

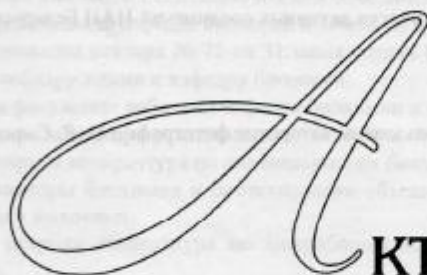


УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ГРОДНЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ЯНКИ КУПАЛЫ»

UNIwersytet w Białymstoku

ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«БЕЛОРУССКИЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ СОЮЗ»

ГРОДНЕНСКИЙ ДОМ НАУКИ И ТЕХНИКИ



АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЭКОЛОГИИ

Материалы X международной
научно-практической конференции

(Гродно, 1 – 3 октября 2014 г.)

В 2 частях
Часть 1

Гродно
ГрГУ им. Я. Купалы
2014

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ Ni (II) И Mn (II) НА РАСЩЕПЛЕНИЕ
БЕЛКОВ-СУБСТРАТОВ ПРОТЕИНАЗАМИ

Ионы металлов играют важную роль в организации живых организмов и их функциональной деятельности. Среди металлов имеется целый ряд таких, образно говоря, двойного действия. К ним, в частности, относятся ионы никеля и марганца. Они являются истинными биоэлементами: входят в состав весьма многочисленных белков, включая ферменты, играют роль кофакторов ферментных реакций, способны образовывать комплексы с биомолекулами. Достаточно упомянуть митохондриальную Mn-супероксиддисмутазу [1] или ряд Ni-содержащих ферментов углеродного цикла [2].

Вместе с тем, в высоких концентрациях ионы этих металлов вызывают серьезные нарушения функциональной деятельности систем и органов, вызывая отравления. Так, например, отравление марганцем влечет развитие нейродегенеративных заболеваний [3], а порой сопровождается чрезвычайно грозным осложнением – отеком мозга, нередко ведущим к летальному исходу.

Влияние ионов никеля и марганца на биохимические и физиологические процессы изучается достаточно давно. Однако многолетние исследования влияния их на биохимические процессы пока еще не дают основания считать механизм действия этих ионов исчерпывающе ясным.

До сих пор никто из исследователей, судя по имеющейся литературе, не обращался к изучению влияния солей этих металлов на систему протеолиза – один из важнейших механизмов регуляции биохимических процессов организма и функциональной активности его органов и тканей, в частности – на активность протеиназ, хотя недавно установлено, что ионы Ni(II) способны гидролитически расщеплять пептидную связь, предшествующую в олигопептидах остатку Ser/Thr [4].

Цель настоящей работы – раскрыть особенности изменения протеолитической активности трипсина, α -химотрипсина и папаина в присутствии NiCl₂ или MnCl₂.

Материалы и методы. В работе использованы образцы трипсина (КФ 3.4.21.4), α -химотрипсина (КФ 3.4.21.1) фирмы «Sigma» (США), папаина (КФ 3.4.22.2) фирмы «Fluka» Швейцария, бактоагар типа «Difco» («Fergak», Германия); гемоглобин быка («Serva»). Казеин по Гаммерстену и другие реактивы квалификации «хч» или «чда» были производства стран СНГ.

Протеолитическую активность определяли по лизису казеина, гемоглобина в тонком слое агар-агара как подробно описано ранее [5, 6]. В качестве растворителя при приготовлении белок-агаровых пластин использовали 0,15 М раствор NaCl pH 7,4 или 0,06 М фосфатный буфер pH 7,4. Концентрация белков

составляла 10 г/л, агар-агара – 10 г/л. В качестве растворителя для приготовления белково-агаровых пластин использовали деионизированную воду, в которую добавляли aliquоты $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ или хлорида натрия.

К растворам протеиназ (мг/мл) добавляли равный объем растворов NiCl_2 или MnCl_2 до конечной концентрации солей от 10^{-8} до 10^{-2} М и через 10 мин наносили на готовые белок-агаровые пластины. Пластины с нанесенными пробами (10 мкл) инкубировали при 37 °С в течение 20 часов. Зоны лизиса визуализировали обработкой белок-агаровых пластин 1 н HCl . Все исследования выполнены не менее чем трехкратно, результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента. Далее в тексте указаны только значимые изменения при $P \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Катионы никеля и марганца оказали весьма заметное действие на активность исследованных протеиназ (пример на рисунке). Причем, в ряде случаев концентрационная зависимость носила сложный характер.

NiCl_2 . В растворе NaCl наиболее сильное подавление ($\geq 80\%$) активности химотрипсина (рисунок, А) и папаина (не показано) выявлено при расщеплении гемоглобина даже при минимальных концентрациях хлорида никеля. При использовании в качестве субстрата казеина активность протеиназ подавлялась слабее, а в случае трипсина даже возросла на 16 % (не показано). При расщеплении казеина химотрипсином отмечена сложная концентрационная зависимость (рисунок, А).

В фосфатном буфере эффекты ионов никеля также наиболее сильно проявились при расщеплении гемоглобина (например, рисунок, Б). Однако в случае трипсина при двух минимальных концентрациях отмечено усиление протеолиза в 2,7 и 4,1 раза (не показано). Расщепление гемоглобина папаином в этих условиях при максимальных концентрациях катиона даже возросло на 30–40 %.

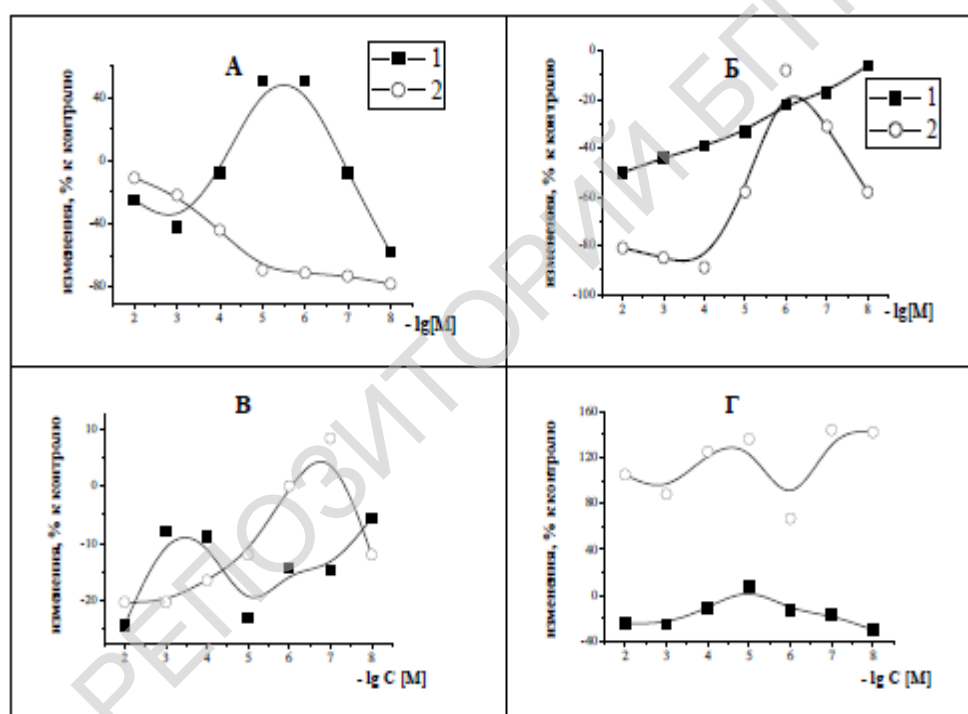


Рисунок – Влияние ионов Ni^{2+} (А, Б) или Mn^{2+} (В, Г) на расщепление казеина (1) или гемоглобина (2) химотрипсином в 0,15 М растворе NaCl pH 7,4 (А, В) или 0,06 М фосфатном буфере pH 7,4 (Б, Г)

MnCl_2 . В растворе NaCl при максимальной концентрации катиона выявлено усиление расщепления гемоглобина трипсином на 50 % (не показано). В сравнении с ионами никеля, катионы марганца в этих условиях вызвали менее резкие изменения протеолиза, как правило, не превышавшие $\pm 20\%$ (рисунок, В).

В фосфатном буфере изменения расщепления обоих белков, не превышавшие $\pm 20\%$, были характерны лишь для трипсина. При исследовании химотрипсина и папаина они более значительны, причем в случае химотрипсина расщепление гемоглобина усилилось даже при минимальных концентрациях эффектора в 2,4 раза (рисунок, Г).

Следовательно, ионы никеля и марганца заметно влияют на расщепление белковых субстратов протеиназами. Это влияние зависит от расщепляемого белка и изменяется в присутствии ионов

неорганического ортофосфата. Изложенные материалы вносят серьезный вклад в понимание путей реализации и регуляторного и токсического действия никеля и марганца, а также дают основания для дальнейших исследований эффектов катионов никеля и марганца на протеолитические процессы на молекулярном, клеточном и иных уровнях организации биологических систем, что составляет задачу наших работ в перспективе.

Список литературы

1. Marklund, St. Gene coded for interleukin-2 polypeptide, recombinant DNA carrying the said gene, a living cell line possessing the recombinant DNA, and method for producing interleukin-2 using the said cell / St. Marklund // *Biochem. J.* – 1984. – Vol. 222. – P. 649–655.
2. Boer, J. L. Nickel uptake and utilization by microorganisms / J. L. Boer, S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2014. – Vol. 544. – P. 142–152.
3. Avila, D. S. Manganese in health and disease / D. S. Avila, R. L. Puntel, M. Aschner // *Met. Ions. Life Sci.* – 2013. – Vol. 13. – P. 199–227.
4. Protas, A. M. Sequence-specific Ni(II)-dependent peptide bond hydrolysis for protein engineering: Active sequence optimization / A. M. Protas, H. N. Ariani, A. Bonna et al. // *J. Inorg. Biochem.* – 2013. – Vol. 127. – P. 99–106.
5. Никандров, В. Н. Расщепление белков внутриклеточными протеиназами *Corynebacterium diphtheriae*: влияние группоспецифических ингибиторов и перекватчиков активных форм кислорода / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова, Н. С. Шалчиц // Доклады НАН Беларуси. – 2007. – Т. 51, № 3. – С. 93–98.
6. Никандров, В. Н. Методы исследования протеолиза. Глава 5 / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Современные проблемы биохимии. Методы исследований.* – Минск: Выш. шк. – 2013. – С. 132–157.

At first the effects of Ni²⁺ and Mn²⁺ cations at casein and hemoglobin cleavage by trypsin, chymotrypsin or papain were demonstrated. These effects were dependent on the inorganic phosphate ions presence.

Никандров В. Н., Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка, Минск, Беларусь, e-mail: nikandrov.vitaly@gmail.com

Ильюкевич В. Н., Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка, Минск, Беларусь.

Петрова Е. И., Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка, Минск, Беларусь.

УДК 661.746.56

О. В. Павлова, Т. П. Троцкая

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УГЛЕРОДНОГО СУБСТРАТА НА СИНТЕЗ БИОМАССЫ *ASPERGILLUS NIGER*

Сухой мицелий *Aspergillus niger* содержит свыше 46 % углерода, который составляет основу всех важнейших веществ мицелия, образующихся в результате обмена веществ между гетеротрофным организмом гриба и питательной средой. Лучшим источником углерода для роста и формирования кислотообразующего мицелия являются углеводы. Углерод используется для синтеза клеточных веществ, дыхания и образования органических кислот. Оптимальная концентрация сахара для сбраживания его в лимонную кислоту зависит от свойств штамма, питательной среды, физико-химических условий и методов культивирования.

Концентрация сахара влияет на скорость ферментативной реакции до тех пор, пока весь фермент не насыщен субстратом, вследствие того, что ферментов в клетке мало, они насыщаются при низкой концентрации сахара, однако исходная концентрация сахара влияет на степень его использования [1].

Меласса, используемая в качестве субстрата для микробиологического синтеза лимонной кислоты, является сложной многокомпонентной системой, включающей сахарозу, безазотистые органические вещества, азотистые минеральные вещества, биогенные стимуляторы, обуславливающие высокое осмотическое давление среды и высокую буферность. Эти свойства мелассы являются препятствием для роста, развития и ферментации в лимонную кислоту более концентрированных растворов, приготовленных из мелассы. Свекловичная меласса характеризуется высоким содержанием сахаров (46–55 %), из которых преобладает сахароза. Меласса, содержит в различных концентрациях вещества как активизирующие, так и ингибирующие процесс биосинтеза, режимы подготовки мелассы к ферментации необходимо выбирать на основании опытных лабораторных данных.

РЕПОЗИТОРИЙ БГПУ