

20. Поширення *Linnaea borealis* L. на території України від пізнього плейстоцену до сучасності // Актуальні проблеми ботаніки та екології: матер. міжнар. конф. молод. вчених. Умань, 9–12 верес. 2014. – Умань, 2014. 6. – С. 56–57.

21. Комар М. Нові дані про фауну та флору пізньопалеолітичної стоянки Бужанка 2 (Середнє Понесення) / М. Комар, Д. Ступак. // Палеонтологічний збірник. – 2011. – № 43. – С. 97–106.

22. Пашкевич Г. А. Палинологическое исследование разреза стоянки Кормань IV / Г. А. Пашкевич // Многослойная палеолитическая стоянка Кормань IV. – М.: Наука, 1977. – С. 105–111.

23. Пашкевич Г. А. Динамика растительного покрова Северо-Западного Причерноморья в голоцене, его изменения под влиянием человека / Г. А. Пашкевич // Антропогенные факторы в истории развития современных экосистем. – М.: Наука, 1981. – С. 74–86.

24. Пашкевич Г. А. Палинологическая характеристика отложений многослойной стоянки Молодова–V. / Г. А. Пашкевич // Многослойная палеолитическая стоянка Молодова–V. Люди каменного века и окружающая среда. – М.: Наука, 1987. – С. 141–151.

25. Сладков А. Н. Определение видов *Lycopodium* L. и *Selaginella* Spring по спорам и микроспорам / А. Н. Сладков // Тр. Ин-та географии АН СССР – 1951. – Вып. 50 – С. 167–199

26. Стратиграфия финального плейстоцена и палеолита долины Днестра (верхи разреза Роксоланы и Буджака) / А. Чепалыга, Н. Герасименко, М. Гладырская [и др.] // Лесовий покрив Північного Причорно-

мор'я // 36. наук. пр. до XVIII українсько-польського семінару. Роксолани, 8–13 верес. 2013 р. – Люблин, 2013. – С. 210–220.

27. Червона книга України. Рослинний світ / за заг. ред. Я. П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.

28. Erdtman G. An introduction to pollen analysis. / G. Erdtman. – Waltham, Mass., USA, 1943. – 239 p.

29. Korniets N. Dobranichivka site. / N. Korniets, M. Komar // The Ukraine Quaternary Explored: the Middle and Upper Pleistocene of the Middle Dnieper Area and its importance for East-West European correlation. – Excursion guide. – Kyiv: IVFQR, 2001 – P. 20–22.

30. Korniets N. Mezhychich site / N. Korniets, A. Velichko, Ju. Gribchenko [et al.] // The Ukraine Quaternary Explored: the Middle and Upper Pleistocene of the Middle Dnieper Area and its importance for East-West European correlation. – Excursion guide. – Kyiv: IVFQR, 2001. – P. 42–48.

31. Mosyakin S. L. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. / S. L. Mosyakin, M. M. Fedoronchuk. – Kiev, 1999. – xxiv + 345 p.

32. Pashkevich G.A. Pollen data of upper Paleolithic site Dobranichivka / G.A. Pashkevich // The Ukraine Quaternary Explored: The Middle and Upper Pleistocene of the Middle Dnieper Area and its importance for the East-West – European correlation. – Kyiv: IUFQR, 2001. – P. 70.

33. Tasenkevich L. Flora of the Carpathians. Checklist of the native vascular plant species. / L. Tasenkevich. – L'viv: State Museum of Natural History of NAS of Ukraine, 1998. – 623 p.

34. DIVA-GIS: <http://www.diva-gis.org>

Надійшла до редколегії 16.03.15

Т. Карпюк, асп., Л. Безусько, канд. биол. наук.

Институт ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины, Киев, Украина,

А. Безусько, канд. биол. наук

Национальный университет "Киево-Могилянская академия", Киев, Украина

ПАЛЕОХОРОЛОГИЯ *SELAGINELLA SELAGINOIDES* (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK И *DIPHASIASTRUM ALPINUM* (L.) HOLUB НА РАВНИННОЙ УКРАИНЕ В ПОЗДНЕМ ДРИАСЕ

Приводятся данные о наличии в спорово-пыльцевых спектрах отложений позднего дриаса равнинной части Украины спор *Selaginella selaginoides* и *Diphasiastrum alpinum*. В настоящее время эти два вида высших споровых растений представлены в третьем издании Красной книги Украины (2009) и участвуют в формировании растительности высокогорий Украинских Карпат. Установлено, что в позднем дриасе (стадиальное похолодание последнее климатического ритма позднеледникового) *Selaginella selaginoides* и *Diphasiastrum alpinum* входили в состав перигляциальных сообществ лесной и лесостепной зон Украины. Полученные палеопалинологические материалы позволили сделать вывод о том, что *Selaginella selaginoides* была распространена как на правобережной, так и левобережной частях этих зон. Распространение *Diphasiastrum alpinum* было ограничено правобережной частью лесной и лесостепной зон Украины. Разработаны первые карты-схемы распространения *Selaginella selaginoides* и *Diphasiastrum alpinum* на территории равнинной Украины в позднем дриасе.

Ключевые слова: палеопалинология, палеохорология, *Diphasiastrum alpinum*, *Selaginella selaginoides*, поздний дриас, Украина.

T. Karpiuk, PhD stud., L. Bezusko, PhD.

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine,

A. Bezusko, PhD.

National University Kiyv-Mohyla Academy, Kyiv, Ukraine

PALEOCHOROLOGICAL STUDIES OF *SELAGINELLA SELAGINOIDES* (L.) P. BEAUV. EX MART. ET SCHRANK AND *DIPHASIASTRUM ALPINUM* (L.) HOLUB IN THE YOUNGER DRYAS WITHIN PLAIN PART OF UKRAINE.

The data on the presence of spores of *Selaginella selaginoides* and *Diphasiastrum alpinum* in the spore-pollen spectra of Younger Dryas sediment within plains part of Ukraine are presented. Currently, these two species are listed in the third edition of the Red Data Book of Ukraine (2009) and are involved in the formation of highlands vegetation of the Ukrainian Carpathians. We found that *Selaginella selaginoides* and *Diphasiastrum alpinum* were part of the periglacial community of the forest, forest-steppe and steppe zones during the Younger Dryas in Ukraine. Paleopalynological materials are shown that *Selaginella selaginoides* was distributed both on the right bank and left-bank parts of these zones. The occurrence of *Diphasiastrum alpinum* was limited to the right-bank part of the forest and steppe zones of Ukraine. As a result of our investigation, the sketch maps of distribution of *Selaginella selaginoides* and *Diphasiastrum alpinum* within the plain part of Ukraine were developed.

Key words: paleopalynology, paleochorology, *Diphasiastrum alpinum*, *Selaginella selaginoides*, Late Dryas, Ukraine.

UDC 577.151.644

D. Gladun, PhD stud., N. Chornenka, stud., S. Ostapchuk, stud., N. Raksha, PhD.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

DERIVATION OF TRYPSIN-LIKE ENZYMES FROM ANTARCTIC MARINE ORGANISMS

Modern biotechnology provides continuous search for alternative sources of raw materials. The aim of this work was to isolate and characterize trypsin-like enzymes from tissues of Antarctic marine aquatic organisms (krill, starfish, nemertines). Trypsin fraction was obtained by column chromatography on benzamidino-Sepharose. Proteolytic activity in the resulting fraction was revealed. Analysis of protein fractions was performed by disc-electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel. The presence of active hydrolases with different molecular weights in the tissues of aquatic organisms was demonstrated. Protein bands with molecular weights below 10-14 kDa may be trypsin-like enzyme fragments that were subjected to autolysis process.

Keywords: marine organisms, trypsin-like enzymes.

Introduction. Most modern biotechnology developments are focused on finding a variety of alternative sources of raw materials for the production of biologically active molecules with directed action, including marine and aquatic organisms [1]. The development of

methods for the preparation of biologically active substances in order to use them to create original effective pharmacological agents with the most promising and important properties for academic research is the main problem of biotechnology. Decisive factor that motivates

the need to find the target molecules of marine aquatic metabolites is the constantly rising price of new pharmacological agents [2], which are based on highly valuable biologically active substances of plant and animal origin. Scarcity and cost of marine aquatic organisms, making cost-effective production of marine biological resources, especially non-traditional, receiving pharmacological substances and creation of original effective biotechnological products. Great interest for pharmaceutical industry is active substances from metabolites of marine organisms – a group of cephalosporin antibiotics, nucleosides nereiztoksin, eledoizin, glycosides, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and many other substances with a different spectrum of pharmacological action. Development of optimal methodological approaches for obtaining and testing proteins of Antarctic organisms for further implementation of these proteins in practical biotechnology is the main interest of this study.

Object and research methods. Antarctic marine aquatic – krill (*Euphasia Superba*), starfish (*Odontaster validus*) and nemertine (*Parborlasia corrugata*) were used as an test objects. Animal tissues were homogenized in

liquid nitrogen, followed by addition of the extraction buffer – 0,1 M Na-phosphate buffer containing 0.15 M NaCl and 0,15 mM (ethylenediaminetetraacetic acid) (EDTA), pH 7.4.) and were separated by centrifugation at 10,000 g at 4° C for 20 min. Supernatant was decanted and lyophilized for storage optimization. Lyophilized samples were dissolved in distilled water and precipitation of the proteins was performed using trichloroacetic acid (25%). Identification of potential trypsin-like protein fraction was performed by disc-electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate [3]. Trypsin fraction was obtained by column chromatography on benzamidine-Sephadex [4]. In order to separate solutions of proteins from non-protein fraction gel filtration chromatography using a Sephadex G-25 was performed [5]. Identification of trypsin-like protein fractions after chromatographic separation was performed by disc-electrophoresis in a 10% polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Proteolytic activity of the studied fractions were determined using as substrate 4% solution of casein in 0.05 M phosphate buferi, pH 7.4.

Results and discussion. Analysis of total protein composition of organisms was performed by disc-electrophoresis polyacrylamide gel.



Fig.1 Results of electrophoretic separation of samples of hydrobionts
1,2 – nemertines; 3,4 – krill; 5,6 – starfish; 7 – molecular weight markers

Electrophoretic analysis revealed the presence of proteins with a molecular weight from 3 to 126 kDa in tissues of marine animal. These results may indicate the presence of variety of enzymes, including trypsin-like enzymes in animal tissues. In order to analyze the amount of trypsin-like enzymes in the samples, we performed chromatographic separation by chromatography on benzamidine-Sephadex. The lyophilized material was dissolved in 2 ml of distilled water and transferred into a 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4 using Sephadex G 25. Fraction was applied to 2 ml Sephadex G 25 equilibrated with 50 mM Na-phosphate buffer, pH 7.4 at 10 ml/min. Protein fractions separation and change of conductivity was monitored using an UV and conductivity sensors. Column with benzamidine-Sephadex was equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0. Protein fraction was applied on the column in a volume of 5 ml with an application rate of 0.5 ml/min. Non-specifically bound proteins were washed out with a standard buffer and trypsin-like enzymes were eluted with 50 mM glycine-HCl buffer, pH 3.0. The speed of all stages of the chromatographic separation was 0.5 ml/min. Changes in absorbance were fixed using a UV sensor at a wavelength of 280 nm.

Figure 2 shows the chromatogram of isolation of trypsin-like enzymes. The fraction of non-specifically bound

proteins (3) and trypsin enzyme fraction (2) were collected, protein concentration was measured using the Bradford method [6]. The test fractions were transferred to 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 using Sephadex G-25, immediately before the measurement of activity.

Measurement of protein content in fraction 2 gave the following result: *Euphausia superba* – $2,9 \pm 0,3$ mg/g sample, *Parborlasia corrugatus* – $1,7 \pm 0,1$ mg/g sample, *Odontaster validus* – $0,8 \pm 0,3$ mg/g. sample. Analysis showed the presence of trypsin-like activity in the fraction №2 and the complete absence of this activity in fractions №1 and №3. Measurement of trypsin-like activity showed results: krill – $4,1 \pm 0,4$ c.u./ g sample, nemertines – $2,8 \pm 0,3$ c.u/g sample, starfish $1,8 \pm 0,3$ c.u/g sample.

Serine proteases are enzymes that cleave peptide bonds in proteins, in which serine serves as the nucleophilic amino acid at the active site. Trypsin-like serine proteases cleave peptide bonds following a positively charged amino acid (lysine or arginine) [7].

For more information about qualitative composition of trypsin-like enzyme fractions in the test samples, electrophoretic separation of the fraction №2 was performed using disc-electrophoresis in polyacrylamide gel with the addition of sodium dodecyl sulfate.

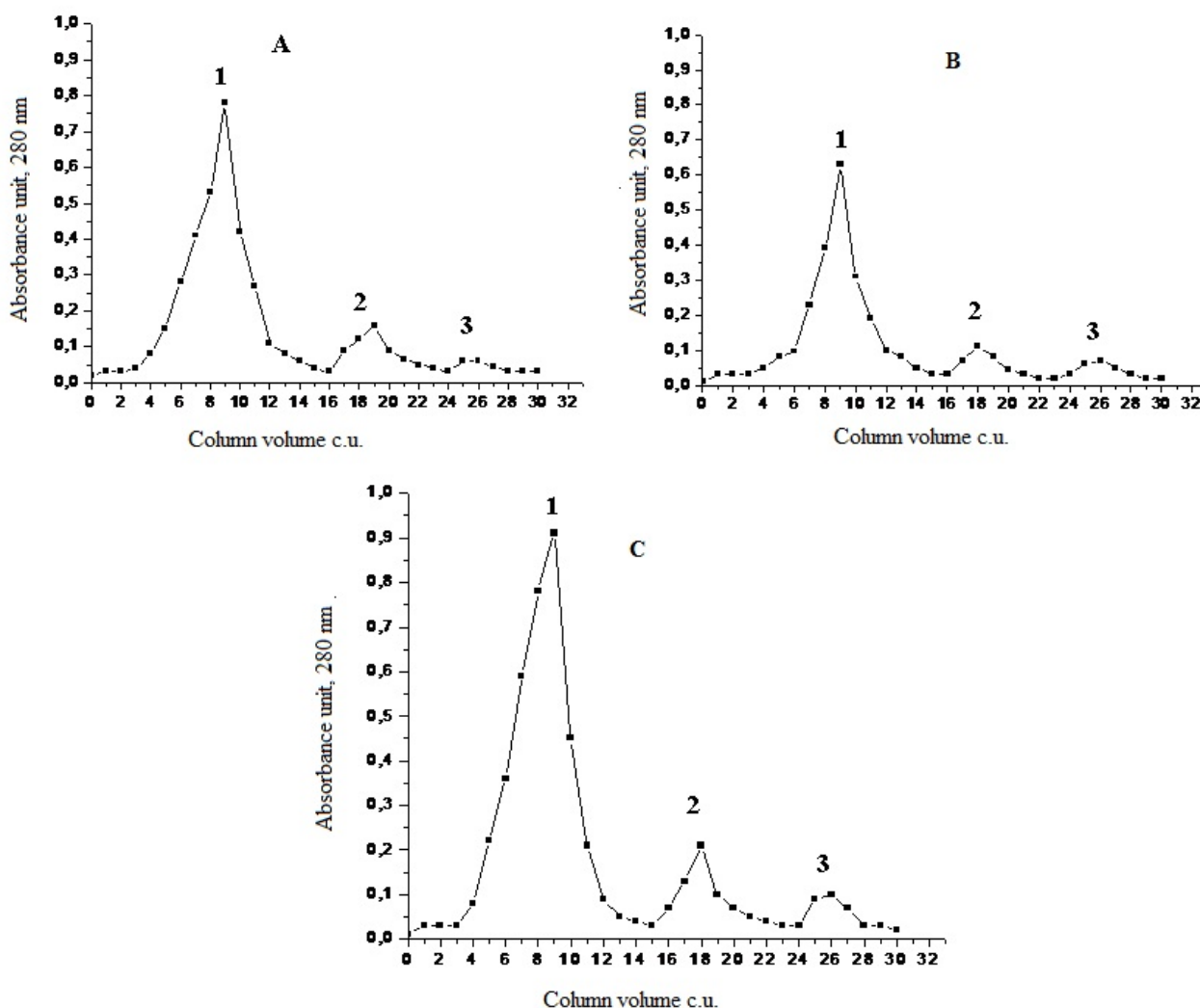


Fig.2 – Chromatogram of separation of samples protein fractions on a column of benzamidine-Sepharose (A – nemertines – *Parborlasia corrugatus*; B – starfish – *Odontaster validus*; V – krill – *Euphausia superba*): 1 – not related stuff; 2 fraction of trypsin-like enzymes; 3 – fraction which was eluted with 1M NaCl

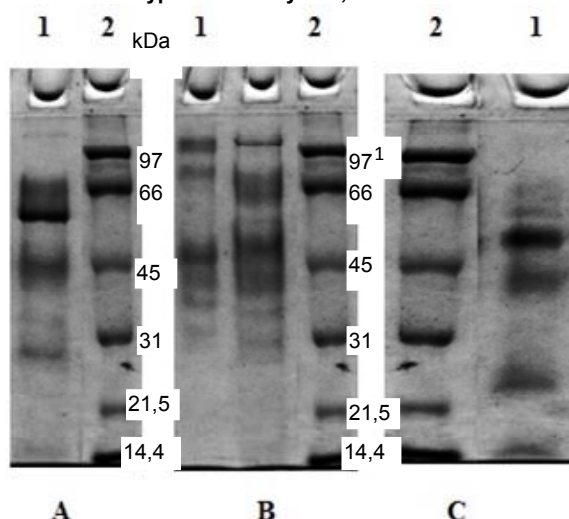


Fig.3. Electrophoregram of separation of trypsin-like fraction obtained from nemertines (A), krill (B) starfish (C) after chromatography on benzamidine-Sepharose: 1 – molecular weight markers (96, 67, 43, 30, 20, 14 kDa) 2 – fraction of trypsin enzymes

As it's indicated in Figure 3, nine bands with different molecular weight were present in trypsin-like enzyme fraction. Protein bands with molecular weight below 10-14 kDa fragments may be trypsin-like enzymes that were subjected to autolysis.

Conclusions. These findings suggest that development of optimal methodological approaches for obtaining and testing trypsin-like enzymes of Antarctic organisms might be used for the creation of potential biotechnological substances which can be used in modern

medical industry in order to create a new generation of pharmacological agents.

References

1. Buchholz F. Metabolic and enzymatic adaptations in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, and Antarctic krill, *Euphausia superba* / F. Buchholz, S. Reinhard // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2000. – Vol. 57. – P. 115–129.
2. Campell D. Debridging ability of a novel multi-enzyme preparation isolated from Antarctic krill (*Euphausia superba*) / D. Campell, L. Hellgren, B. Karlstam // Experientia. – 1987. – Vol. 43. – P. 578–579.
3. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

4. Affinity Chromatography. Principles and Methods. – Sweden: Amersham Pharmacia Biotech AB, 2001. – P. 89–96.

5. Kimoto K. Purification and characterization of serine proteinases from *Euphausia superba* / K. Kimoto, S. Kusama, K. Murakami // Agricultural and biological chemistry Journal. – 1983. – Vol. 47. – P. 529–534.

6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 86. – P. 193–200.

7. Luke B. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection / B. Luke, J. R. Vásquez, C. S. Craik // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – Vol. 87 (17). – P. 63.

Надійшла до редколегії 24.03.15

Д. Гладун, асп., Н. Чорненька, студ., С. Остапчук, студ., Н. Ракша, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОТРИМАННЯ ФРАКЦІЙ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ З АНТАРКТИЧНИХ МОРСЬКИХ ОРГАНІЗМІВ

Сучасна біотехнологія потребує постійного пошуку альтернативних джерел сировини. Мета проведеної роботи – виділити та охарактеризувати трипсиноподібні ферменти морських антарктичних гідробіонтів (криль, морська зірка, немертина). Ідентифікацію трипсиноподібних ферментів проводили методом диск-електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі. Фракцію трипсиноподібних ферментів отримували шляхом афінної хроматографії на колонці з бензамідин-сефарозою. Показано присутність у тканинах досліджуваних гідробіонтів активних гідролаз з різними молекулярними масами. Білкові смуги з молекулярною масою нижче 10-14 кДа можуть бути фрагментами трипсиноподібних ферментів, які зазнали процесу автолізу.

Ключові слова: морські організми, трипсиноподібні ферменти.

Д. Гладун, асп., Н. Чорненька, студ., С. Остапчук, студ., Н. Ракша, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПОЛУЧЕНИЕ ФРАКЦИИ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ АНТАРКТИЧЕСКИХ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Современная биотехнология требует постоянного поиска альтернативных источников сырья. Цель проведенной работы – выделить и охарактеризовать трипсиноподобные ферменты морских антарктических гидробионтов (криль, морская звезда, немертина). Идентификацию трипсиноподобных ферментов проводили методом диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Фракцию трипсиноподобных ферментов получали путем аффинной хроматографии на колонке с бензамидин-сефарозой. Показано присутствие в тканях исследуемых гидробионтов активных гидролаз с различными молекулярными массами. Белковые полосы с молекулярной массой ниже 10-14 кДа могут быть фрагментами трипсиноподобных ферментов, которые подверглись процессу автолиза.

Ключевые слова: морские организмы, трипсиноподобные ферменты.

УДК 581.135.51

С. Ковтун-Водяницька, канд. біол. наук, О. Вергун, канд. біол. наук
Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України, Київ

АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ НАДЗЕМНОЇ ЧАСТИНИ ІНТРОДУЦЕНТІВ РОДУ *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

Визначено сумарну антиоксидантну активність надземної частини рослин *Isodon japonicus* (Burman) H. Nara та *I. japonicus* (N. Z. Burm) Nara var. *glauco-salux* (Maxim.) H. W. Li, інтродукованих в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп). Використано спектрофотометричний метод зі спиртовим розчином радикалу DPPH. Досліджено зразки сировини інтродуцентів, екстраговані водою, метанолом, етанолом. Найвищу антиоксидантну активність рослин отримано в метанолі 82-83%. Відмічено, що фаза розвитку рослин не мала кардинального впливу на отриманий результат. Встановлено високу загальну антиоксидантну активність представників роду *Isodon*, інтродукованих в Україні. Отримані результати дозволяють розглядати їх як потенційне джерело сировини для створення продукції зі спрямованою антиоксидантною дією.

Ключові слова: інтродуценти, *Isodon*, антиоксидантна активність, DPPH-метод.

Вступ. Збереження рослинного біорізноманіття (видового, генетичного, екологічного) та його раціональне використання і надалі не втрачає своєї актуальності, а навпаки, постає на часі гостріше. Суттєво зменшити навантаження на природні популяції рослин, які експлуатуються людиною, дозволяє інтродукційна робота. В останні 10-15 років відмічається тенденція пошуку та використання рослин, які вирізняються поліфункціональними властивостями. Це спонукає в інтродукційних дослідженнях до одночасного багатовекторного вивчення окремо взятого виду рослин, до виявлення та оцінки сукупних господарсько-цінних ознак. Сьогодні одним із трендових напрямків у дослідженні корисних властивостей рослин є встановлення їх позитивної дії на організм людини, зокрема антиоксидантної активності. Адже згідно останніх даних ВОЗ близько 80% населення планети, як і раніше, спирається на використання

лікарських засобів рослинного походження [1]. Іншим, не менш важливим аспектом у дослідженнях є те, що на думку вчених активність антиоксидантної системи рослин може використовуватися для оцінки ступеню їх стресу і адаптації до несприятливих умов зростання [2].

Цікавим об'єктом в цьому розрізі постає рід *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach родини *Lamiaceae* Lindley. На сьогодні в межах роду *Isodon* нараховують 117 видів і внутрішньовидових таксонів, які поширені переважно в тропічній і субтропічній Азії з центром різноманіття в південно-західному Китаї та 2 види – в тропічній Африці. Види даного роду достатньо рідко представлені в ботанічних колекціях Європи, практично невідомі в Україні. Однак вони мають тривалу історію використання в країнах Азії, насамперед в якості рослин-цілительів: сировина окремих видів активно використовується в народній ме-