

кий Схід (1990), Моравський Крас і Велика Угорська долина (1995) та ін.), з яких до Ботанічного саду привозила цінні для колекції рослини кизильників, що були висаджені на спеціально відведеній ділянці. У нових умовах рослини потребували старанного догляду, і Ганна Терентіївна доклала максимум зусиль, щоб забезпечити кожній із них оптимальні умови росту і розвитку, зуміла налагодити роботу з догляду за колекцією, вивчила еколого-біологічні властивості інтродукованих кизильників, установила їхні адаптаційні можливості, здійснила селекційну роботу окремих видів як посухостійкої підщепи для груші, яблуні та айви з перспективами використання у зеленому будівництві при створенні садів та лісосадів на непридатних та порушених територіях, у фітомеліорації та фармакогнозії.

Кабінет Ганни Терентіївни заставлено книжковими шафами, на робочому столі очікують своєї черги рукописи, гербарні збори, статті для рецензування, нові публікації. Стіни кабінету прикрашено українським вишитим рушником, Почесними грамотами та подяками, фотографіями, що нагадують про знахідки кизильників у природній флорі України та далеко за межами нашої країни.

Ганна Терентіївна завжди радо приймає усіх, готова кожному допомогти словом і ділом. Вона підготувала 9 кандидатів біологічних наук, які засвоїли її крилатий вислів: "Роби неможливе – й отримаєш можливе". Для аспірантів та пошуковців вона завжди є не тільки досвідченим і вимогливим науковим керівником, а й чуйною і мудрою людиною, яка передає їм свої знання та досвід, піклується про них, підставляє своє плече допомоги, надихає на плідну працю. Ганна Терентіївна приділяє багато уваги навчально-виховній роботі, не одне покоління студентів вишів Києва щорічно практикується на ділянці рослин роду *Cotoneaster*, а ландшафтні дизайнери охоче переймають досвід упровадження цих рослин в озеленення.

Як науковець і куратор колекції, Ганна Терентіївна вкладає багато сил у розбудову Ботанічного саду, упродовж половини століття перебуває в центрі колективного життя, самовіддано займається улюбленою справою, плідно співпрацює з науковцями Великої Британії, Франції, Німеччини, Чехії, Польщі та інших країн із питань систематики роду *Cotoneaster*, підтримує тісні контакти з колегами ботанічних садів України, проводить дослідження в Інституті ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Ганна Терентіївна Гревцова – ветеран Київського національного університету імені Тараса Шевченка. За визначні досягнення в галузі науки й освіти нагороджена відзнакою НАН України "За підготовку наукової зміни" (2009), грамотою "За особливі заслуги перед КНУ імені Тараса Шевченка" (2004, 2009, 2014, 2015), Почесною грамотою Київського міського голови (2005), медалями "Ветеран праці" (1988), "У пам'ять 1500-річчя Києва", орденом "Святої великомучениці Варвари" (2008), а в 2017 році за особливі заслуги перед українським народом нагороджена Грамотою Верховної Ради України.

Відомості про Г.Т. Гревцову можна знайти у таких літературних джерелах: 1. Жінки-вчені Києва. – К., 2003. 2. Київський літопис XXI століття. Україні незалежній 20. Ювілейні сторінки. – К., 2011. 3. Наукові записки КНУ імені Тараса Шевченка. Т. II. Біологічний факультет. – К., 2004. 4. Українській технологічній академії 15 років. – К., 2001.

Колеги та численні учні бажають Ганні Терентіївні доброго здоров'я на довгі та щасливі роки, бадьорості духу, зацікавленості в житті та невичерпної енергії для втілення нових творчих задумів на ниві ботанічної науки.

Надійшла до редколегії 06.05.19

УДК 595.3.574

М. Абрамова, студ.,
Н. Ракша, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ ЩОДО ОДЕРЖАННЯ ЦІЛЬОВИХ БІЛКІВ ІЗ ГІДРОБІОНТІВ АНТАРКТИЧНОГО РЕГІОНУ

Ферменти з організмів, адаптованих до існування при низьких температурах середовища, привертають значну увагу науковців як потенційно перспективні об'єкти не лише із практичного погляду, а і як цінні інструменти для проведення фундаментальних досліджень. Це обумовлено незвичайними умовами навколишнього середовища (низька температура, високий гідростатичний тиск, слабка освітленість), а також значним рівнем економічної рентабельності, що зумовлена широкою розповсюдженістю морських гідробіонтів та високою продуктивністю психрофільних ферментів порівняно з їх мезо- та термофільними аналогами. Про доцільність використання гідробіонтів Антарктичного регіону *Parborlasia corrugatus* та *Stereichinus neumayeri*, як джерел для одержання ферментів, свідчать результати попереднього ензим-електрофоретичного аналізу, відповідно до яких, загальний екстракт тканин гідробіонтів містив низку ферментів, що виявляли активність щодо желатину та фібриногену. У результаті поєднання декількох хроматографічних стадій, які включали афінну хроматографію на колонці з носієм Blue Sepharose 6 FF та хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонках з носіями Superdex 75 PG та Superdex 200 PG із загального екстракту тканин *Parborlasia corrugatus* та *Stereichinus neumayeri* одержано фракції, що містили гідролітичні ферменти. Із загального екстракту тканин обох досліджуваних гідробіонтів було виділено 4 фракції, що виявляли желатиназну активність. Також із тканин гідробіонта *Stereichinus neumayeri* виділено фракцію, що містила високомолекулярні ферменти, здатні розщеплювати фібриноген. Розроблену методику двостадійної хроматографії можна використати в подальшому як основу для одержання ферментів аналогічного спектра дії з інших об'єктів.

Ключові слова: гідробіонти Антарктичного регіону, хроматографія, ензим-електрофорез.

Вступ. Серед нагальних потреб сучасної біоорганічної хімії можна виокремити проблему пошуку нових джерел біологічно активних сполук, як основи для створення оригінальних та ефективних фармакологічних засобів. Істотний дефіцит сировини для фармацевтичної індустрії і, відповідно, постійно зростаюча ціна на лікарські засоби, основу яких становлять досить кошто-

вні речовини рослинного та тваринного походження, а також переоцінювання традиційних підходів щодо експлуатації ресурсів Світового океану, привернули увагу дослідників до морських гідробіонтів. Серед продуктів життєдіяльності морських організмів виділяють ряд сполук, які становлять певний інтерес для фарміндустрії. Одним із перспективних напрямків в області ство-

рення нових препаратів є розробка засобів на основі білкових молекул. Слід відмітити, що кожного року інтерес до препаратів білкового походження стабільно зростає, з'являється багато рекомендацій, розробок та наукових публікацій щодо перспективності впровадження нових технологій виробництва біотехнологічних продуктів на основі білків та пептидів, отриманих не лише як цільовий, але й як побічний продукт під час переробки основної сировини [5, 9, 10]. Зважаючи на рентабельність, розповсюдженість та відтворюваність морських біоресурсів будуть посилюватися тенденції щодо їх активного використання у медицині, косметології, харчовій промисловості та агропромисловій галузі порівняно із традиційними джерелами сировини. Ще одним важливим аргументом на користь використання морських гідробіонтів як джерела сировини білкового походження є відсутність так званих "споживчих ризиків" – "коров'ячого сказу", "ящуру", "пташиного грипу" та їх генетичних модифікацій на відміну від сировини тваринного походження. Особливості існування морських організмів, на життєдіяльність яких безпосередньо впливає ряд факторів, зокрема, солоність океанічних вод, низьке освітлення або повна його відсутність, гідростатичний тиск та коливання температур, обумовлюють не лише значне структурно-функціональне різноманіття метаболітів, а також присутність ферментів із низкою унікальних властивостей, що становить певний інтерес як для наукових досліджень, так і для промислового застосування. Гідролази гідробіонтів холодних кліматичних зон мають, як правило, дещо ширшу субстратну специфічність, значно вищу загальну протеолітичну активність [4], а також здатні проявляти активність при нижчих температурах, ніж їх мезо- та термофільні аналоги. Вказані фактори обумовлюють перспективність застосування гідробіонтів у медицині, біотехнології, різних галузях харчової промисловості. Зважаючи на певні відмінності фізико-хімічних та біологічних характеристик метаболітів з морських організмів від традиційних фармакологічних субстанцій, оптимізація існуючих та розробка нових методів їх виділення, а також вивчення їх властивостей, без перебільшення можна віднести до одного з пріоритетних напрямків розвитку науково-технологічного прогресу.

З огляду на викладене, метою нашої роботи було оптимізувати методологічні підходи щодо одержання із тканин гідробіонтів з Антарктичного регіону білкових молекул.

Матеріали та методи. У роботі використано два об'єкти – представник родини *Cerebratulidae* Антарктична немертина *Parborlasia corrugatus* та представник родини *Echinidae* Антарктичних морський їжак *Sterechinus neumayeri*. Харчові звички немертини та їжака є досить схожими, організми навіть часто асоціюють між собою для більш ефективного полювання та захисту від хижаків [2, 8]. Об'єкти для дослідження люб'язно надано Національним антарктичним науковим центром. Зразки зібрано біля острова Галіндез (географічні координати – 65° 15' південної широти, 64° 15' західної довготи) архіпелагу Аргентинських островів. Солоність води біля острова становила 28.4–32.2 ‰, температура 1.1–0.8 °C. Матеріал було зібрано в рамках XVII, XVIII Українських антарктичних експедицій у березні 2012 – квітні 2013 років та березні 2013 – квітні 2014 відповідно. Для отримання екстракту м'які тканини гідробіонтів гомогенізували у 100 мМ Na-фосфатному буферному розчині (pH 7,4), що містив 150 мМ NaCl, 0,15 мМ EDTA, 2 мМ ПМСФ та 0,1 % тритон X-100, послідовно додаючи рідкий нітроген. Після центрифугування при 10000 g, 40 хв, надосадову рідину температурою

4 °C відбирали та ліофілізували. Очищення загального екстракту тканин проводили за допомогою методу хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці з носієм Sephadex G 25 та афінної хроматографії, використовуючи носій Blue Sepharose 6FF. У подальшому фракції очищали методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на носіях із вищою здатністю до розділення молекул, а саме Superdex 200 PG та Superdex 75 PG. Після кожного етапу хроматографічної очистки перевіряли наявність в отриманих фракціях активних ферментів за допомогою методу ензим-електрофорезу відповідно до протоколу [7]. Розділяючий гель полімеризували за присутності желатину або фібриногену з розрахунку 1 мг/мл. Електрофоретичний поділ білків проводили відповідно до методу Лемлі. Електрофореграми фарбували відповідно до протоколу фірми AlphalyseTM [6].

Результати та їх обговорення. Заморожену масу тканин гідробіонтів гомогенізували у рідкому азоті з додаванням екстрагуючого буферного розчину у співвідношенні 5 мл буферу на кожні 10 г матеріалу, після чого центрифугували при температурі 4°C, 10000 g, 20 хв. Для екстракції з тканин гідробіонтів білків було використано 100 мМ Na-фосфатний буферний розчин (pH 7,5), оскільки застосування саме даного буферу забезпечувало найвищий ступінь екстракції білків [3]. З метою збереження стабільності та функціональної активності білків до буферного розчину додавали 0,15 мМ EDTA, 2 мМ ПМСФ та 0,1 % тритон-X-100. Після центрифугування надосадову рідину ліофілізували і використовували при подальших маніпуляціях як загальний екстракт тканин, попередньо розчинивши у відповідному буферному розчині. За необхідності ліофілізат заморожували і зберігали при –20 °C. З метою очищення загально екстракту від солей, інгібіторів та можливих домішок одержаний ліофілізат перед проведенням досліджень піддавали очищенню методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм Sephadex G 25.

Для отримання вихідної інформації про наявність у загальних екстрактах тканин гідробіонтів активних ферментів застосовано метод ензим-електрофорезу. Отримані результати представлено на рис. 1.

Оскільки желатин є універсальним субстратом для багатьох протеолітичних ферментів, його використовують при попередньому оцінюванні наявності у зразках активних ферментів. Фібриноген є більш специфічним субстратом, оскільки до його гідролізу здатні не всі ферменти, і саме використання фібриногену, заполімеризованого у розділяючий гель, дозволяє визначити наявність чи відсутність ферментів із фібриногенолітичною активністю. Візуальне порівняння ензим-електрофореграм (рис. 1) дозволяє зробити висновок про вищу активність ферментів із *S. neumayeri* щодо фібриногену та желатину. Ферменти з *P. corrugatus* також виявляли желатино- та фібриногенолітичну активність, проте їх активність була дещо менше виражена порівняно з результатами для *S. neumayeri*. Як бачимо із представлених електрофореграм, зразки тканин досліджуваних гідробіонтів містили активні ферменти у діапазоні з молекулярних мас від 30 кДа до 100 кДа. Отже, з огляду на одержані результати, можна стверджувати, що вибрані об'єкти містили активні ферменти, які потенційно можуть використовуватися у біотехнологічному виробництві. Наприклад, фібриногенолітичні ферменти застосовують під час виробництва медичних препаратів для лікування та профілактики захворювань серцево-судинної системи. Ферменти з активністю щодо желатину можуть бути використані у харчовій та легкій промисловості.

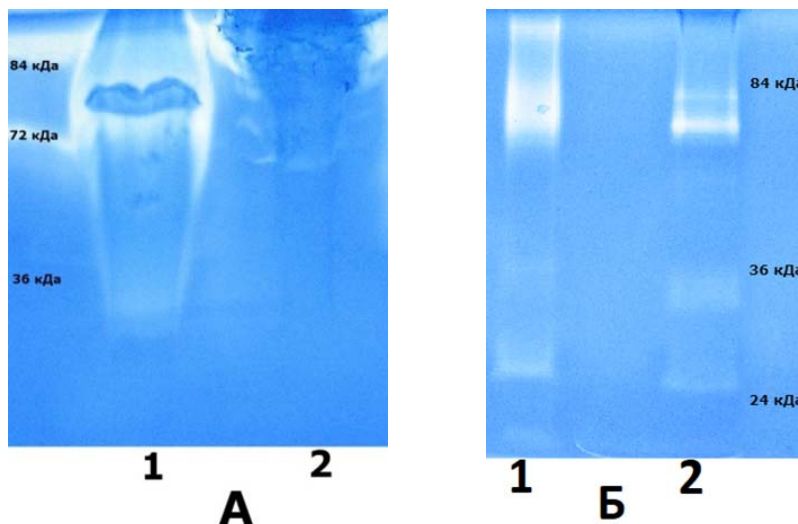


Рис. 1. Ензим-електрофореграми розділення білків загальних екстрактів тканин гідробіонтів із використанням як субстрату желатину (А) та фібриногену (Б):
1 – Антарктичний морський їжак *S. neumayeri*; 2 – Антарктична немертина *P. corrugatus*

З огляду на зазначене, перспективним видавалося виділити із загального екстракту тканин гідробіонтів окремі ферменти, що і визначило наступне завдання нашої роботи. Спочатку загальний екстракт тканин очищали методом афінної хроматографії на колонці з носієм Blue Sepharose 6 FF, який як ліганд містить Cibacron™ Blue F3G-A. Відносно широка специфічність ліганду до різних груп білків обумовлює його застосування на етапі очищення різних ферментів. Окрім того, Cibacron™ Blue F3G-A є відносно дешевим, синтез сорбентів на його основі методично простий, а ємність такого сорбенту на порядок вища, порівняно з іншими афінними сорбентами [1]. Як вихідний матеріал для виділення ферментів використано ліофілізовану білкову фракцію, отриману після етапу очистки на колонці із Sephadex G 25. Ліофілізат розчиняли у 10 мМ

трис-НСІ буфері, рН 8,0 та наносили на колонку, урівноважену цим же буфером. Швидкість нанесення становила 1 мл/хв, оскільки саме така швидкість є оптимальною для максимального зв'язування молекул білка у пробі з лігандами носія. Після відмивання сорбенту від не зв'язаного матеріалу, білки, що зв'язалися з носієм, елюювали із використанням 10 мМ трис-НСІ буферу, рН 8,0, що містив 1 М NaCl, швидкість елюції складала 2 мл/хв. Різке підвищення іонної сили буферу зумовлювало розривання зв'язків типу ліганд-молекула. Варто підкреслити, що у білковому матеріалі, що не зв'язався з носієм на цьому етапі очистки, а це близько 75-80 % від вихідного, було виявлено лише слідові залишки фібриногенолітичної активності. Отримані хроматограми представлено на рис. 2 і 3.

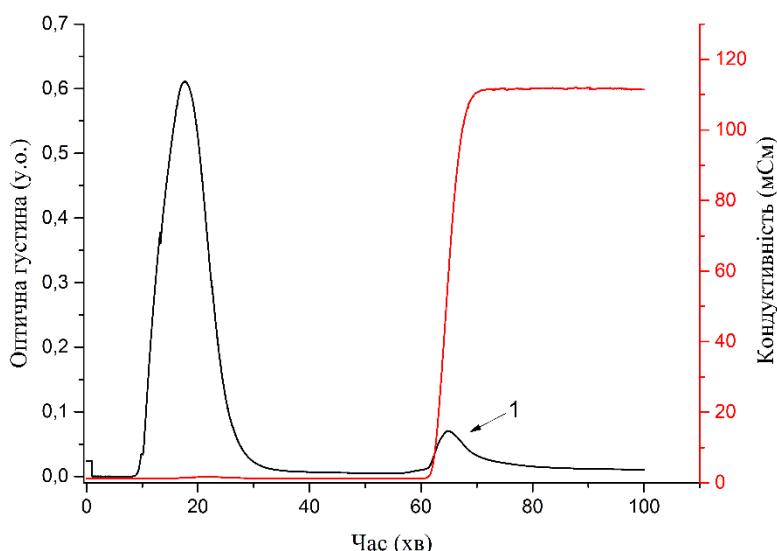


Рис. 2. Хроматограма розділення загального екстракту тканин *P. corrugatus* методом афінної хроматографії на колонці з носієм Blue Sepharose 6FF:
1 – зв'язана фракція, що містить ферменти з желатино- та фібриногенолітичною активністю

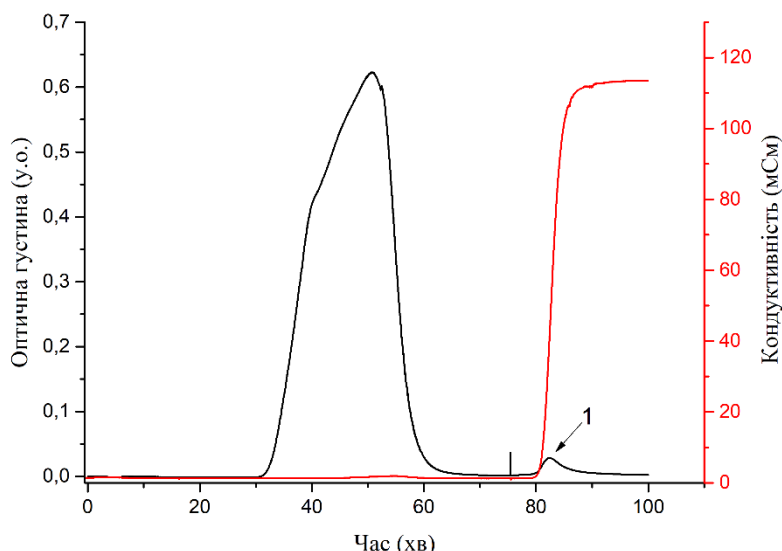


Рис. 3. Хроматограма розділення загального екстракту тканин *S. neimayeri* методом афінної хроматографії на колонці з носієм Blue Sepharose 6FF:

1 – зв'язана фракція, що містить ферменти з желатино- та фібриногенолітичною активністю

На рис. 4 представлено електрофореграму розділення білків фракцій, зібраних після етапу афінної хроматографії на колонці з носієм Blue Sepharose 6 FF. У зв'язаній фракції з екстракту тканин *P. corrugatus* ідентифіковано один білок з молекулярною масою приблизно 20 кДа. Цей білок, з огляду на результати ензим-електрофореграми (рис. 5) виявляв

желатинолітичну активність. У зв'язаній фракції *S. neimayeri* виявлено близько 5 низькомолекулярних білків із молекулярною масою від 10 кДа до 25 кДа. З ензим-електрофореграми (рис. 5) видно, що у виділеній фракції наявні як желатино- так і фібриногенолітична активності, на відміну від *P. corrugatus*, ферменти якої здатні розщеплювати лише желатин.

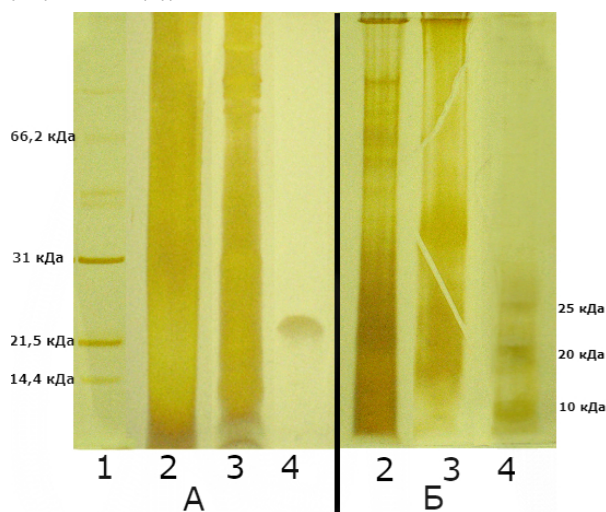


Рис. 4. Типова електрофореграма розділення білків загального екстракту тканин *P. corrugatus* (А) та *S. neimayeri* (Б) методом афінної хроматографії на колонці з носієм Blue Sepharose 6 FF :
1 – маркери молекулярних мас; 2 – загальний екстракт тканин; 3 – фракція білків, що не зв'язались із носієм; 4 – фракція білків, що зв'язались із носієм

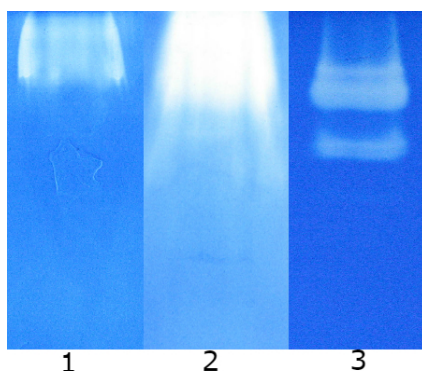


Рис. 5. Ензим-електрофореграма розділення білків загального екстракту тканин гідробіонтів методом афінної хроматографії на колонці з носієм Blue Sepharose 6 FF: 1 – *S. neimayeri* (субстрат желатин); 2 – *S. neimayeri* (субстрат фібриноген); 3 – *P. corrugatus* (субстрат желатин)

Отже, проведений етап дослідження показав, що зв'язані фракції обох досліджуваних гідробіонтів містили активні гідролітичні ферменти, здатні розщеплювати фібриноген та желатин. Метою наступного етапу дослідження було виділити з отриманих на попередньому етапі фракцій ферменти з максимальним збереженням їх структурних та функціональних характеристик. Для цього використано хроматографію, що поділяє за розмірами. Поділ фракції *P. corrugatus* було проведено на колонці з носієм Superdex 200 PG. Носій характеризується діапа-

зоном поділу від 5 кДа до 600 кДа, що дозволяє ефективно поділити суміш білків у зазначеному діапазоні молекулярних мас. Як вихідний матеріал використано фракцію після етапу очищення методом афінної хроматографії. Було зважено 0,5 г ліофілізату зв'язаної фракції і розчинено у 4 мл буферного розчину 50 мМ трис-НСІ (рН 7,4), що містив 0,07 М NaCl, необхідний для запобігання затримуванню білків із сорбентом. Швидкість потоку становила 0,75 мл/хв. У результаті хроматографічного розділення отримано 5 фракцій (рис. 6).

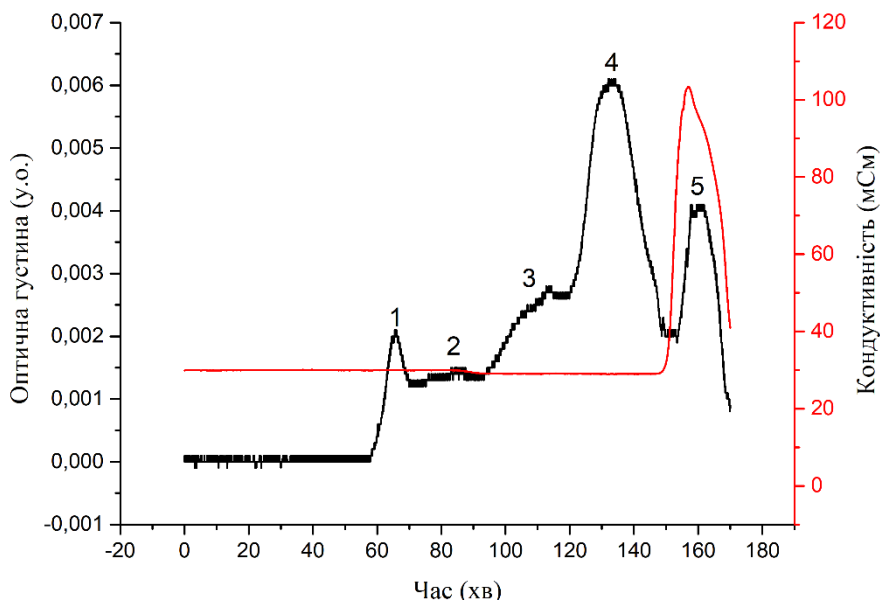


Рис. 6. Хроматограма розділення білків фракції з тканин *P. corrugatus*, одержаної після етапу афінної хроматографії, методом хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці з носієм Superdex 200 PG: 1–5 є номерами одержаних фракцій

Для перевірки присутності у фракції активних ферментів застосовано метод ензим-електрофорезу з желатином, заполімеризованим у розділяючий гель, оскільки на попередньому етапі роботи було визначено, що ферменти у зв'язаній фракції виявляли лише желатиналітичну

активність. Аналіз отриманої ензим-електрофореграми (рис. 7) дозволяє зробити висновок про те, що всі отримані на цьому етапі фракції, окрім останньої, містять ферменти з желатиназною активністю.

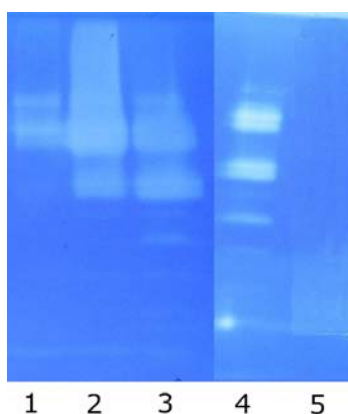


Рис. 7. Ензим-електрофореграма розділення білків *P. corrugatus* у фракціях, отриманих методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм Superdex G 200, субстратний білок желатин. Порядковий номер треку збігається з порядковим номером фракції

Для виділення ферментів з Антарктичного морського їжака використано хроматографію, що поділяє за розмірами на колонці з носієм Superdex 75 PG. Носій дозволяє проводити очищення білків у діапазоні молекулярних мас від 3 до 70 кДа. На колонку, урівноважену 50 мМ трис-НСІ буферним розчином (рН 7,4), наносили зв'язану фракцію. Швидкість потоку складала 0,75

мл/хв, що є оптимальною для ефективного розділення білків проби. У результаті зібрано шість фракцій відповідно до піків, які зображено на рис. 8. Як бачимо, на останньому піці кондуктивність зростала до 100 мСм, що свідчить про вихід небілкових фракцій. З огляду на це, відбирання подальших фракцій є нераціональним.

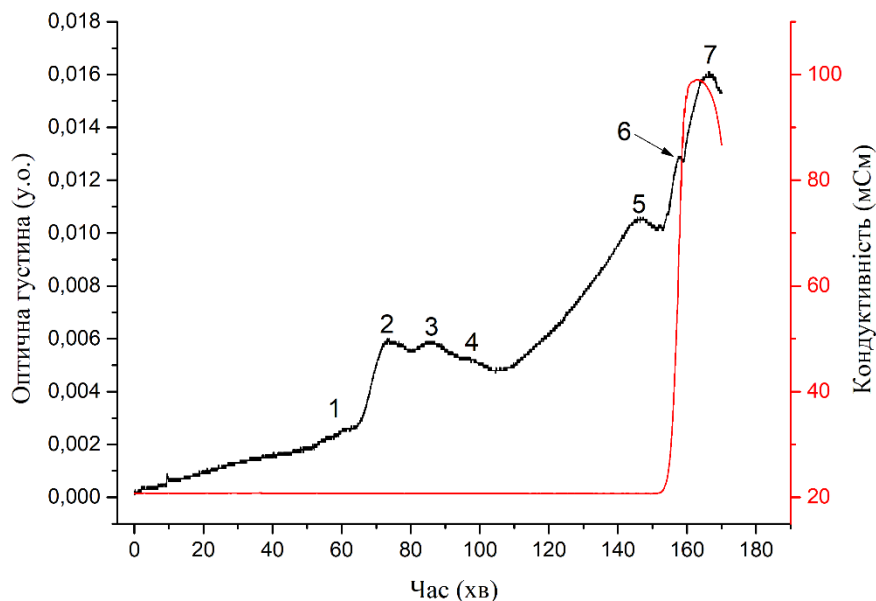


Рис. 8. Хроматограма розділення білків фракції із тканин *S. neumayeri*, одержаної після етапу афінної хроматографії, методом хроматографії, що поділяє за розмірами на колонці з носієм Superdex 75 PG: 1–7 є номерами одержаних фракцій

Отримані фракції аналізувались на наявність ферментативної активності методом ензим-електрофорезу із заповнітим розділюючим гелем желатином чи фібриногеном. Отримані результати зображено на рис. 9.

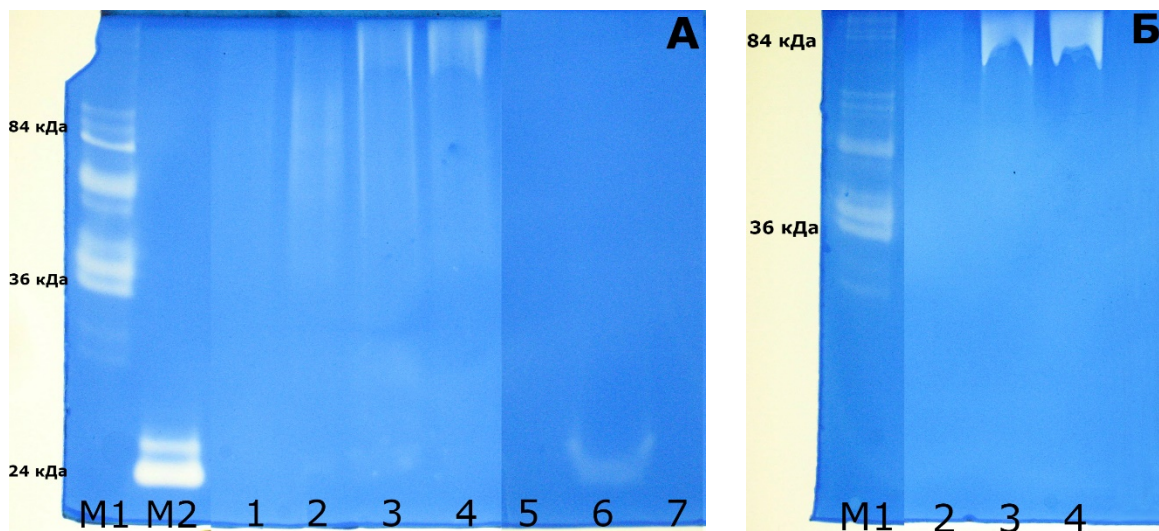


Рис. 9. Ензим-електрофореграма розділення білків *S. neumayeri* у фракціях, отриманих методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на колонці з носієм Superdex G 75, субстратні білки – желатин (А) і фібриноген (Б), М1 – плазмін, М2 – трипсин, порядковий номер треку збігається з порядковим номером фракції

Аналізуючи ензим-електрофореграми, отримані при очищенні *S. neumayeri* методом хроматографії, що поділяє за розмірами, можна сказати, що ферментний пул організму налічував молекули, що виявляють як желатинолітичну, так і фібриногенолітичну активності. Желатинолітичну активність було виявлено у 4 фракціях (номер 2–4 і 6). Фракції з 2 по 4 містили високомолекулярні білки з молекулярною масою близько 90 кДа, фракція під номером 6 налічувала лише один білок із молекулярною масою близько 24 кДа. У фракції номер 1 виявлено низьку желатинолітичну активність, що можна пояснити наявністю слідових кількостей ферментів із наступної фракції. Згідно з одержаними результатами, фібриногенолітичні ферменти наявні лише у двох піках (номер 3 і 4), а також присутні у слідовій кількості

у фракції номер 2. Виділені ферменти мають молекулярну масу близько 85 кДа.

Висновки. Отримані результати свідчать, що гідробіонти Антарктичного регіону, зокрема Антарктичний морський їжак *Sterechinus neumayeri* та Антарктична немертина *Parborlasia corrugatus*, потенційно можуть бути використані як джерело протеолітичних ферментів. Двостадійний метод хроматографічного очищення, який поєднує етапи афінної хроматографії та хроматографії, що поділяє за розмірами, є ефективним, простим, відносно дешевим і таким, що може бути оптимізованим для роботи з іншими організмами. Одержані нами результати обґрунтовують доцільність проведення подальших досліджень, спрямованих на детальне вивчення властивостей отриманих ферментів.

Список використаних джерел:

1. Affinity chromatography: principles and methods, 2007. – 157 с. – (GE Healthcare).
2. Gibson R. Antarctic nemerteans: The Anatomy, Distribution and Biology of *Parborlasia corrugatus* (McIntosh, 1876) (Heteronemertea, Lineidae) / R. Gibson // Biology of the Antarctic Seas XIV. – 1983. – № 39. – С. 289–316.
3. Gladun D. V. Physico-chemical and catalytic properties of trypsin-like and fibrinogenolytic enzymes from Antarctic sea scallop *Adamussium colbecki*: dis. cand. of biol. sciences: 03.00.04 / Gladun D. V. – Kyiv, 2017. – 195 с.
4. Klomklao S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications / S. Klomklao // Songklanakarin J. Sci. Technol. – 2008. – № 30. – С. 37–46.
5. Oil from Antarctic krill (*Euphausia superba*) facilitates bone formation in dexamethasone-treated mice / L. Mao, F. Wang, Y. Li et al. // Food Sci Biotechnol. – 2018. – № 28. – С. 539–545.
6. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis / E. Mortz, T. N. Krogh, H. Vorum, A. Görg // Proteomics. – 2001. – № 1. – С. 1359–1363.
7. Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2011. – № 2. – С. 20–26.
8. Pearce J. S. Food, reproduction and organic constitution of the common antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri* (meissner) / J. S. Pearce, A. C. Giese // Biological Bulletin. – 1966. – № 130. – С. 387–401.
9. New fibrinogenase isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki* / N. Raksha, D. Gladun, T. Vovk et al. // Journal of Biochemistry International. – 2016. – № 3. – С. 9–18.
10. Peptides from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) improves osteoarthritis via inhibiting HIF-2 α mediated death receptor apoptosis and metabolism regulation in osteoarthritis mice / K. Wang, Y. Li, Y. Dai et al. // J. Agric. Food Chem. – 2019. – № 67. – С. 3125–3133.
2. Gibson R. Antarctic nemerteans: The Anatomy, Distribution and Biology of *Parborlasia corrugatus* (McIntosh, 1876) (Heteronemertea, Lineidae). Biology of the Antarctic Seas XIV. 1983;39(4):289-316.
3. Gladun DV. Physico-chemical and catalytic properties of trypsin-like and fibrinogenolytic enzymes from Antarctic sea scallop *Adamussium colbecki* [dissertation]. Kyiv; Taras Shevchenko National University of Kyiv; 2017. Ukrainian.
4. Klomklao S. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2008;30(1):37-46.
5. Mao L, Wang F, Li Y, Dai Y, Liu Y, Wang J, Xue C. Oil from Antarctic krill (*Euphausia superba*) facilitates bone formation in dexamethasone-treated mice. Food Sci Biotechnol. 2018;28(2):539-545.
6. Mortz E, Krogh TN, Vorum H, Görg A. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. Proteomics. 2001;1(11):1359-63.
7. Ostapchenko L, Savchuk O, Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2011;2(1):20-26.
8. Pearce JS, Giese AC. Food, reproduction and organic constitution of the common antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri* (meissner). Biological Bulletin. 1966;130(3):387-401.
9. Raksha N, Gladun D, Vovk T, Savchuk O, Ostapchenko L. New fibrinogenase isolated from marine hydrobiont *Adamussium colbecki*. Journal of Biochemistry International. 2016;3(1):9-18.
10. Wang K, Li Y, Dai Y, Han L, Zhu Y, Xue C, Wang P, Wang J. Peptides from Antarctic Krill (*Euphausia superba*) improves osteoarthritis via inhibiting HIF-2 α mediated death receptor apoptosis and metabolism regulation in osteoarthritis mice. J. Agric. Food Chem. 2019;67(11):3125-33.

Надійшла до редколегії 6.05.19

Отримано виправлений варіант 7.06.19

Підписано до друку 7.06.19

Received in the editorial 6.05.19

Received a revised version on 7.06.19

Signed in the press on 7.06.19

Reference

1. GE Healthcare Bio-Sciences AB. Affinity chromatography: principles and methods. Uppsala; 2007. 159 p.

M. Абрамова, студ., Н. Ракша, канд. биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ВЫДЕЛЕНИЮ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ АНТАРКТИЧЕСКОГО РЕГИОНА

Ферменты из организмов, адаптированных к существованию при низких температурах среды обитания, привлекают значительное внимание ученых как потенциально перспективные объекты не только с практической точки зрения, но и как ценные инструменты для проведения фундаментальных исследований. Это обусловлено необычными условиями среды обитания (низкая температура, высокое гидростатическое давление, слабое освещение), а также значительным уровнем экономической рентабельности, который предопределен широкой распространенностью морских гидробионтов и высокой продуктивностью психрофильных ферментов по сравнению с их мезо- и термофильными аналогами. О целесообразности использования гидробионтов Антарктического региона *Parborlasia corrugatus* и *Sterechinus neumayeri*, как источника для получения отдельных ферментов, свидетельствуют результаты энзим-электрофоретического анализа общего экстракта тканей гидробионтов, согласно которым, общий экстракт содержал ряд ферментов, которые проявляли активность в отношении желатина и фибриногена. В результате комбинации нескольких хроматографических стадий, которые включали аффинную хроматографию на колонке с носителем Blue Sepharose 6 FF и гель-фильтрации на колонках с носителями Superdex 75 PG и Superdex 200 PG из общего экстракта тканей гидробионтов были получены фракции гидролитических ферментов. Из общего экстракта тканей обоих исследуемых гидробионтов было выделено 4 фракции, которые проявляли желатиназную активность. Также из тканей гидробионта *Sterechinus neumayeri* было выделено фракцию, содержащую высокомолекулярные ферменты, способные расщеплять фибриноген. Разработанная методика двухстадийной хроматографии может быть использована в дальнейшем как основа для оптимизации получения ферментов аналогичного спектра действия из других объектов.

Ключевые слова: гидробионты Антарктического региона, хроматография, электрофорез.

M. Abramova, stud., N. Raksha, Ph.D
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

DEVELOPMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE PURIFICATION OF TARGET PROTEINS FROM MARINE HYDROBIONTS OF ANTARCTIC REGION

Enzymes from organisms that are adapted to the existence at low temperatures attract significant attention of scientists as a perspective objects not only on a practical point of view, but also as a valuable tools for conducting basic research. This is due to unusual environmental conditions (low temperature, high hydrostatic pressure, low illumination), as well as a significant level of economic profitability due to the widespread of marine hydrobionts and high efficiency of psychrophilic enzymes in comparison with their mesophilic and thermophilic analogues. The expediency of using the hydrobionts of the Antarctic region *Parborlasia corrugatus* and *Sterechinus neumayeri* as a source for producing individual enzymes was indicated by the results of electrophoretic analysis of enzymes from hydrobionts tissues extract, so it was concluded that the total extract contained a number of enzymes that were active with gelatin and fibrinogen. As a result of a combination of several chromatographic stages, which included affinity chromatography on Blue Sepharose 6 FF column and size exclusion chromatography on Superdex 75 PG and Superdex 200 PG columns, from the total hydrobiont tissue extract were obtained fractions of hydrolytic enzymes. From the total tissues extract of both hydrobionts which was explored were isolated 4 fractions which showed gelatinase activity. Also from the tissues of *Sterechinus neumayeri* a fraction containing high-molecular enzymes capable of cleaving fibrinogen was isolated. The developed method of two-stage chromatography can be used further as a basis for optimizing the obtaining of enzymes of a similar spectrum of action from other objects.

Key words: hydrobionts of Antarctic region, chromatography, electrophoresis.