

В. Н. ОРЕХОВИЧ, А. А. ТУСТАНОВСКИЙ и К. Д. ОРЕХОВИЧ

**О ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО
БЕЛКА КОЖИ**

(Представлено академиком Я. О. Парнасом 10 I 1947)

В течение ряда лет мы изучали изменения устойчивости белков кожи, крови и мышц по отношению к тканевым протеиназам (1-4). Было установлено, что в результате воздействия на организм ряда биологических, химических и физических факторов понижается или повышается расщепляемость тканевых белков катепсином. Другие протеиназы (пепсин, трипсин, папаин) к изменениям, вызываемым этими факторами, не чувствительны.

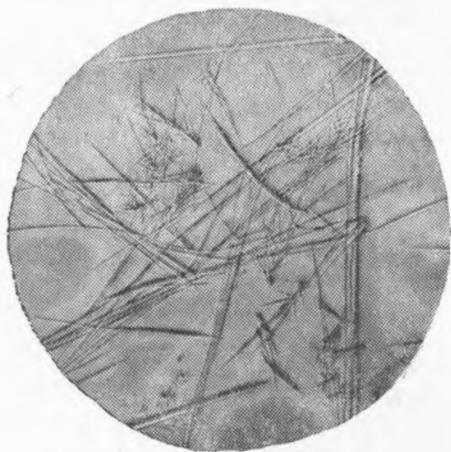


Рис. 1. Кристаллический белок кожи крысы

В связи с необходимостью выяснить механизм этих специфических изменений были предприняты опыты по выделению лабильной фракции белков, изменение устойчивости которой мы изучали в описанных ранее опытах. Тустановскому удалось выделить из кожи эту белковую фракцию в чистом, кристаллическом виде.

Выделенный кристаллический белок (рис. 1) растворяется в подкисленной воде (рН от 1 до 4), нерастворим при комнатной температуре в нейтральной и слабощелочной средах. Осаждается растворами нейтральных солей (NaCl , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), спиртом, ацетоном и т. д. Содержит очень мало ароматических аминокислот. В состав белка входит (по данным микроанализа): азота 16,1%, углерода 50,9%, водорода 7,23%.

Нами было изучено отношение этого белка к тканевым протеиназам желудочно-кишечного тракта. Изучалась перевариваемость кристаллического белка катепсином, папаином и кристаллическим пепсином, трипсином и химотрипсином.

В качестве препарата катепсина использовался кислый глицириновый экстракт из печени кролика. Папаин (неочищенный препарат) был получен из США от фирмы Nema Drug Co.

Кристаллические пепсин, трипсин и химотрипсин были приготовлены в нашей лаборатории по Нортропу и Куницу. Гидролиз белка проводился в следующих условиях. Навеска влажных кристаллов белка (400—500 мг) растворялась или разбивалась сильным помешиванием в цитратном или фосфатном буфере. К пробе добавлялось определенное количество фермента, небольшое количество тимола и, в опытах с папаином и катепсином, по 10 мг цистеина. Общий объем смеси 5 мл. Бралась проба на содержание аминокислот, и затем смесь ставилась в термостат на 24 часа при 37° С. По интенсивности нарастания аминокислот (за 24 часа) в 1 мл перевара мы судили о степени гидролиза субстрата (аминокислот определяется по Ван-Сляйку).

Количество добавленных к пробам препаратов ферментов следующее:

катепсина — 1/2 мл глициринового экстракта из печени;

папаина — 30 мг сухого препарата;

пепсина — 1 мл раствора, содержащего 5 мг сухого кристаллического фермента (по азоту);

трипсина — 1 мл раствора, содержащего 6 мг сухого кристаллического фермента (по азоту);

химотрипсина — 1 мл раствора, содержащего 5,6 мг сухого кристаллического фермента (по азоту).

Гидролиз белка катепсином, папаином и пепсином проводился в цитратном буфере при различных рН, трипсином и химотрипсином — при рН = 7,3 (фосфатный буфер).

Результаты опытов приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Интенсивность ферментативного гидролиза белка при различных рН среды

Прирост аминокислот за 24 часа в 1 мл пробы в мг

Ферменты	рН									
	2,3	3,2	3,67	4,0	4,4	4,5	4,9	5,0	6,0	7,3
Папаин	0,26	0,28	0,42	0,16	0,30	—	0,30	—	0,32	—
Катепсин	0,00	0,14	0,38	0,46	—	0,44	—	0,32	0,22	—
Пепсин	0,00	0,10	0,18	0,00	—	0,12	—	0,06	—	—
Трипсин	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,20
Химотрипсин . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,12

Нами установлено, что выделенный в нашей лаборатории новый кристаллический белок хорошо расщепляется катепсином в буферной смеси при рН = 3,67—5,0; оптимальное рН = 4,0.

За 24 часа при 37° С в пробе, содержащей 40 мг сухого белка (что соответствует 6,4 мг азота), содержание свободного аминокислот увеличивается на 2,3 мг. Если представить себе, что весь азот белка является аминокислотом пептидных связей (что не соответствует действительности), то и в этом случае необходимо допустить разрыв не менее 40% всех пептидных связей. Фактически же их гидролизуетс значительное больше.

Приблизительно так же гидролизовался белок папаином. Как видно из табл. 1, за 24 часа содержание аминокислот увеличилось в 1 мл пробы на 0,42 мг, или во всей пробе на 2,10 мг. Следовательно, за 24 часа разрывалось не меньше 30% пептидных связей в белке.

Кристаллический пепсин не расщепляет белка с освобождением аминокислот в сильно кислой среде ($pH = 2,5; 2,0; 2,3$), но при $pH = 4,0$ имеет место некоторое нарастание свободного аминокислот — 0,18 мг на 1 мл, или 0,90 мг во всей пробе. 14% всего белкового азота накапливается в виде свободного аминокислот.

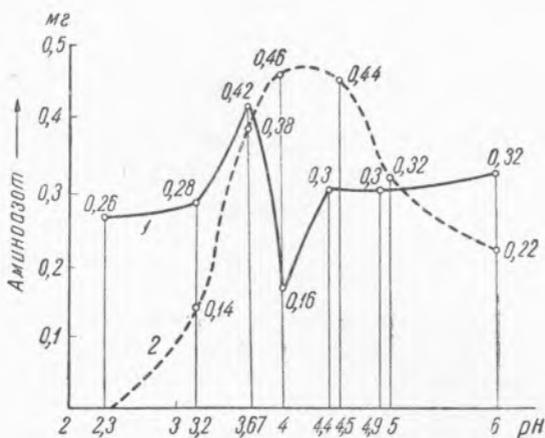


Рис. 2. Интенсивность гидролиза белка папаином и катепсином в зависимости от pH среды.
1 — папаин, 2 — катепсин

Кристаллический трипсин гидролизует белок значительно слабее (приблизительно в 2 раза), чем катепсин или папаин. За 24 часа только около 15% белкового азота накапливается в виде свободного аминокислот.

Кристаллический химотрипсин очень слабо гидролизует этот белок. Около 9% белкового азота освобождается после 24 часов гидролиза в виде свободного аминокислот. Денатурация белка кипячением не изменяет степени перевариваемости белка химотрипсином и трипсином.

При сравнении показателей степени гидролиза белка катепсином и папаином (рис. 2) при различных pH необходимо отметить, что оптимумы pH для катепсина и папаина очень близки, хотя и четко разграничены. Оптимум pH среды для папаина 3,7, а для катепсина от 4 до 4,5. Для папаина имеется еще второй оптимум среды между 5 и 6.

На основании наших данных можно сказать, что выделенный кристаллический белок нельзя отнести ни к коллагену, ни к эластину, хотя по ряду свойств он напоминает эти белки.

Исследования продолжаются.

Институт биологической и медицинской химии
Академии медицинских наук СССР

Поступило
10 I 1947

и
Лаборатория физиологической химии
Академии Наук СССР

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ V. N. Orekhovich, Am. Rev. Sov. Med., 6, 517 (1944). ² В. Н. Орехович и Т. П. Соколова, ДАН, 25, 747 (1940). ³ В. Н. Орехович, Биохимия, 5, 331 (1940). ⁴ Он же, Биохимия, 3, 456 и 616 (1938).