

С. 80-83.

4. Гриневиц Т. М., Стоянов І. С. Експериментальне дослідження процесу послаблення верху взуття в процесі їх стоншення // Вісник Хмельницького національного університету. – 2006. – № 5. – С. 173-176.

5. Гриневиц Т. М., Стоянов І. С. Експериментальне дослідження процесу послаблення деталей верху взуття в результаті проколу голкою // Вісник Хмельницького національного університету. – 2007. – № 3. – С. 255-259.

6. Цветков В. М., Прилуцкая Н. Л. Ослабление хромовых кожевенных материалов строчкой: // Сб. трудов ЦНИИКП. – М. – Л.: Гизлегпром. – 1935. – № 2.

7. Аревкова В. М., Багров И. В. и др. Оптимизация технологических параметров однорядных ниточных швов // КОП – 1986. – № 5.

8. Технология производства обуви. – М.: ЦНИИТЭСИ Легпром, 1978. – Ч. 5. – С. 226.

9. Зурабян К. М., Краснов Б. Я., Бернштейн М. М. Материаловедение изделий из кожи. – Легпромбытиздат, 1988. – С. 415.

Надійшла 26.2.2010 р.

УДК 648.145

Л. С. СТЕПАНОВА, І. А. ПІГОЛЬ
Хмельницький національний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СУБСТРАТУ НА АКТИВНІСТЬ ІММОБІЛІЗОВАНОГО ПЕПСИНУ

Проаналізовано вплив різних факторів (концентрації субстрату казеїну, тривалості гідролізу казеїну різних концентрацій, рН – середовища та тривалості процесу гідролізу) на зміну протеолітичної активності як нативного, так і іммобілізованого сичужного ферменту пепсину.

Influence of different factors (concentration substrat of casein, duration of hydrolysis of casein of different concentrations, pH – environment and duration of process of hydrolysis) is analysed on changing of proteolitchnoy activity both native and immobilized of sichuzhnoy enzyme of pepsin.

Ключові слова: фермент, біотехнологія, іммобілізація, протеолітична активність, субстрат.

Постановка проблеми

На думку вчених, еру антибіотиків і гормональних препаратів заступає ера ферментів. Проте широке використання ферментів обмежене їх малою стабільністю при зберіганні, швидкою інактивацією під впливом внутрішніх середовищ організму, сильними імунологічними реакціями, високою вартістю і нездатністю до регенерації. Тому вже на даний час значна кількість ферментів застосовується не у вільному стані, а будучи закріпленими на органічних і неорганічних носіях. Такого роду системи називають іммобілізованими [1].

Використання ферментів, достатньо міцно зв'язаних з нерозчинними матеріалами, перш за все зробило процеси більш технологічними. З'явилася можливість використовувати безперервні процеси, основані на пропусканні розчину субстрату через колонку з іммобілізованим ферментом. Зникла проблема відокремлення прореагованих компонентів від ферменту, різко підвищилася ефективність використання ферменту.

У ряді випадків з'являється особлива субстратна специфічність

Таким чином, завдяки іммобілізації ферментів, тобто зв'язуванню їх із неорганічними або органічними носіями, значною мірою усуваються вади, які обмежують їх застосування.

Широке впровадження у промисловість біотехнологічних процесів стимулює розробку, вивчення властивостей та можливість застосування волокнистих матеріалів з іммобілізованими ферментами. Використання різних типів волокон з біологічною активністю дозволяє досягнути економії сировини, матеріальних та енергетичних ресурсів, створити нові види гетерогенних каталізаторів для харчової промисловості, медицини тощо, при цьому створюється можливість удосконалити існуючі технології по ферментації субстратів, робити їх безперервними, більш екологічно чистими.

Будь-які технологічні процеси проходять при впливі на них різних факторів. Тому, для того щоб знайти область практичного використання біокаталізаторів важливим аспектом є вивчення поведінки, стабільності біологічно-активних систем, знаходження оптимальних параметрів режиму їх роботи.

Постановка мети та завдання дослідження

Мета роботи полягала у дослідженні поведінки і стабільності іммобілізованого пепсину на модифікованому пропеновою кислотою бавовняному носії з наступним порівнянням властивостей останнього з властивостями нативного ферменту. У зв'язку з цим потрібно було виконати наступні завдання:

- приєднати фермент до носія за розробленою раніше методикою [2];
 - дослідити вплив субстрату на зміну протеолітичної активності нативного та іммобілізованого пепсину;
- Предметом дослідження є протеолітична активність приєданого до модифікованої пропеновою

кислотою бавовняної тканини пепсину.

Об'єктом дослідження є целюозна тканина (медична марля) та протеолітичний фермент пепсин.

Виклад основного матеріалу

Серед великої кількості носіїв для іммобілізації ферментів, найкращими і більш поширеними у використанні є носії природного походження, а точніше – класу полісахаридів. Адже саме такі носії створюють найближчі природні умови в яких фермент здатен найкраще працювати, спостерігається найменший негативний вплив на активний центр. Серед полісахаридів найбільше таким вимогам, як висока гідрофільність, легкість активації, можливість одержання носія в будь-якій формі, невисока вартість відповідає целюлоза.

Модифікація целюозного носія здійснювалась за розробленим раніше [2] технологічним режимом: просочування носія при температурі 40°C впродовж 40 хв. у ванні, що містила 5 % пропенової кислоти від маси волокна та 5 % калію персульфату від маси пропенової кислоти; промивання волокна (марлі) від залишків кислоти за індикаторним папером; висушування при кімнатній температурі. В носії після обробки визначали статичну обмінну ємність за стандартною методикою, що характеризує наявність карбоксильних груп.

Іммобілізацію ферменту пепсину здійснювали наступним чином. Окремо готували водний розчин пепсину концентрацією 1 мг/мл. Об'єм розчину розраховували виходячи з маси волокна та модуля ванни, що дорівнює 100. Модифіковане волокно поміщали у розчин ферменту і витримували його при кімнатній температурі впродовж 24 годин. Після цього волокно двічі промивали у 0,85 %-му розчині натрію хлориду для видалення з його поверхні молекул ферменту, які не приєдналися, визначали кількість приєданого білка та протеолітичну активність.

Субстратом для вивчення властивостей іммобілізованого ферменту був обраний казеїн – основний білок молока, оскільки він найчастіше використовується в якості субстрату для досліджень протеолітичної активності.

Одним із факторів, що визначають швидкість ферментативних реакцій (активність ферменту), є концентрація субстрату (рисунок 1).

При збільшенні концентрації субстрату активність як нативного, так і іммобілізованого ферменту поступово зменшується, що видно з рисунку 1. В одній із робіт [3] автор висловлює думку, що швидкість процесу взаємодії ферменту з субстратом при високих концентраціях останнього обмежується дифузиею його до активного центру ферменту. Порівняно з активністю закріпленого на носії ферменту, активність нативного вища при відповідних значеннях концентрації субстрату. Але при концентрації казеїну більше 1,5 % активність нативного ферменту починає падати в більшій степені, на відміну від іммобілізованого. Наприклад, активність нативного ферменту при концентрації субстрату 2 % становить 8 %, а активність закріпленого на носії – 18 %. Це явище можна пояснити тим, що активний центр іммобілізованого ферменту захищений від впливу лужного середовища, яке створюється при збільшенні концентрації субстрату, а також від негативного впливу самого субстрату.

Дослідження впливу тривалості гідролізу казеїну різних концентрацій нативним та іммобілізованим пепсином наведені на рисунку 2 а, б, в, г, звідки видно, що всі криві проходять через максимум, який відповідає 120 хв. гідролізу. При малій концентрації казеїну (0,1 %) відбувається різке підвищення активності як нативного, так і іммобілізованого пепсину (до 120 хв), потім таке ж стрімке падіння.

При постійній концентрації ферменту швидкість ферментативної реакції підвищується із збільшенням концентрації субстрату до насичення ферменту субстратом, досягаючи максимальної величини і далі не збільшується [4].

В даному випадку, при концентрації від 0,5 % до 2 % казеїну криві майже накладаються одна на одну і для нативного, і для іммобілізованого ферментів, що видно з рисунку 2. Тобто, можна зробити висновок, що концентрація казеїну вище 1 % практично не впливає на гідроліз субстрату. Фермент, закріпленний на носії, при збільшенні концентрації казеїну проявляє більшу активність на відміну нативному, оскільки його активний центр більш захищений від негативного впливу реакційного середовища. При концентрації субстрату вище 0,5 % хід кривих ідентичний, окрім різного ступеня падіння активності після 120 хв. дії ферменту на субстрат. Чим більша концентрація казеїну, тим менше падіння активності після 120 хв. гідролізу. Треба відмітити, що все ж для іммобілізованого пепсину це падіння активності менше на 15 % порівняно з нативним ферментом. Отже, з вище сказаного видно, що існує певна залежність між концентрацією субстрату та тривалістю гідролізу.

Для визначення впливу рН-казеїну на протеолітичну активність, як нативного, так і іммобілізованого пепсину, створювали для казеїну рН від 1 до 11. Дані цих досліджень представлені на рисунку 3 а.

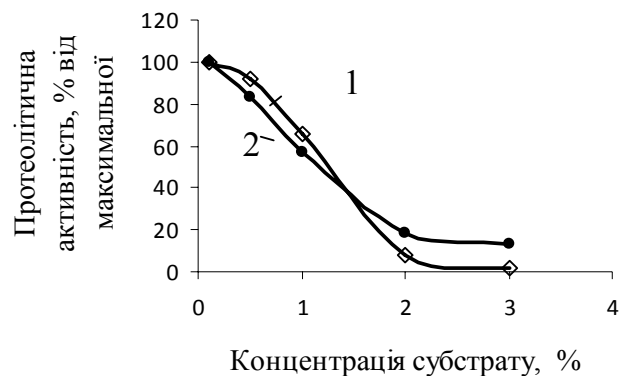


Рис. 1. Вплив концентрації субстрату на активність нативного (1) та іммобілізованого (2) пепсину

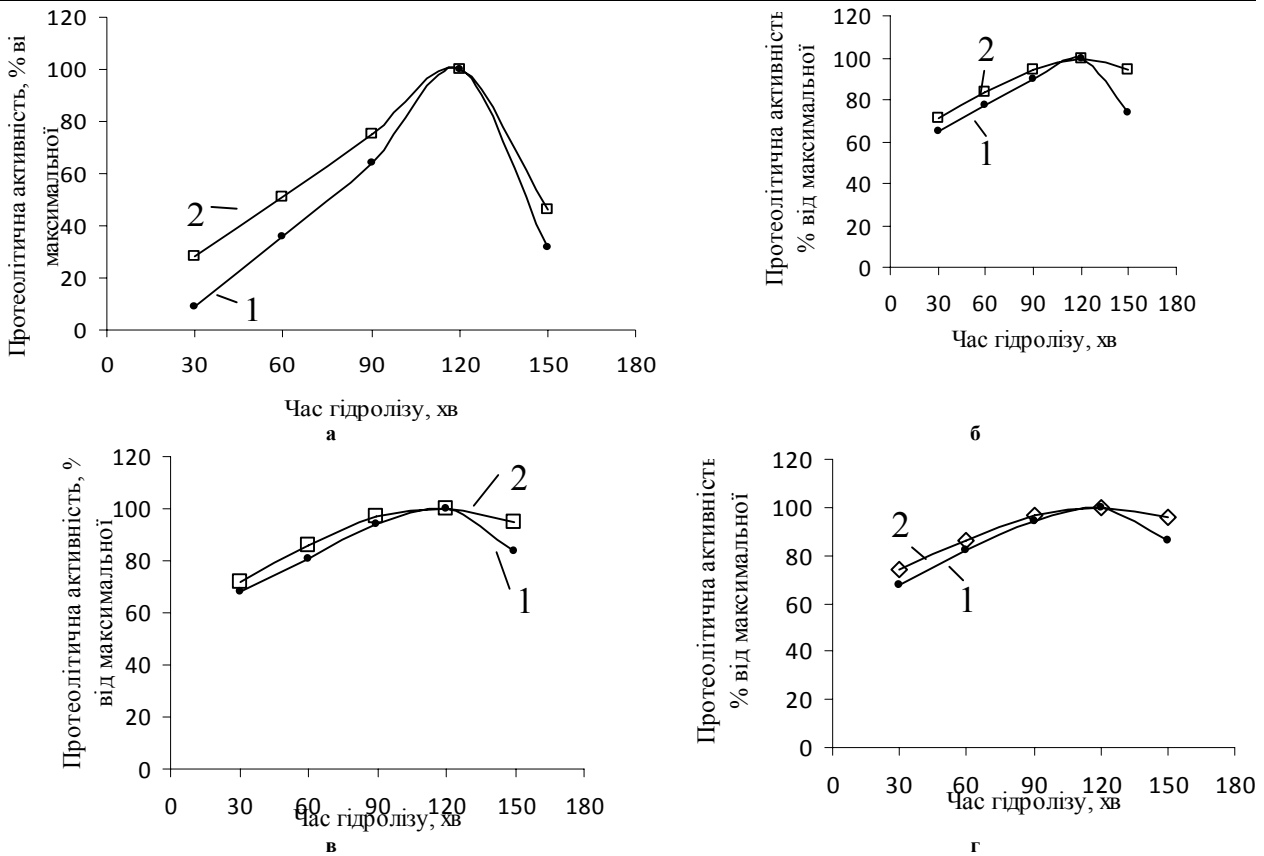


Рис. 2. Вплив тривалості гідролізу субстрату різних концентрацій (а- 0,1 %; б- 0,5 %; в- 1 %; г- 2 %) на активність нативного (1) та іммобілізованого (2) пепсину

З рисунка 3.а видно, що протеолітична активність як нативного, так і іммобілізованого ферменту спочатку зростає із збільшенням значення рН, а потім падає. Найбільше значення протеолітичної активності нативного ферменту спостерігається при рН в межах від 1,5 до 2,5, тобто, в кислому середовищі, а потім різко зменшується із збільшенням лужності субстрату. Оптимальне значення рН субстрату 2,1 для нативного ферменту. Це можна пояснити тим, що за своєю природою фермент функціонує саме в кислому середовищі, яке створюється соляною кислотою шлунку.

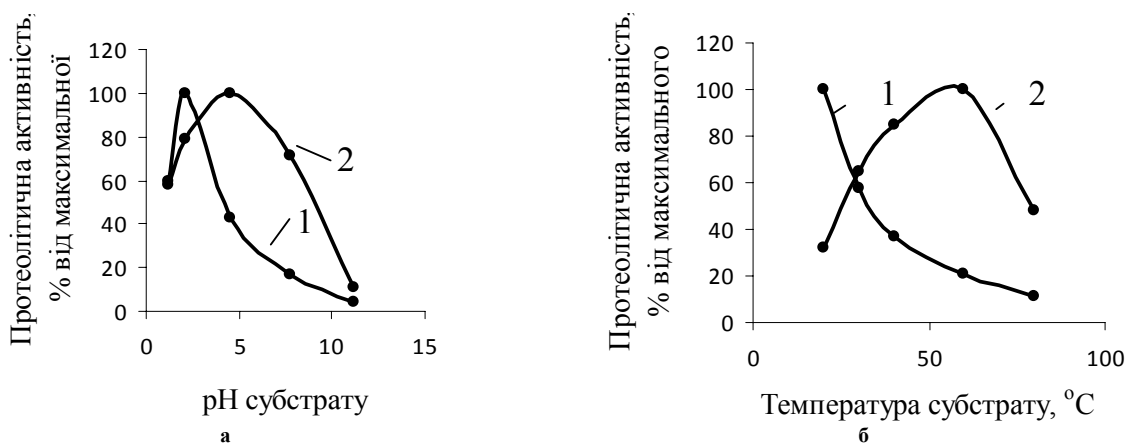


Рис. 3. Вплив рН (а) та температури (б) субстрату на активність нативного (1) та іммобілізованого (2) пепсину.

Порівняно з нативним ферментом, іммобілізований фермент проявляє найбільшу активність при рН субстрату від 2,5 до 6,5 (оптимум дії – рН 4,5), а з наступним збільшенням лужності середовища казеїну активність іммобілізованого ферменту зберігалась в більшій мірі ніж активність у нативного. Звідси слідує, що іммобілізація ферменту суттєво змінює рН – оптимум казеїну, в даному випадку він зміщується в менш кисле середовище.

Зсув рН – оптимуму в кисле чи лужне середовище пояснюється будовою матриці-носія і будовою ферменту, впливом заряду носія на іоногенні групи ферменту, які беруть участь в реакції. В результаті електростатичної взаємодії ферменту з субстратом змінюється концентрація іонів водню в області активного центру ферменту, зв'язаного з носієм, і відбувається зміщення рН – оптимуму активності [5]. Отже, за рахунок закріплення ферменту на носії розширюються межі значень рН в яких фермент проявляє значну

активність, на відміну від нативного.

Визначали також вплив температури проведення реакції гідролізу казеїну на активність нативного та іммобілізованого пепсину. Дослідження термолабільності нативного та іммобілізованого ферментів проводили при наступних значеннях температури: 20°C, 30°C, 40°C, 60°C та 80°C. Результати досліджень представлені на рисунку 3б.

Ферменти – термолабільні речовини. Зміна температури зумовлює зміну їх активності. Так, підвищення температури на 10°C прискорює швидкість хімічних реакцій приблизно в 2 рази [6]. Але ця закономірність спостерігається лише в інтервалі від 0°C до 25°C. При подальшому підвищенні температури збільшення швидкості реакції (активності ферменту) дещо сповільнюється і після досягнення температурного порогу починає швидко падати [7].

В даному випадку з підвищенням температури субстрату активність нативного ферменту постійно зменшується, особливо після 40°C, що видно з рисунка 3.б. Активність нативного ферменту при 20°C порівняно з іммобілізованим вища, але при температурі більше 30°C значення активності останнього значно перевищує активність нативного.

На відміну від нативного ферменту, активність іммобілізованого зростає з підвищенням температури від кімнатної до 60°C, при наступному підвищенні температури активність швидко і необоротно починає зменшуватися. Але фермент закріплений на носії в більшій мірі зберігає свою активність, наприклад, при температурі 80°C активність останнього становить 48 %, а у нативного – 11 %. Зсув оптимуму ферментативної активності в сторону більш високих температур казеїну у іммобілізованих ферментів, розширення температурних меж, очевидно, є наслідком дії двох факторів: підвищення стійкості останніх до теплової денатурації і збільшення енергії активації утворення фермент – субстратного комплексу через деяке обмеження конформаційних змін поліпептидного ланцюга ферменту. Величина зсуву температурного оптимуму для того чи іншого ферменту залежить від ступеня його зв'язування з носієм (числа зв'язків на одну молекулу білка), а відповідно, від обраного способу іммобілізації [8].

Висновки

На протеолітичну активність як нативного, так і іммобілізованого пепсину, впливає концентрація субстрату, тривалість гідролізу ферментом субстрату залежно від його концентрації, рН – середовище та температура гідролізу.

Література

1. Явоненко О. Ф. Біохімія: підручник для студентів спеціальності “Фізична культура” педагогічних університетів / О. Ф. Явоненко, Б. В. Яковенко. – С.: Університетська книга, 2002. – 380с.
2. Степанова Л. С. Вплив різних факторів на процес модифікації целюлозної тканини органічною кислотою / Л. С. Степанова, Ю. В. Жак // Вісник ХНУ. – 2006. – № 4. – С. 211 – 215.
3. Sundaram P. V. Kinetic laws for solid – supported enzymes / P. V. Sundaram // Canadian chemical. – 1970. – V. 48. – P. 1498 – 1504.
4. Волков М. И. Биохимия мышечной деятельности / М. И. Волков. – К.: Олимпийская литература, 2000. – 502 с.
5. O’Driscoll K. F. Open tubular heterogeneous enzyme reactors: preparation and kinetic behavior / K. F. O’Driscoll // Biotechnology bioengineering. – 1972. – V.14. – № 6. – P. 885 – 914.
6. Боєчко Ф. Ф. Біологічна хімія: підручник / Ф. Ф. Боєчко. – К.: Вища школа, 1995. – 536 с.
7. Меньшикова Н. И. Биохимия: науч. пособие / Н. И. Меньшикова. – М.: Физкультура и спорт, 1986. – 384 с.
8. Логинова Т. А. Свойства протеаз, ковалентно иммобилизованных на силикагеле / Т. А. Логинова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1978. – Т.14, вып. 5. – С. 715 – 718.

Надійшла 19.2.2010 р.