

Література

1. Черно Н. К. Иммунизация ферментов заместительной терапии на пищевых волокнах [Текст] / Черно Н. К., Давиденко Т. И., Севастьянова Е. В., Кравченко И. А. // Доклады АН Украины, биохимия. 1994.– № 5.– С. 146-149.
2. Антонов Ю. А. Применение метода безмембранного осмоса для концентрирования белков из молекулярно-дисперсных и коллоидно-дисперсных растворов (обзор) [Текст] / Антонов Ю. А. // Прикладная биохимия и микробиология.– 2000.– Т. 36.– № 4.– С. 380-394.

УДК 633.31:66.097.8

ВИДІЛЕННЯ ІНГІБІТОРУ ТРИПСИНУ З ЗЕРНА АМАРАНТУ З ВИКОРИСТАННЯМ АФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

**Крусір Г.В., канд. техн. наук, доцент, Севастьянова О.В., канд. хім. наук, доцент
Одеська національна академія харчових технологій, м. Одеса**

Виділено та охарактеризовано білковий інгібітор трипсину зерна амаранту. Він має значну антипротеолітичну активність та є перспективним для створення харчових композицій, які призначені для корекції харчування за різних станів, що супроводжуються підвищеною активацією протеолітичних ферментів.

Albuminous trypsin inhibitor of amaranth corn is selected and described. He has considerable antiproteolytic activity and is perspective for food compositions creation, which are intended for correction of feed at different states which are accompanied by the promoted activation of proteolytic enzymes.

Ключові слова: зерно амаранту, екстракція, афінна хроматографія, інгібітор трипсину, амінокислота, молекулярна маса.

Одним з актуальних та перспективних напрямків біотехнології є розробка харчових композицій, які спрямовано впливають на ферментативні процеси в організмі.

Білкові інгібітори протеолітичних ферментів відіграють важливу роль у підтримці гомеостазу. Вони беруть участь у регулюванні функцій протеаз шлунково-кишкового тракту, кровоносної системи, клітин шкіри та інших органів. У наш час багаточисельними лабораторними та клінічними дослідженнями доведено, що активація протеаз є основною ланкою в патогенезі таких тяжких захворювань людини, як панкреатити різної етіології, захворювання системи згортання крові, шоківий та алергічний стани, різні запальні процеси [1].

Відомо, що секреція соку підшлункової залози регулюється «процесом травлення». Перетравлюваність їжі залежить від рівня трипсину та хімотрипсину в кишечнику. Коли рівень цих ферментів стає нижчим за критичний показник, підшлункова залоза починає виробляти більше ферментів. За умов зв'язування трипсину з інгібітором може відбуватися уповільнення травлення [2]. Фактором-посередником між трипсином та підшлунковою залозою слугує гормон холецистокінін, який вивільняється з секретом кишечника, коли вміст трипсину в ньому стає нижчим за найвищий показник. Таким чином, збільшення рівня інгібіторів трипсину в їжі викликає ланцюг реакцій, що відновлюють нормальний вміст трипсину в кишечнику та нормалізують травлення [3].

Вплив інгібітору трипсину на організм людини не обмежується функціями травлення. Деякі патологічні стани, такі як ревматоїдний артрит, бактеріальна пневмонія, перитоніт, характеризуються надлишковою активацією протеолізу. Введення в організм додаткових кількостей інгібіторів - один з методів лікування перерахованих захворювань.

Доведено антиоксидантну дію інгібіторів хімотрипсину з сої, квасолі та картоплі, яка залежить як від дози, так і від типу інгібітора. Прийнято вважати, що інгібітори захищають від окиснення перш за все клітини та молекули шлунково-кишкового тракту [4]. Механізм цього захисту поки що не з'ясовано, але вважається, що атоми сульфуру молекул інгібітору здатні зв'язувати радикали, що попереджує їх окиснення та утворення пероксиду водню.

Інгібітори виявляють також антивірусну, антимікробну активність, мають протизапальну, антикоагуляційну дію.

Метою роботи є виділення та характеристика білкового інгібітору трипсину зерна амаранту. Він رایонований на Україні, має значну антипротеолітичну активність [4] та перспективний як компонент хар-

чових композицій, призначених для корекції харчування за різних станів, що супроводжуються підвищеною активацією протеолітичних ферментів.

Інгібітор трипсину виділяли з зерна амаранту *Amaranthus caudatus* (білий), який характеризується найбільшим значенням ТІА (трипсинінгібіторної активності), вона склала 3,56 ІО/г зерна амаранту. Крім того *Amaranthus caudatus* є однією з тих рослин, які зможуть доповнити своєю продукцією наш харчовий баланс. Культура цієї рослини, завдяки великим урожаям, посухостійкості, можливості створити зручні для механізованого прибирання форми і низки інших якостей, має широкі перспективи.

Об'єкти досліджень: зерно амаранту, трипсин підшлункової залози людини (Sigma, T6424).

Як сорбент використовували сефарозу 4В. Її активацію проводили з використанням бензохінону [5], який синтезували за методикою [6] з попередньо очищеного гідрохінону [7].

Виклад основного матеріалу.

1. Ковалентне зв'язування активованого носія з трипсином проводили наступним методом: до 3 мл гелю активованої сефарози 4В додавали 3 мл 0,1 М фосфатного буферу, рН 7,6. Реакцію зв'язування проводили при 4 °С впродовж 24 годин. Отриманий гель трипсин-сефарози 4В промивали дистильованою водою на скляному фільтрі, а потім у колонці (1x15 см) послідовно 1 М КСІ в 0,1 М Na-ацетатному буфері, рН 4 протягом 24 годин, 1 М КСІ в 0,1 М фосфатному буфері, рН 8,0 протягом 24 годин та дистильованою водою до відсутності поглинання при 280 нм.

2. Знежирення зерна амаранту здійснювали в апараті Сокслета з використанням петролейного ефіру. Екстракцію інгібітору трипсину з зерна амаранту проводили 0,05 М боратним буфером, рН 7,6, який містив 0,5 М NaCl (гідромодуль 100) при кімнатній температурі. Екстракт прогрівали при температурі 70 °С впродовж 10 хвилин для інактивації протеаз, які могли бути екстраговані з зерна амаранту. Осад відокремлювали від супернатанту за допомогою центрифугування при швидкості 8000 обертів за хвилину впродовж 20 хвилин.

3. Попередньо було викладено, що інгібітор трипсину зерна амаранту, який відносять до сімейства інгібітора Кунітца, є білком-альбуміном. Тому його фракціонування проводили сульфатом амонію зі ступенем насичення солі між (75 і 100) % (F₇₅₋₁₀₀). Розчин білка після кожного введення солі перемішували і центрифугували при швидкості 8000 обертів за хвилину впродовж 20 хвилин. Фракціонування сульфатом амонію проводили при температурі 4 °С впродовж 40 хвилин [8]. Отриманий осад розчиняли у дистильованій воді, суспензію білка переносили до діалізної камери з пористою мембраною і діалізували проти дистильованої води впродовж 3 днів. Осад відокремлювали від рідинної фази центрифугуванням при 5000 обертів за хвилину протягом 30 хвилин. Отриманий супернатант наносили на колонку з афінним сорбентом

4. Розчин інгібітору пропускали через колонку (1x15 см) з сорбентом трипсин-сефароза 4В зі швидкістю 15 мл/хвилину. Після насичення сорбенту, яке контролювали за появою у елюаті активності інгібітору по відношенню до трипсину, гель промивали 0,05 М трис/НСІ буфером, рН 8. Гель в колонці промивали послідовно 1 М розчином NaCl, 8 М сечовиною в 0,05 М трис/НСІ буфері, рН 8. Десорбцію інгібітору проводили 10⁻³ М розчином HCl. Активну фракцію нейтралізували до рН 8,0 1 М розчином NaOH та ліофільно висушили.

5. Очищений інгібітор досліджено за допомогою гель-електрофорезу в трис-гліциновому буфері рН 8,3 з використанням 15 % поліакриламідного гелю (ПААГ) на приладі 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator. В якості маркерів використовували фосфорилазу В (92500 Да), БСА (37000 Да), яєчний альбумін (15000 Да), карбогідразу (29000 Да), соєвий інгібітор трипсина (21000 Да), цитохром С (12000 Да), інгібітор з легень великої рогатої худоби (6000 Да). Зразки оброблені при температурі 4 °С впродовж 3 годин струмом в 20 мА. Фіксацію білків проводили 60 % водним розчином трихлороцтової кислоти протягом 3 годин при кімнатній температурі. Гель зафарбовували фарбою «Кумасі – 250» впродовж 4 годин при кімнатній температурі. Промивку гелю проводили 7 % розчином оцтової кислоти в 10 % розчині ізопропілового спирту [9].

6. Інгібіторну активність (ІА) визначали за ступенем гальмування ферментативної активності трипсину і виражали в інгібіторних одиницях (ІО). Активність трипсину виражали кількістю казеїну, який було розщеплено 1 г препарату білка при 37 °С за 1 хвилину. В якості субстрату використовували казеїн за Гамерстеном.

7. Вміст білка визначали за методом Лоурі-Хартрі [10].

Після знежирення та екстракції білкових речовин провели фракціонування білкової складової зерна амаранту. Найбільш розповсюдженим та класичним є метод фракціонування екстрагованих білків солями з одержанням розчинів різного ступеня насиченості. Аналіз літературних джерел свідчить про те, що інгібітори протеолітичних ферментів знаходяться в альбуміновій фракції. Цим пояснюється дослідження інгібіторної активності у фракції білкових речовин, одержаних за ступенем насиченості солевих розчинів від 75 % до 100 %.

Стадії очищення інгібітору трипсину з зерна амаранту включали екстракцію 0,05 М боратним буфером, рН 7,6, фракціонування білкової складової екстракту сульфатом амонію з подальшим діалізом фракції між 75 % та 100 % ступенем насиченості $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та афінну хроматографію на біоспецифічному сорбенті трипсин – сефароза 4В (табл. 1).

Таблиця 1 – Стадії очищення інгібітору трипсину з зерна амаранту (10 г борошна зерна амаранту, ГМ 10)

Стадії очищення	1 стадія (екстракція)	2 стадія (фракціонування та діаліз)	3 стадія (афінна хроматографія)
Об'єм, см ³	90	120	70
ІА, ІО/ см ³	0,36	0,18	0,22
Білок, мг/ см ³	3,0	0,08	0,02
Загальний білок, мг	270	9,6	1,4
Сумарна ІА, од	32,4	21,6	15,4
Питома ІА, ІО/мг	0,12	2,25	11,0
Ступінь очищення	1,0	18,8	91,7
Вихід, %	100	66,7	47,5

Наведені в табл. 1 дані свідчать, що екстракт із вмістом білка 3,0 мг/см³ та інгібіторною активністю 0,36 ІО/см³ очищено до вмісту білка в активній фракції елюату після афінної хроматографії 0,02 мг/см³, що володіє інгібіторною активністю 0,22 ІО/см³. Ступінь очищення інгібітору складає 91,7. Таким чином, розрахунки свідчать, що із 100 г зерна амаранту можна одержати 4,7 мг інгібітору трипсину, інгібіторна активність якого складає 11,0 ІО/мг білка.

З даних таблиці можна зробити висновок, що інгібітор зерна амаранту може бути виділений за допомогою афінної хроматографії на іммобілізованому трипсині практично в одну стадію з виходом 47,4 % та високим ступенем очищення.

Субстанція є гігроскопічним порошком білого кольору добре розчинним у воді.

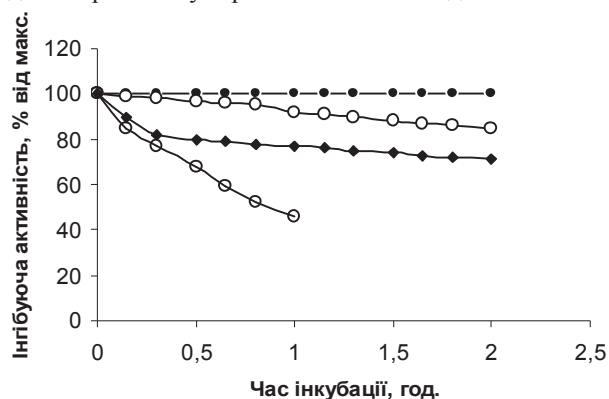
Для очищення білка-інгібітору трипсину використовували метод афінної хроматографії на трипсин-сефарозі 4В. Результати гель-хроматографії інгібітора, який виділено методом афінної хроматографії на трипсин-сефарозі, свідчать про те, що білок елюється в вигляді одного головного симетричного піка, об'єм елюювання якого відповідає значенню $M_r 20000 \pm 1000$, розрахованому за калібрувальним графіком.

Матеріал з $M_r 20\ 000$ ліофілізували і використовували в подальшій роботі.

Вивчені основні фізико-хімічні та біохімічні властивості виділеного ІТ з зерна амаранту.

Визначення гомогенності білка в ПААГ показало присутність двох ізоформ інгібітора з молекулярними масами (18 ± 1) кДа та (20 ± 1) кДа. Дані були підтвержені за допомогою метода гель-фільтрації. Дослідження показали, що інгібітор трипсина з зерна амаранту є сумішшю двох індивідуальних білків, які не утворюють асоціацій між собою.

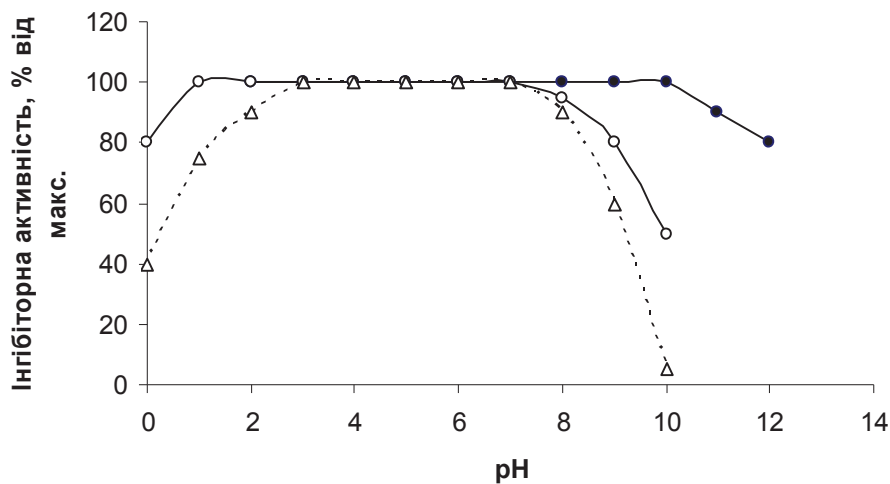
Відомо, що інгібітори протеолітичних ферментів природного походження володіють значними рН- і термостабільністю. У зв'язку з цим були проведені дослідження за визначенням рН- і термостабільності виділеного інгібітору. Як видно з представлених на рис. 1 даних, після 24 год. інкубації при температурі (20 ± 2) °С і (40 ± 2) °С активність інгібітору залишається практично на вихідному рівні. Ці дані дають можливість передбачити, що інгібітор трипсину з амаранту залишиться активним в умовах організму людини. При температурі (60 ± 2) °С інгібітор втрачає лише 10 % вихідної активності. При температурі (80 ± 2) °С за 20 хв. втрата активності складає 15 %, і далі активність продовжує плавно знижуватися. При температурі (100 ± 2) °С впродовж 1 год. активність інгібітору знижується наполовину. Отримані результати свідчать про високу термостабільність виділеного інгібітору.



Значення: 1 – (20 ± 2) і (40 ± 2) °С;
2 – (60 ± 2) °С; 3 – (80 ± 2) °С;
4 – (100 ± 2) °С

Рис. 1 – Залежність активності інгібітора трипсина із зерна амаранта від температури і часу витримування

Результати вивчення рН-стабільності інгібітору зерна амаранта подані на рис. 2, з нього видно, що за 4 год. інгібіторна активність залишається на початковому рівні в середовищі із значеннями рН від 2 до 11,5. При витримці ІТ протягом 12 год його активність падає при рН нижче 3,0 і вище 10. Після 24 год інкубації субстанції інгібітору при різних значеннях рН ІТ зберігає активність в інтервалі рН від 4 до 10. Отримані дані свідчать про значну рН-стійкість ІТ.



1 – 4 год.; 2 – 12 год.; 3 – 24 год

Рис. 2 – Стабільність інгібітора трипсину із зерна амаранта при різних значеннях рН за тривалості експозиції

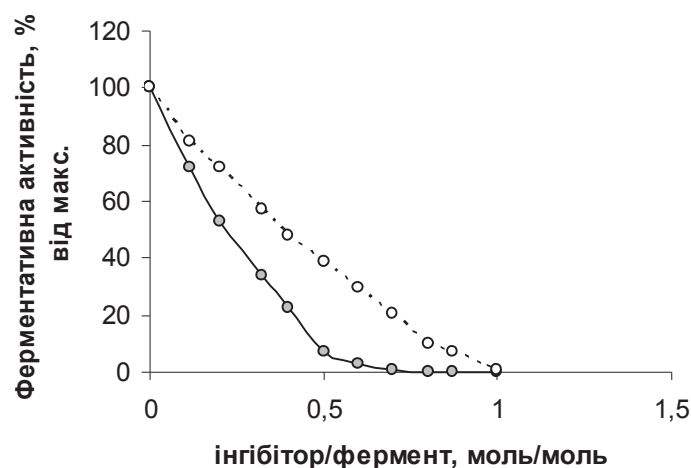
Однією з основних характеристик природних інгібіторів є специфічність їх дії на різні ферменти. У табл. 2 приведені порівняльні дані вивчення специфічності ІТ з насіння амаранта і препарату контрикал. Показано, що обидва препарати знижують активність трипсину, хімотрипсину і фібринолізина, активність ІТ порівняна з таким же препаратом тваринного походження. На відміну від контрикала, двократний надлишок інгібітору трипсину на 20 % гальмує активність мікробної протеїнази С, препарати якої застосовуються для замісної ферментної терапії при захворюваннях шлунково-кишкового тракту.

Таблиця 2 – Порівняльна специфічність дії інгібітору трипсину з зерна амаранта і контрикала (співвідношення концентрацій інгібітор: фермент – 1:1)

Фермент	Інгібіторна активність, %	
	ІТ амаранта	Контрикал
Трипсин	99,5 ± 0,5	94,7 ± 0,6
Хімотрипсин	49,5 ± 1,2	38,0 ± 1,3
Пепсин	не інгібує	не інгібує
Протеаза С (из <i>Acremonium chrysogenum</i> 328 А)	(20,0 ± 0,1)	не інгібує
Субтилізин	не інгібує	не інгібує
Лужна протеїназа із <i>Asp. oryzae</i>	не інгібує	не інгібує
α-амілаза	не інгібує	не інгібує

З наведених експериментальних даних дослідження видно, що отриманий інгібітор і інгібітор, що входить до складу комерційного препарату, ефективно знижують активність трипсину, незначно інгібують активність хімотрипсину та не впливають на активність α-амілази і протеаз. Таким чином, наведені дані свідчать, що інгібітор трипсину зерна амаранту не є біфункціональним інгібітором, тому що не впливає на активність амілолітичних ферментів.

Дослідження дії ІТ в концентраціях від 0,1 міліграма/мл до 1 міліграма/мл на протеолітичну активність трипсину (рис. 3) показало, що лінійна залежність між кількістю внесеного до інкубаційної суміші ІТ і зниженням ферментативної активності зберігається практично до досягнення 90 % інгібування. Екстраполяція до нульової ферментативної активності дозволила зробити висновок, що при утворенні фермент-інгібіторного комплексу молекула ІТ з насіння амаранта зв'язує 2 молекули трипсину, тоді як контрикал зв'язує тільки 1 молекулу трипсину.



1 – інгібітор трипсину з амаранта; 2 – контрикал

Рис. 3 – Залежність активності трипсину від концентрації інгібітору

Відомо, що контрикал – інгібітор протеолітичних ферментів тваринного походження застосовується у вигляді ін'єкцій в кров для лікування ензимопатій, які супроводжуються підвищеною активацією протеолітичних ферментів, зокрема, панкреатиту і для зупинки кровотечі при операціях і травмах.

Подібно до інгібітору Кунітца (STI), білок з зерна амаранта є слабким нестехіометричним інгібітором хімотрипсину. Отже, за характером дії на трипсин і хімотрипсин інгібітор з зерна амаранту нагадує інгібітор Кунітца.

В цілому амінокислотний склад інгібітору зерна амаранту характеризується низкою рис, загальних для інгібіторів сімейства STI. Як вже було відмічено, молекула виділеного інгібітору містить значну кількість залишків кислих амінокислот, а також гліцину та амінокислот з неполярними боковими ланцюгами (Pro, Val, Leu, Ile). Доля неполярних бокових ланцюгів (NPS), розрахована за методом Бігелу [11], складає 0,39 для інгібітору трипсину зерна амаранту. Для STI ця величина – 0,29. Таким чином, виділений інгібітор відноситься до білків з високим ступенем гідрофобності. Склад амінокислот, бокові ланцюги яких можуть брати участь в утворенні водневих зв'язків, складає 25 % від загального числа амінокислотних залишків інгібітору трипсину зерна амаранту. Для STI ця величина складає 23%.

Література

1. Сыновец А.С. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине / А.С. Сыновец, А.П. Левицкий – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: Здоровья, 1985. – 72 с.
2. Кислухина О.В. Ферменты в производстве пищи и кормов. М.: ДеЛи принт. – 2002. – 335 с.
3. Марри Р., Греннер Д., Мейес П. Биохимия человека. – Т. 2. – М.: Мир, 1993. – 414 с.
4. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Растительные белки ингибиторы протеолитических ферментов. М.: ВИНИТИ. – 1993. – 207 с.
5. Johnny Brandt, Lars-Olov Andersson and Jerker Porath. Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone. – Biochimica et Biophysica Acta, 1975. – V. 386. – P. 196-202.
6. Агромонов А. Е., Шабаров Ю. С. Лабораторные работы в органическом практикуме. – М.: изд. МГУ. – 1971. – С. 275.
7. Perrin D. D., Armarego W. L. F., and Dawn R. Perrin. Purification of Laboratory chemicals. – Pergamon Press-Oxford. – 1966. – P. 181.
8. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – с.258.
9. Остерман Л. А. Методы исследования белка и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1981. – С. 288.
10. E. F. Hartree. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response//Analytical Biochemistry. – 1972. – V. 48. – P. 422 – 427.
11. В.В. Мосолов, Е.Л. Малова, А.Н. Чебан. Выделение из семян фасоли специфического ингибитора сериновых протеиназ микроорганизмов // Биохимия. – 1983. – Т. 48. – Вып. 10. – С. 1680 – 1686.