

УДК 577.152.34

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА ПАПАИНОМ, ТРИПСИНОМ И ЩЕЛОЧНОЙ ПРОТЕАЗОЙ ИЗ *BACILLUS SUBTILIS*

Романовская И.И., Декина С.С., Севастьянов О.В.

Изучена кинетика начальных скоростей гидролиза казеина папаином, трипсином и щелочной протеазой из *Bacillus subtilis*. Определены термодинамические и кинетические параметры реакции. Показано, что в диапазоне концентраций субстрата, превышающих 4,6; 3,1; 1,8 г/дм³ для папаина, трипсина и щелочной протеазы, соответственно, наблюдается ингибирование протеолитической активности ферментов, что значительно снижает скорость реакции гидролиза. Учитывая данный эффект рекомендовано использование 0,5 – 0,75 % растворов казеина, при которых субстратное ингибирование не будет играть существенной роли.

Ключевые слова: папаин, трипсин, щелочная протеаза, кинетика, субстратное ингибирование, модификация.

ВВЕДЕНИЕ

Протеолитические ферменты являются классическим объектом биохимии, химии белка и энзимологии, играют ключевую роль в белковом обмене живых организмов, в образовании и распаде биологически активных веществ, таких как гормоны, токсины, нейропептиды. Многие регуляторные механизмы основаны на ограниченном высокоспецифичном протеолизе. Несмотря на большой объем знаний, накопленных в данной области, характеристика и выяснение особенностей функционирования протеаз является актуальной задачей. Для достижения необходимого эффекта в биотехнологическом процессе при использовании ферментных препаратов очень важно выбрать их правильную дозировку. Оценка качества ферментных препаратов и точность метода определения их активности имеют огромное значение для биотехнологии.

Ранее в наших работах по иммобилизации протеолитических ферментов различного происхождения и изучению физико-химических особенностей их функционирования [1-3], мы столкнулись с существенно искажающим их истинную активность субстратным ингибированием. Использование наиболее распространенных методов определения протеолитической активности по казеину [4] не позволяло достоверно определять истинную активность препаратов. В связи с недостаточностью освещения данной проблемы в литературе, целью работы явилось подробное изучение кинетики гидролиза казеина папаином, трипсином и щелочной протеазой *Bacillus subtilis*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали папаин (К.Ф. 3.4.22.2) из *Carica papaya* с активностью 320 ед/г (Merck), трипсин (К.Ф. 3.4.23.1) с активностью 210 ед/г (Merck), внутриклеточную щелочную сериновую протеиназу *Bacillus subtilis* (К.Ф. 3.4.21.14), штамм 72 (АО «Энзим», Украина), с протеолитической активностью 65 ед/г, казеин по Гаммерстейну (ОАО «Диаэм», Россия).

Активность протеаз определяли методом Ансона [4], принимая за единицу протеолитической активности такое количество фермента, которое за 1 мин при 37 С катализирует расщепление казеина до продуктов, не осаждаемых трихлоруксусной кислотой, содержание которых выражено в микромолях тирозина. Содержание белка контролировали методом Лоури-Хартри [5].

Кинетику гидролиза папаином, трипсином и щелочной протеазой определяли по начальным скоростям гидролиза казеина [6, 7]. На основе полученных данных строили график в координатах Хейнса $S/V=f([S])$. Методом наименьших квадратов определяли tg угла наклона, численно равный $1/V_{max}$, а точка пересечения экстраполированной прямой с осью ординат соответствует K_m/V_{max} ; точка пересечения с осью абсцисс – K_m .

Ингибирование ферментов анализировали, определяя константы ингибирования методом Диксона, строя графическую зависимость $1/V=f([S])$. Точка пересечения прямой с осью абсцисс – отрицательное значение константы субстратного ингибирования ($-K_{is}$), а точка пересечения с осью ординат – обратное значение максимальной скорости ($1/V_{max}$) [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение кинетики гидролиза казеина по начальным скоростям реакции для всех ферментов показало, что для протеаз характерна параболическая форма кривой зависимости наблюдаемой скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 1). Скорость реакции по мере повышения концентрации субстрата сначала возрастала, а, достигнув максимума, начинала снижаться.

Полученные данные проанализированы методами линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен по Хейнсу (рис. 2).

Согласно проведенным кинетическим исследованиям установлено, что для папаина кажущиеся значения K_m и V_{max} , составляли 1,72 г/дм³ и 730,6 мкмоль/г/мин, соответственно. Для трипсина K_m и V_{max} , соответственно, 0,75 г/дм³ и 625,0 мкмоль/г/мин. Для щелочной протеазы K_m и V_{max} , соответственно, составляли 0,57 г/дм³ и 193,1 мкмоль/г/мин.

Наибольший интерес представляет наблюдаемое субстратное ингибирование реакции, поскольку характер данного процесса оказывает существенное влияние на определяемую активность ферментов. При добавлении субстрата выше определенной концентрации скорость катализируемой реакции далее не увеличивалась и не оставалась постоянной при концентрациях выше насыщающей, а понижалась, т.е. развивалось ингибирование. Эффект ингибирования вероятнее всего связан с локальным увеличением концентрации казеина в микроокружении фермента.

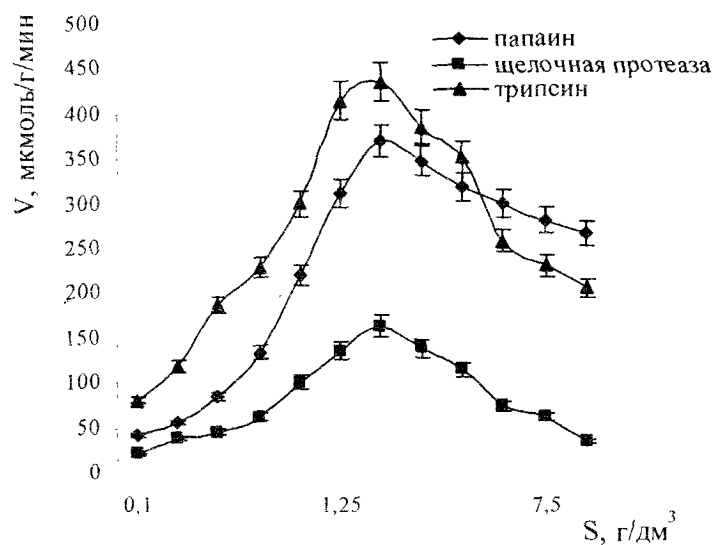


Рис. 1. Зависимость скорости реакции гидролиза казеина папаином, щелочной протеазой, трипсином от концентрации субстрата.

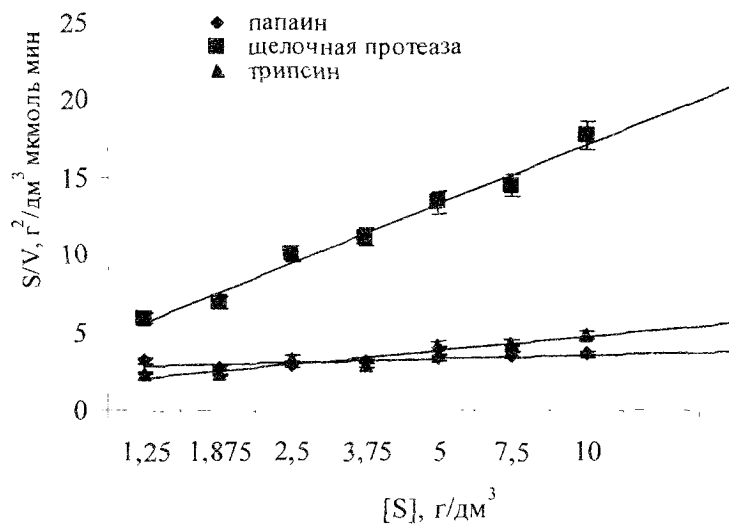


Рис. 2. Зависимость отношения концентрации субстрата к наблюдаемой скорости реакции гидролиза казеина от концентрации субстрата для папаина, щелочной протеазы и трипсина.

Анализ нисходящей части параболической зависимости наблюдаемой скорости реакции от концентрации субстрата методом Диксона (рис. 3) позволил вычислить

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА

кажущиеся константы ингибирования протеаз, оптимальные концентрации субстрата.

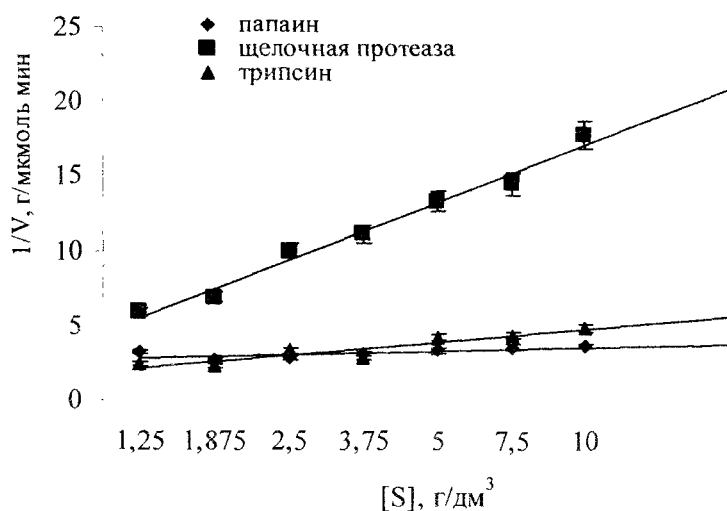


Рис. 3. Зависимость обратной скорости реакции гидролиза казеина от концентрации субстрата для папаина, щелочной протеазы и трипсина.

Для папаина, трипсина и щелочной протеазы константы ингибирования составили, соответственно, 12,5; 12,5; 5,9 г/дм³. Оптимальные концентрации субстрата 4,6; 3,1; 1,8 г/дм³, что соответствует использованию 0,5 – 0,75 % раствора казеина в методике определения протеолитической активности.

ВЫВОД

В результате проведенных исследований установлено что, для более точного определения протеолитической активности изученных протеаз рекомендовано использование меньших концентраций казеина, при которых субстратное ингибирование не будет играть существенной роли.

Список литературы

1. Романовська І.І., Декіна С.С. Розробка раневого гідрогелевого покриття з іммобілізованою лужною протеазою *B. subtilis* на основі модифікованого полі-N-вінілпіролідону // Досягнення біології та медицини. - 2007. - № 1. – С. 88 - 91.
2. Романовська І.І., Декіна С.С. Іммобілізація папаїну та сечовини в полівініловий спирт // Медична хімія. - 2007 - №1. – С. 35 – 40.
3. Dekina S., Romanovskaya I., Sevastyanov O. Investigation of casein hydrolysis kinetics by papain, trypsin and *Bacillus subtilis* alkaline protease // Materials of III International Young Scientists conference “Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution”, Odessa, 15 – 18 May 2007.: Тез. докл./ Одесса. - С. 182
4. Польшалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов – М.: ДеЛи принт, 2003. – С. 230 - 231.

5. Hartzee E.E. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // *Anal. Biochemistry*. – 1972 - V. 48 - №1 - P. 422-427.
6. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1980. – 393 с.
7. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. - М.: МГУ, 1976. - 320 с.

*Романовська І.І., Декіна С.С., Севастьянов О.В. Деякі особливості кінетики гідролізу казеїну папаїном, трипсином та лужною протеазою з *Bacillus subtilis* // // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського . Серія „Біологія, хімія”. – 2007. – Т. 20 (59). – № 2. – С. 126-130.*

Досліджено кінетику початкових швидкостей гідролізу казеїну папаїном, трипсином і лужною протеазою з *Bacillus subtilis*. Визначені термодинамічні і кінетичні параметри реакції. Показано, що в діапазоні концентрацій субстрату, що перевищують 4,6; 3,1; 1,8 г/дм³ для папаїну, трипсину і лужної протеази, відповідно, спостерігається інгібування протеолітичної активності ферментів, що значно знижує швидкість реакції гідролізу. Враховуючи даний ефект, рекомендовано використання 0,5 – 0,75 % розчинів казеїну, за яких субстратне інгібування не буде мати суттєвої ролі.

Ключові слова: папаїн, трипсин, лужна протеаза, кінетика, субстратне інгібування, модифікація.

*Romanovskaya I.I., Dekina S.S., Sevastyanov O.V. Some features of casein hydrolysis kinetics by papain, trypsin and alkaline protease from *B. subtilis* // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V. I. Vernadskogo. Series «Biology, chemistry». – 2007. – V.20 (59). – № 2. – P. 126-130*

The kinetic of initial rates of casein hydrolysis kinetics by papain, trypsin and alkaline protease from *Bacillus subtilis* was studied. The thermodynamic and kinetic parameters of the reaction were determined. In the range of substrate concentrations, exceeding 4.6; 3.1 and 1.8 g/dm³ for papain, trypsin and alkaline protease, respectively, the substrate inhibition of proteolytic activity of the enzymes mentioned occurs, which substantially decreases the rate of hydrolysis reactions, as it was shown. Taking this effect in consideration, it is recommended the usage of 0.5 – 0.75 % casein solutions, at which the substrate inhibition would not play the significant role.

Keywords: papain, trypsin, alkaline protease, kinetic, substrate inhibition, modification.

Поступила в редакцію 05.10.2007 г.