

ISSN 1810-5033

**НОВОСТИ
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
НАУК**

**NEWS
OF BIOMEDICAL SCIENCES**

Научно-практический и научно-теоретический журнал

Издается с 2001 года

Выходит четыре раза в год

№ 4, 2009

Минск

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

В. С. Улащик (главный редактор),
В. А. Кульчицкий (зам. главного редактора), А. Г. Чумак (зам.
главного редактора), А. В. Сидоров (ответственный секретарь),
Л. И. Арчакова, Ф. И. Висмонт, С. Л. Кабак, В. Н. Калюнов, Л. М. Лобанок,
А. С. Медведев, А. Г. Мрочек, В. Н. Никандров, Е. И. Слобожанина,
В. В. Солтанов, Н. Ф. Сорока, С. Н. Черенкевич

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

К. В. Анохин (Москва, Россия), Ю. А. Владимиров (Москва, Россия),
А. И. Григорьев (Москва, Россия), Р. А. Григорьян (Санкт-Петербург,
Россия), Д. П. Дворецкий (Санкт-Петербург, Россия), В. В. Зинчук (Гродно,
Беларусь), Ю. Д. Игнатов (Санкт-Петербург, Россия), П. Г. Костюк (Киев,
Украина), А. И. Кубарко (Минск, Беларусь), В. А. Матюхин (Москва, Рос-
сия), А. Д. Ноздрачев (Санкт-Петербург, Россия), Г. Н. Пономаренко (Санкт-
Петербург, Россия), А. Н. Разумов (Москва, Россия), В. Ф. Сагач (Киев,
Украина), В. О. Самойлов (Санкт-Петербург, Россия), И. Н. Семененя
(Минск, Беларусь), А. П. Солодков (Витебск, Беларусь), К. В. Судаков
(Москва, Россия), В. А. Труфакин (Новосибирск, Россия), G. Burnstock
(United Kingdom), M.-A. Custaud (France), N. Dale (United Kingdom),
D. Djuric (Serbia), R. Gerstberger (Germany), M. J. Kluger (USA), K. M. Spyer
(United Kingdom), M. Szekely (Hungary), W. Winlow (United Kingdom)

Адрес редакции:

*Институт физиологии НАН Беларуси, к. 203, ул. Академическая, 28,
220072, г. Минск, Республика Беларусь
Тел./Факс: (375) 17 284-16-30
Электронная почта: biblio@fizio.bas-net.by*

© Институт физиологии НАН Беларуси
© Новости медико-биологических наук

УДК 577.122.2 : 577.152.34

В. Н. НИКАНДРОВ^{1,2}, В. А. КОЛОС², О. К. КУПЧЕНКО²

ПРОТЕОЛИЗ БЕЛКОВЫХ СУБСТРАТОВ В ГЕТЕРОГЕННОЙ СИСТЕМЕ: ДИНАМИКА БЕЛКА И ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ В РАСТВОРИМОЙ ФАЗЕ

¹ – Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

² – НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ Республики Беларусь, Минск, Беларусь

Особенности расщепления белков протеиназами далеки от исчерпывающей ясности, несмотря на исследования, ведущиеся в многочисленных научных центрах мира на протяжении ряда десятилетий. Более того, изучение протеолитических реакций даже с использованием белков субстратов проводят в подавляющем большинстве случаев на гомогенных системах – полностью растворимых компонентах. Однако подобный подход не всегда отражает реальную ситуацию. Так, процесс пищеварения даже после прохождения измельченных питательных субстратов через желудок вряд ли протекает в истинно гомогенной системе. Переработка белкового сырья с целью получения различных гидролизатов также ведется в системах, не являющихся гомогенными.

Между тем подобные гидролизаты необходимы прежде всего для наработки разнообразных микробиологических питательных сред, включая среды специального назначения, без которых невозможна бактериологическая диагностика инфекционных заболеваний. Подобные среды в настоящее время в Республике Беларусь не выпускаются, почти все они закупаются за рубежом. Гидролизаты различных белковых субстратов, позволяющие обеспечить физиологические потребности микробных клеток, в первую очередь, в источниках азота – аминокислотах, олигопептидах, составляют основу большинства питательных сред для патогенных микроорганизмов, в том числе при производстве вакцинного материала, токсинов, иных продуктов их жизнедеятельности. Ведущие мировые производители питательных микробиологических сред (например “Merk”, “Fluka”, “bioMerieux”) работают с гидролизатами нескольких типов из различного сырья.

В 1996–1997 г. в лаборатории биохимии НИИ эпидемиологии и микробиологии Миздрава Республики Беларусь осуществлена разработка отечественных основ питательных сред (перевара Хоттингера, пептона Мартена) для микробиологической диагностики дифтерии [1].

Как мы уже отмечали ранее [2], проблема протеолитического гидролиза в микробной биотехнологии занимает чрезвычайно важное место. Тем не менее теоретические аспекты этой проблемы до сих пор представляются весьма запутанными, что отражает даже отсутствие единой терминологии и общепринятой классификации гидролизатов белковых субстратов. Характер используемого субстрата существенно определяет свойства получаемого продукта, а также влияет и на процесс гидролиза непосредственно.

В силу этих обстоятельств были проведены [2] углубленные исследования динамики накопления общего и аминного азота, тирозина и триптофана в супернатантах при расщеплении энзимами ткани поджелудочной железы в соответствии с [3] при различных режимах гидролиза четырех белковых субстратов: 1) фарша говяжьего (из мяса высшего сорта) после его варки; 2) фарша сердца крупного рогатого скота; 3) технического казеина высшего сорта; 4) казеина по Гаммерстену.

Во многих случаях принято характеризовать белковый гидролизат прежде всего по концентрации общего и аминного азота. Однако для роста популяции патогенных микроорганизмов очень часто определяющее значение имеет пептидный состав питательных сред, на что обращают внимание зарубежные производители.

Цель настоящей статьи – изучение динамики белка и пептидных фракций водорастворимых супернатантов панкреатических гидролизатов перечисленных видов белкового сырья.

Материалы и методы. Как и в предыдущей работе [2], в качестве белковых субстратов использовали жилованную свежую говядину высшего сорта, сердце и поджелудочную железу крупного рогатого скота, казеин технический высшего сорта и казеин по Гаммерстену. Животные ткани при необходимости хранили при температуре – 40 °С.

Особенности этих субстратов заключаются в том, что оба фарша – субстраты, лишенные легкорастворимой водной фракции, содержащие лишь термостабильные протеолитические энзимы. Технический казеин – субстрат, содержащий преимущественно один вид белка (несколько фракций) и лишенный собственных протеиназ. Все эти субстраты образуют в водной среде гетерогенную систему. Казеин по Гаммерстену близок к техническому казеину, но в водно-солевой среде он способен давать систему, близкую к гомогенной.

Говяжье мясо либо сердце, поджелудочную железу освобождали от пленок, жил, жировой ткани и других посторонних включений и измельчали на мясорубке в фарш. Фарш говядины или сердца помещали в эмалированную посуду, заливали холодной водопроводной водой. Полученную смесь доводили до кипения и варили в течение 15 мин. После остывания смеси до 50 °С ее помещали в колбу, закрывали ватно-марлевыми пробками. При температуре 40–45 °С в содержимом колбы измеряли рН и доводили его до нужной величины, используя 20 %-ный раствор NaOH и 50 %-ный раствор HCl. Затем добавляли свежеприготовленный фарш поджелудочной железы, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре. В течение не менее 3 ч осуществляли коррекцию значения рН смеси через каждые 30 мин. При незначительном изменении рН смеси в течение 30 мин в колбу добавляли хлороформ (3% от объема смеси). Закрытые ватно-марлевыми пробками колбы помещали в термостат при температуре 37 °С.

В процессе гидролиза ежедневно на протяжении семи суток корректировали значения рН смеси и отбирали пробы. Надосадочную жидкость гидролизной смеси получали путем центрифугирования отобранных ее аликвот при 6000 об/мин в течение 30 мин после тщательного перемешивания содержимого. Супернатант осторожно отсасывали и использовали для анализа.

В случае гидролизата казеина навеску сухого вещества заливали теплой (~ 45 °С) дистиллированной водой. К смеси добавляли NaHCO₃ и оставляли для набухания на 3 ч. Содержимое колбы часто и тщательно перемешивали во избежание «склеивания» казеина в пленку на поверхности воды. Затем измеряли рН содержимого колбы и доводили его до нужной величины. После установления необходимого рН добавляли фарш поджелудочной железы и далее процесс проводили идентично гидролизу мяса и сердца. Учитывая ранее полученные нами материалы о широком диапазоне рН для протеолитической активности трипсина, о повышении фибринолитической активности трипсина и α -химотрипсина в присутствии солей меди (II) [4], гидролиз вели в четырех вариантах: при рН 8,0, как общепринято при панкреатическом гидролизе [5], при рН 8,0 в присутствии солей меди (II), при рН 5,0 и при рН 5,0 с добавлением Cu²⁺.

В супернатантах гидролизной смеси выделяли фракции общего белка и пептидов путем осаждения растворами трихлоруксусной кислоты различной концентрации и фосфорномолибденовой кислоты [6] с последующим определением пептидов биуретовым методом [7]. Каждый вариант был изучен не менее трех раз. Результаты подвергнуты статистической обработке с вычислением средней арифметической величины и погрешности по общепринятым методам для малых выборок [8].

Результаты и обсуждение. Используемое белковое сырье и режимы гидролиза оказали существенное влияние на динамику состава жидкой фазы (супернатанта) гидролизной смеси.

Фарш говядины. В первые 24 ч гидролиза максимальное содержание белка в супернатантах панкреатических гидролизатов было характерно для варианта «рН 8+Cu²⁺», а наименьшее – для варианта «рН 5+Cu²⁺». Последний в 3,2–4,4 раза уступал остальным вариантам, и в нем уровень белка нарастал до максимума в течение 48 ч. Однако и здесь он уступал по величине остальным вариантам в начальной точке процесса. Панкреатический гидролиз говяжьего фарша сопровождался снижением на 65–89 % уровня белка в супернатантах на протяжении первых трех суток (рис. 1 а). На 4–5-е сутки наблюдался рост его уровня в супернатантах гидролизатов: в случае варианта «рН 8» он фактически мало отличался от такового в начальной точке гидролиза. В варианте «рН 8+Cu²⁺» такое увеличение было существенно меньшим и не превышало половины от величины в начальной точке гидролиза. Варианты гидролиза в присутствии ионов меди в этом

плане были менее демонстративны, хотя и в них отмечен прирост концентрации белка в период 5–7 сут. В конце процесса не выявлено принципиальных различий по уровню белка между всеми четырьмя вариантами. Однако в присутствии ионов меди этот уровень был ниже на 23–29 %.

Содержание высокомолекулярных пептидов при всех режимах панкреатического гидролиза в первые 5 сут колебалось в пределах ± 40 –80% (рис. 1 б). Лишь в варианте «рН 5+Cu²⁺» на 4-е сутки этот уровень возрастал в 2,8 раза по сравнению с предыдущими сутками. На 6–7-е сутки уровень высокомолекулярных пептидов при первых трех режимах гидролиза возрастал в 2,0–4,5 раза, достигая в варианте «рН 8+Cu²⁺» максимальной величины.

По содержанию среднемолекулярных пептидов в начальной точке гидролиза варианты различались в ~ 3 раза (рис. 1 в): от минимального в варианте «рН 8» до максимального в варианте «рН 5». При этом в процессе панкреатического гидролиза в отсутствие ионов меди концентрация среднемолекулярных пептидов нарастала к 6–7-м суткам в 1,26–2,90 раз, достигая максимальных значений при режиме «рН 5». На всем протяжении процесса для варианта гидролиза «рН 8+Cu²⁺» были характерны относительно небольшие колебания по сравнению с начальной точкой: ± 60 %, тогда как для варианта «рН 5+Cu²⁺» – уровни этой фракции пептидов, превышавшие исходную величину.

Наименьшая исходная величина содержания низкомолекулярных пептидов была присуща варианту «рН 8», тогда как гидролиз при рН 5,0 обусловил увеличение их концентрации в начальной точке в 6,4 раза. Во всех случаях в ходе гидролиза уровень этой фракции пептидов возрастал (рис. 1 г). Причем в варианте «рН 8» – в 11,8 раза, а в обоих вариантах «рН 5» – в 2,2 раза. Максимальная концентрация этой фракции пептидов к концу гидролиза отмечена в варианте «рН 5». Ранее описанная динамика аминного азота в кислой среде [2] однотипна с усилением накопления средне- и низкомолекулярных пептидов, а в присутствии ионов меди – с угнетением этого процесса, хотя добавление Cu²⁺ при рН 8 сопровождалось определенной активацией расщепления белков.

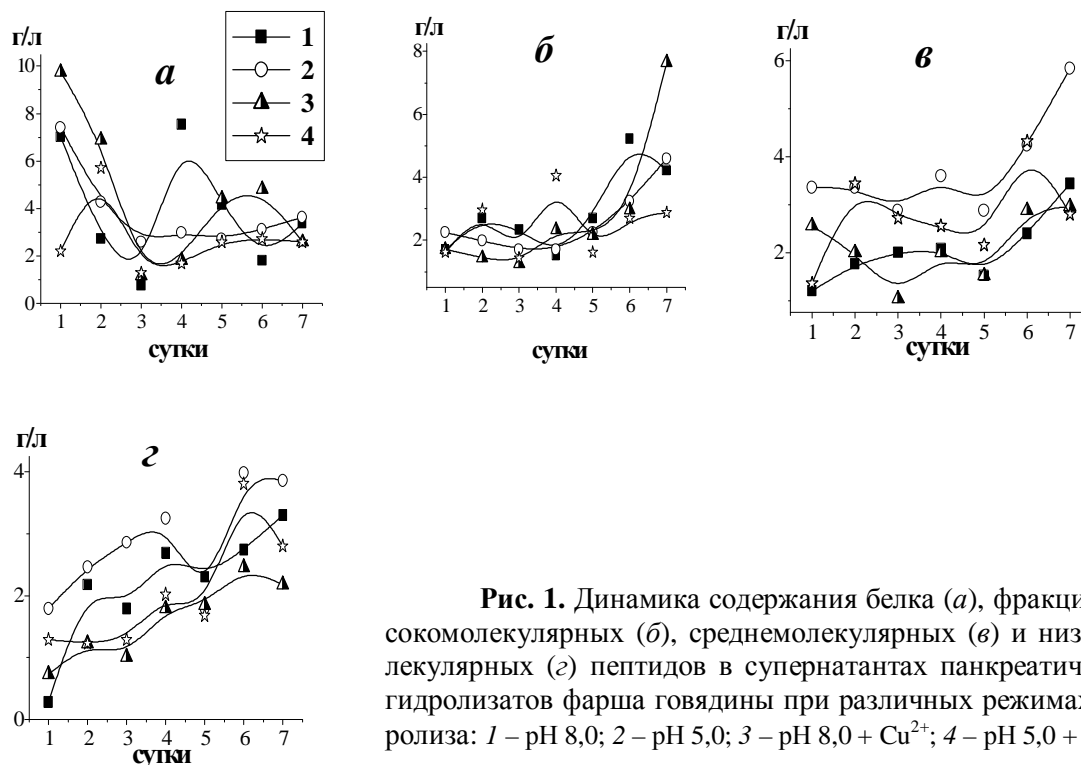


Рис. 1. Динамика содержания белка (а), фракций высокомолекулярных (б), среднемолекулярных (в) и низкомолекулярных (г) пептидов в супернатантах панкреатических гидролизатов фарша говядины при различных режимах гидролиза: 1 – рН 8,0; 2 – рН 5,0; 3 – рН 8,0 + Cu²⁺; 4 – рН 5,0 + Cu²⁺

Фарш сердца. В отличие от предыдущего субстрата панкреатический гидролиз фарша сердца сопровождался неуклонным падением уровня белка в супернатантах гидролизатов (рис. 2 а). При этом в начальный период гидролиза более низким содержанием белка отличались супернатанты варианта «рН 5», тогда как остальные варианты принципиальных различий не имели. В ходе гидролиза в супернатантах снижалась концентрация белка при режимах «рН 8» и «рН 5» на 90–95 %, а при добавлении в гидролизную смесь ионов меди – на 81 и 75 %. По завершении гидролиза минимальный уровень белка отмечен в варианте «рН 5», а в супернатантах, содержащих ионы меди гидролизатов – в 4,3–6,0 раз более высокий.

В начальной точке гидролиза варианты принципиально не различались по содержанию в супернатантах фракции высокомолекулярных пептидов: оно колебалось от 1,14 до 1,74 г/л. Динамика этой фракции пептидов в процессе гидролиза у различных вариантов также не различалась (рис. 2 б): отмечен рост уровня этих пептидов на 5-е сутки в 2,1–4,5 раза. Наиболее выражен он был в вариантах «рН 8» и «рН 8+Cu²⁺». По окончании гидролиза уровень высокомолекулярных пептидов при различных вариантах режима существенно не отличался. Однако в сравнении с начальной точкой гидролиза их концентрация в варианте «рН 8+Cu²⁺» выросла почти вдвое, тогда как в сопоставлении с максимальной величиной показателя (5-е сутки) наибольшее падение (в 4,3 раза) выявлено в варианте «рН 8». В остальных же вариантах это падение составило 2,4–2,7 раза.

Сложный характер имела динамика среднемoleкулярных пептидов (рис. 2 в). Наиболее богаты ими в начальной точке гидролиза были супернатанты варианта «рН 8». Они превосходили остальные варианты в 1,8–2,3 раза. В ходе гидролиза супернатанты этого варианта заметно обеднялись среднемoleкулярными пептидами. Лишь по окончании процесса в этом варианте вновь наблюдался рост их уровня до 70 % исходной величины. Ко 2-м суткам уровень среднемoleкулярных пептидов увеличился в супернатантах гидролизатов вариантов «рН 5» и «рН 5+Cu²⁺» в 1,5 и 3,4 раза соответственно с последующим резким снижением в 2,3 и 5,7 раз соответственно. В этих вариантах в интервале 4–5 сут выявлено повторное повышение содержания среднемoleкулярных пептидов. Причем в варианте «рН 5» оно было максимальным. Сходная с этим вариантом динамика наблюдалась и при режиме «рН 8+Cu²⁺». В конечной же точке гидролиза наиболее богатыми среднемoleкулярными пептидами были супернатанты вариантов «рН 8» и «рН 5», а минимальная концентрация (в 3,3 раза ниже) была характерна для варианта «рН 5+Cu²⁺». Несмотря на колебательный характер динамики содержания пептидов этой фракции в ходе гидролиза, уменьшение их уровня по окончании процесса выявлено лишь в варианте «рН 5+Cu²⁺».

Динамика же низкомолекулярных пептидов была близка к таковой высокомолекулярной пептидной фракции (рис. 2 г) с той лишь разницей, что в начальной точке гидролиза содержание этих пептидов в вариантах «рН 5» и «рН 8+Cu²⁺» различалось почти вдвое, а к 5-м суткам максимальный уровень их обнаружен в варианте «рН 5». Он на 20–39 % превосходил содержание этой фракции пептидов в остальных вариантах. В конечной точке гидролиза концентрация низкомолекулярных пептидов резко падала в сравнении с начальной точкой процесса, за исключением варианта «рН 8+Cu²⁺». Минимальным уровнем их отличался вариант «рН 5+Cu²⁺».

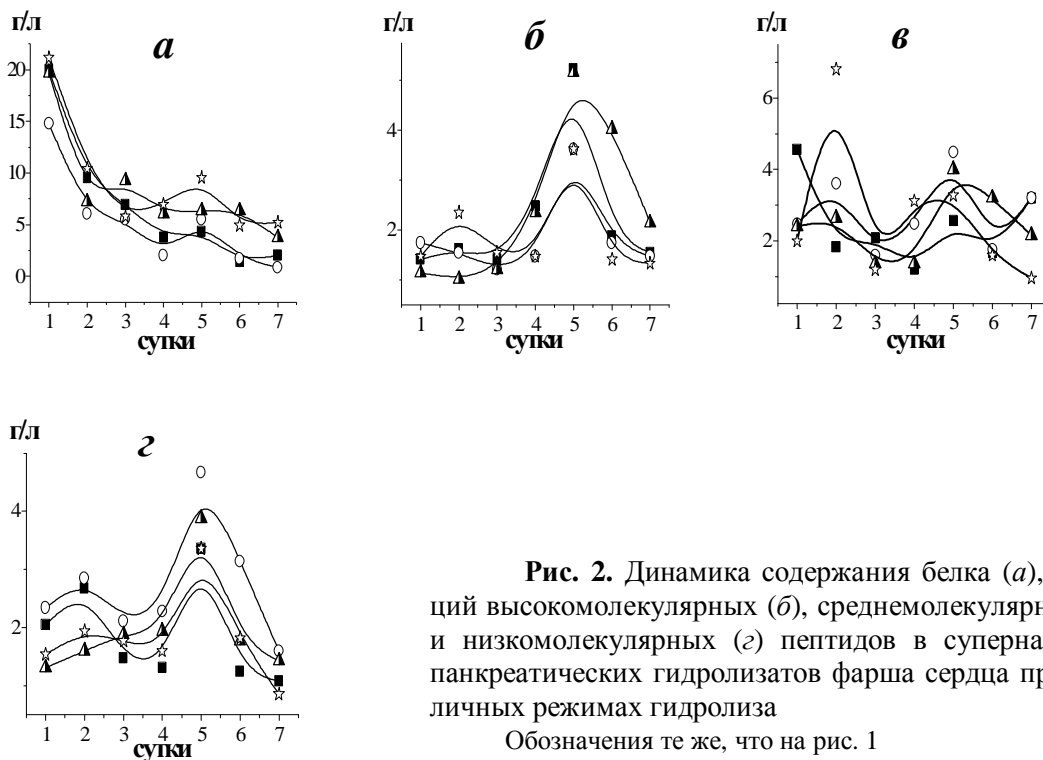


Рис. 2. Динамика содержания белка (а), фракций высокомолекулярных (б), среднемoleкулярных (в) и низкомолекулярных (г) пептидов в супернатантах панкреатических гидролизатов фарша сердца при различных режимах гидролиза

Обозначения те же, что на рис. 1

В отличие от предыдущего субстрата, в кислой среде наблюдалось замедление процесса накопления аминного азота [2], хотя динамика накопления пептидных фракций принципиально не отличалась от таковой при рН 8. Более того, изменения уровня белков, средне- и низкомолекулярных пептидов позволяют говорить о небольшой активации процесса. Усиление же накопления аминного азота в присутствии ионов меди лишь в отдельных моментах согласуется с динамикой пептидных фракций.

Казеин технический. В отличие от рассмотренных выше гетерогенных многокомпонентных субстратов при гидролизе технического казеина динамика белка в супернатантах вариантов «рН 8» и «рН 5» резко различалась (рис. 3 а). Гидролиз в кислой среде способствовал обогащению белком супернатантов в течение 4 сут. Лишь на 5-е сутки вариант «рН 8» достигал сопоставимого уровня. Ведение же гидролиза при добавках ионов меди обусловило превышение к 5- и 6-м суткам уровня белка в супернатантах по сравнению с остальными вариантами в 1,5–1,8 и 2,2–3,3 раза соответственно. Наиболее богат высокомолекулярными пептидами в начальной точке гидролиза супернатант варианта «рН 5+Cu²⁺», тогда как минимальная их концентрация присуща варианту «рН 8» (рис. 3 б). Различия между этими вариантами превышали 3 раза. Содержание высокомолекулярных пептидов в супернатантах гидролизатов «рН 8» на протяжении 4 сут снизилось на 42 %, а к 6-м суткам возросло в 4,9 раза.

Динамика этой фракции пептидов в обоих вариантах «рН 5» была в качественном плане примерно однотипна: в период 1–3 сут уровень высокомолекулярных пептидов снижался до минимального, а затем наблюдался его рост. В конечной точке гидролиза наиболее богаты этой фракцией пептидов были супернатанты вариантов «рН 8» и «рН 5+Cu²⁺», тогда как минимальная концентрация присуща варианту «рН 5».

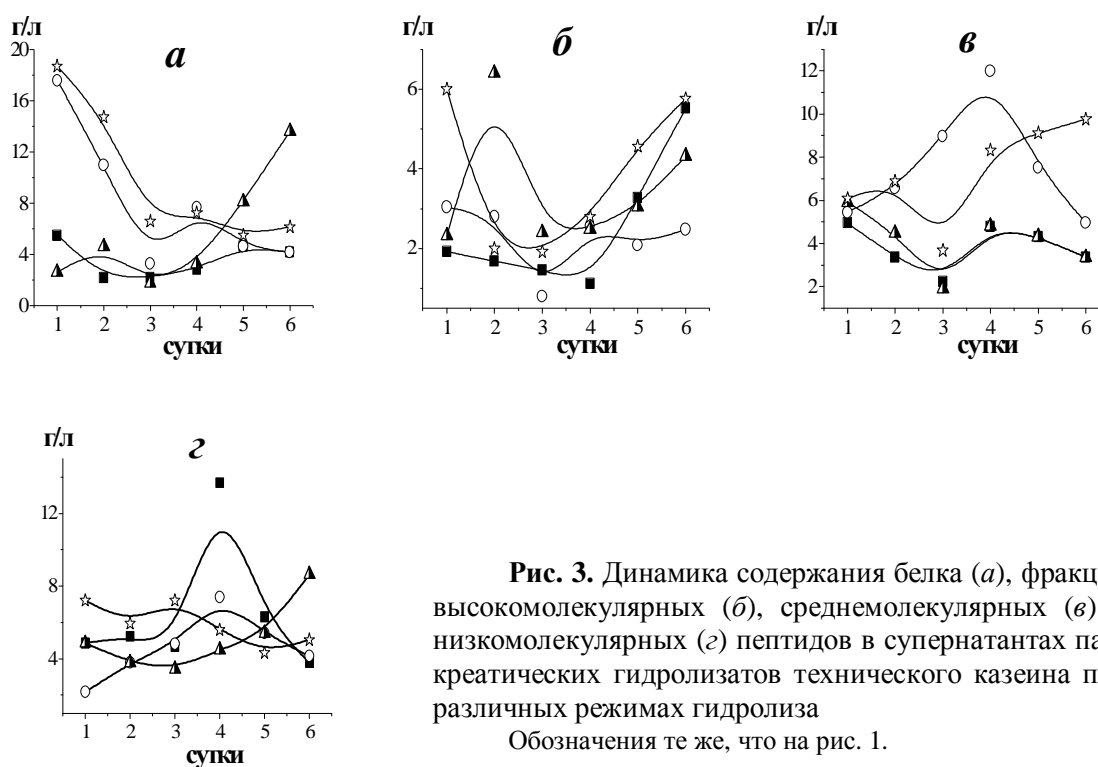


Рис. 3. Динамика содержания белка (а), фракций высокомолекулярных (б), средномолекулярных (в) и низкомолекулярных (г) пептидов в супернатантах панкреатических гидролизатов технического казеина при различных режимах гидролиза

Обозначения те же, что на рис. 1.

Различия между вариантами режимов гидролиза по содержанию средномолекулярных пептидов в супернатантах в начальной точке процесса не были столь ярки по сравнению с предыдущими субстратами и с фракцией высокомолекулярных пептидов (рис. 3 в). Содержание средномолекулярных пептидов в обоих вариантах «рН 8», независимо от присутствия ионов меди уменьшалось в период 1–3 сут на 55–68 %, достигая минимума. На 4-е сутки концентрация этих пептидов возросла в 2,1–2,5 раза и вновь постепенно снижалась до 6-х суток до 68 или 57 % от исходных величин соответственно. Значительно рельефнее были изменения в обоих вариантах «рН 5». Причем в отсутствие ионов меди в гидролизной смеси уровень средномолекулярных пептидов резко (на 121 %) возрастал к 4-м суткам, а затем к 6-м суткам снижался в 2,4 раза, принципиально не отличаясь от исходной ве-

личины. При добавлении в гидролизную смесь ионов меди – вариант «рН 5+Cu²⁺» – содержание среднемoleкулярных пептидов в супернатантах гидролизатов возрастало практически линейно, за исключением 3-х суток, когда в сравнении с предыдущей точкой оно падало на 47 %.

По уровню низкомолекулярных пептидов в начальной точке гидролиза гидролизаты заметно различались (рис. 3 г). Максимальная концентрация таких пептидов была присуща варианту «рН 5+Cu²⁺», а минимальная (в 3,3 раза ниже) – варианту «рН 5». В отсутствие ионов меди в гидролизной системе уровень низкомолекулярных пептидов в супернатантах типа «рН 5» линейно возрастал в 3,4 раза к 4-м суткам, а затем плавно снижался, почти вдвое превышая при этом исходный уровень. При гидролизе в варианте «рН 8» концентрация пептидов этой фракции также возрастала к 4-м суткам, однако прирост от 3- до 4-х суток составил 192 %. Дальнейшее снижение концентрации пептидов в 3,6 раза наблюдалось к 6-м суткам. В варианте «рН 8+Cu²⁺» в первые 3 сут концентрация низкомолекулярных пептидов снижалась на 30 %, а в последующий период отмечен близкий к линейному рост на 153 %. В варианте «рН 5+Cu²⁺», в целом, наблюдались колебания уровня низкомолекулярных пептидов с постепенным снижением их содержания к 6-м суткам на 30 %. Панкреатический гидролиз казеина технического в кислой среде выражался в угнетении процесса накопления аминного азота [2], тогда как снижение уровня белка, прирост содержания среднемoleкулярных пептидов были более выраженными, чем при рН 8. Введение в гидролизную смесь ионов меди на динамике аминного азота и пептидных фракций, в целом, принципиально не отразилось.

Казеин по Гаммерстону. Супернатанты этих гидролизатов были наиболее богаты белком. В течение первых 3 сут при всех режимах гидролиза уровень белка падал, особенно резко – на 90 % при рН 8 (рис. 4 ак). В присутствии ионов меди это падение менее заметно – на 62 %. В дальнейшем содержание белка в супернатантах типа «рН 8» увеличивалось, достигая к 6-м суткам 70–72 % величин в начальной точке процесса. Гидролиз в кислой среде вызвал менее демонстративные изменения концентрации белка. При этом складывается впечатление, что ионы меди тормозили расщепление казеина.

Уровень высокомолекулярных пептидов в вариантах, не содержащих ионов меди, в начальной точке гидролиза был на 35–68 % выше, особенно при рН 8 (рис. 4 б). К 4-м суткам содержание пептидов этой фракции в 3–6 раз снижалось, однако в последующем наблюдался рост их уровня, который в варианте «рН 8» к 6-м суткам практически достигал величин в начальной точке процесса. Тем не менее по окончании гидролиза концентрация пептидов этой фракции в супернатантах была ниже исходных величин в 3–6 раз, за исключением варианта «рН 5».

В начальной точке процесса наиболее богаты среднемoleкулярными пептидами были варианты гидролизатов в кислой среде, которые превосходили оба варианта «рН 8» на 43–47% (рис. 4 в). На протяжении 4 сут их уровень снижался при всех режимах гидролиза, но наиболее резко – в обоих вариантах «рН 8». Причем в отсутствие ионов меди снижение описывалось прямой. В последующий период концентрация этой фракции пептидов изменялась сравнительно мало и в конце процесса ни в одном варианте не превышала 70 % от величин в начальной точке процесса. Максимальный уровень фракции низкомолекулярных пептидов в начальной точке гидролиза отмечен в супернатантах гидролизных смесей, содержащих ионы меди (рис. 4 г). Эти варианты превосходили соответствующие смеси без добавления ионов металла в 1,8 и 8,3 раза. Различия же между вариантами «рН 8+Cu²⁺» и «рН 5+Cu²⁺» не принципиальны. Как правило, в последующие 2–3 сут отмечен рост концентрации этой фракции пептидов, который в варианте «рН 5» возрос почти на порядок в сравнении с начальной точкой процесса. Лишь при режиме «рН 8+Cu²⁺» выявлено постепенное близкое к линейному снижение уровня этих пептидов более, чем в 4 раза. Во всех остальных вариантах такому снижению предшествовал рост уровня этих пептидов. Следует отметить, что в варианте «рН 5+Cu²⁺» фактически на протяжении всего периода уровень этой фракции пептидов превышал таковой в других вариантах.

Панкреатический гидролиз этого субстрата, как и казеина технического, в кислой среде сопровождался угнетением процесса накопления аминного азота [2]. В отличие от казеина технического кислая среда угнетала расщепление белка, хотя прирост содержания средне- и низкомолекулярных пептидов был большим, чем при рН 8. Введение в гидролизную смесь ионов меди, в целом, угнетало накопление аминного азота. Однако при рН 5 в присутствии Cu²⁺ отмечен существенный рост уровня средне- и низкомолекулярных пептидов.

Полученные результаты прежде всего иллюстрируют зависимость состава получаемых панкреатических гидролизатов от используемого белкового сырья. Ранее мы отмечали, что при гидролизе разных субстратов значения уровня аминного азота были весьма близки [2].

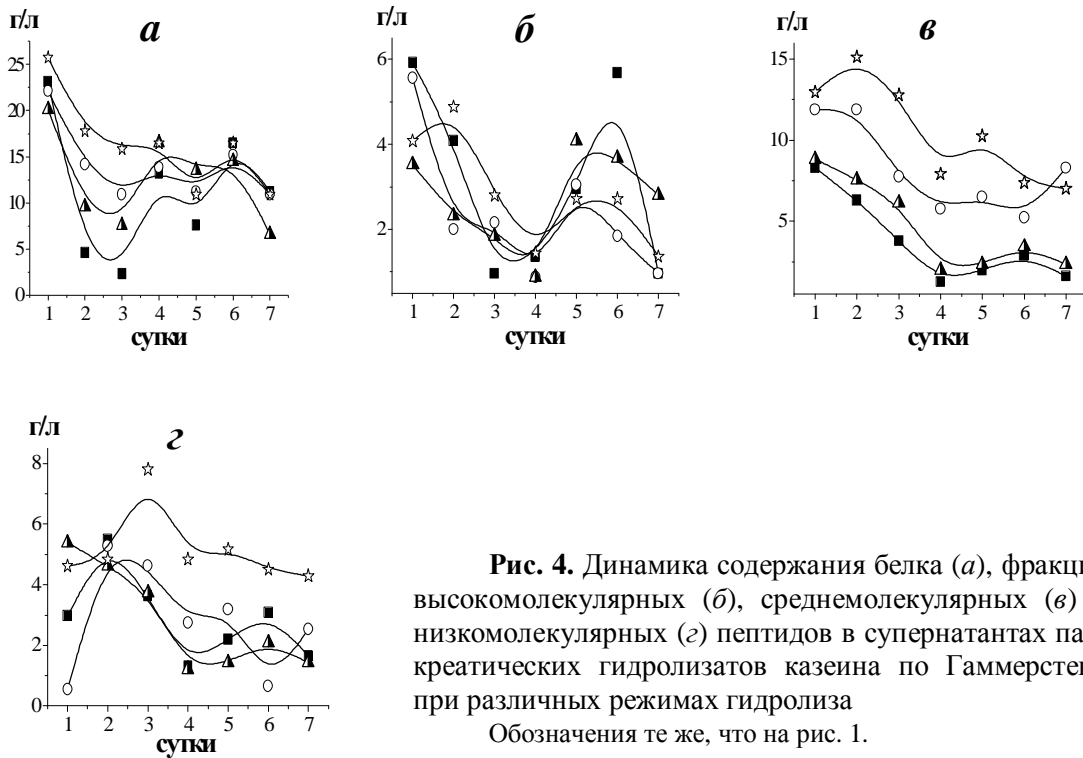


Рис. 4. Динамика содержания белка (а), фракций высокомолекулярных (б), средномолекулярных (в) и низкомолекулярных (з) пептидов в супернатантах панкреатических гидролизатов казеина по Гаммерстену при различных режимах гидролиза
Обозначения те же, что на рис. 1.

Это наводило на мысль, что гидролиз белков идет лишь до известных пределов, в которых и происходит накопление аминокислот. В некотором противоречии с данным суждением были значения уровня триптофана и тирозина, порой чрезвычайно сильно различавшиеся в разных белковых гидролизатах.

Изложенные выше материалы иллюстрируют следующие два момента. Во-первых, содержание, например, пептидов низкомолекулярной фракции в супернатантах гидролизатов различных белковых субстратов заметно различалось уже после первых 24 ч гидролиза. Наиболее богатые белками в начальной точке гидролиза супернатанты фарша сердца и казеина по Гаммерстену имели существенные отличия по уровню низкомолекулярных пептидов и в этой точке и по окончании процесса. Во-вторых, обращает на себя внимание выраженный в целом ряде случаев колебательный характер динамики пептидных фракций. Такие изменения не могут быть объяснены только с позиций усиливающегося расщепления белков и их крупных фрагментов. Следует еще раз подчеркнуть, что, по крайней мере, в случае трех первых субстратов мы имеем дело с гетерогенной системой, а регистрация продуктов гидролиза ведется в растворимой фазе. Это обстоятельство обуславливает переход в растворимую фазу и самих белков в процессе гидролиза. Более того, растворимость самих продуктов расщепления белков может быть различна. Именно в силу этих особенностей нами было выдвинуто положение о протеолизе белковых субстратов в гетерогенных системах как о сложном процессе мацерационно-экстракционно-гидролитического характера [9].

Спектр протеолитических энзимов поджелудочной железы достаточно сложный. Однако этим не исчерпывается своеобразие первых двух из используемых нами субстратов – мяса и сердца. Для гидролиза имеют значение не только аминокислотный состав и особенности структуры конкретного белка, фракционный состав белков сырья, но еще, по-видимому, и спектр собственных протеолитических энзимов. Этот момент, как оказалось, имеет значение даже при жесткой обработке сырья, в данном случае – кипячении. Ранее нами было показано [10, 11], что несмотря на жесткие технологические режимы (кипячение, автоклавирование, пастеризацию) сложные питательные среды, приготовленные на основе гидролизатов животных белков, обладают собственной протеолитической активностью. Наконец, по современным представлениям процессы протеолиза могут включать не только реакции разрыва пептидных связей, но и их синтеза [12]. Все эти обстоятельства объясняют весьма несхожую картину динамики состава супернатантов при расщеплении одним и тем же набором энзимов поджелудочной железы различных белковых субстратов, сложный характер этой динамики, а также неодинаковый эффект кислой среды и добавления ионов меди.

Как уже отмечено в [2], проведенные исследования позволили получить гидролизаты белков, использованные при разработке отечественных питательных сред для микробиологической диагностики дифтерии [13]. Они также создают базу для изучения протеолиза белков в сложной системе и для дальнейших работ в области конструирования отечественных микробиологических питательных сред, организации их производства и его масштабирования.

Литература:

- [1]. Шатило Н.Л., Никандров В.Н., Малевич Т.М. Разработка приемов получения гидролизатов белков животного происхождения, пригодных для микробиологических целей // Современные проблемы инфекционной патологии человека. Мн., 1998. С. 503–504.
- [2]. Никандров В.Н., Купченко О.К., Малевич Т.М., Колос В.А., Шатило Н.Л., Пыжова Н.С. Панкреатический протеолиз белковых субстратов в гетерогенной системе. Динамика общего и аминного азота, тирозина и триптофана в растворимой фазе // Современные проблемы инфекционной патологии человека (эпидемиология, клиника, вирусология, микробиология и иммунология). Мн., 2005. С. 228–245.
- [3]. Лабораторный регламент на производство перевара Хоттингера. Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии. Мн., 1997. 17 с.
- [4]. Пыжова Н.С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: Дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.04 / Мн.: Белорусский НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава БССР, 1990. 193 с.
- [5]. Виноградова И.Н. Производственные питательные среды // Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. Т.1. М.: Медгиз, 1962. С. 339–384.
- [6]. Торбан М.А. О механизме обезвреживания токсина формалином // Биохимия. 1960. Т. 25, № 1. С. 28–33.
- [7]. Рунова В.Ф., Бендас Л.Г., Максимова Г.А. и др. Методические указания по применению физико-химических методов контроля питательных сред. М., 1997.
- [8]. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. Л.: Изд-во ЛГУ, 1975.
- [9]. Никандров В.Н., Колос В.А., Купченко О.К., Малевич Т.М., Шатило Н.Л. Динамика панкреатического протеолиза белковых субстратов для биотехнологических целей // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VI. Мн., 2001. С. 86.
- [10]. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. Энзиматическая активность неинкулированных микробиологических питательных сред сложного состава // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии. Мн., 2004. С. 89–91.
- [11]. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Шатило Н.Л. Собственная энзиматическая активность микробиологических питательных сред сложного состава // Достижения медицинской науки Беларуси. Вып. VIII. Мн., 2003. С. 59–60.
- [12]. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991.
- [13]. Никандров В.Н., Шатило Н.Л., Хасеневич Н.А., Малевич Т.М., Колос В.А., Купченко О.К. Создание отечественных питательных сред для бактериологической диагностики инфекционных заболеваний // 75 лет санитарно-эпидем. службе Республики Беларусь, история, актуальные проблемы на современном этапе, перспективы развития. Мн., 2001. С. 453–455.

Поступила в редакцию 22. 06. 2009 г.

V. N. NIKANDROV^{1,2}, V. A. KOLOS², O. K. KUPCHENKO²

PROTEOLYSIS OF PROTEIN SUBSTRATES IN HETEROGENOUS SYSTEM: PROTEIN AND PEPTIDE FRACTION DYNAMICS IN SOLUBLE PHASE

¹ – Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus;

² – Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health of Belarus, Minsk, Belarus

Summary

New data on dynamics of protein, high-, medium- and low-molecular weight peptides in the soluble supernatants of pancreatic hydrolysates of beef, bovine heart (both substrates as hot-water extracted stuffing), “industrial” grade of casein and Hammersten’s casein at pH 8 and 5 as well as after additions of cupric (II) ions in the hydrolytic systems are stated. The dependence of obtained pancreatic hydrolysate composition on used protein is demonstrated. In the number of cases the oscillatory character of peptide fractions’ dynamics is exposed. The obtained data are discussed from the concept on proteolysis of protein substrates in heterogenous systems as the complex processes of maceration-extraction-hydrolytic character.

Key words: proteolysis, peptides, protein

СОДЕРЖАНИЕ

ФИЗИОЛОГИЯ

С. Г. ПАШКЕВИЧ

РЕГУЛЯЦИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЛИГАНДОВ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ЯДРО СОЛИТАРНОГО ТРАКТА..... 7

А. В. СИДОРОВ

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В РЕАЛИЗАЦИЮ ОБОРОНИТЕЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ МОЛЛЮСКА *LUMNAEA STAGNALIS*..... 16

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

В. В. СОЛТАНОВ, В. А. СЕРГЕЕВ

НЕРВНО-ГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНЫХ РАСТРОЙСТВ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ КОЛИТОМ..... 22

Г. К. ТРОПНИКОВА

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СЕРОТОНИНА В ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКЕ И НЕКОТОРЫХ ОТДЕЛАХ СТВОЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ХОЛЕСТАЗЕ И ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИНА..... 28

А. Н. ЧЕРНОВ, Л. А. ЛОПАТИНА, В. Н. КАЛЮНОВ

ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ НА ДИНАМИКУ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КУЛЬТУРЫ ГЛИОМЫ С6..... 34

МОРФОЛОГИЯ

В. Н. БОЧАРОВА, Е. Н. САВЧИНА

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЯДРЕ СОЛИТАРНОГО ТРАКТА ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛЕНИИ У КРЫС, ВЫЗЫВАЕМОМ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ *ESCHERICHIA COLI*..... 39

А. А. ЕМЕЛЬЯНОВА, Н. Д. ЖУКОВА, Е. Ю. МАНИНА

ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ МОБИЛЬНОГО ТЕЛЕФОНА «MOTOROLA C-139» НА ГОЛОВНОЙ МОЗГ КРЫС..... 44

БИОХИМИЯ

В. Н. НИКАНДРОВ, В. А. КОЛОС, О. К. КУПЧЕНКО

ПРОТЕОЛИЗ БЕЛКОВЫХ СУБСТРАТОВ В ГЕТЕРОГЕННОЙ СИСТЕМЕ: ДИНАМИКА БЕЛКА И ПЕПТИДНЫХ ФРАКЦИЙ В РАСТВОРИМОЙ ФАЗЕ..... 49

Н. С. ПЫЖОВА, В. Н. НИКАНДРОВ

О ВОЗМОЖНОСТИ УЧАСТИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В РАСЩЕПЛЕНИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ НУКЛЕАЗАМИ..... 57

ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

О. Г. КИРКЕВИЧ, Е. В. КРАВЧЕНКО

ВЛИЯНИЕ НООПЕПТА НА ВЫПОЛНЕНИЕ МЫШАМИ КРАТКОВРЕМЕННЫХ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫХ НАГРУЗОК В ПЛАВАТЕЛЬНОМ ТЕСТЕ..... 63

Е. В. КРАВЧЕНКО, Л. В. МАКСИМОВА
ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТОВ СОЕДИНЕНИЯ ИФБ-30 ПРИ НАРУШЕНИЯХ НЕАССОЦИАТИВНОГО ОБУЧЕНИЯ, ВЫЗВАННЫХ ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛОМ..... 68

С. Г. ПАШКЕВИЧ, Т. В. КАРАВАЙ, А. Г. ЧУМАК, В. А. КУЛЬЧИЦКИЙ
ЭФФЕКТЫ МЕКСИБЕЛА И ФЕНИБУТА В ОТНОШЕНИИ ГИПОКСИЧЕСКОГО ФАКТОРА..... 73

А. Н. ЧЕРНОВ, М. В. ТАЛАБАЕВ, Д. Г. ГРИГОРЬЕВ, З. Б. КВАЧЕВА, Е. Д. ЧЕРСТВОЙ, В. Н. КАЛЮНОВ, В. А. КУЛЬЧИЦКИЙ
ОЦЕНКА *IN VITRO* ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ХИМИОПРЕПАРАТАМ КЛЕТОК МЕДУЛЛОБЛАСТОМЫ И ГЛИОМЫ..... 80

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

Д. А. МАКАРЕВИЧ, А. А. ФЕДОРОВ, О. В. КОЗЛЯКОВА, Т. В. РЯБЦЕВА, А. К. КОРОЛИК, В. В. КИРКОВСКИЙ, В. П. ГОЛУБОВИЧ, Е. Д. ЧУМАКОВА
СОРБЕНТ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ANTI-Rh АНТИТЕЛ ИЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ..... 85

ОБЗОРНЫЕ И ПРОБЛЕМНЫЕ СТАТЬИ

Н. В. ГЛУТКИНА, В. В. ЗИНЧУК
КРИВАЯ ДИССОЦИАЦИИ ОКСИГЕМОГЛОБИНА: ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ... 90

О. В. КИСТЕНЬ, В. В. ЕВСТИГНЕЕВ, В. С. УЛАЩИК, Б. В. ДУБОВИК
ТРАНСКРАНИАЛЬНАЯ МАГНИТНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ ЭПИЛЕПСИИ..... 99

В. В. СОЛТАНОВ
ЭНДОТОКСИНЫ И НЕЙРОГУМОРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ВЕГЕТАТИВНЫХ ФУНКЦИЙ..... 109

В. С. УЛАЩИК
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОТЕРАПИИ 120

В. Н. РОСТОВЦЕВ, В. С. УЛАЩИК
СПЕКТРАЛЬНАЯ ДИНАМИКА И ФИЗИОЛОГИЯ..... 129

СОБЫТИЯ, ДАТЫ, ЛЮДИ

ВИТАЛИЙ НИКОЛАЕВИЧ НИКАНДРОВ (к 60-летию со дня рождения)..... 134

ОТ РЕДАКЦИИ

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ..... 137

NEWS OF BIOMEDICAL SCIENCES

№ 4, 2009

Founded by Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus
Published quarterly since January, 2001

Editorial Board:

V. S. Ulashchik (Editor-in-Chief)
V. A. Kulchitsky (Associate Editor-in-Chief), A. G. Chumak (Associate Editor-in-Chief),
A. V. Sidorov (Responsible Secretary), L. I. Archakova, S. N. Cherenkevich, S. L. Kabak,
V. N. Kaliunov, L. M. Lobanok, A. S. Medvedev, A. G. Mrochek, V. N. Nikandrov,
E. I. Slobozhanina, V. V. Soltanov, N. F. Soroka, F. I. Vismont

Address of the Editorial Office:

Institute of Physiology, room 203, Akademicheskaya str. 28, 220072 Minsk, Republic of Belarus
Tel/Fax: (375)-17-284-16-30; E-mail: biblio@fizio.bas-net.by

CONTENTS

PHYSIOLOGY

- S. G. PASHKEVICH*
BODY TEMPERATURE REGULATION AT RATS AFTER INTRODUCTION OF GLUTAMATE RECEPTORS LIGANDS IN NUCLEUS TRACTUS SOLITARIUS..... 7
- A. V. SIDOROV*
EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON ELECTRICAL ACTIVITY OF THE NEURONS INVOLVED IN DEFENSIVE BEHAVIOUR WITHIN MOLLUSK *LYMNAEA STAGNALIS*..... 16

PATHOPHYSIOLOGY

- V. V. SOLTANOV, V. A. SERGEEV*
NERVOUS-HUMORAL MECHANISMS OF GASTRODUODENAL DISORDERS IN EXPERIMENTAL COLITIS RATS..... 22
- G. K. TROPNIKOVA*
INFLUENCE OF EXOGENOUS MELATONIN ON THE CHANGE OF SEROTONIN CONTENT IN THE DUODENUM AND SOME BRAIN STEM REGIONS OF CHOLESTATIC RATS..... 28
- A. N. CHERNOV, L. A. LOPATINA, V. N. KALJUNOV*
EFFECT OF THE NERVE GROWTH FACTOR ON DINAMICS OF THE MORPHOFUNCTIONAL PROPERTIES OF C6 GLIOMA CELL CULTURE..... 34

MORPHOLOGY

- V. N. BOCHAROVA, E. N. SAVCHINA*
MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN NUCLEUS TRACTUS SOLITARIUS OF RATS DURING SYSTEMIC INFLAMMATION CAUSED BY *E. COLI* LYPOPOLYSACCHARIDE..... 39
- A. A. EMELJANOVA, N. D. ZHUKOVA, E. Ju. MANINA*
EFFECT OF ELECTROMAGNETIC RADIATION OF «MOTOROLA C-139» MOBILE PHONE ON RATS BRAIN..... 44

BIOCHEMISTRY

<i>V. N. NIKANDROV, V. A. KOLOS, O. K. KUPCHENKO</i> PROTEOLYSIS OF PROTEIN SUBSTRATES IN HETEROGENOUS SYSTEM: PROTEIN AND PEPTIDE FRACTION DYNAMICS IN SOLUBLE PHASE.....	49
---	----

<i>N. S. PYZHOVA, V. N. NIKANDROV</i> ON THE POSSIBILITY OF PARTICIPATION OF ACTIVE OXYGEN SPECIES IN A CLEAVAGE OF NUCLEIC ACIDS BY NUCLEASES.....	57
--	----

PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY

<i>O. G. KIRKEVICH, E. V. KRAVCHENKO</i> EFFECT OF NOOPEPT ON THE FULFILMENT BY MICE OF SHORT- AND LONG-TERM EXERCISES IN SWIMMING PROBE.....	63
--	----

<i>E. V. KRAVCHENKO, L. V. MAKSIMOVA</i> STUDY OF EFFECTS OF IFB-30 COMPOUND ON NONASSOCIATIVE LEARNING AFFECTED BY PENTILENTETRAZOLE.....	68
---	----

<i>S. G. PASHKEVICH, T. V. KARAVAJ, A. G. CHUMAK, V. A. KULCHITSKY</i> EFFECTS OF MEXIBEL AND FENIBUT IN THE RELATION TO HYPOXIA...	73
--	----

<i>A. N. CHERNOV, M. V. TALABAEV, D. G. GRIGOREV, Z. B. KVACHEVA, E. D. CHERSTVOY, V. N. KALJUNOV, V. A. KULCHITSKY</i> IN VITRO ASSESSMENT OF INDIVIDUAL SENSITIVITY OF MEDULLOBLASTOMA AND GLIOMA CELLS TO CHEMOTHERAPY.....	80
---	----

BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

<i>D. A. MAKAREVICH, A. A. FEDOROV, O. V. KOZLYAKOVA, T. V. RYABTZEVA, A. I. KOROLIK, V. V. KYRKOVSKY, V. P. GOLUBOVICH, E. D. CHUMAKOVA</i> SORBENT FOR SELECTIVE EXTRACTION OF ANTI-Rh ANTIBODIES FROM BLOOD PLASMA...	85
---	----

REVIEWS AND PROBLEM ARTICLES

<i>N. V. GLUTKINA, V. V. ZINCHUK</i> OXYHEMOGLOBIN DISSOCIATION CURVE: PHYSIOLOGICAL IMPORTANCE.....	90
---	----

<i>O. V. KISTSEN, V. V. EVSTIGNEEV, V. S. ULASHCHIK, B. V. DUBOVIK</i> TRANSCRANIAL MAGNETIC STIMULATION IN DIAGNOSTIC AND TREATMENT OF EPILEPSY.	99
--	----

<i>V. V. SOLTANOV</i> ENDOTOXIN AND NEUROHUMORAL MECHANISMS OF REGULATION OF AUTONOMIC FUNCTIONS.....	109
--	-----

<i>V. S. ULASCHIK</i> BIOMEDICAL BASICS OF TRANSCRANIAL ELECTROTHERAPY.....	120
--	-----

<i>V. N. ROSTOVTSEV, V. S. ULASHCHIK</i> SPECTRAL DYNAMIC AND PHYSIOLOGY.....	129
--	-----

CHRONICLE AND JUBILEE

VITALY NIKOLAEVICH NIKANDROV (TO 60-th ANNIVERSARY).....	134
--	-----

EDITORIAL NOTES

INSTRUCTION FOR AUTHORS.....	137
------------------------------	-----