

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ 21

ХИМИЯ * ГЕОЛОГИЯ. 1972, № 2

УДК 577.156.3

H. HEINLO

TRÜPSIINI ENSÜMAATILISE AKTIIVSUSE SÄILIVUSEST JA
AUTOLÜÜSI INHIBEERIMISEST SOJAOAST ERALDATUD
INHIBIITORI TOIMEL *X. ХЕИНЛО. О СОХРАНЕНИИ ЭНЗИМАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ИНГИБИРОВАНИИ
АВТОЛИЗА ТРИПСИНА В ПРИСУТСТВИИ ИНГИБИТОРА ИЗ СОЕВЫХ БОБОВH. HEINLO. PRESERVATION OF TRYPTIC ACTIVITY AND INHIBITION OF AUTOLYSIS OF
TRYPSIN IN THE PRESENCE OF SOYBEAN INHIBITOR

Trüpsiini (T) iseloomustab võime aktiveeruda ja lõhustuda madal-molekulaarseteks fragmentideks niipea, kui pH tõuseb üle 5. Kahel viimasel aastakümnel on paljud [1-8] uurinud T autolüüsi produktide, s. o. T fragmentide fermentatiivset aktiivsust. Ensüümi fragmentide aktiivsuse uurimine pakub huvi seoses küsimusega, kui suur osa fermenti molekulist on vajalik, et tagada fermentreaktsiooni.

Meie varasemates töödes [9, 10] uuriti T leeliselise ja happelise autolüüsi tingimustes saadud produktide eraldumist geelfiltratsioonil ja elektrofooreasil, samuti eraldunud fragmentide katalüütilist aktiivsust. Selgus, et katalüütiline aktiivsus on seotud vähemalt $5/8$ -ga natiivse T molekulist. Veelgi väiksemad autolüüsiga saadud fragmendid osutusid katalüütiliselt vähe- või mitteaktiivseteks.

Käesolevas töös uuriti trüpsiini—trüpsiiniinhibiitori komplekside (T—STI kompleks) autolüüsi ja sellega kaasnevaid muutusi ensüümi aktiivsuses. Komplekside moodustamiseks kasutati sojaoast eraldatud trüpsiiniinhibiitorit (STI), mis ühineb T-ga koheselt ja suhteliselt püsivalt, kusjuures inhibeerimine on stöhhiomeetriline ja konkureeriv. T—STI kompleksi ehituse kohta puuduvad täpsed andmed. Levinud aga on seisukoht, et side- med kompleksis on mittekovalentsed. T—STI kompleks on ebastabiilne pH happelises piirkonnas [11].

Käesolevas uurimistöös püüti selgitada, millist toimet avaldab STI trüpsiini autolüüsi kulule ja kuidas muutub T fermentatiivne aktiivsus sõltuvalt T ja STI kaalulistest vahekordadest.

Metoodika

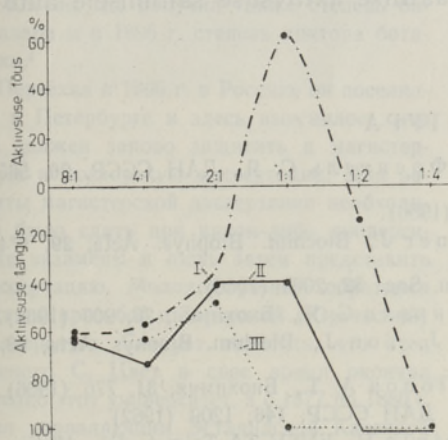
Reagentidena kasutati Spofa kristalset T-d ja Reanali STI-d. T ja STI lahustamiseks, samuti eluendina autolüsaatide geelfiltratsioonil Sephadexi G-100 kolonnis (1,2×140 cm) kasutati 0,1 M formiaatpuhvit (pH=3,2), millele lisati NaCl kuni ioontugevuseni $\mu=0,5$. T ja STI proovid kaaluti vahekordades 8:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4. Autolüüsi proovid samades kaalulistes vahekordades lahustati boraatpuhvis (pH=8,6) ja inkubeeriti 3,5 tundi temperatuuril 35°C. Autolüüs lõpetati formiaatpuhvi lisamisega kuni lahus saavutas

* Uurimus valmis ENSV TA korrespondentliikme O. Kirreti juhendamisel.

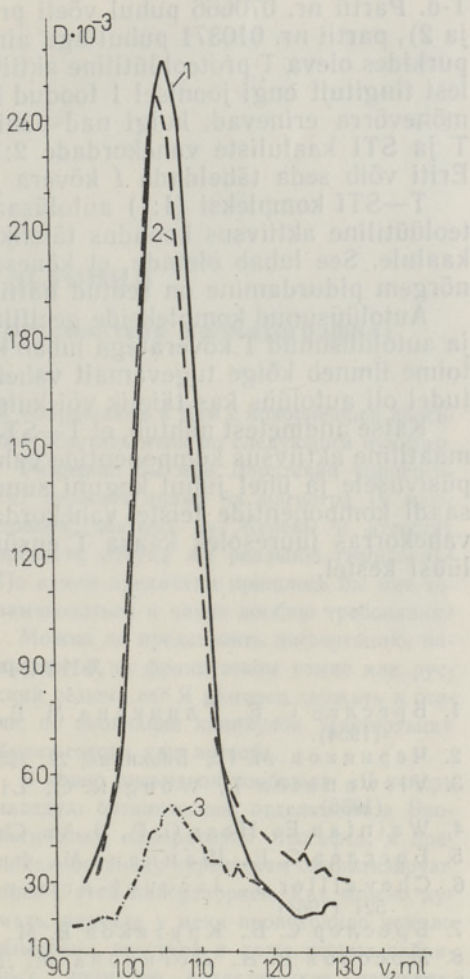
pH=3,2. T-sisalduse muutused proovides määrati spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 280 nm ultraviolettspektromeetri (Spektromom 201) abil. T ensümaatilist aktiivsust T—STI kompleksides hinnati kaseiini (Hammarsten, Reanal) hüdrolüüsi intensiivsuse järgi [12].

Uurimistulemused

Andmed T aktiivsuse kohta autolüüsunud ja autolüüsumata fermentiinhibiitori kompleksides on esitatud joonisel 1. Neist selgub, et T ensümaatiline aktiivsus vähenes autolüüsi kulgedes oluliselt T ja STI kõikide vahekordade puhul, välja arvatud 1:1. T ülehulga korral (8:1,



Joon. 1. T aktiivsuse muutumine T—STI kompleksides. I — T (nr. 1)—STI, II — T (nr. 2)—STI, III — T (nr. 3)—STI.



Joon. 2. Natiivse T (1), autolüüsunud T—STI (2) ja autolüüsunud T (3) geelfiltratsioonikõverad.

4:1, 2:1) on aktiivsuse vähenemine tingitud peamiselt inhibiitoriga seostamata jäänud T molekulide autolüütilisest lagunemisest. Nendes tingimustes inhibeeris STI lisand T aktiivsust vaid 60—50%. STI suure ülehulga korral (1:4) aga seostati kõik T molekulid inhibiitoriga; see põhjustas kuni 100-protsendilise aktiivsuse languse ja autolüüsi pidurduse. T ja STI vahekorra 1:1 puhul täheldati proteolüütilise aktiivsuse teatavat suurenemist ehk paremat säilimist, võrreldes T—STI autolüüsumata kompleksi aktiivsusega. T suuremat fermentatiivset aktiivsust komplekside autolüüsates täheldati ka siis, kui mõlema komponendi kaalulised kogused suurendati kas 5- või 10-kordseks. Kirjeldatud nähtus on seega reeglipärane ja huvipakkuv, kuid siiani pole sellele tähelepanu juhitud. Teataval määral on tähelepanu vääriv, et V. Mosolov ja M. Loginova eraldasid T autolüüsast geelfiltratsiooni teel ühe madalmolekulaarse fraktsiooni, mille esteraasne aktiivsus oli kõrgem kui lähtetrüpsiinil [8].

Täienduseks ülalõeldule tuleb märkida, et T—STI komplekside moodustamiseks kasutati kahest erinevast partiist nr. (070666 ja 010371) pärinevat

T-d. Partii nr. 070666 puhul võeti proovid kahest erinevast purgist (nr. 1 ja 2), partii nr. 010371 puhul aga ainult ühest purgist (nr. 3). Kõigis neis purkides oleva T proteolüütiline aktiivsus oli küllaltki erinev. Võib olla sellest tingitult ongi joonisel 1 toodud kolme katse andmed (kõverad I—III) mõnevõrra erinevad, kuigi nad põhiliselt viitavad kõik ühele ja samale: T ja STI kaaluliste vahekordade 2:1 ja 1:1 puhul suureneb T aktiivsus. Eriti võib seda täheldada I kõvera juures.

T—STI kompleksi (1:1) autolüsaadi geelfiltratsiooni fraktsioonide proteolüütiline aktiivsus koondus täielikult piirkonda, mis vastab T molekulkaalule. See lubab oletada, et kõnesoleva aktiivsuse suurenemine või siis nõrgem pidurdamine on seotud natiivse T molekulidega.

Autolüüsunud komplekside geelfiltratsioonikõverate võrdlemine natiivse ja autolüüsunud T kõveratega lubab kinnitada, et T autolüüsi pidurdav STI toime ilmneb kõige tugevamalt vahekorra 1:1 puhul (joon. 2), teistel juhtudel oli autolüüs kas täielik või kulges nõrgemini.

Katse andmetest nähtub, et T—STI kompleksi autolüüsil ilmutab T ensümaatilise aktiivsuse komponentide vahekorra 1:1 juures tendentsi suuremale püsivusele ja ühel juhul koguni suurenemisele, võrreldes andmetega, mis saadi komponentide teiste vahekordade juures. Seega aitab STI sobivas vahekorras juuresolek kaasa T ensümaatilise aktiivsuse säilimisele autolüüsi kestel.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бреслер С. Е., Глинкина М. В., Френкель С. Я., ДАН СССР, **96**, 565 (1954).
2. Черников М. П., Биохимия, **21**, 295 (1956).
3. Viswanatha T., Wong R. C., Liener J., Biochim. Biophys. Acta, **29**, 174 (1958).
4. Wainfan E., Hess G. P., J. Am. Chem. Soc., **82**, 2069 (1960).
5. Бреслер С. Е., Шампань М., Френкель С. Я., Биохимия, **26**, 909 (1962).
6. Chevallier J., Jacquot-Armand J., Yon J., Biochim. Biophys. Acta, **92**, 521 (1964).
7. Бреслер С. Е., Крутяков В. М., Попов А. Т., Биохимия, **31**, 776 (1966).
8. Мосолов В. В., Легинова М. Д., ДАН СССР, **146**, 1209 (1962).
9. Kirret O., Lippmaa E., Arro I., Heinlo H., ENSV TA Toimet., Füs.-Matem. ja Tehn.-tead. seeria, **15**, 612 (1966).
10. Kirret O., Arro I., Heinlo H., ENSV TA Toimet., Keem.-Geol., **18**, 83 (1969).
11. Boyer P. D., Lardy H., Myrbäck K., The Enzymes, **4**, New York, 1960.
12. Bergmeyer H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 811—818.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Keemia Instituut

Toimetusse saabunud
25. I 1972