

UDC 577.15:582.683.2

ISOLATION AND RESEARCH OF MOLECULAR MASS AND COMPOSITION OF LYSOCYM ARMORACIA RUSTICANA BY THE ENZYME-SUBSTRATE CHROMATOGRAPHY METHOD

Galyna V. Krusir^{1*}, Konstantyn O. Prysiazniuk², Elena V. Sevastyanova¹, Liudmyla N. Pylypenko¹, Olga A. Sagdeeva¹

¹Odessa National Academy of Food Technologies, St. Kanatna, 112, Odessa, 65039 Ukraine,

²Odessa Polytechnic National University, Shevchenko av., 1, Odessa, 65044, Ukraine

Received 7 March 2022; accepted 12 April 2022; available online 13 May 2022

Abstract

The article presents the results of the extraction of plant lysozyme from *Armoracia rusticana* by specific enzyme-substrate chromatography. A chromatographic curve of lysozyme isolation from the juice part of *Armoracia rusticana* root crops using as a biospecific sorbent, glucochitin, which is presented. A preparation of lysozyme was obtained from the juice part of the roots of *Armoracia rusticana* with a specific activity of 217.6 units/mg. The lysozyme, which was examined by gel electrophoresis in 15 % polyacrylamide gel using a calibration curve is characterized by a molecular mass of 12.022 kDa, that confirms that it belongs to low-molecular-weight proteins. The yield of the lysozyme preparation by the total lysozyme activity is 36.8 %. The data obtained allow predicting the prospects of using *Armoracia rusticana* as a source of plant-based lysozyme.

Keywords: lysozyme; isolation; *Armoracia rusticana* root crops; enzyme-substrate chromatography; gel electrophoresis.

ВИДІЛЕННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ ТА СКЛАДУ ЛІЗОЦИМУ ARMORACIA RUSTICANA МЕТОДОМ ФЕРМЕНТ-СУБСТРАТНОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Галина В. Крусір¹, Костянтин О. Присяжнюк², Олена В. Севастьянова¹, Людмила М. Пилипенко¹, Ольга А. Сагдєєва¹

¹Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, м. Одеса, Україна, 65039

²Національний університет «Одеська політехніка», пр-т Шевченка, 1, м. Одеса, Україна, 65044

Анотація

У статті наведено результати виділення лізоциму рослинного походження з *Armoracia rusticana* шляхом специфічної фермент-субстратної хроматографії. Наведено хроматографічну криву виділення лізоциму з сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana* з використанням біоспецифічного сорбенту – глюкохітину. Отримано препарат лізоциму з сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana* із питомою активністю 217.6 од/мг. Лізоцим, досліджений за результатами гелі-електрофорезу в 15 % поліакриламідний гель з використанням калібрувальної кривої, характеризується молекулярною масою 12.022 кДа, що підтверджує його приналежність до низькомолекулярних білків. Вихід препарату лізоциму за сумарною лізоцимною активністю складає 36.8 %. Отримані дані дозволяють прогнозувати перспективність використання *Armoracia rusticana* як джерела отримання лізоциму рослинного походження.

Ключові слова: лізоцим; виділення; коренеплоди *Armoracia rusticana*; фермент-субстратна хроматографія; гелі-електрофорез.

*Corresponding author: e-mail: krussir.65@gmail.com

© 2022 Oles Honchar Dnipro National University;

doi: 10.15421/jchemtech.v30i1.255480

Вступ

Ферменти та інші білки мають властивість адсорбуватися на різних нерозчинних сполуках. Ця властивість використовується для розділення суміші білків та виділення ферментів при отриманні високоочищених та гомогенних препаратів з подальшим визначенням [1; 2] їх фізико-хімічних властивостей, молекулярної маси, амінокислотного складу та наявності ізоформ [3–5].

Лізоцим (КФ 3.2.1.17, мукопептид N-ацетилмурамілгідролаза) – фермент класу гідролаз, що розщеплює β -1,4-глікозидні зв'язки у полімерних молекулах, які утворюють бактеріальну стінку, здатний до лізису клітин різних бацил, мікрококів, стафілококів, деяких видів дріжджів та грибів. У стінках двох останніх він розщеплює хітин – полімер ацетилглюкозаміну, тобто проявляє хітинолітичну (або ацетилглюкозамінідазну) активність.

Лізоцим є універсальним поширеним ферментом на всіх етапах еволюції живих організмів – вищих ссавців та людини, де відіграє роль захисту організму від інфекцій. Фермент має багато біологічних функцій, зокрема протівірусну активність, завдяки формуванню нерозчинних комплексів із кислотними вірусами; має антибіотичний, антибактеріальний характер та ін. [6; 7].

Фермент широко використовується у харчовій індустрії, зокрема, при обробці поверхневого шару продуктів (овочі, риба, фрукти, м'ясо та ін.) для запобігання псуванню сировини в результаті ферментативного лізису клітинних оболонок під дією мікроорганізмів [7–9]. Лізоцим попереджує здуття сиру [10], його присутність передбачає зниження температури стерилізації у консервному виробництві. У клінічних дослідженнях фермент використовується при захворюваннях жовчовивідних шляхів, при лікуванні хронічних гастритів, зупиняє алергічні реакції [11; 12].

Сукупність захисних механізмів лізоциму визначає його основну фундаментальну функцію – забезпечення природної толерантності організму до чужорідних тіл. Лізоцим було виявлено в ікрі риб [13], соках хрону, редьки, ріпи, капусти, фікусу, примули, у латексі папайї [14–18]. Найбільш вивченим є лізоцим тваринного походження – з білку курячого яйця [18; 19].

Відомо, що лізоцими рослинного і тваринного походження розрізняються за амінокислотним складом, молекулярною масою, фізико-хімічними властивостями. Препарати рослинних ферментів у ряді випадків перевершують тваринні та мікробні аналоги за рахунок меншої токсичності, алергізуючого потенціалу та містять супутні корисні біологічно активні компоненти полісахаридної, ліпідної, пігментної та іншої природи, здійснюють позитивний фізіологічний вплив на організм людини, не викликають побічних ефектів. Цим пояснюється актуальність розробки технологій біологічно активних добавок та функціональних продуктів, які містять рослинні ферменти [14; 20].

Серед різноманітних рослин особливе значення для організму людини мають овочеві культури, зокрема *Armoracia rusticana*, яка є невичерпним джерелом біологічно активних речовин. Відомо, що корінь *Armoracia rusticana* містить вітаміни: С – 250 мг%, В1, В2, РР; вуглеводи: сахароза – 1.5 %, глюкоза, галактоза, арабіноза, ксилоза, полісахариди; мінеральні речовини: N, K, Ca, Fe, P [14; 21].

Для виділення лізоцимів рослинного та тваринного походження використовують метод мембранного розділення, афінну, гелта іонообмінну хроматографію [22; 23]. Однак багато з цих методів високоартістичні і потребують дорогого апаратурного оформлення, що звужує сферу їх використання у комерційному масштабі і перешкоджає розповсюдженню у харчовій індустрії. Спосіб афінної хроматографії дорогий, як і всі інші. Перевагою її є те, що речовину, яка знаходиться у дуже малих кількостях, можна виділити повністю та дуже швидко. Саме тому цей метод часто є єдиним із тих, які можна застосовувати.

Найбільш поширеними залишаються чотири методи виділення лізоциму: класична процедура прямої кристалізації (тільки лізоцим з білка курячого яйця), пряма мембранна фільтрація, афінна та іонообмінна хроматографія. Особливе місце займає метод афінної хроматографії, перевага якого в тому, що з його допомогою можливо отримати практично в одну стадію високоочищені білки (ферменти), які мають незначний вміст побічних продуктів або зовсім вільні від останніх.

Субстратна специфічність є основою афінної хроматографії [24]. Найпоширенішими адсорбентами, які використовуються для зв'язування лізоциму, є хітин та його похідні: глюкохитин (ступінь дезамінування варіює в межах 10–50 % [25]) і хітозан (дезацетильований хітин) [8].

Описано метод виділення та очищення лізоцимів за допомогою їх сорбції на твердому та слабкоперетравлюваному субстраті – хітині – за рН 5.0–5.5 з наступною вибірковою десорбцією дистильованою водою. Дослідження властивостей фермент-субстратного комплексу лізоциму з хітином у різних умовах показало, що доцільніше проводити сорбцію за рН 8.0–8.5: при цьому значенні рН лізоцим не гідролізує хітин, а фермент-субстратний комплекс, який утворюється в цих умовах, не розкладається у воді і може руйнуватись у присутності розведених кислот, наприклад оцтової, що дозволяє в одну стадію отримати лізоцим. Треба відзначити, що найбільш вагомим фактором при виділенні лізоциму цим способом є величина рН, яка повинна знаходитись у межах 8.0–8.5 одиниць рН. За більш низького значення рН та чи інша частина лізоциму десорбується водою [26–27].

Метою роботи було виділення лізоциму рослинного походження з сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana* в активній формі за допомогою специфічної фермент-субстратної хроматографії. Серед завдань дослідження варто зазначити: виділення лізоциму методом афінної хроматографії, визначення молекулярної маси виділеного лізоциму методом електрофорезу з використанням калібрувальної кривої, визначення гомогенності лізоциму методом електрофорезу.

Об'єкти та методи досліджень

Виділення лізоциму з коренеплодів *Armoracia rusticana* проводили за такою схемою: свіжі коренеплоди у кількості 2 кг мили, віджимали сік ($\pm 365 \text{ см}^3$), додавали гідрокарбонат натрію до його масової концентрації $\omega = 1\%$ та центрифугували з подальшим відокремленням осаду. Супернатант наносили на колонку з глюкохитином ($2 \times 30 \text{ см}$), яку попередньо також промивали розчином бікарбонату натрію до повного видалення сторонніх білкових домішок (контроль по зміні оптичної густини елюенту за $\lambda = 280 \text{ нм}$).

В якості сорбенту афінної хроматографії використовували хітин фірми «БіоХіт», що було дезаміновано шляхом обробки азотистою кислотою з метою усунення його іонообмінних властивостей, які у ряді випадків призводять до виділення разом із основним продуктом сторонніх білкових речовин. Для дезамінування до розчину 10.35 г (0.15 М) нітриту натрію у 300 см^3 дистильованої води за температури $2\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$ додавали 12.7 см^3 концентрованої хлоридної кислоти (0.15 М). У отриманий розчин (рН 2–3) вносили 100 см^3 (23.9 г) хітину. Перемішували за $2\text{--}4 \text{ }^\circ\text{C}$ до припинення утворення піни (виділення азоту), що зайняло ± 6 годин. Отриманий глюкохитин відмивали дистильованою водою та сушили за температури $80\text{--}100 \text{ }^\circ\text{C}$. Відсутність у ньому іонообмінних груп контролювали за допомогою кондуктометричного титрування [23].

Лізоцим десорбували 5%-вим розчином оцтової кислоти. Елюент збирали по 2 см^3 , швидкість потоку складала $18 \text{ см}^3/\text{хв}$. У кожному із зібраних зразків визначали лізоцимну активність (ЛА, $\text{од}/\text{см}^3$) і кількість білка ($\text{мг}/\text{см}^3$) методом Лоурі у модифікації Хартрі [28].

За одиницю активності лізоциму приймали таку його кількість, яка в результаті лізису бактеріальної культури *Micrococcus lysodeikticus* призводить до зменшення оптичної густини реакційної суміші на 0.001 од . за 1 хв . [8].

Білковий розчин (62 см^3) ліофільно висушували за температури $-50 \text{ }^\circ\text{C}$ та тривалості 70 годин. Молекулярну масу визначали за допомогою гель-електрофорезу в тріс-гліциновому буфері рН = 8.3 з використанням 15% поліакриламідного гелю (ПААГ) на приборі 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator. Використовували наступні маркери з відомою молекулярною масою: фосфорілаза В (92.5 кДа), БСА (37.0 кДа), яєчний альбумін (15.0 кДа), карбогідраза (29.0 кДа), соєвий інгібітор трипсину (2.1 кДа), цитохром С (12.0 кДа), інгібітор з легень крупної рогатої худоби (6.0 кДа). Електрофорез проводили за температури $4 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 3 годин за сили струму 20 МА . Фіксацію білків здійснювали 60% водним розчином трихлороцтової кислоти протягом 3 годин за кімнатної температури. Гель забарвлювали індикатором Кумасі – 250 (4 години за

кімнатної температури). Відмивали гель 7 % розчином оцтової кислоти в 10 % розчині ізопропілового спирту.

Результати та обговорення

Властивості того чи іншого об'єкту визначають вибір умов його виділення. Стадії одержання білкових препаратів включають: екстракцію, висолування, осаджування

різноманітними органічними розчинниками, хроматографічні методи. Виділення лізоциму з сокової частини коренеплодів *Armoracia rusticana* проводили із використанням біоспецифічного сорбенту – глюкохітину. Результати визначення ЛА та концентрації білка у зібраних (V ел.) фракціях елюатів приведені на рис. 1.

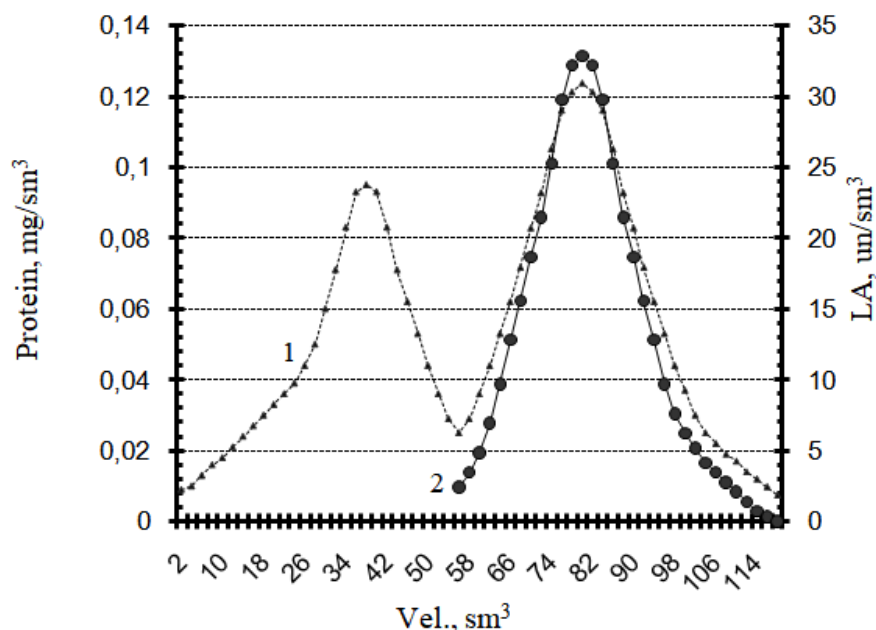


Fig. 1. Baseline chromatographic curve of the juice part *Armoracia rusticana* lysozyme on glucosaminoglycan: Protein - 1 and LA - 2

Рис. 1. Базова хроматографічна крива лізоциму сокової частини *Armoracia rusticana* на глюкохітині: Протеїн - 1 та ЛА - 2

Хроматографічна крива виходу білка з колонки характеризується двома максимумами, причому другий максимум супроводжується ліполітичною активністю.

Isolation of *Armoracia rusticana* lysozyme from the juice of the roots (2 kg of roots)

Ізоляція лізоциму *Armoracia rusticana* з соку коренів (2 кг коренів)

Indexes	Juice	Protein solution
Volume, cm^3	365	62
LA, units / cm^3	191.3	415.3
Protein, mg / cm^3	11.47	1.91
Total protein, mg	4189.5	118.3
Total LA, units	69838.46	25748.25
Specific LA, units/mg	16.6	217.6
Degree of purification	of 1.0	13.0
Entrance, %	100.0	36.8

Основні стадії виділення лізоциму рослинного походження наведені у таблиці, з

якої видно, що сік *Armoracia rusticana* з концентрацією білка 11.47 mg/cm^3 та питомою активністю 16.6 од/мг був очищений до концентрації білка 1.91 mg/cm^3 із питомою активністю 217.6 од/мг.

Таким чином, метод, який використовували у роботі, дозволив отримати з 1 кг свіжих коренеплодів *Armoracia rusticana* до 60 мг препарату лізоциму. Субстанція являє собою гігроскопічний порошок білого кольору, добре розчинний у воді, за питомою ЛА подібний до найбільш активних аналогів лізоциму рослинного походження.

Як відомо з літературних джерел, молекулярна маса (Mr) найбільш поширеного лізоциму тваринного походження білка курячого яйця – 14.306 кДа. Mr рослинних лізоцимів – латексу папайї, фікусу, ріпи складають відповідно 28.0 кДа, 29.0 кДа, 25.0 кДа [8; 15]. Досліджуваний лізоцим має Mr 12.022 кДа, яку визначено за даними гель-електрофорезу у 15 % ПААГ із використанням

розрахункової калібрувальної кривої різного походження відносяться до (рис. 2, 3). Це свідчить про те, що лізоцими низькомолекулярних білкових речовин.

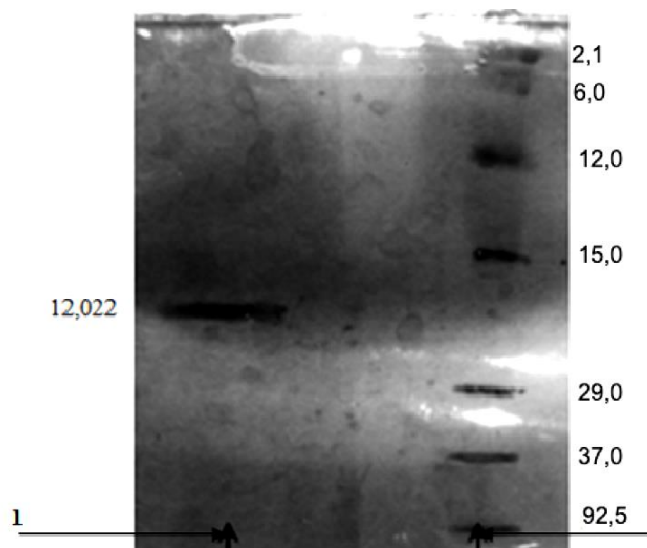


Fig. 2. Electrophoregram of isolated *Armoracia rusticana* lysozyme of root crops (molecular weight determination): 1 – lysozyme, 2 – standard markers

Рис. 2. Електрофореграма лізоциму *Armoracia rusticana*, виділеного з корнеплодів (визначення молекулярної маси): 1 – лізоцим, 2 – стандартні маркери

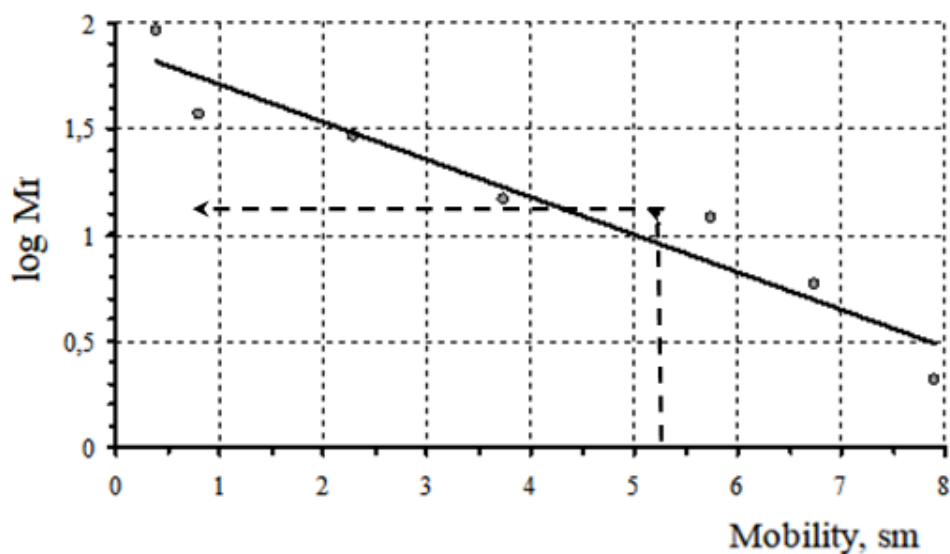


Fig. 3. Calibration curve for calculating the molecular weight of the isolated *Armoracia rusticana* lysozyme of root crops: phosphorylase B (92.5 kDa), BSA (37.0 kDa), egg albumin (15.0 kDa), carbohydrase (29.0 kDa), soy trypsin inhibitor (2.1 kDa), cytochrome C (12.0 kDa), cattle lung inhibitor (6.0 kDa)

Рис. 3. Калібрувальна крива для розрахунку молекулярної маси виділеного лізоциму корнеплодів *Armoracia rusticana*: фосфорілаза В (92.5 кДа), БСА (37.0 кДа), ячний альбумін (15.0 кДа), карбогідраза (29.0 кДа), інгібітор соєвого трипсіна (2.1 кДа), цитохром С (12.0 кДа), інгібітор легких КРС (6.0 кДа)

Визначення гомогенності білка у 15 % ПААГ показало присутність двох ізоформ лізоциму із M_r 12.022 кДа (рис. 4).



Fig. 4. Electrophoregram of isolated *Armoracia rusticana* lysozyme of roots

Рис. 4. Електрофореграма виділеного лізоциму коренів *Armoracia rusticana*

Висновки

Таким чином, одержано препарат лізоциму з сокової частини коренеплідів *Armoracia rusticana* із питомою активністю 217.6 од/мг, Мг якого складає 12.022 кДа. Вихід препарату лізоциму за сумарною ЛА складає 36.8 %. Отримані дані дозволяють прогнозувати перспективність використання *Armoracia rusticana* як джерела отримання лізоциму рослинного походження.

References

- [1] Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. (2015). Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv.*, 33(5):435–56. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.006.
- [2] Novykova, L. A., Faletrov, Ya. V., Kovaleva, Y. E., Mauersberger, Sh., Luzykov, V. N., Shkumatov, V. M. (2009). From the structure and function of steroid biosynthesis enzymes to new genetic engineering technologies. *Uspexy biologicheskoy khymy*, 49, 159–210.
- [3] Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto, C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M., Schomburg, D. (2013). BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D764–D772. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1049>.
- [4] Qiao J., Zhang M., Qi L. (2018). Dual-functional polymer-modified magnetic nanoparticles for isolation of lysozyme. *Analytica Chimica Acta*, 1035, 70–76.
- [5] Cornish-Bowden, A. (2013). The origins of enzyme kinetics. *FEBS letters*, 587(17), 2725–2730. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.009>
- [6] Goncharova, A.Y., Okulych, V. K., Zemko, V. Yu., Senkovych, S. A. (2019). Antimicrobial activity of lysozyme as a factor nonspecific resistance. *Vestnik VSMU*, 18(4), 40–45. <https://doi.org/10.22263/2312-4156.2019.4.4>
- [7] Krusir, G., Zakharchuk, V., Sevastyanova, E., Pylypenko, L., Mazurenko, K. (2021). Isolation of lysozyme of Black sea mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Chemistry and Technologies*, 29(3), 410–416.
- [8] Dekina, S. S. (2020). Biotexnologiya mukoadgezyvnykh lizocym-polimernyx system medychnogo pryznachennya, *National Academy of Sciences of Ukraine*, Kyiv.
- [9] Pesenceva, M.S. (2013). Enzymes of the marine mollusk *Littorina sitkana*: 1→3-β-D-glucanase, β-D-glucosidase, sulfatase and tyrosyl protein sulfotransferase, *Pacific Institute of Bioorganic Chemistry*, Vladivostok.
- [10] Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Timothy, M. Cogan M., Guinee, T. P. (2004). *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 1 ISBN 0–1226–3652-X Copyright © 2004, Elsevier Ltd.
- [11] Savyelyeva, N. M. (2017). Features of the clinic, diagnosis, treatment and prevention of generalized periodontitis in patients with parasitic invasion, DU "ISShhLX NAMN".
- [12] Dekina, S. S. (2020). [Biotechnology of mucoadhesive lysozyme-polymer systems for medical applications] (2020). dys. ...d-ra biol.nauk. (in Ukrainian).
- [13] Bachali, S., Bailly, X., Jolles, J., Jolles, P., Deutsch, J. S. (2004). The lysozyme of the starfish *Asteria rubens*. A paradigmatic type i lysozyme. *Eur. J. Biochem.*, 271, 237–242.
- [14] Rymareva, L.V., Serbyna, E.M., Sokolova, E.N., Borshheva, Yu.A. (2017). Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. *Voprosy pytannya*, 86(5), 62–74. doi: 10.24411/0042-8833-2017-00078
- [15] Xue Q., Hellberg M.E., Schey K.L., Itoh N., Eytan R.I., Cooper R.K., La Peyre J.F. (2010). A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC evolutionary biology*, 15(10), 213. doi: 10.1186/1471-2148-10-213.
- [16] Danylova, O., Serdyuk, M., Pylypenko, L., Pelykh, V., Lopotan, I., Yegorova, A. (2019). Screening of Agricultural Raw Materials and Long-term Storage Products to Identify Bacillary Contaminants. *Modern Development Paths of Agricultural Production*. SpringerLink, 641–654. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14918-5_63
- [17] Ovsepyan, A. M., Dekyna, S. S. (2016). Development of a method for isolating highly purified lysozyme from chicken egg protein. *Scientific youth conference "Problems and reach of modern chemistry"*, 71.
- [18] Dekina, S.S., Romanovska, I.I., Ovsepyan, A. M., Bodyul, M. G., Toptikov, V.A. (2015). Isolation and purification of lysozyme from the hen egg white. *Biotechnologia Acta*, 8(6), 41–47.
- [19] Dekina, S. S., Romanowska, I. I., Leonenko, I. I., Egorova, A. V. (2015). [Mucoadhesive gel with immobilized lysozyme: preparation, properties], *Biotechnologia Acta*, 8(3), 104–109. (in Ukrainian).
- [20] Natarova, N. O. (2001). Biologically active additives to fat. *ID «Vis»*.
- [21] Reshta, S. P., Pylypenko, L. M., Danylova, O. I. (2021). Physiological aspects of assessing the quality of grub products. *OLDI-PLYuS*.
- [22] Freitag, R., Hilbrig F. (2003). Protein purification by affinity precipitation. *Journal of chromatography B*, 790(1–2), 79–90.
- [23] Affinity Chromatography Principles and Methods Handbook. (2007). GE Healthcare Bio-Sciences AB. 18-1022-29 AE 10/2007

- [24] Skryabyna, K.G., Vyxorevoj, G.A., Varlamova, V.P. (2002). Chitin and chitosan: obtaining, properties and application. *Nauka*.
- [25] Romanovskaya, I., Dekina, S., Andronati, S. (2012). [Construction of immobilized protein substances]. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co. KG. (in Russian).
- [26] Kapustian A., Chernov N. (2019). Determination of complex forming ability of mixed-ligand organic systems relative to the metal ions. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. Series: Food Technologies 21 (91), 130-135. <https://doi.org/10.32718/nvlvet-f9122>.
- [27] Ylyna, A. V., Varlamov, V. P. (2003). Influence of the degree of acetylation on the enzymatic hydrolysis of chitosan by cellobiohydrolase G20x. *Prykladnaya biokhimiya y mykrobiologiya*, 3, 273–277.
- [28] Khandagle, A. (2017). Lowry method for protein estimation (Estimation of protein concentration in laboratory) <https://www.slideshare.net/AbhayKhandagle/lowry-method-for-protein-estimation>