

ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ИЗ ОБОЛОЧЕК СЕМЕНИ СОИ

Федулов А.Л., Спиридович Е.В., Рахманько Е.М.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» Минск, Республика Беларусь

Введение.

Пероксидаза – железопорфириновый фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз, который повсеместно встречается во всех растениях, животных и микроорганизмах[1]. Фермент катализирует окислительно-восстановительную реакцию в присутствии пероксида водорода, который выступает в качестве акцептора электронов, многих видов органических субстратов посредством высвобождения кислорода[2]. Фермент присутствует в хрене, соевых бобах, томатах, картофеле, репе, моркови, пшенице, бананах, клубнике и др.[1], но корень хрена является источником промышленного выделения фермента.

Пероксидаза имеет широкое практическое применение, в частности, в медицине в качестве компонента диагностических систем для биохимических и иммуноферментных анализов. В иммуноферментных методах пероксидаза широко используется для приготовления антитело-фермент или антиген-антитело-фермент конъюгатов, в виду высокого сродства, высокой скорости протекания реакции и большей чувствительности[3]. Использование высокоспецифичной, высокочувствительной и очень стабильной пероксидазы обеспечивается в диагностической системе определения уровня глюкозы в крови в глюкозооксидазной методике[4].

Пероксидаза сои представляет интерес благодаря некоторым уникальным характеристикам: высокая термостабильность (температура инактивации выше 80°C), высокая реакционная способность и стабильность при низких значениях рН и в ряде органических растворителей[5]. Пероксидаза сои содержится в большом количестве в семенной оболочке сои, являющейся дешевым сырьем и побочным продуктом при переработке сои. Эти свойства делают этот фермент привлекательным для практического применения и получения в промышленных масштабах.

Целью данной работы является исследование возможности выделения и очистки пероксидазы из соевых оболочек и разработка на этой основе методики её получения.

Методы исследования.

Методика определения активности пероксидазы. Активность пероксидазы измерялась при 405 нм в среде 0,1 М фосфатного буфера с pH 5,0 с использованием перекиси водорода и 2, 2' - азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS) в качестве хромогена. 0,1мл 0,1% перекиси водорода добавлялся к смеси 2,9 мл буферного раствора хромогена и 0,05 мл раствора образца фермента. Оптическая плотность измерялась через 5 минут после начала реакции. Расчет активности проводился в интервале времени 1 мин., при котором наблюдалась максимальная скорость реакции[6].

Определение параметра RZ. Степень чистоты образцов фермента определялась из отношения $RZ = D_{\Delta 403} / D_{\Delta 275}$, где $D_{\Delta 403}$ и $D_{\Delta 275}$ – величины оптической плотности раствора образца фермента при соответствующих длинах волн[6].

Определение концентрации белка. В каждом образце определялось содержание белка. Определение велось по методике с красителем пирогаллоловым красным относительно стандарта бычьего сывороточного альбумина (Roche) 1,0 г/л[7].

Электрофорез. Образцы анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ)(60% акриламид: метиленбисакриламид, C = 3%) в щелочной системе в денатурирующих условиях по методу Laemmli[8] с некоторыми модификациями. Для разделения белковых компонентов использовали гели с градиентом концентрации мономеров ПААГ (10-24%), в качестве концентрирующего геля использовали 4% ПААГ. Электрофорез проводили в буфере, содержащем 0,025 М Tris, 0,192 М глицина (pH 8,3) и 0,1 % додецилсульфата натрия (ДСН). Непосредственно перед электрофорезом навеску белков или аликвоту белкового экстракта растворяли в буфере, содержащем 0,625 М Tris-HCl (pH 6,8), 5 % 2-меркаптоэтанола, 2 % ДСН, 10 % глицерина, 0,001 % бромфенолового синего, прогревали в течение 3-5 мин. на кипящей водяной бане, центрифугировали при 10000 g (ELMI, Литва) 5 мин., и супернатант использовали для электрофореза.

Окрашенные гели фотографировали с помощью цифровой фотокамеры Canon. При электрофоретическом разделении белков в каждом геле параллельно с исследуемыми образцами разделяли белки-маркеры фирмы “Amersham Pharmacia Biotech” (Швеция) с диапазоном Мм 14,4-97 kD для электрофореза в денатурирующих условиях.

Исследование термической стабильности. Проведен сравнительный анализ термической стабильности образцов пероксидаз из двух источников: пероксидаза из корня хрена (Roche) и пероксидаза из оболочек семени сои. Для выполнения эксперимента взяли два образца с активностью по 70 Е/мл этих пероксидаз. Образцы

представляли собой навески, растворенные в 0,1 М калий - фосфатном буфере рН 6,0. Опыт проводился при четырех различных температурах: 45°C, 60°C, 75°C и 90°C. Приготовленные образцы инкубировали на водяной бане в течение 30 минут при определенной температуре. Определение активности велось по описанной выше методике.

Результаты и их обсуждение.

Проведена оценка районированных в Беларуси сортов сои по активности. Были использованы сорта «Северная звезда», «Ясельда» и «БОС 37-15». Наилучшим по активности пероксидазы оказался сорт «Северная звезда», который в дальнейшем использовался во всех экспериментах по выделению.

Приготовление экстракта фермента. Источником фермента были измельченные семенные оболочки сои, предоставленные АО «Соя – Север». Были проведены исследования по полноте и времени экстракции пероксидазы из измельченной шелухи семян сои в дистиллированной воде, калий - фосфатном буфере, а также в различных соотношениях жидкости и сухого сырья. Экстракция в калий - фосфатном буфере проводилась в диапазонах рН от 5,0 до 8,0. Оптимальное соотношение жидкости и сухого сырья определялось в ряде 3:1, 5:1, 10:1, 15:1 по массе. В результате проведенных экспериментов различий в полноте экстракции между буфером и дистиллированной водой не наблюдалось. Оптимальное соотношение жидкости к сухому сырью составило 10:1 по массе, а достаточное время для проведения экстракции при 4°C составило 24 часа.

Обработка спирто-хлорформной смесью. Crude-экстракт обрабатывался спирто-хлорформной смесью в соотношении 2:1(по объему)[9]. Предварительно охлажденная спирто-хлорформная смесь приливалась к экстракту в объемном соотношении 0,15:1 при постоянном перемешивании при 4°C в течение 20 мин. Затем полученная смесь центрифугировалась при 5000 об/мин. на холоду в течение 15 мин. Экстракт концентрировали на роторном испарителе ИР-1М2. Концентрирование проводилось в диапазоне температур от 35°C до 55°C. Показано, что концентрирование при 55°C не приводит к инаktivации фермента, но значительно увеличивает скорость отгонки воды. Результаты измерения активности показаны на Рис. 1 (Фракция А – активность фермента в экстракте, Фракция В – активность фермента после концентрирования на испарителе). В дальнейшем концентрирование проводилось при 55°C до активности фермента 280-320 Е/мл (приблизительно в течение 90 мин.).

Фракционирование и очистка. Исследовали концентрационные интервалы $(NH_4)_2SO_4$ при поэтапной очистки полученного после концентрирования на роторном испарителе раствора фермента. Изучали активность образцов, полученных после

осаждения $(NH_4)_2SO_4$ в широком диапазоне концентраций. В результате проведенных экспериментов наиболее эффективной оказалась следующая схема солевой очистки:

I этап. Проводили насыщение $(NH_4)_2SO_4$ до концентрации 180 г/л. Затем центрифугирование при 5000 об/мин на холоду. (Фракция – 1,1) рис.1. В супернатант добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до концентрации 380 г/л. Затем снова проводили центрифугирование. (Фракция – 1,2).

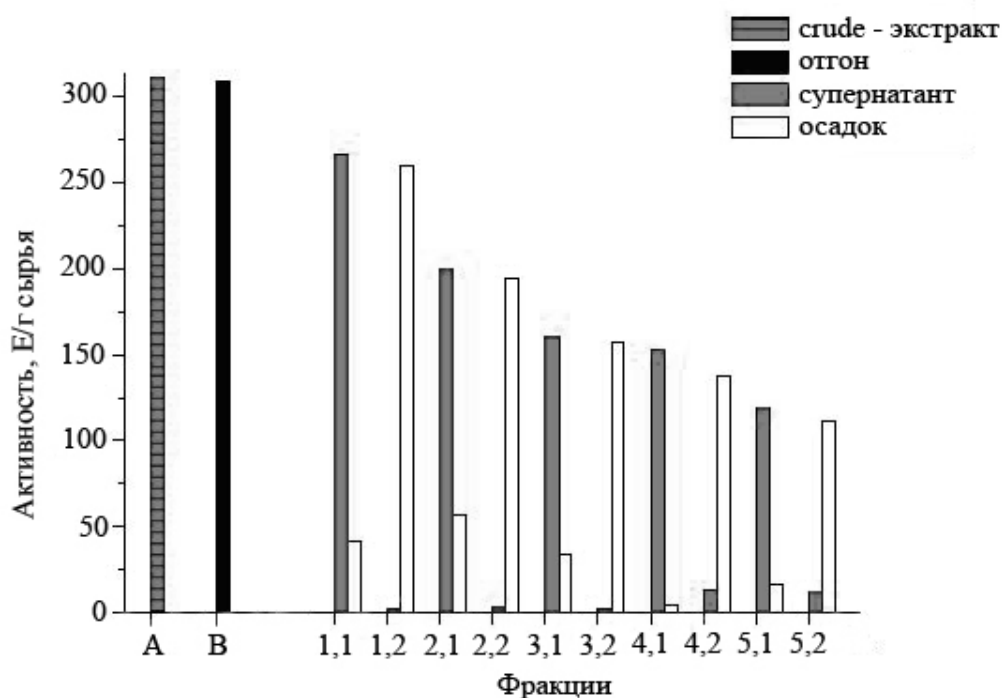


Рисунок 1 - Активность пероксидазы из сои на грамм сырья в образцах на различных этапах очистки.

А – crude-экстракт; В – crude-экстракт после концентрирования на роторном испарителе; 1,1 – распределение активности между супернатантом и осадком на I этапе осаждения 180 г/л $(NH_4)_2SO_4$; 1,2 – распределение активности между супернатантом и осадком на I этапе осаждения 380 г/л $(NH_4)_2SO_4$; 2,1- распределение активности между супернатантом и осадком на II этапе осаждения 220 г/л $(NH_4)_2SO_4$; 2,2 – распределение активности между супернатантом и осадком на II этапе осаждения 360 г/л $(NH_4)_2SO_4$; 3,1 – распределение активности между супернатантом и осадком на III этапе осаждения 240г/л $(NH_4)_2SO_4$; 3,2 – распределение активности между супернатантом и осадком на III этапе осаждения 340 г/л $(NH_4)_2SO_4$; 4,1 – распределение активности между супернатантом и осадком на IV этапе очистки C_2H_5OH (1,8 об.спирта/1 об.образца); 4,2 – распределение активности между супернатантом и осадком на IV этапе очистки C_2H_5OH (4 об.спирта/1 об.образца); 5,1 – распределение активности между супернатантом и осадком на V этапе очистки C_2H_5OH (2,2 об.спирта/1 об.образца); 5,2 -

распределение активности между супернатантом и осадком на V этапе очистки C_2H_5OH (3,4 об. спирта/1 об. образца).

В результате I этапа получен образец фермента с удельной активностью 25,41 Е/мг белка.

II этап. Полученный осадок при центрифугировании в I этапе растворяли в дистиллированной воде до концентрации пероксидазы 200-300Е/мл. В раствор добавляли до концентрации 220 г/л $(NH_4)_2SO_4$. Центрифугирование при 5000 об/мин на холоду. (Фракция – 2,1). В супернатант добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до концентрации 360 г/л. Затем снова проводили центрифугирование. (Фракция – 2,2). В результате II этапа получен образец фермента с удельной активностью 53,27 Е/мг белка.

III этап. Полученный осадок при центрифугировании на II этапе растворяли в дистиллированной воде до концентрации пероксидазы 1500-1600 Е/мл. В раствор добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до концентрации 240 г/л. Центрифугирование при 5000 об/мин на холоду. (Фракция – 3,1). В супернатант добавляли $(NH_4)_2SO_4$ до концентрации 340 г/л. Осадок от супернатанта отделяли центрифугированием при 5000 об/мин, при 4°C. (Фракция – 3,2). Как видно из рис. 1, фракция – 3,2 использование данного концентрационного интервала $(NH_4)_2SO_4$ приводит к практически полному осаждению пероксидазы из раствора. В результате III этапа получен образец фермента с удельной активностью 112,21 Е/мг белка и параметром $RZ = 0,4$. При последующих этапах фракционирования $(NH_4)_2SO_4$ наблюдались большие потери фермента.

Для повышения чистоты полученных образцов продолжили очистку охлажденным этиловым спиртом. Исследовались возможные объемные соотношения растворов фермента и этилового спирта для дальнейшей очистки. В результате наиболее эффективной оказалась следующая схема:

IV этап. К 1 объему раствора образца пероксидазы с концентрацией 1900–2000 Е/мл приливали по каплям на холоду 1,8 объема этилового спирта. Осадок от супернатанта отделяли центрифугированием при 5000 об/мин при 4°C. (Фракция – 4,1). В супернатант добавляли 4 объема этилового спирта. Осадок центрифугировали. (Фракция – 4,2). В результате 4 этапа получен образец фермента с удельной активностью 285,88 Е/мг белка. $RZ = 0,6$.

V этап. Осадок, полученный в результате очистки на IV этапе, растворяли в дистиллированной воде до концентрации пероксидазы 2200-2340 Е/мл. Далее к 1 объему раствора образца пероксидазы добавляли 2,1 объема этилового спирта, центрифугировали. (Фракция – 5,1). К полученному супернатанту добавляли этиловый

спирт при 4°C в соотношении по объему 1 к 3,4 - (Фракция – 5,2). В результате V этапа получен образец фермента с удельной активностью 557,69 Е/мг белка. R_z = 0,9.

При последующих экспериментах с различными соотношениями добавляемых объемов этилового спирта к растворам фермента не наблюдалось четкого разделения активности между супернатантом и осадком. Степень очистки фермента представлена в табл. 1.

Таблица 1. Очистка пероксидазы из оболочек семени сои.

Образец	Crude-экстракт	Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄			Очистка C ₂ H ₅ OH	
		I этап	II этап	III этап	IV этап	V этап
Активность, Е/мл	31,15	260,40	1578,36	1968,75	2298,31	1861,86
Содержание белка, мг/мл	3,77	10,25	29,63	17,55	8,04	3,38
Удельная активность, Е/мг	8,26	25,41	53,27	112,21	285,88	557,69
Степень очистки	1,00	3,08	6,45	13,58	34,61	67,52

Удельная активность crude-экстракта составила 8,26 Е/мг белка. После I этапа фракционирования удельная активность составила 25,41 Е/мг белка. После II этапа – 53,27 Е/мг. Осаждение сульфатом аммония приводит к повышению удельной активности до 112,21 Е/мг белка после III этапа фракционирования. Образец фермента, полученный после очистки сульфатом аммония, подвергли фракционированию этиловым спиртом. Удельная активность после IV этапа составила 285,88 Е/мг белка. Очистка этиловым спиртом на V этапе приводит к дальнейшему повышению удельной активности фермента до 557,69 Е/мг белка. Полученный после очистки спиртом на V этапе, образец был лиофильно высушен. Электрофорез образцов фермента на различных стадиях очистки представлен на рис. 2.

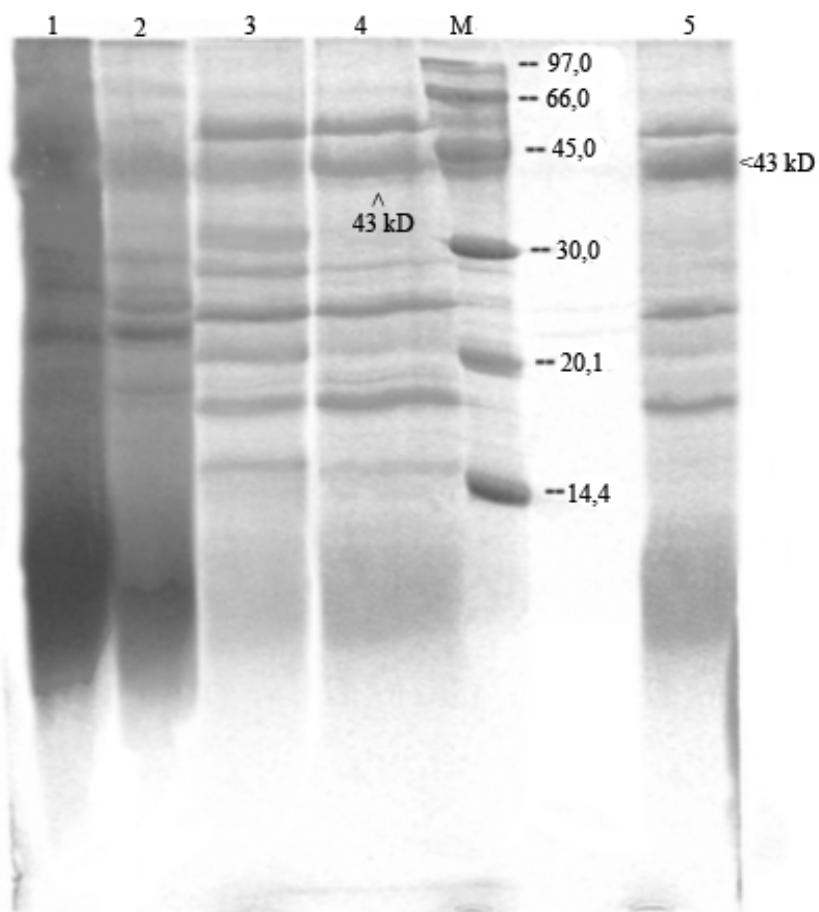


Рисунок 2 - Электрофорез образцов пероксидазы из сои.
 1 – образец *crude*-экстракта; 2 – образец, полученный после I этапа фракционирования $(NH_4)_2SO_4$; 3 – образец, полученный после III этапа фракционирования $(NH_4)_2SO_4$; 4 – образец, полученный после IV этапа очистки C_2H_5OH ; 5 – образец, полученный после V этапа очистки C_2H_5OH ; M – маркер Pharmacia (Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis).

В треках 4 и 5 выявлена ярко выраженная полоса с молекулярной массой 43 kD, характерной для пероксидазы сои при электрофоретическом разделении в денатурирующих условиях[10].

В результате последовательных стадий фракционирования $(NH_4)_2SO_4$ мы достигли степени очистки фермента в 13,58 раза по сравнению с *crude*-экстрактом. На стадии фракционирования этиловым спиртом достигли очистки в 67,52 раза по сравнению с *crude*-экстрактом. Полученный препарат обладал активностью 276 Е/мг и параметром $RZ = 0,9$.

Полученный в результате многостадийной очистки образец фермента изучался на термическую стабильность. Данные по термической стабильности пероксидаз из оболочек сои (SBP) и корня хрена (HRP) отражены на рис. 3.

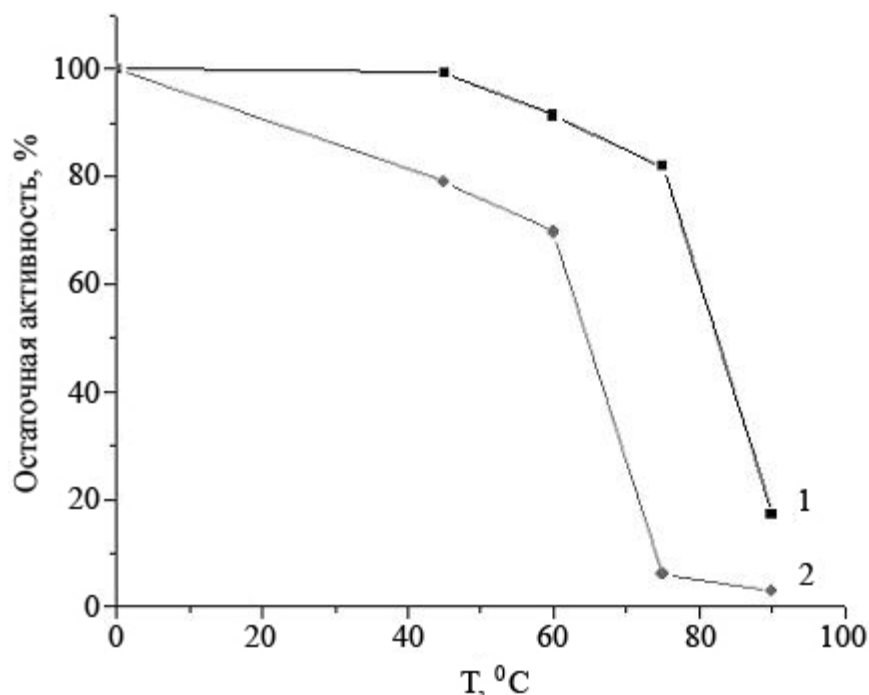


Рисунок 3 - Термическая стабильность растворов пероксидаз, выделенных из различных источников. 1 – пероксидаза из оболочек семени сои. 2 – пероксидаза из корня хрена. Время инкубирования 30 минут.

Как видно из рисунка:

- 1) при 45°C активность HRP падает на 22%, SBP не изменяется.
- 2) при 60°C активность HRP падает на 30%, SBP только на 8%.
- 3) при 75°C активность пероксидазы из хрена падает на 90%, SBP только на 18%.
- 4) при 90°C активность HRP практически полностью падает, а SBP падает на 82%.

Сравнительный анализ термостабильности двух ферментов в водном растворе выявил значительные преимущества пероксидазы из оболочек сои по сравнению с традиционно используемой пероксидазой из корней хрена. Выделенные образцы препарата SBP обладали высокой термической стабильностью, что подтверждает литературные данные[5] и позволяет значительно расширить области применения данного фермента.

Заключение.

В результате проведенных исследований выделен фермент пероксидаза из сои с высокими физико-химическими параметрами (активность – 276 Е/мг, RZ – 0,9). Найдены концентрационные интервалы для фракционирования сульфатом аммония, а также для этапа очистки этиловым спиртом. Разработана методика выделения фермента, технологически выгодная для внедрения в производство, так как использует

отечественное сырье и не требует дорогостоящего оборудования. Проведен ряд экспериментов, которые подтверждают уникальные физико-химические свойства пероксидазы из оболочек семени сои.

Литература

1. Reed G. Oxidoreductases /G. Reed// Enzymes in Food Processing. Academic Press. – USA., 1975. – P. 219 – 253.
2. Brill A.S. Peroxidases and catalases /A.S. Brill// Comprehensive Biochemistry. Elsevier Pub. – USA., 1966. – Vol.14. – P. 447 – 479.
3. Farr, A.G. Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies / A.G. Farr, P.K. Nakane // Journal of Immunological Methods. – 1981. – Vol.47. – P.129 – 144.
4. Hames B.D. Recombinant DNA technology: Polymerase chain reaction / B.D. Hames et al.// Instant notes of Biochemistry. Bios Scientific Publishers. – 1997. – Vol. 16. – P.213 – 217.
5. Henriksen A. Structure of soybean seed coat peroxidase: A plant peroxidase with unusual stability and haem-apoprotein interactions / Henriksen A. et al. // Protein Science. – 2001. – Vol.10. – P. 108 – 115.
6. Biochemicals for the Diagnostic Industry 1999/2000. // Roche Molecular Biochemicals. - 8th edition. – P. 131 – 293.
7. Watanabe N. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer / N. Watanabe et al. //Clin. Chem. – 1986. – Vol.32. – P.1551 – 1554.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 /U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol.227. – P.680 – 685.
9. Kenten R.H. A simple method for the preparation of horseradish peroxidase / R.H. Kenten, P. J.G. Mann //Biochem. J. – 1954. – Vol.57. – P .347 – 348.
10. Gijzen M. Soybean seed coat peroxidase: A comparison of high-activity and low-activity genotypes / M. Gijzen et al. // Plant Physiol. – 1993. – Vol.103. – P. 1061 – 1066.