

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ ИЗ ОТХОДОВ ПЕРЕРАБОТКИ ПТИЦЫ

В.Г. ВОЛИК, К.И. ЛОБЗОВ, Т.В. ДОЛГИХ, А.Я. БУЖЕНИНОВ, В.П. ТАРАКАНОВА
Научно-производственное объединение птицеперерабатывающей и клеежелатиновой промышленности "Комплекс"

Москва, СССР

Значительное увеличение производства мяса птицы создает прочную основу для заготовок сырья, являющегося источником биологически активных препаратов. Известно, что птица обладает большей интенсивностью роста и скороспелостью по сравнению с сельскохозяйственными животными, препараты из органов и тканей птицы имеют высокую биологическую активность и в некоторых случаях уникальную специфичность.

В последние годы возник дефицит в кислых протеиназах из животных тканей. Начались поиски эффективных заменителей наиболее ценного из них - сычужного фермента.

Наряду с другими исследованиями [1,2,3,4], проведенные нами исследования показали, что куриный и утиный пепсины наиболее близки по своим молокосвертывающим свойствам к сычужному ферменту [5,6].

В настоящее время медицинская промышленность СССР выпускает более десяти препаратов на основе свиного пепсина и один препарат на основе сычужного фермента для лечения ряда заболеваний желудочно-кишечного тракта (ахилии, гипо- и анацидного гастритов, гастроэнтеритов и энтероколитов). Наибольшим лечебным эффектом обладает препарат на основе сычужного фермента.

Результаты проведенных нами ранее исследований молокосвертывающих свойств куриного и утиного пепсинов явились предпосылкой для изучения кислых протеиназ из животного сырья с целью выяснения возможности использования пепсинов из железистых желудков птицы в медицине.

Использовали концентраты куриного и утиного пепсинов, полученных в соответствии с разработанной нами технологией [5,6]. Концентраты очищали методом ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе. Фракции, в которых предполагалась протеолитическая активность, собирали и обессоливали на сефадексе G-25.

Для разделения пепсинов был использован метод изоэлектрической фокусировки на амфолинах [7].

Активные фракции объединяли, предварительно удалив амфолины путем пропускания раствора через колонку с сефадексом G-25.

Аминокислотный состав пепсинов определяли по методу Мура и Штейна [8]. Протеолитическую активность пепсинов определяли по гидролизу гемоглобина [9]. Определение пептидазной активности пепсинов проводили при pH 1,95 [10].

Устойчивость ферментов исследовали в области pH 6,0-II,0. Раствор фермента инкубировали в фосфат-цитратном буфере с требуемым значением pH, остаточную активность определяли по методу гидролиза гемоглобина.

В результате проведенных исследований был установлен более высокий выход пепсинов из железистых желудков птицы, чем из слизистой оболочки крупного рогатого скота.

Выход ферментного препарата (кг на 1 т мяса)

Т а б л и ц а I

Показатели	Выход стандартного препарата
Выход говяжьего пепсина	0,25
Выход куриного пепсина	1,00
Выход утиного пепсина	0,64

При очистке куриного и утиного пепсинов на хроматограммах получены две белковые фракции, первая из которых не обладает активностью и является смесью неактивных белков и полипептидов, вторая - активна и является собственно пепсином.

При повторной хроматографии второй фракции пепсины выходят из колонки в виде хроматографически однородного белкового пика.

При электрофокусировке после ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе получено три фракции куриного и две фракции утиного пепсина.

С помощью метода изоэлектрофокусировки установлена изоэлектрическая точка куриного и утиного пепсинов $I = 3,5$, $II = 3,6$.

Индивидуальные фракции пепсинов представляют интерес с точки зрения их дальнейшего изучения.

Определен аминокислотный состав куриного и утиного пепсинов. Установлено, что куриный пепсин содержит 35 свободных карбоксильных и 17 основных групп, утиный - 30 карбоксильных и 11 основных.

Куриный и утиный пепсины являются менее кислыми белками, чем свиной и говяжий (свиной содержит 40 свободных карбоксильных и 5 основных групп, говяжий - 38 карбоксильных и 4 основных).

Для характеристики пепсинов важными показателями являются молекулярный вес, N-концевые аминокислоты, pH оптимума действия, способность гидролизовать гемоглобин, казеин и ди-, три-, и тетрапептиды. Результаты представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Сравнительная характеристика пепсинов из животного сырья

Физико-химические показатели	П е п с и н ы			
	говяжий	свиной	куриный	утиный
Молекулярный вес по аминокислотному составу	36000	35000	34000	32000
N-концевая аминокислота	Валин	Изолейцин	Треонин	Аланин
pH оптимума действия (по гидролизу гемоглобина)	2,0	1,8-2,0	2,0	2,0-2,2
Гидролиз субстрата (свиной пепсин принят за 100%), % :				
гемоглобин	60	100	150	120
казеин	70	100	150	140
Синтетические субстраты (пептиды), %	58	100	25	12

Как следует из приведенных данных, протеолитическая активность куриного и утиного пепсинов выше, чем говяжьего и свиного.

Пептидазная активность (способность гидролизовать синтетические субстраты) куриного и утиного пепсинов значительно ниже, чем говяжьего и свиного. Низкая пептидазная активность характерна для сычужного фермента.

Изучение устойчивости пепсинов показало, что свиной пепсин инактивируется при pH 6,8 и 35°C за несколько минут. Говяжий пепсин инактивируется при pH 8,0, сычужный фермент - при pH 8,7, куриный - при 9,5, утиный - при pH 10,7. Куриный и утиный пепсины значительно стабильнее, чем сычужный фермент. Так, при pH 7,8 за 30 мин инкубирования сычужный фермент теряет 90% активности, куриный - 20%, а утиный пепсин сохраняет активность полностью.

При ахилии, гипо- и анацидном гастритах наблюдается понижение кислотности желудочного сока, поэтому наиболее эффективными будут те препараты, которые сохраняют большую активность при сдвиге pH в нейтральную зону. Этим объясняется предпочтение медицинскому препарату на основе сычужного фермента по сравнению с препаратами на основе свиного пепсина.

Наряду с высокой устойчивостью, куриный и утиный пепсины имеют наивысшую протеолитическую активность по сравнению с остальными ферментными препаратами из животного сырья. Сочетание этих двух показателей в курином и утином пепсинах предопределяет их терапевтический эффект.

Желчь животных традиционно пользуется большим вниманием в медицине. В состав желчи входят вода, желчные кислоты, пигменты, витамины, стероидные гормоны, нейтральный жир, мочевины, мочевая кислота, причем состав желчи различен у разных видов животных и птиц.

В последние годы возник повышенный интерес к хенодезоксихолевой кислоте (ХДХК), которая способствует рассасыванию образований на холестериновой основе в желчных путях. Причем наибольший эффект наблюдается при использовании ХДХК из желчи птиц [11,12].

ХДХК из желчи можно получить двумя путями: фракционированием желчи, в которой содержится большой процент ХДХК [13]; из холевой кислоты методом частичного синтеза [14].

Определение содержания ХДХК в желчи проводили методом тонкослойной хроматографии [15].

Получали ХДХК на основе нескольких способов [13,14,16].

Провели сравнительный анализ состава желчи разных видов животных и птицы. Результаты изложены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

Сравнительные данные выхода желчи и хенодезоксихолевой кислоты у сельскохозяйственных животных и птицы

Показатели	ВИДЫ животных и птицы			
	крупный рогатый скот	мелкий рогатый скот	свиньи	куры и цыплята
Количество желчи в желчном пузыре, г	160	30	45	1,5
Выход желчи на 1 т массы, г	1220	754	577	1500
Содержание сухих веществ в желчи, %	9,6	9,6	11,2	20,0
Содержание сухих веществ в желчи на 1 т массы, г	116,5	72,4	64,6	300
Содержание хенодезоксихолевой кислоты в сухом остатке желчи, %	0,5	0,5	-	85
Содержание хенодезоксихолевой кислоты в сухом остатке желчи на 1 т массы, г	5,08	0,36	-	255

Из приведенных данных видно, что содержание ХДХК в желчи птицы выше, чем у сельскохозяйственных животных как в абсолютных величинах, так и в пересчете на 1 т массы.

При выделении ХДХК из желчи птиц наибольшего внимания требует процесс удаления пигментов. Лучшие результаты получены при использовании комбинированных методов очистки.

Литература

1. Herriot R.M. "J. Gen. Physiol.", 21, 575, 1938.
2. Левчук Т.П., Орехович В.Н. "Биохимия", 28,6,1963.
3. Bohak Z. "J. Biol. Chem.", 244, 17, 4638, 1969.
4. Vunakis V.N. "Biochemistry", 9,14, 2791, 1970.
5. Волик В.Г., Долгих Т.В., Лобзов К.И., Новгородова Н.С. Материалы XXIII Европейского конгресса научных работников мясной промышленности. М., 1977.
6. Волик В.Г., Долгих Т.В., Лобзов К.И., Мухтаров Э.И. Материалы XXIV Европейского конгресса научных работников мясной промышленности. Будапешт. 1979.
7. Furlond C.E., Weiner J.H. "Bioch. and Biophys. Reseach. Com.", 3,10,76, 1970.
8. Moore S., Steer W.H. "J.Biol. Chem", 211, 907, 1954.
9. Ryle A.P., Porter R.R. "J. Biochem.", 73, 73, 1959.
10. Новгородова Н.С., Бузов И.П., Неберт В.К., Уманский М.С., Долгих Т.В. "Прикладная биохимия и микробиология", 13,4, 1977.
11. Dawling. "Hepatobilliary Syst. Fundam. and Pathol. Meeh.", New York, London, 485-501, 1976.
12. Pellisser E. et al. "Chirurgie", 104, 8, 775-779, 1978.
13. Seltzman W. "Separating bilr acids and their animal bile", 1976.
14. Султанов З.З. "Методы получения активных солей отдельных желчных кислот и их активность в отношении некоторых энтеробактерий". Автореферат, 1970.
15. Райцис А.Б., Смоголь В.А. Известия АН Латвийской ССР, 7,142-143, 1975.
16. Блюгер А.Ф. Авторское свидетельство № 2598409 "Способ экстракции желчных кислот", 1979.