

УДК 664.951.014:639.211

А.И. Чепкасова, Н.Б. Аюшин, Е.В. Якуш*

Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4**СОСТАВ И СВОЙСТВА ВОДОРАСТВОРИМОГО ПРЕПАРАТА
ИЗ ПЕЧЕНИ ЛОСОСЕЙ**

Показаны аминокислотный состав и антиоксидантная активность сушеной печени кеты *Oncorhynchus keta*, водорастворимого пептидного комплекса, полученного из нее, а также фракции 1–10 кДа, выделенной из водорастворимого пептидного комплекса. Установлено, что водорастворимый пептидный комплекс содержит более 60 % пептидов молекулярной массой от 1 до 10 кДа, пептидов более 10 кДа содержится около 18 %, а низкомолекулярного материала с массой менее 1 кДа — около 20 %. Наибольшее количество связанных аминокислот в сумме 672,5 мг/г содержится в водорастворимом пептидном комплексе, в печени содержание аминокислот составляет 333,3 мг/г. Содержание связанных аминокислот во фракции 1–10 кДа — 544,4 мг/г. Содержание свободных аминокислот в печени наибольшее (91,94 мг/г), в водорастворимом пептидном комплексе оно составляет 61,36 мг/г. Показано, что антиоксидантная активность печени кеты в 5,2 раза выше активности карнозина (антиоксидант сравнения). Антиоксидантная активность водорастворимого пептидного комплекса в 4,2, а фракции 1–10 кДа в 6,3 раза выше активности карнозина. Установлено, что во фракции 1–10 кДа содержатся три изоформы пептида гепсидина, обладающего антимикробной и антигрибковой активностями. Определены их молекулярные массы — 2841,54, 2913,54 и 3025,63 Да.

Ключевые слова: лососевые, кета, печень, аминокислоты, антиоксидантная активность, пептиды, гепсидин.

Chepkasova A.I., Ayushin N.B., Yakush E.V. Composition and properties of water-soluble preparation from salmon liver // *Izv. TINRO*. — 2014. — Vol. 178. — P. 253–260.

Amino acid composition and antioxidant activity are investigated for dried liver of chum salmon *Oncorhynchus keta*, for water-soluble preparation from the dried liver, and for 1–10 kDa fraction of the water-soluble preparation. The water-soluble preparation contains more than 60 % peptides of molecular weight 1–10 kDa, about 18 % peptides of > 10 kDa, and about 20 % low molecular peptides of molecular weight < 1 kDa. The content of combined amino acids is the highest in the water-soluble preparation (672.5 mg/g), it is lower in its 1–10 kDa fraction (544.4 mg/g) and the lowest in the dried liver (333.3 mg/g). On the contrary, the content of free ninhydrin-positive compounds is the highest in the liver (91.64 mg/g) and the lowest in the water-soluble preparation (61.36 mg/g). Relative to the level of carnosine antioxidant activity, the antioxidant activity of the dried liver is higher in 5.2 times, the activity of the water-soluble preparation is higher in 4.2 times, and the activity of the 1–10 kDa fraction is

* Чепкасова Анна Ивановна, младший научный сотрудник, e-mail: tinro@tinro.ru; Аюшин Николай Буданович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: aidzen@yandex.ru; Якуш Евгений Валентинович, кандидат химических наук, заместитель генерального директора, e-mail: evyakush@tinro.ru.

Chepkasova Anna I., junior researcher, e-mail: tinro@tinro.ru; Ayushin Nickolay B., Ph.D., senior researcher, e-mail: aidzen@yandex.ru; Yakush Evgeny V., Ph.D., deputy director, e-mail: evyakush@tinro.ru.

higher in 6.3 times. Three isoforms of such biologically active peptide as hepcidin are found in the 1–10 kDa fraction, their molecular weights are 2841.54, 2913.54 and 3025.63 Da.

Key words: salmon, chum salmon, liver, amino acid, antioxidant activity, peptide, hepcidin.

Введение

В процессе поиска способов рационального использования отходов переработки лососевых рыб, не востребованных (или слабо востребованных) промышленностью, для производства пищевой продукции было продолжено изучение водорастворимого препарата из печени лососей. В мировой практике имеется множество примеров обнаружения и выделения из печени водных организмов различных биологически активных веществ. Так, из печени амфибий были выделены и изучены связанные с жирными кислотами белки, определена их аминокислотная последовательность (Schleicher, Santome, 2004). Эти белки имеют большое значение для осуществления метаболизма жиров в печени и могут быть использованы в качестве лекарственных средств. Описаны методы выделения ДНКаз из печени карпа *Cyprinus carpio* (Krawczenko et al., 2005), аланин-аминотрансферазы, играющей важную роль в процессе адаптации организма к различным условиям обитания (Srivastava et al., 2004), каталазы, супероксид-дисмутазы и глутатион-редуктазы трех видов антарктических рыб и определена зависимость активности этих ферментов от температуры тела рыбы (Speers-Roesch, Ballantyne, 2005).

Печень лососей может также служить источником ферментов, таких как протеиназы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, 6-фосфоглюконат дегидрогеназа, пируваткиназа, фосфоенолпируват-карбоксикиназа, лактат-дегидрогеназа и малик-фермент, применяющихся для тонких биохимических работ (Mommensen et al., 2001). Из печени радужной форели *Oncorhynchus mykiss* удалось выделить триацилглицероллипазу, липолитическая активность которой увеличивается в присутствии связанной с ионом магния цАМФ/АТФ (Harmon et al., 1991). Ранее из этого же источника выделили и очистили ацетил-КоА-карбоксилазу (McKim et al., 1989). Кроме того, в печени *O. mykiss* были изучены уровни некоторых гормонов роста, причем выяснено, что наибольшего значения они достигают во время нереста, т.е. в период наиболее активной добычи лососей (Gomez et al., 1999). В печени атлантического лосося *Salmo salar* найдены и локализованы клетки, вырабатывающие эстроген и ксеноэстроген (Arukwe et al., 1999), из этого же объекта был выделен белок, обладающий антимикробным действием, в дальнейшем идентифицированный как гистон H1 с молекулярной массой около 22 кДа (Richards et al., 2001).

Особенно интересно, что в печени и других органах японской камбалы *Paralichthys olivaceus* были обнаружены две формы богатого цистеином пептида, проявляющего высокую антимикробиальную активность (Hirono et al., 2005). Этот пептид, получивший название гепсидин, был открыт несколькими годами ранее (Park et al., 2001) и в дальнейшем обнаружен в печени многих позвоночных животных. Помимо антимикробной, он проявляет также антигрибковую активность и играет важную роль в регуляции уровня железа в организме (Левина и др., 2008).

Ранее из печени лососей, в частности горбуши, был получен комплекс водорастворимых компонентов (Чепкасова и др., 2012). Было показано, что он содержит белково-пептидные компоненты и обладает заметной антиоксидантной и гепатопротекторной активностью, однако подробного изучения фракционного состава пептидной составляющей проведено не было. Целью настоящей работы стало выяснение состава белково-пептидной составляющей водорастворимого препарата из печени лососевых рыб, исследование его молекулярно-массового распределения и свойств отдельных фракций. Для этого было необходимо разделить препарат на фракции, оценить их массовые соотношения и изучить характеристики, обуславливающие биологическую активность.

Материалы и методы

Сублимированный водный экстракт печени (водорастворимый пептидный комплекс — ВПК), предварительно очищенный хитозаном, получали способом, разработанным ранее (Пат. № 2409291).

Аминокислотный анализ проводили на скоростном аминокислотном анализаторе L-8800 фирмы «Hitachi» (Япония). Антиоксидантную активность определяли по методу Глевинда (Владимиров, Арчаков, 1972) с использованием α -дифенил- α -пикрилгидразина (ICN, США).

Для проведения ультрафильтрации использовалась аппаратура фирмы Millipore (Франция) с плоскими мембранными модулями Pellicon, рассчитанными на пропускание макромолекул с массой в 1 и 10 кДа.

Хроматографию ВПК для определения фракционного состава пептидов проводили на колонке Супероза-12 аналитическая (1,0*30 см), элюент — 0,2 М хлорид натрия, УФ-детектор 280 нм, скорость — 0,4 мл/мин.

Поиск гепсидина осуществляли с помощью масс-спектрографа с лазерной ионизацией фирмы «Ciphergen Biosystems» (США).

Результаты и их обсуждение

Исследование молекулярно-массового распределения белково-пептидного материала с использованием гель-хроматографии показало, что ВПК содержит двенадцать фракций. Наиболее значительные по объему фракции — 2, 3, 4, 5 и 10 (рис. 1).

В табл. 1 представлены молекулярные массы фракций и относительное содержание в них пептидов. Как видно из данных табл. 1, материал с молекулярной массой более 10 кДа составляет около 18 %. Еще около 19 % приходится на низкомолекулярные пептиды — менее 400 Да (фракции 7–12).

Количество пептидов с молекулярной массой от 4 до 10 кДа, что в среднем составляет от 25 до 60 аминокислотных (а/к) остатков, равно почти 24 % (фракция 3), пептидов с молекулярной массой от 1,5 до 4,0 кДа, в среднем от 10 до 25 а/к остатков, — около 24 % (фракция 4) и пептидов с молекулярной массой от 800 до 1 500 Да (5–10 а/к остатков) — около 14 % (фракция 5). На фракцию, содержащую ди-, три-, тетрапептиды, приходится менее 2 % общего содержания пептидов в ВПК. Таким образом, общее содержание пептидов с молекулярной массой от 1 до 10 кДа составляет

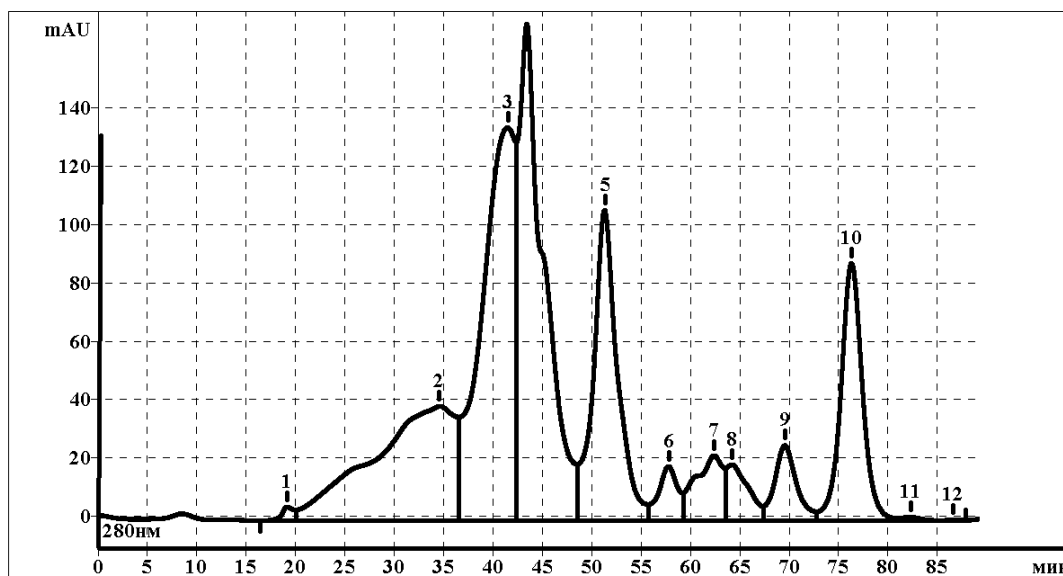


Рис. 1. Молекулярно-массовое распределение белков и пептидов в ВПК из печени лососей
Fig. 1. Molecular weights of proteins and peptides in water-soluble preparation of salmon liver

Молекулярно-массовое распределение пептидов в ВПК

Table 1

Molecular weights of peptides in water-soluble preparation of salmon liver

Номер фракции	Молекулярный вес, кДа	Доля, %
1–2	> 10	17,82
3	10–4	23,78
4	4,0–1,5	23,54
5	1,5–0,8	13,91
6	0,8–0,4	1,92
7–12	< 0,4	19,03

более 60 %. Это послужило основанием для выделения этой фракции в целом и более подробного ее исследования, для чего водорастворимый комплекс подвергали ультрафильтрации, отделяя вещества в диапазоне молекулярных масс от 1 до 10 кДа как от более тяжелой фракции, так и от более легкой. При этом было замечено, что при сильном концентрировании фракции с молекулярной массой более 10 кДа выпадает осадок механических примесей, свойственных ВПК и обусловленных технологическими особенностями его изготовления. Фракции с молекулярной массой 1–10 кДа и более тяжелую (после удаления осадка) сублимировали и определяли содержание в них белковых и свободных аминокислот, а также антиоксидантную активность.

Сравнение содержания и распределения аминокислот (табл. 2) показало, что наибольшее количество связанных аминокислот как в сумме (672,5 мг/г), так и по отдельным аминокислотам наблюдается в ВПК. В печени содержание аминокислот в 2 раза ниже, чем в ВПК, и составляет 333,3 мг/г. Разделение ВПК на ультрафильтрационной установке приводит к тому, что во фракцию 1–10 кДа переходит наибольшее количество связанных аминокислот, общее содержание их лишь немного ниже, чем

Таблица 2

Белковые аминокислоты печени кеты и препаратов из нее, мг аминокислоты/г материала

Table 2

Content of protein amino acids in the chum salmon liver and its preparations, mg/g

Аминокислота	Печень	ВПК	Фракция 1–10 кДа	Фракция более 10 кДа
Незаменимые аминокислоты				
Thr	10,9	20,6	13,9	7,8
Val	21,2	51,9	41,1	21,0
Met	7,4	12,6	7,6	5,7
Pe	13,8	35,1	25,7	11,6
Leu	21,2	68,4	49,9	18,6
Phe	11,3	39,4	30,5	14,0
Lys	29,3	59,3	47,5	19,0
Сумма незаменимых	115,1	287,3	216,2	97,7
Заменимые аминокислоты				
Tyr	6,0	14,2	8,8	5,9
Ser	5,3	7,1	3,6	2,9
Asp	33,3	76,0	58,5	25,1
Glu	77,1	91,7	85,2	38,5
Gly	26,2	32,7	34,4	14,8
Ala	24,0	48,6	38,3	10,9
His	5,9	23,5	18,8	6,1
Arg	8,3	34,3	33,1	5,5
Pro	23,0	50,2	41,3	15,6
Cys	9,1	6,9	6,2	4,3
Сумма заменимых	218,2	385,2	328,2	129,6
Итого	333,3	672,5	544,4	227,3

в самом ВПК, и составляет 544,4 мг/г. При этом во фракции более 10 кДа общее содержание связанных аминокислот в 3 раза ниже, чем в ВПК, и составляет 227,3 мг/г.

Таким образом, большая часть связанных аминокислот в ВПК представлена в виде пептидов с молекулярной массой 1–10 кДа, что позволяет позиционировать ВПК как пептидный препарат. Сумма аминокислот ВПК заметно меньше, чем общая сумма двух фракций, полученных при ультрафильтрации. Это объясняется наличием в ВПК значительного количества механических примесей, упомянутых выше.

Определение состава и количества свободных аминокислот в печени кеты, сублимированном из нее ВПК и во фракциях (табл. 3) показало, что содержание свободных аминокислот в печени наибольшее (91,94 мг/г), а в процессе получения ВПК оно снижается до 61,36 мг/г.

Таблица 3

Свободные аминокислоты печени кеты и препаратов из нее, мг аминокислоты/г материала

Table 3

Content of free amino acids in the chum salmon liver and its preparations, mg/g

Аминокислота	Печень	ВПК	Фракция 1–10 кДа
π -Ser	6,13	5,26	3,74
Tau	5,19	5,79	5,00
PEA	5,74	0,51	0,08
Asp	3,59	3,02	2,67
Thr	3,77	2,71	1,85
Ser	3,85	2,60	1,82
Glu	8,78	8,15	8,91
α -AAA	0,13	0,26	–
Gly	5,72	4,68	3,62
Ala	7,06	5,28	3,79
Cit	6,92	6,86	3,69
Val	4,40	2,39	1,90
Cys	–	–	0,27
Met	2,20	0,56	0,92
Cysthin	0,54	0,24	0,09
Ile	3,16	1,56	1,45
Leu	6,21	3,43	2,94
Tyr	2,10	0,26	0,17
Phe	2,76	1,27	1,11
β -Ala	1,11	0,58	0,30
β -AiBA	0,76	0,77	0,20
γ -ABA	0,12	0,07	0,08
Trp	0,32	0,25	0,21
EONH ₂	0,24	0,10	0,17
HyLys	0,81	0,22	0,57
Orn	0,89	0,81	1,25
Lys	3,44	2,62	3,23
His	0,44	0,27	0,30
Ans	0,80	0,61	0,61
Car	0,10	–	0,05
Arg	0,36	0,23	0,18
Pro	4,30	–	2,30
Итого	91,94	61,36	53,47

Использование ультрафильтрации для выделения из ВПК фракции 1–10 кДа закономерно способствует уменьшению количества свободных аминокислот в среднем в 1,7 раза по сравнению с содержанием свободных аминокислот в печени.

При этом содержание отдельных аминокислот — Tau, Asp, Glu, Trp, lys, Ans — во фракции 1–10 кДа и ВПК сравнимо с содержанием их в печени. Количество таких

аминокислот, как Ile, Leu, Phe и His, сравнимо в ВПК и фракции 1–10 кДа и в среднем в 2 раза ниже, чем их содержание в печени. Количество других свободных аминокислот снижается в ряду: печень — ВПК — фракция 1–10 кДа. Содержание только одной аминокислоты — Orn — во фракции 1–10 кДа (1,25 мг/г) превышает ее содержание в печени (0,89 мг/г) и в ВПК (0,81 мг/г).

Одной из важных характеристик, обуславливающих биологическую активность тех или иных веществ, является антиоксидантная активность (АОА). При определении антиоксидантной активности препаратов в качестве стандарта использовался дипептид карнозин как антиоксидант средней силы (табл. 4).

Таблица 4

Антиоксидантная активность препаратов из печени кеты

Table 4

Antioxidant activity of preparations from the chum salmon liver

Препарат	Степень активности (количество карнозина, г, соответствующее активности 1 г препарата)
Печень кеты, сушеная	5,2
ВПК	4,2
Фракция 1–10 кДа	6,3
Фракция > 10кДа	5,1

Ранее было показано, что высушивание печени лососей увеличивает срок ее хранения с 2 до 12 мес (Чепкасова и др., 2009). Исследование АОА проводили с использованием сухой печени, полученной из нее ВПК и фракции ВПК с молекулярной массой 1–10 кДа, так как согласно данным хроматографического исследования именно эта фракция содержит наибольшее количество пептидного материала.

Результаты, представленные в табл. 4, показывают, что сушеная печень кеты имеет высокую степень АОА: ее активность в 5,2 раза выше, чем у карнозина.

Антиоксидантная активность ВПК немного ниже, чем в исходной сухой печени, и составляет 4,2. При этом во фракции 1–10 кДа АОА составляет 6,3, что в полтора раза выше, чем в ВПК, и в 1,2 раза выше, чем в сушеной печени. Активность более тяжелой фракции находится на уровне активности исходной печени. Таким образом, можно утверждать, что за антиоксидантную активность, свойственную печени лососей, отвечает множество веществ, распределенных по всему спектру молекулярных масс.

Во фракции 1–10 кДа были предприняты поиски гепсидина, о ценных биологических свойствах которого упоминалось выше, поскольку именно эта фракция соответствует диапазону молекулярных масс его изоформ.

Полученную в результате ультрафильтрации фракцию сублимировали и исследовали с помощью масс-спектрометрии. В результате были обнаружены три молекулярных иона с массой 2841,54, 2913,54 и 3025,63 Да (рис. 2).

Молекулярные массы обнаруженных молекулярных ионов не совпадают с массами присущих человеку форм гепсидина, однако это можно объяснить видовыми различиями. Обнаруженные в организмах японской камбалы *Paralichthys olivaceus* (Hirono et al., 2005), американской «зимней» камбалы *Pseudopleuronectes americanus* (Douglas et al., 2003) и окуня *Morone chrysops* (Lauth et al., 2005) формы гепсидина также имели отличия по молекулярной массе от гепсидинов человека, однако проявляли антимикробную активность и реагировали с антителами, полученными для человеческого гепсидина. Эти данные позволяют допустить, что печень лососей, в частности кеты, содержит гепсидин, представленный тремя формами, что в свою очередь может явиться основанием для рекомендации ВПК из печени лососей в качестве основы для изготовления добавки к пище антимикробного и антигрибкового действия.

Заключение

Выявленные в ходе исследования особенности распределения белково-пептидного материала во фракциях ВПК в совокупности с данными по антиоксидантной актив-

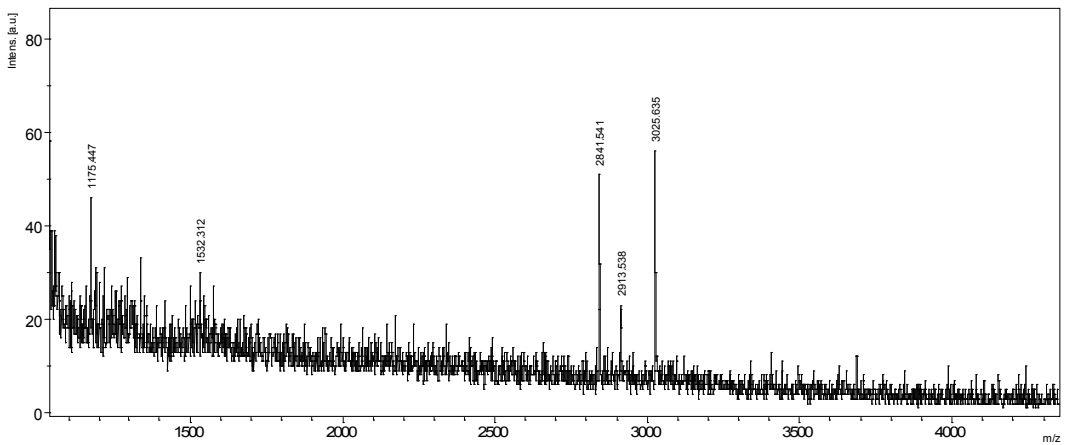


Рис. 2. Масс-спектрометрия фракции 1–10 кДа водорастворимого препарата из печени кеты
 Fig. 2. Mass-spectrometry of the 1–10 kDa fraction of the water soluble preparation from the chum salmon liver

ности ВПК и фракции 1–10 кДа позволяют сделать заключение, что наиболее высокой АОА обладает материал с молекулярной массой от 1 до 10 кДа, на долю которого приходится более 60 % общей массы. Наличие в этом материале трех соединений, которые с большой долей вероятности можно идентифицировать как изоформы гепсидина, открывает перспективы для использования фракции ВПК из печени лососевых рыб с молекулярной массой от 1 до 10 кДа для создания специализированных биологически активных добавок к пище.

Список литературы

- Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах : монография. — М., 1972. — 252 с.
- Левина А.А., Казюкова Т.В., Цветаева Н.В. и др.** Гепсидин как регулятор гомеостаза железа // Педиатрия. — 2008. — Т. 87, № 1. — С. 67–74.
- Пат. № 2409291** Способ получения водорастворимого полипептидного комплекса из печени рыб лососевых пород / А.И. Чепкасова, Н.Б. Аюшин, Н.Н. Ковалев. Заявл. 17.08.09; Опубл. 20.01.11.
- Чепкасова А.И., Аюшин Н.Б., Юрьева М.И. и др.** Перспективы использования печени лососевых для получения биологически активных компонентов // Изв. ТИНРО. — 2012. — Т. 169. — С. 230–237.
- Чепкасова А.И., Аюшин Н.Б., Юрьева М.И. и др.** Технохимическая характеристика печени лососевых рыб и перспективы ее использования // Изв. ТИНРО. — 2009. — Т. 159. — С. 325–336.
- Arukwe A., Nilsen B.M., Berg K., Goksoyr A.** Immunohistochemical analysis of the vitellogenin response in the liver of Atlantic salmon exposed to environmental oestrogens // Biomarkers. — 1999. — Vol. 4, № 5. — P. 373–380.
- Douglas S.E., Gallant J.W., Liebscher R.S. et al.** Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish // Dev. Comp. Immunol. — 2003. — Vol. 27. — P. 589–601.
- Gomez J.M., Mourot B., Fostier A., LeGac F.** Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) // J. of Reproduction and Fertility. — 1999. — Vol. 115, № 2. — P. 275–285.
- Harmon J.S., Michelsen K.G., Sheridan M.A.** Purification and characterization of hepatic triacylglycerol lipase isolated from rainbow-trout, *Oncorhynchus mykiss* // So Fish Physiology and Biochemistry. — 1991. — Vol. 9, Iss. 4. — P. 361–368.
- Hirono I., Jee-Youn Hwang, Ono Y. et al.** Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* // FEBS Journ. — 2005. — Vol. 272, Iss. 20. — P. 5257–5264.
- Krawczenko A., Ciszak L., Malicka-Blaszkiewicz M.** Carp liver DNase — isolation, further characterization and interaction with endogenous actin // Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. and Mol. Biol. — 2005. — Vol. 140, № 1. — P. 141–151.

Lauth X., Babon J.J., Stannard J.A. et al. Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and *in vivo* hepatic response to bacterial infections // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280, Iss. 10. — P. 9272–9282.

McKim J.M., Schaup H.W., Marien K., Selivonchick D.P. Isolation and identification of acetyl-coa carboxylase from rainbow-trout (*Salmo gairdneri*) liver // *Lipids.* — 1989. — Vol. 24, Iss. 3. — P. 187–192.

Mommsen T.P., Moon T.W., Plisetskaya E.M. Effects of arginine on pancreatic hormones and hepatic metabolism in rainbow trout // *Physiological and Biochemical Zoology.* — 2001. — Vol. 74, № 5. — P. 668–678.

Park C.H., Valore E.V., Waring A.J., Ganz T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Vol. 276, Iss. 16. — P. 7806–7810.

Richards R.C., O'Neil D.B., Thibault H., Ewart K.V. Histone H1: An Antimicrobial Protein of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* — 2001. — Vol. 284, Iss. 3. — P. 549–555.

Schleicher C.H., Santome J.A. Purification, characterization, and partial amino acid sequencing of an amphibian liver fatty acid binding protein // *Mokuzai Gakkaishi.* — 2004. — Vol. 50, Iss. 6. — P. 413–421.

Speers-Roesch B., Ballantyne J.S. Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts // *Comp. Biochem. Physiol. A-Mol. Integr. Physiol.* — 2005. — Vol. 140, Iss. 4. — P. 487–494.

Srivastava A.S., Oohara I., Suzuki T. et al. Purification and properties of cytosolic alanine aminotransferase from the liver of two freshwater fish, *Clarias batrachus* and *Labeo rohita* // *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.* — 2004. — Vol. 137, Iss. 2. — P. 197–207.

Поступила в редакцию 11.06.14 г.