

УДК 577.115.7

DETERMINATION OF PHOSPHOLIPIDS AND PROTEIN CONTENT IN LIPID EXTRACT OBTAINED FROM THE ALCOHOL SOLUTION OF FOLLICULAR HEN EGGS

V. Bondareva, V. Mank, A. Miroshnikov
National University of Food Technologies

Key words:

*Follicular egg
Whites
Thin layer
chromatography
Phospholipids
Total lipids*

Article history:

Received 10.07.2014
Received in revised form
20.07.2014
Accepted 09.08.2014

Corresponding author:

V. Bondarev
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The aim was to produce follicular eggs of hens by extraction with ethyl alcohol lipid the extract, followed by determining its composition of phospholipids, total lipids and proteins. The process of biological material preparation and receiving lipid extract consisted of three stages. The first step included treatment of follicular eggs according to the method of Cohn. The second stage was an extraction of follicular eggs of hens in ethanol and the resulting suspension. In the third stage, filtration of lipid suspension and the resulting protein-lipid extraction of follicular eggs of hens took place. Due to the preliminary preparation of biological material for extraction by switching between freezing and thawing of tissue and cooling the lipid extract in the total volume of sludge, such "minor" structures like proteins have been transferred. The supernatant fluid contained only neutral lipids: phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine.

ВИЗНАЧЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ І БІЛКА В ЛІПІДНОМУ ЕКСТРАКТІ, ОТРИМАНОМУ ЗІ СПИРТОВОГО РОЗЧИНУ ФОЛІКУЛЯРНИХ ЯЄЦЬ КУРЕЙ

В.Й. Бондарєва, В.В. Манк, О.М. Мірошников
Національний університет харчових технологій

У статті досліджено процес отримання з фолікулярних яєць курей методом екстракції етиловим спиртом ліпідного екстракту з подальшим визначенням у його складі фосфоліпідів (ФЛ), загальних ліпідів (ЗЛ) і білків. Процес підготовки біологічного матеріалу й отримання ліпідного екстракту складався з трьох етапів. На першому етапі проводили обробку фолікулярних яєць відповідно до методу Кона. Другий етап передбачав проведення процесу екстрагування фолікулярних яєць курей в етанолі й отримання суспензії. На третьому етапі проводили фільтрацію ліпідної суспензії й отримання білково-ліпідного екстракту фолікулярних яєць курей. Завдяки попередній підготовці біологічного матеріалу до екстракції з використанням зміни режимів заморожування та розморожування тканин, а також охолодження ліпідного екстракту в осаді із

загального об'єму були переведені такі «мінорні» речовини, як білки. У надосадних рідинах залишилися лише нейтральні ліпіди, фосфатидіхолін і фосфатиділетаноламін.

Ключові слова: фолікулярні яйця, білки, тонкошарова хроматографія, фосфоліпіди, загальні ліпіди.

Відомо, що лецитин є важливою сировиною у харчовій, косметологічній промисловості та медицині. Найбільшим попитом користується соєвий лецитин, який має низьку комерційну ціну, але його біологічні властивості значно нижчі, ніж у лецитині, отриманому з курячих яєць, який має високі біологічно-активні характеристики, проте є дорогим харчовим продуктом. До того ж, білкова оболонка, яка оточує жовток у курячих яйцях, уповільнює проведення екстракції, що з технологічної точки зору не є прийнятним. Зважаючи на це, для отримання якісного лецитину було вирішено використати такий біологічний матеріал, як фолікулярні яйця курей. Ця сировина більш дешева порівняно з курячими яйцями. До того ж, відсутність білкової оболонки у фолікулярних яйцях значно спрощує проведення процесу екстракції для отримання фосфоліпідного комплексу.

При виконанні дослідження для визначення фосфоліпідів та аналізу білків у ліпідному екстракті фолікулярних яєць курей використовували спектрофотометричний метод кількісного визначення білків [1,3] і метод тонкошарової хроматографії [2].

Для проведення спектрофотометричного методу кількісного визначення білків у ліпідному екстракті біологічний матеріал оброблявся у три етапи. Перший етап містив зміну режимів заморожування та розморожування тканин, що призводило до розриву клітинних стінок ростучими кристалами льоду (метод Кона). Це призводило до дезінтеграції біологічного матеріалу з руйнуванням не тільки клітин, але й внутрішньоклітинних структур, що сприяє переходу розчинних речовин клітин яєць у позаклітинний простір.

Другим етапом був процес екстрагування фолікулярних яєць курей в етанолі (1:10). Цей органічний розчинник сприяє розриву білково-ліпідних зв'язків, що підвищує ступінь вивільнення білків з тканин [4, 5, 6]. Термін екстракції тривав три години, внаслідок чого отримано суспензію жовтків у спирті. На третьому етапі відбувалася фільтрація суспензії й отримання фільтрату — білково-ліпідного екстракту фолікулярних яєць курей.

Для подальшого визначення кількості білків у ліпідному екстракті спектрофотометричним методом брали 3 проби по 5 мл кожна.

Перша проба спиртового розчину жовтків зберігалася протягом 2 год при температурі $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$. Друга витримувалася 2 години при $+9\text{ }^{\circ}\text{C}$, третя при $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Через 2 год у пробах 1 та 2 спостерігалася утворення осадів. Шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 3000 об./хв у кожній пробі були отримані дві чітко відокремлені складові: надосадна рідина й осад. Осад у пробі 1 мав білу рихлу консистенцію, у пробі 2 — в'язку, жирну структуру. Надосадні рідини характеризувалися прозорим жовтим забарвленням. Ці рідини мікропіпеткою відокремлювали від осадів та отримували такі проби:

надосадна рідина — «1», осад — «1а», надосадна рідина — «2», осад — «2а», «в.р.» — вихідний розчин (проектрагований і відфільтрований ліпідний екстракт жовтків). Для побудови калібрувального графіка, за допомогою якого визначався вміст білків, готували стандартні розчини альбуміну: № 1 (4 мг альбуміну розчинені у 2000 мкл H₂O), № 2 (500 мкл розчину № 1 та 4500 мкл H₂O), № 3 (500 мкл розчину № 1 та 2000 мкл H₂O). З цих розчинів робили відповідні розведення (табл. 1). На спектрофотометрі Speacol при довжині хвилі $\lambda = 660$ нм вимірювали їх оптичну густина білку та на підставі отриманих даних будували калібрувальний графік.

Таблиця 1. Розведення альбуміну для побудови калібрувального графіка

Альбумін	Контроль	2 мкг	4 мкг	6 мкг	8 мкг	10 мкг	15 мкг	20 мкг
Розведення	20 мкл H ₂ O	10 мкл розчину № 2 та 10 мкл H ₂ O	20 мкл розчину № 2	15 мкл розчину № 3 та 5 мкл H ₂ O	20 мкл розчину № 3	5 мкл розчину № 1 та 15 мкл H ₂ O	7,5 мкл розчину № 1 та 12,5 мкл H ₂ O	10 мкл розчину № 1 та 10 мкл H ₂ O

Для визначення наявності білків у розчинах альбуміну зроблені контрольні паралельні розведення білка (проба 1, проба 2) концентрацією 4 мкг, 8 мкг та 10 мкг, оптична густина яких перевірялась за калібрувальним графіком (табл.2).

Таблиця 2. Значення оптичної густини контрольних розведень альбуміну

Альбумін, H ₂ O	Контроль	4 мкг	8 мкг	10 мкг
Значення оптичної густини (1 проба)	0,045	0,07	0,135	0,195
Значення оптичної густини (2 проба)	0,045	0,075	0,140	0,210

Для визначення кількості білка у вихідному розчині (ліпідному екстракті) та у надосадних рідинах з їх об'ємів відбирали по 20 мкл досліджуваних речовин та отримували наступні проби: в.р.1, в.р.2, 1.1, 1.2, 2.1, 2.2. Контроль — К.1, К.2 містив по 20 мкл H₂O. Складові речовини в осадах (1а, 2а) та у надосадних рідинах (1, 2) визначалися методом тонкошарової хроматографії.

Для проведення експериментів з визначенням білків готували реактиви «А» — 2 % Na₂CO₃, 0,4 % NaOH, 0,16 % C₄H₄O₆Na₂·2H₂O (тарtrat натрію), 1 % C₁₂H₂₅NaSO₄ (додecilсульфат натрію); «В» — 4 % CuSO₄·5H₂O; «С» — 100 частин реактиву «А» та 1 частина реактиву «В»; «Е» — реактив Фоліна. У всі ці проби додавали 980 мкл реактиву «С». Суміш ретельно перемішувалася та залишалася на 35 хвилин. Потім у проби додавали по 100 мкл розведеного реактиву Фоліна та залишали на 45 хвилин. За оптичною густиною отриманих розчинів розраховували концентрацію білків у них. Результати наведені в табл. 3.

Таблиця 3. Концентрація білків у досліджуваних розчинах

Проби	К1	К2	в.р.1	в.р.2	1.1	1.2	2.1	2.2
Оптична густина	0,045	0,045	0,120	0,120	0,090	0,090	0,095	0,095

Проби	K1	K2	в.р.1	в.р.2	1.1	1.2	2.1	2.2
Середнє значення	0,045		0,075		0,045		0,050	
Кількість білка, мг/мл			0,41		0,24		0,25	

Таким чином, у «в.р.» вміст білків складав 0,41 мг/мл, а в надосадних рідинах 0,24 та 0,25 мг/мл, що свідчить про зменшення вмісту білків у надосадних рідинах порівняно з вихідним екстрактом на 61 %.

Методом тонкошарової хроматографії визначали наявність у пробах загальних ліпідів (ЗЛ) і фосфоліпідів (ФЛ). Контрольною речовиною був препарат кальмофіл. Хроматограми надосадних рідин та осадів наведені на рис. 3, 4.

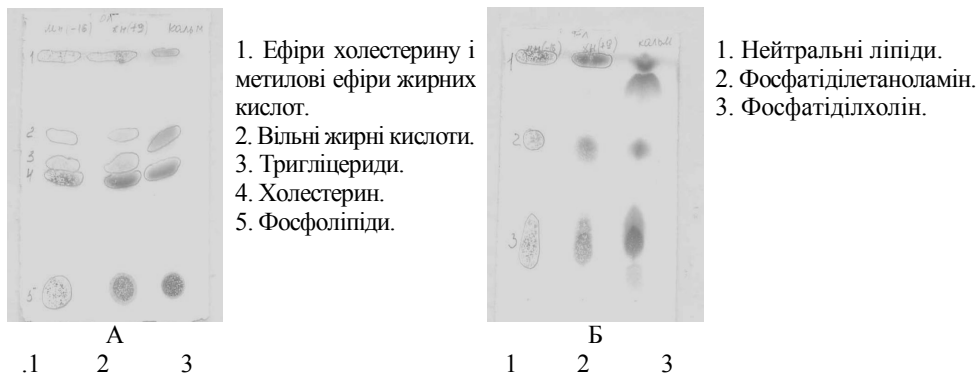


Рис. 3. Одномірні тонкошарові хроматографії загальних ліпідів (А) і фосфоліпідів (Б), екстрагованих з надосадних рідин спиртового екстракту фолікулярних яєць курей у системах розчинників I и II (1 — надосадна рідина проби № 1, $t = -16\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2 — надосадна рідина проби № 2, $t = +9\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3 — кальмофіл $t = +20\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Дані, отримані при проведенні одномірної тонкошарової хроматографії надосадних рідин, свідчать про наявність у їх складі таких речовин, як нейтральні ліпіди, фосфатіділетаноламін і фосфатіділхолін.

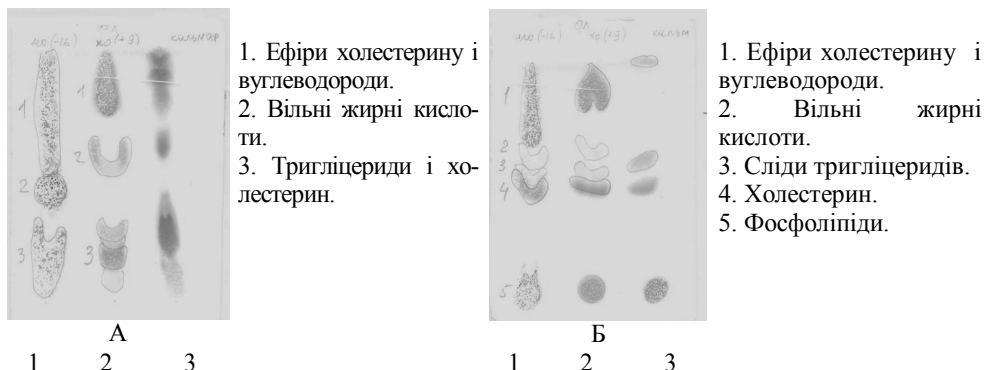


Рис. 4. Одномірні тонкошарові хроматографії фосфоліпідів (А) і загальних ліпідів (Б), екстрагованих з осадів спиртового екстракту фолікулярних яєць курей у системах розчинників I и II (позначення осадів ті ж, що й на рис.3)

Отримані дані свідчать про наявність в осадах таких речовин, як ефіри холестерину та вуглеводородів, вільних жирних кислот, тригліцеридів і фосфоліпідів.

Висновки

При кількісному визначенні білків з фолікулярних яєць курей спектрофотометричним методом встановлено, що у «в.р.» вміст білків складав 0,41 мг/мл, а у надосадних рідинах 0,24 та 0,25 мг/мл. Це вказує на зменшення вмісту білків у надосадних рідинах порівняно з вихідним екстрактом на 61 %. Отримані дані свідчать про ефективність методу екстрагування фолікулярних яєць курей етиловим спиртом при переведенні значної кількості білків із загального об'єму в осад. З аналізу тонкошарових хроматограм фосфоліпідів у надосадних рідинах, отриманих при температурах $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ та $+9\text{ }^{\circ}\text{C}$, визначена наявність таких речовин, як нейтральні ліпіди, фосфатіділетаноламін, фосфатіділхолін. Наявність цих речовин у розчинах свідчить про ефективність методу екстракції етиловим спиртом. При дослідженні загальних ліпідів у надосадних рідинах визначена наявність таких речовин: ефіри холестерину та метилові ефіри жирних кислот, вільні жирні кислоти, тригліцериди, холестерин, фосфоліпіди. Аналіз загальних ліпідів в осадах дозволив визначити такі речовини, як: ефіри холестерину та вуглеводородів, вільні жирні кислоти, тригліцериди, холестерин, фосфоліпіди. Завдяки попередній підготовці біологічного матеріалу до екстракції з використанням зміни режимів заморожування та розморожування тканин, а також охолодження ліпідного екстракту в осаді із загального об'єму були переведені такі «мінорні» речовини, як білки. У надосадних рідинах залишились лише нейтральні ліпіди, фосфатіділхолін і фосфатіділетаноламін.

Література

1. Дамбре А. Химия белка / А. Дамбре. — М.: Мир, 1990.
2. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. — М.: Мир, 1985.
3. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. — М.: Мир, 1985.
4. Якубке Х.Д. Аминокислоты, пептиды и белки / Х.Д. Якубке, Х.М. Ешкайт. — М.: Мир, 1985.
5. Степанов А.Е., Краснопольская Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. — Москва: Наука, 1991.
6. Оои Т. Биополимеры / Т. Оои, Э. Онари; под. ред. Ю. Иманиси. — М.: Мир, 1988.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ И БЕЛКА В ЛИПИДНОМ ЭКСТРАКТЕ, ПОЛУЧЕННОМ ИЗ СПИРТОВОГО РАСТВОРА ФОЛЛИКУЛЯРНЫХ ЯИЦ КУР

В.Й. Бондарева, В.В. Манк, А.Н. Мирошников
Национальный университет пищевых технологий

В статье исследован процесс получения из фолликулярных яиц кур методом экстракции этиловым спиртом липидного экстракта с последующим опреде-

лением в его составе фосфолипидов (ФЛ), общих липидов (ОЛ) и белков. Процесс подготовки биологического материала и получение липидного экстракта состоял из трех этапов. На первом этапе проводили обработку фолликулярных яиц в соответствии с методом Кона. Вторым этапом был процесс экстрагирования фолликулярных яиц кур в этаноле и получение суспензии. На третьем этапе проводили фильтрацию липидной суспензии и получение белково-липидного экстракта фолликулярных яиц кур. Благодаря предварительной подготовке биологического материала к экстракции с использованием смены режимов замораживания и размораживания тканей, а также охлаждения липидного экстракта в осодок общего объема были переведены такие «минорные» вещества, как белки. В надосадочных жидкостях остались только нейтральные липиды, фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин.

Ключевые слова: фолликулярные яйца, белки, тонкослойная хроматография, фосфолипиды, общие липиды.