

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**  
**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

**Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений**

ДЕМИДЮК  
Мария Дмитриевна

**ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ  
СЫВОРОТКИ ЛАТЕКСА *HEVEA BRASILIENSIS* КАК БЕЛКИ С  
АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:  
Кандидат биологических наук  
О. А. Иванов

Допущена к защите  
«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2017 г.

Заведующий кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений доктор  
биологических наук В. В. Демидчик

Минск, 2017

## Оглавление

Перечень условных обозначений.....	3
Реферат.....	4
Введение.....	7
Глава 1 Литературный обзор.....	9
1.1 Понятие о белках-ингибиторах протеолитических ферментов	9
1.2 Краткая ботаническая характеристика <i>Hevea brasiliensis</i> .....	11
1.3 Характеристика латекса, продуцируемого деревьями <i>Hevea brasiliensis</i> .....	13
1.4 Современное состояние проблемы утилизации отходов переработки латекса.....	16
1.5 Краткая характеристика грибов-возбудителей болезней растений.....	18
Глава 2 Материалы и методы.....	20
2.1 Объекты исследования.....	20
2.2 Центрифугирование латекса.....	20
2.3 Измерение активностей ингибиторов модельных протеаз.....	20
2.4 Определение концентрации белка путем микробиуретовой реакции .....	21
2.5 Проведение электрофореза с додецилсульфатом Na и нативного электрофореза.....	22
2.6 Хроматографическое разделение белков.....	25
2.7 Оценка фунгистатического действия сыворотки латекса <i>Hevea brasiliensis</i> .....	25
Глава 3. Результаты и обсуждение.....	27
3.1 Описание центрифугирования.....	27
3.2 Ингибиторная активность в отношении модельных протеаз для исходной С-сыворотки латекса.....	28
3.3 Частичная очистка ингибиторов субтилизина из сыворотки латекса.....	29
3.4 Активность сыворотки латекса <i>Hevea brasiliensis</i> в отношении некоторых фитопатогенных и условно патогенных грибов.....	32
Заключение.....	38
Список использованных источников.....	39

## РЕФЕРАТ

Дипломная работа 41 с., 8 таблиц, 14 рисунков, 37 литературных источников.

### ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СЫВОРОТКИ ЛАТЕКСА *HEVEA BRASILIENSIS* КАК БЕЛКИ С АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

**Ключевые слова:** Гевея бразильская (*Hevea brasiliensis*), латекс, белки, ингибитор, сериновые, протеиназы, фунгицид, *Fusarium avenaceum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Объект исследования:** технологический латекс из *Hevea brasiliensis*, плантация Pusat Penelitian Karet, pH 9,95 (Богор, Индонезия), 2015 год сбора.

**Цель работы:** оценить возможность использования сыворотки латекса в качестве источника белков (ингибиторов протеиназ) с фунгицидной активностью.

**Методы исследования:** центрифугирование, измерение активностей ингибиторов модельных протеаз по Гофману и Вайсблау и по Томарелли, определение концентрации белка микробиуретовым способом, электрофорез с додецилсульфатом Na и нативный электрофорез, ионообменная хроматография, культивирование грибов *in vitro* на питательной среде Чапека.

В ходе данной работы было установлено, что сыворотка, получаемая из латекса *Hevea brasiliensis*, содержит значительные количества белков, среди которых важное место занимают ингибиторы протеолитических ферментов серинового типа. Большинство приходится на долю ингибиторов субтилизина. Также было установлено, что сыворотка, полученная после центрифугирования, при добавлении ее в питательную среду для выращивания грибов, способна вызывать задержку роста таких фитопатогенных грибов как *Fusarium avenaceum*, *Botrytis cinerea* и *Colletotrichum gloeosporioides*. Экспериментально было доказано, что фунгистатическому действию сыворотки более всего подвержен такой фитопатоген, как *Botrytis cinerea*. Остальные опытные организмы также показывают снижение скорости роста, однако менее выражено.

Также была установлена необходимость дальнейшего изучения вопроса с целью подборки менее трудоемких и длительных способов проведения всех этапов очистки латекса и его сыворотки от нежелательных примесей.

## РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 41 с., 8 табліц, 14 малюнкаў, 37 літаратурных крыніц.

### ІНГІБАТАРЫ ПРАТЭАЛІТЫЧНЫХ ФЕРМЕНТАЎ СЫРОВАТКІ ЛАТЭКСУ *HEVEA BRASILIENSIS* ЯК БЯЛКІ З АНТЫФУНГАЛЬНАЙ АКТЫЎНАСЦЮ

**Ключавыя словы:** Гевея бразільская (*Hevea brasiliensis*), латэкс, бялкі, інгібатар, сярынавыя, пратэіназы, фунгіцыд, *Fusarium avenaceum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Аб'ект даследавання:** тэхналагічны латэкс з *Hevea brasiliensis*, плантацыя Pusat Penelitan Karet, pH 9,95 (Багор, Інданезія), 2015 год збору.

**Мэта працы:** ацаніць магчымасць выкарыстання сыроваткі латэкса ў якасці крыніцы бялкоў (інгібітараў пратэіназ) з фунгіцыднай актыўнасцю.

**Метады даследавання:** цэнтрыфугаванне, вымярэнне актыўнасцей інгібітараў мадэльных пратэіназ па Гофману і Вайсблаю ды па Тamarэлі, вызначэнне канцэнтрацыі бялкоў мікрабіурэтавым спосабам, электрафарэз з дадэцылсульфатам Na ды натыйны электрафарэз, іонаабменная храматаграфія, культываванне грыбоў *in vitro* на пажыўном асяроддзе Чапека.

Падчас працы было ўстаноўлена, што сыроватка, якая атрымліваецца з латэксу *Hevea brasiliensis*, змяшчае значныя колькасці бялкоў, сярод якіх важнае месца займаюць інгібітары пратэалітычных ферментаў сярынавага тыпу. Большасць прыпадае на долю інгібітараў субтылізіна. Таксама было ўстаноўлена, што сыроватка, атрыманая пасля цэнтрыфугавання, пры даданні яе ў пажыўнае асяроддзе для вырошчвання грыбоў, здольная выклікаць затрымку росту такіх фітапатагенных грыбоў як *Fusarium avenaceum*, *Botrytis cinerea* і *Colletotrichum gloeosporioides*. Эксперыментальна было даказана, што да фунгістатычнага дзеяння сыроваткі больш за ўсё схільны фітапатаген *Botrytis cinerea*. Астатнія вопытныя арганізмы таксама паказваюць зніжэнне хуткасці росту, аднак менш выяўленае.

Таксама была ўсталявана неабходнасць далейшага вывучэння пытання з гэтай падборкі менш працаёмкіх і працяглых спосабаў правядзення ўсіх этапаў ачысткі латэкса і яго сыроваткі ад непажаданых прымешак.

## ABSTRACT

Graduate work 41 pp., 8 tables, 14 drawings, 37 literary sources.

### PROTEOLYTIC ENZYMES INHIBITORS OF SERUM LATEX *HEVEA BRASILIENSIS* AS PROTEINS WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY

**Key words:** *Hevea brasiliensis*, latex, proteins, inhibitor, serine, proteinases, fungicide, *Fusarium avenaceum*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

**Object of the study:** technological latex from *Hevea brasiliensis*, plantation Pusat Penelitian Karet, pH 9.95 (Bogor, Indonesia), 2015 collection.

**Objective:** to assess the possibility of using latex serum as a source of proteins (proteinase inhibitors) with fungicidal activity.

**Methods of investigation:** centrifugation, activity measurement of the model proteases inhibitors according to Hoffmann and Weisbleau and Tomarelli methods, determination of protein concentration by microbiurette method, electrophoresis with sodium dodecyl sulfate and native electrophoresis, ion- exchange chromatography, cultivation of fungi in vitro on the Czapek nutrient medium.

In the course of this work, it was found that serum, obtained from *Hevea brasiliensis* latex, and which contains significant amounts of proteins, among which an important role is played by inhibitors of serine-type proteolytic enzymes. Most inhibitors are inhibitors of subtilisin. It was also found that the serum obtained after centrifugation, when added to the growth medium for fungi, is capable of delaying the growth of such phytopathogenic fungi as *Fusarium avenaceum*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*. It has been experimentally proved that the fungistatic action of serum is most susceptible to such a phytopathogen as *Botrytis cinerea*. The other experimental organisms also show a decrease in the growth rate, but less pronouncedly.

It was also found necessary to further study the issue in order to select less time-consuming and long-lasting methods for conducting all stages of purification of latex and its serum from unwanted impurities.