

Аминокислотное разнообразие как критерий выбора оптимального калибратора для определения общего белка в биопрепаратах

И. Е. Костылева*, Е. Д. Изотова

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет

Россия, Республика Татарстан, 420008 г. Казань, улица Кремлевская, 18.

**Email: www.irishka96@mail.ru*

В работе рассматривался вопрос разнообразия и количественной характеристики аминокислотного состава коровьего молока, используя биоинформатический подход, и обсуждается применимость методов Кингслея–Вейксельбаума и Лоури для определения содержания общего белка после термокислотной и хлоркальциевой коагуляции. В качестве сложной белковой системы используется коровье молоко.

Ключевые слова: аминокислотное разнообразие, общий белок, метод Кингслея–Вейксельбаума, метод Лоури, термокислотная коагуляция, хлоркальциевая коагуляция.

Высокой пищевой ценностью и сырьем для искусственного обогащения других продуктов выступают белки молока [1]. Актуальной проблемой на сегодняшний день является возрастающая аллергия к белкам пищевых продуктов. Например, казеины используются в качестве добавок и наполнителей для повышения питательности в некоторых продуктах (сосиски, хлеб, супы, мороженое, заправки для салатов), входят в состав белковых коктейлей, витаминизированных каш, детского питания [2]. Белки в растворе представлены в агрегированном состоянии, разнообразны по строению, физико-химическим свойствам и биологическим функциям. Молоко и молочные продукты относят к полноценным продуктам питания по наличию эссенциальных аминокислот в своем составе. В нем в достаточном количестве присутствуют аминокислоты: V, K, M, T, W, F. Выделяю три группы белков [3]: казеины, занимающие около 80% всего состава и разделяющихся на 4 основные фракции ($\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, и κ -казеин) в виде казеината кальция, связанный с коллоидным фосфатом кальция; сывороточные белки, к которым относятся β -лактоглобулины и α -лактальбумины, иммуноглобулины, альбумин сыворотки крови, лактоферрин, трансферрин, лизоцим, церулоплазмин и белки оболочек жировых шариков [3, 4].

Для получения белковой фракции молока в промышленных условиях применяют термокислотный, хлоркальциевый или сычужный способы коагуляции. При термокислотном методе в качестве коагулянтов используется кислота (уксусная) и воздействие температуры. Для хлоркальциевой коагуляции белков молока применяется раствор

хлорида кальция. Коагулирующим агентом при сычужном методе является смесь сычужных ферментов. Каждый способ отличается различным выходом и целостностью белковой продукции [5, 6].

Для количественной характеристики белковой фракции на производстве используют 3 основных метода определения, согласно ГОСТу 25179–90, это: колориметрический, рефрактометрический, метод формольного титрования. Кроме того, основными методами в биохимических исследованиях, в медицине, в пищевой промышленности для определения общего белка широко применяют биуретовый метод (Кингслея–Вейксельбаума), метод Лоури, метод Бредфорда, метод ВСА (бицинхониновая кислота), а также УФ-спектрофотометрия [5].

Материалы и методы

Для определения аминокислотного спектра и доли каждой аминокислоты в белковой фракции коровьего молока использовались аминокислотные последовательности, полученные из базы данных U. S. National Library of Medicine [7] под номерами: P04653.3, CAA26983, AAA30431.1, P02668.1, NP_776354.2, NP_776803.1, NP_851335.1, AAB37381.2, ANN46379.1, AAC48564.1, AAB62251.1, AAB81518.1, AAC98391.1, P00978.2, AAA30610.1. Данные белки охватывают 95.5% всего белкового разнообразия. Суммарный вес каждой аминокислоты рассчитывался из доли каждого белка в составе и веса самой аминокислоты.

Было отобрано семь образцов молока различных фирм производителей, с условной нумерацией от 1 до 7. Исследуемые образцы были подготовлены термокислотным и хлоркальциевым методами. Для определения общего количества белка были использованы биуретовый метод и метод Лоури. В основе биуретовой реакции образование окрашенного комплекса пептидных групп белка и меди, возникающий в щелочных условиях. В методе Лоури в дополнении к образованию биуретового комплекса, присутствуют реакции восстановления реагентом Folin–Ciocalteu (комплекс «молибдат–вольфрамат–фосфорная кислота») некоторых аминокислотных остатков (Y, W, F, C), что приводит к повышению чувствительности в 100 раз. Колориметрия проводилась при длине волны 540 нм и 750 нм, соответственно [5]. В качестве калибратора использовался бычий сывороточный альбумин (БСА).

Результаты

Построенное распределение аминокислот, входящих в состав белков коровьего молока (рисунок 1), основывается на разнообразии белков и их доли в общем сухом остатке [4]. Суммарно в смеси присутствуют все 20 протеиногенных аминокислот, с процентным вкладом от 0.78% для W, до 10.67% для L.

Для определения общего белка методами, используемые в биохимических и лабораторных исследованиях одним из значимых факторов качественного результата является аминокислотный состав исследуемого раствора. Поскольку, в основе данных методов лежат качественные реакции не только на пептидные группы (как для биуретовой реакции), так и специфические, взаимодействия с функциональными группам в аминокислотных остатках. В основе калибратора часто выступает БСА, который так же содержит в своем составе все 20 протеиногенных аминокислот (рисунок 1). Характер распределения аминокислотного спектра калибровочного белка и исследуемой среды будет вносить сдвиги в абсолютные значения концентрации и приводить к ложным результатам.

Для метода Лоури большой вклад в образование комплекса вносят: Y, W, F, C. При этом, значения вклада Y и W, по суммарному значению белков молока и в БСА, отличаются незначительно, на 0.09% и 0.29%, в то время как для F и C разница составила уже 1.13% и 4.76%, соответственно. Наибольший вклад аминокислот в образовании окрашенного комплекса убывает в следующем ряду: W, F, Y, C.

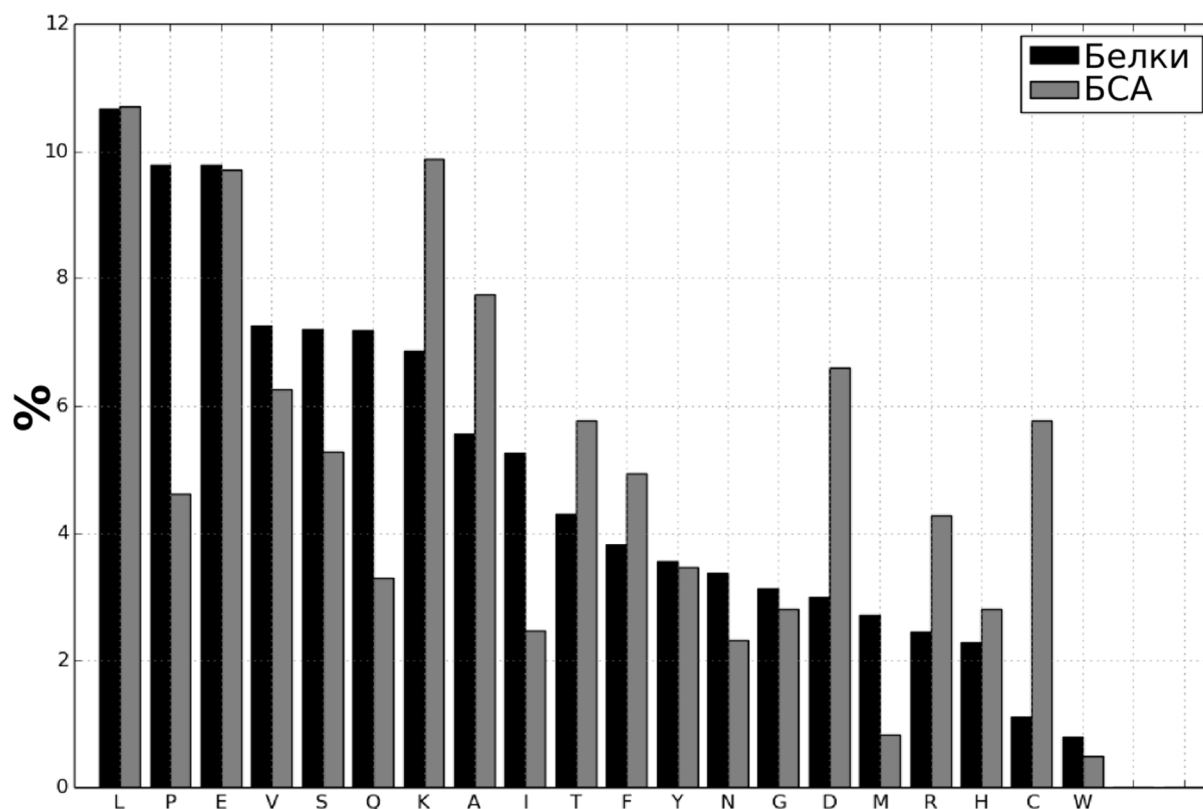


Рис. 1. Аминокислотный профиль белков коровьего молока и бычьего сывороточного альбумина.

Определение общего белка в молоке методами Кингслея–Вейксельбаума и Лоури после кислотной и хлоркальциевой коагуляции (таблица 1) показало, что стабильно наблюдается большее значение общего белка при хлоркальциевой коагуляции. Измерение общего белка методом Кингслея–Вейксельбаума в целом дает большие показатели, чем метод Лоури. Низкое количество белка характерно для проб №6 и №7; в образце №4 содержит большее количество белка во всех вариантах измерения. Можно предположить, что такие разнообразные значения связаны с несколькими причинами. Во-первых, у различных методов – разная чувствительность, метод Лоури считается чувствительнее биуретового метода в 100 раз [8]. Во-вторых, большинство казеинов находится в молоке в связанном состоянии – в виде мицелл. Поэтому нужно учитывать, что некоторые белки не растворились и остались в связанном состоянии. В-третьих, при хлоркальциевой коагуляции в осадок выпадает больше белка, чем при термокислотной коагуляции молока. Это связано с тем, что хлорид кальция интенсивнее расщепляет пептидные связи казеинов и вытягивает из них кальций и фосфор, тем самым дестабилизируя мембраны белка и уменьшая стабильность мицелл.

Таблица 1. Общее количество белка в исследуемых образцах коровьего молока после хлоркальциевой и кислотной коагуляции

№	Биуретовый метод		Метод Лоури	
	Хлоркальциевая коагуляция, мг/мл	Термокислотная коагуляция, мг/мл	Хлоркальциевая коагуляция, мг/мл	Термокислотная коагуляция, мг/мл
1	33.2	22.73	26.32	14.86
2	42.5	2.74	18.83	2.85
3	24.11	22.9	16.16	13.13
4	39.36	32.24	42.66	19.23
5	21.9	20.41	22.43	13.55
6	31.13	14.05	22.89	14.01
7	10.2	29.43	20.06	6.75

Остается открытым вопросом, может ли доля присутствующих аминокислот нивелировать вклад в образование окрашенного комплекса.

Работа носит исследовательский характер, поэтому торговые марки скрыты под номерами, если Вас заинтересовал материал, свяжитесь с автором по электронному адресу.

Литература

1. Комолова, Г. С., Ионова И. И., Овчинникова О. Е., Комолов С. А. Сывороточные белки коровьего молока как активная основа пищевых полифункциональных БАД // Пищевая промышленность. 2011. №.3. С. 16–17.
2. Федотова М. М., Огородова Л. М., Федорова О. С., Евдокимова Т. А. Молекулярные и эпидемиологические основы аллергии к белкам коровьего молока // Бюллетень сибирской медицины. 2011. Т.6. С. 86–90.
3. Макарова Н. В., Камалдинов И. Н., Хаертдинов Р. А. Сравнительный анализ белкового состава молока у коров молочного и мясного направлений продуктивности // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. 2015. Т.1. С. 125–128.
4. Горбатова К. К., Гунькова П. И. Биохимия молока и молочных продуктов // Пищевая химия. 2010. С. 20–39.
5. Козлова О. В., Разумникова И. С., Бабич О. О., Просеков А. Ю. Биологически активные пептиды из белков молока // Молочная промышленность. 2010. №9. С. 68–69.
6. Смирнова И. А., Гралевская И. В., Штригуль В. К., Смирнов Д. А. Исследование способов коагуляции молока с целью формирования микропартикулятов белка молока // Техника и технология пищевых производств. 2012. Т.3. С. 1–8.
7. NCBI. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
8. Vrsanka M. A., Vojtech K. comparison of biuret, Lowry and Bradford methods formeasuring the egg's proteins // MendelNet. 2015. P. 394–395.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и биотехнологии КФУ
(д.н., проф. Р. Г. Киямова)

Amino acid diversity as a criterion for choosing optimal calibrator for determining crude protein in biological products

I. E. Kostileva*, E. D. Izotova

Kazan Federal University

18 Kremlyovskaya Street, 420008 Kazan, Republic of Tatarstan, Russia.

**Email: www.irishka96@mail.ru*

The paper considered the issue of the diversity and quantitative characteristics of the amino acid composition of cow's milk using the bioinformatic approach, and the applicability of the Kingsley-Weikselbaum and Lowry methods for determining the total protein content after thermal acid and chlorocalcine coagulation is discussed. Cow's milk is used as a complex protein system.

Keywords: amino acid diversity, total protein, Kingsley-Weikselbaum method, Lowry's method, thermal acid coagulation, chloralcalcium coagulation.