

С.Е. НИЗКИЙ, Г.А. КОДИРОВА, Г.В. КУБАНКОВА

Особенности калибровочных уравнений для ИК-сканеров при определении аминокислотного состава белков сои

Из 20 аминокислот, входящих в состав растительных белков, 17 лучше всего определяются с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Но эта технология затратна по времени, в том числе из-за подготовки проб, что делает ее малоприменимой при проведении массовых анализов, например при оценке селекционного материала. В этом случае наиболее приемлемы технологии, основанные на сканировании в ближнем инфракрасном диапазоне излучения. Несмотря на то что ИК-сканеры способны по одному калибровочному уравнению выявлять большое количество компонентов, необходима постоянная коррекция при определении состава аминокислот и приведении его в процентное соотношение. В статье рассматриваются варианты создания калибровочных уравнений для расчета аминокислотного состава белков сои с помощью компьютерных программ (Nir 42, ISI), обеспечивающих работу ИК-сканеров типа NIR-4250 или FOSS NIRSystem 5000. Установлено, что при создании калибровочных уравнений содержание каждой аминокислоты наиболее корректно выражать в абсолютных единицах (г на 100 г белка), а не относительных (%).

Ключевые слова: ИК-сканер, хроматография, компьютерные программы, калибровочные уравнения, аминокислоты, соя.

Features of calibration equations for IR scanners in determining the amino acid composition of soy proteins. S.E. NIZKII, G.A. KODIROVA, G.V. KUBANKOVA (All-Russian Scientific Research Institute of Soybean, Blagoveshchensk).

17 of the 20 amino acids, included in the composition of plant proteins, are most effectively determined using liquid chromatography. The technology of high-performance liquid chromatography is to a certain extent costly in time, among other things because of sample preparation that makes it unsuitable for mass analysis, for example, when evaluating a breeding material. In this case, the technology based on scanning in the near infrared radiation band are the most acceptable. Despite the fact that IR scanners are able to determine a sufficiently large number of components on the basis of one calibration equation, a constant correction is required when determining the composition of amino acids and reducing it to a percentage ratio. The options for creating calibration equations for determining the amino acid composition of soybean proteins for computer programs (Nir 42, ISI), which provide the operation of IR scanners, such as NIR-4250 or FOSS NIRSystem 5000 are considered in the article. It was found that when creating calibration equations, it is most correct to set for each amino acid its mass content (g per 100 g of protein), and not the relative portion (in %).

Key words: IR scanner, chromatography, computer programs, calibration equations, amino acids, soybean.

Введение

Соя – сельскохозяйственная культура, богатая белком, поэтому важным показателем качества ее семян является содержание в них аминокислот, особенно незаменимых, которые не вырабатываются в организме человека и поступают только с пищей.

*НИЗКИЙ Сергей Евгеньевич – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, КОДИРОВА Галина Александровна – кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, КУБАНКОВА Галина Викторовна – старший научный сотрудник (Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск).

*E mail: agrofak06@mail.ru

В селекционных питомниках ВНИИ сои (Благовещенск) испытывается более тысячи всевозможных образцов (сортов, гибридов, линий и т.д.), оценка которых осуществляется по разным признакам и показателям, в том числе по аминокислотному составу [9, 14].

Для определения содержания аминокислот в белках растительного происхождения используют разные методы, например высокоэффективную жидкостную хроматографию. Современные жидкостные хроматографы пришли на смену автоматическим анализаторам аминокислот, но это не привело к существенному ускорению анализа. Хроматографическое разделение может идти несколько часов, также трудоемка подготовка проб. Не менее длительны и другие физико-химические методы – капиллярный зонный электрофорез и тонкослойная хроматография [6, 10]. Все это ограничивает возможности проведения массовых анализов, например при исследовании коллекций сортов и гибридов в селекционном процессе. С целью экономии времени при массовых экспресс-анализах часто применяют инфракрасные (ИК) сканеры, они успешно определяют общее количество белка, жира и другие хозяйственно ценные биохимические показатели сельскохозяйственных растений [2, 11].

Целью наших исследований является оценка калибровочных уравнений для компьютерных программ, обеспечивающих работу ИК-сканеров, при определении аминокислотного состава белков в растительной продукции.

Методы исследований

В ВНИИ сои для определения аминокислотного состава белков в семенах и надземной массе сои и пшеницы первоначально использовали метод жидкостной хроматографии [9]. Пробоподготовка заключалась в полном расщеплении белков гидролизом обезжиренной муки 6 н соляной кислотой в автоклаве при 105 °С в течение 12 ч. Аминокислоты разделяли на колонке с сульфополистирольным катионитом. Далее, используя фотометрические датчики и нингидриновую реакцию, идентифицировали 17 аминокислот. Время полного разделения на хроматографе занимало более 3,5 ч [6].

В настоящее время в научной литературе описано более 200 аминокислот, найденных в природе, и только 20 из них являются протеиногенными, т.е. составными частями белков [4]. К сожалению, не все эти аминокислоты удается разделить с помощью жидкостной хроматографии. Например, триптофан разрушается при гидролизе [5], а аспарагин не образует окраски в реакции с нингидрином. Глутамин – аминокислота, входящая в двадцатку протеиногенных, – синтезируется из глутаминовой кислоты в организме [1] и обычно отдельно не анализируется. Четыре аминокислоты на колонках с сульфополистиролом, как правило, плохо разделяются и выходят попарно (метионин + цистеин и аланин + глицин) [7]. Таким образом, при хроматографическом разделении удается идентифицировать всего 15 пиков, которые соответствуют 17 аминокислотам.

Количественные расчеты ведутся путем определения площади пиков аминокислот на хроматограмме. В результате обработки хроматограммы вручную или, как правило, с помощью компьютерных программ устанавливается процентное соотношение аминокислот в белке. Содержание каждой аминокислоты выражается в ее доле (%) к суммарному количеству всех, вышедших из колонки (100 %), содержание аминокислот с совпадающими пиками учитывается в равных долях. Этого обычно достаточно, чтобы охарактеризовать белок. Хроматографическое разделение дает дополнительную возможность – установить абсолютное содержание аминокислот (г на 100 г белка), что, однако, сопряжено с проведением более длительных процедур, связанных с построением градуировочных графиков по стандартам отдельных аминокислот. Разумеется, длительность как пробоподготовки, так и самого хроматографического разделения накладывает ограничение на количество анализируемых образцов.

В настоящее время широкое распространение получили инфракрасные сканеры, которые обеспечивают высокую скорость выполнения анализа, причем при достаточно

простой пробоподготовке [3, 12]. Например, для анализа биохимического состава семян иногда не предусматривается даже размол образцов.

Суть метода ИК-сканирования заключается в измерении интенсивности диффузно отраженного света от образца на заранее выбранных длинах волн [3, 13]. Спектр отражения в ближней ИК-области размолотого зерна сои, полученный на ИК-сканере FOSS NIRSystem 5000, приведен на рисунке. Каждому пику спектра соответствует тот или иной химический компонент (жир, белок, углеводы, аминокислоты и т.д.). Компьютерные программы, обеспечивающие работу ИК-сканеров, анализируют спектры образца, сравнивая их с эталонными спектрами, созданными на основе данных, полученных химическими методами, и путем сложных математических расчетов определяют содержание того или иного компонента [17]. Эталонные спектры хранятся в базе данных компьютерных программ в виде калибровочных уравнений. Сканеры NIR 4250 (фирма Pacific Scientific, США) и FOSS NIRSystem 5000 (фирма FOSS Analytical A/S, Дания) позволяют с помощью одного калибровочного уравнения проанализировать в одной пробе более 10 веществ одновременно [15, 16], что делает возможным анализировать с их помощью аминокислотный состав белков в растительных образцах. Для создания калибровочных уравнений подбирали 30 образцов семян сои, отличающихся по содержанию белка друг от друга с коэффициентом вариации не менее 10 %. Аминокислотный состав белка в образцах был определен на жидкостном хроматографе (автоматический анализатор аминокислот фирмы LKB, Швеция) как в относительных (%), так и абсолютных (г на 100 г белка) единицах. В последнем случае использовали метод добавки: в ранее проанализированные пробы добавляли известное количество той или иной химически чистой аминокислоты, и ее содержание определяли по пропорциональности прироста площади пика на хроматограмме. Затем оценивали два вида калибровочных уравнений для ИК-сканера: уравнение 1, основанное на данных о процентном соотношении отдельных аминокислот, и уравнение 2, построенное по абсолютным количествам каждой из них.

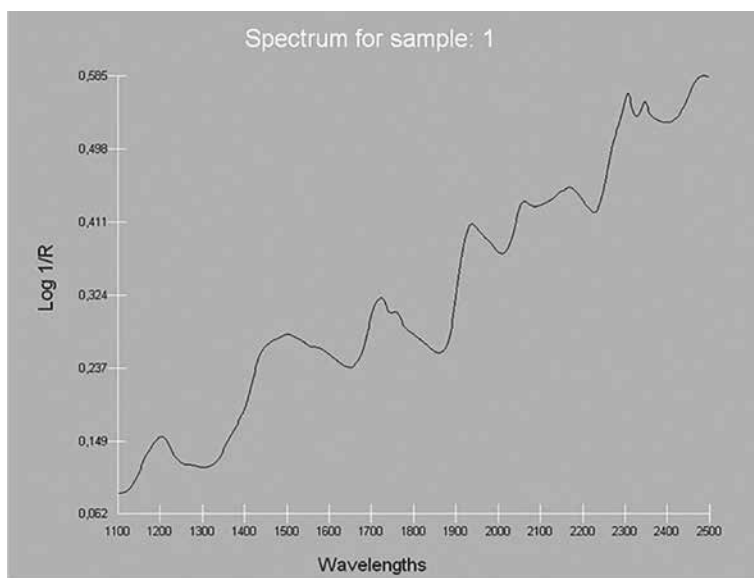
Результаты и обсуждение

Одновременный анализ 17 аминокислот по одному калибровочному уравнению на ИК-сканере создает определенные трудности при обработке результатов, особенно если необходимо корректировать данные. Поэтому для удобства калибровочные уравнения были разделены на две группы – для девяти незаменимых (аргинин, валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин и фенилаланин) и для восьми заменимых (аланин + глицин, аспарагиновая кислота, глютаминовая кислота, цистеин, пролин, серин и тирозин) аминокислот.

Использование калибровочного уравнения, построенного по результатам хроматографического анализа, выраженным в процентном соотношении, показало несоответствие полученных данных критерию «единого целого» (см. таблицу). Другими словами, компьютерная программа выдает результат без учета того, что сумма аминокислот должна составлять 100 %. Для разных проб это может быть и меньше, и больше 100 %. Такой результат не является точным и требует определенных коррекций [8], что компьютерные программы ISI и Nir-42 в принципе предусматривают. Но возникают сомнения, содержание каких аминокислот и в какую сторону необходимо корректировать.

В таблице, где приведены данные по аминокислотному составу белков зерна сои, это несоответствие проявляется для проб 3 и 4: суммы равны 102,26 и 95,02 % соответственно, тогда как для пробы 1 сумма строго соответствует 100 %.

Расчет абсолютного содержания аминокислот по хроматограммам показывает, что в 100 г белка соевого зерна их чуть больше 90 г, что (без учета трех не анализируемых нами аминокислот, а также некоторых других компонентов) вполне справедливо [4, 10]. Соотношения количеств аминокислот, вычисленных разными методами – при расчете хроматограмм или анализе на ИК-сканере, тождественны.



Спектр отражения в ближней ИК-области размолотых семян сои (по оси абсцисс – обратная величина коэффициента отражения, по оси ординат – длина волны, нм)

Результаты определения аминокислотного состава белков семян сои на жидкостном хроматографе LKB и ИК-сканере FOSS NIRSystem 5000 по разным калибровочным уравнениям

Аминокислота		Жидкостной хроматограф		ИК-сканер		
				уравнение 1		уравнение 2
		%	г/100 г белка	%		г/100 г белка
		проба 1	проба 2	проба 3	проба 4	проба 5
Незаменимые	Аргинин	8,83	8,76	8,92	9,02	8,68
	Валин	5,61	6,14	6,31	6,28	6,12
	Гистидин	8,82	5,60	10,90	6,10	4,33
	Изолейцин	6,12	4,48	6,12	4,31	4,24
	Лейцин	7,70	8,12	8,77	8,07	7,90
	Лизин	6,32	6,13	6,62	6,51	5,97
	Метионин	0,50	0,48	0,70	1,00	0,45
	Треонин	3,81	3,28	3,64	3,86	3,27
	Фенилаланин	4,75	4,00	4,71	4,34	4,05
	Σ	52,46	46,99	56,69	49,49	45,01
Заменяемые	Аланин + глицин	4,86	4,14	4,92	4,48	4,29
	Аспарагиновая	11,21	10,54	10,71	11,19	10,68
	Глютаминовая	14,73	13,71	14,75	14,15	13,68
	Цистеин	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
	Пролин	6,40	5,64	5,82	5,96	5,74
	Серин	5,74	5,17	5,24	5,43	5,11
	Тирозин	4,10	3,68	3,63	3,82	3,42
	Σ	47,54	43,38	45,57	45,53	43,42
Все аминокислоты		100,00	90,37	102,26	95,02	88,43

Аналогичные и в целом корректные данные получены и при использовании калибровочного уравнения 2 на ИК-сканере. Так, в пробе 5 установлено, что в 100 г белка зерна сои содержится 88,4 г аминокислот.

Любой из способов подсчета содержания незаменимой аминокислоты лизин (6,32 % от общего количества аминокислот – хроматографический анализ, 5,97 г в 100 г белка – данные ИК-сканера) характеризует белки сои как высоколизиновый продукт, повышающий значение культуры в кормовых смесях для сельскохозяйственных животных*.

Закключение

При определении аминокислотного состава на ИК-сканере с помощью калибровочного уравнения, основанного на данных о процентном соотношении аминокислот, возможно получить их сумму, отличную от 100 %, что не является корректным. Калибровочное уравнение, где применялись данные по абсолютному содержанию аминокислот, дает в результате чуть более 90 г проанализированных аминокислот на 100 г белка зерна сои. Второй подход, по-видимому, более верен, ведь учитывались только 17 из 20 аминокислот, он соответствует литературным данным. Соотношение содержания между отдельными аминокислотами тождественно в обоих случаях, что позволяет проводить оценку полноценности того или иного белка любым из методов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева С.В. Глутаминовая кислота и глутамин // Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов. Т. 1. Харьков: Щедра садиба плюс, 2014. С. 27–83.
2. Баюнов А.П., Смарицын С.Н. Использование модельных систем для получения градуировок в методе ближней инфракрасной спектроскопии // Вестн. Казан. технол. ун-та. 2011. Т. 11. С. 23–29.
3. Ефименко С.Г., Ефименко С.К., Кучеренко Л.А., Нагалева Я.А. Экспресс-оценка содержания основных жирных кислот в масле семян рапса с помощью ИК-спектрометрии // Масличные культуры: Науч.-техн. бюл. ВНИИМК. 2015. Вып. 4 (164). С. 35–40.
4. Кретович В.Л. Биохимия растений. М.: Высш. школа, 1980. 445 с.
5. Крищенко В.П., Ушакова Т.Ф. Аминокислотный состав зерна ячменя, ржи и пшеницы при разных условиях минерального питания // Изв. ТСХА. 1986. Вып. 5. С. 73–79.
6. Мельников И.О. Разработка микрометодов анализа аминокислот, коротких пептидов и олигонуклеотидов с использованием ОФ ВЭЖХ и капиллярного электрофореза: автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2006. 24 с.
7. Руденко А.О., Карцова Л.А., Снарский С.И. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот // Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. Т. 10, вып. 2. С. 223–230.
8. Секанов Ю.П., Степанов М.А. Научные основы и опыт применения средств неразрушающего контроля качества продукции и технологических процессов в растениеводстве // Вестн. ВНИИМЖ. 2016. № 4 (24). С. 110–115.
9. Синеговская В.Т., Клеткина О.О. История развития аграрной науки в Приамурье. Благовещенск: Одеон, 2018. 198 с.
10. Handbook of Chemistry and Physics (1st student ed.) / Ed.-in-chief R.C. Weast. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1988. 1800 p.
11. Mouazen A.M., Saeyes W., Xing J., De Baerdemaeker J., Ramon H. Near infrared spectroscopy for agricultural materials: an instrument comparison // J. Near Infrared Spec. 2005. Vol. 13, iss. 2. P. 87–98.
12. Naoto Shimizu, Junji Katsura, Takashi Yanagisawa et al. Evaluating techniques for rice grain quality using near infrared transmission spectroscopy // J. Near Infrared Spec. 1998. Vol. 6, iss. A. P. A111–A116.
13. Osborn B.G., Fearn T. Near infrared spectroscopy in food analysis. New York, USA: Longman Scientific and Technical, 1986. 200 p.
14. Sinegovskaya V.T. Condition and prospects of scientific support of soybean production // Дальневост. аграр. вестн. 2016. № 4 (40). С. 8–12.
15. Watson C.A., Carville D., Dikeman E., Daigger G., Booth G.D. Evaluation of two infrared instruments for determination protein content of hard red winter wheat // Cereal Chem. 1976. Vol. 53, iss. 2. P. 214–222.
16. Williams P.C., Corderio H.M. Effect of calibration practice on correction of errors induced in near-infrared protein testing of hard red spring wheat by growing location and season // J. Agric. Sci. Vol. 1985. Vol. 104. P. 113–123.
17. Williams P.C., Norris K. Near-infrared technology in the agricultural and food industry. St. Paul, Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1987. 330 p.

* ГОСТ Р 56913-2016. Лизин кормовой. Общие технические условия. Дата введения: 01.01.2017 г. – <http://docs.cntd.ru/document/1200134026> (дата обращения: 11.02.2020 г.).