

С.И. Денисова, В.М. Шейбак, О.Ю. Абакумова, В.Ю. Смирнов,  
Е.М. Дорошенко, Н.А. Коваленко, Н.И. Захаренкова, А.А. Чиркин

## Белковый и аминокислотный состав куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.)

Повышение биологической ценности продуктов питания остается актуальной проблемой пищевой и фармацевтической промышленности. Биологическую ценность и защитные свойства продуктам питания придают эссенциальные компоненты пищи: незаменимые аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты, клетчатка, витамины, микроэлементы и др. Аминокислоты обеспечивают не только синтез белков (протеиногенные аминокислоты), но также выполняют ряд важных метаболических и регуляторных функций, например, для функционирования нейронов и клеток инсулярного аппарата поджелудочной железы необходимы аминокислоты с разветвленным радикалом (валин, лейцин, изолейцин), для синтеза мочевины требуются орнитин, цитруллин, аспарагиновая кислота и аргинин, для синтеза гормонов щитовидной железы и мозгового вещества надпочечников используется тирозин [1]. В связи с этим актуальной остается задача поиска доступных природных источников аминокислот.

### Методика определения спектров свободных и суммарных аминокислот

Аналізу подвергают свободные, или общие, аминокислоты тканей. Для выделения общих аминокислот применяют гидролиз. Гидролиз образцов производится в десятикратном объеме концентрированной соляной кислоты в запаянных ампулах при 110°C в течение 24 часов. После выпаривания соляной кислоты осадок гомогенизируют в 10-кратном объеме 0,2M HClO<sub>4</sub> с добавлением внутреннего стандарта (норлейцин). Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот и их дериватов проводится катионообменной хроматографией одноколоночным методом на автоанализаторе аминокислот Т-339М (Чехия) по модифицированному методу J.V. Benson, J.A. Paterson (1974) [2]. Принцип метода заключается в элюции аминокислот и родственных им соединений ступенчатым градиентом Li-цитратных буферных растворов. После нанесения кислотного экстракта на аналитическую колонку (22,0x0,35 см), заполненную сферическим катионообменником LGAN 2B (размер частиц 8 мкм) («Lachema», Чехия), хроматографическое разделение исследуемых соединений последовательно осуществляется Li-цитратными буферами. Скорость потока растворов 14 мл/час, рабочее давление на колонке 2,5–3,5 МПа. Температура анализа дискретно повышается в середине аналитического цикла с 40 до 62°C. Количественное содержание каждого компонента спектра исследуемых соединений оценивается по реакции с 1% раствором нингидрина (скорость потока 12 мл/час) в капиллярной бане при 100°C при длине волны 520 нм после прохождения через проточную кювету однолучевого фотометра. Сигнал с выхода фотометра поступает на программно-аппаратный комплекс «Мультихром-1», где происходит регистрация, обработка, идентификация пиков и вычисление концентраций по площадям пиков.

Качественная идентификация и количественная оценка полученных значений производится программой путем сравнения результатов анализа исследуемых биологических объектов со стандартной калибровочной кривой

искусственной смеси аминокислот и нингидринположительных компонентов. Последняя содержит равные количества определяемых соединений по 250 нмоль/мл каждого и в качестве внутреннего стандарта в нее добавляют в той же концентрации норлейцин (концентраты стандартных смесей фирмы «Calbiochem», США). В описанной системе последовательно элюируются и определяются следующие соединения: цистеиновая кислота (CA), таурин (Tau), фосфозтаноламин (PEA), мочеви́на (urea), аспарагиновая кислота (Asp), OH-пролин (H-Pro), треонин (Thr), серин (Ser), аспарагин (Asp), глутаминовая кислота (Glu), глутамин (Gln),  $\alpha$ -аминоадипиновая кислота ( $\alpha$ -AAA), пролин (Pro), глицин (Gly), аланин (Ala),  $\alpha$ -аминомасляная кислота ( $\alpha$ -ABA), цитруллин (Citr), валин (Val), цистин (Cys), метионин (Met), цистатионин (Ctn), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), норлейцин (n-Leu),  $\beta$ -аланин ( $\beta$ -Ala),  $\beta$ -аминомасляная кислота ( $\beta$ -ABA),  $\gamma$ -аминомасляная кислота (GABA), этаноламин (EA), аммиак ( $\text{NH}_3$ ), орнитин (Orn), лизин (Lys) и гистидин (His). Весь цикл аналитического процесса (включая регенерацию колонки 0,2 N LiOH и ее стабилизацию стартовым 0,2 M Li-цитратным буфером pH 2,8) составляет 200 мин. Воспроизводимость метода  $\pm 1,5\%$ , чувствительность –  $10^{-9}$  моль. Реагенты готовятся из коммерческих комплектов для определения свободных аминокислот («Lachema») на деионизованной воде, которая перед использованием подвергается двойной дистилляции.

#### **Объект исследования**

Культура китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) разводится на кафедре зоологии Витебского государственного университета им. П.М. Машерова на протяжении 30 лет [3, 4].

Куколки получены из гусениц, питавшихся на разных кормовых растениях, а именно: дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) и береза повислая (*Betula pendula* Roth.). Куколки анализировались в состоянии диапаузы.

Выкормка гусениц проводилась в летний период 2005 года при одинаковых температуре, влажности воздуха и освещенности.

#### **Данные о гидролизатах белков молока и некоторых растений**

Учитывая, что стандартом по содержанию аминокислот являются гидролизаты белков молока, на первом этапе исследований были изучены аминокислотные спектры белковых препаратов молока (казеинаты, копреципитаты), а также экстракты растительных компонентов широко распространенных пищевых добавок. Для сравнения был использован аминокислотный спектр гидролизата нейтрализованного казеина. Получены следующие наиболее интересные результаты (табл. 1).

В гидролизате образца копреципитата-сырца среднекальциевого обнаружено повышение процентного содержания пролина, а также – уменьшение содержания метионина, изолейцина, лейцина, тирозина и фенилаланина. В отличие от гидролизата казеина, в гидролизате копреципитата обнаруживаются альфа-аминобутират, бета-аланин и этаноламин. Эти азотсодержащие соединения не являются протеиногенными и связаны, вероятно, с метаболическими функциями белков копреципитата. В спектрах свободных аминокислот и в спектрах аминокислот гидролизатов изучаемых образцов белков молока не обнаружены значимые количества триптофана, гистидина и аргинина. Препараты пенообразователей (1-США и 2-Франция) по аминокислотному составу гидролизатов близки к нейтрализованному казеину. В гидролизате пенообразователя 2-Франция по сравнению с пенообразователем 1-США повышено относительное содержание треонина, серина, пролина и тирозина; в обоих образцах пенообразователей не выявлено значимых количеств триптофана, гистидина и аргинина. Широко применяемые в пищевой, кондитерской и косметической промышленности препараты белков молока

CS-922, CC-903, HCA-411 имеют сходный аминокислотный состав гидролизатов, но отличаются по соотношению аминокислот от образца нейтрализованного казеина большим относительным содержанием глутаминовой кислоты, пролина, аспарагиновой кислоты, серина, тирозина, лизина, гистидина, аргинина, триптофана и цистеина, а также более низким относительным содержанием аланина, изолейцина и лейцина.

Таблица 1

**Аминокислотные спектры препаратов молока и экстрактов лекарственных растений (ммоль/л)**

Аминокислота	Казеин	Казеинат натрия	Копреципитат	Пенообразователь	Спирулина	Эхинацея	Родиола розовая
Асп	3,28	2,07	9,34	4,29	0,69	15,7	16,2
Тре	2,80	2,62	5,78	1,45	0,74	2,20	4,22
Сер	2,68	1,86	6,24	2,15	0,38	2,00	5,97
Глу	5,28	2,20	9,89	3,06	1,95	11,2	17,2
Гли	–	0,26	–	–	0,73	3,57	–
Про	–	21,3	6,72	11,1	6,41	30,5	15,6
Гли	3,56	4,68	7,66	4,34	6,64	4,43	11,7
Ала	18,05	15,4	14,6	19,3	25,5	14,9	10,3
Вал	8,26	17,0	10,8	15,1	13,7	6,85	6,44
Цис	–	–	–	–	–	–	–
Мет	3,33	1,17	0,31	3,12	1,20	0,10	–
Иле	12,8	8,63	7,83	9,92	8,32	2,35	2,76
Лей	22,6	9,25	9,03	19,0	13,2	1,80	3,55
Тир	2,41	0,79	0,79	3,15	1,77	–	–
Фен	5,23	2,54	2,86	3,95	3,50	1,81	1,37
Лиз	–	–	–	–	–	–	–
Гис	–	–	–	–	–	–	–
Ава	–	2,33	0,40	–	4,46	0,11	–
бета-ала	–	–	–	–	3,33	–	1,11
Этаноламин	–	0,55	–	–	0,47	0,89	–
Арг	–	–	–	–	–	–	–
Три	–	–	–	–	–	–	–

Изучены аминокислотные спектры гидролизатов экстрактов растений спирулины, эхинацеи, родиолы розовой и солянки холмовой. Наиболее близким спектром аминокислот по сравнению с нейтрализованным казеином обладает гидролизат экстракта спирулины, однако для гидролизата экстракта спирулины характерно более высокое содержание альфа-аминобутирата, пролина, бета-аланина и этаноламина. Этот спектр весьма близок к таковому гидролизата копреципитата белков молока (за исключением более низкого относительного содержания тирозина). В гидролизатах экстрактов исследованных растений по сравнению с нейтрализованным казеинатом повышено относительное содержание аспарагиновой и глутаминовой кислот и пролина и снижено относительное содержание метионина, изолейцина, лейцина и тирозина.

**Данные о свободных аминокислотах куколок китайского дубового шелкопряда**

Исследованиями украинских ученых доказано, что куколки китайского дубового шелкопряда являются эффективным источником многих биологически активных веществ [5]. В связи с этим был проанализирован спектр свободных аминокислот куколок китайского дубового шелкопряда с учетом кормовой базы гусениц (табл. 2).

**Спектр свободных аминокислот куколок  
китайского дубового шелкопряда (моль/л)**

Аминокислота	Питание листьями дуба	Питание листьями березы	Без учета питания
Таурин	0,70±0,08	1,12±0,08 <sup>†</sup>	0,98±0,11
Асп	3,81±0,57	5,59±0,68 <sup>†</sup>	4,70±0,56
Тре	10,3±0,36	10,2±0,49	10,3±0,27
Сер	16,2±2,04	10,1±1,07 <sup>†</sup>	13,1±1,71
Глу	1,03±0,10	0,76±0,06 <sup>†</sup>	0,90±0,08
Глн	15,2±0,99	22,9±1,36 <sup>†</sup>	19,1±1,89
Про	4,86±0,24	6,31±0,51 <sup>†</sup>	5,59±0,41
Гли	16,1±0,75	18,2±1,55	17,1±0,91
Ала	22,7±3,27	14,0±2,06 <sup>†</sup>	18,3±2,60
Альфа-АБА	0,034	0,016	0
Вал	8,49±0,21	7,83±0,19 <sup>†</sup>	8,16±0,19
Мет	0,80±0,08	0,54±0,10 <sup>†</sup>	0,67±0,08
Цитр	2,26±0,26	2,04±0,14	2,15±0,14
Иле	4,54±0,19	4,14±0,12	4,34±0,14
Лей	4,70±0,16	4,82±0,24	4,76±0,13
Тир	2,86±0,38	2,20±0,12	2,53±0,23
Фен	0,90±0,03	1,15±0,04 <sup>†</sup>	1,04±0,07
Бета-АБА	0,56±0,04	0,46±0,01 <sup>†</sup>	0,51±0,03
Этаноламин	0,21±0,01	0,24±0,03	0,23±0,02
Орнитин	0,05±0,01	0,04±0,01	0,04±0,01
Лиз	8,30±0,73	9,02±1,03	8,70±0,59
Гис	10,4±0,76	10,1±0,27	10,3±0,37

Примечание: <sup>†</sup> – P<0,05.

Итак, в природе имеется объект – куколка, содержащая биологическую жидкость, между стадиями двух эукариотических организмов – гусеницы и бабочки. Очевидно, что в этой жидкости должен содержаться оптимальный для синтеза белков эукариотического организма спектр аминокислот. По данным нашей лаборатории, общее количество свободных аминокислот в жидком содержимом куколок китайского дубового шелкопряда составляет 14,6 г/л, в том числе обнаружены ( $M \pm m$ , ммоль/л) глутамин (19,07±1,886), аланин (18,33±2,601), глицин (17,15±0,907), серин (13,13±1,711), треонин (10,28±0,272), гистидин (10,26±0,367), лизин (8,659±0,586), валин (8,162±0,193), пролин (5,586±0,409), лейцин (4,763±0,133), аспарагиновая кислота (4,700±0,561), изолейцин (4,337±0,145), тирозин (2,530±0,230), цитрулин (2,152±0,141), фенилаланин (1,043±0,070), таурин (0,976±0,112), глутаминовая кислота (0,899±0,081), метионин (0,672±0,083), бета-аланин (0,511±0,029), этаноламин (0,227±0,016), орнитин (0,044±0,004). Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии не выявлены аминокислоты аспарагин, цистеин и триптофан. По сравнению со спектром свободных аминокислот растений в жидком содержимом куколок содержится больше глицина, лизина, гистидина, пролина и глутамина, а также снижено содержание глутаминовой кислоты и фенилаланина. Аминокислотный состав куколок близок к биологически полноценным белкам молока.

Интересно, что характер кормовой базы может модифицировать аминокислотный состав куколки. Оказалось (табл. 2), что при питании гусениц березовыми листьями в куколках содержится больше таурина, аспарагиновой кислоты, глутамина, пролина и фенилаланина и меньше серина, глутаминовой кислоты, аланина, валина, метионина и бета-аланина по сравнению с куколками, сформированными из гусениц, питавшихся дубовыми листьями.

**Белковый спектр и биологическая активность содержимого куколок китайского дубового шелкопряда**

При фракционировании содержимого куколок на сефадексе G-25 получают три пика веществ, поглощающих ультрафиолет при длинах волн 260 и 280 нм (табл. 3).

Таблица 3

**Хроматографическое разделение экстракта куколок китайского дубового шелкопряда на сефадексе G-25**

Номер фракции	Поглощение при 260 нм	Поглощение при 280 нм	Содержание белка, мг/мл
5	0,006	-0,002	-
6	0,484	0,677	0,681
7	2,747	2,762	2,193
8	2,449	2,689	2,308
9	1,008	1,508	1,571
10	0,4	0,554	0,555
11	0,18	0,219	0,203
12	0,114	0,116	0,093
13	0,097	0,075	0,042
14	0,125	0,076	0,023
15	0,154	0,083	0,011
16	0,166	0,086	0,007
17	0,177	0,09	0
18	0,234	0,116	0
19	0,337	0,16	0
20	0,386	0,194	0
21	0,45	0,217	0
22	0,415	0,206	0
23	0,406	0,208	0,014
24	0,387	0,208	0,029
25	0,295	0,188	0,068
26	0,237	0,174	0,09
27	0,192	0,152	0,09
28	0,174	0,141	0,087
29	0,165	0,137	0,086
30	0,149	0,128	0,086
31	0,123	0,114	0,084
32	0,111	0,122	0,105
33	0,117	0,147	0,139
34	0,134	0,184	0,183
35	0,144	0,223	0,183
36	0,144	0,25	0,277
37	0,134	0,256	0,295
38	0,13	0,265	0,311

Номер фракции	Поглощение при 260 нм	Поглощение при 280 нм	Содержание белка, мг/мл
39	0,159	0,356	0,431
40	0,296	0,788	0,981
41	0,551	1,586	2,04
42	0,733	2,075	2,659
43	0,745	2,095	2,681
44	0,641	1,822	2,337
45	0,506	1,418	1,813
46	0,387	1,049	1,332
47	0,277	0,743	0,94
48	0,192	0,514	0,651
49	0,128	0,347	0,441
50	0,08	0,222	0,284
51	0,046	0,133	0,172
52	0,026	0,075	0,096
53	0,006	0,032	0,045

Анализ хроматограмм показал, что в содержимом куколок китайского дубового шелкопряда можно найти три пика нуклеиновых кислот (A260) и белков (A280), причем максимумы этих пиков совпадают: 7,8 фракции, 21 фракция и 42,43 фракции.

Характер разделения биополимеров содержимого куколок китайского дубового шелкопряда в виде трех пиков представлен на рисунке.

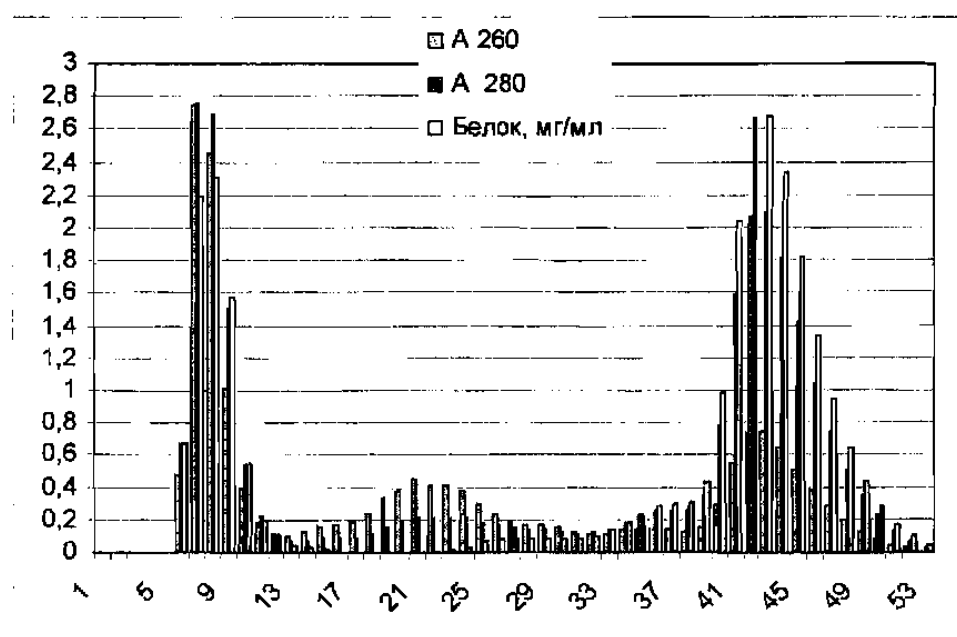


Рис. Спектр биополимеров содержимого куколок китайского дубового шелкопряда в результате разделения на сефадексе G-25.

При диск-электрофорезе содержимого куколок китайского дубового шелкопряда также выделяется 8 фракций белков, четко делящихся на три группы по электрофоретической подвижности белков.

Хотя предстоит работа по изучению химического состава выделенных групп биополимеров, была предпринята попытка изучения биологической активности жидкого содержимого куколок (ЖСК) китайского дубового шелкопряда.

В табл. 4 приведены результаты исследований защитного действия ЖСК на модели абстинентного синдрома у крыс. В качестве критерия эффективности защитного эффекта препаратов избрана концентрация гомоцистеина в сыворотке крови. Известно, что эта аминокислота накапливается при дефиците фолиевой кислоты и витамина В<sub>12</sub> и проявляется в виде нарушений процессов метилирования биомолекул и повреждения эндотелия кровеносных сосудов.

Таблица 4

**Содержание гомоцистеина в сыворотке крови крыс при моделировании абстинентного синдрома**

Группа животных	Концентрация гомоцистеина, мкмоль/л
Контроль	12,2±3,9
Абстинентный синдром	22,3±10,9
Абстинентный синдром + витамин В <sub>12</sub>	22,3±6,8
Абстинентный синдром + триптофан	40,1±9,7
Абстинентный синдром + ЖСК	7,6±1,6

Из анализа данных табл. 4 следует, что только жидкое содержимое куколок китайского дубового шелкопряда оказалось способным полностью предотвратить развитие экспериментального абстинентного синдрома.

Итак, в результате проведенных исследований показано, что спектр свободных аминокислот содержимого куколок китайского дубового шелкопряда близок к биологически полноценным белкам. Спектр свободных аминокислот содержимого куколок китайского дубового шелкопряда зависит от вида скармливаемых гусеницам листьев. Биополимеры содержимого куколок дубового шелкопряда распределяются в виде трех групп макромолекул. Суммарное содержимое куколок китайского дубового шелкопряда предотвращает развитие экспериментального абстинентного синдрома у крыс.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. **Чиркин, А.А.** Аминокислотный состав препаратов солянки холмовой и их применение для коррекции возрастных изменений метаболизма / **А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, В.М. Шейбак** // Вестник фармации. – 1998. – № 4. – С. 24–30.
2. **Бенсон, Дж.** Хроматографический анализ аминокислот и пептидов на сферических смолах и его применение в биологии и медицине / **Дж. Бенсон, Дж. Патерсон** / Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М., 1974. – С. 9–84.
3. **Радкевич, В.А.** Экология листогрызущих насекомых / **В.А. Радкевич**. – Мн.: Наука и техника, 1980. – 239 с.
4. **Денисова, С.И.** Теоретические основы разведения китайского дубового шелкопряда в Беларуси / **С.И. Денисова**. – Мн.: УП «Технопринт», 2002. – 234 с.
5. Способ получения лечебного экстракта: а.с. СССР, № 1787439 А1; патент Украины 16965 (1997 год) / **В.А. Трокоз, Т.Д. Лотош, А.Б. Абрамова, Т.Б. Арегинская, Л.М. Гухман**.

**S U M M A R Y**

*In the result of the carried out investigation it has been shown that the spectrum of free amino acids of the content of *Antheraea pernyi* pupae is similar to biologically valuable proteins. The spectrum of the free amino-acids of the content of *Antheraea pernyi* pupae depends on the type of leaves used for feeding caterpillars. Biopolimers of the content of *Antheraea pernyi* are distributed into three types of macromolecules. The total content of *Antheraea pernyi* prevents from developing experimental abstinent syndrome in rats.*

*Поступила в редакцию 20.11.2006*