



УДК 57.08:577.15

Ю. П. Копытов, научн. сотр., **И. А. Харчук**, вед. инж.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины,
Севастополь, Украина

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИЛОЛИТИЧЕСКОЙ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЕЙ ЭКЗОФЕРМЕНТОВ В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Предложен метод определения экзоферментативных активностей в водной среде, позволяющий определить фоновое содержание белковоподобных и крахмалоподобных соединений. Метод может быть применён для морских и пресных вод, в полупромышленных и в лабораторных условиях, при культивировании микроводорослей.

Ключевые слова: амилолитическая и протеолитическая активность, экзоферменты, белковоподобные и крахмалоподобные соединения

Изучение качественных и количественных аспектов распределения органического вещества в морской среде представляет интерес, как для прогнозирования экологической ситуации, так и для гидробиологических и геохимических исследований, позволяя, с одной стороны, понять тонкие механизмы функционирования морских экосистем, а с другой – оценить роль органического вещества в общем круговороте веществ в океане [7].

Значительная часть растворённого органического вещества морской воды представлена в виде полимерных молекул (полисахариды, белки, нуклеиновые и гуминовые кислоты, металлоорганические комплексы), которые могут подвергаться гидролизу под действием внеклеточных гидролитических ферментов, выделяемых во внешнюю среду [2].

Из девяти различных классов гидролитических ферментов – гидролаз – главными являются протеазы, амилазы и эстеразы. Протеазы действуют на пептидные связи – NH – CO – и катализируют гидролиз белков, в то время как амилазы, гидролизующие глико-

зильные соединения, катализируют гидролиз крахмала. О действии гидролитических ферментов-гидролаз мы можем судить по их участию в химических реакциях. Скорость реакции определяют либо по скорости убывания исходного субстрата, либо по скорости образования продуктов реакции

Среди существующего многообразия способов определения ферментативной активности особую группу составляют методы определения экзоферментативной амилолитической и протеолитической активности. Хорошо известны методы определения ферментативных активностей гидролаз в водных экосистемах [2, 3, 8]. Эти трудоёмкие методы не лишены определённых недостатков, о чём пойдет речь ниже.

Мы попытались найти альтернативные пути, позволяющие достаточно быстро и относительно просто определять экзоферментативную амилолитическую и протеолитическую активности в водной среде, включая культуральную жидкость, взятую во время выращивания микроводорослей.

крахмал 400 мкл (0,1г/л)

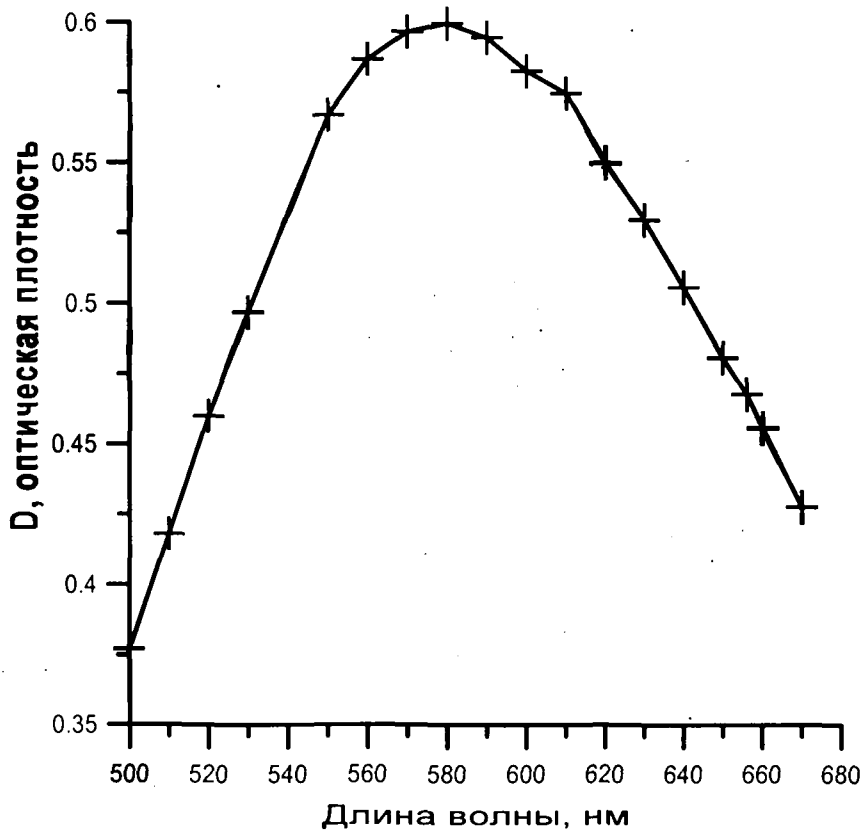


Рис. 1. Спектр поглощения раствора крахмала при взаимодействии с раствором йода

Fig. 1. Absorption spectrum of a starch solution at interaction with an iodine solution

За основу определения амилолитической активности была взята методика [3]. Согласно ей, в пробу морской воды объёмом 5 мл вносился раствор крахмала (субстрата), а в качестве контроля использовалась дистиллированная вода с таким же количеством субстрата. Через 10 мин экспозиции после добавления раствора йода проводилось измерение начальной и конечной оптической плотностей. По этим данным в результате соответствующих расчётов определялась величина амилолитической активности морской воды.

Однако в ходе апробации метода был выявлен ряд существенных недостатков, и поэтому нами было проведено соответствующее исследование с целью оптимизации условий проведения анализа.

Так, согласно данной методике, все определения оптической плотности производили при длине волны 656 нм. Из рис. 1 видно, что предлагаемая авторами длина волны не является оптимальной, поскольку максимум поглощения раствора крахмала при взаимодействии с раствором йода приходится на 580 нм, а на рекомендованной длине волны оптическая плотность в 1.3 раза ниже.

Предлагаемые для использования концентрации крахмала очень высоки. По этой причине нами проведено исследование с целью подбора оптимального объема крахмала (табл. 1). Оказалось, что внесение 0.5 мл раствора субстрата на 5 мл пробы является достаточным.

Далее в процессе работы выяснилось, что время экспозиции в 10 мин явно недостаточно, более достоверные данные были получены при увеличении времени до 4 ч. Проверка влияния времени инкубации пробы на чув-

ствительность анализа в интервале 1, 2, 4 и 24 ч показала, что наиболее оптимальным является 4-часовая экспозиция. Полученные результаты совпадают с литературными данными [9].

Табл. 1. Определение объема вносимого крахмала
Table 1. Definition of volume of introduced starch

Объём вносимого раствора крахмала, мкл/ 5 мл пробы	Оптическая плотность среды, $\lambda = 580$ нм
100	0.040
200	0.133
300	0.293
400	0.519
500	0.673

Для остановки ферментативных процессов, вместо подкисления реакционной смеси, использовали выдерживание пробирок в кипящей водяной бане в течение 2 мин. Время подбирали опытным путём, поскольку при увеличении времени экспозиции более 2 мин из культуральной среды в осадок выпадали соли.

Параллельно в исследуемых пробах определяли экзоферментативную протеолитическую активность. Существует множество ферментов, селективно атакующих азотсодержащие соединения, особенно белки. Как и амилазы, протеазы разделяются на ферменты, гидролизующие концевые группы (экзопептидазы), т. е. действующие на концевые карбоксильные или аминные группы, и ферменты, расщепляющие внутренние пептидные связи (эндопептидазы), действующие на центральные участки пептидной цепи и расщепляющие молекулу на уровне пептидных связей на более мелкие фрагменты [4].

В настоящее время для определения экзопротеазной активности используются такие методы, как метод непрерывного титрования [8], вискозиметрический метод [3], метод поляризационной флуоресценции [9] и другие. Данные методы либо трудоёмки, либо требуют специального оборудования и дорогостоящих реактивов.

Широко используемый в биохимических исследованиях для определения белка метод Лоури в данном случае не подходит, поскольку высокое содержание солей приводит к выпадению осадка. Спектрофотометрический метод - при измерении на длине волны 210 нм (поглощение пептидной связи) невозможен в виду высокой оптической плотности солей, а на 280 нм он недостаточно чувствителен. Биуретовый метод также характеризуется низкой чувствительностью.

Наиболее оптимальным оказался метод Бредфорда [6], который отличается от всех предыдущих высокой чувствительностью и не зависит от содержания солей. Известно, что химизм данного метода заключается во взаимодействии белка с красителем Кумасси бриллиантовым синим G 250, что приводит к изменению окраски раствора. Различные белки обладают неодинаковой способностью связываться с красителем. В частности, сывороточные альбумины характеризуются высоким значением D_{595} и поэтому могут быть использованы в качестве субстрата для определения протеолитической активности.

Ниже излагается разработанный нами метод определения протеолитической активности, в основе которого лежит определение скорости снижения концентрации растворённого белка посредством метода Бредфорда.

В экспериментах использовали культуральную жидкость, которую получали после центрифугирования культуры микроводорослей, где, как предполагается, содержание растворённых органических веществ относительно высокое.

Реактивы:

1. Раствор крахмала (1 мг/мл)

0.1 г крахмала для йодометрии растворяли в 20 мл холодной дистиллированной воды, а затем добавляли 80 мл кипящей дистиллированной воды, кипятили несколько минут до получения прозрачного раствора.

2. Раствор йода.

0.5 г металлического йода взвешивали в стаканчике, добавляли 5 г KI и 2 мл дистиллированной воды, перемешивали до полного растворения и доводили объём до 200 мл (концентрированный раствор). Рабочий раствор готовят перед опытом из 1 мл концентрированного раствора и 4 мл дистиллированной воды.

3. Раствор Кумасси

А) К 85 мл дистиллированной воды добавляли 15 мл ортофосфорной кислоты.

Б) 100 мг красителя Кумасси (Kumσαι brilliant blau G – 250 пр-ва фирмы Loba Feinchemis) растворяли в 15 мл этанола и фильтровали. Перед использованием смешивали 10 мл реактива А и 0.6 мл реактива Б (срок годности 1 сут).

4. Раствор альбумина (1 мг/мл)

Навеску человеческого сывороточного альбумина (ЧСА пр-во фирмы Reanal), равную 0.1 г, растворяли в 2 – 5 мл дистиллированной воды. Полученный раствор переливали в мерную колбу и доводили объём до 100 мл дистиллированной водой. Хранили в морозильной камере, перед использованием размораживали.

5. Смешанный раствор субстратов

Раствор крахмала смешивали с раствором альбумина в соотношении 1: 1. Хранили в морозильной камере и размораживали перед использованием.

Для определения ферментативной активности культуру микроводорослей центрифугировали в течение 10 - 15 мин при 3000 об/мин. Затем в пробирки с условными обозначениями опыт (О), контроль (К) вносили по 9 мл отцентрифугированной культуральной жидкости. Далее к опыту добавляли 1 мл раствора субстрата, помещали в термостат при 30 °С на 4 ч. В пробирку с контролем также добавляли 1 мл смешанного субстрата помещали его в кипящую водяную баню на 2 мин для температурной инактивации фермента, после чего охлаждали. В качестве холостой пробы использовали чистую среду для культивирования (Ср) в объёме 10 мл, которая помещалась в кипящую водяную баню на 2 мин вместе с контролем и затем охлаждалась. По истечении времени экспозиции пробирку (О) также подвергали температурной инактивации с последующим охлаждением.

Для определения экзоферментативной амилолитической активности отбирали по 1 мл пробы в 3-х повторностях из О, К и Ср. К отобранному объёму добавляли по 0.1 мл раствора йода, перемешивали и измеряли поглощение растворов на КФК-3 против холостой пробы при длине волны 580 нм в кювете 10 мм в течение не более 10 мин.

Процедура определения протеолитической ферментативной активности была совершенно аналогична и отличалась только тем, что объём отбираемых проб составлял 0.5 мл. К ним приливали по 0.5 мл раствора Кумасси, перемешивали и через 5 мин измеряли поглощение растворов на КФК-3 при длине волны 595 нм в кювете 10 мм также против холостой пробы. Все замеры проводили в трёхкратной повторности.

Во время работы на КФК-3 использовался модифицированный кюветодержатель, позволяющий работать с кюветами базой 1 см, а для замера объём исследуемого раствора может быть порядка 1.2 мл. Для этой цели можно использовать кварцевые кюветы от СФ.

Амилолитическую и протеолитическую активность рассчитывали по константе скорости первого порядка [1, 5]:

$$K = \frac{1}{t} * \ln \frac{D_{(k)}}{D_{(o)}}$$

где $D_{(k)}$ – оптическая плотность субстрата в контроле,

$D_{(o)}$ – оптическая плотность субстрата опыте,

t – время инкубации, ч,

K – константа скорости первого порядка, $ч^{-1}$.

Используя полученное уравнение, можно рассчитать фоновое содержание белково-подобных соединений.

Все эксперименты проводились на культуральной жидкости, отбираемой во время выращивания зелёной галобной микроводоросли *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. В ходе исследований были получены следующие ре-

зультаты: константа скорости первого порядка протеолитической активности колебалась от 0.027 до 0.058 $ч^{-1}$, амилолитической активности - 0.097 до 0.157 $ч^{-1}$, при этом изменения констант скоростей зависели от стадии культивирования микроводорослей.

Выводы. 1. В результате проведённой работы разработана методика, позволяющая за относительно короткое время определить амилолитическую и протеолитическую активности культуральной среды, при этом используются относительно несложные методы. Затраты реактивов минимальны, а чувствительность применяемых методов достаточно высока. **2.** Предлагаемый метод даёт возможность при соответствующих калибровках определить содержание белковоподобных и крахмалоподобных соединений. **3.** Метод может быть использован для определения ферментативной активности в морских и пресных водах, в полупромышленных и в лабораторных условиях при культивировании микроводорослей.

1. Айзатуллин Т. А. Расчет и моделирование трансформации органических веществ // Методы исследования органического вещества в океане. - М.: Наука, 1980. - С. 311 – 329.
2. Базелян В. Л. Определение скорости ферментативного гидролиза биополимеров (полисахаридов и нуклеиновых кислот) в морской среде // Методы исследования органического вещества в океане. - М.: Наука, 1980. - С. 226 – 234.
3. Батурина М. В. Определение ферментативной активности морской воды // Методы исследования органического вещества в океане. - М.: Наука, 1980. - С. 212 – 221.
4. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. - М.: Мир, 1989. – С. 125 – 173.
5. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. - М.: Мир, 1982. – 1, - С. 31 – 34.
6. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. - М.: Мир, 1991 - С. 466 – 467.
7. Копытов Ю. П., Цымбал И. М., Дивавин И. А. Биохимический состав органического вещества в воде восточной части Индийского океана // Гидробиол. журн. – 1998. - **34**, № 3 – С 97 – 103.
8. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры // М.: Изд. - ВНИРО, 2004. - С. 63 – 79.
9. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры // М.: Изд. - ВНИРО, 2004. - С. 63 – 79.
10. Садчиков А. П., Френкель О. А., Еремин С. А. Определение протеолитической активности в природных водах методом поляризации флуоресценции // Гидробиол. журн. – 1998. - **34**, № 3 – С 105 – 107.

Поступила 01 декабря 2005 г.

Метод визначення амілолітичної і протеолітичної активності екзоферментів у водному середовищі. Ю. П. Копитов, І. А. Харчук. Була зроблена спроба знайти альтернативні шляхи, що дозволяють достатньо швидко і відносно просто визначати екзоферментативну амілолітичну і протеолітичну активності у водному середовищі, включаючи культуральну рідину, узятую під час вирощування мікроводоростей. Пропонований метод застосовний для морських і прісних вод, в напівпромислових і в лабораторних умовах, при культивуванні мікроводоростей. Метод дозволяє визначити зміст білковоподібних і крохмальоподібних сполук.

Ключові слова: амілолітична та протелітична активність, екзоферменти, білковоподібні та крохмальоподібні сполуки

Definition of amylolytic and proteolytic activity of exoenzymes in the water environment. J. P. Kopytov, I. A. Kharchuk The original biochemical method of determinate of amylolytic and proteolytic exoenzyme activity in the water has been carried out. This method is more suitable, quick and quite. The offered method is applicable for sea and sweet waters, in industry and in laboratory conditions, during microalgae cultivation. This method allows determining the content of protein-like and amylo-like compounds as well.

Keywords: amylolytic and proteolytic activity, exoenzymes, protein-like and amylo-like compounds