

December 2019

Determination of amino acids buffer of soluble proteins of the Aral sea Artemia cyst

KHAJIBAYEV Quvvat

Institute of Natural Sciences, Nukus, Uzbekistan, khajibaye_93@mail.ru

BERDIMBETOVA Gulsara

Institute of Natural Sciences, Nukus, Uzbekistan, gulsara2@rambler.ru

QARLIBAYEVA Bakhtigul

Institute of Natural Sciences, Nukus, Uzbekistan, bqarlibaeva@inbox.ru

OSHCHEPKOVA Yuliya

Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan, Joshepkova05@rembler.ru

Follow this and additional works at: <https://uzjournals.edu.uz/cce>

 Part of the [Other Chemical Engineering Commons](#)

Recommended Citation

Quvvat, KHAJIBAYEV; Gulsara, BERDIMBETOVA; Bakhtigul, QARLIBAYEVA; and Yuliya, OSHCHEPKOVA (2019) "Determination of amino acids buffer of soluble proteins of the Aral sea Artemia cyst," *CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING*: Vol. 2019 : No. 4 , Article 25.

Available at: <https://uzjournals.edu.uz/cce/vol2019/iss4/25>

This Article is brought to you for free and open access by 2030 Uzbekistan Research Online. It has been accepted for inclusion in CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING by an authorized editor of 2030 Uzbekistan Research Online. For more information, please contact sh.erkinov@edu.uz.

DETERMINATION OF AMINO ACIDS BUFFER OF SOLUBLE PROTEINS OF THE ARAL SEA ARTEMIA CYST

Quvvat KHAJIBAYEV¹ (khajibaye_93@mail.ru), Gulsara BERDIMBETOVA¹ (gulsara2@rambler.ru),
 Bakhtigul QARLIBAYEVA¹ (bqarlibaeva@inbox.ru), Yuliya OSHCHERKOVA² (Joshepkova05@rembler.ru),
 Uchqun ISHIMOV² (81_uchqun@mail.ru)

¹Institute of Natural Sciences, Nukus, Uzbekistan

²Institute of Bioorganic Chemistry, Tashkent, Uzbekistan

For the first time, the amino acid composition of the buffer of soluble proteins of the Artemia cyst of the Aral Sea was determined. The determination of the qualitative and quantitative amino acid content of the buffer of soluble proteins of Artemia cysts was carried out by high performance liquid chromatography. Qualitative analysis and quantitative calculation of the concentration of the studied free amino acids were carried out by comparing the retention time and peak areas of standard amino acids, and the studied phenylthiocarbamide derivatives of amino acids. As a result of studies in the buffer of soluble proteins of the Artemia cyst, 19 amino acids were identified, 9 of which are indispensable.

Keywords: cysts, Artemia, acid hydrolysis, essential amino acids, high performance liquid chromatography

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ БУФЕР РАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ЦИСТЫ АРТЕМИИ АРАЛЬСКОГО МОРЯ

Кувват Ганиевич ХАЖИБАЕВ¹ (khajibaye_93@mail.ru), Гулсара Есеновна БЕРДИМБЕТОВА¹ (gulsara2@rambler.ru),
 Бахтигул Пердебаевна ҚАРЛИБАЕВА¹ (bqarlibaeva@inbox.ru), Юлия Игоревна ОЩЕПКОВА² (Joshepkova05@rembler.ru),
 Учқун Жомуродович ИШИМОВ² (81_uchqun@mail.ru)

¹Институт естественных наук, Нукус, Узбекистан

²Институт биоорганической химии, Ташкент, Узбекистан

Впервые определен аминокислотный состав буфер растворимых белков цисты Артемии Аральского моря. Определение качественного и количественного содержания аминокислот буфер растворимых белков цисты Артемии проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Качественный анализ и количественный расчет концентрации исследуемых свободных аминокислот проводили сравнением времени удерживания и площадей пиков стандартных аминокислот, и исследуемых фенилтиокарбамильных производных аминокислот. В результате проведенных исследований в буфер растворимых белках цисты Артемии были идентифицированы 19 аминокислот, 9 из которых являются незаменимыми.

Ключевые слова: циста, Artemia, кислотный гидролиз, незаменимые аминокислоты, высокоэффективная жидкостная хроматография

OROL DENGIZI ARTEMIA SISTASINING BUFFER ERITUVCHIDA ERIGAN OQSIL TARKIBIDAGI AMINOKISLOTALAR MIQDORINI ANIQLASH

Quvvat G'anievich KHAJIBAYEV¹ (khajibaye_93@mail.ru), Gulsara Esenovna BERDIMBETOVA¹ (gulsara2@rambler.ru),
 Bakhtigul Perdebaevna QARLIBAYEVA¹ (bqarlibaeva@inbox.ru), Yuliya Igorevna OSHCHERKOVA² (Joshepkova05@rembler.ru),
 Uchqun Jomurodovich ISHIMOV² (81_uchqun@mail.ru)

¹Tabiiy fanlar instituti, Nukus, O'zbekiston

²Bioorganik kimyo instituti, Toshkent, O'zbekiston

Birinchi marta Orol dengizi Artemia sistasining buffer eritmada eruvchan oqsillari tarkibidagi aminokislotalar miqdori aniqlandi. Artemia sistasining bufferda eruvchan oqsillarini sifat va miqdoriy analiz qilish yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi yordamida amalga oshirildi. O'rganilgan erkin aminokislotalar miqdorini sifatli tahlil qilish va miqdoriy hisoblash standart aminokislotalarning chiqish vaqti va miqdori aminokislotalarning o'rganilgan feniltiokarbamil hosilalarini taqqoslash orqali amalga oshirildi. Artemia sistasining buffer eritmada eriydigan oqsillari tarkibida 19 ta aminokislotalar aniqlandi, ulardan 9 tasi almashinilmaydigan aminokislotalar hisoblanadi.

Kalit so'zlar: sista, Artemia, kislotali gidroliz, almashinilmaydigan aminokislotalar, yuqori samarali suyuqlik xromatografiya

Введение

Одной из специфических особенностей всех жизненных форм рачка Артемии, в том числе цисты, является значительное содержание белков (49—55%). Этот показатель варьирует по годам и под влиянием различных факторов окружающей среды его обитания. Также установлено, что состав и соотношение белков и других биологически активных веществ меняется в процессе онтогенеза рачка, что необходимо учитывать при их использовании в качестве биологически активной пищевой добавки. Кроме того, для каждой стадии артемии характерны специфические белки, идентификация которых представляет большой интерес для выяснения их биологической роли и физиологической активности.

Известно, что белок очень ценен благодаря своему аминокислотному составу, так как аминокислоты являются главным строительным

материалом в живом организме. Из более 500 выявленных в природе различных аминокислот только 20 протеиногенных аминокислот играют важнейшую роль в жизни человека.

В связи с этим, цисты рачка Артемии как высокобелковое природное сырье с высоким содержанием аминокислот представляет большой интерес для исследования [1, 2, 3].

Целью нашего исследования является определение аминокислотного состава буфер растворимых белков цисты Артемии Аральского моря.

В ранних публикациях мы сообщали о количественном содержании белка и свободных аминокислот в цистах Артемии Аральского моря.

В данной статье мы представляем результаты определения аминокислотного состава буфер растворимых белков цисты Артемии Аральского моря.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служили цисты Артемии, собранные осенью 2018 г. с побережья Аральского моря Республики Каракалпакстан. Цисты были предварительно очищены, обессолены (промыты от морских солей на его поверхности), измельчены на шаровой мельнице до мукообразного порошка размером частиц 40 мкм, при влажности $5,1 \pm 0,2\%$. Полученная мука цисты представляет собой порошок темно-коричневого цвета, со специфическим рыбным запахом [4].

Обезжиривание образца проводили смесью хлороформ:метанол (2:1, об) по методу Folchet al. (1957) при комнатной температуре [5].

Белки экстрагировали из обезжиренной муки буфер (Tris-HCl 0.5 M), в течение 2 ч (3 раза), при комнатной температуре. По окончании экстракции, образцы центрифугировали в течение 15 минут при 6000 об/мин. Далее отбирали супернатант, который лиофильно высушивали.

Гидролиз образца осуществляли по методу [6].

В термостойкую ампулу поместили 50 мкг белковой фракции и к нему добавили смесь трифторуксусной и соляной кислот (ТФУ:НСl =1:2, об) в количестве 50 мл. Содержимое ампулы замораживали жидким азотом и под вакуумом запаивали ампулу. Затем ампулу выдерживали в термостате при температуре 166 °С в течение 1 часа 10 минут. Полученный гидролизат высушивали под вакуумом лиофилизацией.

Синтез фенилтиокарбамильных (ФТК)-производных аминокислот.

Для получения ФТК-производных аминокислот, было взято 200 нмоль образца, высушенного гидролизата белковой фракции и к нему добавлено 100 мкл раствора, состоящего из ТЭА:CH₃ОН:Н₂О (1:7:1 по об). Смесью выдерживали в течение 10 минут при комнатной температуре и высушивали под вакуумом.

Реакцией с фенилтиоизоцианатом (ФТИЦ) синтезировали ФТК-производные аминокислот. Для этого к ампуле с высушенным гидролизатом добавляли 50 мкл раствора, состоящего из ТЭА:CH₃ОН:Н₂О:ФТИЦ (1:7:1:1 по об). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 минут. По окончании, содержимое досуха упаривали под вакуумом. Предколонную модификацию аминокислот проводили по методу Кохана [7, 8].

Высокоэффективный жидкостной хроматографический (ВЭЖХ) анализ ФТК-производных аминокислот проводили на хроматографе Agilent Technologies 1200 с диодноматричным детектором в градиенте концентрации ацетонитрила. Использовали колонку Discovery HS C18 (75x4.6 мм). Раствор А: 0,14M

CH₃COONa + 0,05% ГЭА pH 6,4; В: ацетонитрил. Скорость потока 1,2 мл/мин, оптическое поглощение измеряли при 269 нм. Градиент %В/мин: 1-6%/0-2.5мин; 30%-45мин; 60%-45-50 мин; 0%-55мин.

Использовали стандартные образцы следующих аминокислот (Sigma): аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu), серин (Ser), глицин (Gly), аспарагин (Asn), глутамин (Gln), цистеин (Cys), треонин (Thr), аргинин (Arg), аланин (Ala), пролин (Pro), тирозин (Tyr), валин (Val), метионин (Met), изолейцин (Ile), лейцин (Leu), гистидин (His), триптан (Trp), фенилаланин (Phe), лизин (Lys), а также фенилизотионат (sigma) соляная кислота (х.ч.) изопропиловый спирт (ч.д.а.) гидроксид натрия (ч.д.а.), ацетат натрия (х.ч.), ацетонитрил (sigma) («CHEMICALS» France), метилцианид (ч.д.а).

Качественный анализ и количественный расчет концентрации исследуемых свободных аминокислот проводили сравнением времени удерживания и площадей пиков стандартных и исследуемых ФТК-производных аминокислот [9, 10].

Результаты и обсуждение

Белковый экстракт цисты представляет собой сухой рассыпчатый порошок белого цвета, легко растворимый в воде.

Хроматограмма стандартной смеси и ФТК-производных аминокислот и условия разделения приведены на рисунке 1. Идентификацию аминокислот проводили сравнением их времени удерживания в аналитической колонке, а количественное определение проводили сравнением площадей пиков каждой аминокислоты на хроматограммах стандартной и исследуемых образцов.

Полученные данные приведены в таблице 1. Для сравнения количественного содержания аминокислот в последнем столбце таблицы (База цисты А., %) приведены данные из публикации Рудневой И.И. по вариативности содержания аминокислотного состава цист соленых озер Крыма [11].

Как видно из рисунка 1 и таблицы 1, цисты Артемии Аральского моря содержат 19 аминокислот, 9 из которых являются незаменимыми (аргинин, треонин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, гистидин, фенилаланин и лизин).

В количественном отношении, аминокислоты буфер растворимых белков расположены в следующем порядке: Glu > Asp > Leu > Ile > Val > Cys > Ala > Arg > Tyr > Gln > Ser > Pro > Gly > Asn > Thr > His > Met > Phe > Lys.

Из приведенных данных видно, что наряду со схожестью с составом цист соленых озер Крыма имеются различия, а именно обнаружены также аспарагин и глутамин. Выявлено наличие большого количества незаменимых аминокис-

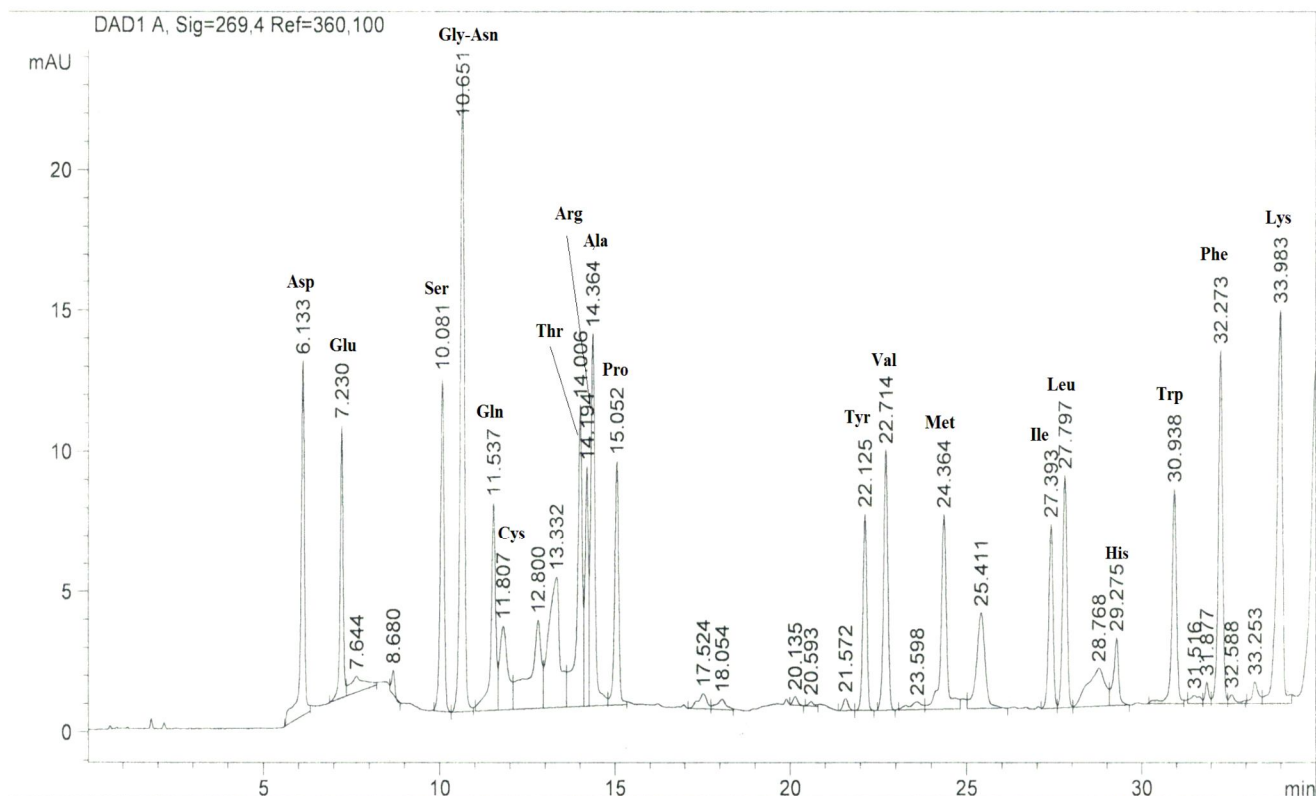


Рисунок 1. Хроматограмма стандартной смеси ФТК-аминокислот.

Таблица 1

Состав аминокислот цисты *Артемии* Аральского моря

| № | аминокислот | Цисты А., мг/г | % | База цисты А., % |
|--------------------------|-------------|----------------|-------|------------------|
| Заменимые аминокислоты | | | | |
| 1 | Asp | 42.47995 | 11.62 | 10.6-22.8 |
| 2 | Glu | 60.77145 | 16.63 | 15.6-19.5 |
| 3 | Ser | 16.00963 | 4.38 | 5.8-8.6 |
| 4 | Gly | 11.81316 | 3.23 | 4.9-6.0 |
| 5 | Asn | 11.83208 | 3.23 | - |
| 6 | Gln | 16.19764 | 4.43 | - |
| 7 | Cys | 19.00784 | 5.20 | 1.6-1.8 |
| 8 | Ala | 18.25586 | 4.99 | 13.7-16.3 |
| 9 | Pro | 15.23593 | 4.16 | 4.9-5.9 |
| 10 | Tyr | 17.29176 | 4.73 | 1.9-8.5 |
| Незаменимые аминокислоты | | | | |
| 1 | Thr | 11.6639 | 3.19 | 0.0-1.9 |
| 2 | Arg | 17.48705 | 4.78 | 3.2-6.3 |
| 3 | Val | 29.19847 | 7.99 | 0.0-2.0 |
| 4 | Met | 2.897253 | 0.79 | - |
| 5 | Ile | 29.52861 | 8.08 | 0.0-0.5 |
| 6 | Leu | 33.55143 | 9.18 | 0.6-1.4 |
| 7 | His | 9.02572 | 2.47 | 0.8-1.8 |
| 8 | Trp | - | - | - |
| 9 | Phe | 1.720675 | 0.47 | 0.0-0.2 |
| 10 | Lys HCl | 1.383373 | 0.37 | 1.8-2.6 |

лот - лейцина, изолейцина, валина, аргинина, треонина, гистидина, метионина, фенилаланина, за исключением лизина, по сравнению с аминокислотами крымских цист.

Как известно, эти аминокислоты имеют большую биологическую ценность, так как они необходимы для полноценного питания организма и синтеза белков в них.

Заключение

Установлено, что преобладающей аминокислотой цисты Артемии Аральского моря является глутаминовая кислота, которая участвует в важнейших процессах обмена веществ, оказывающих существенное влияние на физиологическое состояние организма. Содержание таких заменимых аминокислот, как

серин, глицин, пролин и, в особенности, аланин несколько уступают содержанию их в крымских цистах, но, необходимо отметить наличие таких аминокислот, как аспарагин и глутамин, не обнаруженные в цистах из соленых озер Крыма.

Определено высокое содержание незаменимых аминокислот - лейцина, изолейцина, валина, аргинина, треонина, гистидина, метионина, фенилаланина.

На основе полученных данных по качественному и количественному содержанию аминокислотного состава буфер растворимых белков цисты Артемии Аральского моря можно определить как высококачественное белковое сырье для получения эффективного биопродукта.

REFERENCES

1. Khajibayev Q.G., Berdimbetova G.E., Oshchepkova Yu.I., Ishimov U.J., Salikhov Sh.I. Kolichestvennoe opredelenie obshego belka i svobodnix aminokislot tsisti Artemii Aralskogo moray [Quantitative determination of the general protein and free amino acids of artemia cysts of the Aral Sea]. *Doklady AN RUz*, 2019, no. 3, pp. 54-58.
2. Terje van der Meeren, Rolf Erik Olsen, Kristin Hamre, Hans Jorgen Fyhn. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 2008, vol. 274, pp. 375-397.
3. Herawati V.E., Hutabarat J., Ocky Karna Radjasa O.K. Nutritional Content of Artemia sp. Fed with Chaetoceros calcitrans and Skeletonema costatum. *HAYATI Journal of Biosciences*, 2014, vol. 21, no. 4, pp. 166-172.
4. Khajibayev Q.G., Berdimbetova G.E., Qarlibayeva B.P., Oshchepkova Yu.I. Izucheniya makro i mikronutrientov tsistiartemii Aralskogo morya [Study of macro- and micronutrients of artemia cysts in the Aral Sea]. *UNIVERSUM: CHEMISTRY AND BIOLOGY*, 2019, vol. 63, no. 9, pp. 19-24. DOI - 10.32743/UniChem.2019.63.9
5. Folch J., Lees M., Stanley G.H., A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, vol. 226, no. 1, pp. 497-509.
6. Csap'ó J., Kiss-Csap'ó Zs., Albert Cs., L'óki K. Hydrolysis of proteins performed at high temperatures and for short times with reduced racemization, in order to determine the enantiomers of D- and L-amino acids *Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria*, 2008, no. 1, pp. 31-48.
7. Checa-Moreno R., Manzano E., Miron G., Capitn-Vallvey L.F. Revisitation of the phenyl isothiocyanate derivatives procedure for amino acid determination by HPLC-UV. *J. Sep. Sci.*, 2008, vol. 31, pp. 3817 - 3828.
8. Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L., paper presented at the *International Symposium on HPLC in the Biological Sciences Conference* in Melbourne, Australia, February 20-22, 1984.
9. Bidlingmeyer B.A., Cohen S.A., Tarvin T.L. Rapid Analysis of Amino Acids Using Pre-Column Derivatization. *J. Chromatogr*, 1984, vol. 93, pp. 336.
10. Cohen S.A., Tarvin T.L., Bidlingmeyer B.A., Analysis of Amino Acids Using Pre-Column Derivatization with Phenylisothiocyanate. *Am. Lab*, 1984, August, pp. 49.
11. Rudneva I.I. Artemiya. *Perspektivy ispol'zovaniya v narodom khozyaystve* [Artemia. Prospects for use in the national economy.] Kiev, Science. Dumka Publ., 1991. 144 p.