

На правах рукописи



Заболоцкая Елена Романовна

**ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ СУБСТАНЦИЙ ИЗ
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Санкт-Петербургском государственном технологическом институте (техническом университете)

Научный руководитель:

Виноходов Дмитрий Олегович, доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой Молекулярной биотехнологии Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета)

Официальные оппоненты:

Глазова Наталья Владимировна, кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета

Шемарова Ирина Владимировна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории функциональной биохимии мышц Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита состоится «28» января 2021 года в 14.00 на заседании диссертационного совета У.03.01.06 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» по адресу: 194021, Санкт-Петербург, Новороссийская ул., д.48, ауд. 201

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого по адресу: 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая 29 и на сайте ФГАОУ ВО «СПбПУ» www.spbstu.ru

Автореферат разослан « _____ » _____ 2020 года

Учёный секретарь
диссертационного совета



Аронова Е.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений современной биотехнологии. Ферментные препараты широко используются во многих отраслях промышленности: медицинской, микробиологической, парфюмерной, сельскохозяйственной и других. Особое значение в настоящее время приобретает получение лекарственных средств на основе ферментов из животного сырья, которые могут успешно заменить препараты аналогичного действия, производимые путем химического и микробиологического синтеза. Гидролитические ферменты имеют ряд особенностей, выгодно отличающих их от другого вида ферментных препаратов: высокая эффективность в микроколичествах, высокая специфичность, быстрое достижение желаемого результата, возможность создания на их основе продуктов с заданными свойствами.

В настоящее время сохраняется потребность в препаратах высокоочищенных протеаз поджелудочной железы – трипсина (ТС) и химотрипсина (ХТС). Оба фермента обладают высокой протеолитической активностью, воздействуют только на некротическую ткань, не оказывая литического действия на живые клетки вследствие наличия в них специфических ингибиторов. Нуклеазы поджелудочной железы – рибонуклеаза (РНКаза) и дезоксирибонуклеаза (ДНККаза) обладают противовирусным и противовоспалительным эффектами. Оба фермента могут применяться для лечения вирусных инфекций, таких как герпес, энцефалит, лихорадка Эбола, вирусный конъюнктивит. РНКазы различных типов широко используются в биохимических лабораториях, поскольку каждый тип имеет специфичность к своему типу реакции расщепления РНК. Использование гидролитических ферментов в медицинской практике в виде внутримышечных и, в особенности, внутривенных инъекций предполагает высокую их степень очистки.

Ужесточение требований к качеству лекарственных препаратов с одной стороны и высокая потребность в ферментных препаратах с другой, требует совершенствования технологии их выделения и очистки с целью получения высокоочищенных ферментов. В настоящее время при получении высокоочищенных ферментных препаратов значительную роль играют сорбционные методы, которые, однако, недостаточно широко используются в промышленности. Особенности физико-химических свойств белковых макромолекул, а именно: высокая молекулярная масса, лабильность молекулы, с одной стороны, и многокомпонентность растворов, содержащих помимо целевых компонентов большое количество примесных соединений различной природы, с другой стороны,

свидетельствуют о том, что выделение и очистка ферментов представляет определенные трудности.

Наиболее эффективным является комплекс технологических операций, с помощью которых на одном и том же оборудовании можно получать несколько препаратов в едином технологическом цикле.

В этой связи перспективным является разработка сорбционно-хроматографического метода выделения и очистки панкреатической ДНКазы, РНКазы, ТС и ХТС, выделенных из поджелудочной железы крупного рогатого скота (КРС).

Степень разработанности темы. Существенный вклад в развитие технологий получения ферментных препаратов медицинского, технического и ветеринарного назначения внесли такие отечественные и зарубежные ученые, как Глазова Н.В., Беленький Н.Г., Полонская Л.Б., Чамин Н.Н., Царенко О.В., Рудометова Н.В., Османов В.К., Бирюкова О.В., Борисова А.В. Mccarty M., Kanayass Sh., Itayan M., Asgeirsson I V., Fox J. W., Bjarnason J. V. и другие.

Существующие технологии предназначены для получения одного или двух продуктов в рамках единой технологической схемы, а применяемые методы выделения и очистки ферментных систем основаны на их высаливании, что, в отличие от гидрофобной хроматографии, не позволяет сократить количество и объем посторонних электролитов. Конечный этап очистки ферментов предполагает использование диализа, который, в отличие от ультрафильтрации, не позволяет получить концентраты и даже разбавляет полученные субстанции, что приводит к увеличению затрат на их последующую лиофилизацию.

Все вышесказанное обуславливает необходимость изучения и разработки процессов экстракции, выделения, фракционирования, очистки, и хранения панкреатических ферментов, а также новых технологических процессов и замкнутых технологических циклов производства ферментных препаратов, с учетом вопросов охраны окружающей среды.

Цель и задачи исследования. Целью работы являлась разработка новой технологии получения четырех панкреатических ферментов в рамках единой схемы с применением современных приемов выделения и очистки.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- провести исследования условий предварительной подготовки экстракта поджелудочной железы, включающей его осветление, для снижения вязкости и удаления балластных жировых компонентов;
- модифицировать методики идентификации и определения активности исследуемых ферментов в полученном экстракте поджелудочной железы и выделенных фракциях;

- изучить влияние сорбентов и условий фракционирования подготовленного экстракта с использованием препаративной ионообменной и гидрофобной хроматографии;
- экспериментально обосновать режимы обеспечения селективной сорбции и элюции исследуемых ферментов;
- разработать технологию получения целевых ферментных субстанций из поджелудочной железы КРС.

Научная новизна. Разработан способ предварительной подготовки экстракта поджелудочной железы КРС, включающий его осветление путем использования приемов криоденатурации и изменения кислотно-основного равновесия. Впервые разработаны методики разделения и очистки фракций протеолитических ферментов (ТС и ХТС) и нуклеаз (РНказы и ДНказы) с использованием препаративной ионообменной и гидрофобной хроматографии.

Экспериментально доказана возможность получения ферментных субстанций протеолитических ферментов (ТС и ХТС) и нуклеаз (РНказы и ДНказы) из экстракта поджелудочной железы КРС в едином технологическом цикле.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований предложен эффективный способ разделения фракций и последующей очистки панкреатических ферментов ТС, ХТС, РНказы и ДНказы), выделенных из поджелудочной железы КРС, исключая недостатки традиционной схемы очистки и позволяющий увеличить выход целевых ферментных субстанций, сократить время технологического цикла за счет последовательного использования ионообменной и гидрофобной хроматографии и повысить удельную активность полученных ферментных субстанций. Подобраны условия фракционирования панкреатических ферментов, которые рекомендованы к применению для промышленного производства препаратов медицинского и ветеринарного назначения. Предложены модифицированные экспресс-методики определения активности панкреатических ферментов в полученных фракциях экстракта поджелудочной железы.

Методология и методы исследования. В работе использованы современные, физическо-химические, биохимические методы исследования ферментов, модифицированная методика анализа ферментативной активности в пробах полупродуктов, а также методы математической статистики и планирования эксперимента.

Основные положения, выносимые на защиту:

- способ предварительной подготовки экстракта поджелудочной железы КРС и режимы его осветления для последующего фракционирования;
- методика фракционирования и очистки панкреатических ферментов поджелудочной железы КРС с использованием ионообменной и гидрофобной хроматографии;
- технология получения ферментных субстанций из поджелудочной железы КРС;
- результаты исследований активности и выхода полученных ферментных субстанций.

Степень достоверности и апробация результатов. Научные результаты выполненной работы обладают высокой степенью достоверности и воспроизводимостью экспериментальных данных, что подтверждается применением современных методов математической обработки экспериментальных данных и сопоставимостью результатов эксперимента. Материалы диссертации доложены на третьем национальном конгрессе с международным участием «Здоровые дети — будущее страны» (ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, 2019 г.). Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание 0785.00.X6019).

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 4 печатные работы в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, экспериментальных данных и их обсуждения, выводов, списка цитированной литературы, включающего 114 источников отечественных и зарубежных авторов. Работа изложена на 111 страницах, содержит 8 таблиц, 22 рисунка.

Декларация личного участия автора. Диссертация содержит фактический материал, непосредственно полученный автором в период с 2013 по 2018 гг. Работа проведена в лаборатории Кафедры молекулярной биотехнологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость, освещена апробация полученных результатов, изложены основные положения, выносимые на защиту. **В первой главе** обобщены сведения о

применении протеолитических ферментов рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы, трипсина и химотрипсина в медицине, биотехнологии и пищевой промышленности. Охарактеризованы способы фракционирования для получения препаратов на основе ферментов. Представлены известные методы выделения и очистки, применяемые для получения чистых ферментов. Подробно описаны известные методы определения ферментативной активности для изучаемых ферментов. Обобщены сведения о способах обнаружения и идентификации ферментов.

Проведенный обзор литературы позволил сформулировать цели и задачи исследования.

Во второй главе приведены характеристика объектов исследования, описание материалов и методов, использованных в работе.

Объекты исследования. Экстракт поджелудочной железы КРС и выделенных из него протеолитических ферментов: ТС, ХТС и нуклеаз: РНКазы и ДНКазы, коммерческие препараты ферментов (Ribonuclease A from bovine pancreas, Deoxyribonuclease I from bovine pancreas, Trypsin from bovine pancreas, α -Chymotrypsin from bovine pancreas) производства Sigma и ВРР.

Методы исследования. Для составления материального баланса каждой стадии процесса выделения и очистки исследуемых фракций использовали показатели общего содержания белка и активности выделенных ферментов. Анализ содержания белковых веществ в полученных фракциях осуществляли с использованием биуретового метода (ГФ, изд. 14, т. 1, с. 1036, ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка) и спектрофотометрирования в области от 215 до 280 нм. Активность ДНКазы определяли по Кунитцу (Kunitz M., 1940), активность РНКазы – по Фирсу и Штокку (Беленький Г.Г. и др. «Новое в производстве ферментов и ферментных препаратов из животного сырья», 1966, с. 86), активность ТС – согласно модифицированному методу Ансона по содержанию п-нитроанилина, высвобождаемого трипсином из синтетического субстрата – хлоргидрата *N* α -бензоил-DL-аргинин-п-нитроанилида (БАПНА) в определенных условиях. Активность ТС выражали в ПЕ. Активность ХТС определяли по модифицированному методу Ансона по скорости гидролиза *N*-бензоил-L-тирозина этилового эфира (БТЭЭ) и высвобождения *N*-бензоил-L-тирозина под воздействием химотрипсина. Активность ХТС выражали в бензоилтирозиновых единицах (БТЕ). В качестве контрольного образца использовали неосветленный экстракт поджелудочной железы КРС.

Для выделения ферментов из поджелудочной железы КРС применяли метод кислотной экстракции. Хроматографическое разделение полученных ферментных фракций проводили на жидкостном хроматографе среднего давления «BioRad BioLogic DuoFlow Pathfinder 20 System» с коллектором

фракций «BioRad» с использованием стеклянных колонок разного объема с применением сорбента YMC-BioPro 75S (фирма YMC) – для ионообменной хроматографии (ИОХ) и сорбента Phenyl 650M (фирма TOYOPEARL) – для гидрофобной хроматографии (ГФХ).

Контроль состава фракций и чистоты выделенных ферментов осуществляли методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на колонке Jupiter C18, 300 Å, 150x4,6 мм, фирмы Phenomenex в системе «Shimadzu LC-2030C Prominence». Молекулярные массы белков (свыше 10 кДа) в исследуемых фракциях определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (SDSPAGE) с использованием маркеров Low-Range SDS-PAGE Standards, фирмы BioRad в электрофоретической ячейке «BioRad Mini PROTEAN Tetra System».

Статистическую обработку результатов опытов проводили с использованием программного пакета MS Excel 2010.

Третья глава включает описание экспериментальных исследований по разработке технологии получения ферментных субстанций. Для выделения и очистки ферментов (ТС, ХТС, ДНКазы и РНКазы) использовали жидкостную хроматографию с применением ионообменного и гидрофобного сорбентов.

Современные сорбенты обладают высокой емкостью и селективностью, но являются мелкозернистыми, поэтому особое внимание было уделено подготовке проб исследуемых образцов, поскольку особенности панкреатического сырья определяют различия качества полученных экстрактов.

Способ подготовки экстракта поджелудочной железы КРС для последующего фракционирования. Для осветления экстрактов поджелудочной железы использовали три способа: первый – фильтрацию через капсульные фильтры марки КФВгП из полипропилена (ООО НПП «Технофильтр», Москва), второй – пропускание экстракта через стеклянную колонку, заполненную сорбентом Purolite A845 (США) и третий – путем смещения кислотно-основного равновесия экстракта. Для этой цели экстракт замораживали при температуре $-(20\pm 2)$ °С и размораживали при комнатной температуре, после чего к размороженному экстракту добавляли сухой трис-гидроксиметил-аминометан при непрерывном перемешивании до получения значения рН 8-9. После чего экстракт центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин и собирали супернатант, в который вносили по каплям раствор 2,5 н серной кислоты до достижения значения рН 2-3. Экстракт повторно центрифугировали при тех же условиях и отделяли супернатант, который использовали для дальнейших исследований.

Результаты исследований выхода ферментов в полученные экстракты, выраженные в % от исходной активности ферментов в неосветленном экстракте, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты определения выхода ферментов в осветленный экстракт поджелудочной железы КРС

Фермент	Выход ферментов, % от	Фермент	Выход на стадии, %
Способ 1			
ТС	48,6±3,6	ДНКаза	78,5±3,6
ХТС	87,3±3,6	РНКаза	54,9±3,6
Способ 2			
ТС	95,0±3,0	ДНКаза	90,9±2,5
ХТС	81,1±2,9	РНКаза	99,2±2,7
Способ 3			
ТС	82,8±3,5	ДНКаза	84,4±3,8
ХТС	81,3±3,7	РНКаза	96,1±3,1

Установлено, что фильтрация через капсульные фильтры не является достаточно эффективной, а способ фильтрации на Purolite A845 занимает слишком много времени, несмотря на хорошую степень осветления и инертность сорбента по отношению к выделяемым ферментам. Кроме того, для ускорения осветления экстракта данным методом необходимы дополнительные экспериментальные исследования по подбору высоты слоя сорбента и диаметра колонки. Таким образом, наиболее эффективным является осветление экстракта путем криоденатурации белковых примесей и смещения кислотно-основного равновесия экстракта. Совокупность этих приемов позволила получить прозрачную жидкость из исходного сырья различных сортов. При этом выделяемые ферменты сохраняют активность, что подтверждено методами ОФ ВЭЖХ и электрофореза (рисунок 1).

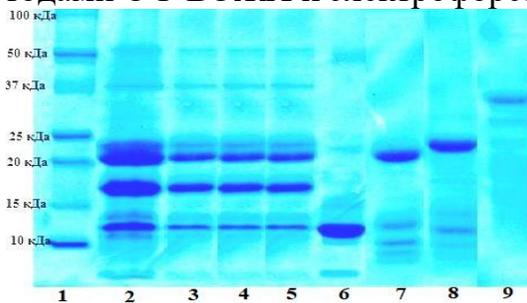


Рисунок 1 – Гель-электрофореграмма экстрактов, осветленных по способам 1-3.

1 – маркер Bio-Rad; 2– контрольный образец экстракта; 3– экстракт, осветленный по способу 1; 4 – экстракт, осветленный по способу 3; 5 – экстракт, осветленный по способу 2; 6 – РНКаза стандарт (Sigma); 7 – ТС стандарт (BRP); 8 – ХТС стандарт (BRP); 9 – ДНКаза стандарт (Sigma).

Фракционирование и очистка панкреатических ферментов поджелудочной железы КРС с использованием ИОХ и ГФХ.

Для первого этапа разделения осветленного экстракта были подобраны условия ионообменной сорбции-десорбции на сильном катионите YMC-BioPro 75S. Выбранный катионит обладает хорошей емкостью сорбции.

Осветленный экстракт поджелудочной железы подавали на колонку с мелкозернистым сорбентом, без риска получения нечеткого профиля элюции.

На рисунке 2 показан профиль сорбции-элюции осветленного экстракта поджелудочной железы КРС, полученный с использованием ИОХ.

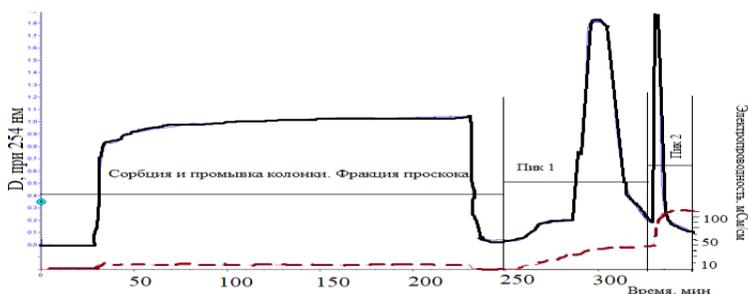


Рисунок 2 – Профиль сорбции-элюции экстракта поджелудочной железы, полученный с использованием ИОХ. (сплошная линия – оптическая плотность раствора при $\lambda=254$ нм, пунктир – электропроводность).

В результате было получено две фракции, одна из которых содержала ТС и ХТС (Пик 1), а другая РНКазу и ДНКазу (Пик 2).

На рисунке 3 (а и б) представлены результаты анализа фракций Пик 1 и Пик 2 методом ОФ ВЭЖХ, которые хорошо согласуются с результатами, полученными методом электрофореза (рисунок 4).

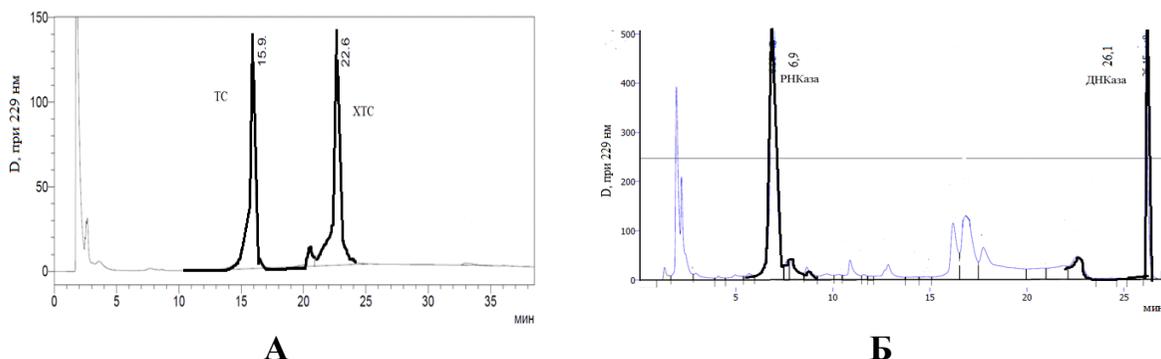


Рисунок 3 – А – анализ фракции «Пик 1» методом ОФ ВЭЖХ;
Б – анализ фракции «Пик 2» методом ОФ ВЭЖХ

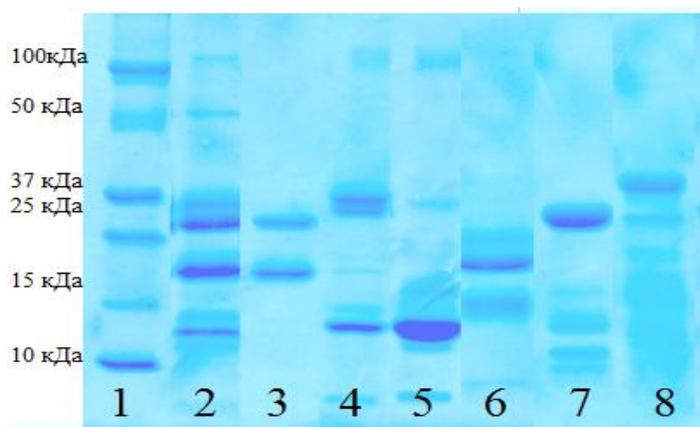


Рисунок 4 – Гель-электрофореграмма экстракта, фракций ИОХ и стандартных образцов

1 – маркер Bio-Rad; 2 – экстракт, осветленный по способу 3; 3 – фракция «Пик 1»; 4 – фракция «Пик 2»; 5 – РНКазы стандарт (Sigma); 6 – ТС стандарт (BRP); 7 – ХТС стандарт (BRP); 8 – ДНКазы стандарт (Sigma)

В таблице 2 представлены результаты определения выхода ферментов во фракции «Пик 1» и «Пик 2», полученные методом препаративной ИОХ, выраженные в % от исходной активности ферментов в неосветленном экстракте.

Таблица 2 – Результаты определения выхода ферментов во фракции «Пик 1» и «Пик 2»

Фермент	Пик 1	Пик 2
ТС	56,2% ±3,2%	0,41 %±0,05%
ХТС	41,8 %±3,2%	0,39 %±0,05%
ДНКазы	2,1 %±0,3%	53,0 %±3,5%
РНКазы	3,2 %±0,3%	70,6 %±3,5%

Установлено, что в подобранных условиях разделения (0,02 М цитратный буфер pH 3,0 ± 0,5; электропроводность менее 10 мСм/см; сорбент УМС-ВюПро 75S) наблюдалась эффективная сорбция всех четырех ферментов, что подтверждается отсутствием нуклеотической активности во фракции Пик1 и протеолитической активности во фракции Пик 2.

Для дальнейшего фракционирования исследуемых ферментов использовали метод ГФХ.

На первом этапе хроматографического разделения через колонку с сорбентом Phenyl 650M пропускали предварительно подготовленную фракцию «Пик 1».

Профиль элюции ГФХ показан на рисунке 5, а на рисунке 6 (а и б) — результаты анализа фракций Пик ТС и Пик ХТС методом ОФ ВЭЖХ, которые свидетельствуют о практически полном разделении ферментов.

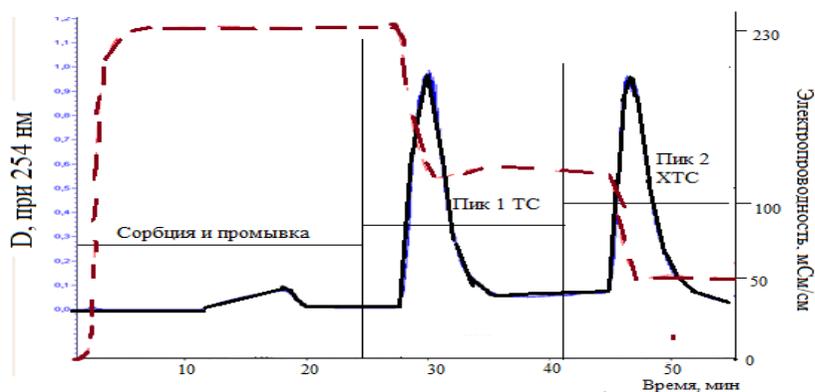


Рисунок 5 – Профиль сорбции-элюции фракции «Пик 1», полученный с использованием ГФХ. (сплошная линия – оптическая плотность раствора при $\lambda=254$ нм, пунктир – электропроводность)

В таблице 3 представлены результаты определения выхода ферментов во фракции ТС и ХТС, полученные методом препаративной ГФХ, выраженные в % от исходной активности ферментов в неосветленном экстракте.

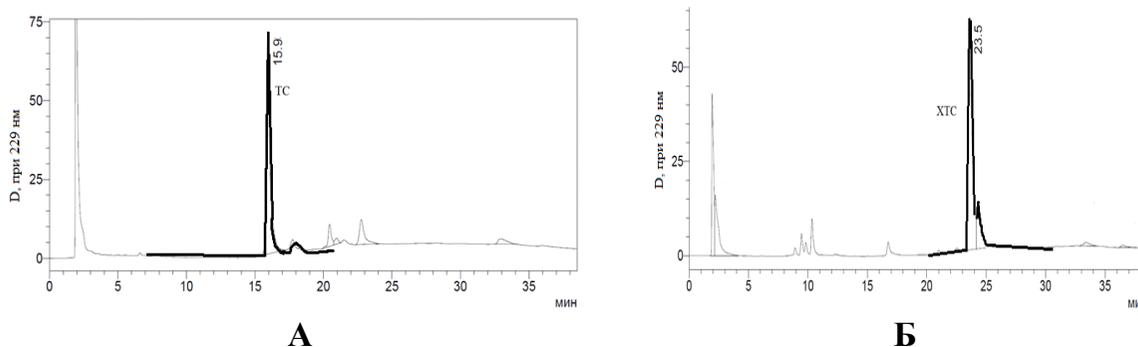


Рисунок 6 – А – анализ фракции «Пик ТС» методом ОФ ВЭЖХ;
Б – анализ фракции «Пик ХТС» методом ОФ ВЭЖХ

В таблице 5 представлен общий выход по активности трипсина и химотрипсина на первой части этапа гидрофобной хроматографии.

Таблица 3 – Результаты определения выхода ферментов во фракции ТС и ХТС

ТС	25,1 %±3,2%	-
ХТС	-	37,3 %±3,2%

Опираясь на знание о различной гидрофобности очищаемых ферментов, для последующей очистки была выбрана гидрофобная хроматография.

На втором этапе хроматографического разделения через колонку с сорбентом Phenyl 650M пропускали предварительно подготовленную фракцию «Пик 2». Профиль элюции ГФХ показан на рисунке 7, а на рисунке 8 (а и б) — результаты анализа фракций «Пик РНКазы» и «Пик ДНКазы» методом ОФ ВЭЖХ, которые свидетельствуют о практически полном разделении ферментов.

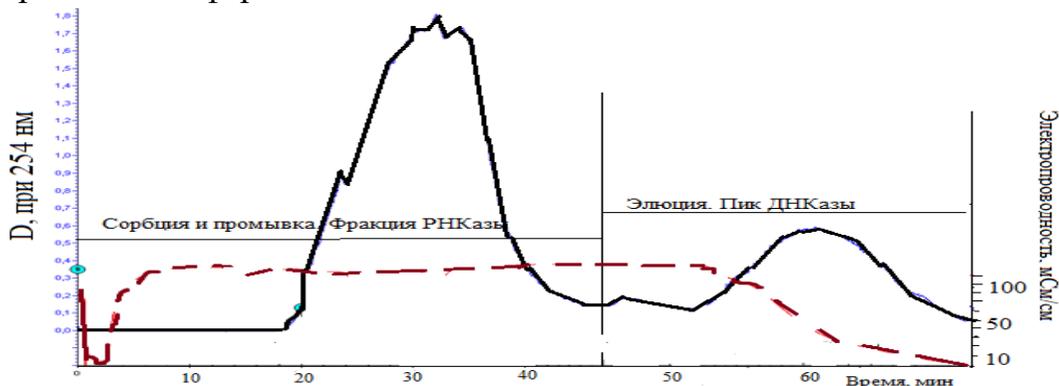


Рисунок 7 – Профиль разделения РНКазы и ДНКазы (сплошная линия – оптическая плотность раствора при $\lambda=254$ нм, пунктир – электропроводность)

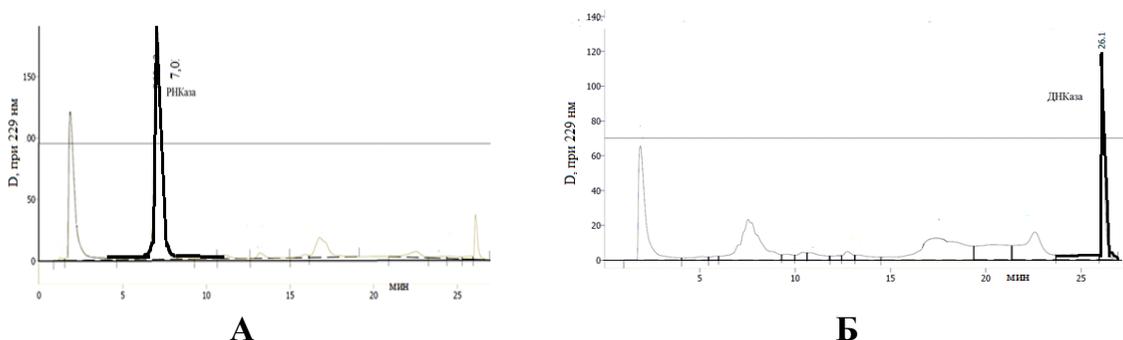


Рисунок 8 – А – анализ фракции «Пик РНКазы» методом ОФ ВЭЖХ;
Б – анализ фракции «Пик ДНКазы» методом ОФ ВЭЖХ

В таблице 4 представлен общий выход по активности ДНКазы и РНКазы на второй части этапа гидрофобной хроматографии.

Таблица 4 – Результаты определения выхода ферментов во фракции РНКазы и ДНКазы

РНКазы	57,0 %±3,2%	-
ДНКазы	-	25,7%±3,2%

В подобранных условиях: пробоподготовки фракции «Пик 2» со стадии ИОХ, которая заключалась в увеличении электропроводности до значения 125 ± 5 мСм/см добавлением NaCl, объема образца, 0,02 М цитратного буфера pH=3,0±0,5 с $\approx 1,15$ М NaCl, электропроводности 125 ± 5 мСм/см, на сорбент Phenyl 650M наблюдалась эффективная сорбция ДНКазы. РНКазы в данных условиях не связывалась с матрицей сорбента и выходила в проскоке. Это связано с существенными отличиями гидрофобности молекул двух белков. Полученные результаты определения активностей, ВЭЖХ и электрофореза показали эффективное разделение смеси РНКазы и ДНКазы. Выходы по активности также оказались удовлетворительными.

На рисунке 9 представлен электрофорез всех четырех полученных фракций (ТС. ХТС, РНКазы, ДНКазы) фракций ГФХ в сравнении с коммерческими стандартными образцами.

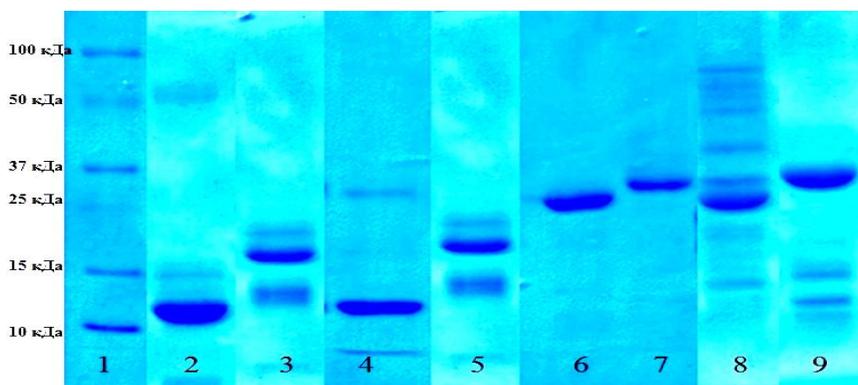


Рисунок 9 – Гель-электрофореграмма фракций ГФХ в сравнении со стандартами ферментов

1–Маркер Bio-Rad; 2–РНКазы стандарт (Sigma); 3–ТС стандарт (BRP); 4 –Пик ГФХ «РНКазы»; 5–Пик ГФХ «ТС»; 6–Пик ГФХ «ХТС»; 7–Пик ГФХ «ДНКазы»; 8–ХТС стандарт (BRP); 9–ДНКазы стандарт (Sigma)

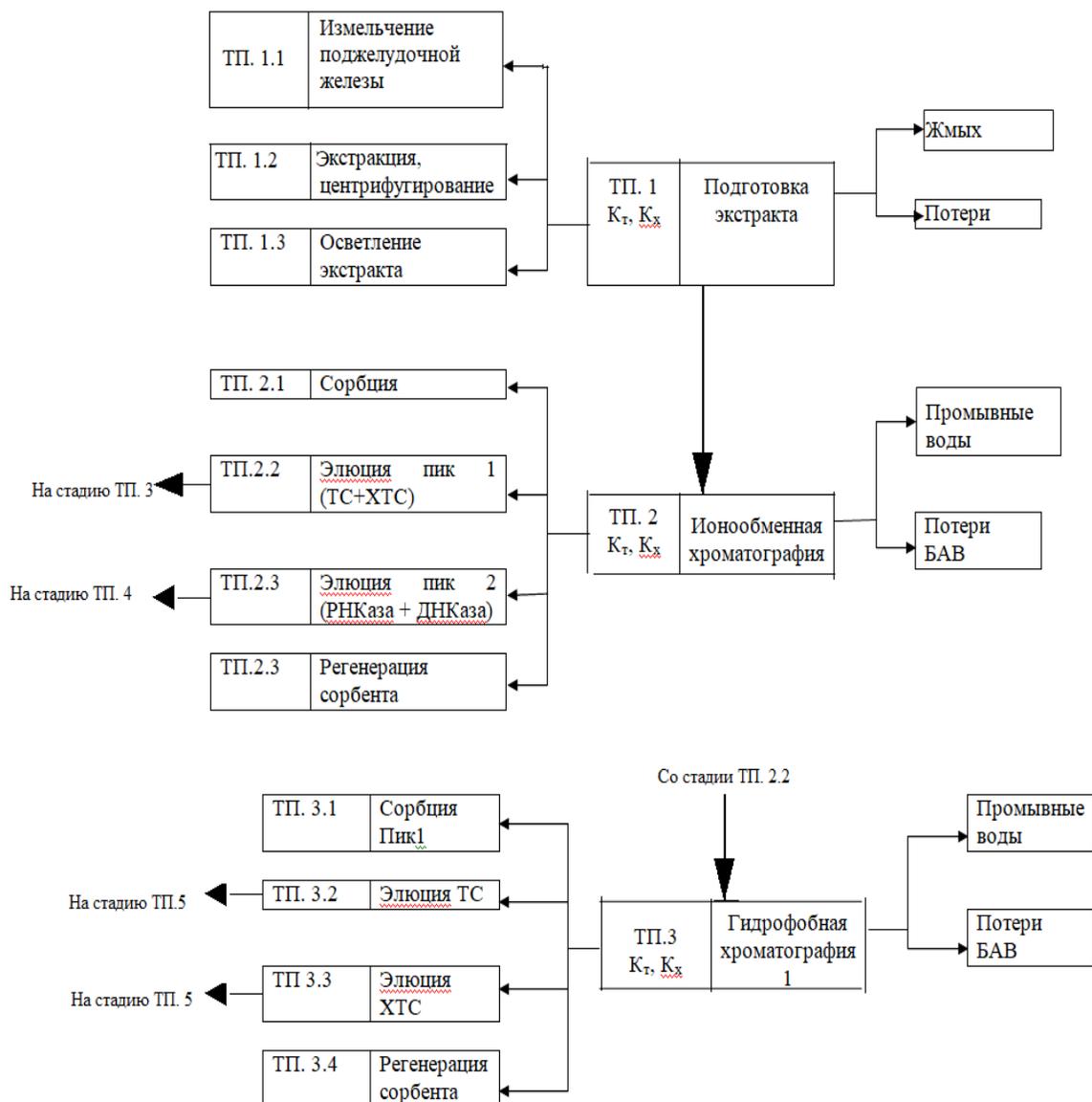
На заключительном этапе очистки полученных фракций их подвергали ультрафильтрации на кассетах «Millipore Pellicon XL» и «Pall Minimate TFF Capsule» для удаления солей и концентрирования. Метод ультрафильтрации является экономически целесообразным, поскольку позволяет использовать фильтрующие элементы и кассеты для многоразовой или последовательной очистки трех продуктов (ТС, ХТС и ДНКазы).

Трипсин, химотрипсин и ДНКазу концентрировали на кассетах с мембраной (порог отсечения 10 кДа), а РНКазу — на кассете с мембраной (порог отсечения 3 кДа). Полученные концентраты лиофилизировали на

приборе «Labsonco». В полученных лиофилизированных ферментных субстанциях определяли протеолитическую и нуклеазную активность.

Технология получения ФС из поджелудочной железы крупного рогатого скота и характеристики их удельной активности.

На рисунке 10 представлена технологическая схема получения ФС из поджелудочной железы крупного рогатого скота.



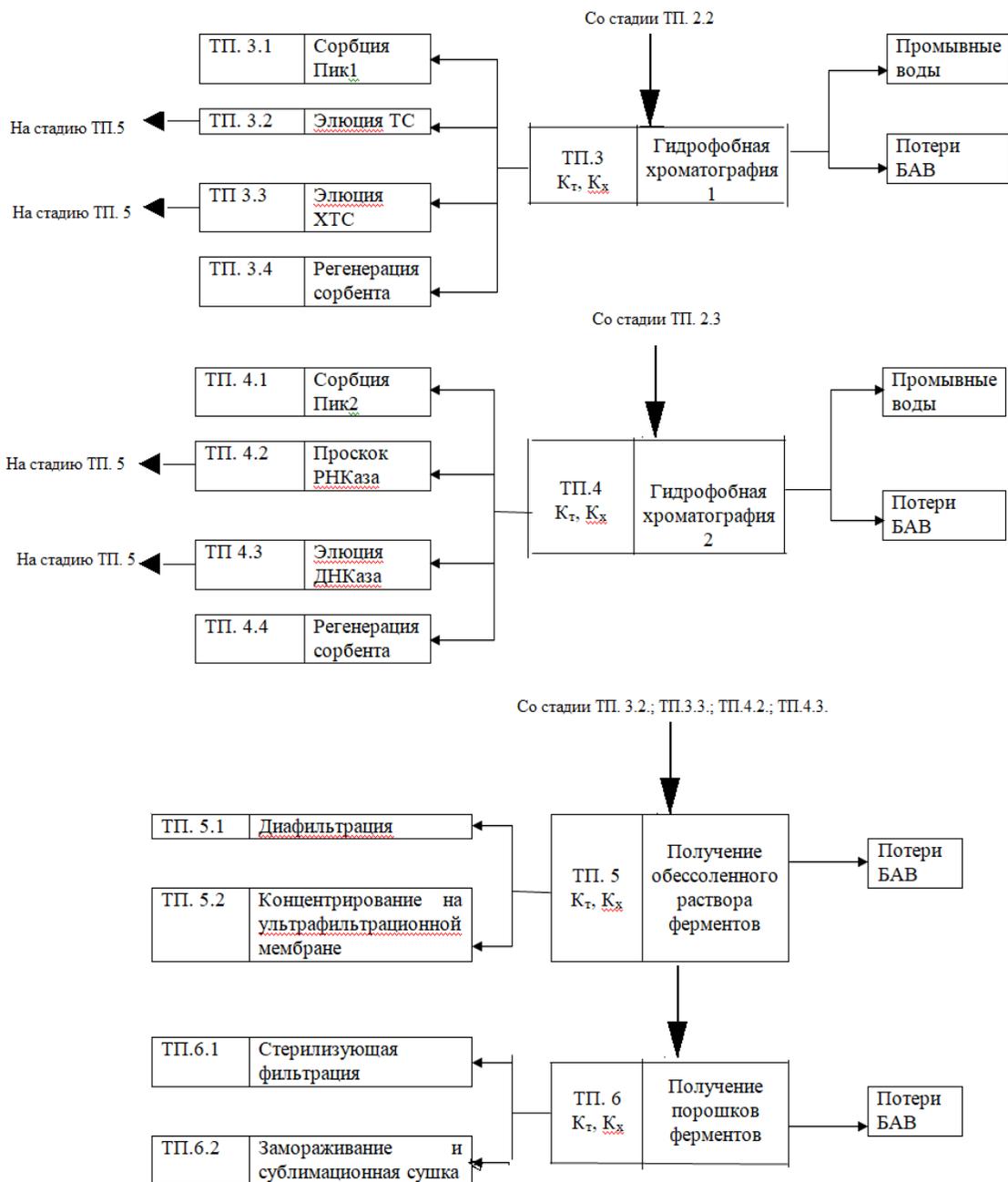


Рисунок 10 – Технологическая схема получения ФС из поджелудочной железы крупного рогатого скота

Сравнительная оценка результатов определения выхода ферментов в полученных ферментных субстанциях показана в таблице 5, а в таблице 6 — удельная активность полученных нами ферментных субстанций и коммерческих препаратов.

Таблица 5 – Сравнительная оценка результатов определения выхода ферментов в полученных ферментных субстанциях, %

Стадия	ТС	ХТС	РНКаза	ДНКаза
ИОХ	56,1±3,7	42,2±3,2	71,8±4,5	53,3±3,8
ГФХ 1	25,3 ±2,7	37,5±3,2	-	-
ГФХ 2	-	-	57,3±3,5	25,2±2,5
Концентрирование и сушка	98,0±5,1	97,1±5,3	95,4±5,5	97,5±5,2
Общий выход	13,4±1,7	15,6±1,2	38,5±2,1	13,1±1,5

Таблица 6 – Сравнительная оценка удельной активности

Показатель/фермент	ТС	ХТС	РНКаза	ДНКаза
Удельная активность полученных ФС	0,17 ПЕ/мг	69,40 БТЕ/мг	9501,40 ЕА/мг	117519,00 ЕА/мг
Удельная активность используемых в работе коммерческих образцов ферментных препаратов	0,12 ПЕ/мг	40,00 БТЕ/мг	8000,00 ЕА/мг	100700,00 ЕА/мг

Разработанная процедура осветления экстрактов поджелудочной железы КРС позволяет использовать в промышленном производстве сырье, которое ранее считалось некондиционным. Модификация процесса очистки экстракта методами препаративной ИОХ и ГФХ путем сочетанного применения двух ступеней хроматографического разделения позволит получать препараты ферментов (ТС, ХТС, РНКазы, ДНКазы) с высокой степенью чистоты и ферментативной активности, относительно традиционно используемой технологии.

Таким образом, на основании проведенных теоретических и экспериментальных исследований предложен эффективный способ очистки панкреатических ферментов (трипсина, химотрипсина, РНКазы и ДНКазы), исключающий недостатки традиционной схемы очистки и позволяющий увеличить выход целевого продукта, сократить время технологического цикла получения ферментов за счет последовательного использования ионообменной и гидрофобной хроматографии и повысить удельную активность препаратов.

Заключение.

1. Проведено исследование по предварительной подготовке экстракта поджелудочной железы, включающей его осветление для снижения вязкости и удаления балластных жировых компонентов:

заморозка до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течении суток и последовательного изменения с начала до значения рН 8 – 9, а затем до достижения значения рН 2 – 3.

2. Модифицированы методики для идентификации и определения активности исследуемых ферментов в полученном экстракте и выделенных фракциях.

3. Изучено влияние сорбентов и условий фракционирования подготовленного экстракта методами препаративной ионообменной и гидрофобной хроматографии. Подобраны сорбенты: для ИОХ УМС-BioPro 75S, а для ГФХ Phenyl - 650M.

4. Экспериментально обоснованы режимы обеспечения селективной сорбции и элюции исследуемых ферментов.

5. Разработаны методики выделения целевых ферментных субстанций: ультрафильтрации для конечной очистки фракций, содержащих целевые ферменты (ТС, ХТС и ДНКазы) на кассетах с мембраной с порогом отсечения 10 кДа, а РНКазы на кассете с мембраной с порогом отсечения 3 кДа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Заболоцкая, Е. Р.,** Виноходов Д. О. Современные методы выделения и очистки ферментов. Отделение нуклеаз от протеолитических ферментов в экстракте поджелудочной железы крупного рогатого скота. // Известия СПбГТУ (ТИ). – 2018. – № 47 (73). – С. 62–68.

2. **Заболоцкая, Е. Р.,** Виноходов Д. О. Осветление экстракта поджелудочной железы крупного рогатого скота. // Известия СПбГТУ (ТИ). – 2018. – № 47 (73). – С. 69–72.

3. **Заболоцкая, Е. Р.,** Виноходов Д.О. Применение протеолитических ферментов и нуклеаз в биомедицине и биотехнологии. // Вестник биотехнологии и физико–химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2018. – № 4. – Т. 14. – С. 71–74

4. **Заболоцкая, Е. Р.,** Виноходов Д.О. Современные методы выделения и очистки ферментов. Разделение трипсиногена и химотрипсиногена. // Вестник биотехнологии и физико–химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2020. – № 1. – Т. 16. – С. 27–34

5. **Заболоцкая, Е. Р.,** Сазанов А. А. Современные методы выделения и очистки ферментов. // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2018. – № 12. – С. 106–111.

6. **Заболоцкая, Е. Р.,** Виноходов Д. О. Отделение нуклеаз от протеолитических ферментов в экстракте поджелудочной железы КРС //Рецензируемый научно–практический журнал «Медицина: теория и практика». Сборник трудов третьего национального конгресса с международным участием «Здоровые дети — будущее страны». Под

редакцией Д.О. Иванова, Ю.С. Александровича, Р.А. Насырова, В.И. Орла, Ю.В. Петренко. – СПб. – 2019. – Т. 4. – № 5. – С. 213–214.

Список использованных сокращений

ГФХ – гидрофобная хроматография

ДНКаза – дезоксирибонуклеаза

ИОХ – ионообменная хроматография

КРС – крупный рогатый скот

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

РНКаза – рибонуклеаза

ТС – трипсин

ХТС – химотрипсин