

УДК 633.31:66.097.8

О. Л. ГАРКОВИЧ, к. б. н, доц.,

Г. В. КРУСІР, д. т. н., проф.,

І. О. КУЗНЕЦОВА, к. т. н, доц.,

М. М. МАДАНИ, к. т. н., доц.,

М. М. ПАНЧЕНКО, к. б. н., доц.

Одеська нац. акад. харчових технологій, Одеса

e-mail: garkovith@outlook.com

e-mail: krussir.65@gmail.com

БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІНГІБІТОРУ ТРИПСИНУ З НАСІННЯ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ (*MEDICAGO SATIVA L.*)

Із водного екстракту насіння люцерни посівної за використання висолування, діалізу та афінної хроматографії був виділений інгібітор трипсину (20,24 кДа) з молекулярною масою 0,007 мг/см³ та інгібіторною активністю 0,19 ІО/см³. Досліджено його амінокислотний склад та дію на протеолітичну активність трипсину.

Ключові слова: люцерна (*Medicago sativa L.*), інгібітор трипсину, афінна хроматографія, очистка та властивості.

Вступ. Одним із актуальних та перспективних напрямів біотехнології є розробка харчових композицій, які спрямовано впливають на ферментативні процеси в організмі.

Білкові інгібітори протеолітичних ферментів відіграють важливу роль у підтримці гомеостазу. У наш час багаточисленними лабораторними та клінічними дослідженнями доведено, що інгібітори протеолітичних ферментів беруть участь у біохімічних каскадах організму і є ключовими регуляторами багатьох біологічних процесів, що ініціюють порушення згортання крові, ангіогенезу, апоптозу, в тому числі активізації системи комплементу [1–3].

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 критичне значення, підшлункова залоза починає виробляти більше ферментів. За умов зв'язування трипсину з інгібітором може відбуватися уповільнення травлення [4]. Отже, збільшення рівня інгібіторів трипсину в їжі викликає ланцюг реакцій, що відновлюють нормальний вміст трипсину в кишечнику та нормалізують травлення [5]. Підтримання інгібіторного потенціалу організму при таких патологічних станах є серйозною проблемою.

Останнім часом все більшу увагу дослідників привертає питання виділення та використання інгібіторів протеаз рослинного походження.

Потенційним джерелом рослинних інгібіторів є насіння рослин, наприклад, інгібіторів ліпаз — представники сімейств бобових, хрестоцвітних; амілаз — зернових; протеаз — бобових. Проведені дослідження [5] довели, що білки із насіння гречки, пшениці, люпину, жита, перцю, гірчиці, картоплі є ефективними інгібіторами трипсиноподібних протеаз. Однак незважаючи на це, пошук нових, альтернативних джерел є актуальним.

Бобові культури, зокрема люцерна посівна, містять значну кількість біологічно активних сполук, особливо низькомолекулярних білків, які є природними інгібіторами з широким спектром біологічної активності.

Метою роботи було виділення, очистка та характеристика властивостей інгібітору трипсину з насіння люцерни.

Матеріал та методи. Об'єкти досліджень: насіння люцерни сорту 'Єва' (СГІ–НЦНС) та трипсин підшлункової залози людини — T6424 Sigma (Sigma-Aldrich, USA).

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

Ковалентне зв'язування активованого носія з трипсином здійснювали наступним чином: до 3 мл гелю активованої сефарози 4В додавали 3 мл 0,1 М фосфатного буфера, 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 КСl в 0,1 М Na-ацетатному буфері, рН 4, протягом 24 год, 1 М КСl в 0,1 М фосфатному буфері, рН 8,0, протягом 24 год та дистильованою водою до відсутності поглинання за 280 нм.

У лабораторних дослідженнях використовували стандартні та адаптовані методи біохімічного аналізу: активність інгібітору трипсину визначали за зменшенням швидкості гідролізу казеїну ензимом у присутності інгібітору [7]; визначення молекулярної маси очищеного інгібітору трипсину здійснювали методом електрофорезу [8]; вміст білка визначали за методом Лоурі — Хартрі [9]; амінокислотний склад методом іонообмінної рідинної хроматографії [10]; частку неполярних бокових ланцюгів інгібітору — за методом Бігелу [11].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою програми BioStat 2008 5.8.4.3 для Windows.

Результати та їх обговорення. Знежирення гомогенізованого насіння люцерни масою 0,7 г здійснювали в апараті Сокслета з використанням петролейного ефіру. Екстракцію інгібітору трипсину з насіння люцерни проводили 0,05 М боратним буфером, рН 7,6, який містив 0,5 М NaCl (гідромодуль 100) за кімнатної температури.

Очищення інгібітору трипсину з насіння люцерни включало 2 стадії: прогрів екстракту за 70 °С та фракціонування білкової складової екстракту сульфатом амонію з подальшим діалізом фракції між 75 та 100 %-ним

ступенем насиченості $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ й афінну хроматографію на біоспецифічному сорбенті трипсин — сефароза 4В.

Стадія 1. Екстракт прогрівали за температури 70 °С впродовж 10 хв для інактивації протеаз, які могли бути екстраговані з насіння люцерни. Осад відокремлювали від супернатанту за допомогою центрифугування зі швидкістю 8000 г впродовж 20 хв. За характеристиками інгібітор трипсину є білком-альбуміном, який відносять до сімейства інгібіторів Кунітца. У зв'язку з цим його фракціонування проводили сульфатом амонію зі ступенем насичення солі між 75 і 100 % (F_{75-100}). Розчин білка після кожного введення солі перемішували і центрифугували зі швидкістю 8000 г впродовж 20 хв. Фракціонування сульфатом амонію проводили за температури 4 °С упродовж 40 хв. 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 г протягом 30 хв. Отриманий супернатант наносили на колонку з афінним сорбентом.

Стадія 2. Фракцію інгібітору трипсину наносили на колонку (1x15 см) з сорбентом трипсин-сефарозою 4В зі швидкістю 15 мл/хв. Елюцію білків проводили ступінчасто буферними розчинами: 0,05 М трис-НCl, рН 8,0; 1М NaCl, 0,05 М трис-НCl, рН 8,0, що містив 8М сечовину. Інгібітор елюювали з колонки 10^{-3} М розчином НCl (рис. 1). Активну фракцію нейтралізували до рН 8,0 1 М розчином NaOH та ліофільно висушували (табл. 1).

Таблиця 1

Стадії виділення та очищення інгібітору трипсину з насіння люцерни

Стадія	Екстракція	Фракціонування та діаліз	Афінна хроматографія
Об'єм, см ³	70	130	67
ІА, ІО/ см ³	0,27	0,14	0,19
Білок, мг/ см ³	0,940	0,020	0,007
Загальний білок, мг	65,80	2,60	0,47
Сумарна ІА, од.	18,90	18,14	13,00
Питома ІА, ІО/мг	0,29	7,00	27,60
Ступінь очищення	1,0	25,0	95,2
Вихід, %	100,0	96,0	68,7

Субстанція є гігроскопічним порошком білого кольору, добре розчинним у воді.

Наведені в таблиці 1 дані свідчать про те, що екстракт із вмістом білка 0,940 мг/см³ та інгібіторною активністю 0,27 ІО/см³ очищено до вмісту білка в активній фракції елюату після афінної хроматографії 0,007 мг/см³, що володіє інгібіторною активністю 0,19 ІО/см³. Ступінь очищення інгібітору становить 95,2 %. Отже, розрахунки свідчать, що із 100 г насіння люцерни сорту 'Ева' одержано 67,14 мг інгібітору трипсину, інгібіторна активність якого становить 27,6 ІО/мг білка.

Результати визначення ІА та концентрації білка у зібраних (Вел.) фракціях елюатів наведені на рисунку 1.

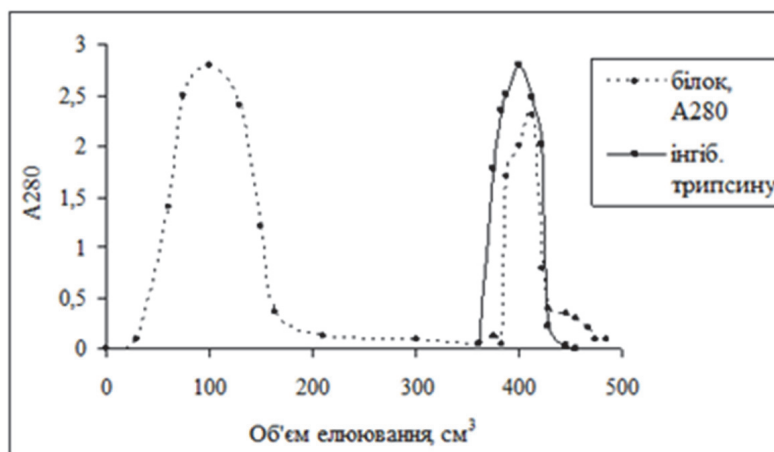


Рис. 1. Профіль елюції інгібітору трипсину із насіння люцерни на трипсин-сефарозі

Молекулярну масу (M_r) очищеного інгібітору визначали методом електрофорезу в 15 % ПААГ, що містив 0,1 % натрій додецилсульфат, при рН 8,3, на приладі для горизонтального електрофорезу фірми (Bio-Rad) за температури 4°C з використанням 2219 MultitempII Thermostatic Circulator. Як маркери використовували суміш білків: фосфорилазу В (92500 Да), бичачий сироватковий альбумін (67000 Да), лактатдегідрогеназу (35000 Да), карбогідразу (29000 Да), соєвий інгібітор трипсину (21000 Да), яєчний альбумін (15000 Да), цитохром С (12000 Да) фірми Bio-Rad. Зразки оброблені за температури у 4 °С впродовж 3 год струмом у 20 мА. Фіксацію білків проводили 60 %-ним водним розчином трихлороцтової кислоти протягом 3 год за кімнатної температури. Гель зафарбовували розчином Кумасі-250 у 12,5 %-ній трихлороцтовій кислоті, що містив 5 % етанолу протягом 4 год за кімнатної температури. Надлишок фарби видаляли розчином, що містив 10 % ізопропілового спирту та 7 % оцтової кислоти (рис. 2).

Отримано білок із молекулярною масою 20,24 кДа, яку було розраховано за допомогою калібрувальної кривої (рис. 3).

Амінокислотний склад виділеного інгібітору трипсину визначали за допомогою амінокислотного аналізатора фірми «Hitachi» (Японія) модель 835 на сталій колонці (0,4 x 15 см), заповненій катіонообмінною смолою марки 2619 (Hitachi custom Ion-Exchange Resin). Для аналізу використовували 50 мкл зразка інгібітору. Розділення амінокислот здійснювали у трибуферній системі натрій-цитратних буферних розчинів: 0,18Н рН 3,25; 0,3Н рН 3,9; 1,6Н рН 4,75. За одержаними даними порівняли амінокислотний склад одержаного інгібітору трипсину (IT-1) з інгібіторами Кунітца (STI) та Баумана — Бірк (BBI) (табл. 2).

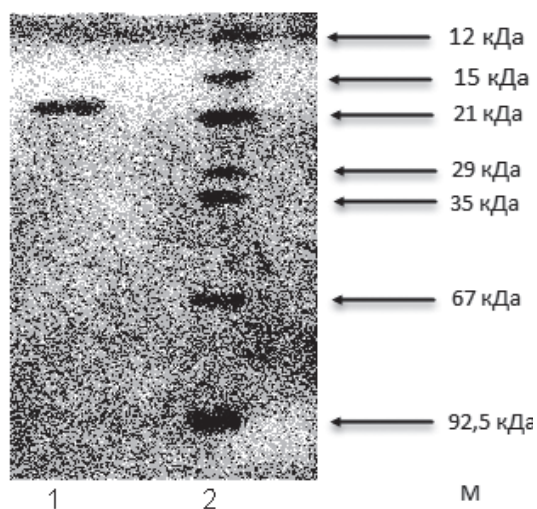


Рис. 2. Визначення молекулярної маси виділеного інгібітору трипсину з насіння люцерни методом електрофорезу, де 1 — зразок інгібітору трипсину; 2 — маркери; М — маркери молекулярної маси

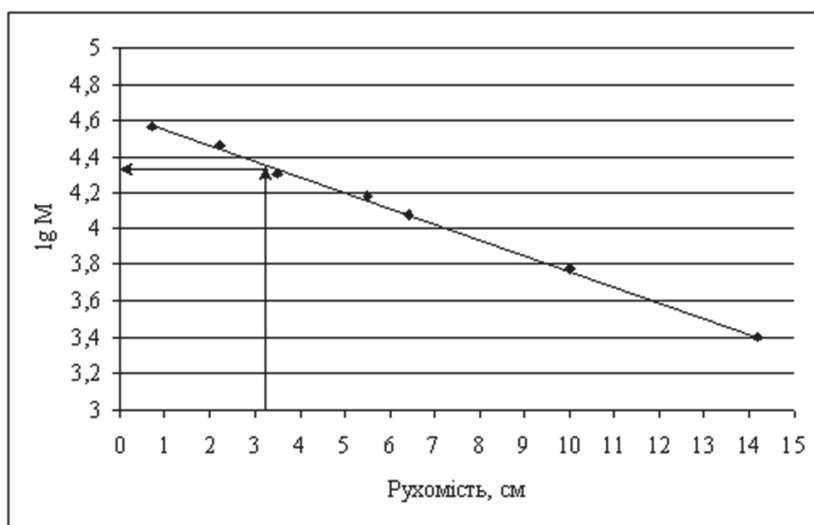


Рис. 3. Калібрувальна крива для розрахунку молекулярної маси інгібітору трипсину

Аналіз даних, наведених у таблиці 2, вказує на те, що інгібітор із насіння люцерни значно відрізняється за амінокислотним складом від інгібітору Баумана — Бірк.

Ці відмінності в першу чергу виявляються в низькому вмісті цистеїну та більш високому вмісті залишків із боковими ланцюгами гідрофобного характеру. Важливо, що через менше число дисульфідних зв'язків стабільність конформації інгібітору з насіння люцерни більшою мірою, ніж інгібітору Баумана — Бірк, залежить від гідрофобних взаємодій.

Таблиця 2

Порівняння амінокислотного складу інгібіторів трипсину з насіння люцерни (IT-1), Кунітца (STI) та Баумана — Бірк (BBI)

Амінокислота	Число залишків		
	IT-1	STI [12]	BBI [12]
Asp	16,4(16)	26	12
Tle	6,2(6)	7	2
Ser	14,8(15)	11	8
Glu	18,1(18)	18	7
Pro	15,2(15)	10	6
Gly	20,2(20)	16	0
Ala	8,0(8)	8	4
Val	1,4(14)	14	1
Cys	3,9(4)	4	14
Met	1,8(2)	2	1
Ile	13,3(13)	14	2
Leu	17,3(17)	15	2
Phe	4,8(5)	9	2
Tyr	7,3(7)	4	2
Lys	13,9(14)	10	5
His	3,1(3)	2	1
Arg	8,3(8)	9	2
Trp	0,8(1)	2	0
Загальне число залишків	186	181	71
M_r	20238	20100	8000

У цілому амінокислотний склад інгібітору з насіння люцерни характеризується низкою рис, загальних для інгібіторів сімейства STI. Як вже було відзначено, молекула виділеного інгібітору містить значну кількість залишків кислих амінокислот, а також гліцину та амінокислот із неполярними боковими ланцюгами (Pro, Val, Leu, Ile). Доля неполярних бокових ланцюгів (NPS), розрахована за методом Бігелоу, становить 0,39 для інгібітору трипсину насіння люцерни. Для STI ця величина — 0,29.

На рисунку 4 наведено результати досліджень з інгібування трипсину підшлункової залози людини виділеним інгібітором. Він ефективно пригнічує активність трипсину. Крива інгібування має лінійний характер до досягнення 90 %-го інгібування. Екстраполяція лінійної ділянки кривої до точки, яка відповідає нульовій ферментативній активності, свідчить про досягнення 100 %-го інгібування при молярному співвідношенні інгібітор : фермент — 1 : 1.

Дослідження дії інгібітору трипсину (IT) у концентраціях від 0,1 до 1 мг/см³ на протеолітичну активність трипсину довело лінійну залежність між кількістю внесеного в інкубаційну суміш IT та ферментативною активністю, яка зберігається практично до досягнення 90 % інгібування. Порівняння екстраполяції величин ферментативної активності дозволило зробити висновок, що за утворення фермент-інгібіторного комплексу

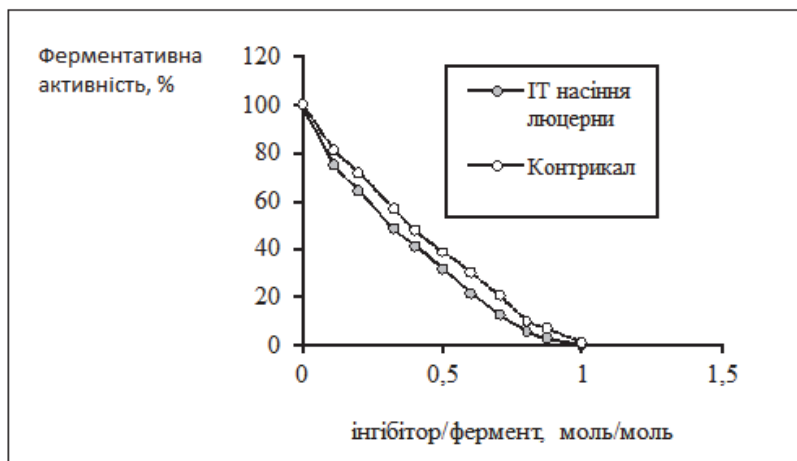


Рис. 4. Залежність активності трипсину від концентрації інгібітору

одна молекула ІТ з насіння люцерни так само, як і одна молекула «Контрикалу», зв'язують по одній молекулі трипсину. За характером дії на трипсин інгібітор із насіння люцерни аналогічний інгібітору Кунітца [12].

Однією з основних характеристик природних інгібіторів є специфічність їх дії на різні ферменти. У таблиці 3 наведені порівняльні дані дослідження специфічності інгібітору трипсину з насіння люцерни та препарату інгібітору протеаз із легенів великої рогатої худоби (препарат «Контрикал» фірми AWD pharma GmbH & Co. KG).

Таблиця 3

Порівняльна специфічність інгібітору трипсину з насіння люцерни сорту 'Єва' та препарату «Контрикал» (вагове співвідношення інгібітор : фермент — 1 : 1)

№ п/п	Фермент	Інгібіторна активність інгібітору трипсину насіння люцерни, %	Інгібіторна активність препарату «Контрикал», %
1	Проназа Е (із <i>Streptomyces griseus</i>)	не інактивує	не інактивує
2	Протеаза С	не інактивує	не інактивує
3	Пепсин	не інактивує	не інактивує
4	Панкреатин	не інактивує	не інактивує
5	Ораза	не інактивує	не інактивує
6	Хімотрипсин	23,5	37,3
7	Трипсин	92,6	97,0
8	α - Амілаза	не інактивує	не інактивує
9	β - Амілаза	не інактивує	не інактивує

Наведені експериментальні дані дослідження доводять, що одержаний інгібітор і інгібітор, що входить до складу комерційного препарату, ефективно знижують активність трипсину, практично не впливають на активність хімотрипсину та взагалі не дезактивують α -амілазу і протеази. Це свідчить про відсутність у одержаного препарату біфункціональ-

них характеристик, зокрема щодо дії на активність аміолітичних ферментів.

Висновки. 1. Із водного екстракту насіння люцерни посівної, за використання висолювання, діалізу та афінної хроматографії, був виділений інгібітор трипсину (20,24 кДа) з вмістом білка 0,007 мг/см³ та інгібіторною активністю 0,19 ІО/см³. Молекула виділеного інгібітору містить значну кількість залишків кислих амінокислот, а також гліцину та амінокислот із неполярними боковими ланцюгами (Pro, Val, Leu, Ile). Дослідження дії інгібітору трипсину (ІТ) на протеолітичну активність трипсину підтвердило лінійну залежність між кількістю внесеного в інкубаційну суміш ІТ та ферментативною активністю, яка зберігається практично до досягнення 90 % інгібування.

2. Досліджено і порівняно амінокислотний склад одержаного інгібітору трипсину (ІТ-1) з інгібіторами Кунітца (STI) та Баумана — Бірк (BBI). Аналіз даних вказує на те, що інгібітор із насіння люцерни значно відрізняється за амінокислотним складом від інгібітору Баумана — Бірк. Ці відмінності в першу чергу виявляються в низькому вмісті цистеїну та більш високому вмісті залишків із боковими ланцюгами гідрофобного характеру. Важливо, що через менше число дисульфідних зв'язків стабільність конформації інгібітору з насіння люцерни більшою мірою, ніж інгібітору Баумана — Бірк, залежить від гідрофобних взаємодій.

3. Інгібітор із насіння люцерни ефективно знижує активність трипсину, практично не впливає на активність хімотрипсину та взагалі не дезактивує α -амілазу і протеази. Це доводить відсутність у одержаного препарату біфункціональних характеристик, зокрема щодо дії на активність аміолітичних ферментів. Інгібітор може використовуватися як перспективний компонент харчових композицій, призначених для корекції харчування за різних станів, що супроводжуються підвищеною активацією протеолітичних ферментів.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Zavasnik-Bergant T. Cystatin protease inhibitors and immune functions. *Front. Biosci.* 2008. Vol. 1, № 13. P. 4625–4637.
2. Silverman G. A., Whisstock J. C., Askew D. J., Pak S. C., Luke C. J., Cataltepe S., Irving J. A., Bird P. I. Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cell Mol. Life Sci.* 2004. Vol. 61, № 3. P. 301–325.
3. Richardson J., Viswanathan K., Lucas A. Serpins, the vasculature, and viral therapeutics. *Front. Biosci.* 2006. Vol. 1, № 11. P. 1042–1056.
4. Кислухина О. В. Ферменты в производстве пищи и кормов. Москва: Дели принт, 2002. 335 с.
5. Дунаевский Я. Е., Цыбина Т. А., Белякова Г. А., Домаш В. И., Шарпио Т. П., Забрейко С. А., Белозерский М. А. Ингибиторы протеиназ как антистрессовые белки высших растений. *Прикл. биох. и микробиол.* 2005. Т 41, № 4. С. 392–396.

6. Perrin D. D. Armarego W. L. F., Perrin Dawn R. Purification of Laboratory chemicals. Pergamon Press-Oxford, 1966. P. 181.
7. Левицкий А. П. Методы определения ингибиторов трипсина. Биохимические методы исследования селекционного материала. Одесса: ВСГИ, 1979. Т. 15. С. 68–73.
8. Остерман Л. А. Методы исследования белка и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. Москва: Наука, 1981. С. 288.
9. Hartree E. F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry. 1972. Vol. 48. P. 422–427.
10. Методы биохимического исследования растений. А. И. Ермаков и др.; под ред. А. И. Ермакова. Ленинград: Агропромиздат, 1987. 430 с.
11. Bigelow C. C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure. J. Theoret Biol. 1967. 16(2). P. 187–211.
12. Мосолов В. В., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений. Прикл. биохим. и микробиол. 2005. Т. 41, № 3. С. 261–282.

Надійшла 13.12.2017

UDC 633.31: 66.097.8

Garkovich O. L., Krusir G. V., Kuznietsova I. O., Madani M. M., Panchenko M. M. Odesa National Academy of Food Technologies, Odesa
e-mail: garkovith@outlook.com
e-mail: krussir.65@gmail.com

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF TRYPSIN INHIBITOR OF ALFALFA SEEDS (*MEDICAGO SATIVA L.*)

A low-molecular-weight inhibitor of trypsin (20.24 kDa) with a protein content of 0.007 mg/cm³ and an inhibitory activity of 0.19 IA/cm³ was isolated from the aqueous extract of alfalfa seeds, using the methods of salting-out, dialysis and affinity chromatography. Its amino-acid composition and action on the proteolytic activity of trypsin have been studied.

УДК 633.31:66.097.8

Гаркович А. Л., Крусир Г. В., Кузнецова И. А., Мадани М. М., Панченко Н. Н. Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса

e-mail: garkovith@outlook.com

e-mail: krussir.65@gmail.com

БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИНГИБИТОРА ТРИПСИНА ИЗ СЕМЯН ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ (*MEDICAGO SATIVA L.*)

Из водного экстракта семян люцерны посевной при использовании высаливания, диализа и аффинной хроматографии был выделен ингибитор трипсина (20,24 кДа) с молекулярной массой 0,007 мг/см³ и ингибиторной активностью 0,19 ИА/см³. Исследованы его аминокислотный состав и действие на протеолитическую активность трипсина.