



УДК 543

Исследование углеводного компонента в кератиновом гликопротеине методами гель-хроматографии и ИК-спектроскопии

Шамханов Ч.Ю.¹, Антипова Л.В.², Селеменев В.Ф.³

¹- Грозненский государственный нефтяной технический университет, Грозный

²- Воронежская государственная технологическая академия, Воронеж

³- Воронежский государственный университет, Воронеж

Поступила в редакцию 28.01.2010 г.

Аннотация

Физико-химическими и биологическими методами определено, что основным продуктом ферментативного гидролиза кератинового (перо-пухового) сырья являются гликопротеины с молекулярной массой до 3 000 Да. Фракция № 9 одновременно дает реакции на биуретовую связь, нингидрин, тирозин а также редуцирующие вещества. Подобная характеристика предполагает возможную непосредственную связь между углеводной и белковой частями в составе единого комплекса.

Ключевые слова: гликопротеины, гель-хроматография, ИК-спектроскопия, углеводы, белки

It is determined by physical and chemical and biological methods, that the basic product fermentation hydrolysis keratin raw material are glycoproteins with molecular weight up to 3000 Da. The fraction № 9 simultaneously gives reactions on biuret connection, ninhydrin, tyrosine and also reducing substances. The similar characteristic assumes possible direct connection between carbohydrate and albuminous parts in structure of uniform complex.

Keywords: glycoproteins, gel chromatography, IR-spectroscopy, carbohydrates, proteins

Введение

Комплексное использование физико-химических и биохимических методов дает возможность получить взаимодополняющие данные, позволяющие развить более углубленные и объективные представления о структуре, конформации, свойствах и функциях биополимеров, в том числе и белков [1]. Уникальные биологические функции и технологическое значение белков в производстве продуктов питания тесно связаны с особенностями их химического строения и пространственной структурой. Высокой жирудерживающей способности керопептид обязан прежде всего присутствию в своем составе аминокислот с гидрофобными R-группами: изолейцин (21,97 мас.%), лейцин (16,98 мас.%), валин (4,97 мас.%) и аланин (2,09 мас.%). Значительная водоудерживающая способность керопептида как пищевой белковой добавки возможно объясняется наличием как гидрофильных R-групп части аминокислот, так и остатками полисахаридов [2].

Теоретическая часть

Достаточно большое количество разнообразных фактов по исследованию кератинов дает возможность предполагать некоторую структуру кератинового пептида. Качественный состав белковой цепи представлен всеми известными аминокислотами, некоторые фрагменты последовательности аминокислот общеизвестна (цистеин-цистеин-глутаминовая кислота-пролин-серин) [3]. Доказательство наличия углеводного компонента предполагает, что продуктами ферментативного гидролиза кератина пера препаратом «Савиназа» являются гликопротеины.

Эксперимент

Существуют различные методы определения молекулярной массы белков. В связи с этим при определении молекулярных масс белков предпочтительнее использовать статистические методы, когда белковый раствор находится в состоянии равновесия, например путем его пропускания через колонку, заполненную гелем [4].

Для определения молекулярной массы белковых компонентов кератинового гидролизата применяли метод гель-фильтрации [5]. Для его проведения использовали сефадекс G-100 (средний, диаметр частиц 40-120 мкм) с пределами фракционирования 4 000-150 000 Дальтон (Да) (Дальтон – масса одного атома водорода, равная $1,66 \times 10^{-24}$ грамма) [6].

Колонку размерами 46,0×1,9 см заполняли сефадексом, обработанным 0,02 М универсальным буфером с рН 7,0. Наносили на нее 1,5 см³ раствора (7 мг/см³) кератинового гидролизата и элюировали тем же 0,02 универсальным буфером (рН 7,0) со скоростью 12 см³/ч. Собирали фракции по 3 см³ и затем определяли в них содержание белка спектрофотометрически на СФ-46 при 280 нм. Для определения молекулярной массы фракций кератинового гидролизата колонку с сефадексом предварительно проградуировали в тех же условиях при помощи нескольких чистых (маркерных) белков с известной молекулярной массой (табл.1). Калибровочную кривую строили, используя линейную зависимость между логарифмом молекулярной массы и объемом элюата V_e , вышедшего с колонки.

Таблица 1. Некоторые физико-химические характеристики маркерных белков

Наименование маркерных белков	Молекулярная масса (М), Да	Lg M	Объем элюции V_e , см ³
1. Лизоцим	13 930	4.143	54
2. Трипсин	25 700	4.409	48
3. Пероксидаза	34 000	4.531	45
4. Бычий альбумин	68 000	4.832	36
5. Голубой декстран	2 000 000	6.301	21
6. Водорастворимая фракция керопептида	< 10 000	2.845	72

Водорастворимая фракция кератинового гидролизата (рис. 1) выходит с колонки в объеме $V_e = 72$ см³ ($\lg M = 2,845$), что значительно ниже объема элюции для маркерного белка лизоцима ($V_e = 54$ см³) с наименьшей молекулярной массой – 13 930 Да. Следовательно, в кератиновом гидролизате (керопептиде) отсутствуют

белковые фракции с молекулярной массой выше 13 930 Да. Ориентировочная масса продуктов гидролиза находится ниже уровня 10000 Да, определяемого методом гель-фильтрации на сефадексе G-100 маркерными белками.

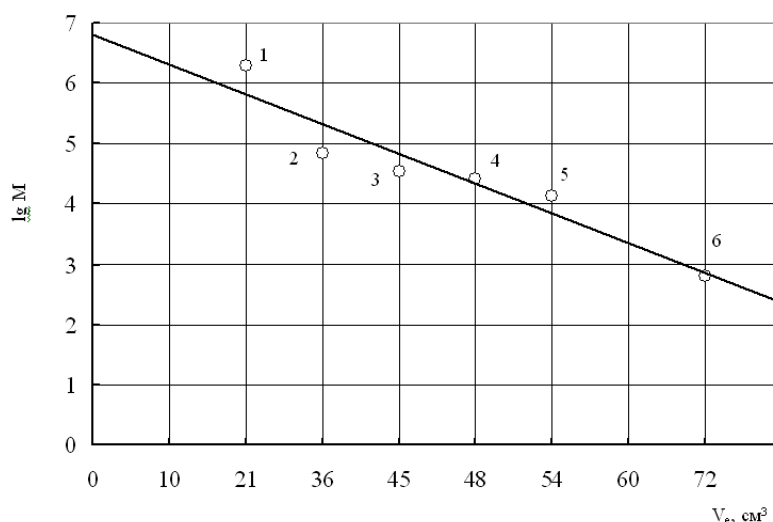


Рис. 1. Линейная зависимость между логарифмом молекулярной массы ($\lg M$) белков и объемом элюата (V_e), вышедшего с колонки: 1 - голубой декстран; 2 - бычий альбумин; 3 - пероксидаза; 4 - трипсин; 5 - лизоцим; 6 - водорастворимая фракция керопептида

В связи с отсутствием маркерных белков в исследуемом диапазоне от 10 000 до 5 000 Да поиск фракции водорастворимого белка осуществляли при помощи пористых мембран марок УПМ-100 и УАМ-50 на лабораторной ультрафильтрационной установке (ЗАО НПО «Техкон»). Схема включала в себя саму установку с 5 %-ым раствором керопептида, помещенную для его постоянного перемешивания на магнитную мешалку. Для эффективного разделения белкового раствора в верхнюю часть установки под давлением подавали сжатый воздух. Продукты гидролиза проходили через пористые мембраны, поочередно сменяемые в зависимости от желаемой молекулярной массы ультрафильтрата в нижнюю часть установки и собирались в приемную емкость. В полученных ультрафильтратах определяли ряд биохимических показателей, позволяющих оценить распределение продуктов гидролиза по молекулярной массе (табл. 2).

Таблица 2. Биохимические показатели молекулярных фракций керопептида

Молекулярная масса фракций, Да	Растворимый белок и пептиды, мг/см ³	Суммарные пептиды и аминокислоты, мкг/см ³	Тирозин, мкмоль/см ³	РВ, мкг/см ³
0-10 000	5.64	7337	7.835	2815
0-5 000	4.21	5278	5.960	2272
в %, от исходной	74.6	71.9	76.1	80.7

Как показали результаты исследований в керопептиде присутствуют низкомолекулярные белки с массой в диапазоне 5000-10000 Да. Их массовая доля оценивается как разница в показаниях для фракций 0-10000 и 0-5000 Да (5,64 минус 4,21) и составляет 1,43 мг/см³. Эта фракция дала также положительную реакцию на нингидриновую реакцию (2059 мкг/см³), тирозин (1,875 мкмоль/см³) и

редуцирующие вещества (543 мкг/см^3). Однако основная доля продуктов гидролиза сосредоточена в более низкомолекулярной фракции с массой менее 5000 Да , соответствующей по существующей классификации фракции пептидов. Массовая доля всех исследуемых показателей находится в ней на уровне более 70% от аналогичных значений во фракции $0-10000 \text{ Да}$.

В связи с этим дальнейшее определение молекулярной массы водорастворимых белковых фракций керопептида проводили на сефадексе G-25 (средний, диаметр частиц $50-150 \text{ мкм}$), позволяющим устанавливать ее в пределах фракционирования $1\ 000-5\ 000 \text{ Да}$. Условия проведения гель-фильтрации оставались неизменными. По результатам определения белка во фракциях строили профиль элюции (рис. 2). Во всех фракциях помимо белка находили содержание низкомолекулярных веществ нингидриновым методом, тирозин и редуцирующие вещества (РВ), а также количественное распределение белковых фракций.

Как показали результаты гель-фильтрации раствора керопептида через сефадекс G-25, белок обнаруживается в виде двух небольших пиков практически в первых же фракциях. Массовая доля белка во фракциях № 1-8 ($V_e = 3-24 \text{ см}^3$) имеет достаточно высокие значения и составляет $0,12-0,18 \text{ мг/см}^3$ (кривая 1).

Основная масса продукта выходила с колонки в виде максимального пика белка объемом 27 см^3 элюата (фракция № 9, по 3 см^3 элюата). Массовая доля белка в этой фракции зарегистрирована на уровне $0,66 \text{ мг/см}^3$, что в 3-4 раза выше его содержания в остальных исследуемых фракциях.

Дальнейшая элюция керопептида в диапазоне объемов $36-96 \text{ см}^3$ выявила три пика с понижением в них массовой доли белка не более $0,08 \text{ мг/см}^3$. Полностью раствор керопептида элюируется в конечном объеме 96 см^3 .

Во фракции № 9 было обнаружено все содержание имеющихся в наличии РВ массовой долей 66 мкг/см^3 (кривая 4). Нингидриновая реакция применялась нами при гель-хроматографии для идентификации распределения продуктов гидролиза по молекулярной массе. Она выявила, что при взаимодействии избыточного количества нингидрина и белковых продуктов со свободной NH_2 -группой и в зависимости от количества этих групп можно определить местонахождение белковых производных при элюции через сефадекс. Так, например, низкая массовая доля нингидрина ($4-6 \text{ мкг/см}^3$) весьма точно отражает количество свободных аминогрупп и определяет нахождение высокомолекулярных пептидов ($3\ 000-5\ 000 \text{ Да}$) во фракциях № 1-8 (кривая 2). Следует напомнить, что в диапазон измерения молекулярной массы продуктов гидролиза менее $5\ 000 \text{ Да}$ входят только пептиды и аминокислоты. При больших концентрациях белка (фракция № 9) соответственно увеличивается окрашивание его свободных аминогрупп нингидрином- 64 мкг/см^3 . Этот диапазон элюции характеризует наличие в этих фракциях (№ 8-12) среднемолекулярных пептидов с массой $300-3\ 000 \text{ Да}$. Логарифм молекулярной массы керопептида ($\lg 2,845$), определяемый с помощью маркерных белков по калибровочной кривой, также указывает на его ориентировочную массу не менее 700 Да .

Дальнейший анализ профиля элюции по нингидриновой пробе (фракции № 12-36) выявил пик, не соответствующий его концентрации по белку, как наблюдалось для пептидов в предыдущих фракциях. Массовая доля низкомолекулярных веществ во фракции № 23 составила 157 мкг/см^3 , что более 2 раза превышает аналогичный показатель для пептидов во фракции № 9. Обратная пропорциональная зависимость показателей белка и нингидриновой пробы во фракциях № 9 и № 23 указывает по качественному анализу на присутствие в последней фракции продуктов гидролиза в виде свободных аминокислот.

Принадлежность к ней и аминокислоты тирозина ($0,06 \text{ мкмоль/см}^3$) является еще одним доказательством высказанного положения.

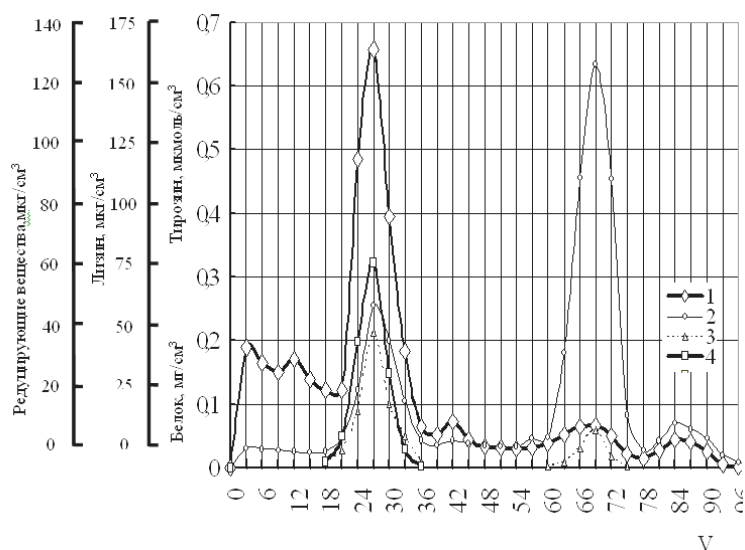


Рис. 2. Гель-хроматограмма ферментативного кератинового гидролизата через сефадекс G – 25: 1 – белок; 2 – нингидриновая проба; 3 – тирозин; 4 – редуцирующие вещества; V – объем элюции, см^3

ИК-излучение применяли для выявления функциональных групп углеводных компонентов в кератиновых пептидах, полученных ферментативным гидролизом препаратом «Савиназой». Подготовку образцов для снятия ИК-спектров проводили следующим образом: монокристаллический KBr растирали в агатовой ступке и высушивали в термостате при температуре $160 \text{ }^\circ\text{C}$ до полного удаления следов воды. Исследуемые образцы, высушенные при комнатной температуре, растирали в агатовой ступке до состояния пудры (размером $0,05 \text{ мкм}$) и смешивали там же с предварительно подготовленным KBr (150 мг бромистого калия и $1,5 \text{ мг}$ образца) в течение 10 мин . Полученную смесь в количестве 100 мг прессовали под давлением 150 кгс/см^2 в течение 30 мин . [7]. Прозрачная прессованная таблетка размерами $25 \times 4 \times 0,5 \text{ мм}$ с держателем помещалась в рабочий канал спектрографа ИК-спектрометра с Фурье преобразователем «ИнфраЛЮМ-ФТ-02». Спектрограмму снимали в области частот от 4000 до 400 см^{-1} и $1800 - 1400 \text{ см}^{-1}$, где в основном находятся частоты поглощения интересующих групп.

Обсуждение результатов

Гель-фильтрация кератинового гидролизата через сефадексы G-100 и G-25 свидетельствует о наличии в нем низкомолекулярного (менее 10000 Да) растворимого белка, составляющего 25% от его общего количества в гидролизате. Преобладающая часть белковых продуктов (75%) представлена среднемолекулярными пептидами (диапазон $300-3000 \text{ Да}$) с ориентировочной массой не менее 700 Да . В данном случае предполагается длина белковых цепочек, содержащих от 5 до 20 аминокислотных остатков. Важно подчеркнуть, что фракция № 9 одновременно дает реакции на биуретовую связь, нингидрин, тирозин а также редуцирующие вещества. Подобная характеристика предполагает возможную

непосредственную связь между углеводной и белковой частями в составе единого комплекса. Полученные также электрофоретические данные фракции № 9 дают основание полагать о комплексной природе керопептида, включающего наряду с белковой и полисахаридный фрагмент.

Спектры поглощений фракции № 9 (рис. 3) свидетельствуют о следующем [8]: появление нового пика при 868 см^{-1} по сравнению с предыдущими анализами кератиновых продуктов говорит о том, что это валентные колебания (типа 2 – более перпендикулярные колебания по отношению к цепи) в фрагментах пиранозного кольца сахаридов с возможной мутаротацией гликозидного остатка (оптическое вращение, переход из D- в L-форму) без разрыва связей; появление еще одного нового пика при 977 см^{-1} также указывает на пульсационные (либрационные) колебания пиранозного кольца в сахаре (типа 1 – перпендикулярно или параллельно цепи). Полученные данные после гель-фильтрации кератинового гидролизата свидетельствуют о нахождении в исследуемом продукте полисахаридного компонента. Это положение подтверждается валентными колебаниями в гликозидных остатках групп C-O, C-C, кольцевых структур или деформационные колебания CH_2 -групп при поглощениях 1105 см^{-1} и симметричными колебаниями C=O в COOH-группах или кетонных группах при 1713 см^{-1} . Колебания 741 см^{-1} и 1361 см^{-1} характеризуют связь C-N между белком и гликозидным остатком. И, наконец, валентные колебания при $3100\text{--}3500\text{ см}^{-1}$ четко определяют наличие связи между водой и гликозидными группировками, так как белки не дают такого спектра непрерывного поглощения света (связь белок - вода дает четко выраженные отдельные пики спектров). Спектры поглощений, выявленные ранее для белковых компонентов (рис. 4), сохранили свои значения при анализе очищенного гидролизата (фракция № 9) в неизменном состоянии (рис. 3).

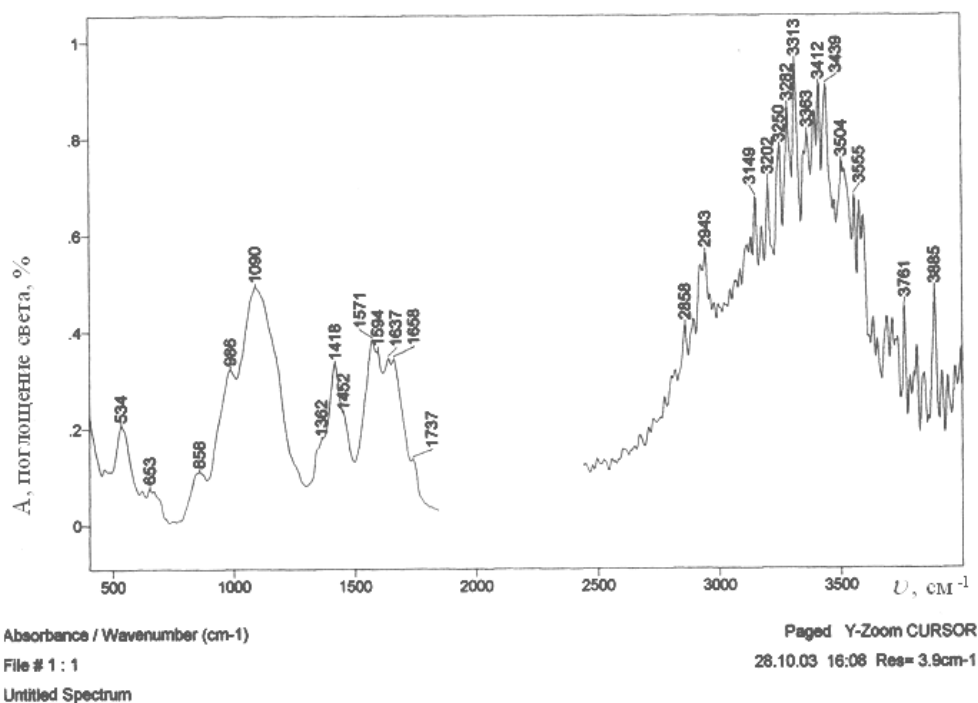


Рис. 3. ИК-спектрограмма фракции № 9 (таблетка с KBr)

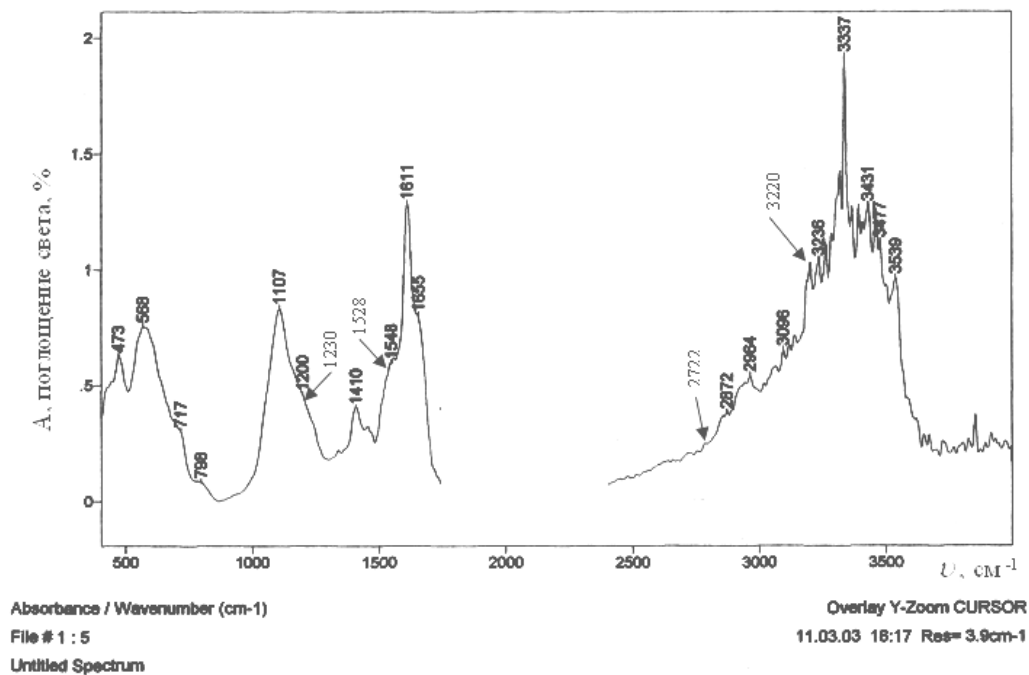


Рис. 4. ИК-спектр ферментативного кератинового гидролизата

Спектр самого ферментного препарата «Савиназы» снимали для учета возможного наложения полос поглощения его белкового компонента на характеристики кератиновых продуктов (рис. 5). Полученные результаты не влияют на спектры поглощений кератиновых гидролизатов и свидетельствуют о составе аминокислот (серин-гистидин-аспарагин), входящих в активный центр фермента – эндопротеиназы серинового типа из алкалофильного вида микроорганизма *Vacillus* фирмы «Ново-Нордиск» (Дания).

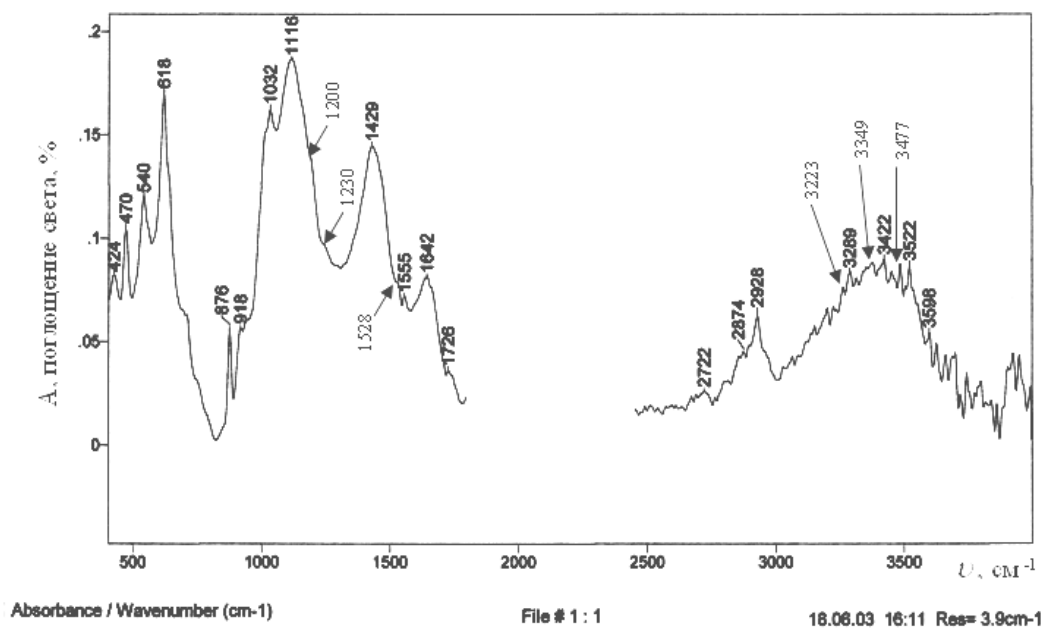


Рис. 5. ИК- спектр ферментного препарата «Савиназы»

Молекулярный спектральный анализ очищенного на сефадексе G-25 керопептида в виде фракции № 9 окончательно подтвердил все предыдущие предположения о существовании прочной связи между белковой и углеводной частями в составе единого комплекса – кератинового гликопротеина.

Заключение

Таким образом, различными физико-химическими и биологическими методами [4,5,7] определено, что основным продуктом ферментативного гидролиза кератинового сырья являются гликопротеины. Высокие функционально-технологические свойства керопептида в различных биологических средах обеспечиваются структурными особенностями его белково-углеводного комплекса [1,2].

Список литературы

1. Шамханов Ч.Ю., Антипова Л.В., Осминин О.С. Регулирование функциональных свойств кератиновых белков при их гидролизе ферментными препаратами // Успехи современного естествознания. – 2003. - № 3. - С. 81.
2. Антипова Л.В., Пашенко Л.П., Шамханов Ч.Ю., Курилова Е.С. Получение и характеристика пищевого кератинового гидролизата // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2003. – № 7. – С. 63-66.
3. Зенгбуш П. Молекулярная и клеточная биология: Пер. с нем.-М.: Мир, 1982.-В 3-х томах.-1150 с.
4. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
5. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии: Учебное пособие для студентов биологических специальностей университетов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1980. – 272 с.
6. Нечаев А.П. и др. Пищевая химия (3-е изд. перераб. и доп.) : Уч. пос. для Вузов. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 640 с.
7. Углянская В.А., Чикин Г.А., Селеменев В.Ф., Завьялова Т.А. Инфракрасная спектроскопия ионообменных материалов. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1989. – 208 с.
8. Сапронов А.Р., Колчева Р.А. Красящие вещества и их влияние на качество сахара. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 347 с.

Шамханов Чингисхан Юсупович – д.т.н., профессор кафедры «Технологии продуктов питания» Грозненского государственного нефтяного технического университета, Чеченская республика, Грозный

Антипова Людмила Васильевна – д.т.н., профессор, зав. кафедрой «Кафедра пищевой биотехнологии и переработки животного и рыбного сырья, Воронежский университет инженерных технологий, заслуженный деятель науки РФ, Воронеж

Селеменев Владимир Федорович – д.х.н., профессор, зав. каф. аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел.(473)220-89-32

Shamhani Genghis Yu. - Professor of the Department "Technology of food products" Grozny State Oil Technical University, the Chechen Republic, Grozny

Antipova Lyudmila V. - the professor, head of the department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh

Selemenev Vladimir F. – the professor, head of department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: common@chem.vsu.ru