

Выделение и очистка α -амилазы из органов северного оленя

А.А. Забавкина, Ю.Д. Янушевская, Н.В. Котова
Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет,
Российская Федерация, 197022, ул. Профессора Попова, д. 14

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Забавкина Алина Александровна – магистрант Санкт-Петербургского национального исследовательского университета информационных технологий механики и оптики. Химико-биологический кластер. Тел.: +7 (911) 958-83-73. E-mail: zabavkina97@mail.ru

Янушевская Юлия Дмитриевна – Онлайн-школа «Skysmart». Тел.: +7 (931) 354-06-71. E-mail: julie0795@mail.ru

Котова Наталия Владимировна – доцент кафедры биотехнологии Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета, кандидат химических наук. Тел.: +7 (921) 926-44-35. E-mail: Natalia.Kotova@pharminnotech.com. ORCID: 0000-0002-6273-4478

РЕЗЮМЕ

Введение. Растет популярность препаратов природного происхождения, полученных из органов и тканей животных. В России только северный олень отвечает идеальным требованиям донора органов, используемых для производства препаратов, компенсирующих человеческий организм жизненно важными биологически активными веществами. В медицине широко используется фермент α -амилаза. Известно, что высокая активность α -амилазы обнаруживается в поджелудочной железе крупного рогатого скота.

Цель. Определение качественного состава аминокислот в околоушной железе северного оленя, а также подбор оптимальных условий выделения и очистки α -амилазы.

Материал и методы. Исследования проводили на околоушной железе северного оленя. Определение компонентного состава осуществляли методами гель-хроматографии и гель-электрофореза. Определение аминокислотного состава проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для выделения и очистки α -амилазы использовались экстракционные и сорбционно-хроматографические методы.

Результаты. Оптимальным экстрагентом для экстракции α -амилазы был выбран изотонический раствор, оптимальным сорбентом для очистки α -амилазы является КУ-23.

Заключение. Определен аминокислотный состав околоушной железы северного оленя. Подобраны оптимальные условия выделения и очистки α -амилазы из околоушной железы северного оленя.

Ключевые слова: околоушная железа северного оленя, α -амилаза, гель-хроматография, гель-электрофорез, сорбционно-хроматографическая очистка.

Для цитирования: Забавкина А.А., Янушевская Ю.Д., Котова Н.В. Выделение и очистка α -амилазы из органов северного оленя. Фармация, 2021; 70 (3): 36–41. <https://doi.org/10.29296/25419218-2021-03-07>

ISOLATION AND PURIFICATION OF α -AMYLASE FROM ARCTIC CARIBOU (*RANGIFER TARANDUS*) ORGANS

A.A. Zabavkina, Yu.D. Yanushevskaya, N.V. Kotova

Saint Petersburg Chemopharmaceutical University, 14, Professor Popov St., Saint Petersburg 197022, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Zabavkina Alina Alexandrovna – Master's Student of the St. Petersburg National Research University of Information Technologies Mechanics and Optics Chemical and Biological cluster. Tel.: +7 (911) 958-83-73. E-mail: zabavkina97@mail.ru

Yanushevskaya Yulia Dmitrievna – Online school «Skysmart». Tel.: +7 (931) 354-06-71. E-mail: julie0795@mail.ru

Kotova Natalia Vladimirovna – Associate Professor of the Department of Biotechnology, St. Petersburg Chemical and Pharmaceutical University, Candidate of Chemical Sciences. Tel.: +7 (921) 926-44-35. E-mail: Natalia.Kotova@pharminnotech.com. ORCID: 0000-0002-6273-4478

SUMMARY

Introduction. Drugs of natural origin, which are obtained from animal organs and tissues, are growing in popularity. In Russia, only an Arctic caribou (*Rangifer tarandus*) meets ideal requirements to be a donor of the organs used to produce drugs that compensate for the human body with vital biologically active substances. The enzyme α -amylase is widely used in medicine. It is known that the high activity of α -amylase is observed in the pancreas of cattle.

Objective: to determine the qualitative composition of amino acids in the parotid gland of an Arctic caribou and to select optimal conditions for the isolation and purification of α -amylase.

Material and methods. The parotid gland of the Arctic caribou was investigated. The elemental composition was determined by gel chromatography and gel electrophoresis. The amino acid composition was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Extraction and adsorption chromatographic methods were used to isolate and purify α -amylase.

Results. An isotonic solution was chosen as an optimal extraction medium for α -amylase; KU-23 was an optimal sorbent for its purification.

Conclusion. The amino acid composition was determined in the parotid gland of an Arctic caribou. Optimal conditions were selected for the isolation and purification of α -amylase from the Arctic caribou parotid gland.

Key words: Arctic caribou (*Rangifer tarandus*) parotid gland, α -amylase, gel chromatography, gel electrophoresis, adsorption chromatographic purification.

For reference: Zabavkina A.A., Yanushevskaya Yu.D., Kotova N.V. Isolation and purification of α -amylase from Arctic caribou (*Rangifer tarandus*) organs. *Farmatsiya*, 2021; 70 (3): 36–41. <https://doi.org/10/29296/25419218-2021-03-07>

Введение

В настоящее время растет популярность препаратов природного происхождения, полученных из органов и тканей животных. В России только северный олень отвечает идеальным требованиям донора органов, используемых для производства препаратов, компенсирующих человеческий организм жизненно важными биологически активными веществами (БАВ). Это связано с круглогодичным содержанием северного оленя на естественных пастбищах в экстремальных условиях Крайнего Севера, инфекционной безопасностью и биологическим контролем, наличием убойных пунктов и цехов, стандартизированных по европейским требованиям. Оленеводство является высокодоходным сектором агропромышленного комплекса. Оно имеет высокую рентабельность благодаря малым затратам на содержание и кормление оленей, которые находятся преимущественно на свободном выпасе и подножном корме [1].

Фермент α -амилаза широко используется в медицине в качестве препарата при следующих показаниях: недостаточность функции поджелудочной железы (ПЖЖ), недостаточность пищеварения, операции на ПЖЖ, кишечнике, печени и желудке. Из литературных данных известно, что высокая активность α -амилазы наблюдается в ПЖЖ крупного рогатого скота. Активность фермента также обнаруживается в толстом и тонком кишечнике, скелетных мышцах, печени, почках, легких, фаллопиевых трубах, жировой ткани. Представляет интерес определить содержание БАВ в околоушной железе (ОЖ) северного оленя [2].

Цель исследования – определение качественного состава аминокислот в ОЖ северного оленя, а также подбор оптимальных условий выделения и очистки α -амилазы.

Материал и методы

Объектом исследования служил экстракт ОЖ северного оленя и выделенная из него α -амилаза.

Аминокислотный состав экстракта ОЖ определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Предварительно экстракт очищали от белков методом высаливания, используя сульфат аммония при степени насыщения 0,8. ВЭЖХ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu). Условия проведения ВЭЖХ для определения аминокислотного состава экстракта околоушной железы северного оленя представлены в табл. 1.

Условия хроматографирования: колонка Supelcosil C18, 4.6×250 мм, диаметр гранул 5 мкм.

Таблица 1

Условия проведения ВЭЖХ при определении аминокислотного состава экстракта околоушной железы северного оленя

Table 1

Conditions for HPLC determination of the amino acid composition of an extract from the parotid gland of an Arctic caribou

Параметры метода	
Режим подачи подвижной фазы	Трехкомпонентный градиентный
Подвижная фаза	Компоненты А и С – ацетатные буферные растворы с рН 5.5 и 4.05 соответственно
Скорость потока элюента, мл/мин	1,0
Температура термостата колонки, °С	55
Объем вводимой дозы, мкл	20
Время анализа, мин	45

Выделение α -амилазы из сырья северного оленя проводилось экстрагированием 0,9% NaCl в течение 1 ч при температуре 5°C. После чего центрифугированием при температуре 5°C на лабораторной центрифуге UniCenMR Herolab при частоте вращения 11 000 об/мин в течение 15 мин отделяли осадок, а супернатант использовали в экспериментальных целях.

α -Амилаза (диастаза, α -D-1,4-глюкангидролаза, КФ 3.2.1.1.) относится к классу гидролаз. Она катализирует гидролиз α -1,4-гликозидных связей крахмала, гликогена и родственных им полисахаридов. Конечными продуктами являются олигосахариды, имеющие α -конфигурацию и со-

держающие смесь мальтозы, мальтотриозы и расщепленных олигосахаридов, которые содержат α -1,4- и α -1,6 связи.

Общую концентрацию белка определяли методом Лоури [3] Амилолитическая активность определялась методом, основанным на количественном определении прогидролизованного крахмала в результате его гидролиза ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы в стандартных условиях (температура 30°C, значение pH=4,7, продолжительность гидролиза 10 мин). Количество прогидролизованного крахмала определялось колориметрическим методом по степени окраски остаточного крахмала раствором йода при длине световой волны 670 нм в кюветках при толщине поглощающего свет слоя 10 мм. В качестве контроля использовали 1% раствор крахмала объемом 10 см³, в который вместо раствора анализируемого фермента добавлялось 5,0 см³ очищенной воды. Полученная смесь прогревалась при температуре 30°C в течение 10 мин.

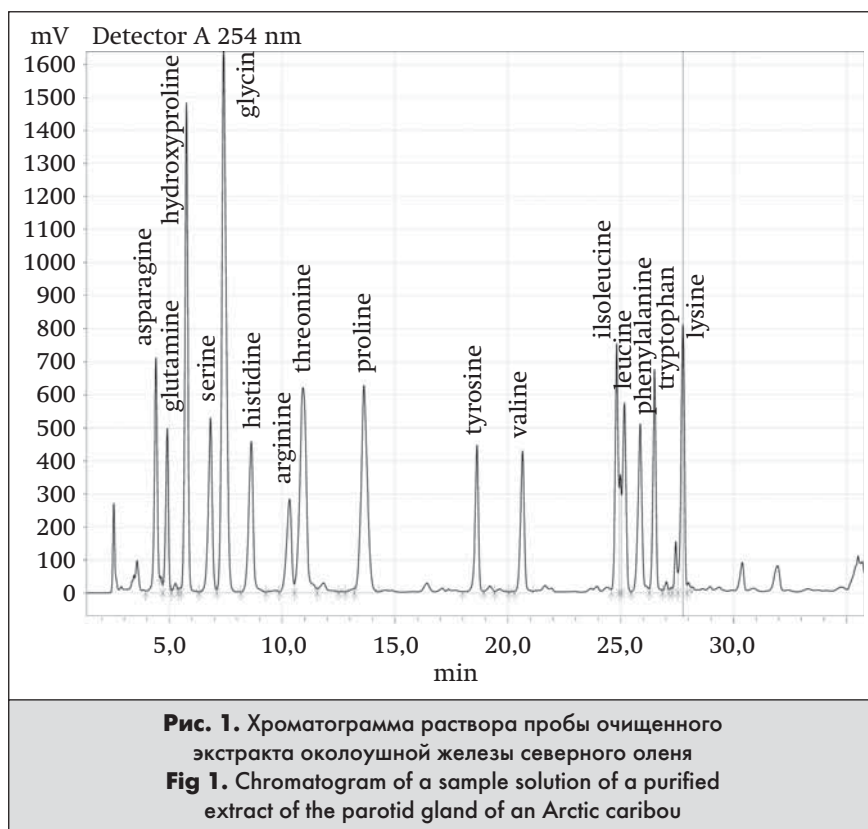
Компонентный состав нативного раствора α -амилазы определяли методом элютивной гель-хроматографии на лабораторной колонке $d \times H = (1,0 \times 20)$ см. В качестве молекулярно-ситового геля был использован сефадекс фирмы Sigma марки G-75. Проводили электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли [4]. Изучение равновесных параметров процесса сорбции α -амилазы проводили на сорбентах: сульфокатионитах КУ-23, С-160, С-150 и карбоксильном катионите С-115Е в статических условиях (концентрация сорбента 2 мг/мл; pH=3,5–3,8). Характеристика сорбентов представлена в табл. 2 [5–8].

Навески воздушно-сухих сорбентов промывали дистиллированной водой, чтобы очистить сорбент от мелких ча-

Таблица 2
Физико-химические характеристики используемых сорбентов

Physical and chemical characteristics of used sorbents

Сорбент	Средний размер зерна сорбента, мм	Коэффициент набухания	Насыпная плотность, г/см ³	Функциональные группы
КУ-23	0,25–0,4	1,5	0,6	SO ₃ H
С-160	0,3–0,4	4	0,82–0,86	SO ₃ H
С-150	0,3–0,4	5	0,785–0,825	SO ₃ H
С-115Е	0,3–0,4	5	0,66–0,705	COO ⁻



стиц и загрязнений. Затем сорбент заливали 1 н раствором HCl и оставляли на 24 ч, по истечении времени сорбент отмывали очищенной водой до значения pH=5-6. Далее тот же сорбент заливали 1н NaOH и также оставляли на 24 ч, по истечении времени сорбент отмывали дистиллированной водой до pH=5-6. Отфильтровывали и высушивали до постоянной массы. Обработанные сорбенты хранились в колбах с крышками, откуда необходимые навески отбирались по мере надобности для проведения экспериментов.

По экспериментальным данным рассчитаны емкость сорбции, построены изотермы сорбции и рассчитаны коэффициенты распределения K_d (см³/г). Коэффициент распределения сорбируемого вещества между фазами раствора и сорбента (K_d , см³/г) рассчитывали графическим методом при равновесной концентрации белка в растворе 1,9 мг/см³.

Результаты и обсуждение

Анализ аминокислотного состава ОЖ северного оленя показал, что в экстракте ОЖ содержится в незначительном количестве 14 аминокислот, из которых 7 являются незаменимыми (рис. 1).

Исследования по изучению влияния степени измельчения и времени проведения процесса экстракции показали, что наиболее эффективным является измельчение ОЖ до размера 5-8 мм.

Для определения оптимальных условий проведения процесса экстракции α -амилазы из ОЖ северного оленя проведены исследования зависимости концентрации белка в экстракте от использования различных экстрагентов: уксусной кислоты (0,01; 0,1 н уксусная кислота), серной кислоты (0,01; 0,1н) и изотонического раствора. На рис. 2 представлена зависимость концентрации белка в экстракте от различных экстрагентов. Оптимальным экстрагентом является 0,9% NaCl, т.к. при его использовании концентрация белка в экстракте в 1,5-2 раза больше, чем при использовании уксусной и серной кислот.

В полученном экстракте был проведен гель-хроматографический анализ белкового состава ОЖ северного оленя на сефадексе G-75 (Sigma). Из гельхроматограммы (рис. 3) видно, что в экстракте присутствуют 2 белковых пика с молекулярными массами: 1-й – около 50 кДа (проявляет амилолитическую активность), 2-й – около 31 кДа (не проявляет амилолитическую актив-

ность). Таким образом, белковые примеси имеют молекулярную массу ниже, чем целевой продукт. Поэтому они могут быть отделены от амилазы сорбционно-хроматографическими и мембранными методами.

Для подтверждения компонентного состава экстракта ОЖ северного оленя использован электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли, который полностью подтверждает результаты гельхроматографического анализа.

Для сорбционно-хроматографической очистки амилазы были подобраны оптимальные условия проведения сорбции на данных сорбентах: pH=3,5-3,8, концентрация сорбента 2 мг/мл. Определены равновесные показатели процес-

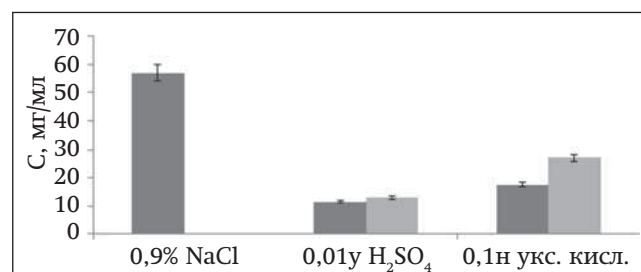


Рис. 2. Зависимость концентрации белка в экстракте от различных экстрагентов
Fig 2. Relationship of protein concentration in the extract to various extraction media

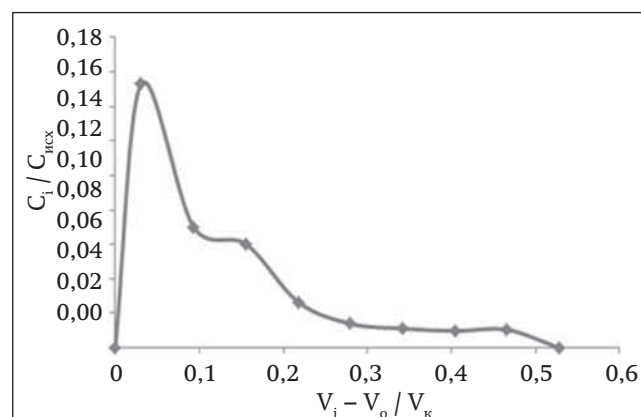
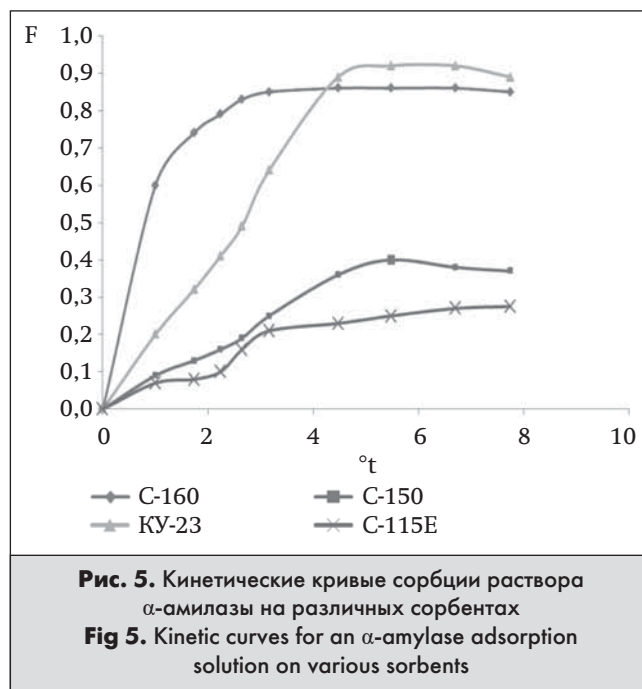
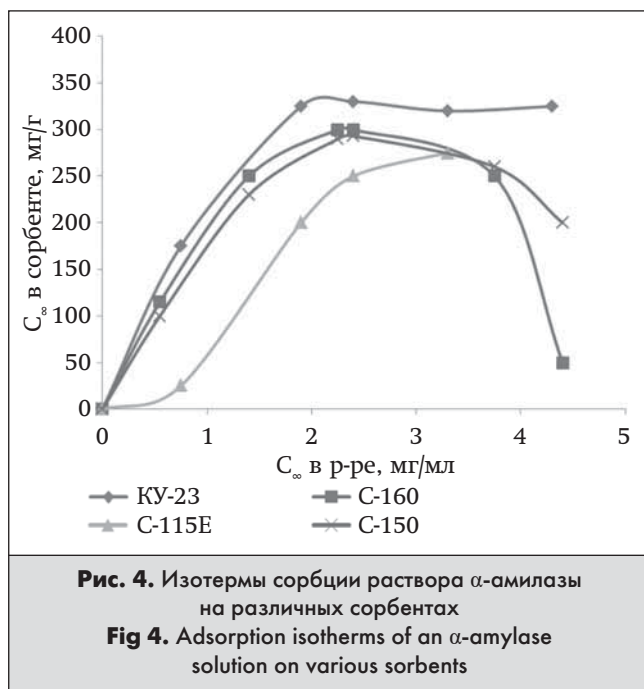


Рис. 3. Гель-хроматографический анализ экстракта из околоушной железы северного оленя

Примечание. C_i – концентрация белка в экстракте, мг/мл;
 $C_{исх}$ – концентрация белка в исходном растворе, мг/мл;
 V_i – объем фракции, мл; V_o – свободный объем колонки, мл;
 V_k – объем хроматографической колонки.

Fig 3. Gel chromatography for an extract from the parotid gland of an Arctic caribou

Note. C_i is the protein concentration in the extract, mg/ml;
 C_{stock} is the protein concentration in the stock solution, mg/ml;
 V_i is the fraction volume, ml; V_o is the free volume of the column, ml; V_c is the volume of the chromatographic column, ml.



са сорбции. Для изучения избирательности процесса сорбции были построены изотермы сорбции α -амилазы на разных сорбентах (рис. 4), которые имеют различный вид. На изотермах сорбции α -амилазы на сульфокатионитах C-150 и C-160 наблюдается максимум, который проявляется вследствие того, что поры сорбента недоступны для макромолекулярных ассоциированных структур и емкость сорбента снижается. Изотерма сорбции α -амилазы на сульфокатионите КУ-23 соответствует модели Лэнгмюра [9]. Изотерма сорбции α -амилазы на карбоксильном катионите C-115E имеет вид S-образной кривой. Это связано с кооперативным эффектом взаимодействия: происходит взаимное влияние сорбируемых молекул, первые молекулы сорбируются плохо, а последующие – лучше за счет этого влияния.

Был проведен кинетический анализ процесса сорбции α -амилазы на различных сорбентах, построены кинетические кривые и графическим методом рассчитаны коэффициенты диффузии (рис. 5). Коэффициент диффузии (D) рассчитывался по тангенсу угла наклона начального прямолинейного участка зависимости $F = f(\sqrt{t})$:

$$D = A \cdot (\tan \alpha)^2 \cdot d_{\text{ч}}^2,$$

где A – числовой коэффициент, зависящий от формы сорбента; $A = \pi / 144$, $d_{\text{ч}}^2$ – диаметр частиц сорбента, м.

Исследование кинетики процесса показало, что скорости сорбции α -амилазы на сорбентах КУ-23, C-150 и C-160 сопоставимы, и коэффициенты диффузии составили $4\text{--}7 \cdot 10^{-11}$ м²/с (табл. 3). При этом коэффициент распределения на катионите КУ-23 в 2 раза, а емкость сорбции в 1,1 раза превышают данные показатели на других сорбентах. Таким образом, оптимальным сорбентом для выделения α -амилазы является сульфокатионит КУ-23.

Показатели процесса сорбции на исследуемых сорбентах

Indicators of the adsorption process on test sorbents

Сорбент	Коэффициент распределения Kd, см ³ /г	Коэффициент диффузии D, м ² /с	Емкость сорбции, мг/г
КУ-23	260±0,4	7,850 • 10 ⁻¹¹ (±0,8)	330±0,3
C-150	120±0,4	4,800 • 10 ⁻¹¹ (±0,8)	293±0,3
C-160	131±0,4	7,670 • 10 ⁻¹¹ (±0,8)	300±0,3
C-115E	79±0,4	7,065 • 10 ⁻¹¹ (±0,8)	275

Заключение

Определен аминокислотный состав ОЖ северного оленя, представленный 14 аминокислотами, 7 из которых являются незаменимыми. Подобраны оптимальные условия выделения

α -амилазы из ОЖ северного оленя и условия процесса сорбции α -амилазы. Наиболее эффективным экстрагентом является 0,9% NaCl, а наиболее эффективным сорбентом для выделения и очистки – КУ-23.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Рогожин Ю.В. Возможности инновационного развития производства биопрепаратов в Республике Саха (Якутия). [Электронное издание]. Режим доступа: <https://docplayer.ru/64903869-Rogozhin-yu-v-vozmozhnosti-innovacionnogo-razvitiya-proizvodstva-biopreparatov-v-respublike-saha-yakutiya.html> (дата обращения 09.06.2019)
2. Амилаза – Биохимия. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://biokhimija.ru/enzymes/amilase.html> (дата обращения 09.06.2019)
3. Shen Y. et al. Improvement on the modified Lowry method against interference of divalent cations in soluble protein measurement. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013; 97 (9): 4167–78.
4. Thomas R., Kurien B.T. Ultrarapid Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Mini-Gel Electrophoresis. Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols (ed. Kurien B.T., Scofield R.H.). New York, NY: Springer New York, 2019; 491–4.
5. Катионит КУ-23. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://chemimpex.net/index.php/ios/ios-azot/azot-kation/ku-23> (дата обращения 09.06.2019)
6. Purolite. Purolite Product: Purolite® C150. [Electronic resource]. Access mode: <http://www.purolite.com/product/c150> (circulation date 09.06.2019)
7. Purolite® C160. [Electronic resource]. Access mode: <https://www.purolite.com/product/c160> (circulation date 08.06.2019)

8. Уравнение изотермы адсорбции Ленгмюра. [Электронное издание]. Режим доступа: <https://helpiks.org/8-21027.html> (дата обращения 09.06.2019)

References

1. Rogozhin Yu.V. Possibilities of innovative development of the production of biological products in the Republic of Sakha (Yakutia). [Electronic resource]. Access mode: <https://docplayer.ru/64903869-Rogozhin-yu-v-vozmozhnosti-innovacionnogo-razvitiya-proizvodstva-biopreparatov-v-respublike-sahaykutiya.html> (circulation date: 06.09.2019) (in Russian)
2. Amylase – Biochemistry. [Electronic resource]. Access mode: <http://biokhimija.ru/enzymes/amilase.html> (circulation date: 06.09.2019) (in Russian)
3. Shen Y. et al. It was noted that the method of protein insulation should be improved. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013; 97 (9): 4167–78.
4. Thomas R., Kurien B.T. Ultrarapid Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Mini-Gel Electrophoresis. Electrophoretic Separation of Proteins: Methods and Protocols. (ed. Kurien B.T., Scofield R.H.). New York, NY: Springer New York, 2019; 491–4.
5. Kationit KU-23 [Electronic resource]. Access mode: <http://chemimpex.net/index.php/ios/ios-azot/azot-kation/ku-23> (circulation date: 06.09.2019) (in Russian)
6. Purolite. Purolite Product: Purolite® C150 [Electronic resource]. Access mode: <http://www.purolite.com/product/c150> (circulation date: 06.09.2019).
7. Purolite® C160 [Electronic resource]. Access mode: <https://www.purolite.com/product/c160> (circulation date: 06.08.2019).
8. Langmuir adsorption isotherm equation. [Electronic resource]. Access mode: <https://helpiks.org/8-21027.html> (circulation date: 06.09.2019) (in Russian)

Поступила 1 февраля 2021 г.

Received 1 February 2020

Принята к публикации 25 марта 2021 г.

Accepted 25 March 2021