



УДК 577.152.193

Влияние ионов кальция при разработке сорбционно-хроматографического метода выделения пероксидазы из экстракта

Глазова Н.В., Серкова А.Н.

*ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург*

Поступила в редакцию 23.03.2013 г.

Аннотация

Фермент пероксидаза высоко востребован на рынке в области медицины, как для лечения, так и для диагностики. В настоящее время в России растительная пероксидаза не производится. Поэтому актуальным является разработка эффективного метода выделения пероксидазы из дешёвого и доступного растительного сырья. В работе использовались плоды редьки чёрной, из которых методом твёрдофазной экстракции выделялся фермент совместно с примесными компонентами. Для выделения высокоочищенной фракции пероксидазы использовали ионогенные и неионогенные сорбенты, для которых подобраны оптимальные элюенты. Для оценки качества очистки пероксидазы от примесей был использован гелхроматографический метод.

Ключевые слова: пероксидаза, чёрная редька, медицина, экстракция, сорбенты, гелхроматография, сорбционно-хроматографический метод.

The enzyme peroxydase is highly demanded in the market in the field of medicine for both treatment and diagnostics. At the present time in Russia plant peroxydase is not manufactured. So urgent is the development of an effective method of isolation of peroxydase from cheap and readily available plant material. We used the fruits of black radish, of which stood out by solid phase extraction an enzyme with impurity components. To isolate highly purified fractions of peroxydase ionic and nonionic sorbents used for which matched the best eluents. To assess the quality of peroxydase purification from impurities gel chromatographic method has been used.

Keywords: peroxydase, black radish, medicine, extraction, sorbents, gel chromatography, sorptographic method

Введение

Пероксидаза — один из распространенных ферментных белков, интерес к изучению которого с годами не ослабевает. Уникальные свойства этого фермента обуславливают его применение в медицине, науке и технике.

В медицине пероксидаза применяется для диагностики острых, хронических бактериальных и вирусных (в том числе СПИД), инфекционных, аллергических, аутоиммунных, эндокринологических заболеваний и злокачественных новообразований методом иммунологического анализа. Данные по пероксидазной активности учитывают при селекции растений, так как существует взаимосвязь

между значением пероксидазной активности и устойчивостью растений к различным инфекциям [1].

Сегодня в России пероксидаза не производится, и российский рынок обеспечивается дорогостоящими импортными препаратами, в основном фирмы «Sigma», США. Необходимость производства пероксидазы в России назрела в связи с тем, что производство диагностических наборов, объем которого в настоящее время составляет сотни тысяч наборов в год, интенсивно растет.

Современная технология получения пероксидазы [2] трудоемка, низко продуктивна (2 – 3 грамма из 100 кг хрена корней) и связана с использованием сезонного сырья, дорогостоящих импортных хроматографических сорбентов. Все это определяет высокую стоимость фермента: стоимость препаратов пероксидазы фирмы «Sigma» (США) варьируется от семи до двух тысяч долларов за 1 грамм в зависимости от качества препарата.

Целью и задачей исследовательской работы являлась разработка эффективного сорбционного способа выделения и очистки пероксидазы из экстракта растительного сырья. Так как этот фермент является одним из доминирующих в растительном сырье, то подбор доступного источника получения пероксидазы решил бы проблему высокой стоимости фермента. Использование сорбционно-хроматографического метода выделения и очистки пероксидазы, с предварительно подобранным оптимальным сорбентом может, несомненно, повысить выход пероксидазы. Установлено, что макропористые сорбенты являются наиболее перспективными для сорбции крупных органических молекул, включая пероксидазу.

Теоретическая часть

Роль кальция в структуре и активности пероксидаз

Изученные до настоящего времени пероксидазы состоят из неокрашенного гликопротеина и соединенного с ним коричнево-красного феррипорфирина, а также содержат два иона кальция в структуре [3]. Феррипротопорфирин IX входит в активный центр, составляя порфириновое кольцо гема, являющегося высокоароматичным и гидрофобным соединением. Именно гидрофобное взаимодействие порфиринового макроцикла с белком формирует третичную структуру нативной пероксидазы. Активный центр в структуре пероксидазы формируется четырьмя остатками фенилаланина – 142, 143, 179, 68.

Пероксидаза представляет собой гликопротеин, содержащий протогем в качестве простетической группы, а также два иона кальция в структуре. Линейный размер белковой глобулы в растворе составляет 4 нм [4]. Структура молекулы пероксидазы представлена на рис. 1.

Главную роль в гетеролитическом расщеплении перекиси играют дистальные остатки His42 и Arg38. Пероксидаза содержит три остатка гистидина в положениях 40, 42 и 170. Последний является проксимальным лигандом железа. Проксимальный остаток His170 отвечает за прочное связывание гема в активном центре. Дистальный или, как его еще называют, каталитический His42 отвечает за расщепление H_2O_2 . Предполагается, что для максимальной эффективности пероксидазного катализа требуется определенная ориентация имидазольного кольца His42 по отношению к порфириновому кольцу. Остаток Arg38 в дистальной части белковой глобулы играет важную роль на всех ступенях катализа: способствует как правильной ориентации перекиси водорода в активном центре, так и ее гетеролитическому расщеплению [2].

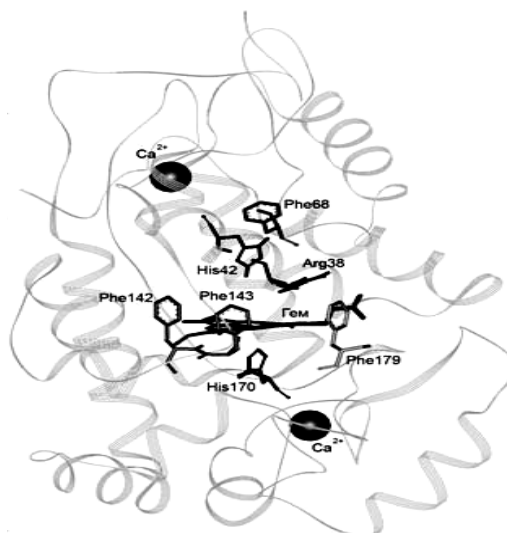


Рис. 1. Структура молекулы пероксидазы со стороны входа в активный центр, формируемого четырьмя остатками фенилаланина – 142, 143, 179, 68

Изучение эффектов, вызванных замещением кальция на другие двухвалентные металлы и Ln^{3+} , продемонстрировало неэквивалентность проксимального и дистального кальций связывающих центров в структуре молекулы пероксидазы. Последний центр оказался менее специфичным к природе металла, и именно он теряет кальций в первую очередь. Применение современных физических методов позволило подтвердить важность проксимального кальция для поддержания общей структуры фермента и седлообразной конформации гема, обеспечивающей выполнение им каталитических функций. Дистальный Ca^{2+} в большей степени критичен для стабильности структуры дистального домена фермента. Высокая подвижность этого домена при потере иона Ca^{2+} приводит к инактивации фермента при хранении или при экстремальных значениях pH. В обоих случаях присутствие в растворе кальция предохраняет пероксидазу из корней хрена от инактивации.

В отсутствие ионов кальция в дистальном центре каталитический гистидин находится на расстоянии более 8 Å от железа гема и не может принимать участия в катализе расщепления H_2O_2 в активном центре. Только протонирование фермента с последующим встраиванием иона Ca^{2+} в дистальный центр восстанавливает активность пероксидазы по отношению к перекиси водорода.

В случае пероксидаз грибов диссоциация иона кальция из дистального центра имеет роковые последствия. Принципиальное различие между пероксидазами растений и грибов состоит в различной роли одной из дисульфидных связей (Cys49–Cys44). У пероксидаз растений эта дисульфидная связь поддерживает структуру дистальной области и в отсутствие иона Ca^{2+} , в то время как у пероксидаз грибов она не компенсирует отсутствие иона кальция в дистальном центре и не в состоянии поддерживать структуру белка. Результатом этой структурной особенности является значительно меньшая стабильность грибных ферментов, у которых потеря иона кальция приводит к сильным структурным изменениям и полной потере активности [2].

Очень актуальным является дальнейшее изучение регуляторной роли ионов кальция для других источников растительного сырья (в частности, для чёрной редьки). Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что механизм и природа такой регуляции характеризуются высокой специфичностью в каждом индивидуальном случае.

Эксперимент

Материалы и методы изучения

В качестве источников пероксидазы использовали: чёрной редьки плоды (ч.р.п.). Объект исследования: фермент пероксидазы, находящийся в Са – экстракте ч.р.п. В качестве сорбентов для исследования были выбраны молекулярный (Полисорб-1) и ионогенный (КУ-23) макропористые сорбенты на основе стирола и дивинилбензола, и гелевый сорбент с жёстким каркасом (КУ-2-20) для проведения процесса деминерализации экстракта. Физико-химические свойства сорбентов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Физико-химические свойства сорбентов

Показатель	Полисорб-1	КУ-23	КУ-2-20
Полимерная основа	Стиролдивинилбензольная		
Ионогенная группа	отсутствует	-SO ₃ H	-SO ₃ H
Размер зёрен, мм	0.5+/-0.1	0.5+/-0.1	0.8+/-0.1
Рабочий диапазон pH	не зависит от pH	1-14	1-14
Особенности	Структура макропористая; молекулярный сорбент	Высокопроницаемая структура (промежуточная между непористой и макропористой)	Гелевый сорбент с жёстким каркасом

Концентрацию общего белка определяли по методу Лоури и Кумасси, а активность пероксидазы определяли по пирогаллолу.

Метод основан на измерении количества окисленного в присутствии пероксидазы пирогаллола в пурпурогаллин. При этом раствор приобретает более насыщенную пурпурную окраску. Пурпурогаллин имеет максимум поглощения при $\lambda=420$ нм.

1 единица активности пероксидазы по пирогаллолу соответствует такому количеству фермента, которое катализирует образование 1 мг пурпурогаллина из пирогаллола за 20 секунд при $t = 20^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH} = 6,0$.

Экстрагент и оптимальные условия проведения процесса экстракции были подобраны ранее с использованием, как литературных источников, так и экспериментальной работы. Эти условия приведены ниже: растительное сырьё и экстрагент 5 % раствор CaCl₂ в соотношении 1:10. Экстракцию проводили в течение 30 минут при постоянном перемешивании на качалке при комнатной температуре.

Обсуждение результатов

В работе проводили изучение влияния концентрации ионов Ca²⁺ на активность фермента. Экспериментальные данные представлены на рис. 2.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, при полной деминерализации (без ионов кальция) экстракта происходит инактивация пероксидазы, что свидетельствует о зависимости активности пероксидазы из ч.р.п. от присутствия в

экстракте ионов кальция. Этот эффект ранее не был описан в литературных источниках для данного растительного сырья. Экспериментально проводили определение той минимальной концентрации ионов кальция в экстракте, которой будет достаточно для проявления пероксидазной активности. По результатам проделанных опытов стало ясно, что минимальной необходимой концентрацией ионов кальция является концентрация применяемого при выделении экстрагента, то есть 5 %.

Для изучения компонентного состава исходного экстракта использовали метод гельхроматографии. Эксперимент проводили на предварительно откалиброванной по белкам с известной молекулярной массой колонке ($D \times H = 1,0 \times 20,0$ см) с сефадексом фирмы "Sigma" марки G-50-150.

Как видно из данных, представленных на Рис. 3, в исходном экстракте на гельхроматограмме наблюдается два пика, один из которых соответствует (по активности) пероксидазе, а второй более низкомолекулярным балластным примесям. Молекулярная масса первого пика соответствует 45000 Да. Полученные данные говорят о том, что в исходном экстракте количество балластных белков составляет приблизительно 80 %.

В динамических условиях провели подбор условий и сравнительный анализ сорбции/десорбции пероксидазы из экстракта ч.р.п. на молекулярном (Полисорб-1) и ионогенном (КУ-23) сорбентах. Сорбцию и десорбцию пероксидазы проводили на лабораторных колонках $D \times H = 1,0 \times 20,0$ см. Скорость сорбции $W_{\text{сорб.}} = 8$ мл/час, промывки и десорбции $W_{\text{десорб.}} = W_{\text{пром.}} = 4$ мл/час. Для данного эксперимента использовали неионогенный сорбент Полисорб-1 с размером частиц 300-500 мкм, высота слоя сорбента составляла 3,5 см, и 500 мг сухого КУ-23 с размером частиц 300-500 мкм, высота слоя сорбента составляла 4,5 см. Для сравнительного анализа динамических экспериментов выходные кривые для Полисорба -1 и КУ-23 построены в координатах $C/C_{\text{исх}} (A/A_{\text{исх}}) = f((V_i - V_0)/V_{\text{кол}})$, где $C_{\text{исх}}$, $A_{\text{исх}}$ – концентрация белка и активность пероксидазы в исходном экстракте; C , A – концентрация белка и активность пероксидазы в пробах. Элюенты, которые использовали в опытах, представлены в табл. 2, выбранные исходя из теоретических предположений и экспериментальных данных.

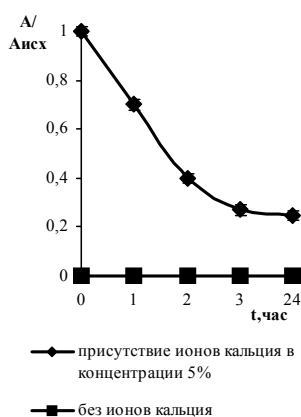


Рис. 2. Изменение активности пероксидазы в экстракте из ч.р.п. во времени

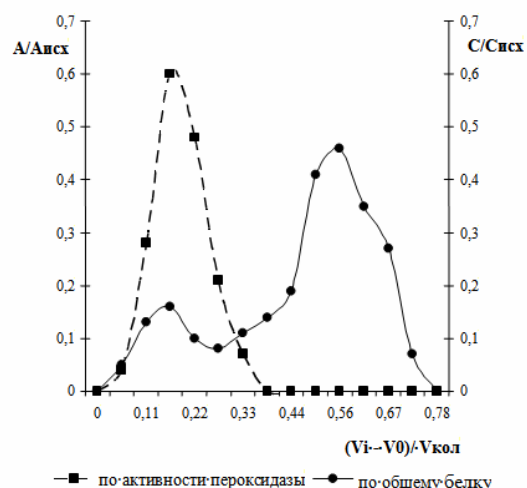


Рис. 3. Гельхроматограмма исходного экстракта

Для молекулярного сорбента не имело значение рН элюирующего раствора, а определяющим являлась концентрация органического растворителя. Кроме того, молекулярный сорбент не сорбирует ионы кальция и они остаются в структуре фермента. Для ионогенного сорбента рН является определяющим фактором десорбции, так как это связано с перезарядкой фермента выше изоточки, и необходимым для проявления активности пероксидазы является наличие ионов кальция в составе элюирующего раствора (в количестве 5 %) в виду необратимой сорбции ионов кальция на сульфокатионите.

Экспериментальные данные представлены на Рисунках 4 и 5. В табл. 2 представлен выход пероксидазы при десорбции с использованием различных элюентов на сорбентах Полисорб-1 и КУ-23.

Таблица 2. Выход пероксидазы по десорбции с различных сорбентов

Измерения	Выход по десорбции, %	
	Полисорб-1; Элюент: водный ацетон (7,5% об.) + 0,6 М NaCl	КУ-23; Элюент: раствор NH ₄ OH (рН 10,7) + 5% CaCl ₂
по общему белку	89	90
по активности пероксидазы	64	87

Как видно из таблицы, выход по общему белку на обоих сорбентах одинаков, независимо от состава элюента. В случае молекулярного сорбента выход по активности значительно ниже. Это может быть связано с тем, что ацетон может оказывать ингибирующее действие на активность фермента. Выбранный элюент для ионогенного сорбента является оптимальным, так как выход пероксидазы по активности и белку практически совпадает.

Для оценки эффективности сорбционной очистки была проведена гельхроматография полученного элюата. Экспериментальные данные представлены на рис. 6.

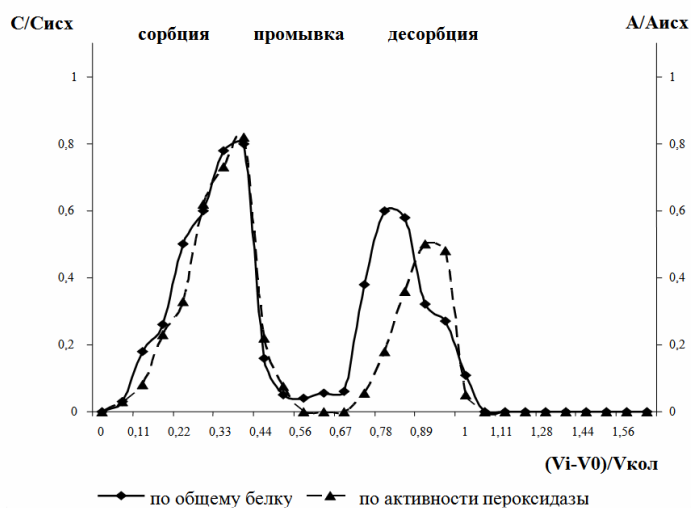


Рис. 4. Выходная кривая пероксидазы из исходного экстракта на Полисорб-1

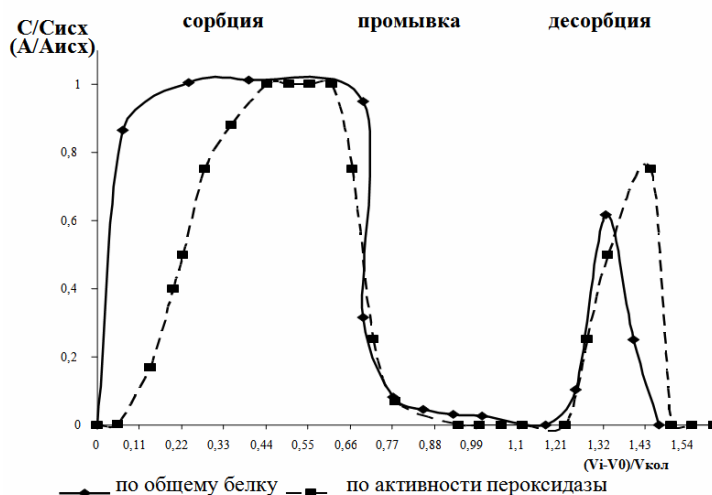


Рис. 5. Выходная кривая пероксидазы из исходного экстракта на КУ-23

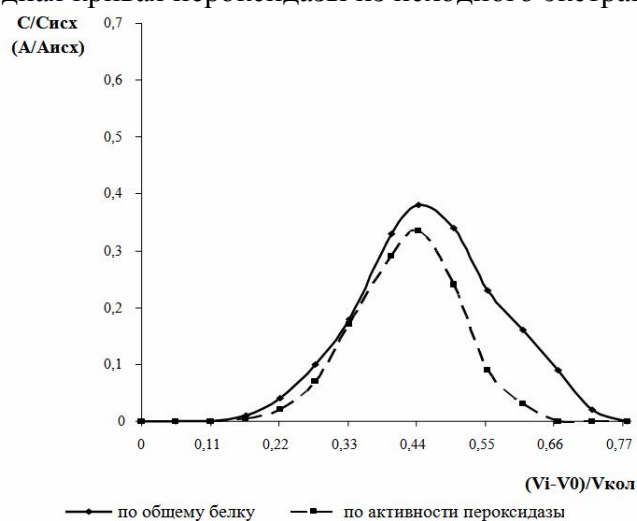


Рис. 6. Гельхроматограмма очищенного экстракта

Как видно из данных, представленных на Рис. 6, положение максимума по активности пероксидазы и по общему белку сместилось в сравнении с гельхроматограммой исходного экстракта. Максимум пика соответствует молекулярной массе 20000 Да, которая близка к молекулярной массе фракции чистой пероксидазы. Удельная активность пероксидазы в элюате составляет 20 ЕД/мг, что превосходит в 10 раз удельную активность пероксидазы в исходном экстракте. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о возможности эффективной очистки пероксидазы от более низкомолекулярных белков.

Заключение

Исследовано влияние ионов кальция на сорбционно-хроматографический метод выделения пероксидазы редьки из экстракта. Так как в структуре пероксидазы содержатся ионы кальция и их потеря приводит к инактивации фермента, то были подобраны условия проведения сорбционно-хроматографического выделения пероксидазы на молекулярном и ионогеном ионитах. Показано, что существует

вероятность исключения ионов кальция из структуры фермента при связывании пероксидазы с сульфокатионитом. Это необходимо учитывать при подборе элюента для выделения высокоочищенной фракции пероксидазы.

Список литературы

1. Давыдова Г.Ф., Ермаков О.А., Панасенко А.И., Тищенко А.М. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза //Химия растительного сырья. 1998. № 1. С. 15-18.
2. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений. М. 2006. С. 303-330.
3. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М.: Наука. 1988. 128с.
4. Александрова Е.Ю., Орлова М.А., Нейман П.Л. Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и её стабильности к различным воздействиям //Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия. 2006. №5. С. 350-352.

Глазова Наталья Владимировна - к.х.н., доцент каф. биотехнологии, ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, тел. 8 (911) 949-00-82

Серкова Анастасия Никитична – ассистент кафедры биотехнологии, соискатель, ГБОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург

Glazova Natalia V. - candidate of chemical sciences, docent of biotechnology department, SBEI HVE Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, S-Petersburg

Serkova Anastasia N. - assistant of biotechnology department, applicant for a degree of the Candidate of Science, SBEI HVE Saint-Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of the Russian Federation, S-Petersburg, e-mail: nastyusha88@yandex.ru