

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРНЫХ СВОЙСТВ КАРБОГИДРАЗ

Ковалева Т.А., Холявка М.Г., Битюцкая Л.А., Гречкина М.В.

*Воронежский государственный университет**Воронеж, Россия*

Для исследования особенностей надмолекулярной организации ферментов в настоящее время успешно применяются различные сочетания классических методов биохимического анализа и современные биофизические подходы, в том числе метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Объектом исследований является инулиназа из *Kluyveromyces marxianus Y-303*, которая гидролизует инулин и другие фруктозосодержащие полимеры. Данный фермент может использоваться для получения фруктозы из инулинсодержащего растительного сырья, а изготовленные из инулина фруктозные сиропы применяются в кондитерской промышленности, в лечебном питании, а также для профилактики сахарного диабета, кариеса и ожирения.

Гомогенность фракций фермента и его субъединиц контролировали электрофоретическим анализом. Содержание белка определяли методом Лоури, каталитическую активность энзима измеряли спектрофотометрически. Визуализацию олигомерной структуры инулиназы осуществляли с помощью атомно-силовой микроскопии на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO фирмы НТ-МДТ. Для изучения четвертичной структуры фракции фермента инкубировали с додецилсульфатом натрия (ДСН) в концентрации $3,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. При гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-150 субъединицы выходят двумя пиками, что свидетельствует об асимметричности их строения. Кажущаяся молекулярная масса субъединиц равна 54,8 кДа и 8,4 кДа. Установлено, что они обладают каталитической активностью $1,35 \pm 0,21$ ед/мг и $1,05 \pm 0,23$ ед/мг соответственно.

Нами были получены изображения молекул инулиназы на пластинках свежесколотой слюды. Показано, что данный белок имеет олигомерную структуру и состоит из двух субъединиц, различных по размеру. Длина глобулы намного превышает ее высоту, возможно, что такое уплощение молекулы происходит за счет многоточечного связывания заряженных аминокислотных остатков, расположенных на поверхности белка, с поверхностью слюды. Показано, что высота большей субъединицы (54,8 кДа) превышает высоту малой (8,4 кДа) в 2 раза. При разделении белка на субъединицы происходит изменение их структуры, а следовательно, и размеров по отношению к нативному препарату. При разделении димера инулиназы на мономеры происходит небольшая их компактизация, и субъединицы практически сравниваются по высоте.

Таким образом, результаты экспериментов по гель-хроматографии, электрофорезу и визуализации олигомерной структуры методом атомно-силовой микроскопии, позволяют сделать заключение о том, что четвертичная структура инулиназы *Kluyveromyces marxianus* представлена двумя субъединицами, различающимися по размерам, молекулярной массе и активности. Процессы диссоциации-ассоциации субъединиц, возможно, принимают участие в процессе регуляции каталитической активности данного фермента.