

ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 664.95:577.151

Н.Н. Ковалев, Е.В. Михеев, Ю.М. Позднякова*Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4**БИОТЕХНОЛОГИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ ИЗ ГАНГЛИЕВ КАЛЬМАРОВ**

Приведены результаты исследования влияния на экстрактивность холинэстеразы из ганглиев кальмаров ферментных препаратов различного типа действия. Показано, что целлолюкс повышает экстрактивность холинэстеразы из мороженных и сублимированных ганглиев кальмаров. Установлено влияние различных концентраций комплексов протеолитических ферментов на экстрактивность холинэстеразы из мороженных и сублимированных ганглиев кальмаров. В ходе работы были получены препараты холинэстеразы из ганглиев кальмаров с использованием протеолитических ферментов и последующей очисткой ультрафильтрацией. Препараты были охарактеризованы по субстратной специфичности, активности, термостабильности и чувствительности к фосфорорганическим соединениям. Показано, что использование метода ограниченного протеолиза позволяет получить из ганглиев кальмаров термостабильный, высокочувствительный к фосфорорганическим соединениям препарат холинэстеразы с высокой удельной активностью.

Ключевые слова: холинэстераза, экстракция, протеолитические ферменты, кальмары.

Kovalev N.N., Mikheev E.V., Pozdnyakova Yu.M. Biotechnology of cholinesterase from squid ganglia // *Izv. TINRO*. — 2012. — Vol. 172. — P. 253–264.

Enzymes of different types influence on cholinesterase extraction from squid optical ganglia is considered. The CelloLux raises the cholinesterase extraction from frozen and dry ganglia. Influence of the Protamex and Pilorin enzyme complexes in various concentration on the cholinesterase extraction from frozen and dry ganglia is defined. Substrate specificity, activity, thermal stability, and sensitivity to organophosphorus compounds are determined for preparations of cholinesterase produced from squid ganglia with using proteolytic enzymes and ultrafiltration. Technology of partial proteolysis allows to extract from ganglia a thermostable preparation of cholinesterase with high specific activity.

Key words: cholinesterase, extraction, protease, squid.

Введение

Исследование ферментов как биологических катализаторов представляет собой одно из наиболее перспективных направлений современной биотехнологии и биохимии. Однако проблема выделения и очистки ферментов не теряет актуальности, так как развитие современных биотехнологических приемов позволяет упростить и удешевить

* Ковалев Николай Николаевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией, e-mail: kovalevnn@tinro.ru; Михеев Евгений Валерьевич, кандидат технических наук, младший научный сотрудник, e-mail: mikheev@tinro.ru; Позднякова Юлия Михайловна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: pozdnyakovajm@tinro.ru.

Kovalev Nikolay N., D.Sc., head of laboratory, e-mail: kovalevnn@tinro.ru; Mikheev Eugene V., Ph.D., junior researcher, e-mail: mikheev@tinro.ru; Pozdnyakova Yulia M., Ph.D., researcher, e-mail: pozdnyakovajm@tinro.ru.

многоступенчатую и высокзатратную процедуру их выделения. Все это предъявляет определенные требования к разработке технологических приемов выделения ферментов, масштабированию процессов, изучению специфических свойств ферментов.

В сыворотке крови позвоночных животных холинэстеразы (ХЭ) находятся в растворенном состоянии, и получение водорастворимого очищенного препарата фермента в этом случае не представляет значительных трудностей. В нервной ткани, эритроцитах крови и в электрическом органе рыб ХЭ находятся, как правило, в виде комплексов с липидами, полисахаридами, белками и встроены в мембрану с помощью «якоря», который представляет собой углеводный компонент (гликозидные остатки: D-манноза, D-галактоза, N-ацетилглюкозамин, сиаловая кислота) (Haas et al., 1986). В этом случае выделение фермента является сложной задачей: для перевода его в водорастворимую форму требуется предварительное разрушение как мембран, так и самих комплексов.

Протеолитические ферменты как животного, так и микробного происхождения широко используются для получения белковых гидролизатов с низкой и средней степенью конверсии белка. Из ферментов животного происхождения чаще всего используются пепсин, трипсин, α -химотрипсин, карбокси- или аминопептидазы в индивидуальном виде или в виде смесей ферментов (Неклюдов и др., 2000). Также была показана возможность использования ферментов целлюлолитического типа действия для выделения мембраносвязанных ферментов в биотехнологии кормовых и пищевых продуктов (Каравай, Левочкина, 2008).

Холинэстеразу широко применяют для определения остаточного количества фосфорорганических и карбаминантных пестицидов в воде, в водных и водно-органических экстрактах из растительного материала, почв, продуктов питания (Pretti, Cognetti-Varriale, 2001; Hayes et al., 2011; Rodrigues et al., 2011). В связи с повышенными требованиями к контролю безопасности производств и охране окружающей среды потребность в стабильных, высокоактивных, чувствительных к загрязнителям препаратах фермента высока.

Целью исследования являлось обоснование использования ферментов различного типа действия в биотехнологии холинэстераз.

Материалы и методы

В качестве источников фермента использовали сублимированные и мороженые ганглии тихоокеанского кальмара *Todarodes pacificus* и кальмара Бартрама *Ommastrephes bartramii*.

Источником фермента служили центрифугаты (1000 g) водных гомогенатов тканей (гидромодуль для сырых и сублимированных ганглиев составлял 3 : 1). Скорость холинэстеразного гидролиза определяли калориметрическим методом Элмана (Ellman et al., 1961). В качестве субстратов холинэстераз использовали тиохолиновые эфиры карбоновых кислот — ацетил (АТХ), пропионил (ПТХ) и бутирилтиохолин (БТХ) иодиды (ICN, США).

Обработку сырья проводили ферментными препаратами — пилорином из пилорических придатков лососевых рыб*, протамексом из *Bacillus protease* (Denmark)**, ЦеллоЛюксом-А*** (ООО ПО «Сиббиофарм»). В качестве ингибитора протеаз использовали ингибитор трипсина из яичного белка фирмы Sigma (США).

В качестве ингибиторов ХЭ использовали диизопропилфторфосфат (ДФФ) — $[(\text{CH}_3)_2\text{CHO}]_2\text{P}(\text{O})\text{F}$ и О-этил-S-(β -этилмеркаптоэтил) метилтиофосфанат (ГД-42) — $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_2)\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$. Фосфорорганические соединения (ФОС) синтезированы в Институте элементарной органической химии им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва (Кабачник, 1964). Чувствительность ХЭ к ингибиторам оценивали по

* ТУ 9280-1203-00472012-96. Пилорин марки А.

** Гигиеническое заключение № 77.99.9.916.П.15411.10.00.

*** ТУ 9291-008-13684916-05. Препарат ферментный ЦеллоЛюкс-А для спиртовой и пивоваренной промышленности.

величине бимолекулярной константы (k_{II}) скорости взаимодействия фермента с ФОС (Яковлев, 1965).

Очистку ХЭ проводили ультрафильтрацией на колонках с мембранами волоконного типа с пределом пропускания пор 100 кДа (GE Healthcare, США). Параметры процесса: скорость — 500 мл/ч; давление — 0,1 кПа.

Электрофорез ферментных препаратов проводили в 10 %-ном ($C = 3,2$) полиакриламидном геле (Остерман, 1981). Для выявления ХЭ-активности в гелях использовали тиохолиновый метод (Karnovsky, Roots, 1964).

Термостабильность препарата определяли по степени инаktivации водного раствора препарата фермента при термостатировании в течение 1 ч при 50 °С.

Результаты и их обсуждение

В ходе работы впервые проведено исследование влияния коммерческого препарата «ЦеллоЛюкс-А» на выход ХЭ из ганглиев кальмара в раствор. Целлолюкс — комплексный ферментный препарат микробиального происхождения, содержащий в своем составе набор ферментов целлюлазно-глюканазно-ксилапазного действия. В результате действия этих ферментов происходит гидролиз некрахмалистых полисахаридов.

Ранее (Михеев, Ковалев, 2012) было установлено, что рациональными параметрами водной экстракции ХЭ из мороженных ганглиев кальмаров являются температура 18–25 °С и гидромодуль 3 : 1.

Влияние различных концентраций целлолюкса на выход ХЭ в раствор в зависимости от времени оценивали по величине активности фермента в центрифугате ферментолизата ганглиев кальмаров (рис. 1). Количество вносимого фермента выражали в процентах к массе сырья.

Установлено, что целлолюкс только в концентрации 0,5 % массы от сырья повышает экстрактивность ХЭ из мороженных ганглиев тихоокеанского кальмара в течение всего времени экстрагирования. Прирост выхода наблюдался после 2–8 ч экстракции и не превышал 10 % по сравнению с экстракцией водой. Увеличение концентрации целлолюкса не оказывало влияния на экстрактивность ХЭ из ганглиев. Отсутствие эффекта повышения экстрактивности, по-видимому, можно объяснить недоступностью к действию ферментов препарата углеводного компонента «якоря» ХЭ.

Ранее (Михеев, Ковалев, 2012) было показано влияние сублимации на экстрактивность ХЭ из ганглиев кальмаров. Отмечалось, что сублимация сырья способствовала

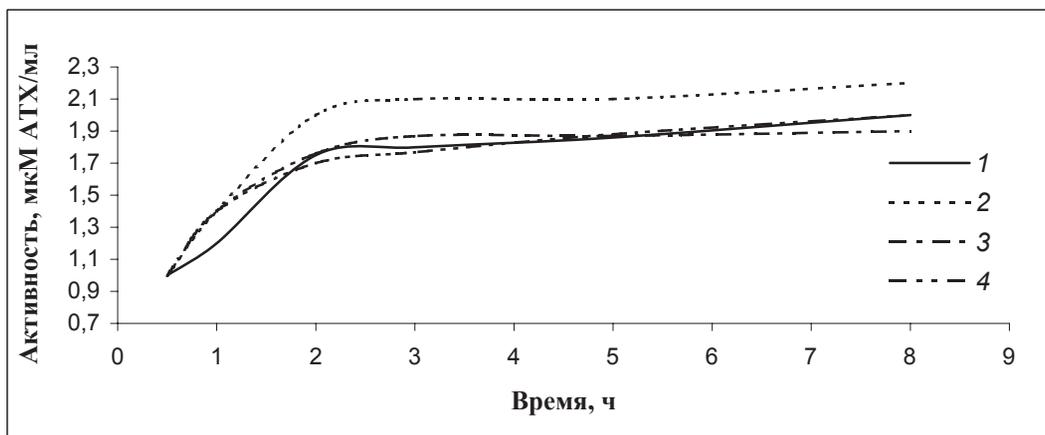


Рис. 1. Влияние различных концентраций препарата «ЦеллоЛюкс-А» на экстрактивность ХЭ мороженных ганглиев тихоокеанского кальмара в раствор: 1 — водная экстракция; 2 — целлолюкс-А 0,5 %-ный; 3 — целлолюкс-А 1,0 %-ный; 4 — целлолюкс-А 1,5 %-ный; гидромодуль — 3 : 1; t — 20 °С; pH — 6,8; активность — $p \leq 0,05$

Fig. 1. CelloLux in various concentration influence on cholinesterase extraction from frozen squid ganglia under temperature 20 °С, pH 6.8: 1 — water extraction; 2 — CelloLux-A 0.5 %; 3 — CelloLux-A 1.0 %; 4 — CelloLux-A 1.5 %; hydromodule — 3 : 1; activity — Mm ATCh/ml ($p \leq 0.05$)

большему переходу фермента в водный раствор по сравнению с морожеными ганглиями. Высказывалось предположение, что это связано с частичной деструкцией клеточной мембраны, способствующей сольватации фермента (Михеев, Ковалев, 2012). Оценка экстрактивности ХЭ из сублимированных ганглиев не проводилась.

Для проверки данного предположения проведена серия опытов по оценке влияния различных концентраций целлолюкса на экстрактивность ХЭ из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара (рис. 2).

Показано, что процесс сублимации и, как следствие, деструкция клеточных мембран не оказывали влияния на экстрактивность ХЭ под действием целлолюкса. Прирост активности наблюдался в течение всего времени экстракции при различных концентрациях целлолюкса и составлял 9 % по сравнению с водной экстракцией.

Таким образом, проведенная серия опытов показала невысокую эффективность применения препарата «ЦеллоЛюкс-А» в биотехнологии получения ХЭ: его применение позволяет перевести в раствор не более 59 % суммарной активности ХЭ в сырье. В то же время применение смеси органических растворителей бутанол : гексан в соотношении 1,5 : 1,0 позволяло перевести в раствор 67 % ферментативной активности (Михеев, Ковалев, 2012).

Широко применяемым биотехнологическим методом деструкции биологических тканей считается обработка протеолитическими ферментами или их комплексами (Пивненко и др., 1997; Позднякова, Давидович, 1997, 1999; Давидович, 2004; Суховерхова, Пивненко, 2006). В зависимости от задач исследования используют различные по субстратной специфичности и активности ферментные препараты. Ранее была показана возможность получения ХЭ из разных тканей (нервной, хвостатого ядра, стромы эритроцитов быка, эритроцитов крови человека) с помощью протеолитических ферментов, в частности трипсина (Ord, Thompson, 1950; Toschi, 1959; Михеев, Ковалев, 2008). Однако использование трипсина оказалось эффективным не для всех видов ткани (Toschi, 1959).

Исследования по влиянию протеолитических ферментов на экстрактивность ХЭ гидробионтов ранее не проводились. В ходе работы нами были использованы ферментные препараты протеолитического действия «Протамекс» — протеазный комплекс из *Bacillus protease* — и «Пилорин» — комплекс протеолитических ферментов из пилорических придатков лососевых рыб. В серии модельных экспериментов показано

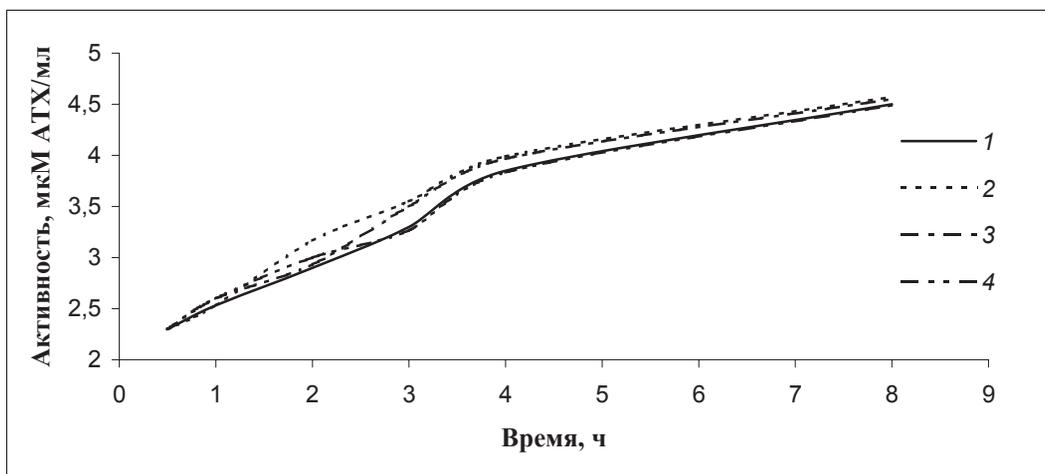


Рис. 2. Влияние различных концентраций препарата «ЦеллоЛюкс-А» на экстрактивность ХЭ сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара в раствор: 1 — водная экстракция; 2 — целлолюкс-А 0,5 %-ный; 3 — целлолюкс-А 1,0 %-ный; 4 — целлолюкс-А 1,5 %-ный; гидромодуль — 3 : 1; t — 20 °С; pH — 6,8; активность — p ≤ 0,05

Fig. 2. CelloLux in various concentration influence on cholinesterase extraction from dry squid ganglia under temperature 20 °C, pH 6.8: 1 — water extraction; 2 — CelloLux-A 0.5 %; 3 — CelloLux-A 1.0 %; 4 — CelloLux-A 1.5 %; hydromodule — 3 : 1; activity — Mm ATCh/ml (p ≤ 0.05)

влияние различных протеолитических ферментов на экстрактивность ХЭ из зрительных ганглиев тихоокеанского кальмара разных способов заготовки.

На рис. 3 представлена зависимость экстрактивности ХЭ из мороженных ганглиев тихоокеанского кальмара от времени обработки различными концентрациями протамекса с активностью 240 Пе/г. Установлено, что низкие концентрации фермента (0,1 %) не приводят к повышению выхода ХЭ в раствор по сравнению с водной экстракцией. Обработка мороженных ганглиев более высокими концентрациями протамекса (1,0 %) приводила к повышению на 18 % выхода ХЭ в раствор в течение 2 ч обработки. Следует отметить, что более длительная обработка протамексом приводит к уменьшению концентрации ХЭ в экстракте. Этот факт, по-видимому, можно объяснить деструкцией ХЭ в экстракте под действием протеолитического фермента.

Действие протамекса на экстрактивность ХЭ из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара отличалось от экстрактивности из мороженных ганглиев (рис. 4).

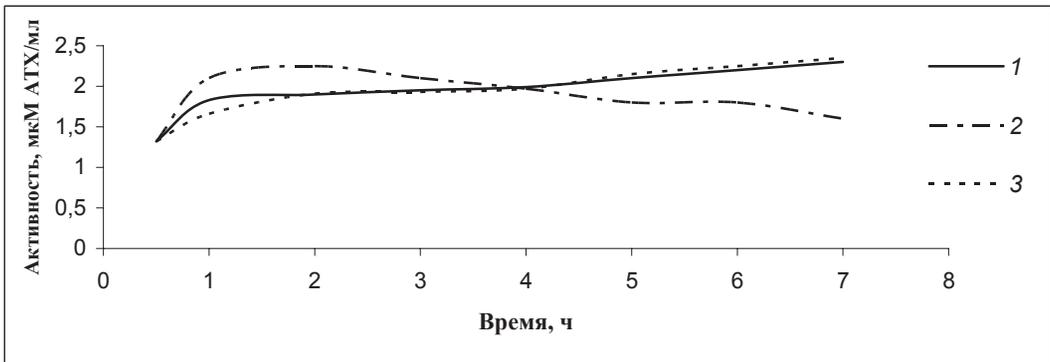


Рис. 3. Влияние различных концентраций препарата «Протамекс» на экстрактивность ХЭ из мороженных ганглиев тихоокеанского кальмара: 1 — водная экстракция; 2 — протамекс 1,0 %-ный; 3 — протамекс 0,1 %-ный; гидромодуль — 3 : 1; t — 20 °С; pH — 6,8; активность — $p \leq 0,05$

Fig. 3. Protamex in various concentration influence on cholinesterase extraction from frozen squid ganglia under temperature 20 °С, pH 6.8: 1 — water extraction; 2 — Protamex 1.0 %; 3 — Protamex 0.1 %; hydromodule — 3 : 1; activity — Mm ATCh/ml ($p \leq 0.05$)

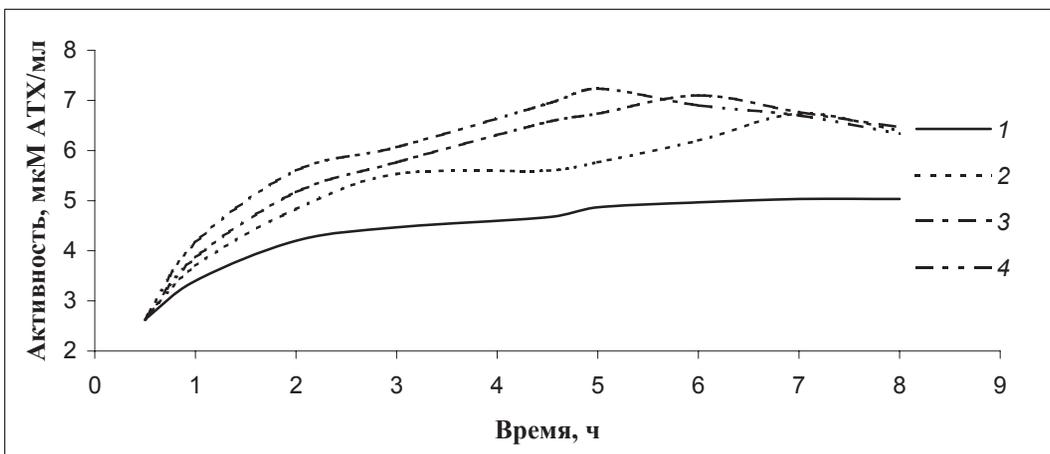


Рис. 4. Влияние различных концентраций препарата «Протамекс» на экстрактивность ХЭ сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара в раствор: 1 — водная экстракция; 2 — протамекс 0,1 %-ный; 3 — протамекс 0,2 %-ный; 4 — протамекс 0,5 %-ный; гидромодуль — 3 : 1; t — 20 °С; pH — 6,8; активность — $p \leq 0,05$

Fig. 4. Protamex in various concentration influence on cholinesterase extraction from dry squid ganglia under temperature 20 °С, pH 6.8: 1 — water extraction; 2 — Protamex 0.5 %; 3 — Protamex 1.0 %; 4 — Protamex 1.5 %; hydromodule — 3 : 1; activity — Mm ATCh/ml ($p \leq 0.05$)

Во-первых, все исследованные концентрации фермента (от 0,1 до 0,5 %) повышали выход ХЭ в раствор. Во-вторых, эффективное время выхода ХЭ по величине удельной активности зависело от концентрации протеолитического фермента. Как и следовало ожидать, максимальное влияние на увеличение активности ХЭ в экстракте оказывал протамекс в концентрации 0,5 % к массе сырья: прирост выхода ХЭ в раствор по сравнению с водной экстракцией составлял 48,5 % в течение первых 5 ч. Для 0,2 %-ного протамекса максимальный прирост составлял 42,9 % в течение 6 ч, а для 0,1 %-ного — 33,8 % в течение 7 ч. Следует отметить, что более длительная экстракция во всех случаях приводит к понижению активности ХЭ в растворе. По-видимому, как и в случае с морожеными ганглиями, в данном случае происходит ферментативная деструкция ХЭ под действием протамекса.

Ранее при разработке технологий БАД к пище было показано (Позднякова, Давидович, 1999), что в ряде случаев протеолитические ферменты морского происхождения проявляют большую специфичность действия по отношению к морскому сырью. В ходе работы в качестве протеолитического фермента был использован пилорин марки А из пилорических придатков лососевых с удельной активностью 204 Пе/г.

Проведенное исследование показало, что все исследованные концентрации пилорина повышали выход ХЭ из сублимированных ганглиев в раствор (рис. 5). Степень повышения выхода ХЭ в раствор по сравнению с водной экстракцией составляла от 7,5 % для 0,1 %-ного пилорина до 20,0 % для 0,5 %-ного пилорина.

Во всех случаях, независимо от концентрации протеолитического фермента, максимальная активность ХЭ в экстракте наблюдалась через 8 ч.

Таким образом, сравнение эффективности использования двух протеолитических ферментов в биотехнологии ХЭ показывает, что микробиальный фермент оказывает более выраженный эффект на солюбилизацию ХЭ тихоокеанского кальмара за меньший промежуток времени.

Параметры ферментативной обработки сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара были приняты для оценки их выхода ХЭ из сублимированных ганглиев кальмара Бартрама.

Использование пилорина и протамекса в концентрации 0,5 % по отношению к сырью показало равноэффективность их влияния на переход в раствор ХЭ из сублимированных ганглиев кальмара Бартрама (рис. 6).

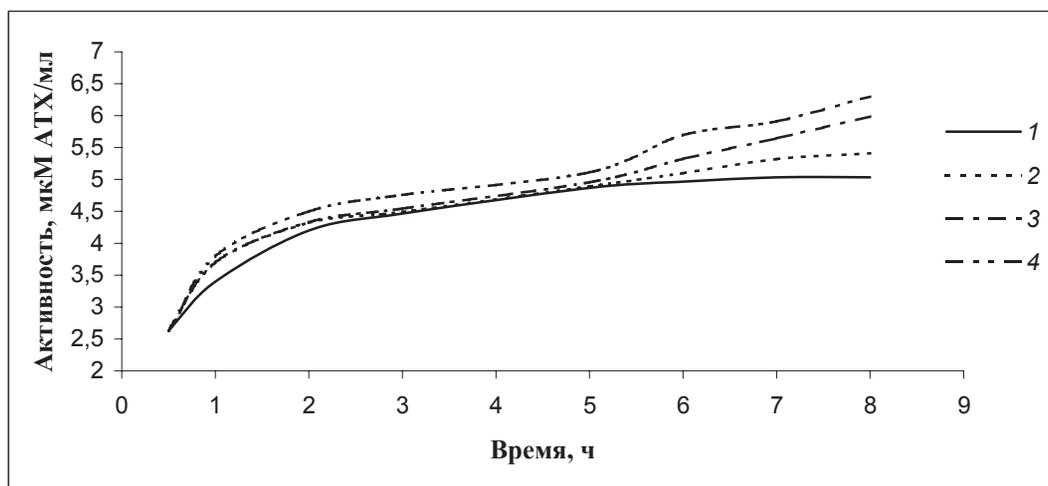


Рис. 5. Влияние различных концентраций препарата «Пилорин» на выход ХЭ сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара в раствор: 1 — водная экстракция; 2 — пилорин 0,1 %-ный; 3 — пилорин 0,2 %-ный; 4 — пилорин 0,5 %-ный; гидромодуль — 3 : 1; t — 18–22 °С; pH — 6,8; активность — μM АТХ/мл ($p \leq 0,05$)

Fig. 5. Pylorin in various concentration influence on cholinesterase extraction from dry squid ganglia under temperature 18–22 °C, pH 6.8: 1 — water extraction; 2 — Pylorin 0.5 %; 3 — Pylorin 1.0 %; 4 — Pylorin 1.5 %; hydromodule — 3 : 1; activity — μM ATCh/ml ($p \leq 0.05$)

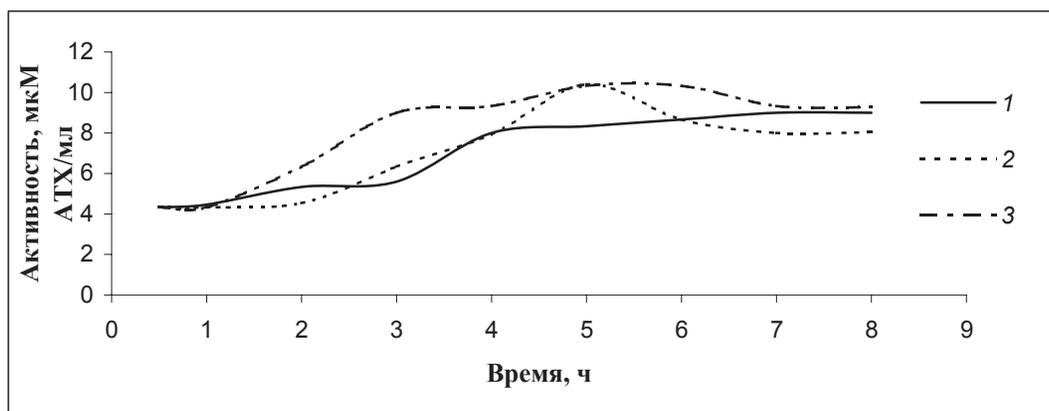


Рис. 6. Влияние различных препаратов на выход ХЭ из сублимированных ганглиев кальмара Бартрама в раствор: 1 — водная экстракция; 2 — протамекс 0,5 %-ный; 3 — пилорин 0,5 %-ный; t — 20 °С; pH — 6,8; активность — $p \leq 0,05$

Fig. 6. Influence of various enzyme preparations on the cholinesterase extraction from dried ganglia of neon flying squid (*Ommastrephes bartramii*) under temperature 20 °С, pH 6.8: 1 — water extraction; 2 — Protamex 0.5 %; 3 — Pilonin 0.5 %; activity — Mm ATCh/ml ($p \leq 0.05$)

Обработка ганглиев кальмара Бартрама 0,5 %-ным протамексом в течение 5 ч приводила к повышению выхода ХЭ в раствор на 24,5 % по сравнению с экстракцией водой. Следует отметить, что 2–4-часовая обработка ганглиев кальмара Бартрама пилорином давала больший прирост выхода ХЭ в раствор. В обоих случаях обработка ферментом более 5 ч приводила к снижению активности ХЭ в экстракте.

Таким образом, в ходе проведенных исследований впервые показано влияние протеолитических ферментных препаратов «Пилорин» и «Протамекс» на увеличение экстрактивности ХЭ из сублимированных ганглиев двух видов кальмаров. В случае тихоокеанского кальмара при использовании протамекса в концентрации 0,5 % от массы сырья наблюдалась наибольшая активность ХЭ в экстракте (время экстракции при этом составляло 5 ч). При использовании пилорина наиболее высокая активность ХЭ в экстракте наблюдалась также при концентрации препарата 0,5 % от массы сублимированных ганглиев, однако время экстракции в данном случае составляло 8 ч. Время экстракции, после которого наблюдалась максимальная активность ХЭ в растворе, в случае кальмара Бартрама составляло 5 ч как для пилорина, так и для протамекса.

Установленные выше параметры экстракции ХЭ (с использованием пилорина и протамекса) из сублимированных ганглиев кальмаров двух видов были использованы при наработке опытных образцов препарата.

При разработке технологии выделения ХЭ учитывали разность молекулярной массы ферментов. Известно, что молекулярная масса ХЭ составляет 260 кДа (Leuzinger, 1971). Позднее (Chan et al., 1972) было показано, что высокоочищенная ацетилхолинэстераза мозга существует в виде трех форм с молекулярной массой 130, 270 и 390 кДа. Молекулярная масса протеаз, входящих в состав пилорина, составляет 20–25 кДа (Пивненко, 1986). Различия в величине молекулярной массы ферментов позволяют применять метод ультрафильтрации при разработке технологии получения ХЭ с использованием протеолитических ферментов для отделения последних от раствора ХЭ.

Для очистки ХЭ был последовательно применен ряд технологических стадий. По окончании экстракции для прекращения протеолиза в раствор добавляли ингибитор протеаз в количестве 0,25 % массы сублимированных ганглиев. Дальнейшую очистку фермента от протеолитических ферментов и низкомолекулярных белков проводили методом ультрафильтрации. В процессе ультрафильтрации использовали колонку с мембранами волоконного типа с пределом пропускания молекул 100 кДа.

После концентрирования раствора в 10 раз производили 5-кратную отмывку низкомолекулярных компонентов, затем раствор концентрировали до минимально

возможного объема. Концентрат центрифугировали при 9000 об/мин и температуре 4 °С, определяли холинэстеразную активность и направляли на сублимацию.

Полученные с использованием протеолитических ферментов препараты ХЭ из ганглиев тихоокеанского кальмара и кальмара Бартрама были охарактеризованы по параметрам субстратной специфичности, термостабильности, удельной активности и чувствительности к ФОС (рис. 7, табл. 1, 2).

Исследования субстратной специфичности показали, что препараты ХЭ, полученные методом ограниченного протеолиза с последующей ультрафильтрацией, катализировали гидролиз всех трех тиохолиновых субстратов (рис. 7). Кривые зависимости скорости гидролиза от концентрации субстрата имели колоколообразную форму, что указывает на ингибирование реакции гидролиза высокими концентрациями субстратов.

В ходе работы отмечено, что ХЭ тихоокеанского кальмара, полученная с использованием пилорина, характеризуется равной скоростью гидролиза ПТХ и БТХ ($V_{\text{АТХ}} > V_{\text{ПТХ}} = V_{\text{БТХ}}$). Фермент, полученный с использованием протамекса, катализировал гидролиз исследованных субстратов в следующей последовательности: $V_{\text{АТХ}} = V_{\text{БТХ}} > V_{\text{ПТХ}}$. Субстратная специфичность ХЭ кальмара Бартрама не зависела от способа обработки сырья. Отмечается некоторое снижение относительной скорости гидролиза ПТХ и БТХ в случае обработки протамексом.

Активность ХЭ, полученных с использованием пилорина, составляла 21,0–25,0 мкМ АТХ/мин/мг белка, с использованием протамекса — 30,6–33,1 мкМ АТХ/мин/мг белка (см. табл. 1).

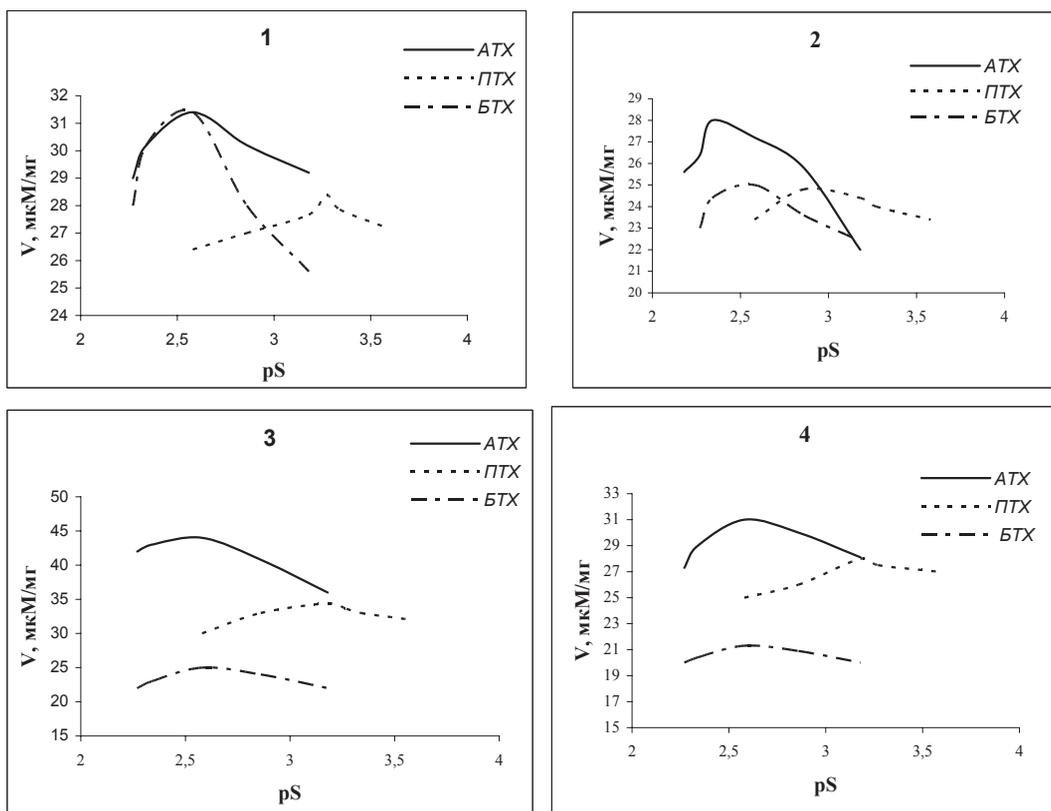


Рис. 7. Зависимость скорости гидролиза субстратов от их концентрации (pS) под действием ферментных препаратов, полученных с использованием протеолитических ферментов: **1, 2** — препараты из тихоокеанского кальмара; **3, 4** — из кальмара Бартрама; **1, 3** — препараты, полученные с использованием протамекса; **2, 4** — с использованием пилорина

Fig. 7. Rate of substrate hydrolysis under processing by proteolytic enzymes in dependence on their concentration (pS). Substrates: **1, 2** — ganglia of japanese common squid; **3, 4** — ganglia of neon flying squid; enzyme preparations: **1, 3** — Protamex; **2, 4** — Pilorin

Характеристики препаратов ХЭ, выделенных из сублимированных ганглиев кальмаров обработкой протеолитическими ферментами

Таблица 1

Table 1
Parameters of cholinesterase preparations extracted from dry squid ganglia by processing of proteolytic enzymes

Субстрат	Vm* отн., %	Термостабильность (1 ч, 50 °С), %	Удельная активность, мкМ АТХ/мин/мг белка	Выход, %
Тихоокеанский кальмар, 0,5 %-ный пилорин				
АТХ	100	37	24,70 ± 0,02	21
ПТХ	84			
БТХ	86			
Тихоокеанский кальмар, 0,5 %-ный протамекс				
АТХ	100	46	30,60 ± 0,01	25
ПТХ	92			
БТХ	103			
Кальмар Бартрама, 0,5 %-ный пилорин				
АТХ	100	45	21,0 ± 0,01	17
ПТХ	88			
БТХ	68			
Кальмар Бартрама, 0,5 %-ный протамекс				
АТХ	100	66	33,10 ± 0,01	27
ПТХ	76			
БТХ	56			

* Максимальная скорость гидролиза ферментов.

Величина k_{II} взаимодействия ХЭ, полученных из различных источников, с ФОС (субстрат АТХ), М, мин⁻¹

Таблица 2

Table 2
Bimolecular constants of cholinesterase of different origin, with OPC (ATCh), М, min⁻¹

ДФФ	ГД-42
Тихоокеанский кальмар, 0,5 %-ный пилорин	
$(1,20 \pm 0,03) \cdot 10^7$	$(1,20 \pm 0,03) \cdot 10^{10}$
Тихоокеанский кальмар, 0,5 %-ный протамекс	
$(1,30 \pm 0,02) \cdot 10^7$	$(0,69 \pm 0,01) \cdot 10^{10}$
Кальмар Бартрама, 0,5 %-ный пилорин	
$(8,50 \pm 0,02) \cdot 10^7$	$(2,90 \pm 0,02) \cdot 10^{10}$
Кальмар Бартрама, 0,5 %-ный протамекс	
$(15,0 \pm 0,01) \cdot 10^7$	$(2,10 \pm 0,01) \cdot 10^{10}$

Важным критерием качества ферментного препарата является термостабильность, потеря активности при термостатировании в течение 1 ч при 50 °С не должна превышать 40 %. Этому параметру соответствовал препарат, полученный из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара с использованием пилорина (снижение активности после инкубирования в течение 1 ч при 50 °С составляло 37 %).

Использование протеолитических ферментов различной специфичности не только приводило к изменению субстратных характеристик ХЭ, выделенных из одного вида сырья, но также оказывало влияние на величину k_{II} взаимодействия фермента с ФОС (табл. 2).

Так, ХЭ тихоокеанского кальмара, полученная с использованием пилорина, оказалась более чувствительной к ингибитору ГД-42 по сравнению с ХЭ, полученной с использованием протамекса. В то же время обработка различными ферментами не влияла на чувствительность ХЭ тихоокеанского кальмара и кальмара Бартрама к ДФФ.

По-видимому, это связано со специфическим действием протеолитических ферментных препаратов различного происхождения на ХЭ, которое может вызвать изменение конформации молекулы и оказывать влияние на связывание катионного ингибитора с активным центром ХЭ.

Чувствительность к ДФФ ХЭ кальмара Бартрама, полученной с использованием протамекса, была в 1,8 раза выше чувствительности ХЭ, полученной обработкой пилорином. Чувствительность препаратов ХЭ кальмара Бартрама, полученных с использованием как пилорина, так и протамекса, к ГД-42 была одинакова.

В целом следует отметить, что ХЭ кальмара Бартрама оказалась наиболее чувствительной к исследованным ФОС.

С целью определения фракционного состава и молекулярной массы компонентов препаратов ХЭ был проведен SDS-электрофорез в полиакриламидном геле. На рис. 8, 9 представлены денситограммы препаратов, полученных из сублимированных ганглиев кальмаров с использованием протеолитических ферментов.

Как видно на рис. 8, в препаратах из ганглиев тихоокеанского кальмара, полученных с использованием как протамекса, так и пилорина, содержатся две фракции белков с молекулярной массой 103–123 и 219–223 кДа. Окрашивание гелей для выявления ХЭ-активности с использованием АТХ (по Карновскому) показало, что ХЭ-активностью обладают только фракции массой 221 и 227 кДа. По-видимому, каталитическая активность ХЭ кальмара характерна для тетрамера с молекулярной массой 221 и 227 кДа.

В препаратах из ганглиев кальмара Бартрама, полученных с использованием протеолитических ферментов, также выявлены две фракции с молекулярной массой 95 и

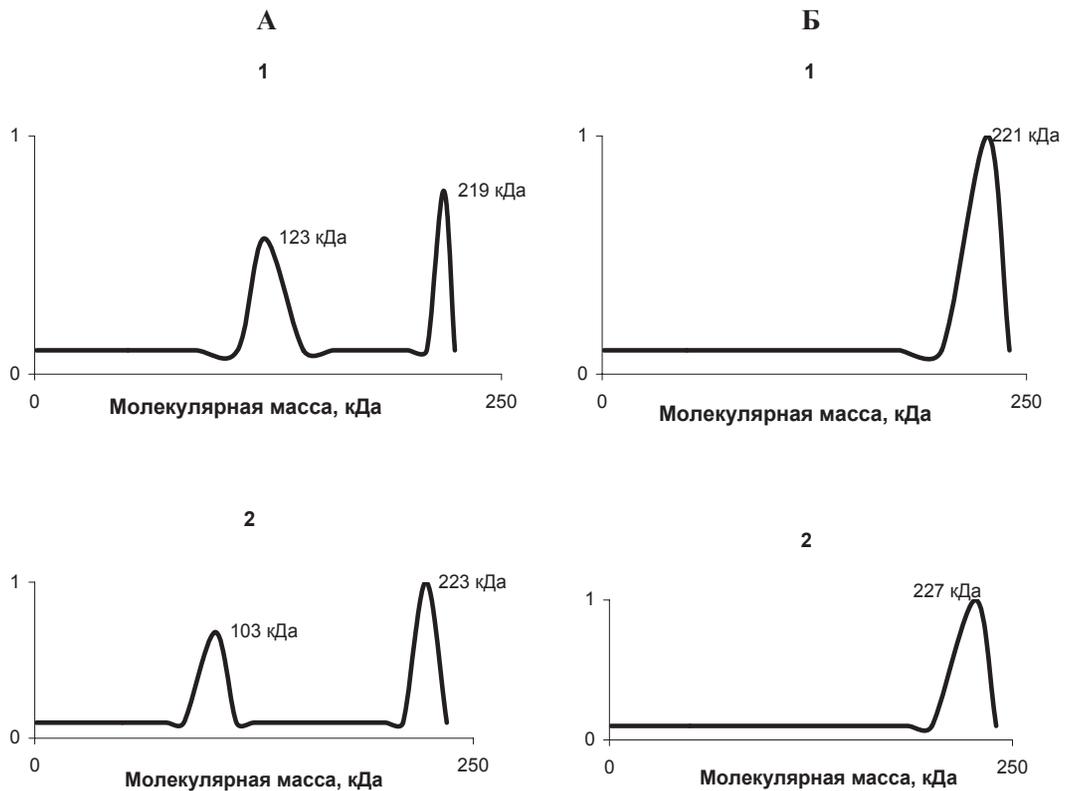


Рис. 8. Денситограммы препаратов из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара: А — окраска кумасси; Б — окраска по Карновскому; 1 — препарат, полученный с использованием протамекса; 2 — препарат, полученный с использованием пилорина

Fig. 8. Densitograms of cholinesterase preparations from ganglia of japanese common squid: А — coloring by Coomassie brilliant blue; Б — coloring by Karnovsky; 1 — Protamex processing; 2 — Pilorin processing

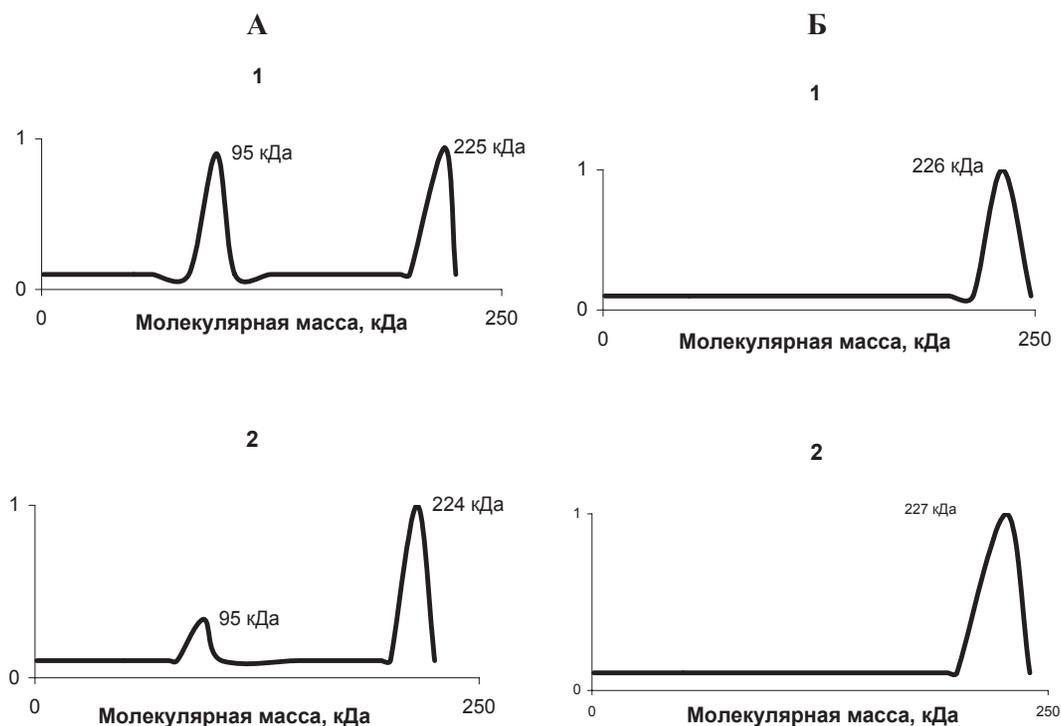


Рис. 9. Денситограммы препаратов из сублимированных ганглиев кальмара Бартрама: **А** — окраска кумасси; **Б** — окраска по Карновскому; **1** — препарат, полученный с использованием протамекса; **2** — препарат, полученный с использованием пилорина

Fig. 9. Densitograms of cholinesterase preparations from ganglia of neon flying squid: **А** — coloring by Coomassie brilliant blue; **Б** — coloring by Karnovsky; **1** — Protamex processing; **2** — Pilorin processing

224–225 кДа (рис. 9). ХЭ-активностью обладали только фракции с молекулярной массой 226 и 227 кДа, что может свидетельствовать об активности только тетрамерной формы.

Таким образом, в ходе работы были получены препараты ХЭ из сублимированных ганглиев тихоокеанского кальмара и кальмара Бартрама с использованием ферментных препаратов «Протамекс» и «Пилорин». Полученные препараты гидролизовали все изученные субстраты. Наибольшей активностью (33,1 Е/мг белка) характеризовался препарат ХЭ из ганглиев кальмара Бартрама, полученный с использованием протамекса. Этот препарат обладал и самым высоким значением выхода по активности (27 %).

Наибольшей величиной k_{II} ($1,5 \cdot 10^8$) взаимодействия с ГД-42 характеризовался препарат из ганглиев кальмара Бартрама, полученный с использованием протамекса. Самым высоким значением k_{II} ($2,9 \cdot 10^{10}$) взаимодействия с ингибитором ДФФ характеризовался фермент, полученный из кальмара Бартрама с использованием пилорина.

Методом электрофореза в полиакриламидном геле во всех препаратах ХЭ из сублимированных ганглиев кальмара установлено наличие двух высокомолекулярных белковых фракций с молекулярной массой около 100 и около 220 кДа. Специфическая окраска по Карновскому показала, что во всех полученных препаратах холинэстеразной активностью обладают фракции с молекулярной массой около 220 кДа.

Заключение

Таким образом, с учетом данных о термостабильности можно сделать вывод, что метод ограниченного протеолиза с использованием пилорина позволяет получить из ганглиев тихоокеанского кальмара термостабильный, чувствительный к ФОС препарат с удельной активностью 24,7 Е/мг белка.

Список литературы

Давидович В.В. Получение и характеристика БАД «Моллюскам» из мантии и щупалец кальмаров // Мат-лы 2-го Междунар. симпоз. «Пищевые биотехнологии: проблемы и перспективы в XXI веке». — Владивосток, 2004. — С. 17–20.

Кабачник М.И. Фосфорорганические физиологически активные вещества // Вестн. АН СССР. — 1964. — № 40. — С. 60–68.

Каравай Л.В., Левочкина Л.В. Применение отходов при переработке риса в технологии рыбных кулинарных изделий // Мат-лы науч. конф. «Современное состояние водных биоресурсов», посвященной 70-летию С.М. Коновалова. — Владивосток : ТИПРО-центр, 2008. — С. 877–881.

Михеев Е.В., Ковалев Н.Н. Обоснование биотехнологии производства ферментного препарата из зрительных ганглиев кальмаров // Мат-лы науч. конф. «Современное состояние водных биоресурсов», посвященной 70-летию С.М. Коновалова. — Владивосток : ТИПРО-центр, 2008. — С. 904–907.

Михеев Е.В., Ковалев Н.Н. Технологические характеристики ганглиев кальмаров как сырья для получения фермента холинэстеразы // Изв. ТИПРО. — 2012. — Т. 169. — С. 238–245.

Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Получение и очистка белковых гидролизатов // Прикл. биохим. и микробиол. — 2000. — Т. 36, № 4. — С. 371–379.

Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование : монография. — М. : Наука, 1981. — 286 с.

Пивненко Т.Н. Трипсиноподобные протеазы дальневосточных лососей : дис. ... канд. биол. наук. — Киев : Ин-т биохимии им. Палладина, 1986. — 176 с.

Пивненко Т.Н., Эпштейн Л.М., Позднякова Ю.М., Давидович В.В. Получение и характеристика белковых гидролизатов с использованием ферментных препаратов различной специфичности // Изв. ТИПРО. — 1997. — Т. 120. — С. 23–31.

Позднякова Ю.М., Давидович В.В. Влияние специфичности ферментных препаратов на нуклеотидный состав гидролизатов молок различных видов рыб // Тез. докл. конф. молодых ученых ТИПРО. — Владивосток : ТИПРО-центр, 1999. — С. 216.

Позднякова Ю.М., Давидович В.В. Исследование субстратной специфичности панкреатических сериновых протеаз различного происхождения // Тез. докл. конф. молодых ученых ТИПРО. — Владивосток : ТИПРО-центр, 1997.

Суховерхова Г.Ю., Пивненко Т.Н. Исследование специфичности ферментов к гидролизу хрящевой ткани гидробионтов // Мат-лы науч.-практ. конф. «Пищевая и морская биотехнология: проблемы и перспективы». — Калининград, 2006. — С. 115–116.

Яковлев В.А. Кинетика ферментативного катализа : монография. — М. : Наука, 1965. — 248 с.

Chan S.L., Shirachi D.Y., Hargava H.N. et al. Purification and properties of multiple forms of brain acetylcholinesterase // J. Neurochem. — 1972. — Vol. 19, № 12. — P. 2747–2758.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharmacol. — 1961. — Vol. 7, № 1. — P. 88–95.

Haas R., Braudt P.T., Knigt J., Rosenbery T.L. Identification of amino components in a glycolipid membrane-binding domain at the C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase // Biochemistry. — 1986. — Vol. 25, № 11. — P. 3098–3105.

Hayes A.W., Dayan A.D., Hall W.C. et al. A review of mammalian carcinogenicity study design and potential effects of alternate test procedures on the safety evaluation of food ingredients // Regul. Toxicol. Pharmacol. — 2011. — Vol. 59, № 1. — P. 142–175.

Karnovsky M., Roots L.A. “Direct-colouring” thiocholine method for cholinesterases // Histochem. Cytochem. — 1964. — Vol. 12. — P. 219–226.

Leuzinger W. The number of catalytic sites in acetylcholinesterase // Biochem. J. — 1971. — Vol. 123, № 2. — P. 134–141.

Ord M.B., Thompson R.H.S. Pseudo-cholinesterase activity in the central nervous system // Biochem. J. — 1950. — Vol. 46. — P. 346.

Pretti C., Cognetti-Varriale A.M. The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases // Aquat. Conserv.: Mar. Freshwat. Ecosyst. — 2001. — Vol. 11, № 3. — P. 299–303.

Rodrigues S.R., Caldeira C., Castro B.B. et al. Cholinesterase (ChE) inhibition in pumpkin-seed (*Lepomis gibbosus*) as environmental biomarker: ChE characterization and potential neurotoxic effects of xenobiotics // Pestic. Biochem. Physiol. — 2011. — Vol. 99, № 2. — P. 181–188.

Toschi G.A. A biochemical study of brain microsomes // Exp. Cell. Rec. — 1959. — Vol. 16, № 2. — P. 232–255.

Поступила в редакцию 30.07.12 г.