

УДК 595.3.574

Д. В. ГЛАДУН, Н. Г. РАКША, О. М. САВЧУК, Л. І. ОСТАПЧЕНКО

*Навчально-науковий центр «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка*

## АНТАРКТИЧНІ МОРСЬКІ ГІДРОБІОНТИ – НОВІ ПЕРСПЕКТИВНІ ДЖЕРЕЛА ОТРИМАННЯ ГІДРОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ

*Морські організми Антарктичного регіону є досить малодослідженими і потенційно можуть містити широкий спектр біологічно активних речовин. Нами було проаналізовано загальний білковий склад екстрактів тканин гідробіонтів та модифіковано декілька методичних підходів до ідентифікації цільових ензимів і тестування їх активності. Показана можливість застосування антарктичних морських гідробіонтів як потенційної сировини для одержання гідролітичних ферментів.*

*Ключові слова:* білки; гідролітичні ферменти; антарктичні гідробіонти

### ВСТУП

Дефіцитність та обмеженість традиційних ресурсів сировини, їх значна собівартість у поєднанні з посиленням попиту на продукцію фармакологічної індустрії внаслідок зростання економічного, соціального, психологічного навантаження на населення актуалізує пошук нових альтернативних джерел сировини з метою створення на їх основі нових препаратів.

У даному контексті увагу дослідників привертають морські організми, зокрема, безхребетні, які на відміну від багатьох наземних форм характеризуються значним різномайттям продуктів життєдіяльності, переважна більшість яких має виражену біологічну активність [5]. Подібна ситуація зумовлює значний інтерес з точки зору методологічних підходів до виділення з тканин гідробіонтів різноманітних молекул з біологічною активністю. Незважаючи на те, що на сьогодні значна кількість морських організмів є достатньо вивченою за своїм біохімічним складом, все ще залишаються недостатньо досліджені групи організмів, особливо в Антарктичному регіоні.

Певний практичний інтерес з точки зору біохімії, фармакології та біотехнології становить білковий склад морських антарктичних гідробіонтів. Результати ряду експериментальних та клінічних досліджень переконливо свідчать про виражений протизапальний, імуномодулюючий, антипухлинний, антимікробний, цитостатичний, гепатопротекторний ефект пептидів. Особливо цінними для виробництва є гідролітичні ферменти, оскільки процес гідро-

літичного розщеплення широко використовується людиною у різних галузях промисловості. Ферменти морських організмів потенційно можуть зберігати свою активність та стабільність досить тривалий час незалежно від різких змін умов навколишнього середовища.

У нашій роботі досліджувалась можливість застосування морських гідробіонтів Антарктичного регіону як альтернативного джерела для одержання гідролітичних ферментів. Для цього було модифіковано декілька методичних підходів з метою ідентифікації цільових ензимів і тестування їх ферментативної активності.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для аналізу якісного складу досліджуваних екстрактів використовували метод одновимірного диск-електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію згідно зі стандартним протоколом [7]. Для ідентифікації потенційної гідролітичної активності було застосовано метод ензим-електрофорезу в 12 % поліакриламідному гелі з заполімеризованим у розділяючий гель желатином (1 мг/мл) [8]. Одержані електрофореграми аналізували з використанням програми TotalLab v2.01. Наведені у роботі електрофореграми є типовими для серії повторних дослідів (не менше трьох у кожній серії) [3, 4].

Загальну гідролітичну активність визначали у відповідності з методом [9], використовуючи як субстрат 4 % розчин казеїну. Для визначення амілолітичної активності застосовували крохмаль. Амідазну та естеразну активність оцінювали, використовуючи, відповідно, субстрати БАПНА (Na-benzoyl-DL-arginine-

© Гладун Д. В., Ракша Н. Г., Савчук О. М., Остапченко Л. І., 2015

## МОЛЕКУЛЯРНІ МАСИ БІЛКІВ У ЕКСТРАКТАХ ТКАНИН МОРСЬКИХ ГІДРОБІОНТІВ (КДА)

Actinaria	Adamussium colbecki	Odontaster validus	Sterechinus neumayer	Glyptonotus antarcticus	Euphausia superba
157,65	157,65	153,60	154,95	154,95	153,60
144,17	144,17	137,43	141,47	141,47	140,13
132,04	130,69	129,34	125,30	122,60	125,30
119,91	121,26	121,26	99,69	106,43	107,78
102,39	110,47	113,17	86,62	75,50	98,34
69,31	79,52	91,03	74,20	69,31	74,20
50,44	61,20	85,17	49,17	57,25	67,07
47,30	47,65	76,82	45,63	50,89	48,39
43,73	44,36	67,07	36,93	45,96	46,28
39,48	35,85	49,17	33,13	37,76	42,18
34,57	32,90	46,28	25,81	32,90	31
33,13	29,55	38,32	22,54	31,19	28,74
25,93	23,74	32,02	21,34	27,72	26,17
21,96	20,33	28,44	19,97	22,25	21,96
15,02	6,916	20,84	16,06	15,23	18,86
4,614	4,422	16,88	4,038	5,76	13,24
		3,84		4,03	9,41

p-nitroanilid) та TAME (Na-tosyl-L-arginine methyl ester). Кількісний вміст білка визначали спектрофотометрично за методом Бредфорд, використовуючи як стандарт бичачий сироватковий альбумін [6].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм Excel [1, 2].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідженнях були використані заморожені маси морських антарктичних гідробіонтів: кріля (*Euphausia superba*), морської зірки (*Odontaster validus*), гігантської ізоподи (*Glyptonotus antarcticus*), антарктичного морського їжака (*Sterechinus neumayer*), антарктичного морського гребінця (*Adamussium colbecki*) та актинії (*Actinaria*), які були заготовлені в експедиційних умовах і у замороженому вигляді доставлені в

лабораторію. Вихідна маса заморожених тканин гідробіонтів зважувалась та гомогенізувалась з послідовним додаванням рідкого нітрогену та екстрагуючого буфера – 0,1 М Na-фосфатного буфера, рН 7,4, який містив 0,15 М NaCl, 0,15 мМ ЕДТА, 0,1 % Тритон X-100 та 2 мМ ПМСФ. Зразки центрифугували впродовж 60 хв, 10000g при 4 °C. Надосадову рідину відбирали та висушували на ліофільній сушарці для оптимізації умов зберігання.

З метою аналізу білкового складу ми проводили електрофоретичне розділення зразків тканин вищеперерахованих гідробіонтів за допомогою методу одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію. На рис. 1 представлено типову електрофореграму розділення екстрактів тканин морських гідробіонтів. Наявність значної кількості білкових смуг у всіх треках свідчить про доволі різноманітний білковий склад досліджуваних безхребетних. Так, було ідентифіковано від 15 до 18 білкових смуг на треку у залежності від виду гідробіонта.

Подальший якісний аналіз електрофореграм з використанням програми TotalLab виявив присутність білкових фракцій в діапазоні молекулярних мас від 3 до 150 кДа (табл. 1).

Стрімке зростання попиту на використання препаратів, активною діючою складовою яких є гідролітичні ферменти, актуалізує проблему пошуку нових економічно обґрунтованих природних джерел сировини, а також розробку ефективних підходів до швидкого скринінгу, отримання та очистки цільових молекул з вираженою ферментативною активністю. Оскільки гідролітичні ферменти морських гідробіонтів характеризуються вищою активністю та нижчою собівартістю порівняно з ферментами рослинного та тваринного походження, це дозволяє розглядати їх як перспективну сировинну базу. Вивчення структури і

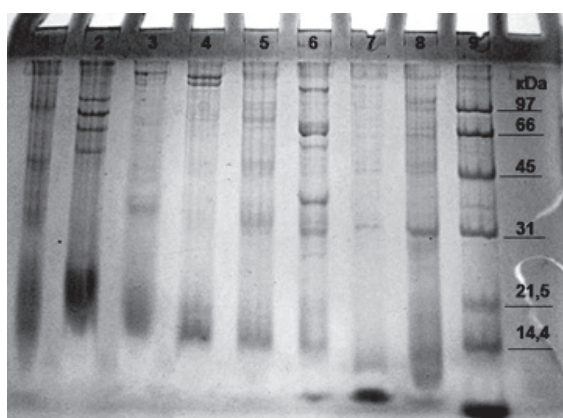


Рис. 1. Електрофореграма розділення білків екстрактів тканин морських гідробіонтів:

- 1 – Actinaria; 2 – Parborlasia corrugatus;  
3 – Adamussium colbecki; 4 – Odontaster validus;  
5 – Sterechinus neumayer; 6 – Glyptonotus antarcticus;  
7, 8 – Euphausia superba; 9 – маркери молекулярних мас (97, 66, 45, 31, 21,5, 14,4 кДа).

## ГІДРОЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЕКСТРАКТІВ ТКАНИН МОРСЬКИХ ГІДРОБІОНТІВ

Гідробіонти	Казеїнолітична активність, К.од/мг білка	Амілолітична активність, Од/мг білка	Естеразна активність, Од/мг білка	Амідазна активність, мкмоль п-нітроаніліну/хв X мг білка
<i>Adamussium colbecki</i>	23,6	1,23	10,6	4,2
<i>Sterechinus neumayer</i>	9,7	1,46	8,1	6,2
<i>Odontaster validus</i>	15,5	1,46	13,8	7,5
<i>Glyptonotus antarcticus</i>	6,93	0,67	4,97	1
<i>Euphausia superba</i>	25,7	1,14	41,6	124,4
<i>Actinaria</i>	18,09	1,46	5,78	14,3

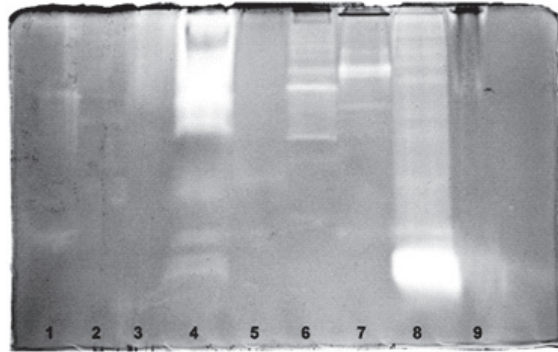
каталітичних властивостей ферментів морських безхребетних дозволить більш раціонально використовувати добуту сировину для отримання ферментних препаратів з метою та їх подальшого застосування в медицині, фармакології, легкій та харчовій галузях промисловості.

Присутність у досліджуваних нами екстрактах білків з різними молекулярними масами дозволяє припустити існування функціонально активних молекул. Виходячи з цього, доцільним видається протестувати одержані нами екстракти тканин гідробіонтів на предмет наявності активних гідролаз. Для цього ми проводили ензим-електрофоретичне розділення з використанням як субстрату желатину, що дозволило ідентифікувати ферменти підкласу протеїназ (рис. 2). Так, поява у площині гелю певної кількості виражених активних зон вказує на присутність у всіх проаналізованих зразках гідробіонтів активних форм ферментів різної молекулярної маси.

З метою деталізації інформації щодо ферментного профілю екстрактів тканин морських гідробіонтів нами були використані різні субстрати. Спочатку ми визначали казеїнолітичну активність, яку можна розглядати як загальну протеолітичну активність. Отримані результати (табл. 2) в цілому узгоджуються з даними ензим-електрофорезу та свідчать про достатньо високий протеолітичний потенціал всіх досліджуваних об'єктів, особливо, *Adamussium colbecki* та *Euphausia superba*.

Трипсиноподібну активність виявляли за допомогою субстратів ТАМЕ та БАПНА, що дозволило нам оцінити, відповідно, естеразну та амідазну активність. У відповідності з результатами, представленими у табл. 2, для більшості гідробіонтів ефективність гідролізу ефірного субстрату була значно вищою. Виключення становить *Euphausia superba*, для якого трипсиноподібна активність щодо субстрату БАПНА була майже втричі вищою у порівнянні з активністю щодо ТАМЕ. Виявлені нами відмінності, ймовірно, можна пояснити особливостями харчової бази проаналізованих гідробіонтів та різним способом життя.

Недивлячись на те, що наші дослідження активності та специфічності гідролітичних ферментів морських безхребетних носять попередній характер, пер-



**Рис. 2.** Ензим-електрофореграма екстрактів тканин гідробіонтів: 1 – трипсин (24 кДа); 2 – плазмін (85 кДа); 3 – колагеназа (120 кДа); 4 – *Adamussium colbecki*; 5 – *Sterechinus neumayer*; 6 – *Odontaster validus*; 7 – *Glyptonotus antarcticus*; 8 – *Euphausia superba*; 9 – *Actinaria*.

спективним є подальше отримання і характеристика окремих білкових фракцій, відповідальних за прояв певного виду ферментативної активності з метою подальшого вивчення структурно-функціональних та каталітичних властивостей ферментів гідробіонтів Антарктичного регіону. Досліджені морські антарктичні організми можуть бути використані як сировина для створення нових оригінальних біотехнологічних та фармакологічних продуктів на основі гідролітичних ензимів.

## ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано білковий склад екстрактів тканин морських антарктичних гідробіонтів та доведено присутність у екстрактах тканин всіх досліджуваних безхребетних гідролітичної активності (амілолітичної та трипсиноподібної).
2. Отримані результати свідчать про можливість застосування досліджуваних морських організмів як потенційного джерела сировини для виділення гідролітичних ферментів з цільовою активністю.

## ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

2. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
3. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. – М.: Медиа-Сфера, 2006. – 312 с.
4. Сергиенко В. И., Бондарева И. Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 304 с.
5. Bioorganic Marine Chemistry. VI-II / Ed. P. J. Sheuer. – Berlin – Heidelberg – New York: Springer-Verlag, 1986-1988.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 86. – P. 193-200.
7. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 1. – P. 680-685.
8. Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active componenets of hemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasileva // Advances in Biosci. and Biotechnol. – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 20-26.
9. Robbins V. Plasminogen and plasmin / V. Robbins, L. Summaria // Methods in Enzymol. – 1976. – Vol. 46. – P. 257-273.

#### УДК 595.3.574

Д. В. Гладун, Н. Г. Ракша, А. Н. Савчук, Л. И. Остапченко

#### АНТАРКТИЧЕСКИЕ МОРСКИЕ ГИДРОБИОНТЫ – НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Морские животные Антарктического региона мало исследованы и могут содержать широкий спектр биологически активных веществ. Нами было проанализировано общий белковый состав экстрактов тканей гидробионтов, модифицировано несколько методических подходов для идентификации целевых энзимов и тестирования их активности. Показана возможность применения антарктических морских гидробионтов в качестве сырья для получения гидролитических ферментов.

**Ключевые слова:** белки; гидролитические ферменты; антарктические гидробионты

#### UDC 595.3.574

D. V. Gladun, N. G. Raksha, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko

#### ANTARCTIC MARINE ORGANISMS ARE NEW PERSPECTIVE SOURCE OF HYDROLYTIC ENZYMES

Marine Antarctic organisms are little explored and potentially may include a wide range of biologically active substances. We have analyzed the total protein composition of tissues extracts of marine hydrobionts, were modified several methodological approaches for the identification of the target enzymes and determination their activity. The possibility of use of Antarctic marine hydrobionts as a raw material for obtaining hydrolytic enzymes was showed.

**Key words:** proteins; hydrolytic enzymes; Antarctic hydrobionts

Адреса для листування:  
01033, м. Київ, вул. Володимирська, 60.  
ННЦ «Інститут біології»

Надійшла до редакції 30.10.2015 р.