



УДК 577.112.3:595.767.28

Исследование аминокислотного состава кормовой пыльцы для шмелей с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ)

Сыромятников М.Ю., Лопатин А.В., Горбачева Т.М., Попов В.Н.

Воронежский государственный университет, Воронеж

Фоменко О.Ю.

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», Воронеж

Поступила в редакцию 11.01.2012 г.

Аннотация

С помощью метода сверхпроизводительной жидкостной хроматографии был исследован аминокислотный состав пыльцевого корма для шмелей. Выявлено варьирование в аминокислотном составе различных сборов пыльцы. Отмечено высокое различие в содержании глицина. Наблюдается также разница в содержании незаменимой для пчел аминокислоты – лизина.

Ключевые слова: метод СВЭЖХ, пыльца, шмели, *Bombus terrestris*, аминокислоты

Amino acids composition of plant pollen used as bumblebees forage was investigated by the UPLC method. Variation in amino acid composition among various harvests of pollen is revealed. We noted the high difference in the content of glycine between different stocks of pollen. There is also a substantial difference in the content of an essential amino acid lysine.

Keywords: UPLC, pollen, bumblebees, *Bombus terrestris*, amino acids

Введение

Коммерческое шмелеводство — одно из наиболее молодых и наукоемких направлений в биотехнологии. В настоящее время по производству и использованию шмелей Россия отстает от ведущих аграрных стран, т. к. по причине несовершенства технологий себестоимость продукции приблизительно в 1,5-2 раза выше, чем у европейских фирм. Особенно остро стоит проблема со стандартизацией пыльцевого корма, т. к. пыльца является единственным источником аминокислот для шмелей и пчел [4].

Химический состав пыльцы сильно варьирует в зависимости от вида растения [1, 2, 3]. Так, например, при исследовании пыльцы вишни было идентифицировано 17 аминокислот, составляющих 15-20 % от сухого веса. Из всех аминокислот

превалировали аспарагин и глутамин – 2,2-7 % от общей доли аминокислот. Меньше всего было обнаружено цистеина и валина [8].

Ранее было показано, что метионин, аргинин, триптофан, лизин, изолейцин, фенилаланин, гистидин, валин, лейцин и треонин являются незаменимыми аминокислотами для пчел, тогда как тирозин, цистеин, серин, гидроксипролин, аланин, глицин и пролин – заменимые. Из незаменимых 3 аминокислоты – лейцин, изолейцин, валин – требуются в больших количествах, тогда как триптофан, метионин и гистидин – в меньших количествах [4].

Важным аспектом также является сохранность питательных свойств пыльцы после длительного хранения. Было установлено, что пчелы, которых кормили сухой пыльцой сроком хранения 1 год, имели недоразвитые гипофарингеальные железы и меньший вес [5].

При выращивании шмелей задача стандартизации аминокислотного состава осложняется тем, что пыльца, поставляемая на предприятия, собрана с большого числа видов растений, и её состав может значительно варьировать. Наиболее распространённым методом определения аминокислотного состава пищевых продуктов является применение жидкостной хроматографии [6]. Исходя из этого, целью нашей работы явилось исследование аминокислотного состава пыльцы, собранной в различных регионах Российской Федерации с использованием сверхпроизводительной жидкостной хроматографии.

Эксперимент

Объектами исследования служили образцы пыльцы, отобранные на коммерческом предприятии по выращиванию шмелиных семей для теплиц. Образец «Майкоп» был поставлен на предприятие пасаками республики Адыгея. Образцы «Воронеж №1» и «Воронеж №2» были поставлены пасаками Воронежской области. При этом образцы «Воронеж №1» и «Воронеж №2» собраны в разные месяцы вегетационного сезона.

Образцы пыльцы обезвоживали в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре не выше 45 °С. Затем определяли общее содержание белка на грамм сухой массы по методу Лоури [7].

На следующем этапе проводили гидролиз образцов пыльцы. 100 мг образца окисляли надмуравьиной кислотой в течение 30 минут. Затем раствор упаривали досуха при температуре не выше 50°С. Осадок растворяли в 10 мл 6Н соляной кислоты и проводили гидролиз в течение 24 часов при температуре 110°С. Из полученного гидролизата отбирали аликвоту объёмом 2 мл и упаривали её досуха. Полученный осадок растворяли в 0,1Н соляной кислоте и фильтровали через фильтр «синяя лента».

Дериватизацию 10 микролитров полученного гидролизата проводили с использованием компонентов набора Waters AccQ-Tag Ultra Derivatization Kit согласно рекомендациям фирмы-производителя. Для проведения анализа использовалась хроматографическая система Waters Acquity с флуорометрическим детектором FLR. Образцы разделяли на колонке Waters AccQ-Tag Ultra 2.1 x 100 мм с размером частиц 1,7 мкм. Объём внесения образца на колонку составлял 1 мкл. Хроматографирование проводили в течение 9,5 минут при температуре колонки 55° С в градиенте элюентов AccQ-Tag Ultra A1 и AccQ-Tag Ultra B со скоростью потока 0,7 мл/мин. Для идентификации производных аминокислот использовалась пара длин волн возбуждения и испускания 266 нм и 473 нм соответственно согласно

рекомендациям фирмы-производителя. Обработка хроматограмм производилась с использованием программного обеспечения Empower 2 Build 2154.

Результаты и их обсуждение

Было протестировано 3 различных вида пыльцы («Майкоп», «Воронеж №1» и «Воронеж №2»). На рис. 1, 2 и 3 представлены типичные хроматограммы аминокислотного состава пыльцы.

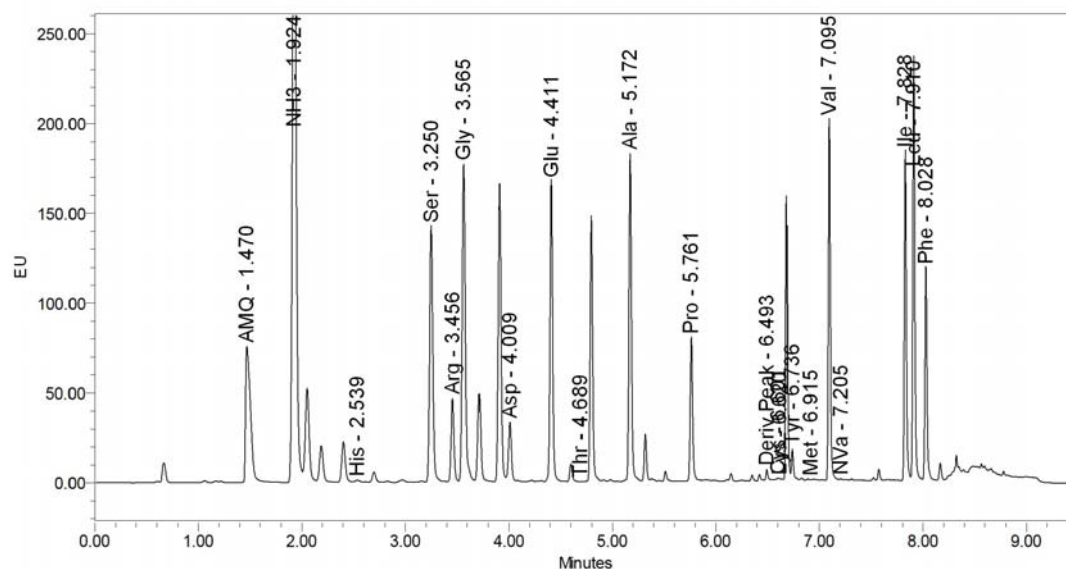


Рис. 1. Хроматограмма аминокислотного состава пыльцы, собранной в Майкопе

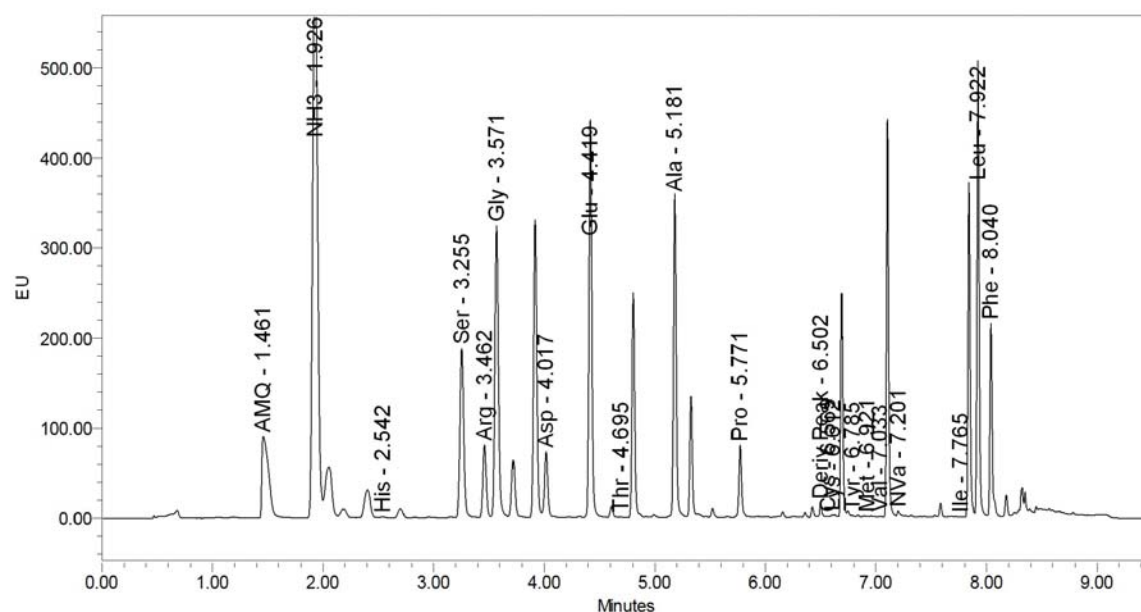


Рис. 2. Хроматограмма аминокислотного состава пыльцы, собранной в Воронеже (сбор №1)

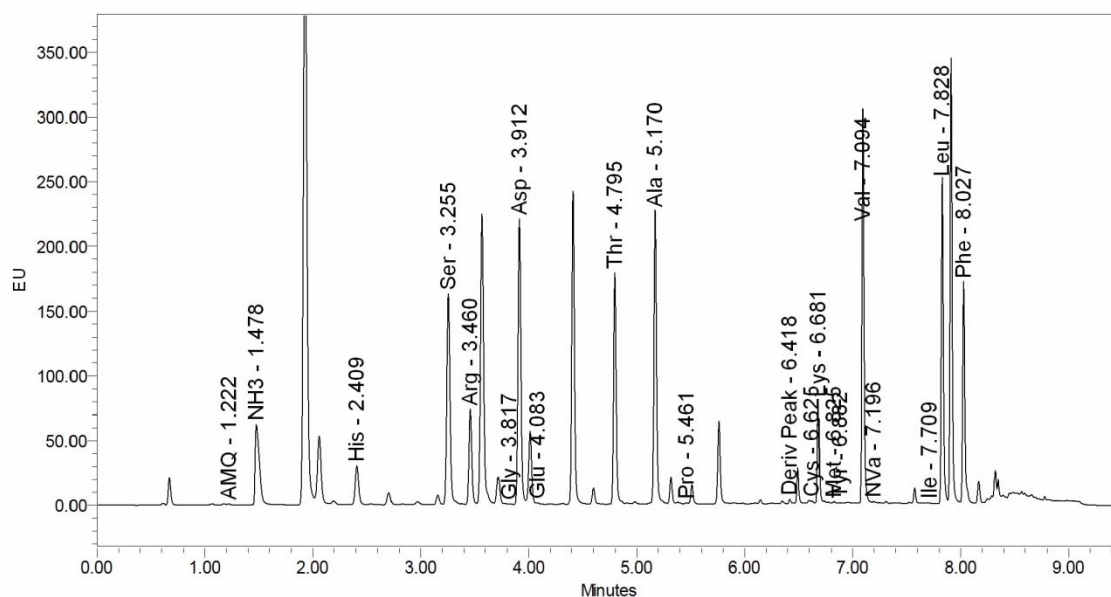


Рис. 3. Хроматограмма аминокислотного состава пыльцы, собранной в Воронеже (сбор №2)

Исходя из полученных хроматограмм можно заключить, что по аминокислотному составу пыльца с разных мест сбора сходна по строению и в ней присутствуют все необходимые аминокислоты. Процентное содержание аминокислот в пыльце представлено в Таблице 1.

Таблица 1. Процентное содержание аминокислот в разных сборах пыльцы (жирным выделены, аминокислоты, процентное содержание которых существенно варьирует в разных сборах пыльцы)

Аминокислота	Майкоп	Воронеж №1	Воронеж №2
Аланин	14.22	14.55	15.58
Аргинин	3.38	3.55	4.42
Аспарат	31.67	32.54	34.77
Цистеин	0.001	0.001	0.001
Глутамат	0.12	0.065	0.11
Глицин	4.24	3.02	0.04
Гистидин	3.1	3.83	3.37
Изолейцин	0.002	0.002	0.001
Лейцин	0.97	1.01	1.18
Лизин	13.06	10.58	6.08
Метионин	0.058	0.04	0.04
Фенилаланин	2.07	2.23	1.59
Пролин	0.09	0.12	0.19
Серин	1.22	0.96	1.18
Треонин	9.58	8.78	9.89
Тирозин	0.35	0.33	0.19
Валин	15.81	18.3	21.29

Наибольшую массовую долю в пыльце составляют аминокислоты (по убыванию массовой доли): аспарагиновая кислота, валин, аланин, лизин, треонин, аргинин и фенилаланин. При этом наименьшие концентрации были характерны для

цистеина, изолейцина, метионина и тирозина. Цистеин и изолейцин был обнаружен в следовых количествах.

Кроме того, было отмечено варьирование по аминокислотному составу между разными сборами пыльцы. Так, содержание глицина в сборе Воронеж №2 было в 70 раз ниже, чем в сборе Майкоп и Воронеж №1. В 2,1 раза по сравнению со сбором из Майкопа и в 1,7 по сравнению со сбором Воронеж №1 было ниже содержание лизина в сборе Воронеж №2. Процентное содержание глутаминовой кислоты в сборе Воронеж №1 было в 1,84 и 1,7 раза меньше, чем соответственно в сборе Майкоп и Воронеж №2. Процентное содержание пролина также варьировало для различных сборов. Так, в сборе Майкоп наблюдалось в 2,1 раза меньшее процентное содержание пролина по сравнению со сбором Воронеж №2 и в 1,3 раза меньше, чем в сборе Воронеж №2.

Различия в содержании аминокислот в разных сборах пыльцы может сказаться на физиологическом состоянии взрослых шмелей и развивающихся личинок. Так, к примеру, известно, что лизин является незаменимой аминокислотой для пчел [4]. В сборе «Воронеж №2» выявлено пониженное содержание данной аминокислоты. Аминокислота изолейцин содержится во всех сборах пыльцы в чрезвычайно малых количествах, хотя известно, что, к примеру, для пчел характерна повышенная потребность в данной аминокислоте [4]. В целом, варьирование в процентном содержании аминокислот в разных сборах пыльцы может негативно сказаться на развитии личинок и куколок шмелей, а недостаток ключевых аминокислот — вызвать замедление развития насекомых.

Таким образом, с помощью метода сверхпроизводительной жидкостной хроматографии нами был исследован аминокислотный состав пыльцевого корма для шмелей. Выявлено варьирование в аминокислотном составе различных сборов пыльцы, в том числе и по уровню незаменимых аминокислот.

Список литературы

1. Колесников М.П. Биохимический состав и кремний растительной пыльцы и пчелиной перги // *Успехи современной биологии*. 2000. Т. 120., Вып.3. С. 374-382.
2. Наумкин Е.П. Аминокислотный состав пыльцы // *Пчеловодство*. 1984. Вып. 10. С. 23-24.
3. Cook S. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? // *Ecological Entomology*. 2003. V. 28. P. 622-627.
4. De Groot A.P. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera* L.) // *Physiologia Comparata et Oecologia*. 1953. V. 3. P. 197-285.
5. Haydak M.H. Influence of storage on the nutritive value of pollens for newly emerged honey bee // *Am. Bee J.* 1961. V. 101. P. 354-355.
6. Introduction to HPLC, Shimadzu, Japane, 2008
7. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193., № 1. P. 265-275.
8. Nyéki J., Szabó Z., Andrásfalvy A., Schmidt B. Chemical analysis of the pollen of sweet and sourcherry varieties // *Acta Hort.* 1998. V. 468. P. 629-636.

Сыромятников Михаил Юрьевич – аспирант, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный

Syromyatnikov Mikhail Yu. - graduate student, Department of Genetics, cytology, and Bioengineering, Voronezh State University,

университет, Воронеж

Фоменко Олег Юрьевич – к.б.н., заведующий лабораторией патобиохимии, ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии фармакологии и терапии», Воронеж

Лопатин Алексей Васильевич – к.б.н., ведущий биолог, биологический учебно-научный центр ВГУ «Веневитиново», Воронежский государственный университет, Воронеж

Горбачева Татьяна Михайловна – аспирант, кафедра биохимии и физиологии клетки, Воронежский государственный университет, Воронеж

Попов Василий Николаевич – д.б.н., заведующий кафедрой генетики, цитологии и биоинженерии, проректор по научной работе, инновациям и информатизации, Воронежский государственный университет, Воронеж

Voronezh. E-mail: mihan.vrn@mail.ru

Fomenko Oleg Yu. - PhD, Laboratory Head patobiohimii, SSI "All-Russian Research Institute of Veterinary Pathology Pharmacology and Therapeutics", Voronezh

Lopatin Alexey V. - PhD, a leading biologist, biological, educational and scientific center of VSU "Venevitinovo", Voronezh State University, Voronezh

Gorbacheva Tatiana M. - graduate student, Department of Biochemistry and Cell Physiology, Voronezh State University, Voronezh

Popov Vasilij N. - PhD, head of the department of genetics, cytology and Bioengineering, Vice Chancellor for Research, Innovation and Informatization, Voronezh State University, Voronezh