

Таким образом, синтетический пептид (60-76) к неструктурированному фрагменту V домена sRAGE может служить перспективным терапевтическим средством для лечения БА.

Список литературы / References:

1. Bobkova N., Vorobyov V., Medvinskaya M., Aleksandrova I., Nesterova I., Interhemispheric EEG differences in olfactory bulbectomized rats with different cognitive abilities and brain beta-amyloid levels. *Brain. Res.*, 2008, vol. 1232, pp. 185-194.
2. Ma L.Y., Fei Y.L., Wang X.Y., Wu S.D., Du J.H., Zhu M., Jin L., Li M., Li H.L., Zhai J.J., Ji L.P., Ma R.R., Liu S.F., Li M., Ma L., Ma X.R., Qu Q.M., Lv Y.L., The Research on the Relationship of RAGE, LRP-1, and A β Accumulation in the Hippocampus, Prefrontal Lobe, and Amygdala of STZ-Induced Diabetic Rats. *J Mol Neurosci.* 2017, vol. 62, no. 1, pp. 1-10.
3. Cho H.J., Son S.M., Jin S.M., Hong H.S., Shin D.H., Kim S.J., Huh K., Mook-Jung I., RAGE regulates BACE1 and A β generation via NFAT1 activation in Alzheimer's disease animal model. *FASEB J.*, 2009, vol. 23, no. 8, pp. 2639-49.
4. Cheng C., Tsuneyama K., Kominami R., Shinohara H., Sakurai S., Yonekura H., Watanabe T., Takano Y., Yamamoto H., Yamamoto Y., Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod Pathol.*, 2005, vol. 18, no. 10, pp. 1385-96.
5. Вольпина О.М., Короев Д.О., Волкова Т.Д., Камынина А.В., Филатова М.П., Запорожская Я.В., Самохин А.Н., Александрова И.Ю., Бобкова Н.В. Фрагмент рецептора конечных продуктов гликозилирования восстанавливает пространственную память животных в модели болезни Альцгеймера. *Биоорг. химия*, 2015, т. 41, № 6, с. 709-16. [Volpina O.M., Korojev D.O., Volkova T.D., Kamynina A.V., Filatova M.P., Zaporozhskaya Y.V., Samokhin A.N., Aleksandrova I.J., Bobkova N.V. Fragment of Receptor for Advanced Glycation End Products Improves Memory State in a Model of Alzheimer's Disease. *Bioorg Khim.*, 2015, vol. 41, no. 6, pp. 709-16. (In Russ.)]
6. Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M., The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives, *Biochim. Biophys. Acta.*, 2014, vol. 1842, pp. 1219-31.
7. Аветисян А.В., Самохин А.Н., Александрова И.Ю., Зиновкин Р.А., Симонян Р.А., Бобкова Н.В., Функциональное нарушение митохондрий неокортекса и гиппокампа у мышей с бульбэктомией – модели болезни Альцгеймера. *БИОХИМИЯ*, 2016, т. 81, вып. 6, с. 802-812. [Avetisyan A.V., Samokhin A.N., Alexandrova I.Y., Zinovkin R.A., Simonyan R.A., Bobkova N.V., Mitochondrial Dysfunction in Neocortex and Hippocampus of Olfactory Bulbectomized Mice, a Model of Alzheimer's Disease, *Biochemistry (Mosc)*, 2016, vol. 81, no. 6, pp. 615-23. (In Russ.)]

ПРИМЕНЕНИЕ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЦЕННОСТИ БЕЛКОВ МОЛОКА ОВЕЦ

Волнин А.А.¹, Шералиев Ф.Д.¹, Шапошников М.Н.², Зайцев С.Ю.², Багиров В.А.¹

¹ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. акад. Л.К. Эрнста"
Дубровицы, 60, Московская обл., 142132, РФ

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина»
ул. Акад. Скрябина, 23, г. Москва, 109472, РФ
e-mail: volnin.a@mail.ru

Аннотация. Оценка биологической ценности продукции животноводства – актуальное направление современной науки и сельскохозяйственной практики, кроме того, количественный анализ аминокислотного состава белков играет важную роль в биохимических, фармацевтических и биомедицинских исследованиях. Данная работа посвящена вопросам использования ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией проб нингидрином при исследовании аминокислотного состава и оценке биологической ценности белков молока овец. Представлен аминокислотный состав белков молока романовской породы овец, полученного на 20 день лактации, выполнен расчет аминокислотного сора этих белков, определено соотношение незаменимых и заменимых аминокислот, произведена оценка биологической ценности белков молока в сравнении с «идеальным» белком (ФАО ВОЗ). Установлено, что в белках молока овец романовской породы, полученных на 20 день лактации, треонин является лимитирующей аминокислотой.

Ключевые слова: ионообменная хроматография, постколоночная дериватизация, нингидрин, аминокислотный сора, молоко овец.

APPLICATION OF ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY IN ASSESSING THE BIOLOGICAL VALUE OF SHEEP MILK PROTEINSVolnin A.A.¹, Sheraliev F.D.¹, Shaposhnikov M.N.², Zaitsev S.Yu.², Bagirov V.A.¹¹L.K. Ernst Institute of animal husbandry
Dubrovitsy, 60, Moscow Region, Russia²Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology by K.I. Skryabin
Akad. Skryabin Str., 23, Moscow, Russia
e-mail: volnin.a@mail.ru

Abstract. Assessment of the biological value of livestock products is an actual trend of modern science and agriculture practice, in addition, a quantitative analysis of the amino acid composition of proteins plays an important role in biochemical, pharmaceutical and biomedical research. This paper is devoted to the use of ion-exchange chromatography with post-column derivatization by ninhydrin in the study of the amino acid composition and evaluation of the biological value of sheep milk proteins. The amino acid composition of the milk proteins of the Romanov sheep breed obtained on the 20th day of lactation is presented, the amino acid score of these proteins are calculated, the ratio of essential and other amino acids is calculated, biological value of milk proteins compared with the "ideal" protein (FAO WHO) is estimated. It was found that in milk proteins of Romanov sheep obtained on the 20th day of lactation, threonine is a limiting amino acid.

Key words: ion-exchange chromatography, post-column derivatization, ninhydrin, amino acid score, sheep milk.

Введение.

Аминокислоты являются ключевыми компонентами питания человека и животных, как в составе белковой диеты, так и в качестве дополненных продуктов. Хотя сбалансированная диета может обеспечить поступление достаточного количества аминокислот для удовлетворения потребностей человека в питании, в частности, в рационе животных возможен недостаток одной или нескольких незаменимых аминокислот, необходимых для поддержания оптимального роста и здоровья животных [1].

В связи с этим анализ биологической ценности пищевых продуктов является одним из актуальных направлений современной науки и практики, включает определение аминокислотного состава белков, в том числе и содержание незаменимых аминокислот [2]. Анализ аминокислот, в качестве лабораторного метода, играет важную роль в биохимических, фармацевтических и биомедицинских исследованиях [3].

Наиболее распространенными методами количественного аминокислотного анализа являются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и ионообменная хроматография с постколоночной дериватизацией проб нингидрином. Однако в практике рутинного анализа, при значительном количестве исследуемых проб метод ионообменной хроматографии имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с ВЭЖХ: более высокая точность определения, воспроизводимость результата и надежность (высокая производительность этого метода является следствием того, что большинство загрязнений быстро перемещаются по колонке и выходят из системы, прежде чем начинается разделение аминокислот), а также более простая подготовка проб (по сравнению с методами предколоночной дериватизации) [2-4].

Метод ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией проб нингидрином стандартизирован Международной организацией по стандартизации (EN ISO 13903), а также Регламентом Европейской Комиссии № 152/2009; рекомендован к использованию для анализа аминокислотного состава сырья и контроля полноценности аминокислотного питания животных Европейской федерацией производителей кормовых добавок и кормов для животных (FEFANA, фр. Fédération Européenne des Fabricants d'Adjuvants pour la Nutrition Animale) [5]. Схема аминокислотного анализатора представлена на рисунке 1.

Данная работа посвящена определению аминокислотного состава белков молока овец романовской породы методом ионообменной хроматографии с постколоночной дериватизацией проб нингидрином, оценке биологической ценности белков молока овец.

Материалы и методы.

Исследование проводили в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях. Пробы молока были получены от овцематок романовской породы (n=8) на 20 день лактации. Животные содержались в условиях физиологического двора ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства имени академика Л.К. Эрнста». Овцематки были клинически здоровы, не подвергались лечению, регулярно осматривались ветеринарными специалистами, имели сбалансированный рацион согласно Нормам кормления и рационам сельскохозяйственных животных (ВИЖ).

Для подготовки проб использовали кислотный гидролиз в растворе 6 N соляной кислоты, с добавлением норлейцина в качестве внутреннего стандарта. Гидролиз выполняли в фторопластовых стаканах с завинчивающейся крышкой (СЕМ, США), в термостате при 110 °С в течении 24 ч. Для определения цистина и метионина пробы окисляли 50% раствором надмуравьиной кислоты, которую предварительно готовили из муравьиной кислоты и перекиси водорода, с добавлением фенола. По окончании гидролиза пробы охлаждали, отбирали 160 мкл гидролизата, и высушивали при 100°C. Сухой остаток растворяли в буферном растворе цитратного буфера для разведения образцов с pH = 2,2 (Sevko&Co, Россия) и центрифугировали при 13 000 об./мин; супернатант отфильтровывали через фильтр (с фторопластовой мембранной) с диаметром пор 0,45 мкм (Agilent, США) и использовали для дальнейшего анализа.

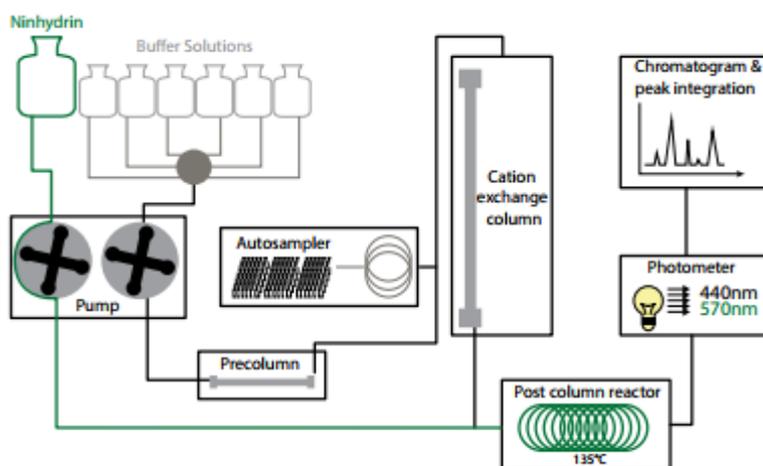


Рисунок 1 – Общая схема аминокислотного анализатора [5]

Анализ выполняли на системе высоко эффективной жидкостной хроматографии (HPLC) Shimadzu LC-20 Prominence (Япония), с реакционным модулем для пост-колоночной дериватизации нингидрином АРМ-1000 (Sevko&Co, Россия), оснащенный абсорбционным детектором ($\lambda_{\text{abs}} = 440 \text{ нм}, 570 \text{ нм}$) и колонкой с ионообменной смолой 4,6 x 150 мм (Sevko&Co, Россия). Использовали готовые буферные растворы (Sevko&Co, Россия).

Расчет концентрации выполняли по стандартному образцу аминокислот (Sykam, Германия).

Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программы Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США); концентрация аминокислот представлена в виде среднего значения и стандартной ошибки. За содержание белка в пробе считали сумму определенных аминокислот (содержание свободных аминокислот, также чувствительных к применяемому методу, считали не влияющим на результат исследования).

Для расчёта аминокислотного сора белка аминокислотный скар каждой незаменимой аминокислоты в «идеальном» белке принимают за 100%, а в исследуемом – определяют процент соответствия рекомендациям ФАО/ВОЗ [6]. Если значение сора для определенной аминокислоты ниже 100%, данную аминокислоту определяют как лимитирующую.

Результаты и обсуждение

Рассматриваемый метод работает на основе того факта, что аминокислоты являются катионами при рН 2,2, удерживаются ионообменной смолой колонки и при элюировании градиентом с повышением рН смываются с нее согласно изоэлектрическим точкам молекул. На выходе с колонки разделившиеся аминокислоты вступают в специфическую реакцию с нингидрином, при высокой температуре, с образованием окрашенного продукта, который количественно определяют используя фотометрическое детектирование при 440 нм – для пролина и 570 нм – для всех других аминокислот [2,5].

Анализ аминокислот проводят после кислотного гидролиза белков. Для более полного нахождения метионина и цистеина (с димером последнего - цистином), кислотный гидролиз проводят с предварительно окисленными (количественно) серосодержащими радикалами аминокислотных остатков. В результате образуются соответствующие продукты окисления –метионинсульфон и цистеиновая кислота. Данный метод позволяет определить 17 протеиногенных аминокислот (за исключением триптофана, разрушающегося при кислотном гидролизе, аспарагина и глутамина, которые гидролизуются в аспарагиновую и глутаминовую кислоты, соответственно). Сумма определяемых аминокислот включает свободные аминокислоты и аминокислоты, которые были связанные в составе белка до гидролиза.

Хроматограмма стандартного образца аминокислот представлена на рисунке 2.

В развитии молодняка овец и реализации его генетического потенциала большую роль играет полноценность питания в первые недели жизни, поскольку в данный период основным кормом для молодняка является молоко матери. От полноценности молочного белка зависит обеспечение потребностей активно растущего организма, физиологическое состояние потомства, степень формирования его продуктивных качеств.

В данном исследовании была определена концентрация незаменимых и заменимых аминокислот в белках молока овец романовской породы. Результаты исследования представлены в таблице 1.

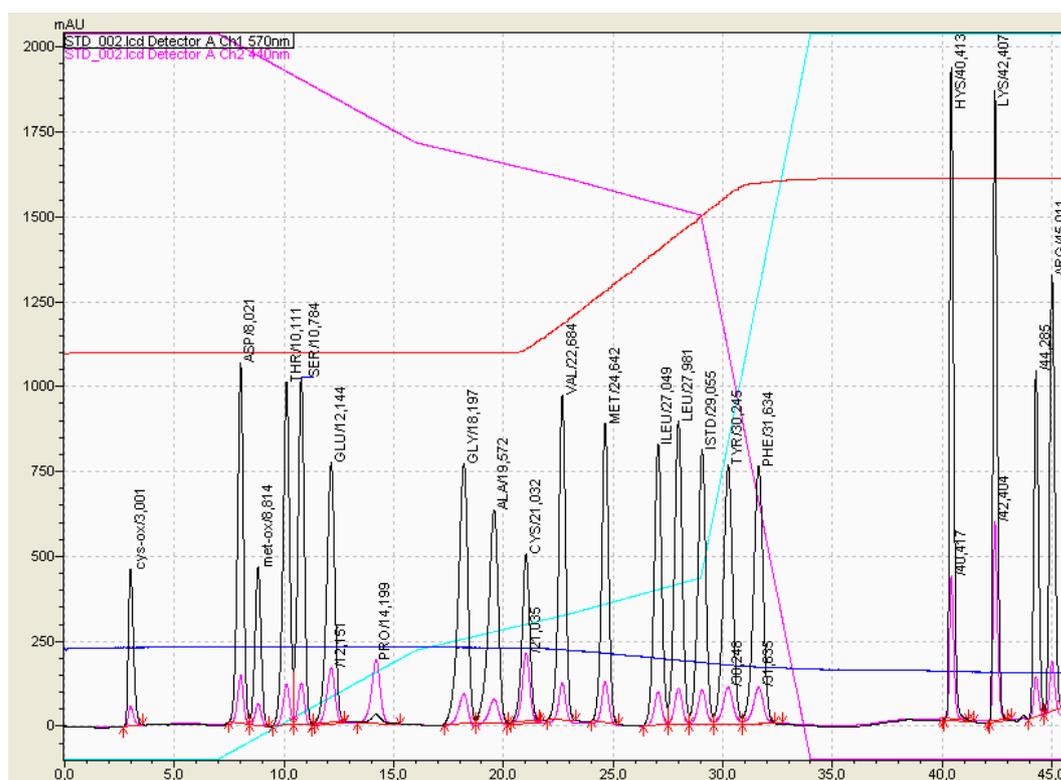


Рисунок 2 – Хроматограмма стандартного образца аминокислот (Сукам, Германия)
 Примечание: ISTD – внутренний стандарт (норлейцин)

Таблица 1 – Аминокислотный состав белков молока овец романовской породы на 20 день лактации

Показатель	г/100 г белка								
	Незаменимые аминокислоты								
	THR	LEU	ILE	VAL	MET	LYS	PHE	TYR	
	3,69±0,09	9,68±0,13	5,27±0,18	7,03±0,18	3,01±0,06	7,88±0,16	4,23±0,10	4,05±0,16	
Заменимые аминокислоты									
ASP	SER	GLU	GLY	ALA	HIS	ARG	PRO	CYS	
7,10±0,12	3,91±0,07	20,24±0,29	1,59±0,07	3,46±0,16	3,07±0,16	3,63±0,40	11,31±0,86	0,83±0,03	

Зная содержание аминокислот в белке, можно оценить степень его биологической полноценности. Для количественной характеристики биологической ценности белка наиболее часто используют аминокислотный скор [2,7,8]. Понятие «скор» позволяет определить качество конкретного пищевого белка путем сравнения его аминокислотного состава с аминокислотным составом «идеального» белка [6]. Аминокислотный скор традиционно используется для характеристики аминокислотного состава молочного белка овец разной породной принадлежности [7].

На основании биологических потребностей человека в аминокислотах ФАО/ВОЗ (англ. Food and Agriculture Organization / World Health Organization) разработан аминокислотный состав «идеального» белка, 1 грамм которого содержит следующие количества незаменимых аминокислот: изолейцин – 40 мг, лейцин – 70 мг, лизин – 55 мг, метионин+цистеин – 35 мг, фенилаланин + тирозин – 60 мг, треонин – 40 мг, триптофан – 10 мг, валин – 50 мг, а сумма незаменимых аминокислот (НАК) составляет 360 мг [6].

В проведенном исследовании были определены показатели биологической ценности белков молока (аминокислотный скор и соотношение незаменимых и заменимых аминокислот) у овцематок романовской породы. Исследование показало, что в белках молока овец романовской породы, полученных на 20 день лактации треонин является лимитирующей аминокислотой.

Значение аминокислотного сора и соотношения незаменимых и заменимых аминокислот белков молока овец романовской породы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели биологической ценности белков молока овец романовской породы

Группа/ показатель	«Идеальный белок» ФАО/ВОЗ [9]									Соотношение незаменимых и заменимых аминокислот, %
	THR	LEU	ILE	VAL	MET	CYS	LYS	PHE	TYR	
	4	7	4	5	3,5		5,5	6		
	Аминокислотный скор, %									
	92*	138	132	141	110		143	138		81

Примечание: * - лимитирующая аминокислота

Молоко является единственным источником незаменимых аминокислот для новорожденных ягнят, поэтому адекватное содержание метионина в молочном белке первых дней лактации у овцематок крайне важно и напрямую связано с ростом и развитием потомства. Кроме того, метионин участвует в ряде других важных биосинтетических процессов, участвуя в обмене холина, креатина и адреналина через высвобождение метильной группы [5,9]. Метионин является первой аминокислотой, встраивающейся в рибосомы при биосинтезе полипептидных цепей белков в клетках, в том числе белков молока [2].

Среди основных протеиногенных аминокислот, лизин является одной из ключевых незаменимых аминокислот, в то время как аргинин является незаменимым только для очень молодых животных [5]. Лизин необходим для синтеза гемоглобина и нуклеопротеидов. Аргинин, превращаясь в орнитин, участвует в обезвреживании конечных продуктов азотистого обмена (в частности, аммиака в мочевины), связан с функцией парашитовидных желез, служит источником образования креатина и креатинина, играя важную роль в энергетическом обмене [9].

Фенилаланин и тирозин являются «взаимопревращаемыми» аминокислотами, имеющиеся данные показывают, что тирозин может частично обеспечить потребность в фенилаланине и наоборот [5]. Фенилаланин и тирозин служат источником образования в организме таких гормонов как тироксин, адреналин и норадреналин, а также пигментов меланинов. Нарушение обмена этих аминокислот сопровождается тяжелыми расстройствами общего обмена веществ, приводящими не только к снижению продуктивности, но и к гибели животных [9].

Изолейцин, лейцин и валин являются аминокислотами, имеющими разветвленные алифатические цепи в радикалах. Их метаболизм интересен тем, что данные аминокислоты имеют общие пути катаболизма и, следовательно, могут создавать помехи друг другу при усвоении. Лейцин является сильным регулятором катаболизма аминокислот с разветвленной цепью, поэтому избыток лейцина в рационе нежелателен для животных [5]. Лейцин и изолейцин обладают сильно выраженным кетогенным свойством. Валин связан с обменом холестерина, каротиноидов, метилмасляных кислот, служит источником образования гликогена и кофермента А, необходим для нормальной функции нервной системы. Треонин, превращаясь в глицин, используется для синтеза протопорфирина, холестерина, жирных кислот и ряда углеводов. В обмене веществ он тесно связан с лейцином и является антагонистом метионина и серина. Гистидин необходим для синтеза гемоглобина, входит в состав карнозина и ансерина, содержащихся в мышцах. При декарбоксилировании гистидина образуется гистамин, являющийся физиологически активным соединением [9].

Заключение.

Полученные данные об аминокислотном составе и биологической ценности белков молока овец на ранних этапах лактации могут быть использованы в овцеводческой практике при планировании мероприятий, связанных с оценкой и контролем полноценности питания молодняка овец и применением заменителей цельного молока.

Благодарность. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект №14-36-00039).

Список литературы / References:

1. Karau A., Grayson I. Amino acids in human and animal nutrition. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2014, vol. 143, pp. 189-228, doi: 10.1007/10_2014_269.
2. Шапошников М.Н., Севко А.В., Севко Д.А., Волнин А.А., Зайцев С.Ю. Анализ аминокислотного состава молока коров симментальской породы. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*, 2015, № 11, с. 70-75. [Shaposhnikov M.N., Sevko A.V., Sevko D.A., Volnin A.A., Zaitsev S.Yu. The analysis amino acid composition of milk of simmental breed cows. *Veterinariya, zootechniya i biotekhnologiya*, 2015, no. 11, p. 70-75. (In Russ.)]
3. Jajić I., Krstović S., Glamočić D., Jakšić S., Abramović B. Validation of an HPLC method for the determination of amino acids in feed. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2013, vol. 78, no. 6, pp. 839-850.
4. Dai Z., Wu Z., Jia S., Wu G. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 2014, vol. 964, pp. 116-27, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.03.025.
5. Dalibard P., Hess V., Tutour L., Peisker M., Peris S., Perojo Gutierrez A., Redshaw M. *Amino Acids in Animal Nutrition*. FEFANA Publication, FEFANA, Brussels, Belgium, 2014.
6. FAO. Energy and protein requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation / World Health Organization, Geneva, 1985, 112 p.
7. Gerchev G., Mihaylova G., Tsochev I. Amino acid composition of milk from Tsigai and Karakachanska sheep breeds reared in the central Balkan mountains region. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 2005, vol. 21, no. 5-6, pp. 111-115.
8. Ivanova P. [et al.] Amino acid composition and solubility of proteins isolated from sunflower meal produced in Bulgaria. *International Food Research Journal*, 2013, vol. 20, no. 6, pp. 2995-3000.
9. Алиев А.А. *Обмен веществ у жвачных животных*. М.: НИЦ «Инженер», 1997. [Aliiev A.A. *Metabolism in ruminants*. Moscow: «Injener», 1997. (In Russ.)]