

УДК 577.156.07

АФФИННЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Л. А. Иголкина¹, Ю. А. Руденская², Г. Н. Руденская^{3*}

(¹Дальневосточный технологический университет рыболовства; ²кафедра химии природных соединений химического факультета; ³кафедра молекулярной биологии биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия; e-mail: gnruden@genebee.msu.su)

Исследована возможность применения хитозана в качестве гидрофильного носителя для выделения и очистки протеиназ. Пять полимерных образцов было получено из панцирей морских ракообразных. В качестве лигандов были использованы антибиотики-полипептиды грамицидин С и бацитрацин. В качестве конденсирующих агентов применяли глутаровый альдегид и *n*-бензохинон. Аффинная хроматография экстракта из ткани минтая на бацитрацин-хитозане показала, что при элюции 1 М NaCl – 25%-й изопропанол в концентрационном градиенте 1 М NaCl обнаруживаются две изоформы катепсина Д. Выход по активности этих ферментов 23 и 45,5%, а степень очистки 6 и 9 раз соответственно. С помощью грамицидин-хитозана удалось выделить трипсин из гепатопанкреаса камчатского краба с выходом 100% и степенью очистки в 8 раз по сравнению с исходным материалом.

Мировой прогресс индустрии хитозана стимулируется необходимостью утилизации отходов промысла крабов для предотвращения загрязнения окружающей среды. Одной из проблем, связанных с применением биоспецифической хроматографии для выделения протеиназ из отходов рыбопереработки является выбор недорогого и доступного для эксплуатации сорбента. Мы осуществили синтез новых аффинных сорбентов на основе хитозана. Потенциальные источники хитина и хитозана многообраз-

ны и широко распространены в природе. Наиболее доступны панцири ракообразных. Выбор нами хитозана для использования в качестве носителя в случае аффинных сорбентов обусловлен рядом причин. Во-первых, хитозан имеет региональное происхождение, что исключает расходы на его транспортировку. Во-вторых, он является продуктом переработки вторичных отходов рыбоперерабатывающих производств. Использование этих отходов ведет к улучшению экологической обстановки морских

*Адресат для переписки.

побережий в районах переработки панцирьсодержащих гидробионтов. Наконец, хитозан имеет на поверхности полисахаридной матрицы реакционноспособные аминогруппы и может быть использован в синтезе без предварительной активации.

В настоящей статье приведены результаты исследований возможностей применения хитозана в качестве нерастворимого носителя в синтезе аффинных сорбентов для выделения и очистки протеиназ.

Материалы и методы

Синтез сорбентов. Для синтеза использовали хитозан промышленных видов дальневосточных крабов, бацитрацин («*Serva*», США), грамицидин С («Красноярскмедпрепараты», Россия), 50%-й глутаровый альдегид («*Serva*», США).

Метод А. К одному грамму хитозана прибавляли 25 мл 25%-го глутарового альдегида ($10 \cdot 10^3$ мкМ) в 0,1 М фосфатном буфере (рН 6,9). После перемешивания в течение 4 ч при комнатной температуре помещали в термостат (37°). Готовый сорбент отфильтровывали, промывали буфером и водой. Содержание бацитрацина в образце составляло 8,5 мкМ/г, выход – 94%. Для определения включения антибиотика в сорбент навеску в 20 мг гидролизали 5,7 М HCl в течение 48 ч при 105° и измеряли количественное содержание аминокислот Asp, Glu, Val, Lys на аминокислотном анализаторе («*Hitachi*»). Выход реакции рассчитывали по отношению количества антибиотика (мкМ), вводимого в реакцию, принимая за 100% исходное содержание антибиотика в реакционной смеси на 1 г хитозана (хитина) [1].

Метод В. Навеску хитозана (1 г) помещали в круглодонную колбу с фосфатным буфером (рН 8,5) для набухания в течение 30 мин. Количество буфера было минимальным. Затем 0,15 г грамицидина С в спиртовом растворе помещали в стакан и добавляли к нему 0,383 г *n*-бензохинона при непрерывном перемешивании в течение 20 мин. Раствор приобрел темно-вишневую окраску. Этот раствор прилили к набухшему в колбе гелю. Колбу присоединили к роторному испарителю без вакуума для мягкого перемешивания в течение 20 мин. Полученный аффинный сорбент промывали фосфатным буфером и водой и использовали во влажном состоянии для набивки хроматографической колонки. Включение антибиотика в сорбент определяли по аналогии с методом А.

Протеолитическая активность. Активность аспаргатных протеиназ определяли по гемоглобину [2]. За единицу активности принимали количество фермента, при котором оптическая плотность (280 нм) фильтрата после осаждения гемоглобина трихлоруксусной кислотой увеличивалась на единицу за 1 мин. Протеолитическую активность по Vz-Arg-pNA определяли по методу [3]. За единицу активности принимали количество фермента, которое в условиях определения отщепляет от субстрата 1 мкМ *n*-нитроанилина.

Для аффинной хроматографии использовали свиной пепсин Московского мяскокомбината, препарат Морикраза из гепатопанкреаса камчатского краба фирмы «*Тринита*», Россия [4].

Выделение трипсина камчатского краба. На колонку (1×5 см) с грамицидин-хитозаном, предварительно промытую 0,1 М раствором ацетата аммония рН 6,4 с 5 мМ CaCl₂, наносили раствор 16 мг Морикраза в 8 мл того же буфера и промывали вышеуказанным буфером. Элюцию активного белка проводили 1 М NaCl с 20% изопропилового спирта на 0,05 М трисовом буфере (рН 8,0).

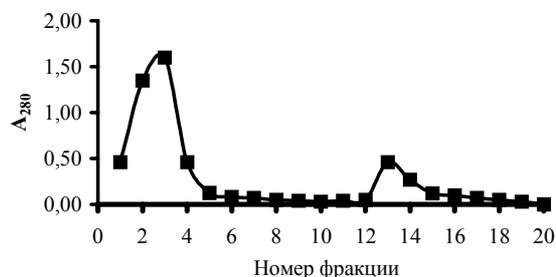
Приготовление промывных вод фарша минтая. Для этого использовали тушки минтая, хранившиеся при –25°. Рыбу размораживали на воздухе при температуре 18–20° до температуры 0–2°, промывали в пресной воде и белую мышечную ткань измельчали на мясорубке с $d_{\text{отв}} = 2,5$ мм (ОСТ 15-19-76). Полученный фарш промывали на двойном капроновом фильтре охлажденной питьевой водой с рН 6,8–7,0 при перемешивании в течение 10 мин. Промывку повторяли дважды. Все операции проводили при температуре 0–4°. Катепсины мышечной ткани экстрагировали 0,05%-м KCl [5].

Аффинную хроматографию катепсина D проводили на биоспецифическом сорбенте бацитрацин-хитозане. Неочищенный экстракт мышечной ткани минтая диализовали против 0,1 М ацетатного буфера с 0,2 М KCl, рН 6,5 и наносили на хроматографическую колонку (1×8 см), уравновешенную тем же буфером. Элюцию проводили 0,1 М ацетатным буфером с добавлением 25% изопропанола и 75% 1 М раствора KCl.

Обсуждение результатов

Известны способы получения аффинных сорбентов, содержащих в качестве лигандов антибиотика-полипептиды грамицидин и бацитрацин [6, 7].

Эти антибиотики-полипептиды содержат аминокислотные остатки, отвечающие специфичности многих протеиназ. Характерные изгибы циклопептидов облегчают комплексное взаимодействие с зоной связывания субстратов, а наличие D-аминокислот обеспечивает устойчивость циклопептидов к протеолизу и, значит, стабильность сорбентов [8]. Основным недостатком вышеуказанных методов является необходимость активировать инертную матрицу бромцианом в случае сефарозы или γ -аминопропилтриэтоксисиланом в случае силохромов. Хитозан представляет собой природный биополимер, содержащий реакционноспособные аминогруппы, не требующие активации. Исходное количество аминокислотных групп на хитине мож-



Выделение трипсина гепатопанкреаса камчатского краба на грамицидин-хитозане

Т а б л и ц а 1

Сравнение способов синтеза аффинных сорбентов для очистки протеиназ

Носитель	Количество аминогрупп на 1 г сорбента, мкМ	Аминопропил этоксисилан, мкМ	Лиганд	Количество лиганда, мкМ	Конденсирующий реагент, мкМ	Включение лиганда, мкМ на 1 г сорбента	Выход, %
Хитозан	30	0	Бацитрацин	9	глутаровый альдегид 10^3	8,5	94
Хитозан	30	0	Грамицидин С	120	10^3	26	21,6
Хитин	30	0	Бацитрацин	14	10^3	13	93
Силохром	0	50	Бацитрацин	50	<i>n</i> -бензохион 50	2	4
Силохром	0	340	Бацитрацин	340	340	46	15
Силохром	0	120	Грамицидин С	120	120	6	5

Т а б л и ц а 2

Результаты аффинной хроматографии катепсина Д мышечной ткани минтая на бацитрацин-хитозане

Стадии хроматографии	Белок общий, о.е.	Активность общая, ед. акт.	Активность удельная, ед./ед. A_{280}	Степень очистки	Выход, %
Экстракт	35,9	1900	50	–	100
Фракция 1	12,3	430	30	–	22,5
Промывка					
Фракция 2	8,95	875	430	8,6	45,5
Элюат					
Фракция 3	1,1	440	310	6,2	23

но заранее определить и подобрать соответствующее количество антибиотика. Использование предлагаемого способа позволяет сократить расход антибиотика в 4–23 раза (табл. 1).

Для определения сорбционных свойств полученных аффинных сорбентов проводили хроматографию коммерческого препарата пепсина в режиме полного насыщения.

Сорбент (1 г)	Включение лиганда, мкМ/г	Пепсин, мг/г
Бацитрацин-хитозан	8,5	2,6
Грамицидин С-хитозан	5,0	6,2
Бацитрацин-силохром	6,0	3,8

Приведенные результаты показывают, что сорбенты на основе хитозана обладают сорбционными свойствами, сравнимыми с таковыми для сорбентов на основе силохрома. Это означает возможность их применения для очистки аспаргатных протеиназ. В табл. 2 приведен пример выделения катепсина Д из экстракта мышечной ткани минтая. Применение синтезированных сорбентов для получения мышечных катепсинов является практически важным. В настоящее время на Дальнем Востоке ведется лов и переработка минтая для изготовления фарша по

японской технологии Суrimi непосредственно на плавбазах. Промывные воды, содержащие значительное количество белка, и в частности протеолитических ферментов, загрязняют океан. В модельном эксперименте мы продемонстрировали возможность выделения катепсинов Д минтая из промывных вод.

Анализ результатов аффинной хроматографии на бацитрацин-хитозане (табл. 2) показывает, что 35% общего белка, нанесенного на колонку, не связалось с сорбентом (фракция 1), 30,6% белка вышло в результате промывки сорбента 0,1 М ацетатным буфером (фракция 2), 23% вещества элюировалось 1 М NaCl с добавлением 25% изопропанола (фракция 3). Активный белок присутствовал во всех фракциях. При этом наблюдалось повышение общей активности фермента во второй фракции по сравнению с исходной в 8,6 раза. Этот эффект можно объяснить присутствием в исходном препарате ингибирующей примеси, отделяющейся в процессе промывки. Степень очистки фермента фракции 3 составила 6,2%. Полученные результаты подтверждают возможность применения грамицидин-хитозана для получения катепсина Д мышечной ткани минтая, который в дальнейшем можно использовать при посоле морских рыб. Другим примером использования сорбентов на основе хитозана является выделение трипсина гепатопанкреаса камчатского краба. На рисунке приведена аффинная хроматография коммерческого препарата

протеиназ Морикраза на колонке с грамицидин-хитозаном. В приведенных условиях удельная активность трипсина камчатского краба повышается в 8 раз.

Таким образом, новые аффинные сорбенты на основе хитозана могут быть использованы в безотходных технологиях переработки морепродуктов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Иголкина Л.А., Руденская Г.Н.* Патент РФ № 2065877. 20.07.1996.
2. *Anson M.L.* // *J. Gen. Physiol.* 1938. **22**. P. 79
3. *Erlanger V.F., Kokovsky N., Cohen W.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1961. **95**. P. 271.
4. *Исаев В.А., Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Степанов В.М., Попова И.М., Диденко Ю.Г.* Патент РФ. № 2008353. 27.08.1994.
5. *Иголкина Л.А.* Патент РФ № 2065876. 20.07.1996.
6. *Степанов В.М., Руденская Г.Н.* Авт. св. № 644796. 30.01.1979.
7. *Степанов В.М., Руденская Г.Н., Акпаров В.Х., Гайда А.В.* Авт. св. № 942427. 09.03.1982.
8. *Руденская Г.Н.* // *Биоорганическая химия.* 1994. **20**. С. 213.

Поступила в редакцию 20.06.00