

**Семенова Елена Сергеевна, м.н.с.**

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (Россия, г.Москва)

## **ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА СЫВОРОТКИ КАК СЫРЬЯ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПРОДУКТОВ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ**

*Аннотация. Для получения новых данных по составу и свойствам сыворотки как основного сырья для производства продуктов функциональной направленности использовали метод капиллярного электрофореза для определения аминокислотного состава. Для оценки достоверности полученных результатов использовали метод сравнения – высокоэффективную жидкостную хроматографию и образцы с различным составом, что позволило разработать методику измерений аминокислотного состава в молоке и молочных продуктах.*

*Ключевые слова: подсырная сыворотка, пермеат, концентрат сывороточных белков, аминокислотный состав, метод капиллярного электрофореза.*

**Semenova Elena Sergeevna, research assistant**

All-Russian Dairy Research Institute  
(Russia, Moscow)

## **APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR DETERMINATION OF AMINO ACID COMPOSITION OF WHEY AS RAW MATERIAL FOR THE FUNCTIONAL PRODUCTS MANUFACTURE**

*Abstract. The method of capillary electrophoresis for determination of amino acid composition was used for obtaining of the new data covering whey composition and properties as the basic raw material for the functional products manufacture. For evaluation of reliability of the obtained data the comparative method – HPLC and the samples with different composition were used that made it possible to develop the method of amino acid composition measuring in milk and milk products.*

*Key words: cheese whey, permeat, whey proteins concentrate, amino acid composition, capillary electrophoresis method.*

### **Введение**

Аминокислоты являются важными питательными компонентами пищевых продуктов и встречаются в продуктах питания либо в свободной форме, либо в качестве строительных блоков белков [1]. Анализ аминокислот в

пищевых продуктах состоит из ряда единичных операций, одна из которых представляет собой высвобождение аминокислот из пищевой матрицы [2], далее следует разделение отдельных аминокислот и конечный вариант – их количественное определение с использованием калибровочных стандартов [3,4]. Каждый из этих этапов имеет свои особенности. Например, для оптимального выделения различных аминокислот требуются различные условия гидролиза, и существует разное количество и тип пищевых матриц, так что большинство лабораторий адаптируют методы для наилучшего соответствия их применению [5,6]. В настоящее время не существует стандартизированного метода анализа аминокислот в молоке и продуктах его переработки. В лабораторной практике для определения аминокислотного состава используют различные аналитические методы, в частности метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и совсем недавно для этих целей стал применяться метод капиллярного электрофореза (КЭФ) [2].

Определение аминокислот обычно проводят с использованием ВЭЖХ со спектроскопическим детектированием. Поскольку прямое обнаружение аминокислот обеспечивает низкую чувствительность, в большинстве случаев для увеличения сигнала детекции требуется химическая дериватизация аминокислот. Для этой цели были предложены методы пре- и пост-хроматографической дериватизации. Реагенты, которые осуществляют аминокислотную дериватизацию, в основном базируются на реакционной способности аминогруппы. В последние годы КЭФ приобрел популярность как метод разделения для рутинного анализа, и он широко применяется во многих областях аналитической химии [7]. В последнее время КЭФ вводится в качестве подходящего инструмента для определения аминокислот. Преимущества КЭФ по сравнению с ВЭЖХ заключаются в использовании меньших объемов образца, реагентов и буфера, а также в более высоком разрешении электрофоретического разделения. Кроме того, время анализа, как правило, короче, чем необходимо при использовании метода ВЭЖХ.

#### **Материалы и методы**

В качестве объектов исследований были использованы образцы сыворотки, пермеата и концентрата сывороточных белков, полученные в процессе ультрафильтрационного концентрирования подсырной сыворотки.

Все растворы готовили с использованием деионизированной воды глубокой очистки. Раствор фонового электролита для разделения общих производных аминокислот состоял из 40 мМ тетрабората натрия.

В качестве аналитических стандартов использовали: лизин (Lys), триптофан (Trp), лейцин (Leu), тирозин (Tyr), валин (Val), гидроксипролин (Hyp), аланин (Ala), треонин (Thr), глицин (Gly), глутаминовая кислота (Glu), цистеин (Cys), орнитин (Orn), фенилаланин (Phe), изолейцин (Ile), аспарагиновая кислота (Asp), аргинин (Arg), пролин (Pro), метионин (Met), аспарагин (Asp), серин (Ser) с содержанием основного вещества не менее 98%.

Для проведения измерений использовали систему капиллярного электрофореза Капель 205М, оборудованную спектрофотометрическим

детектором (Люмекс, Россия). Мониторинг производных аминокислот проводили при длине волны 254 нм. Электроферогаммы обрабатывали с использованием программного обеспечения Эльфоран.

### **Подготовка образцов к измерениям**

Анализ аминокислотного состава можно разделить на несколько операций:

- 1) гидролиз отдельных аминокислот из основной цепи белка;
- 2) разделение отдельных аминокислот с помощью аналитической процедуры;
- 3) обнаружение и количественное определение отдельных аминокислот.

При определении содержания аминокислот в гидролизате белков и пептидов следует отметить, что стадия кислотного гидролиза разрушает триптофан и цистеин. Серин и треонин частично разрушаются кислотным гидролизом, в то время как остатки изолейцина и валина могут расщепляться не до конца. Метионин может подвергаться окислению во время кислотного гидролиза, и некоторые аминокислоты (например, глицин и серин) являются распространенными загрязнителями. Следовательно, количественные результаты, полученные для цистеина, триптофана, треонина, изолейцина, валина, метионина, глицина и серина из белкового или пептидного гидролизата, могут быть различными и могут потребовать дальнейшего изучения и рассмотрения.

### **Обсуждение результатов**

При проведении измерений использовали следующие материалы: кварцевый капилляр общей длиной 60 см, эффективной длиной 52,5 см и внутренним диаметром 50 мкм. Растворы образцов гидродинамически вводили в капилляр при давлении 30 мбар в течение 5 с. Напряжение разделения составляло 25 кВ и УФ-детектирование проводили при длине волны – 254 нм со скоростью сбора данных 2,5 Гц. Перед первым прогоном капилляр промывали водным раствором NaOH концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> в течение 5 минут, затем ультрачистой водой в течение 5 минут и в окончании процесса, фоновым электролитом в течение 5 минут.

Для определения эффективности аналитической методики было произведено электрофоретическое разделение смеси аналитических стандартов аминокислот (рисунок 1).

Используя аналитические стандарты аминокислот, были получены данные о времени удерживания аналитов и построена градуировочная зависимость площадей пиков от концентрации каждого исследуемого компонента.

Чтобы оценить динамический диапазон измеряемых концентраций были использованы стандарты аминокислот в сериях разведений. На рисунке 2 представлены данные по определению глутаминовой кислоты, диапазон линейности наблюдался для основных и нейтральных аминокислот. Таким образом, метод охватывает концентрации в диапазоне более трех порядков.

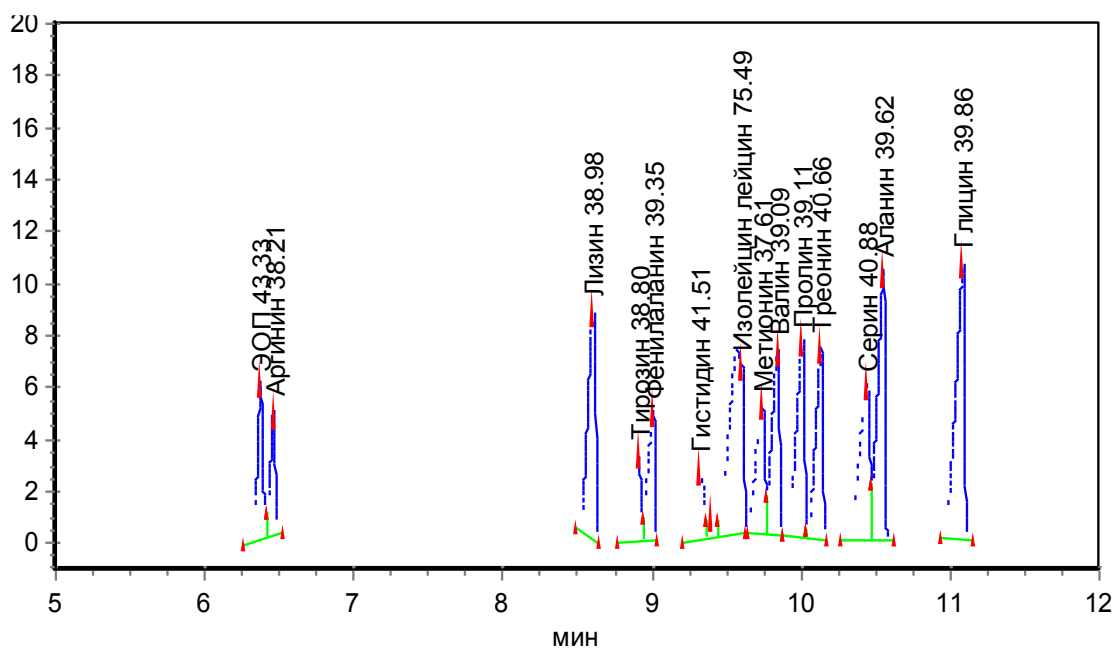


Рисунок 1 – Электрофореграмма смеси аналитических стандартов аминокислот

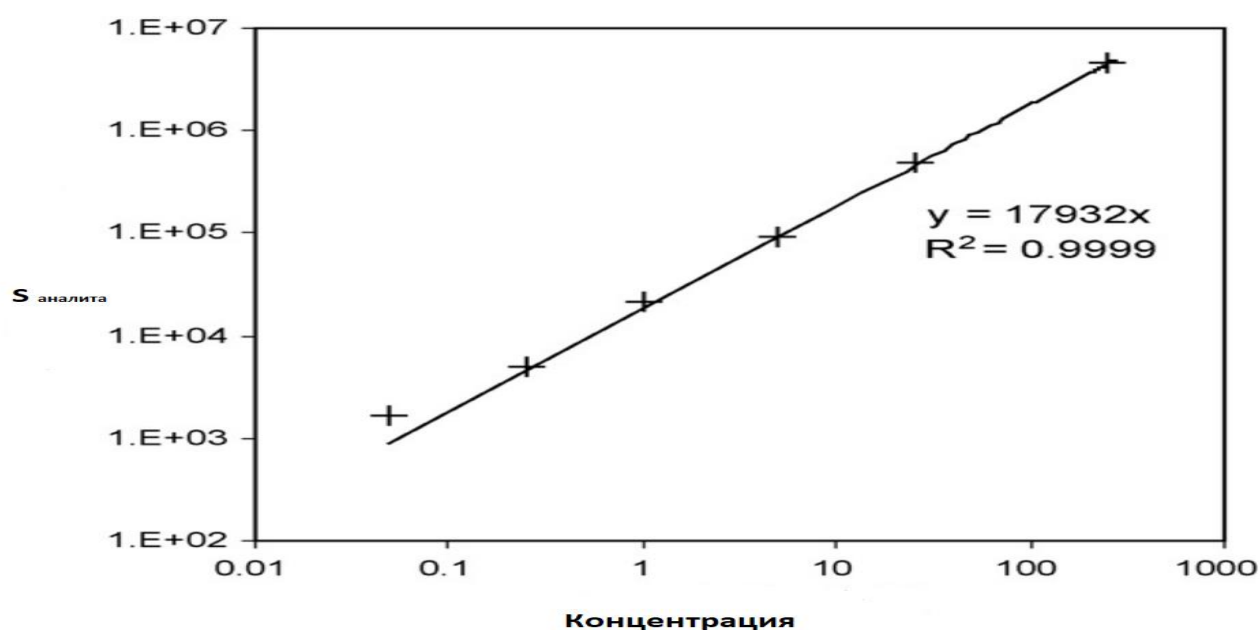


Рисунок – 2 Линейность и динамический диапазон на примере глутаминовой кислоты в двойном логарифмическом масштабе

После разработки методики измерений были проанализированы образцы сыворотки, пермеата и концентрата сывороточных белков, полученные в процессе ультрафильтрационного концентрирования подсырной сыворотки.

При анализе исходного образца сыворотки были получены данные о содержании аминокислот в анализируемом образце. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Аминокислотный состав подсырной сыворотки

№	Время	Наименование аминокислот	Высота	Площадь	Концентрация, мг/100г
1	5.660	Аргинин	3.954	85.73	577
2	7.332	Лизин	20.291	503.6	1229
3	7.540	Тирозин	2.622	75.09	331
4	7.627	Фенилаланин	3.558	77.06	357
5	7.793	Гистидин	1.510	44.56	243
6	8.033	Изолейцин лейцин	14.141	608.2	1927
7	8.133	Метионин	3.184	77.46	268
8	8.222	Валин	8.719	235.8	721
11	8.335	Пролин	11.016	300.1	771
12	8.428	Треонин	12.998	309.9	989
13	8.640	Серин	9.333	268.2	726
14	8.722	Аланин	12.852	309.1	679
15	9.058	Глицин	5.788	131.5	238

Образцы ретентата и пермеата также были проанализированы методом капиллярного электрофореза по составу аминокислот.

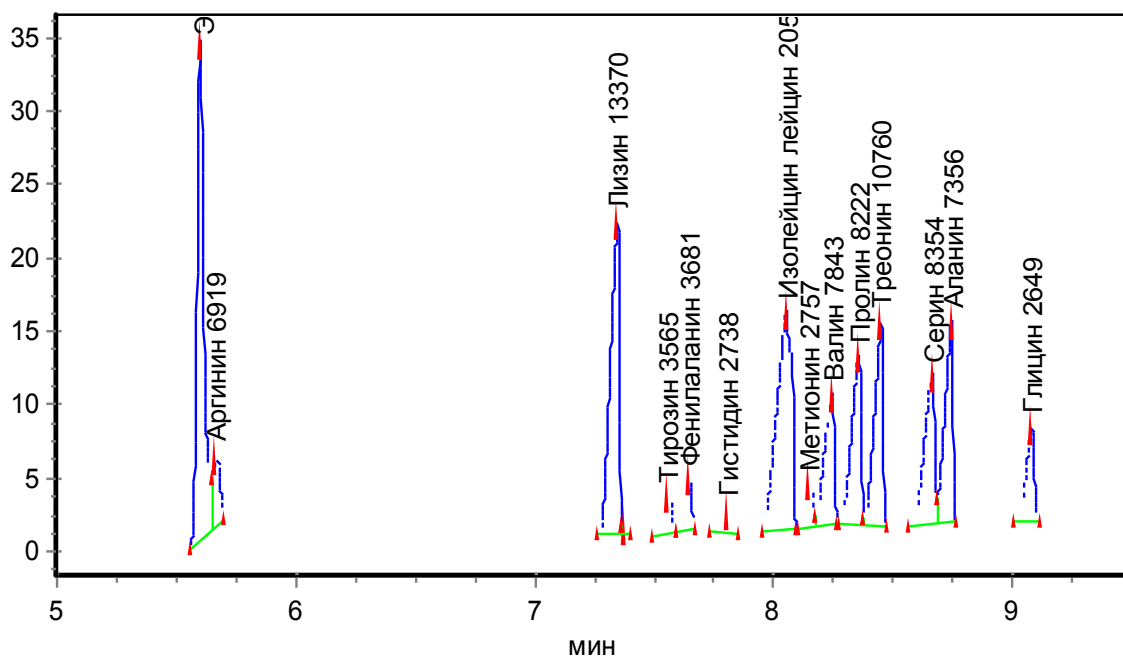


Рисунок 3 – Электрофореграмма аминокислотного состава ретентата подсырной сыворотки

В результате была получена электрофореграмма аминокислотного состава ретентата (рисунок 3) после количественной обработки которой получили результаты определения содержания аминокислот (Таблица 2). Максимальное количество наблюдалось в содержании лизина и

изолейцина+лейцина, что позволяет оценить высокую биологическую ценность ретентата подсырной сыворотки.

Таблица 2 – Аминокислотный состав ретентата

№	Время	Наименование аминокислот	Высота	Площадь	Концентрация, мг/100г
1	5.663	Аргинин	4.795	102.8	2073
2	7.348	Лизин	21.325	547.7	4011
3	7.558	Тирозин	2.702	80.72	1068
4	7.645	Фенилаланин	3.599	79.32	1104
5	7.807	Гистидин	1.435	50.03	819
6	8.053	Изолейцин +лейцин	14.877	648.9	6,168
7	8.152	Метионин	3.227	79.68	825
8	8.245	Валин	8.969	256.4	2352
9	8.358	Пролин	11.584	319.8	2466
10	8.450	Треонин	13.840	337.2	3228
11	8.663	Серин	10.312	308.6	2505
12	8.743	Аланин	13.734	334.8	2205
13	9.080	Глицин	6.409	146.1	792

Анализ образца пермеата выявил практически полное отсутствие аминокислот (рисунок 4).

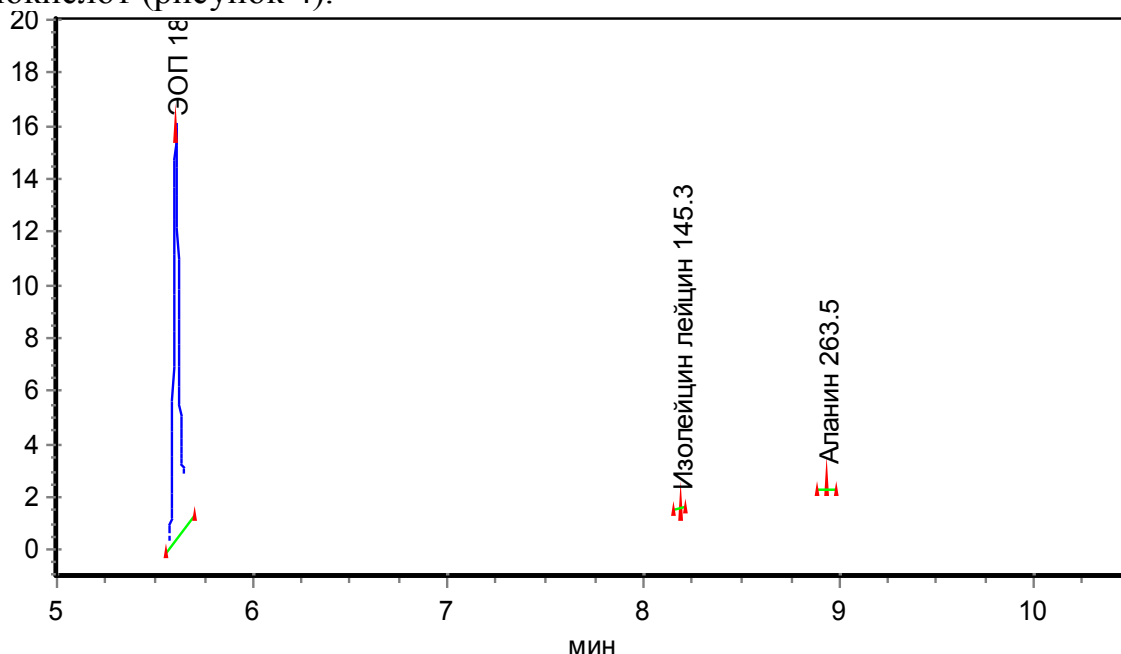


Рисунок 4 – Электрофореграмма аминокислотного состава пермеата подсырной сыворотки

Были обнаружены две аминокислоты изолейцин/лейцин и аланин в концентрации 14,5 мг/100г и 26,3 мг/100г соответственно, свидетельствующие

о том, что при внесении данного компонента при обогащении потребуется корректировка аминокислотного состава продукта.

*Выводы. Проведенные исследования и разработка методики измерений аминокислотного состава позволили сделать вывод, что определение аминокислотного профиля важно для качественной оценки пептидов и белков, которые могут влиять на химические и пищевые свойства продукции, произведенной с применением побочных продуктов переработки молока, активно применяемых в настоящее время на предприятиях молочной отрасли. Метод капиллярного электрофореза для исследования аминокислотного состава, протестированный в данном исследовании, показал себя надежным, быстрым и альтернативным вариантом методу высокоэффективной жидкостной хроматографии.*

### Список литературы

1. Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Рязанцева К.А., Шерстнева Н.Е. Повышение функциональных свойств белков молочной сыворотки путем ферментативного гидролиза // Переработка молока. 2020. № 2. С. 16-19.

2. Юрова Е.А., Мельденберг Д.Н., Жижин Н.А. Применение современных высокоэффективных методов анализа для оценки качества и безопасности молочной сыворотки // Современные достижения биотехнологии. Актуальные проблемы молочного дела: материалы V Международной научно-практической конференции (21-23 октября 2015г.). Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2015. С. 430-433.

3. Лауэр Хенк Х., Розинг Герард П. Высокоэффективный капиллярный электрофорез. СПб, ЦОП «Профессия», 2019. 240 с.

4. Комарова Н.В., Каменцев Я.С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». СПб.: ООО «Веда», 2006. 212 с.

5. Li S.F.Y. Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1992.

6. Smith J.T. Developments in amino acid analysis using capillary electrophoresis // Electrophoresis. 1997. 18:2377-92.

7. Мельденберг Д.Н., Юрова Е.А. Использование метода капиллярного электрофореза для исследования микро-макроэлементного состава молочного сырья и молочной продукции // Научный вклад молодых ученых в развитие пищевой и перерабатывающей промышленности АПК. Сборник научных трудов VII конференции молодых ученых и специалистов научно-исследовательских институтов Отделения хранения и переработки сельскохозяйственной продукции Россельхозакадемии. ГНУ ВНИМИ Россельхозакадемии, Россельхозакадемия, 2013. С. 278-284.