

М.А. ДАВТЯН, С.А. КАРАПЕТЯН, М.А. ХАЧАТРЯН, Г.А. СЕМЕРДЖЯН

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Исследован аминокислотный состав гидролизатов белков молочной сыворотки с целью применения их при парентеральном питании. Получены белковые гидролизаты (кислотные и щелочные) при различных условиях гидролиза. Наибольший выход аминокислот наблюдается при 24-часовом кислотном гидролизе, что составляет 346,2 мг на 100 г молочной сыворотки.

В последние годы на кафедре биохимии ЕГУ ведутся исследования отходов пищевой промышленности, пригодных в других сферах деятельности человека. Изучение их химического состава даст возможность выявить биологически активные компоненты. Весьма интересным является использование их в медицине, промышленности, сельском хозяйстве.

Еще в 1915 году Вудиаг и сотрудники [1] предложили парентеральное применение аминокислот. Были использованы белковые гидролизаты, полученные с помощью кислотного гидролиза, обогащенные триптофаном и цистином. Многочисленные исследования, проведенные в эксперименте и клинике показали, что приготовленные должным образом гидролизаты хорошо утилизируются организмом.

С этой точки зрения большой практический интерес представляет получение из белков молочной сыворотки (отхода молочного производства) аминокислотной смеси, которая найдет применение в клинике для удовлетворения потребностей парентерального питания.

Методы исследований. Белковый кислотный гидролизат получали в пробирке с обратным холодильником в 6*N* HCl при 105°C. После гидролиза HCl удаляли путем многократной отгонки с водой в вакууме. Остаток растворяли в определенном объеме 10% изопропилового спирта, центрифугировали и в надосадке определяли аминокислоты хроматографическим методом. Белковый щелочной гидролизат получали в присутствии 14% раствора $BA(OH)_2$ при 120–125°C. Избыток бария удаляли нейтрализацией разбавленного гидролизата сухим льдом [2]. Аминокислоты исследовались методом хроматографии на бумаге одномерным нисходящим способом. Растворитель: бутанол–уксусная кислота–вода в соотношении 4:1:1. Проявителем служил 0,2% раствор нингидрина в ацетоне. Количественное определение аминокислот производилось по методу Лисицки [3], а общего азота – Несслера [4]. Разделение белков проводили методом дискэлектрофореза на полиакриламидном геле на приборе фирмы “Reanal”, модель 69 [5].

Результаты и обсуждения. Молочная сыворотка является побочным продуктом при производстве сыров, творога, казеина. В зависимости от вырабатываемого продукта получают подсырную, творожную и казеиновую сыворотки. В наших исследованиях использовалась творожная сыворотка после внесения закваски – хлорида кальция и сычужного фермента. Состав молочной сыворотки [6] приведен в табл. 1.

Согласно литературным данным сывороточные белки, содержащие незаменимых аминокислот больше, чем казеина, являются полноценными белками, которые используются организмом для структурного обмена в основном для синтеза белков печени, образования гемоглобина и плазмы крови. Массовая доля белков творожной молочной сыворотки составляет 0,8%. Согласно нашим экспериментальным данным общий азот составляет 0,248 г, что соответствует содержанию 1,55 г белка на 100 г молочной сыворотки.

Таблица 1

Молочная сыворотка	Массовая доля, %				
	сухих в-в	лактозы	белков	молочного жира	минеральных в-в
подсырная	6,5	4,5	0,7	0,4	0,5
творожная	6,0	4,2	0,8	0,7	0,6
казеиновая	6,8	4,5	1,0	0,4	0,7

С целью выяснения природы компонентов, входящих в состав азот-содержащих соединений, были предприняты исследования по определению белков, аминокислот (свободных и структурных). Для определения оптимальных условий *осаждения белков* использовали этиловый спирт (25, 50, 75%). Время осаждения 1 и 3 часа (табл. 2), сульфат аммония – 25, 50, 75 и 100% насыщения (табл. 3) и 20% раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) (табл. 4). В последних двух случаях осаждение белков производили в течение 1 часа. Из данных табл. 2–4 видно, что наиболее результативным является осаждение белков 20 % раствором ТХУ. При этом количество осажденного белка равно 0,930 г на 100 г сыворотки.

Таблица 2

Осаждение белков молочной сыворотки этиловым спиртом (г/100г сыворотки)

Время осаждения	Молочная сыворотка	25%	50%	75%
1 час	надосадок	0,900	0,610	0,875
	осадок	0,160	0,445	0,195
3 часа	надосадок	0,820	0,410	0,800
	осадок	0,190	0,570	0,250

Таблица 3

Осаждение белков молочной сыворотки сульфатом аммония в течение 1 часа (г/100г сыворотки)

Молочная сыворотка	25%	50%	75%	100%
надосадок	0,580	0,790	0,810	0,925
осадок	0,400	0,230	0,180	0,135

Электрофорезом при *pH* 8,3 (триглицериновый буфер) нами получены две выраженные белковые фракции, мигрирующие к аноду. Помимо этих двух белковых полос, отмечены очень слабо выраженные полосы, которые резко отличаются друг от друга по электрофоретической подвижности.

Исследования по выявлению *свободных аминокислот* проводились как в цельной сыворотке, так и в надосадке после осаждения белков 20% ТХУ и центрифугирования при 16000 G в течение 30 мин. Бумажной хроматографией методом падающего и усиливающегося пятна с использованием аминокислот – свидетелей (кроме пролина и триптофана), в первую очередь, нами были идентифицированы свободные

аминокислоты сыворотки надосадка. В творожной сыворотке согласно данным хроматограммы (табл. 5) нами не выявлены цистеин, аргинин, треонин, тирозин. Сравнительно велика доля глутаминовой и незаменимых аминокислот – гистидина и метионина. Так, глутаминовая кислота составляет 23,8, гистидин – 9,8, метионин – 10,1%. Как видно из данных табл. 5, надосадов значительно обедняется аминокислотным составом. Вероятно, обработка ТХУ и выпаривание разрушающе действуют на аминокислоты. В данных условиях устойчивостью отличаются аспарагиновая кислота и глицин.

Таблица 4

Осаждение белков молочной сыворотки 20% ТХУ в течение 1 часа (г/100г сыворотки)

Молочная сыворотка	ТХУ
надосадов	0,260
осадов	0,930

Нами был исследован также аминокислотный состав кислотного гидролизата белков молочной сыворотки. Гидролиз белков осуществляли в присутствии 6 N соляной кислоты при температуре 105°C в течение 6, 12, 24 и 32 часов, соотношение белков с кислотой – 1:5. В гидролизатах осадков белков сыворотки во всех сроках гидролиза проявлены все идентифицированные нами аминокислоты. Как показывают данные табл. 6, наибольшая сумма аминокислот наблюдается при 24-часовом гидролизе. Сумма аминокислот при такой продолжительности гидролиза составляет 346,2 мг на 100 г молочной сыворотки. Данные аминокислотного состава белков сыворотки показывают (24 часа), что в общей сумме значительную долю составляют глутаминовая кислота (11,2%), цистеин (7,54%), а из незаменимых аминокислот – треонин (12,9%), фенилаланин (6,8%), лейцин (10,5%), лизин (11,4%), валин (5,24%) и гистидин (6,52%). В следовых количествах содержатся тирозин и незаменимые аминокислоты – аргинин, метионин.

Таблица 5

Свободные аминокислоты молочной сыворотки

Аминокислоты	Сыворотка, мг АК на 100 г молоч. сыворотки	Доля АК в общей сумме, %	Надосадов, мг АК на 100 г молоч. сыворотки	Доля АК в общей сумме, %
цистеин	2,4	7,1		
лизин	3,3	9,8		
гистидин	следы			
аргинин	3,4	10,1		
аспар. к-та	1,6	4,7		
серин	1,5	4,4	2,5	48
глицин	–	–		
треонин	8,0	23,8		
глут. к-та	3,6	10,7	1,9	36,5
аланин	–	–		
тирозин	2,2	6,5		
валин	3,4	10,1		
метионин	1,2	3,5		
фенилаланин	2,9	8,6	0,8	15,3
лейцин				
сумма	33,5	99,3	5,2	99,8

Таблица 6

Аминокислотный состав белков молочной сыворотки при различных условиях кислотного гидролиза (мг/100г сыворотки)

Аминокислоты	6 ч.		12 ч.		24 ч.		36 ч.	
	АК	доля, %	АК	доля, %	АК	доля, %	АК	доля, %
цистеин	18,4	9,39	13,4	7,85	23,6	7,54	14,7	5,94
лизин	24,2	12,3	29,61	12,64	35,8	11,45	29,7	12,0
гистидин	5,3	2,7	16,0	6,83	20,4	6,52	16,1	6,51
аргинин	—	—	2,9	1,23	4,2	1,34	3,3	1,33
аспар. к-та	10,6	5,41	11,6	4,95	16,3	5,31	12,7	5,13
серин	11,5	5,87	16,4	7,0	18,8	6,01	13,5	5,45
глицин	9,2	4,69	10,0	4,27	12,0	3,83	6,5	2,62
треонин	25,7	13,11	29,5	12,6	40,5	12,9	36,4	14,71
глут. к-та	24,5	12,5	29,2	12,47	35,2	11,2	32,9	13,3
аланин	12,3	6,27	11,9	5,08	16,0	5,11	11,2	4,52
тирозин	—	—	—	—	9,8	3,13	7,5	3,03
валин	12,4	6,32	13,5	5,76	16,4	5,24	13,1	5,29
метионин	4,2	2,16	6,4	2,73	9,2	2,94	7,2	2,91
фенилаланин	9,8	5,0	11,2	4,78	21,5	6,87	12,6	5,09
лейцин	27,8	14,1	27,5	11,74	32,9	10,5	29,9	12,09
пролин	сл.	—	сл.	—	33,6	—	7,8	—
сумма	195,9	99,8	234,1	99,93	346,2	—	255,1	—

Таблица 7

Аминокислотный состав белков молочной сыворотки при различных условиях щелочного гидролиза (г/100г сыворотки)

Аминокислоты	6 ч.		12 ч.		24 ч.		36 ч.	
	гидро-модуль (ГМ)-5	ГМ-10	ГМ-5	ГМ-10	ГМ-5	ГМ-10	ГМ-5	ГМ-10
цистеин	—	—	следы	—	3,6	следы	следы	следы
лизин	—	—	—/—	—	10,3	3,6	—/—	—/—
гистидин	—	—	—/—	—	12,6	8,3	—/—	—/—
аргинин	—	—	—/—	следы	следы	следы	—	—
аспар. к-та	—	—	—/—	—/—	5,3	2,6	1,3	следы
серин	—	—	—/—	—	следы	следы	следы	—
глицин	следы	—	—/—	следы	6,4	4,6	—/—	—
треонин	—	—	—/—	—	16,4	16,2	10,2	2,2
глут. к-та	следы	сл.	12,6	10,8	20,4	19,7	12,4	4,3
аланин	следы	—	6,3	4,6	12,2	11,3	10,2	5,1
тирозин	—	—	—	—	следы	следы	—	—
триптофан	—	—	—	—	—/—	—/—	—	—
валин	—	—	следы	—	—/—	—/—	следы	следы
метионин	—	—	—/—	—	—/—	—/—	—/—	—
фенилаланин	—	—	—	—	—/—	—/—	—/—	следы
лейцин	—	—	следы	—	18,6	12,3	8,3	4,2
сумма	—	—	18,9	25,4	103,8	75,4	42,4	15,8

Так как при кислотном гидролизе происходит разрушение триптофана и частично других аминокислот, нами осуществлен щелочной гидролиз белков молочной сыворотки.

Как показывают данные табл. 7, наибольший выход аминокислот наблюдается при 24-часовом гидролизе при соотношении белков со щелочью 1:5. Сумма структурных аминокислот белков молочной сыворотки при щелочном гидролизе (24 часа) составляет 103,8 мг на 100 г молочной сыворотки, что в 3,3 раза меньше таковой при кислотном гидролизе. В общей сумме аминокислот значительную долю составляют глутаминовая кислота, гистидин, аланин, а из незаменимых аминокислот — лизин, треонин, лейцин. В малом количестве содержатся глицин, аспарагино-

вая кислота. Цистеин, лизин, аргинин, серин, валин, метионин, тирозин, триптофан содержатся в следовых количествах.

Сопоставляя данные количественных характеристик аминокислот гидролизата белков сыворотки молока и мелассы сахарной свеклы, можно отметить, что белки сыворотки богаче такими незаменимыми аминокислотами, как лизин, гистидин, фенилаланин, лейцин, треонин, бедны валином и метионином, Меласса, наоборот, не содержит фенилаланина, незначительны доли лизина, гистидина, но ощутимы доли валина и метионина. Меласса в значительных количествах содержит не только глутаминовую кислоту, как белки сыворотки, но и аспарагиновую [6, 7].

При оценке питательной ценности смесей аминокислот последние можно сравнить с аминокислотным составом плазмы крови [8]. В плазме крови довольно мала доля глутаминовой и аспарагиновой кислот, но зато значительна доля глутамина и аспаргина, фенилаланина, лейцина, изолейцина, валина, треонина, гистидина. Такая смесь не получена нами как в гидролизатах отходов сахарного производства (жом, меласса) так и в сыворотке молока.

Кафедра биохимии

Поступила 09.09.1999

ЛИТЕРАТУРА

1. **Weodyatt R.T., Sansum W.D., Wider R.M.** Prolonged and accurately timed intravenous injection of sugar. – JAMA, 1915, v. 65 p. 2067.
2. **Block J.** – Anal. Chem., 1950, v. 22, № 10, p. 13027.
3. **Lissitzky R.S., Laurent J.** – Bull. Soc. Chem. Biol., 1955, v. 37, p. 1177.
4. **Иванченко Г.М., Кушманова О.Д.** Руководство к практическим занятиям по биологической химии, 1966.
5. **Davis B., Ornstein L.** Deliv at the Soc. the study of Blood at the New York Acad. Med., 1959.
6. **Крусъ Г.Н., Тянжков В.Г., Фазонов Ю.Ф.** Технология молока и оборудования предприятий молочной промышленности. М., 1986.
7. **Арутюнян Т.Г., Карапетян С.А., Хачатрян М.А.** Аминокислотный состав белков мелассы сахарной свеклы. – Биолог ж. Армении, 1995, т. XLVIII, № 21.
8. **Порядков Л.Ф., Нестерин М.Ф., Витолло А.С., Высоцкий В.Г., Анисова АА.** Показатели белкового обмена у крыс при длительном введении различных пищевых смесей. – Проблема гематологии, 1982, т. XXVII.

Մ.Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ, Ս.Ա. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ, Մ.Հ. ԽԱՉՍԱՐՅԱՆ, Հ.Հ. ՍԵՄԵՐՋՅԱՆ

ԿԱԹԻ ՇԻՃՈՒԿԻ ՍՊԻՏԱԿՈՒՑԻ ԱՄԻՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԿԱԶՄԵ

Ա մ փ ո փ ո մ

Ուսումնասիրված է կաթի շիճուկի սպիտակուցի հիդրոլիզատի ամինաթթվային կազմը՝ այն պարենոտերալ սնուցման ժամանակ կիրառելու նպատակով: Հիդրոլիզի տարրեր պայմաններում ստացած են սպիտակուցային հիդրոլիզատներ (թթվային և հիմնային): Սպիտակուցի ամինաթթվային կազմի բարձր ելք դիտվել է 24-ժամյա թթվային հիդրոլիզի պայմաններում, այն կազմում է 346,2 մգ 100 գ կաթի շիճուկում: