

Способ определения активности кератиназ по гидролизу субстрата в геле агарозы

Годуленко А.Г., Белоусова А.И. Башкирский государственный университет, г. Уфа qip.nikmy@yandex.ru

Кератин является третьим наиболее распространенным полимером в природе после целлюлозы и хитина. Это полноценный (содержит 19 аминокислот) белок, однако практическое использование его пока ограничено. Мировые отходы только перового сырья за год составляют миллионы тонн. Главные методы утилизации - сжигание или захоронение. При ферментативном гидролизе максимально сберегается питательная ценность получаемых продуктов, кроме того увеличиваются их растворимость и усвояемость.

Способы получения растворимых форм кератина

Химический гидролиз		Ферментативный гидролиз	Гидротермический метод
Кислотный	Щелочной		
Характерны высокие температуры, давление, средняя продолжительность реакций. Приводит к разрушению нативной структуры кератина, а также некоторых аминокислот.		Характерны мягкие условия. Сохраняются важные аминокислоты.	Используются вакуумные горизонтальные реакторы с высоким давлением и критическими температурами. Приводит к разрушению многих аминокислот.

Продуцентами кератинолитических ферментов являются бактерии рода *Streptomyces*, *Bacillus*, а также грибы рода *Microsporium*. Помимо микроорганизмов, ферменты с кератинолитической активностью могут вырабатывать личинки восковой моли (*Tineola bisselliella*). Для получения и использования кератиназ необходим тщательный выбор методов определения ферментативной активности.

Способ определения активности кератираз по гидролизу субстрата в геле агарозы

Годуленко А.Г., Белоусова А.И. Башкирский государственный университет, г. Уфа qip.nikmy@yandex.ru

Существуют разнообразные методы определения активности кератинолитических ферментов. Выбор того или иного метода при исследовании кератираз определяется наличием доступных субстратов и необходимостью использования приборов.

Сравнительная характеристика методов определения кератинолитической активности

Метод	Субстрат	Сущность
Вискозиметрический, Reyes et all, 1989	Раствор кератина, кератан	уменьшение вязкости растворов белков под действием ферментов
Спектрофотометрические методы:		
Reffel et all, 2003	Азокератин	Изменение оптической плотности при 440 нм
Anbu et all, 2006	Кератин волос	Повышение оптической плотности фильтрата при 280 нм
Ramesh, 1996	Кератин перьев	Аналитическую смесь выдерживают в ледяной воде, оптическую плотность фильтрата определяют при 280 нм
Чашечный «cup plate», Frobisher M, 1957	Коллоидный кератин	Метод основан на формировании зон просветления в агаре, содержащем кератин

Модификацией чашечного метода является метод агарозных пластин (Шпирная и др., 2009). Мы исследовали возможность использования данного метода для определения активности кератираз.

Способ определения активности кератиназ по гидролизу субстрата в геле агарозы

Годуленко А.Г., Белоусова А.И. Башкирский государственный университет, г. Уфа qip.nikmu@yandex.ru

Растворимые формы кератина из перьевого сырья получали различными методами. Наиболее эффективным оказалось использование субстрата, полученного по методу Хичиянца (щелочной гидролиз, осаждение этанолом). При включении в гель агарозы (1%), данный субстрат расщеплялся протеиназой К, неспецифическая протеиназа (трипсин) не проявляла активности (рис.1).

Площадь зон гидролиза измеряли при помощи компьютерной программы и переводили в единицы активности фермента (1 мм² гидролизованного субстрата соответствует 1мЕ активности фермента). Из графика видно, что при увеличении концентрации фермента, линейно возрастает и его активность (рис.2). Таким образом, предложенный метод позволяет обнаружить и количественно измерить активность кератинолитических ферментов.

Специфичность

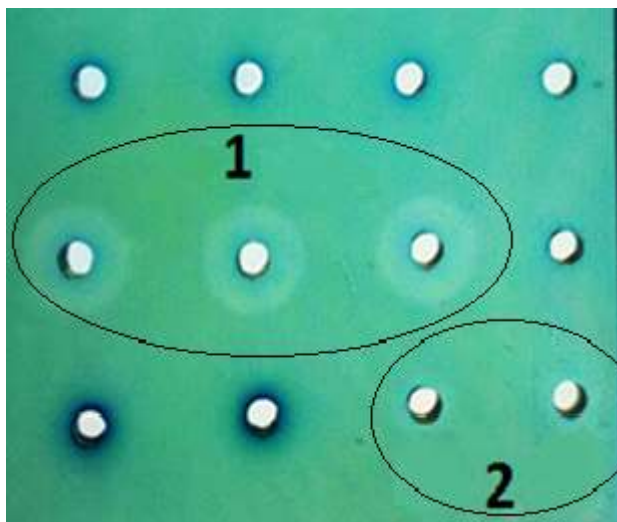


Рис.1. Лунки с растворами ферментов (0,1 мг/мл): 1 – протеиназа К; 2 – трипсин. Инкубация в течение 4 –х часов. Окраска бромфеноловым синим

Чувствительность

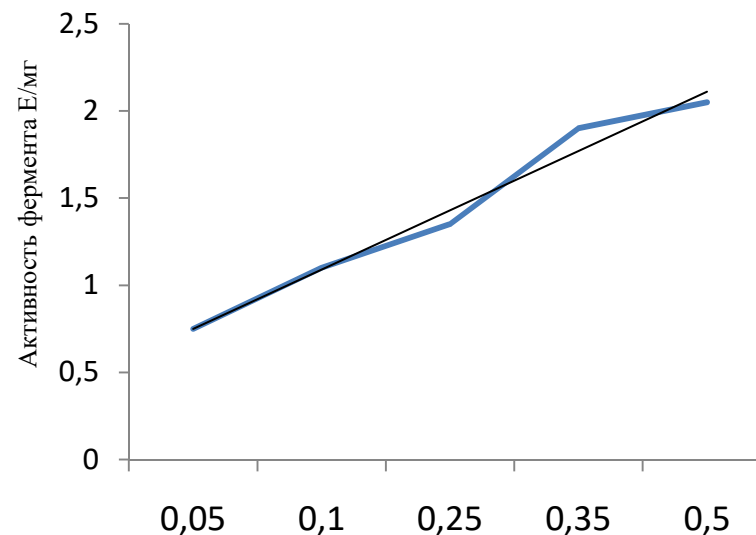


Рис. 2. Концентрация протеиназы К, мг/мл