

Г. А. ДЕБОРИН

О КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА В МОНОСЛОЕ НА ГРАНИЦЕ РАЗДЕЛА ВОЗДУХ/ВОДА

(Представлено академиком А. И. Опариным 11 XII 1950)

За последние годы накоплен большой экспериментальный материал о поверхностной химии белков. Неослабный интерес к этой проблеме объясняется тем, что понимание процессов, протекающих в адсорбированном состоянии, может дать ключ к расшифровке многих биологически чрезвычайно важных явлений, протекающих в живой клетке. В биологических системах имеется огромное количество поверхностей раздела, различающихся по химическим группировкам, энергии и физическому состоянию. По этим причинам зачастую простой акт адсорбции на такой поверхности может приводить к тем или иным изменениям нативной белковой молекулы вплоть до потери ею растворимости в воде и поверхностной денатурации, являющейся, повидимому, существенным моментом в образовании мембран в биологических системах. Согласно представлениям А. И. Опарина (¹), внутренняя поверхность клетки имеет решающее значение в определении направления протекающих в ней ферментативных процессов, связанного со сдвигом равновесия в поверхностном адсорбционном слое. В свою очередь этот сдвиг обуславливается наличием адсорбционных молекулярных сил и особыми стерическими условиями в пленке. Более детально этот вопрос рассмотрен С. Е. Бреслером (²).

Окончательное решение вопроса о том, является ли поверхностная энергия тем фактором, который смещает равновесие в сторону синтеза белка в клетке, может быть получено лишь после появления нового экспериментального материала в этой области. С этой проблемой тесно связан вопрос о морфологических изменениях, претерпеваемых белком в поверхностном слое, и о реакционной способности белков в этих слоях. Некоторые данные и соображения о морфологии белковых макромолекул в поверхностном слое были нами опубликованы (³).

Реакционная способность белков в монослоях являлась предметом исследований ряда авторов. Шульман и Райдил (⁴) с помощью измерений фазового потенциала исследовали протеолиз яичного альбумина и казеиногена панкреатином. Они показали, что кинетика протеолиза в монослое совпадает с кинетикой протеолиза тех же белков в объеме как в отношении влияния рН, так и по порядку ферментативной реакции. Авторы работали с конденсированными пленками белков, а фермент вводили не в монослой белка, а под него, в «подкладку», что не позволяет судить о наличии морфологических изменений белка-фермента в монослое и не может поэтому дать представления об истинных процессах, протекающих в монослое при протеолизе.

Гортер (⁵) снимал монослой пепсина и трипсина с поверхности воды

с помощью шелковой сетки, переносил их в раствор казеина и показал, что при этих условиях ферменты сохраняли до 80 % своей исходной ферментативной активности. Такие же данные были получены Лэнгмюром ⁽⁶⁾ для пепсина. Им же было показано, что монослой уреазы, отложенный на металлической пластинке, сохраняет лишь 0,02 % своей ферментативной активности. Как показал Гаркинс ⁽⁷⁾, адсорбированная каталаза сохраняет лишь $1/5$ — $1/10$ своей ферментативной активности в растворе. Для объяснения указанных фактов выдвигались различные гипотезы, и, в частности, высказывалось предположение, что на поверхности раздела фаз от фермента отщепляется его простетическая группа. Следует отметить, что все указанные работы проводились в совершенно различных условиях, различными экспериментальными методами. Как правило, в этих исследованиях белковые пленки не находились в состоянии газового моно-

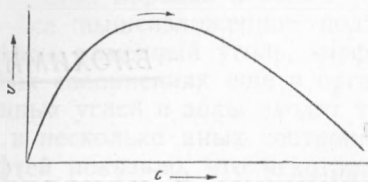


Рис. 1. Схема зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

молекулярного слоя, в результате чего в них, повидимому, происходили побочные процессы и, в частности, необратимая денатурация, приводящие к потере ферментами их ферментативной активности. В последнее время Булл ⁽⁸⁾, работавший в области малых поверхностных давлений, смешивал на поверхности 5 % сернокислого аммония при pH 2,3 пленки яичного альбумина и пепсина. Он установил, что сжатие смешанной пленки дает кривую сила — площадь, которая может быть предсказана по сумме индивидуальных пленок.

Наша экспериментальная работа по исследованию ферментативной активности в газовых монослоях исходила из той идеи, что в результате протеолиза белка под действием фермента в поверхностном слое будет происходить увеличение числа частиц, приводящее к возрастанию поверхностного давления. Естественно, что это будет справедливо лишь в том случае, если продукты протеолиза не переходят в объем раствора, служащего «подкладкой».

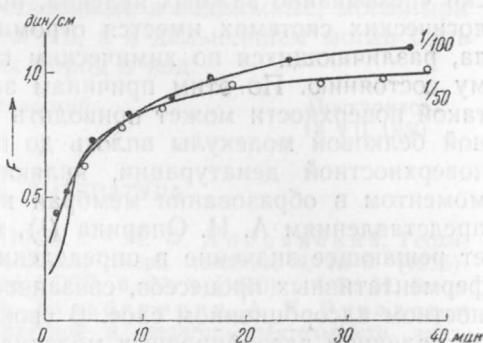


Рис. 2. Зависимость поверхностного давления от времени при протеолизе яичного альбумина трипсином в монослое

Экспериментальная часть

Для опытов применялся кристаллический яичный альбумин в виде его 0,03 % водного раствора. Пленки наносились на насыщенный раствор сернокислого аммония при pH 7,7. Значение pH контролировалось с точностью до $\pm 0,05$ с помощью стеклянного электрода. Температура растворов в ванне доводилась до 37° и с помощью ультратермостата Гепплера поддерживалась с точностью до $\pm 0,01^\circ$. Поверхностное давление измерялось с помощью «весов» Вильгельми с крутильной нитью и оптическим отсчетом с точностью до 0,02 дин/см. Первоначально снималась обычная ⁽⁹⁾ кривая давление — площадь для монослоя яичного альбумина, содержавшего 0,4 мг чистого белка на 1 м². Кривая снималась в течение 2 час. при давлениях, не превышающих 1 дин/см. В дальнейшей работе эта кривая служила в качестве калибровочной

кривой для определения концентрации белка в поверхностном слое при определенном двухмерном давлении.

По достижении равновесия в поверхностный слой вводился активный кристаллический трипсин в количестве, составлявшем $1/100$ или $1/50$ от количества субстрата. При этом снималась кинетическая кривая зависимости роста поверхностного давления со временем. По истечении 25—30 мин. давление достигало предельного значения, свидетельствуя об окончании протеолиза.

Как было показано П. В. Афанасьевым⁽¹⁰⁾, при постоянной концентрации фермента зависимость скорости ферментативной реакции в объеме от концентрации субстрата описывается кривой, приведенной на рис. 1. Так как по мере течения протеолиза продукты протеолиза, в свою очередь, представляют собой субстрат, то, следовательно, по мере протекания ферментативного гидролиза фактическая концентрация субстрата должна нарастать.

Поэтому в том случае, когда концентрация фермента относительно мала, ферментативная система проходит состояния, относящиеся к нисходящей части кривой рис. 1 при больших концентрациях субстрата, т. е. с падением скорости. При относительно больших концентрациях фермента скорость ферментативного процесса вначале должна нарастать за счет возрастания концентрации субстрата, затем должна достигнуть оптимального значения и далее снизиться до нуля.

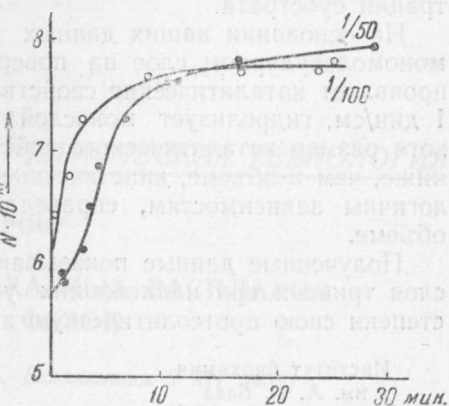


Рис. 3. Зависимость изменения концентрации субстрата со временем (N — число частиц)

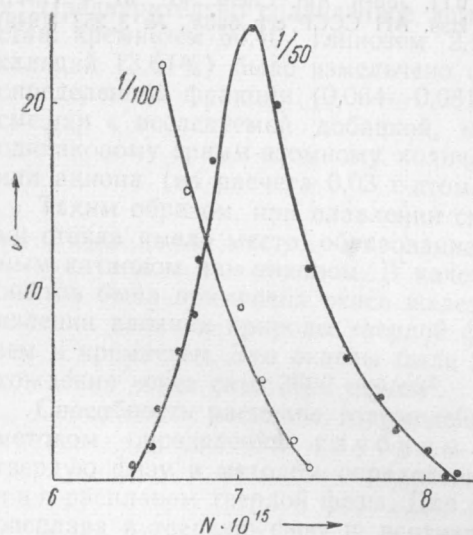


Рис. 4. Зависимость скорости протеолиза монослоя яичного альбумина трипсином от концентрации субстрата

Таким образом, при малых концентрациях фермента кинетическая кривая (F от t) должна иметь нормальный вид, а при больших концентрациях фермента должна быть S-образной.

На рис. 2 приведены полученные нами кинетические кривые зависимости поверхностного давления от времени при протеолизе яичного альбумина трипсином в монослое на границе раздела воздух/вода при двух концентрациях фермента. С помощью калибровочных кривых эти данные

пересчитывались и определялась зависимость изменения концентрации субстрата от времени (см. рис. 3).

Графическое дифференцирование кривых рис. 3 позволило рассчитать зависимость скорости протеолиза от числа частиц белка в слое, т. е. от концентрации субстрата.

Эти данные приведены на рис. 4 для тех же двух концентраций фермента.

Таким образом, наши экспериментальные данные полностью отвечают теоретическим соображениям Афанасьева о кинетике ферментативного действия в объеме.

Следует отметить, что глубина гидролиза белка в мономолекулярном слое невелика и ограничивается 1,5—2-кратным возрастанием концентрации субстрата.

На основании наших данных можно считать установленным, что в мономолекулярном слое на поверхности раздела воздух/вода трипсин проявляет каталитические свойства и при давлениях, не превышающих 1 дин/см, гидролизует монослой яичного альбумина. Установлено, что хотя размер каталитического действия фермента в монослое неизмеримо ниже, чем в объеме, кинетические зависимости при этих процессах аналогичны зависимостям, справедливым при процессах, протекающих в объеме.

Полученные данные показывают, что в условиях мономолекулярного слоя трипсин при надлежащих условиях сохраняет еще в небольшой степени свою протеолитическую активность.

Институт биохимии
им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
4 XII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Опарин, Совещ. по белку, изд. АН СССР, М., 1945. ² С. Е. Бреслер, Усп. соврем. биол., 30, в. 1 (1950). ³ Г. А. Деборин, ДАН, 67, 889 (1949). ⁴ J. Schulman and E. Rideal, Biochem. Journ., 27, 1581 (1933). ⁵ E. Gorter, Trans. Farad. Soc., 33, 1125 (1937); Proc. Roy. Soc. (London), A, 155, 706 (1936). ⁶ I. Langmuir and V. J. Schaefer, Journ. Am. Chem. Soc., 60, 1351 (1938). ⁷ W. Harkins, L. Fourth and P. Fourth, Journ. Biol. Chem., 132, 111 (1940). ⁸ H. Bull, ibid., 185, 27 (1950). ⁹ H. Bull, Journ. Am. Chem. Soc., 67, 4 (1945). ¹⁰ П. В. Афанасьев, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 253 (1949).