

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

САМОЙЛОВ ЄВГЕНІЙ СЕРГІЙОВИЧ

Допускається до захисту  
В.о. завідувача кафедри ботаніки  
та екології, к.б.н., доцент  
\_\_\_\_\_ О.В. Машталер  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2024 р.

**РОЗРОБКА СПОСОБІВ ХІМІЧНОГО ГІДРОЛІЗУ РОСЛИННИХ  
БІЛКІВ З МЕТОЮ ОТРИМАННЯ ВІЛЬНИХ АМІНОКИСЛОТ**

Спеціальність 091 Біологія та біохімія  
Кваліфікаційна (магістерська) робота

Науковий керівник:  
С.С. Руденко, професор  
кафедри ботаніки та екології,  
д.б.н., професор  
\_\_\_\_\_

Оцінка: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
(бал/за шкалою ЕКТС/за національною шкалою)

Голова Е.К.: \_\_\_\_\_

Вінниця 2024

## АНОТАЦІЯ

**Самойлов Є.С.** Розробка способів хімічного гідролізу рослинних білків з метою отримання вільних амінокислот. Спеціальність 091 «Біологія та біохімія», Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса. Вінниця, 2024.

У роботі досліджено процес хімічного гідролізу соєвих білків для отримання лізину. Основним науковим результатом дослідження є розробка ефективного хімічного методу гідролізу соєвих білків для отримання лізину, який може стати економічно вигідною альтернативою ферментативним методам, з одночасним визначенням амінокислотного складу отриманих гідролізатів і підтвердженням високого вмісту лізину в білках сої.

*Ключові слова:* соєві білки, амінокислоти, хімічний гідроліз, лізин, ферментативні методи, білковий гідролізат.

58 с., 7 табл., 9 рис., 58 джерел

## ABSTRACT

**Samoilov Y.S.** Development of chemical hydrolysis methods of plant proteins for the production of free aminoacids. Specialty 091 "Biology and Biochemistry", Programme "Biology". Vasyl' Stus Donetsk National University, Vinnitsa, 2024.

In the work the process of chemical hydrolysis of soybean bilk for lysine production was studied. The main scientific result of the study is the development of an effective chemical method of hydrolysis of soybean proteins for lysine extraction, which can be an economically viable alternative to enzymatic methods, with simultaneous determination of the amino acid composition of the obtained hydrolysates and confirmation of high lysine content in soybean proteins.

*Key words:* soybean proteins, aminoacids, chemical hydrolysis, lysine, enzymatic methods, protein hydrolyzate.

58 pp, 7 tables, 9 figures, 58 sources

## ЗМІСТ

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,<br>СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ ..... | 4  |
| РОЗДІЛ I ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....                                             | 7  |
| 1.1 Гідроліз білків .....                                                   | 7  |
| 1.2 Вільні амінокислоти: роль і значення .....                              | 9  |
| 1.3 Особливості хімічного гідролізу рослинних білків .....                  | 16 |
| РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....                              | 22 |
| 2.1 Матеріали дослідження .....                                             | 22 |
| 2.2 Умови проведення експерименту .....                                     | 24 |
| 2.3 Методи визначення амінокислотного складу .....                          | 26 |
| РОЗДІЛ III РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ, ОБГОВОРЕННЯ .....                         | 36 |
| 3.1 Результати гідролізу соєвих білків .....                                | 36 |
| 3.2 Порівняння вмісту лізину у трьох видах соєвих бобів .....               | 44 |
| 3.3 Обговорення отриманих результатів .....                                 | 45 |
| ВИСНОВКИ .....                                                              | 50 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ЛІТЕРАТУРИ .....                              | 51 |

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ,  
СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

|     |                                                                 |
|-----|-----------------------------------------------------------------|
| LC  | Рідинна хроматографія (Liquid Chromatography)                   |
| CE  | Капілярний електрофорез (Capillary Electrophoresis)             |
| GC  | Газова хроматографія (Gas Chromatography)                       |
| FID | Датчик іонізації полум'я (Flame Ionization Detector)            |
| TCD | Датчик теплопровідності (Thermal Conductivity Detector)         |
| MS  | Мас-спектрометрія (Mass Spectrometry)                           |
| CZE | Капілярна зонна електрофорезія (Capillary zone electrophoresis) |
| AAA | Амінокислотний аналіз (Amino acid analysis)                     |

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Актуальність дослідження полягає в необхідності розробки нових ефективних методів отримання вільних амінокислот із рослинних білків, що є важливим у контексті підвищення харчової цінності продуктів і оптимізації годівлі тварин. Особливо це стосується амінокислоти лізину, що є незамінною і використовується не лише в агропромисловості, а також у фармацевтиці та косметології. Останнім часом значно зросла увага науковців до соєвих білків і їхнього амінокислотного складу як перспективної альтернативи тваринним білкам. Дослідження активно спрямовані на розробку нових харчових продуктів, які включають покращену перетравність білків. [56]

**Метою дослідження** є розробка методу хімічного гідролізу соєвих білків для отримання вільних амінокислот, зокрема лізину, а також аналіз отриманого гідролізату

**Завдання дослідження:**

- Провести хімічний гідроліз білків сої.
- Виконати спектрофотометричний аналіз отриманих гідролізатів.
- Визначити амінокислотний склад гідролізатів.
- Порівняти кількість лізину в гідролізатах трьох різних сортів сої.

**Об'єктом дослідження** є білки соєвих бобів (сорт: Монада, Княжна, Оксана), що використовуються для отримання амінокислот, зокрема лізину, шляхом хімічного гідролізу.

**Предметом дослідження** є процес хімічного гідролізу соєвих білків для отримання вільних амінокислот.

**Методи дослідження:** Основними методами дослідження є хімічний гідроліз білків, спектрофотометричний аналіз, іоннообмінна хроматографія для визначення амінокислотного складу.

**Наукова новизна** дослідження полягає у вдосконаленні процесу хімічного гідролізу рослинних білків для отримання амінокислот, зокрема

лізину, що може бути використано у промисловому виробництві харчових добавок і кормів для тварин.

**Практична значимість** роботи полягає в розробці нових технологій отримання білкових гідролізатів, які можуть бути застосовані як в харчовій промисловості для виготовлення продуктів з високою харчовою цінністю, так і в аграрному секторі для підвищення якості кормів для тварин. Це дослідження відкриває нові можливості для виробництва білкових продуктів з рослинних джерел, що є важливим з огляду на зростаючий попит на альтернативні білкові ресурси у світі.

## РОЗДІЛ І

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Гідроліз білків

*Аналіз сучасних методів гідролізу білків.*

Гідроліз білків є важливим процесом у біохімії, який використовується для розщеплення складних білкових молекул на простіші компоненти, зокрема амінокислоти та пептиди. Цей процес є основою для багатьох біотехнологічних та промислових застосувань, оскільки амінокислоти є будівельними блоками для багатьох метаболічних шляхів і синтезу важливих біомолекул. Визначення амінокислотного складу білка після гідролізу є важливим для аналізу якості харчових продуктів, кормових добавок і фармацевтичних препаратів.

Гідроліз білків - це процес розщеплення білкових молекул на амінокислоти або короткі пептиди.

Якість і характеристики білкових гідролізатів, що використовуються для різних цілей, залежать від початкової сировини, методу гідролізу та подальшої обробки отриманого продукту. Існує два основні підходи до гідролізу білків: хімічний і ферментативний.

*Хімічний гідроліз* є найпоширенішим методом і включає використання кислот (найчастіше HCl) або лугів для розщеплення пептидних зв'язків.

Кислотний гідроліз зазвичай проводять у середовищі 6 М HCl при температурі близько 110°C протягом 24 годин. Недоліками цього методу є можливе руйнування чутливих амінокислот (наприклад, триптофану) і необхідність тривалої обробки. Проте метод залишається популярним через його універсальність [27].

*Лужний гідроліз* проводиться за допомогою таких реагентів як гідроксид кальцію, натрію або калію. Можуть використовуватися при високій температурі (наприклад, 105°C) протягом 20 годин для повного гідролізу білка. Однак у харчовій промисловості частіше застосовують нижчі

температури (27–55°C) та коротший час гідролізу (4–8 годин), щоб отримати пептиди. Після цього продукт випарюють, пастеризують і сушать [27].

Подібно до кислотного гідролізу, лужний гідроліз білків є дешевим і дозволяє зберегти триптофан. Але цей метод також руйнує більшість інших амінокислот (100% втрат), тому його рідко використовують у харчовій промисловості. Він здебільшого підходить для виробництва піноутворювачів, як заміники яєчних білків.[27] Лужний гідроліз застосовують переважно на підготовчих стадіях, як первинну обробку, зокрема, колагенових і кератинових матеріалів. Часто його використовують для отримання гідролізатів із гідробіонтів: стулчастих молюсків, рибної сировини та ін [1].

*Ферментативний гідроліз* є важливим біотехнологічним процесом, що використовується для отримання амінокислот із білкових молекул за допомогою ферментів, таких як пепсин, трипсин та ін. [22]. Ці ферменти здійснюють розщеплення пептидних зв'язків у білках під фізіологічними умовами, що є вагомою перевагою в порівнянні з хімічними методами гідролізу, такими як гідроліз із використанням кислот або лугів. Основними перевагами ферментативного гідролізу є мінімальний вплив на структуру амінокислот, що дозволяє зберегти їх функціональні властивості, а також швидший час проведення реакції в порівнянні з традиційними методами хімічного гідролізу. Водночас одним із суттєвих недоліків цього методу є його вартість, яка зумовлена потребою в специфічних ферментах, що часто мають високу ціну [1].

Вплив ферментативного гідролізу на функціональні властивості білкових гідролізатів, таких як розчинність, емульгуюча здатність та піноутворення, значною мірою залежить від ступеня гідролізу. Як показують дослідження, зокрема в роботі [30], підвищення ступеня гідролізу соєвих білків призводить до покращення антиоксидантної активності гідролізатів, що пов'язано з утворенням низькомолекулярних пептидів, здатних взаємодіяти з вільними радикалами. Однак надмірний гідроліз може призвести до зниження інших функціональних властивостей, таких як піноутворення та емульгуюча

здатність, що обмежує використання таких гідролізатів у певних харчових продуктах.

## **1.2 Вільні амінокислоти: роль і значення**

Вільні амінокислоти є універсальними біомолекулами, які мають важливе значення як у рослинництві, так і в тваринництві, зокрема в людському організмі. Їхня роль полягає не лише у побудові білкових структур, але й у виконанні численних метаболічних і регуляторних функцій. Оскільки амінокислоти є основними будівельними блоками білків, вони відіграють незамінну роль у процесах життєдіяльності рослин і тварин, підтримуючи їхній ріст, розвиток і стійкість до несприятливих умов. У сучасному сільському господарстві та ветеринарії використання амінокислот стає все більш поширеним, оскільки воно сприяє поліпшенню продуктивності рослин і тварин, підвищує їхню стійкість до стресових факторів і сприяє оптимізації обміну речовин.

### *Роль і значення вільних амінокислот у рослинництві*

Вільні амінокислоти відіграють важливу роль у фізіології рослин і є ключовими біостимуляторами в сільському господарстві. Вони беруть участь у багатьох біохімічних процесах, зокрема у синтезі білків, ферментів, гормонів і регуляції обміну речовин. Амінокислоти, такі як лізин, аргінін і глютамін, забезпечують стійкість рослин до стресових факторів, таких як посуха, високі температури та шкідники. Наприклад, аргінін стимулює утворення нових клітин, а пролін допомагає рослинам протистояти осмотичному стресу, пов'язаному з посухою.

Одним із важливих аспектів використання вільних амінокислот є їхня здатність стимулювати ріст кореневої системи, покращуючи поглинання поживних речовин. Внесення вільних амінокислот як біостимуляторів також сприяє підвищенню якості та врожайності сільськогосподарських культур, зокрема фруктів і овочів. Дослідження показують, що амінокислоти

підвищують ефективність поглинання азоту, фосфору та калію, що забезпечує збалансоване живлення рослин.

Як зазначено у роботі [53], використання вільних амінокислот та гідролізатів білка в сільському господарстві дозволяє не тільки поліпшити продуктивність культур, але й позитивно впливає на стійкість до різних патогенів, завдяки посиленню імунної відповіді рослин на зовнішні загрози.

#### *Користь вільних амінокислот для людини та тварин*

У людському організмі вільні амінокислоти виконують кілька важливих функцій, включаючи участь у синтезі білків, регуляції метаболізму та забезпеченні клітин енергією. Вживання вільних амінокислот як дієтичних добавок має переваги перед вживанням цільних білків, оскільки вони швидше абсорбуються та забезпечують підвищену концентрацію амінокислот у плазмі крові, що важливо для швидкої регенерації тканин після фізичних навантажень або травм.

Згідно з дослідженнями [42], прийом вільних амінокислот у порівнянні з еквівалентною кількістю інтактного білка сприяє швидшому підвищенню концентрації амінокислот у плазмі після їжі. Це підвищує їхню доступність для процесів синтезу м'язового білка, що є важливим для спортивного харчування та в умовах стресу, коли організму необхідна прискорена регенерація.

Інше дослідження, проведене [13], показує, що вільні амінокислоти можуть ефективно підтримувати синтез м'язових білків, що є особливо важливим для людей, які страждають на захворювання, пов'язані з втратою м'язової маси, наприклад, саркопенію. Таким чином, вживання вільних амінокислот має широке застосування у медичних та спортивних програмах для підтримки здоров'я та відновлення тканин.

Білки складаються з 20 амінокислот. Кожна амінокислота має  $\alpha$ -карбоксильну групу, первинну  $\alpha$ -аміногрупу та бічний ланцюг, який називається R-групою [38].

Таблиця 1.1. Фізико-хімічні характеристики амінокислот

| Амінокислота         | Абревіатура | Молярна маса, г/моль | Загальна формула                                              | Група за R-групою |
|----------------------|-------------|----------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|
| Гліцин               | Gly         | 75,07                | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>                 | Нейтральна        |
| Аланін               | Ala         | 89,09                | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>                 | Нейтральна        |
| Серин                | Ser         | 105,09               | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>                 | Нейтральна        |
| Пролін               | Pro         | 115,13               | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>                 | Нейтральна        |
| Валін*               | Val         | 117,15               | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Нейтральна        |
| Треонін*             | Thr         | 119,12               | C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>                 | Нейтральна        |
| Цистеїн              | Cys         | 121,16               | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S               | Нейтральна        |
| Ізолейцин*           | Ile         | 131,18               | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                | Нейтральна        |
| Лейцин*              | Leu         | 131,18               | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>                | Нейтральна        |
| Аспарагін            | Asn         | 132,12               | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>   | Нейтральна        |
| Аспарагінова кислота | Asp         | 133,10               | C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>                 | Кисла             |
| Глутамін             | Gln         | 146,15               | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | Нейтральна        |
| Лізін*               | Lys         | 146,19               | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | Основна           |
| Глутамінова кислота  | Glu         | 147,13               | C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>                 | Кисла             |
| Метіонін*            | Met         | 149,21               | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S              | Нейтральна        |
| Гістидин*            | His         | 155,16               | C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>   | Основна           |
| Фенілаланін*         | Phe         | 165,19               | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | Нейтральна        |
| Аргінін              | Arg         | 174,20               | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | Основна           |
| Тирозин              | Tyr         | 181,19               | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>                | Нейтральна        |
| Триптофан*           | Trp         | 204,23               | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Нейтральна        |

\*- незамінні амінокислоти

На відміну від інших амінокислот, пролін має вторинну аміногрупу. Бічний ланцюг варіюється від однієї амінокислоти до іншої. З точки зору харчування, амінокислоти поділяються на 3 групи - незамінні, замінні та напівзамінні. Напівзамінні амінокислоти синтезуються організмом, але в періоди стресу вони визначаються як незамінні [38].

Дев'ять амінокислот, включаючи гістидин, ізолейцин, лейцин, лізін, метіонін, фенілаланін, треонін, триптофан і валін, класифікуються як незамінні амінокислоти, оскільки вони не можуть синтезуватися клітинами людини або інших ссавців. Тому ці амінокислоти повинні надходити з екзогенним харчуванням. Замінні амінокислоти, які не надходять з їжею, синтезуються організмом. Напівзамінні амінокислоти - це амінокислоти, що

сприяють росту. Вони необхідні для дітей, що ростуть, вагітних жінок та жінок, що годують груддю. Амінокислоти поділяються на 3 групи залежно від структури R-групи – нейтральні, кислі та основні. Окрім того, що амінокислоти слугують будівельним матеріалом для білків і пептидів, вони відіграють вирішальну роль у виконанні різних важливих функцій.

Деякі амінокислоти перетворюються на вуглеводи і називаються глюкогенними амінокислотами. Певні амінокислоти дають початок спеціалізованим продуктам. Наприклад, тирозин може перетворюватися на гормони, такі як гормони щитовидної залози, адреналін, норадреналін і меланін.

Метіонін у своїй активній формі, відомій як S-аденозилметіонін, відіграє важливу роль у клітинних процесах, переносючи метильну групу до різних речовин за допомогою процесу, який називається трансметилуванням. Цистин і метіонін є основними джерелами сірки.

Гістидин є попередником різних гормонів і метаболітів, важливих для роботи нирок, вироблення шлункового соку, імунної системи та нейротрансмісії. Він допомагає у виробництві червоних кров'яних клітин і гемоглобіну. Крім того, гістидин каталізує дію великої кількості ферментів і сприяє протизапальним та антиоксидантним процесам. Недостатність гістидину призводить до анемії, дисфункції нирок, оксидативного стресу та запальних розладів.

Ізолейцин – це одна з трьох амінокислот з розгалуженим ланцюгом. Він допомагає збільшити швидкість синтезу білків і сприяє утворенню м'язової тканини. Крім того, ізолейцин відомий тим, що покращує споживання glucose, розвиток кишечника та функції імунної системи, хоча багато досліджень вивчали

Триптофан є попередником молекул ніацину (вітаміну B3), мелатоніну та серотоніну, а отже, необхідний для сну та настрою.

Хоча для синтезу людського білка потрібно 20 амінокислот, лише близько половини з цих необхідних будівельних блоків може бути

синтезовано людиною. Люди та інші ссавці мають генетичний матеріал, необхідний лише для синтезу ферментів, що містяться в шляхах біосинтезу заміennих амінокислот. Видалення довгих шляхів, необхідних для синтезу незамінних амінокислот з нуля, ймовірно, є еволюційною перевагою. Втрачаючи генетичний матеріал, необхідний для синтезу цих амінокислот, і покладаючись на навколишнє середовище для забезпечення цих будівельних блоків, організми можуть зменшити витрати енергії, особливо при реплікації свого генетичного матеріалу. В результаті досягається перевага у виживанні, але для синтезу білка необхідна залежність від інших організмів для отримання необхідних матеріалів [24].

Відхилення від стандартного метаболічного стану здорової дорослої людини може призвести до того, що для підтримки азотного балансу організму знадобиться більше незамінних амінокислот, ніж передбачено стандартом. Як правило, оптимальне співвідношення заміennих і незамінних амінокислот вимагає балансу, що залежить від фізіологічних потреб, які відрізняються у різних людей. Пошук оптимального співвідношення амінокислот у загальному парентеральному харчуванні при захворюваннях печінки або нирок є чудовим прикладом того, що різні фізіологічні стани вимагають різного споживання поживних речовин. Тому терміни «замінні» і «незамінні» амінокислоти можуть вводити в оману, оскільки всі амінокислоти можуть бути необхідними для забезпечення оптимального стану здоров'я.

При недостатньому надходженні незамінних амінокислот можуть з'являтися клінічні симптоми, такі як блювота або низький апетит. Ці симптоми можуть включати депресію, тривогу, безсоння, втому, слабкість і затримку росту у дітей. Ці симптоми здебільшого спричинені недостатнім синтезом білка в організмі через брак незамінних амінокислот. Адекватна кількість амінокислот необхідна для вироблення нейромедіаторів і гормонів, росту м'язів та інших клітинних процесів. Крім того, порушення обміну амінокислот пов'язане з різними захворюваннями людини, включаючи та альбінізму [15], тирозинемію [48] та фенілкетонурію [58].

Ефективне використання вільних АК для синтезу м'язового білка також вносить свій внесок у дебати про збагачення АК для поліпшення якості харчового білка шляхом додавання лімітуючих АК у вільній кристалічній формі. Ця процедура представляє насамперед цікавить у зв'язку з поліпшенням якості рослинного білка, і в першу чергу лізину білка, і в першу чергу збагачення зернових лізином, а також збагачення сіркою збагачення бобових і олійних культур сіркою, хоча, де це доречно, можуть розглядатися й інші ААА або їхні похідні. Інтерес до збагачення рослинних білків у дитячих сумішах добре задокументований і визнаний. добре задокументований і загальновизнаний. Переваги подібного збагачення для дорослих людей залишаються невирішеними, а стаття [42] та ін. показує, що вільні АК ефективно підтримують синтез м'язового білка, є цікавим внесок у цю дискусію. Однак, збагачення АК інтактного білка (особливо тих, що погано засвоюються) білків (особливо тих, що мають низьку засвоюваність, таких як рослинні білків) може не доставити АК на периферію в тому ж профілі, що і суміш вільних АК профілем, що і суміш вільних АК, через різницю в часі перетравлення та/або всмоктування.

Вільні амінокислоти відіграють кілька важливих ролей в організмі завдяки своїм унікальним властивостям і функціям:

Будівельні блоки білків: Амінокислоти є фундаментальними компонентами білків, які необхідні для росту, відновлення та підтримки тканин [49].

Швидка абсорбція: Амінокислоти у вільній формі, які не зв'язані з іншими молекулами, швидко засвоюються і використовуються організмом. Це робить їх особливо корисними для людей з проблемами травлення або тих, хто потребує швидкої доставки поживних речовин [39].

Виробництво енергії: Амінокислоти класифікуються як «глюкогенні», якщо їх катаболізм дає проміжні продукти метаболізму, зокрема піруват,

ацетил КоА, ацетоацил КоА, оксалоацетат і  $\alpha$ -кетоглутарат, амінокислоти можуть слугувати джерелом виробництва енергії через цикл Кребса [35, 39].

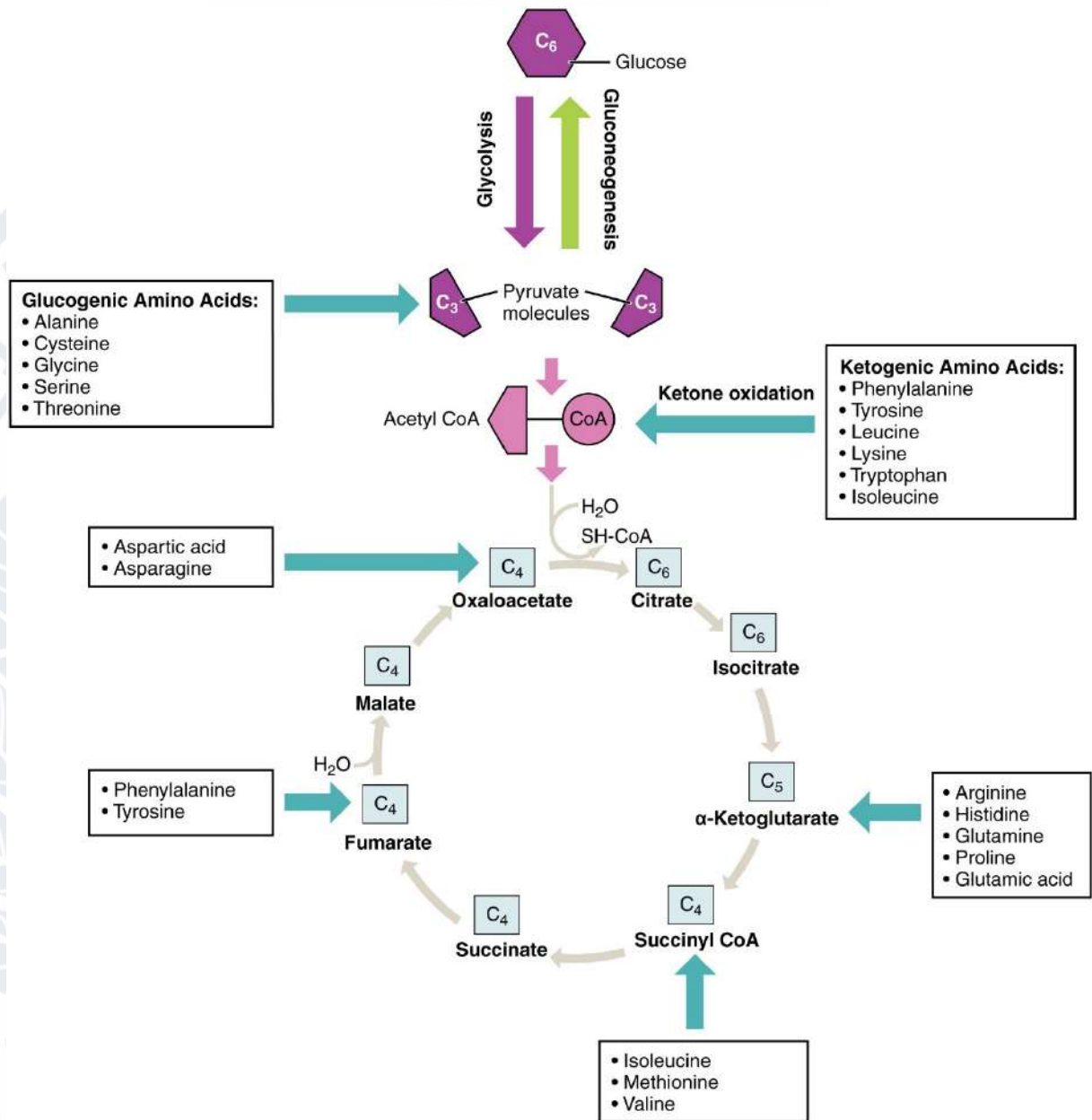


Рис. 1.1. Шляхи використання амінокислот для енергетичних процесів [9].

**Молекули-попередники:** Деякі амінокислоти слугують попередниками важливих молекул, таких як нейромедіатори, які є критично важливими для роботи мозку та регуляції настрою.

**Регуляція метаболізму:** Амінокислоти відіграють важливу роль у регуляції метаболізму та підтримці імунної функції.

Відсутність механізму накопичення: Організм не накопичує надлишок амінокислот. Замість цього вони перетворюються на глюкозу або кетони, або розкладаються на вуглеводні та азотисті відходи.

### **1.3 Особливості хімічного гідролізу рослинних білків**

Рослинні білки, такі як соєві або горохові, можуть бути гідролізовані за допомогою кислот або лугів. Хімічний гідроліз цих білків дозволяє виділити амінокислоти та пептиди для подальшого використання у харчовій промисловості або фармацевтиці. Основна перевага хімічного гідролізу полягає у високій швидкості розщеплення, але важливим є точний контроль умов процесу, оскільки деякі амінокислоти можуть руйнуватися при агресивних умовах.

Хімічний гідроліз дозволяє швидко розщеплювати білки, забезпечуючи високий вихід амінокислот за короткий час. Використання хімічних реагентів, таких як HCl або NaOH, є порівняно дешевим у порівнянні з ферментами.

Процес легко автоматизувати та реалізувати у промислових умовах, оскільки він не потребує специфічних умов, як ферментативний гідроліз.

Хімічний гідроліз рослинних білків має свої особливості порівняно з гідролізом білків тваринного походження через специфічну структуру рослинних білків. Нижче наведені основні особливості хімічного гідролізу рослинних білків:

#### **1) Високий вміст протеїнів і специфічний склад амінокислот**

Рослинні білки, такі як соєві, горохові або пшеничні, відрізняються своїм складом амінокислот, серед яких багато незамінних (лізин, метіонін).

#### **2) Вміст антипоживних факторів**

Рослинні білки можуть містити антипоживні фактори (інгібітори протеаз, фітати, сапоніни), які можуть впливати на процес гідролізу. Хімічний гідроліз при використанні кислот сприяє руйнуванню таких компонентів, що підвищує загальну засвоюваність білків і покращує якість кінцевого продукту.

#### **3) Необхідність агресивніших умов**

Для рослинних білків характерна щільна структура клітинної стінки, яка потребує агресивніших умов гідролізу для ефективного руйнування. Хімічний гідроліз із застосуванням кислот або лугів допомагає розщеплювати білки навіть у складних для ферментативних методів умовах, але водночас може пошкодити деякі амінокислоти.

#### 4) Можливість зміни функціональних властивостей білків

Після хімічного гідролізу рослинних білків отримують не лише вільні амінокислоти, але й пептиди, які можуть мати інші функціональні властивості. Наприклад, гідролізат соєвого білка можна використовувати як стабілізатор або емульгатор у харчовій промисловості. Це важлива перевага при виробництві продуктів з високою харчовою цінністю або спеціальних добавок.

#### 5) Висока продуктивність

Хімічний гідроліз дозволяє швидко та ефективно розщеплювати рослинні білки у великих об'ємах. Завдяки цьому метод широко використовується в промисловому виробництві, особливо для виготовлення гідролізатів соєвого білка, які використовуються у виробництві кормів, спортивного харчування та дієтичних добавок.

#### 6) Втрати окремих амінокислот

Одна з проблем хімічного гідролізу рослинних білків - це деградація чутливих амінокислот, таких як триптофан і цистеїн. Тому при хімічному гідролізі часто втрачається частина цих важливих компонентів, що може впливати на якість гідролізатів.

#### 7) Універсальність

Хімічний гідроліз застосовується для широкого спектра рослинних білків: сої, гороху, кукурудзи, ріпаку та інших. Це дозволяє отримувати різні продукти з різноманітними властивостями для подальшого використання у харчовій, фармацевтичній та інших галузях.

*Вміст і значення лізину в харчових продуктах*

Лізін - це одна з незамінних та лімітувальних амінокислот, яка особливо важлива для нормального росту та розвитку. Він бере участь у синтезі білків, ферментів, гормонів і сприяє засвоєнню кальцію.

Лізін відіграє важливу роль у поділі та зростанні клітин, оскільки є основним будівельним блоком факторів росту [57]. Прискорене загоювання ран за допомогою розчинів на основі лізину призводить до меншої кількості рубцевої тканини, тоді як ділянки, які отримують мало кисню та поживних речовин, безпосередньо ін'єктовані факторами росту, виграють від ангиогенезу або розвитку нових кровоносних судин навколо місця ін'єкції. Більше того, лізін сприяє обміну жирів [36].

Лізін є однією з дев'яти незамінних амінокислот, які відіграють критичну роль у численних фізіологічних процесах організму людини та тварин. Ця амінокислота не синтезується в організмі самостійно, тому її надходження з харчовими продуктами є необхідним для підтримки нормального функціонування та розвитку. Вміст лізину в різних харчових джерелах та його біологічне значення є предметом інтенсивних наукових досліджень у галузі нутриціології, біохімії та медицини.

Біологічне значення лізину в організмі людини є багатограним і охоплює ряд ключових функцій. Перш за все, лізін відіграє фундаментальну роль у синтезі білків, будучи критичним компонентом для формування колагену - основного структурного білка сполучної тканини, який забезпечує цілісність шкіри, кісток, сухожилів та хрящів. Крім того, лізін бере активну участь у процесах росту та відновлення тканин, що особливо важливо для нормального розвитку організму та загоєння ран.

Дослідження показують, що лізін відіграє значну роль у підтримці імунної функції організму. Він бере участь у виробленні антитіл, тим самим підвищуючи захисні сили організму проти патогенів. Недостатність лізину у раціоні може призвести до ослаблення імунної системи, що підвищує сприйнятливості організму до інфекцій та захворювань. Це підтверджується

дослідженнями, які демонструють зв'язок між адекватним споживанням лізину та покращенням імунної відповіді [18].

Лізін також відіграє важливу роль у метаболізмі кальцію. Він сприяє кращому засвоєнню кальцію організмом, що має критичне значення для підтримки здоров'я кісткової тканини та профілактики остеопорозу. Ця функція лізину особливо важлива в періоди активного росту організму, а також у літньому віці, коли ризик розвитку остеопорозу підвищується.

У контексті метаболізму жирів, лізін відіграє важливу роль у регуляції обміну жирних кислот та виробництві енергії. Дослідження показують, що лізін сприяє обміну жирів, що може мати позитивний вплив на загальний метаболізм організму [36]. Крім того, лізін бере участь у синтезі карнітину - сполуки, яка необхідна для транспорту жирних кислот у мітохондрії для їх окислення та отримання енергії.

Важливо відзначити роль лізину у гормональній регуляції організму. Ця амінокислота необхідна для синтезу ряду гормонів, ферментів та нейромедіаторів, включаючи серотонін. Крім того, лізін може впливати на рівень стресу в організмі, сприяючи зниженню рівня кортизолу - гормону стресу. Це може мати позитивний вплив на психоемоційний стан, зменшуючи тривожність та стрес.

Дослідження на тваринних моделях демонструють потенціал лізину у зменшенні запальних процесів та окислювального стресу. Зокрема, на мишачій моделі гепатиту було показано, що лізін знижує рівень експресії факторів запалення та послаблює окислювальний стрес у тканинах печінки [37]. Ці дані відкривають перспективи для подальших досліджень щодо можливого терапевтичного застосування лізину при запальних захворюваннях.

Вміст лізину в харчових продуктах варіюється залежно від джерела білка. Найбагатшими джерелами лізину є продукти тваринного походження, такі як м'ясо, риба, яйця та молочні продукти. Серед рослинних джерел лізину

виділяються бобові культури, особливо соя та її похідні. Однак важливо зазначити, що вміст лізину в рослинних білках зазвичай нижчий, ніж у тваринних, що може бути критичним фактором для вегетаріанців та веганів.

У контексті тваринництва лізин розглядається як одна з найважливіших амінокислот для забезпечення нормального росту та розвитку сільськогосподарських тварин. Дослідження показують, що додавання лізину до раціону свиней та птиці позитивно впливає на їх продуктивність, стимулюючи ріст м'язової маси та підвищуючи ефективність засвоєння корму. Зокрема, експерименти демонструють, що комбінація лізину з іншими амінокислотами, такими як метіонін і треонін, сприяє поліпшенню обміну протеїну, амінокислот та інших поживних речовин у організмі тварин, що призводить до підвищення їх продуктивності [54].

Важливо зазначити, що як недостатнє, так і надмірне споживання лізину може мати негативні наслідки для здоров'я. Нестача лізину може призвести до анемії, порушення обміну жирних кислот, уповільненого загоєння ран, зниження м'язової маси та порушення синтезу сполучної тканини. З іншого боку, надмірне споживання лізину може викликати неврологічні порушення, хоча такі випадки зустрічаються рідко при звичайному харчуванні.

Розуміння ролі лізину в організмі та його вмісту в різних харчових продуктах має велике значення для розробки збалансованих дієт, оптимізації харчування спортсменів, а також для профілактики та лікування різних захворювань. Подальші дослідження в цій галузі можуть відкрити нові перспективи для використання лізину в медицині, нутриціології та біотехнології, сприяючи розробці інноваційних підходів до покращення здоров'я людей та підвищення продуктивності в тваринництві.

#### *Продукти, багаті на лізин*

Вміст лізину варіюється залежно від джерела білка. Основними джерелами лізину є продукти тваринного походження, але він також міститься в рослинних білках, зокрема у бобових [11, 29].

Таблиця 1.2. Таблиця продуктів зі вмістом лізину

| Продукти                          | Білок,<br>г/100г | Лізін,<br>г/100г | % лізину<br>від білку | Добова<br>норма, % |
|-----------------------------------|------------------|------------------|-----------------------|--------------------|
| яєчні білки                       | 81,1             | 5,515            | 6,80                  | 193,1              |
| ізолят соєвого білка              | 80,69            | 5,327            | 6,60                  | 186,5              |
| сир пармезан                      | 38,46            | 2,980            | 7,75                  | 104,3              |
| сир романо                        | 31,8             | 2,941            | 9,25                  | 103,0              |
| м'ясна закуска зі свинячих шкурок | 61,3             | 2,783            | 4,54                  | 97,4               |
| Соєві хлоп'я                      | 22,4             | 2,500            | 8,96                  | 87,5               |

### *Дефіцит лізину та його наслідки*

Недостатність лізину в раціоні може призвести до серйозних порушень:

**Затримка росту:** Лізін є важливим для правильного росту, особливо у дітей та підлітків. Недостатність цієї амінокислоти може призвести до уповільненого фізичного розвитку.

**М'язова слабкість та втома:** Через недостатнє вироблення білків і м'язової тканини організм може відчувати загальну слабкість, втому та зниження працездатності.

**Зниження імунітету:** Лізін необхідний для вироблення антитіл, тому його дефіцит може ослаблювати імунну систему, збільшуючи ризик інфекцій.

**Когнітивні порушення:** Дефіцит лізину пов'язаний зі зниженням рівня нейромедіаторів, таких як серотонін, що може призводити до депресії, тривоги та інших психічних розладів.

### *Використання лізину у харчовій промисловості та як добавки*

Лізін часто використовується як добавка до кормів для тварин, оскільки він є однією з найбільш дефіцитних амінокислот у раціонах сільськогосподарських тварин, особливо при використанні рослинних кормів.

Лізін використовується як добавка в спортивному харчуванні та для підтримки імунної функції. Він також використовується для прискорення загоєння ран і профілактики вірусних інфекцій (наприклад, герпесу) [10].

## РОЗДІЛ II

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Матеріали досліджу

##### *Опис зразків соєвих бобів (три види)*

Для дослідження було проаналізовано три сорти сої, що належать до різних груп стиглості [3], з метою оцінки впливу групи стиглості на амінокислотний склад та вміст білка. Дослідження амінокислотного складу соєвих білків є важливим як з наукової, так і з практичної точки зору, оскільки це дозволяє визначити поживну цінність соєвих бобів залежно від сорту, а також їх потенційне використання в харчовій промисловості або для виробництва кормів.

Вибір сортів сої ґрунтувався на їх генетичних та агротехнічних характеристиках, які впливають на тривалість вегетаційного періоду, рівень продуктивності та якість зерна. Для забезпечення точності та надійності результатів, кожен сорт був проаналізований тричі, що дозволяє врахувати можливі варіації вмісту білка та амінокислот у зразках.

Аналіз амінокислотного складу проводився за допомогою іонообмінного автоматичного аналізатора AAA 500 на базі Жмеринської районної санітарно-епідеміологічної станції, яка знаходиться за адресою: м. Жмеринка, вул Центральна 7. Такий прилад дозволяє з високою точністю визначити вміст окремих амінокислот у складі білків.

Для досліджу було обрано наступні сорти сої, які належать до різних груп стиглості та характеризуються різним вмістом білка. Характеристики сортів наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 Характеристики сортів сої за вмістом білка та групою стиглості.

| Назва та зовнішній вигляд                                                                                                                                                                                                                                                         | Характеристика                                                                                                             |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>КНЯЖНА</p> <p>Група стиглості - 0 - середньоранньостиглий</p>                                                                                                                                | <p>Група стиглості – 0 – середньоранньостиглий</p> <p>Веgetаційний період 102-112 діб</p> <p>Вміст білка,% 36,1-41,0</p>   |
|  <p>СОЯ<br/>Монада</p> <p>Веgetаційний період – 114-121 днів<br/>Урожайність, ц/га – 2,8-3,0 т/га<br/>Рекомендована зона вирощування – Лісостеп, Степ<br/>Оригіатор: ІКСТП НААН</p>             | <p>Група стиглості – I – середньостиглий</p> <p>Веgetаційний період 116 - 125 діб</p> <p>Вміст білка,% 38,7-39,3</p>       |
|  <p>СОЯ<br/>Оксана</p> <p>Веgetаційний період – 125-135 днів<br/>Урожайність, ц/га – 2,9-3,4 т/га<br/>Рекомендована зона вирощування – Лісостеп, Степ<br/>Оригіатори: ІКСТП НААН, ІЗЗ НААН</p> | <p>Група стиглості – II – середньопізнньостиглий</p> <p>Веgetаційний період 125-132 діб</p> <p>Вміст білка,% 38,9-40,6</p> |

## 2.2 Умови проведення експерименту

### *Підготовка зразків до аналізу*

Для досліду брали по 2 г повітряно-сухого рослинного матеріалу, який подрібнювали у ступці та змішували з 3–5 мл дистильованої води.

Отриманий гомогенат переносять у мірну колбу об'ємом 25 мл, додаючи дистильовану воду, та нагрівають на водяній бані (45–50°C) протягом 30 хвилин, періодично перемішуючи.

Після охолодження осаджують білки, додаючи 2 мл 5% розчину  $\text{ZnSO}_4$ , та 0,5 мл 5% розчину  $\text{NaOH}$ , нейтралізуючи розчин до нейтрального pH.

Об'єм доводять до 25 мл дистильованою водою, після чого фільтрують через фільтр Шотта. Для кращої фільтрації попередньо гомогенат можна піддати центрифугуванню. Це дозволить відокремити тверді частинки від рідкої фази, полегшуючи подальший процес фільтрації та забезпечуючи більш чистий розчин для аналізу.

До 5 мл фільтрату додають 5 мл мідної фосфорнокислої суміші, перемішують 10 хвилин, фільтрують через паперовий фільтр.

В одержаному розчині підкислюють 0,1 мл 10%  $\text{HCl}$ , додають 1 мл фероціаніду і доводять об'єм водою до 10 мл.

### *Методика хімічного гідролізу*

Визначення вмісту амінного азоту у рослинах (за методом Н.І. Ястрембовича, Ф.Л. Калініна) [4, с.210].

#### Принцип методу:

Метод базується на перетворенні амінокислот у розчинні мідні солі. Вміст міді визначають у вигляді фероціаніду міді, який забарвлює розчин у блідо-рожевий колір. Оптична густина розчину вимірюється за допомогою спектрофотометра. Кількісний вміст амінного азоту визначається шляхом побудови калібрувального графіка за стандартним розчином мідної солі.

Метод полягає у тому, що амінокислоти, присутні в гідролізаті, взаємодіють із мідними солями, утворюючи розчинні мідні комплекси. Далі

ці комплекси вступають у реакцію з фероціанідом калію, утворюючи фероціанід міді, який забарвлює розчин у блідо-рожевий колір. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна кількості амінного азоту в зразку. Це дозволяє визначити концентрацію амінокислот, які містять аміногрупи (вміст амінного азоту).

Основні етапи процедури:

Підготовка зразка: Рослинний матеріал піддається гідролізу за допомогою кислот (часто  $\text{HCl}$ ), що дозволяє розщепити білки на амінокислоти. Гідроліз проводять за певних умов (температура, концентрація кислоти), щоб забезпечити повний розпад білків.

До гідролізату додають розчин мідної солі (часто  $\text{CuSO}_4$  або  $\text{CuCl}_2$ ). Ця сіль взаємодіє з амінокислотами, утворюючи комплекси з міддю. Комплекси є стабільними у водному розчині та можуть легко вступати в подальші реакції.

Після утворення мідних комплексів до розчину додають фероціанід калію ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), який реагує з мідними іонами, утворюючи осад фероціаніду міді ( $\text{Cu}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ). Осад надає розчину блідо-рожевий відтінок.

Інтенсивність кольору розчину вимірюється за допомогою спектрофотометра при певній довжині хвилі (зазвичай у зеленій області спектра, 540 нм). Вимірюється оптична густина розчину, яка прямо пропорційна концентрації амінного азоту в зразку.

Для кількісного визначення амінного азоту використовують калібрувальний графік, який будується на основі вимірювань оптичної густини стандартних розчинів мідної солі з відомою концентрацією амінокислот або амінного азоту. Це дозволяє визначити концентрацію азоту у досліджуваних зразках шляхом порівняння з калібрувальними даними.

Спектрофотометрія дозволяє точно вимірювати кількість амінного азоту навіть при невеликих концентраціях.

Метод можна застосовувати для широкого спектра рослинних матеріалів, незалежно від їх білкового складу. Процедура не потребує

складного обладнання та може бути виконана в стандартних лабораторних умовах.

### **2.3 Методи визначення амінокислотного складу**

Визначення амінокислотного складу є критично важливим аспектом біохімічних досліджень, що дозволяє отримати детальну інформацію про структуру та функції білків.

На сьогоднішній день, розвиток біоаналітичних технологій призвів до появи численних методів аналізу амінокислот (AAA), які активно використовуються в таких галузях, як фармацевтика, харчова промисловість, виробництво кормів, сільське господарство, медичні та екологічні дослідження, біохімія/біомедицина, а також клінічна діагностика. Як правило, аналіз амінокислот у пептидах або білках включає наступні етапи:

- 1) кислотний гідроліз білків до окремих амінокислот;
- 2) розділення амінокислот за допомогою хроматографії;
- 3) дериватизацію амінокислот (яка може відбуватися до або після хроматографії);
- 4) спектрофотометричне виявлення.

Сучасні методи AAA без дериватизації, які використовують мас-спектрометрію (MS) і внутрішні стандарти для кількісного аналізу окремих амінокислот після хроматографічного поділу, спрямовані на підвищення чутливості та зменшення необхідної кількості білкового матеріалу. Існує низка перевірених методів для проведення AAA у зразках крові, сироватки, плазми, спинномозкової рідини, сечі та тканин. Крім того, такі методи дозволяють легко розрізняти D- і L-ізомери амінокислот. Завдяки цим технологіям процес AAA значно прискорився, збільшилася чутливість і точність аналізу, а також зменшилася кількість матеріалу, необхідного для досліджень.

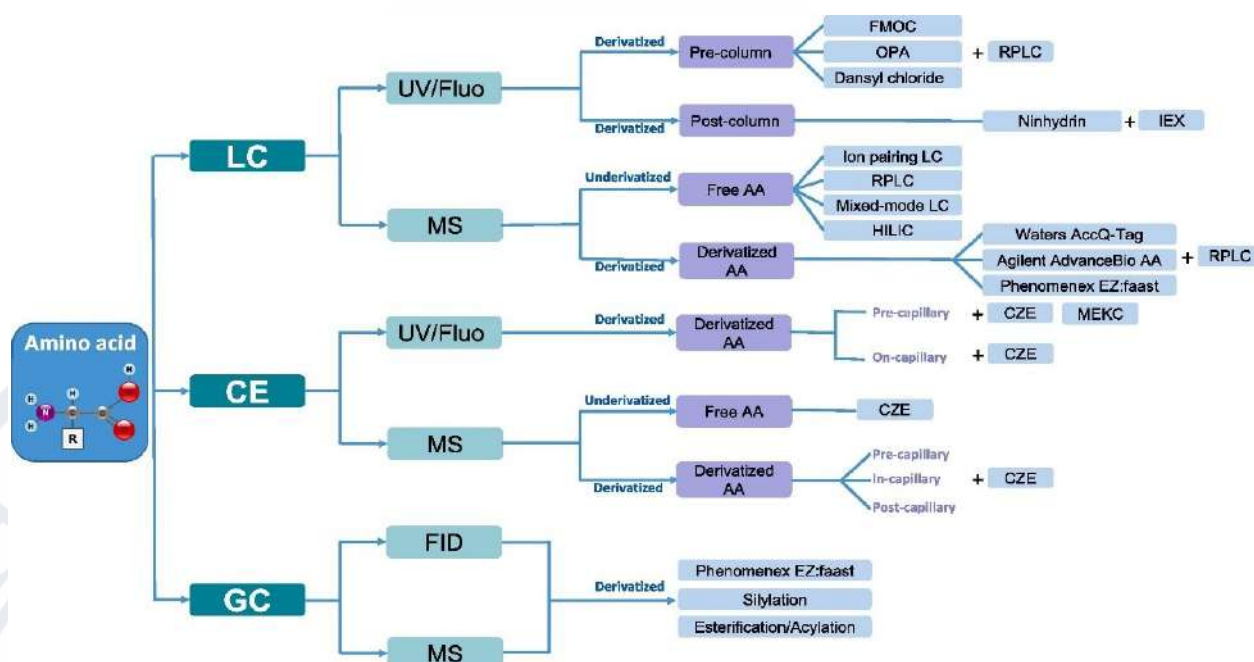


Рис. 2.1. Основні методи аналізу амінокислот

Сучасні аналітичні методи, такі як рідинна хроматографія (LC) [17,29], електрофорез (CE) [9,26,34], газова хроматографія (GC) [11,12] та спектроскопія ближнього інфрачервоного відбиття (NIRS) [7,25], надають дослідникам дієвий інструментарій для точного та ефективного аналізу амінокислот.

Рідинна хроматографія (LC) є одним з найуніверсальніших методів, особливо ефективна у варіанті високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) [17], яка забезпечує високу роздільну здатність та чутливість аналізу. LC дозволяє досліджувати термолабільні сполуки і використовувати різноманітні детектори, такі як ультрафіолетові (UV) [10,23] та флуоресцентні (Fluo).

Електрофорез (CE), особливо капілярна зонна електрофорезія (CZE), характеризується високою роздільною здатністю, швидкістю та чутливістю [9,26], що робить його ідеальним для дослідження білків, ДНК, РНК та інших біомолекул.

Газова хроматографія (GC) є потужним методом для аналізу летких органічних сполук, забезпечуючи надзвичайно високу чутливість та точність

[11,12]. GC широко застосовується для екологічних і метаболомних досліджень.

Спектроскопія ближнього інфрачервоного відбиття (NIRS) може значно покращити ефективність оцінки кормів із сої, хоча для якісного аналізу потрібно створювати калібрувальні моделі на основі даних HPLC [7,25].

Мас-спектрометрія (MS) є надзвичайно потужним методом, який може використовуватись як самостійно, так і в комбінації з GC чи LC, забезпечуючи високу чутливість та специфічність [52].

Для досліду був використаний амінокислотний аналізатор AAA 500, який працює на основі принципу рідинної іонообмінної хроматографії з постколунковою дериватизацією, яка дозволяє кількісно визначити амінокислотний склад.

Аналізатор являє собою одноблочні стаціонарні прилади. У корпусі розташовано термостатовану аналітичну колонку, передколунку, нінгідриновий реактор, спектрофотометричний двоканальний датчик, перистальтичні насоси для нінгідрину і буфера, електромагнітні клапани, що керують потоками елюента і реагенту. У верхньому відсіку аналізатора розміщені бутлі з буферними розчинами та охолоджувальна ємність із нінгідрином, касета для встановлення проб. Управління роботою аналізаторів здійснюють через комп'ютер або клавіатурою сенсорного дисплея. Програми аналізаторів забезпечують повну автоматизацію аналізів. Комп'ютери аналізаторів AAA 500 забезпечені програмою з вільною ліцензією - програмою Clarety, разом з якою поставляються програми основних видів аналізів.

Основою методу є розділення суміші амінокислот на іонообмінній колонці. Колонка – це довга металева або скляна трубка, яка заповнена гранулами синтетичної смоли, яка містить негативно заряджені групи.



Рис.2.3 Будова колонки аналізатора ААА 500

Змінюючи відносну кількість мономерів, можна регулювати ступінь зшивання. Таким чином утворюється трьохмірний каркас із гідрофобних бензольних ядер. Тепер в цей каркас поміщують негативно заряджені сульфгідрильні групи, тобто сульфурують смолу. Наступний етап обробка смоли водою, в разі чого відбувається процес набухання (молекули води входять в каркас і утворюють труднощі для проходження низькомолекулярних сполук). Частка смоли являє собою закріплені негативно заряджені групи. [5, с.7-14]

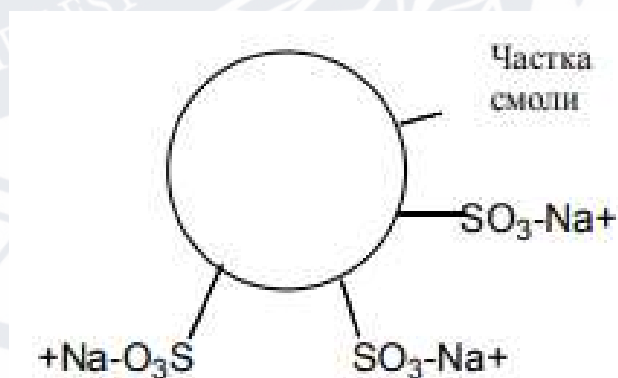


Рис. 2.4 Схематичний вигляд частки смоли

Проведення аналізу амінокислот у зразку включає такі основні стадії:

Підготовка зразка: Зразки білків або пептидів піддаються гідролізу для отримання вільних амінокислот. Потім їх вводять у систему дозування аналізатора, де зразок охолоджується для забезпечення стабільності.

Розділення амінокислот: Використовується іонообмінна хроматографія. Амінокислоти проходять через колонку, заповнену іонообмінною смолою, яка затримує амінокислоти залежно від їхньої електричної зарядженості та розміру. Колонки нагріваються до певної температури (наприклад, до 90°C для оптимального розділення).

Дериватизація: Після того як амінокислоти вийшли з колонки, вони потрапляють у проточний реактор, де до них додають нінгідрин. Він утворює синьо-фіолетове забарвлення, яке потім визначається фотометрично, дозволяючи кількісно оцінити вміст кожної амінокислоти у зразку[43]

Дериватизація: після проходження через колонку амінокислоти піддаються постколонковій дериватизації за допомогою нінгідрину. Цей реактив вступає в хімічну реакцію з амінокислотами, що дозволяє виявити їх шляхом утворення специфічного забарвлення. Кожна амінокислота дає характерний колір, і цей колір реєструється детектором, що фіксує результати за певними хвилями світла (440 нм і 570 нм). Ця подвійна детекція дозволяє диференціювати амінокислоти за типом аміногруп: хромофори з довжиною хвилі 570 нм відповідають продуктам, що містять первинні аміни, тоді як сигнал при 440 нм вказує на присутність вторинних амінів.

Обробка результатів: Результати вимірювань обробляються за допомогою програмного забезпечення, яке генерує хроматограму і дозволяє кількісно визначити амінокислотний склад зразка.

Катіонообмінні смоли, на поверхні яких містяться аніонні групи, називають катіонітами, а ті, що мають зв'язані катіонні групи — аніонітами, або аніонообмінними смолами. Спочатку катіонообмінну колонку насичують іонами натрію, після чого через неї пропускають кислий розчин амінокислот (рН 3,0). При цьому амінокислоти, які в такому середовищі мають позитивний

заряд, відрізняються за ступенем іонізації. У процесі проходження через колонку амінокислоти, як катіони, витісняють іони натрію із смоли. [5]

Амінокислоти, які при рН 3,0 мають найбільший позитивний заряд (наприклад, лізин, аргінін та гістидин), активно взаємодіють із смолою, сильно закріплюючись на її поверхні. Амінокислоти з меншим позитивним зарядом, такі як глютамінова і аспарагінова кислоти, зв'язуються набагато слабше. Інші амінокислоти мають середній позитивний заряд і демонструють помірну силу зв'язування зі смолою [5].

Щоб вимити амінокислоти з колонки, використовують буферні розчини з поступово підвищуваним рН (від 3,25 до 5,28). Це дозволяє амінокислотам переміщатися через колонку з різною швидкістю залежно від їх ізоелектричної точки ( $pI$ ), кислотно-основних констант аміногрупи ( $pK_{+NH_3}$ ), бічних груп ( $pK_R$ ), а також здатності адсорбуватися на смолі [5].

Після завершення процесу розділення порядок виходу амінокислот із колонки зазвичай такий: аспарагінова кислота, треонін, серин, глютамінова кислота, пролін, гліцин, аланін, цистеїн, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, тирозин, фенілаланін, лізин, гістидин, аміак і аргінін. (рис.2.5).

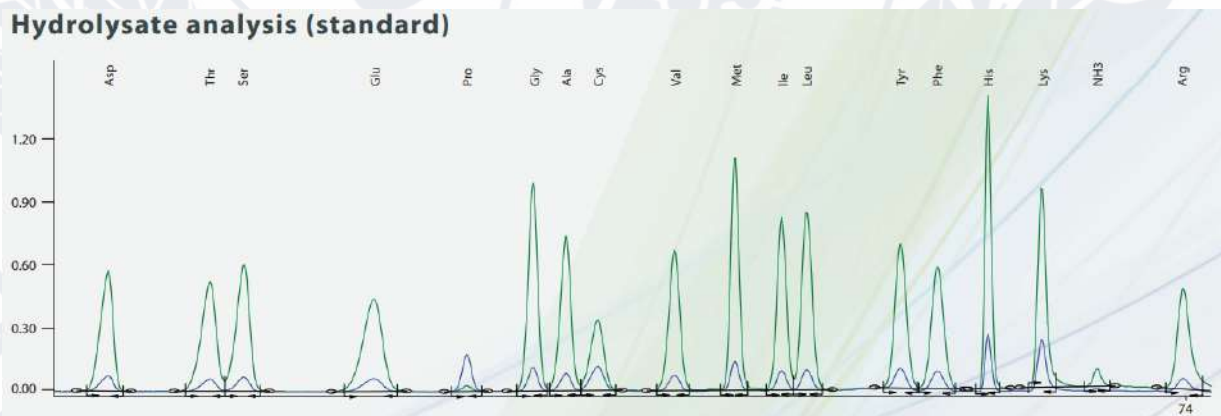


Рис. 2.5. Хроматограма стандартної суміші вільних амінокислот

На цій хроматограмі час виходу кожної амінокислоти слугує якісною характеристикою, а площа піку - кількісною. Таким чином, використання двох довжин хвиль у спектрофотометричному аналізі дозволяє не лише

ідентифікувати та кількісно визначити окремі амінокислоти, але й розрізняти їх за структурними особливостями аміногруп.

### *Способи визначення вмісту лізину*

Визначення вмісту лізину в біологічних зразках та харчових продуктах є важливим аспектом біохімічних та нутриціологічних досліджень. Лізин, як незамінна амінокислота, відіграє ключову роль у синтезі білків, росту та відновленні тканин, а також у підтримці імунної системи. Точне кількісне визначення лізину має велике значення для оцінки якості білків у харчових продуктах, розробки збалансованих раціонів харчування та діагностики метаболічних порушень. Сучасна аналітична хімія пропонує ряд методів для визначення вмісту лізину, кожен з яких має свої особливості та сфери застосування.

Хроматографічні методи є одними з найбільш широко використовуваних для визначення вмісту лізину. Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) з використанням обернено-фазових колонок дозволяє ефективно розділяти та кількісно визначати лізин у складних біологічних матрицях. Метод часто включає попередню дериватизацію лізину флуоресцентними реагентами, такими як о-фталевий альдегід (ОРА) або 9-флуоренілметилхлороформіат (FMOC), що значно підвищує чутливість та специфічність аналізу. Детектування може здійснюватися за допомогою флуоресцентного або УФ-детектора, забезпечуючи високу точність вимірювань навіть при низьких концентраціях аналіту.

Газова хроматографія визначати лізин у присутності інших амінокислот та потенційних інтерферентів.

### *Капілярний електрофорез (СЕ)*

Спектрофотометричні методи, хоча і менш специфічні порівняно з хроматографічними, також знаходять застосування у визначенні вмісту лізину. Колориметричний метод з використанням нінгідрину базується на утворенні забарвленого комплексу при взаємодії лізину з цим реагентом.

Інтенсивність забарвлення, яка пропорційна концентрації лізину, вимірюється спектрофотометрично. Цей метод є відносно простим і економічним, але може бути чутливим до інтерференції з боку інших амінокислот та потребує ретельної калібрування.

Ферментативні методи визначення вмісту лізину засновані на специфічних реакціях, каталізованих ферментами. Наприклад, лізин- $\alpha$ -оксидаза каталізує окислення L-лізину з утворенням пероксиду водню, який може бути кількісно визначений колориметрично або флуориметрично. Ці методи характеризуються високою специфічністю та можуть бути адаптовані для аналізу великої кількості зразків.

Вибір конкретного методу визначення вмісту лізину залежить від природи зразка, необхідної точності та чутливості аналізу, а також доступного обладнання та ресурсів. У багатьох випадках оптимальним підходом є комбінування різних методів для отримання найбільш повної та достовірної інформації. Наприклад, попереднє скринінгове визначення вмісту лізину може бути проведено за допомогою спектрофотометричного методу, після чого зразки з підвищеним вмістом лізину можуть бути проаналізовані більш точними хроматографічними методами.

Розвиток аналітичних методів визначення вмісту лізину продовжується, спрямований на підвищення чутливості, специфічності та ефективності аналізу. Інтеграція новітніх технологій, таких як нанотехнології та мікрофлюїдні системи, відкриває нові перспективи для розробки швидких, точних та мініатюризованих методів аналізу. Ці інновації мають потенціал революціонізувати підходи до моніторингу вмісту лізину в харчових продуктах, біологічних зразках та фармацевтичних препаратах, сприяючи прогресу в галузі нутриціології, медичної діагностики та контролю якості харчових продуктів.

Високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ):

ВЕРХ є одним з найбільш точних та широко використовуваних методів для визначення амінокислот, включаючи лізин, у зразках сої та зернових культур. Метод включає наступні етапи:

Гідроліз білків зразка для вивільнення амінокислот

Дериватизація амінокислот (наприклад, з використанням о-фталевого альдегіду (OPA) або 9-флуоренілметилхлороформіату (FMOC))

Розділення амінокислот на хроматографічній колонці

Детектування за допомогою 7

флуоресцентного або УФ-детектора

ВЕРХ забезпечує високу чутливість та специфічність аналізу, що особливо важливо при роботі зі складними матрицями, такими як соя та зернові [28].

Іонообмінна хроматографія:

Цей метод ефективний для розділення та кількісного визначення лізину та інших амінокислот у зразках сої та зернових. Він базується на різниці в зарядах амінокислот при різних рН. Метод включає:

Гідроліз білків зразка

Розділення амінокислот на іонообмінній колонці

Детектування за допомогою реакції з нінгідрином

Іонообмінна хроматографія особливо корисна для аналізу великої кількості зразків та забезпечує хорошу відтворюваність результатів .

Мас-спектрометрія у поєднанні з ВЕРХ (LC-MS/MS):

Цей метод забезпечує найвищу чутливість та специфічність при визначенні лізину в складних матрицях, таких як соя та зернові. LC-MS/MS дозволяє:

Точно ідентифікувати лізин навіть у присутності інших близьких за структурою сполук

Кількісно визначати лізин на дуже низьких рівнях концентрації

Одночасно аналізувати кілька амінокислот

Цей метод особливо корисний для досліджень, які вимагають високої точності та низьких меж виявлення [44].

Ферментативні методи:

Для аналізу лізину в зразках сої та зернових можуть бути використані специфічні ферментативні методи. Наприклад, метод з використанням лізин- $\alpha$ -оксидази:

Фермент каталізує окислення L-лізину з утворенням перекису водню

Перекис водню кількісно визначається колориметрично або флуориметрично

Ці методи мають високу специфічність до лізину та можуть бути автоматизовані для аналізу великої кількості зразків [47].

При виборі методу для конкретного дослідження слід враховувати такі фактори, як необхідна точність, доступне обладнання, кількість зразків для аналізу та специфічні вимоги до підготовки зразків.

## РОЗДІЛ III

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ, ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Результати гідролізу соєвих білків

##### 3.1.1 Отримання калібрувального графіка

За результатами гідролізу білків та визначення концентрацій азотовмісних сполук у кожному зразку завдяки отриманим результатам, представленим на графіку, було визначено вміст амінного азоту та в подальшому вміст білка в кожному сорті соєвих бобів.

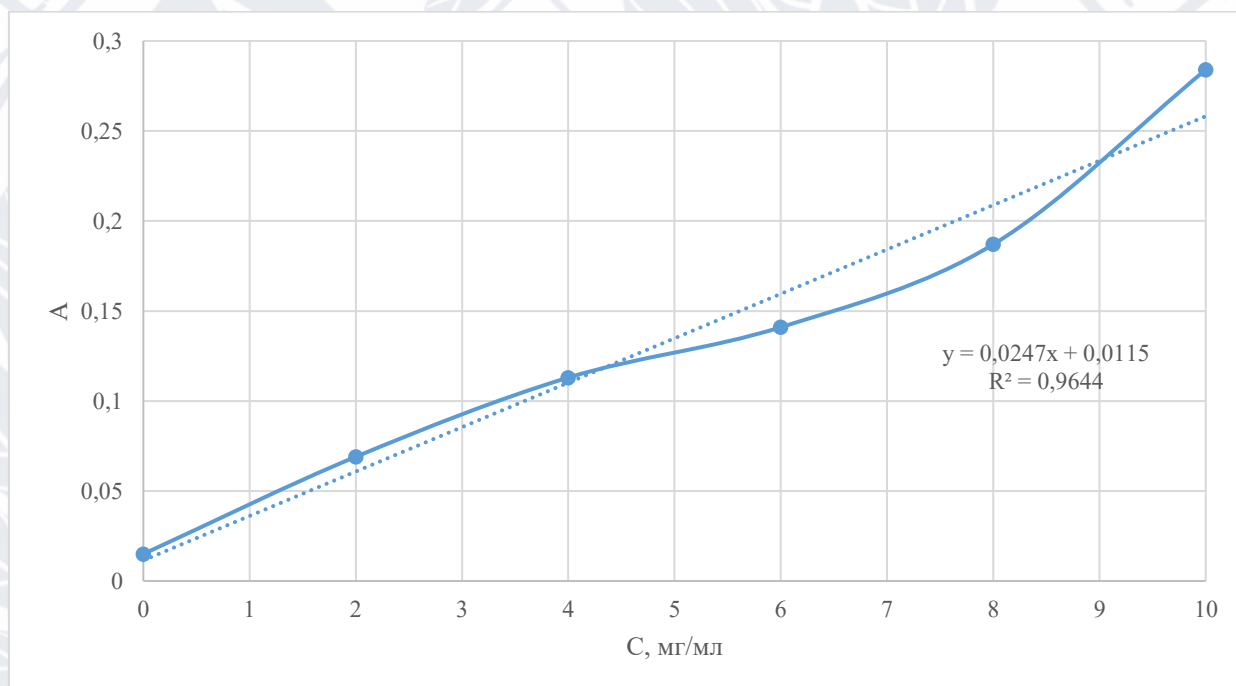


Рис. 3.1. Калібрувальний графік для визначення вмісту амінного азоту у досліджених соєвих бобах

Для визначення вмісту білка в досліджуваних зразках сої було застосовано метод К'ельдаля, який є стандартним методом визначення азоту в органічних сполуках [39]. Процедура аналізу складалася з наступних етапів:

Визначення вмісту загального азоту: На першому етапі аналізу визначалося загальне значення азоту в зразку. Під загальним азотом розуміють суму білкового та небілкового азоту.

Розрахунок вмісту білка: Отримане значення вмісту загального азоту множилося на стандартний коефіцієнт перетворення азоту в білок, який

становить 6,25 [33]. Цей коефіцієнт базується на припущенні, що середній вміст азоту в білках становить 16%

Вміст амінного азоту (в мг/100г) обчислювали за допомогою рівняння, наведеного у [4, с. 211]:

$$X_M = \frac{100 \cdot (0,0247 \cdot 0,045 + 0,0115) \cdot 10}{2} = 6,31, \quad (3.1)$$

$$X_K = \frac{100 \cdot (0,0247 \cdot 0,056 + 0,0115) \cdot 10}{2} = 6,26, \quad (3.2)$$

$$X_O = \frac{100 \cdot (0,0247 \cdot 0,061 + 0,0115) \cdot 10}{2} = 6,38, \quad (3.3)$$

Результати розрахунків за цими формулами для трьох досліджуваних сортів соєвих бобів представлені в Таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. Результати розрахунків вмісту амінного азоту та білку у зразках

| Назва  | Вміст амінного азоту, мг/100г | Білок, % |
|--------|-------------------------------|----------|
| Монада | 6,31                          | 39,4     |
| Княжна | 6,26                          | 39,1     |
| Оксана | 6,38                          | 39,9     |

### 3.1.2 Результати аналізу амінокислотного складу соєвих білків

У результаті проведених експериментів з гідролізу білків сої було отримані хроматограми амінокислотного складу трьох сортів соєвих бобів: Княжна, Монада та Оксана, (рис. 3.2-3.4). Аналіз проводився з використанням іонообмінної хроматографії на амінокислотному аналізаторі ААА 500.

Зображені хроматограми відображають найбільш репрезентативні зразки серед трьох проб, які проводились для кожного сорту. Зразки були обрані на основі максимальної схожості з середніми значеннями амінокислотного складу для кожного сорту. Так для сорту Княжна був обраний зразок першої проби, для решти зрізки з другої проби. Такий підхід

дозволяє зробити висновки про типові характеристики амінокислотного профілю кожного з сортів.

Кожен пік на хроматограмах відповідає певній амінокислоті, а його площа та висота є пропорційними її концентрації у зразку.

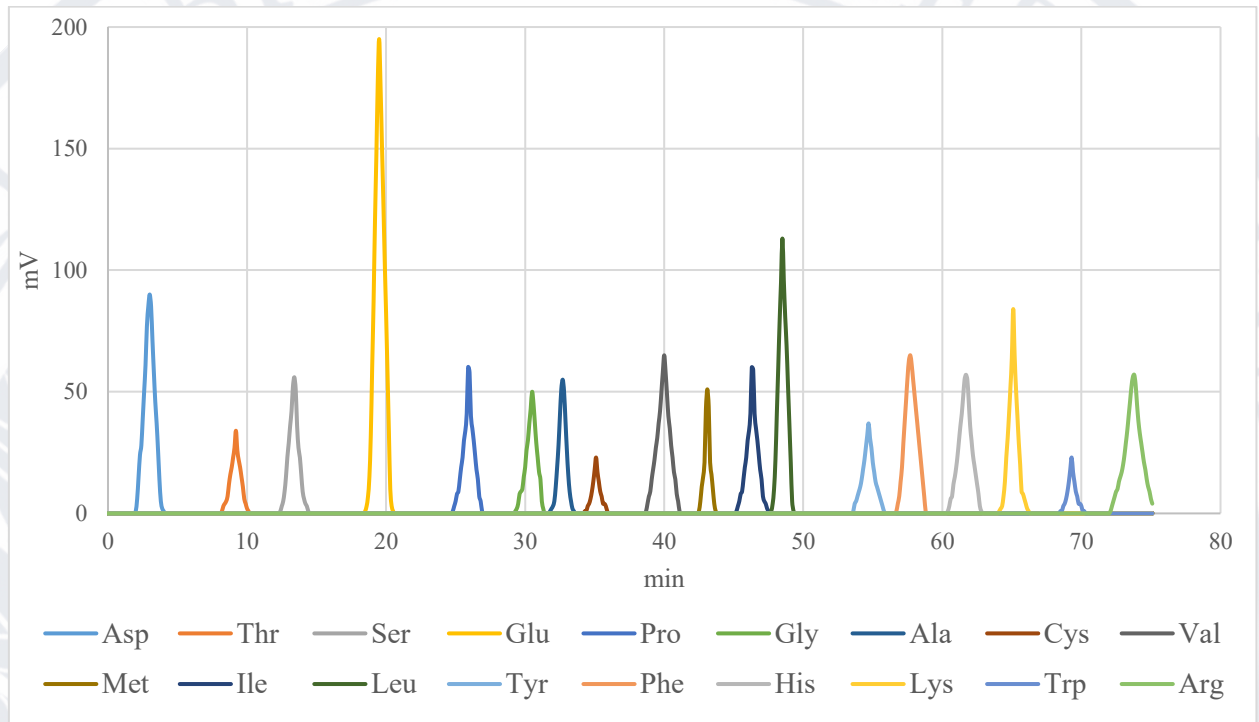


Рис. 3.2 Хроматограма вільних амінокислот сої Княжна

Серед найбільших піків у напрямку спадання інтенсивності виділяються такі амінокислоти, як глутамінова кислота, лейцин, аспаргінова кислота та лізин, що вказує на їх високий вміст у даному зразку.

Глутамінова кислота має найвище пікове значення для усіх сортів сої.

Лейцин також представлений високим піком, який має підвищений рівень біологічної цінності для харчової промисловості.

Аспаргінова кислота є важливою складовою для синтезу інших амінокислот, а також для енергетичних процесів в організмі.

На відміну від сорту Княжна, високі піки окремих амінокислот на хроматограмах сортів сої Монада та Оксана не так чітко виділяються візуально.

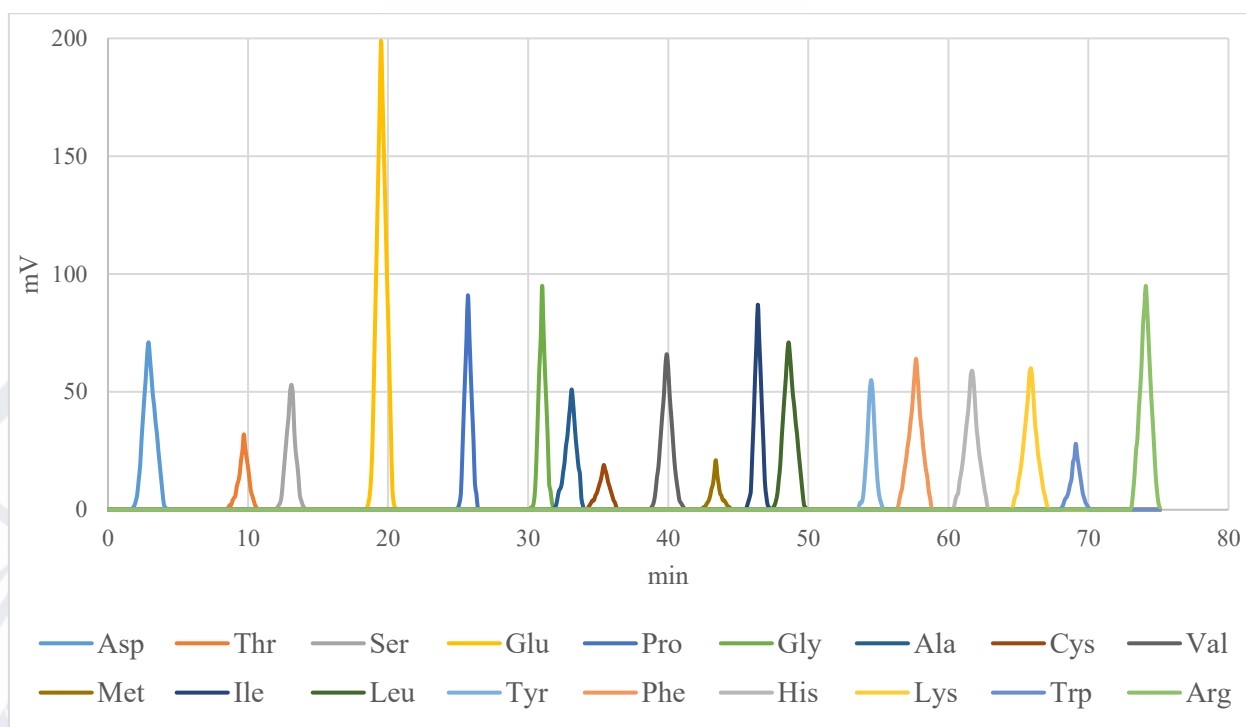


Рис. 3.4 Хроматограма вільних амінокислот сої сорту Монада

Найбільші піки мають: глутамінова кислота, гліцин та аргінін. Лізин займає 10 місце серед пікових значень.

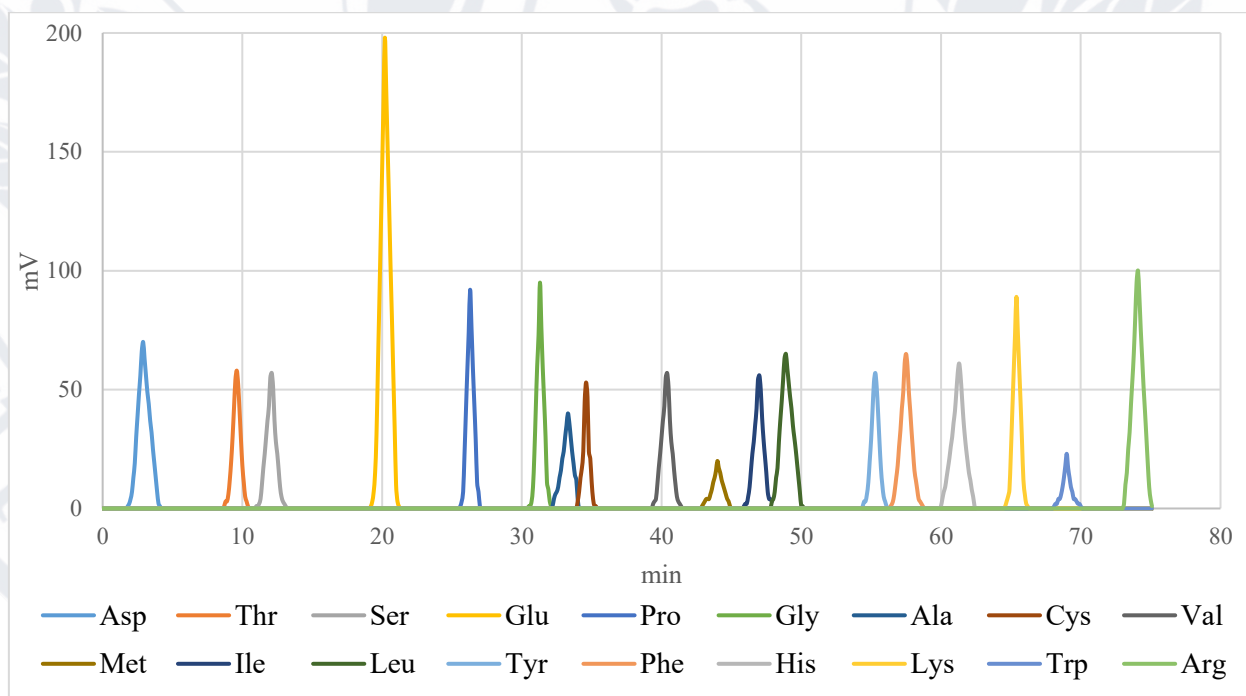


Рис. 3.3 Хроматограма вільних амінокислот сої Оксана

Лідерами і для сорту Оксана залишились тіж амінокислоти з відмінність у порядку: Глутамінова кислота, аргінін та гліцин. Лізин займає 5 сходинку.

Для переведення графічних даних у табличні з відсотковим вмістом по кожній амінокислоті були виконані наступні дії:

- Зняття площ кожного піку. На графіку кожен пік відповідає певній амінокислоті. Висота і площа піка пропорційні концентрації амінокислоти. Для точного визначення площ використовують програмне забезпечення хроматографа або графічні інструменти, якщо дані вже збережені в цифровому форматі.
- Обчислено загальну площу всіх піків. Було складено усі площі піків для отримання загальної кількості амінокислот у зразку. Це буде служити базовою величиною для розрахунків у відсотках ( $S_n$ ).
- Розраховано відсотковий вміст для кожної амінокислоти. Для розрахунку була використана проста формула:

$$A = \frac{S_i}{S_n} \cdot 100, \quad (3.4)$$

де  $A$  – вмісто амінокислоти у %;

$S_i$  - площа окремого піку амінокислоти;

$S_n$  – площа усіх пік амінокислот.

Отримані результати представлені в таблицях 3.2–3.4.

Ці дані дозволяють порівняти не лише загальний рівень білка, але й специфічний вміст ключових амінокислот, що є важливими для оцінки поживної цінності сортів.

Додатково, результати таблиць 3.2–3.4 можуть бути проаналізовані для виявлення тенденцій у зміні вмісту амінокислот залежно від умов вирощування.

Таблиця 3.2 – Амінокислотний склад трьох проб сої сорту Княжна, %

| Амінокислота     | Проба 1    | Проба 2    | Проба 3    | Середнє значення |
|------------------|------------|------------|------------|------------------|
| Гліцин           | 4,4        | 5,0        | 5,2        | 4,9              |
| Аланін           | 3,7        | 3,8        | 4,4        | 4,0              |
| Валін            | 6,8        | 6,2        | 5,7        | 6,2              |
| Лейцин           | 8,1        | 8,3        | 8,1        | 8,2              |
| Ізолейцин        | 5,0        | 4,7        | 5,3        | 5,0              |
| Пролін           | 4,9        | 5,0        | 5,0        | 5,0              |
| Фенілаланін      | 7,0        | 6,9        | 7,1        | 7,0              |
| Тирозин          | 3,4        | 3,8        | 2,6        | 3,3              |
| Метіонін         | 2,5        | 2,3        | 2,3        | 2,4              |
| Цистин           | 1,4        | 1,2        | 1,1        | 1,2              |
| Аспаргінова к-та | 8,4        | 8,2        | 8,0        | 8,2              |
| Глутамінова к-та | 16,3       | 15,5       | 15,7       | 15,8             |
| Лізин            | 5,7        | 6,0        | 5,8        | 5,8              |
| Аргінін          | 7,6        | 7,9        | 8,3        | 7,9              |
| Гістидин         | 6,2        | 6,6        | 6,4        | 6,4              |
| Серин            | 4,6        | 4,9        | 5,0        | 4,8              |
| Треонін          | 2,6        | 2,6        | 2,7        | 2,6              |
| Триптофан        | 1,4        | 1,1        | 1,3        | 1,3              |
| <b>Разом</b>     | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b>       |

В амінокислотному складі сорту "Княжна" відзначається високий вміст гліцину (середнє значення 4,9%), що є важливим компонентом для метаболічних процесів. Лейцин і валін також представлені на високому рівні (8,2% та 6,2% відповідно), що сприяє синтезу білків та підтримці м'язової тканини. Вміст фенілаланіну становить 7,0%, що позитивно впливає на синтез білків та імунну систему. Лізин у "Княжні" має середній показник 5,8%, що є трохи нижчим порівняно з іншими сортами, але важливим для росту і відновлення тканин. Глутамінова кислота має значення 15,8%, що є ключовим фактором для білкового обміну, тоді як аргінін становить 7,9%, що також підтримує метаболічні процеси.

Таблиця 3.3 – Амінокислотний склад трьох проб сої сорту Монада, %

| Амінокислота     | Проба 1    | Проба 2    | Проба 3    | Середнє значення |
|------------------|------------|------------|------------|------------------|
| Гліцин           | 4,9        | 5,5        | 5,6        | 5,3              |
| Аланін           | 3,9        | 4,5        | 3,8        | 4,1              |
| Валін            | 6,3        | 5,9        | 5,2        | 5,8              |
| Лейцин           | 7,6        | 7,2        | 7,3        | 7,4              |
| Ізолейцин        | 5,1        | 5,2        | 5,4        | 5,2              |
| Пролін           | 4,8        | 5,3        | 4,9        | 5,0              |
| Фенілаланін      | 6,5        | 6,7        | 6,3        | 6,5              |
| Тирозин          | 4,4        | 3,7        | 4,2        | 4,1              |
| Метіонін         | 1,2        | 1,3        | 1,6        | 1,4              |
| Цистин           | 1,6        | 1,7        | 1,9        | 1,7              |
| Аспаргінова к-та | 7,5        | 7,2        | 6,9        | 7,2              |
| Глутамінова к-та | 16,0       | 16,1       | 15,8       | 16,0             |
| Лізин            | 6,2        | 6,3        | 6,4        | 6,3              |
| Аргінін          | 7,6        | 8,6        | 8,9        | 8,4              |
| Гістидин         | 7,5        | 6,2        | 6,5        | 6,7              |
| Серин            | 4,1        | 4,1        | 4,5        | 4,2              |
| Треонін          | 2,9        | 2,4        | 2,7        | 2,7              |
| Триптофан        | 1,9        | 2,1        | 2,1        | 2,0              |
| <b>Разом</b>     | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b>       |

У порівнянні сорту Монада з сортом Княжна можна помітити, що Монада має трохи нижчий вміст валіну (5,8% проти 6,2%) та лізину (6,3% проти 5,8%). Ці відмінності є незначними і можуть свідчити про подібні властивості білків обох сортів. Однак вміст гліцину у "Монаді" вищий (5,3%) порівняно з "Княжною" (4,9%), що може позитивно вплинути на структурні властивості білків цього сорту.

Також сорти відрізняються за рівнем тирозину, де Монада демонструє вищі показники (4,1%) у порівнянні з (3,3%). Крім того, "Монада" має вищий вміст гістидину (6,7%) ніж Княжна (6,4%). Це може вказувати на можливе

використання сорту "Монада" у продуктах, що сприяють поліпшенню регенеративних процесів в організмі.

Таблиця 3.4 – Амінокислотний склад трьох проб сої сорту Оксана, %

| Амінокислота     | Проба 1    | Проба 2    | Проба 3    | Середнє значення |
|------------------|------------|------------|------------|------------------|
| Гліцин           | 5,1        | 5,6        | 5,6        | 5,4              |
| Аланін           | 4,3        | 3,6        | 3,7        | 3,9              |
| Валін            | 4,3        | 4,7        | 4,8        | 4,6              |
| Лейцин           | 7,7        | 6,9        | 7,6        | 7,4              |
| Ізолейцин        | 4,8        | 4,6        | 4,8        | 4,7              |
| Пролін           | 5,1        | 5,4        | 5,3        | 5,3              |
| Фенілаланін      | 5,8        | 5,9        | 5,9        | 5,9              |
| Тирозин          | 3,7        | 3,9        | 4,1        | 3,9              |
| Метіонін         | 1,7        | 1,7        | 1,8        | 1,7              |
| Цистин           | 2,6        | 2,8        | 2,9        | 2,8              |
| Аспаргінова к-та | 7,5        | 7,3        | 7,2        | 7,3              |
| Глутамінова к-та | 16,0       | 16,2       | 15,8       | 16,0             |
| Лізін            | 5,7        | 5,4        | 5,9        | 5,7              |
| Аргінін          | 9,1        | 9,3        | 7,4        | 8,6              |
| Гістидин         | 6,4        | 6,5        | 6,0        | 6,3              |
| Серин            | 4,5        | 4,7        | 5,7        | 5,0              |
| Треонін          | 4,3        | 4,0        | 4,3        | 4,2              |
| Триптофан        | 1,4        | 1,5        | 1,2        | 1,4              |
| <b>Разом</b>     | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b> | <b>100</b>       |

Аналіз усіх трьох сортів показує значні відмінності в амінокислотному складі. Вміст валіну в "Княжній" (6,2%) є найвищим серед трьох сортів, тоді як у "Оксани" (4,6%) він значно нижчий. Водночас вміст лізину у сортах "Княжна" (5,8%) та "Оксана" (5,7%) є подібним, тоді як "Монада" має найвищий показник (6,3%).

Також слід зазначити високий вміст аргініну у сорті "Оксана" (8,6%), що перевищує показники "Княжни" (7,9%) та "Монади" (8,4%). Це свідчить про можливу перевагу цього сорту у процесах, пов'язаних із синтезом білка і

м'язовою масою. Усі три сорти показують стабільний вміст таких амінокислот, як пролін (близько 5,0%) та аспарагінова кислота (приблизно 7,0–8,2%).

### 3.2 Порівняння вмісту лізину у трьох видах соєвих бобів

Аналіз показав, що амінокислотний склад білків зразків сої з різних груп стиглості відрізнявся, хоча й незначно. Наприклад, середньоранньостиглі сорти мали трохи вищий вміст амінокислот, таких як лізин і метіонін, у порівнянні з середньопізньюстиглими сортами. Ці різниці можна пояснити відмінностями у фізіологічному розвитку рослин під час вегетаційного періоду та впливом кліматичних умов.

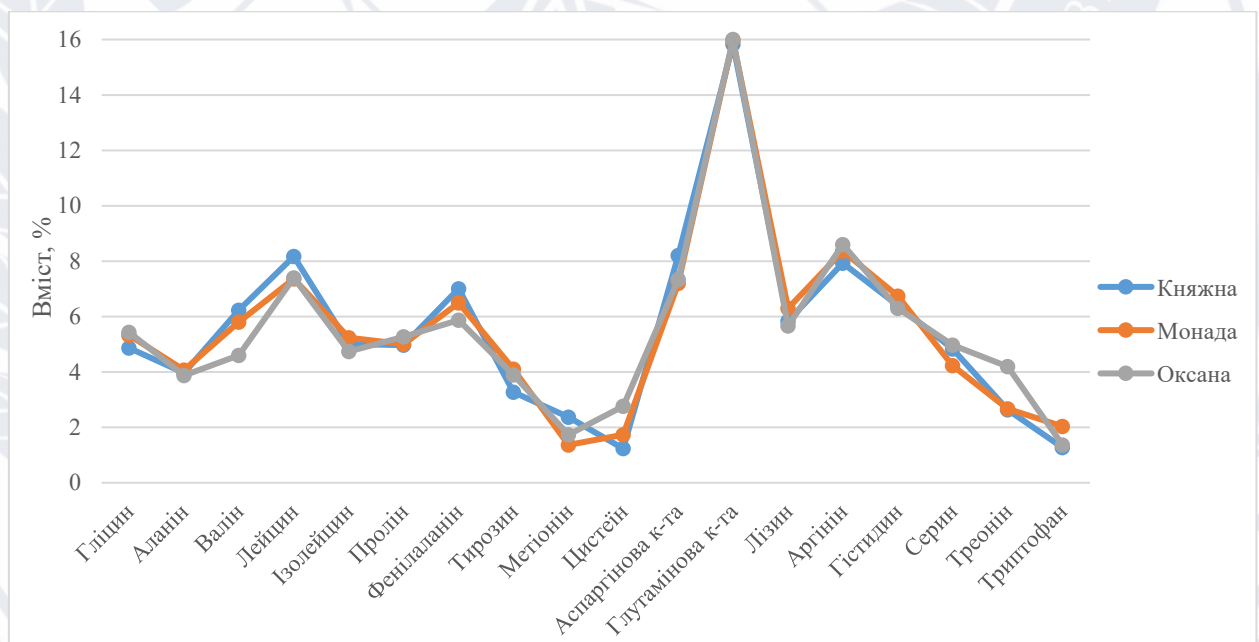


Рис. 3.5 Порівняння вмісту лізину у трьох видах соєвих бобів

Сорт "Монада" продемонстрував найвищий середній вміст лізину - 6,3%, з показниками у пробах від 6,2% до 6,4%. Це свідчить про відносно стабільний вміст цієї важливої амінокислоти у даному сорті.

Сорт "Княжна" показав дещо нижчий середній вміст лізину - 5,8%, з варіаціями у пробах від 5,7% до 6,0%. Хоча різниця з сортом "Монада" складає 0,5 процентних пункти, це може мати значення при промисловому використанні.

Сорт "Оксана" мав найнижчий середній вміст лізину - 5,7%, з коливаннями у пробах від 5,4% до 5,9%. Важливо відзначити, що цей сорт показав найбільшу варіабельність вмісту лізину між пробами.

Порівнюючи отримані результати, можна зробити висновок, що всі три досліджувані сорти мають значно нижчий вміст цієї амінокислоти ніж очікувалось. Різниця складає від 1,7 процентних пунктів для сорту "Монада" до 2,3 процентних пунктів для сорту "Оксана". Це може вказувати на необхідність подальшої селекційної роботи для підвищення вмісту лізину у досліджуваних сортах сої.

Стабільність вмісту лізину між пробами також є важливим показником. У цьому аспекті сорт "Монада" показав найбільшу стабільність з різницею між максимальним і мінімальним значенням 0,2%, тоді як у сорту "Оксана" ця різниця становила 0,5%. Це може бути важливим фактором при промисловому вирощуванні та переробці сої.

### **3.3 Обговорення отриманих результатів**

Результати дослідження показали, що хімічний гідроліз, обраний як основний метод, зіткнувся з певними складнощами в процесі реалізації. Ці труднощі можуть бути пов'язані з різними факторами, такими як стійкість білкових структур до хімічного розщеплення, можливе руйнування деяких амінокислот під час агресивного гідролізу, або складність оптимізації умов реакції для максимального виходу цільових амінокислот.

Незважаючи на виявлені складнощі, дослідження надало цінну інформацію щодо амінокислотного складу гідролізатів різних сортів сої, особливо стосовно вмісту лізину. Ці дані можуть бути корисними для подальшої оптимізації процесів отримання амінокислот з рослинних джерел.

Аналіз амінокислотного складу соєвих білків показав, що всі три сорти мають подібний амінокислотний профіль з деякими відмінностями в кількості окремих амінокислот. Серед ключових результатів:

Вміст лізину у всіх трьох сортах коливається в межах 5,7–6,3%, що є досить високим показником. Лізин є важливою незамінною амінокислотою, і високий його вміст у сої свідчить про високу харчову цінність цих сортів.

Крім лізину, значні кількості містяться такі амінокислоти, як гліцин та аланін, що також підтверджує високу харчову цінність соєвих білків.

Порівняння різних сортів показало, що найбільший вміст лізину спостерігався у сорту Монада, тоді як Княжна та Оксана мали дещо нижчі показники. Це може бути пов'язано з генетичними особливостями сортів або умовами вирощування.

Результати досліджень показали, що амінокислотний склад трьох сортів сої має подібну структуру, але з певними відмінностями у кількісних показниках. Усі три сорти продемонстрували високий вміст лізину (57–63%), причому найбільший вміст був зафіксований у сорті Монада. Лізин є важливою незамінною амінокислотою, що підтверджує високу харчову цінність цих сортів сої.

Отримані результати підтвердили високу харчову цінність соєвих білків, незалежно від групи стиглості. Найбільш значущими амінокислотами у досліджуваних зразках є лізин, метіонін і лейцин, які відіграють ключову роль у забезпеченні росту м'язової тканини та інших процесів в організмі.

Вміст амінокислотного складу в бобах сої був дещо нижчим по деяким амінокислотам ніж у наведений роботі [26]. Ці відмінності були статистично незначними (рис 3.6).

Різниця в амінокислотному складі між соєвими сортами та взятими за для порівняння у роботі [39] показниками може бути зумовлена кількома біологічними та технологічними факторами. [7;50;55] Вона може бути пов'язана як з генетичними відмінностями самих сортів, так і з умовами вирощування, рівнем стиглості, екологічними факторами та особливостями агротехніки.

1. Генетичні фактори та селекція: Кожен сорт сої має свій генетичний профіль, який визначає особливості метаболічних шляхів синтезу білків і

амінокислот. Наприклад, такі амінокислоти, як валін та фенілаланін, мають підвищений вміст у сорті "Княжна". Це може бути результатом селекційного відбору з акцентом на збільшення вмісту білка в даному сорті. Генетична різноманітність у межах одного виду дозволяє отримати рослини з різними рівнями синтезу певних амінокислот.

2. Умови вирощування та агротехнічні практики: Значна варіація в амінокислотах, таких як лізин і глутамінова кислота, може пояснюватися різними умовами вирощування. Наприклад, такі фактори, як вологість ґрунту, доступність азоту, температура повітря та рівень інсоляції, впливають на біосинтез амінокислот у рослинах.[21, 51] У несприятливих умовах, зокрема при недостатньому рівні азоту в ґрунті, знижується вміст азотовмісних амінокислот, таких як лізин, що ми спостерігаємо в усіх досліджених сортах сої.

3. Вплив стадії стиглості та фізіологічний стан: Розбіжності можуть бути обумовлені різними стадіями стиглості соєвих бобів під час збору [31]. Наприклад, підвищений вміст валіну та фенілаланіну може бути пов'язаний із більш активними біосинтетичними процесами у середньоранніх сортах, таких як "Княжна". Сорти з іншими групами стиглості, як, наприклад, середньостиглий "Монада" чи середньопізній "Оксана", можуть мати нижчий вміст деяких амінокислот, оскільки їх білки зазнають більших змін під час дозрівання.

4. Біохімічна спеціалізація сортів: Такі амінокислоти, як глутамінова кислота та аргінін, відіграють важливу роль у синтезі білків та азотному метаболізмі рослин. Зниження рівня глутамінової кислоти у сортах "Княжна" (15,8%) та "Монада" (16,0%) може бути пов'язане з біохімічною специфікою цих сортів, які, можливо, спрямовані на збільшення інших амінокислот за рахунок зниження вмісту глутамінової кислоти.

5. Післязбиральні технології та обробка: Остаточний амінокислотний профіль соєвих білків може значно змінюватися під впливом технологій обробки після збору [19, 20]. Наприклад, такі процеси, як сушіння, можуть

впливати на розпад окремих амінокислот або їх трансформацію. Це може бути однією з причин того, чому такі амінокислоти, як лізин та метіонін, мають нижчий рівень.

Отже, великі розбіжності в амінокислотному складі, особливо лізин, глютамінова кислота, фенілаланін, зумовлені комплексною дією генетичних факторів, умов вирощування та технологій обробки. Це підкреслює важливість інтегрованого підходу до дослідження рослинних білків з урахуванням всіх етапів – від селекції до обробки продукту.

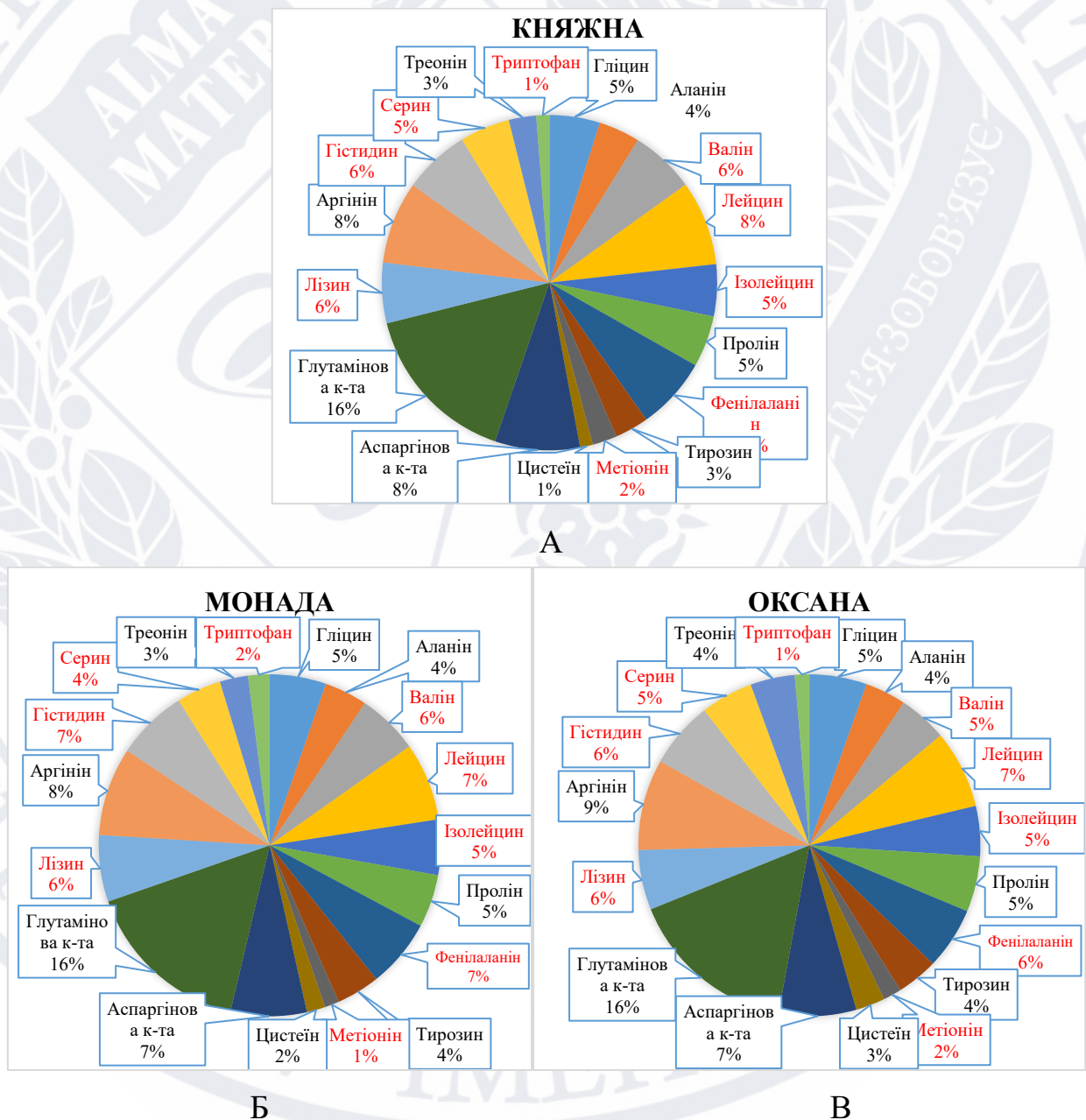


Рис. 3.6 Амінокислотний склад білків соєвих бобів. А – отримані дані Княжна, Б– отримані дані Монада В - отримані дані Оксана

Також було виявлено значні кількості гліцину, аланіну, валіну та інших амінокислот, що робить ці сорти перспективними для використання у виробництві білкових гідролізатів. Відмінності у кількості амінокислот можуть бути пов'язані з генетичними особливостями сортів та умовами вирощування.

Хімічний гідроліз білків у дослідженні амінокислотного складу не має істотних переваг перед ферментативним гідролізом, оскільки основним фактором залишається якісне збереження амінокислотного складу, особливо при виробництві вільних амінокислот у промислових масштабах. Хімічний гідроліз із застосуванням сильних кислот чи лугів може призвести до деградації окремих амінокислот, що знижує точність аналізу та ускладнює отримання достовірних результатів.

Отримані калібрувальні графіки показують значну похибку, що корелює з можливістю виникнення похибок у визначенні концентрації амінокислот у зразках. Метод ручного подрібнення соєвих бобів на ступці також виявився недостатньо точним, оскільки після подрібнення залишаються великі фракції, які ускладнюють рівномірний розподіл і впливають на результати хімічного аналізу. Це ускладнює точний розрахунок вмісту кожної амінокислоти у зразках соєвих бобів, що значно впливає на кінцеву достовірність результатів дослідження.

Крім того, для забезпечення якісного гідролізу та збереження повного складу амінокислот необхідно оптимізувати пропорції додавання кислот і лугів, аби уникнути втрат амінокислот, спричинених агресивною дією реактивів. Недосконалість цього процесу може призводити до додаткового розпаду амінокислот, особливо чутливих до впливу сильних кислот, таких як лізин. Оптимізація хімічного гідролізу потребує подальших досліджень і покращення для забезпечення мінімальної деградації амінокислотного складу і, відповідно, отримання точних і відтворюваних результатів при промисловому виробництві вільних амінокислот.

## ВИСНОВКИ

Метою цього дослідження було розробити метод хімічного гідролізу соєвих білків для отримання вільних амінокислот, зокрема лізину, а також провести детальний аналіз складу отриманих гідролізатів. У рамках поставлених завдань були досягнуті наступні результати:

Був проведений процес хімічного гідролізу білків соєвих бобів трьох сортів - Княжна, Монада і Оксана. Дослідження підтвердило, що хімічний гідроліз рослинних білків, зокрема сої, не має значних переваг перед ферментативним методом у випадках, коли потрібне збереження максимально точного амінокислотного складу. Однією з ключових проблем хімічного методу є значна похибка в отриманих даних через руйнування чутливих амінокислот під дією агресивних кислот або лугів, що використовуються в процесі. Крім того, калібрувальний графік, отриманий після гідролізу, показав наявність похибки, що впливає на точність кількісного визначення амінокислот.

Для визначення кількості амінокислот у гідролізатах було проведено спектрофотометричний аналіз. Цей метод дозволив не тільки кількісно оцінити вміст амінокислот, а й порівняти отримані показники між собою. Завдяки цьому було визначено, що метод спектрофотометрії є дієвим і точним підходом для виявлення амінокислот у складних білкових сумішах.

Результати аналізу показали, що всі три досліджувані сорти соєвих бобів мають значний вміст лізину, що робить їх перспективними для використання у виробництві харчових продуктів з високою харчовою цінністю. Найбільший вміст лізину було зафіксовано в сорті Монада - 6,0%, тоді як сорти Княжна та Оксана мали дещо нижчі показники - 5,8% та 5,7% відповідно.

Результати роботи мають практичне значення для розробки ефективних методів виробництва амінокислотних гідролізатів та оптимізації їх амінокислотного складу відповідно до потреб харчової промисловості та інших галузей застосування.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдєєва Л.Ю., Декуша Г.В. Ферментативні білкові гідролізати для спеціалізованих харчових продуктів. Наукові праці НУХТ 2020. Том 26, № 3, с197-204.DOI: [10.24263/2225-2924-2020-26-3-22](https://doi.org/10.24263/2225-2924-2020-26-3-22)
2. Азаренко, Ю.М. Актуальність удосконалення виробництва білкових гідролізатів ферментативним способом / Ю. М. Азаренко, О. О. Клименко, Н. В. Двінських // Сучасні досягнення фармацевтичної технології і біотехнології : матеріали IX Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 11-12 листоп. 2021 р. – Харків : Вид-во НФаУ, 2021. – С. 59-60.
3. Каталог соєвих бобів. Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН. URL: [http://fri.vin.ua/seeds\\_class.htm](http://fri.vin.ua/seeds_class.htm)
4. Приседський Ю.Г. Великий практикум з фізіології та біохімії рослин (біохімічні методи досліджень): навчальний посібник. Видання друге, перероблене та доповнене / Ю. Г. Приседський. Вінниця : ТВОРИ, 2022. с. 418
5. Сорочан О.О., Штеменко Н.І. Методи аналізу амінокислот: Навч.-метод. посіб. – Д.: ПВВ ДНУ, 2005. – 60 с. URL: <https://www.biochemistry-dnu.dp.ua/wp-content/downloads/metodichki/dyomshina-aminoacid-analysis-metod2005.pdf>
6. Amino Acid Analysis (AAA). Creative Proteomics. URL: <https://www.creative-proteomics.com/services/amino-acid-analysis-aaa.htm>
7. Asen ND, Aluko RE, Martynenko A, Utioh A, Bhowmik P. Yellow Field Pea Protein (*Pisum sativum* L.): Extraction Technologies, Functionalities, and Applications. Foods. 2023 Oct 30;12(21):3978. DOI: [10.3390/foods12213978](https://doi.org/10.3390/foods12213978)
8. Baianu I, Prisecaru V. Novel NIR spectroscopy correlation approach to amino acid analysis of soybean proteins for composition improvements. Nature Precedings. University of Illinois at Urbana. 2011. DOI: [http://dx.doi.org/10.1038/npre.2011.6231.1](https://doi.org/10.1038/npre.2011.6231.1)
9. Betts J.G., Young K.A., Wise J.A., Johnson E., Poe B., Kruse D. H., Korol O., Johnson J.E., Womble M., DeSaix P. OpenStax. Anatomy and

Physiology.2013 URL: <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction>

10. Chang, J.Y.; Balch, C.; Puccio, J.; Oh, H.S. A Narrative Review of Alternative Symptomatic Treatments for Herpes Simplex Virus. *Viruses* 2023, 15, 1314. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15061314>

11. Comparison of total protein, total lysine, and lysine as a percentage. URL: <https://www.gardeningplaces.com/articles/lysine-content-foods.htm>

12. Dadouch, M.; Ladner, Y.; Perrin, C. Analysis of Monoclonal Antibodies by Capillary Electrophoresis: Sample Preparation, Separation, and Detection. *Separations* 2021, 8, 4. DOI: <https://doi.org/10.3390/separations8010004>

13. Daniel Tome, Efficiency of Free Amino Acids in Supporting Muscle Protein Synthesis, *The Journal of Nutrition*, Volume 152, Issue 1, January 2022, Pages 3–4, DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/nxab370>

14. de Marco Castro E, Valli G, Buffière C, Guillet C, Mullen B, Pratt J, Horner K, Naumann-Gola S, Bader-Mittermaier S, Paganini M, De Vito G, Roche HM, Dardevet D; APPETITE Consortium. Peripheral Amino Acid Appearance Is Lower Following Plant Protein Fibre Products, Compared to Whey Protein and Fibre Ingestion, in Healthy Older Adults despite Optimised Amino Acid Profile. *Nutrients*. 2022. DOI: [10.3390/nu15010035](https://doi.org/10.3390/nu15010035)

15. Dolinska MB, Kovaleva E, Backlund P, Wingfield PT, Brooks BP, et al. Albinism-Causing Mutations in Recombinant Human Tyrosinase Alter Intrinsic Enzymatic Activity.2014. DOI: [10.1371/journal.pone.0084494](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084494)

16. Epping, R.; Koch, M. On-Site Detection of Volatile Organic Compounds (VOCs). *Molecules* 2023, 28, 1598. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28041598>

17. Estévez-Danta A., Ayala-Cabrera J. F., López-Vázquez J., Musatadi M., Montes R., Etxebarria N., Benito Quintana J., Olivares M., Prieto A., Rodil R., Miró M., Zuloaga O. Analytical methodology for unveiling human exposure to (micro)plastic additives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 173. 2024. 117653. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117653>

18. Fatufe A.A., Timmler R., Rodehutsord M. Response to lysine intake in composition of body weight gain and efficiency of lysine utilization of growing male chickens from two genotypes. *Poultry Science*, 83, 8, 2004, 1314-1324. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/83.8.1314>
19. García Arteaga, V.; Apéstegui Guardia, M.; Muranyi, I.; Eisner, P.; Schweiggert-Weisz, U. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Molecular Weight Distribution, Techno-Functional Properties and Sensory Perception of Pea Protein Isolates. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2020, 65, 102449. DOI: [10.1016/j.ifset.2020.102449](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102449)
20. Gisele M. Wagner, J.R., Bartosik, R. Drying of soybean seeds and effect on protein quality and oil extraction efficiency by extruding-expelling process. *Scientia Agricola*, 80, 2023. DOI: [10.1590/1678-992x-2022-0176](https://doi.org/10.1590/1678-992x-2022-0176)
21. Głowacka, A.; Jariene, E.; Flis-Olszewska, E.; Kiełtyka-Dadasiewicz, A. The Effect of Nitrogen and Sulphur Application on Soybean Productivity Traits in Temperate Climates Conditions. *Agronomy* 2023, 13, 780. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13030780>
22. Gorissen, S.H.M.; Crombag, J.J.R.; Senden, J.M.G.; Waterval, W.A.H.; Bierau, J.; Verdijk, L.B.; van Loon, L.J.C. Protein Content and Amino Acid Composition of Commercially Available Plant-Based Protein Isolates. *Amino Acids* 2018, 50, 1685–1695. DOI: [10.1007/s00726-018-2640-5](https://doi.org/10.1007/s00726-018-2640-5)
23. Grinias JP, Kennedy RT. Advances in and prospects of microchip liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016, DOI: [10.1016/j.trac.2015.08.002](https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.002)
24. Guedes RL, Prosdocimi F, Fernandes GR, Moura LK, Ribeiro HA, Ortega JM. Amino acids biosynthesis and nitrogen assimilation pathways: a great genomic deletion during eukaryotes evolution. *BMC Genomics*. 2011;12 Suppl 4:S2. DOI: [10.1186/1471-2164-12-S4-S2](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S4-S2)
25. Guiard, B.P.; Gotti, G. The High-Precision Liquid Chromatography with Electrochemical Detection (HPLC-ECD) for Monoamines Neurotransmitters

and Their Metabolites: A Review. *Molecules* 2024, 29, 496. DOI:<https://doi.org/10.3390/molecules29020496>

26. Guo, B., Sun, L., Jiang, S. et al. Soybean genetic resources contributing to sustainable protein production. *Theor Appl Genet* 135, 4095–4121 2022. DOI: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00122-022-04222-9>

27. Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z. et al. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J Animal Sci Biotechnol* 8, 24, 2017. DOI <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>

28. Huber LA, Zhu C, Hansen L, Kozole C, Munoz Alfonso CJ, Mark J, Moghaddam Kakhki RA, Rho Y, Kiarie E. Standardized ileal digestible amino acids and digestible energy contents in two modified soy protein concentrates and soybean meal fed to growing pigs. *Transl Anim Sci.* 2022 Jun 26;6(3):txac088. DOI: <https://doi.org/10.1093/tas/txac088>

29. INRAE CIRAD AFZ. Lysine, an amino acid. URL: <https://www.feedtables.com/content/lysine>

30. Islam, M., Huang, M., Islam, M.S., Fan, B. (2022). Influence of the Degree of Hydrolysis on Functional Properties and Antioxidant Activity of Enzymatic Soybean Protein Hydrolysates. *Molecules*, 27(18), 6110. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27186110>

31. Kambhampati S, Aznar-Moreno JA, Bailey SR, Arp JJ, Chu KL, Bilyeu KD, Durrett TP, Allen DK. Temporal changes in metabolism late in seed development affect biomass composition. *Plant Physiol.* 2021 Jun 11;186(2):874-890. DOI: [10.1093/plphys/kiab116](https://doi.org/10.1093/plphys/kiab116)

32. Kohli, V., Singha, S. Protein digestibility of soybean: how processing affects seed structure, protein and non-protein components. *Discov Food* 4, 7 (2024). <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00076-w>

33. Kudelka, W.; Kowalska, M.; Popis, M. Quality of Soybean Products in Terms of Essential Amino Acids Composition. *Molecules* 2021, 26, 5071. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26165071>

34. Kumar P, Sharma N, Ahmed MA, Verma AK, Umaraw P, Mehta N, Abubakar AA, Hayat MN, Kaka U, Lee SJ, Sazili AQ. Technological interventions in improving the functionality of proteins during processing of meat analogs. *Front Nutr.* 2022 Dec 19;9:1044024. DOI: [10.3389/fnut.2022.1044024](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1044024)
35. Kurant, V., & Khomenchuk, V. (2019). THE INFLUENCE OF IONS OF MAGANESE, ZINC, COPPER AND LEAD ON THE CONTENT OF FREE AMINO ACIDS IN THE ORGANISM OF CARP. *Scientific Issue Ternopil Volodymyr Hnatiuk National Pedagogical University. Series: Biology*, 75(1), 28-42. DOI: [10.25128/2078-2357.19.1.4](https://doi.org/10.25128/2078-2357.19.1.4)
36. Lee LM, Lin ZQ, Zheng LX, Tu YF, So YH, Zheng XH, Feng TJ, Wang XY, Wong WT, Leung YC. Lysine Deprivation Suppresses Adipogenesis in 3T3-L1 Cells: A Transcriptome Analysis. *Int J Mol Sci.* 2023 May 28;24(11):9402. DOI: [10.3390/ijms24119402](https://doi.org/10.3390/ijms24119402)
37. Lei Y, Chen Y, Wang S, Lin Z, Han P, Tian D, Wang H, Liu M. L-lysine supplementation attenuates experimental autoimmune hepatitis in a chronic murine model. *Exp Anim.* 2024 Feb 14;73(1):83-92. DOI: [10.1538/expanim.23-0053](https://doi.org/10.1538/expanim.23-0053)
38. Lopez MJ, Mohiuddin SS. *Biochemistry, Essential Amino Acids*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
39. MacDonald A, Singh RH, Rocha JC, van Spronsen FJ. Optimising amino acid absorption: essential to improve nitrogen balance and metabolic control in phenylketonuria. *Nutr Res Rev.* 2019 Jun;32(1):70-78. DOI: [10.1017/S0954422418000173](https://doi.org/10.1017/S0954422418000173)
40. Measuring Beyond the Bushel. United Soybean Board. 2019. URL: <https://unit-edsoybean.org/article/measuring-beyond-the-bushel-1/>
41. Miao X, Niu H, Sun M, Li D, Hua M, Wang J, Su Y. Structural Characterization and Properties of Modified Soybean Meal Protein via Solid-State Fermentation by *Bacillus subtilis*. *Molecules.* 2023 [8;28\(24\):8015](https://doi.org/10.3390/molecules28248015). DOI: [10.3390/molecules28248015](https://doi.org/10.3390/molecules28248015)

42. Michelle E G Weijzen, Rob J J van Gassel, Imre W K Kouw, Jorn Trommelen, Stefan H M Gorissen, Janneau van Kranenburg, Joy P B Goessens, Marcel C G van de Poll, Lex B Verdijk, Luc J C van Loon, Ingestion of Free Amino Acids Compared with an Equivalent Amount of Intact Protein Results in More Rapid Amino Acid Absorption and Greater Postprandial Plasma Amino Acid Availability Without Affecting Muscle Protein Synthesis Rates in Young Adults in a Double-Blind Randomized Trial, *The Journal of Nutrition*, 152, 1, 2022, Pages 59–67, DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/nxab305>

43. Papavasileiou K., Tsiasioti A., Tzanavaras P.D., Zacharis C.K. HPLC Determination of Colistin in Human Urine Using Alkaline Mobile Phase Combined with Post-Column Derivatization: Validation Using Accuracy Profiles. *Molecules*. 2022 May 28;27(11):3489. DOI: [10.3390/molecules27113489](https://doi.org/10.3390/molecules27113489)

44. Piraud, M., Vianey-Saban, C., Petritis, K., Elfakir, C., Steghens, J. P., Morla, A., & Bouchu, D. (2003). ESI-MS/MS analysis of underivatized amino acids: a new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism. Fragmentation study of 79 molecules of biological interest in positive and negative mode. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(12), 1297-1311. DOI: [10.1002/rcm.1054](https://doi.org/10.1002/rcm.1054)

45. Prieto-Blanco, M. C., Planas-Franco, A., Muniategui-Lorenzo, S., & González-Castro, M. J. (2023). Mixed-mode chromatography of mixed functionalized analytes as the homologues of benzalkonium chloride. Application to pharmaceutical formulations. *Talanta*, 2023, 255. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124228>

46. Qiu S, Cai Y, Yao H, Lin C, Xie Y, Tang S, Zhang A. Small molecule metabolites: discovery of biomarkers and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Mar 20;8(1):132. DOI: [10.1038/s41392-023-01399-3](https://doi.org/10.1038/s41392-023-01399-3)

47. Raquel Sousa, Reto Portmann, Sébastien Dubois, Isidra Recio, Lotti Egger, Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model, *Food Research International*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108996>

48. Rokaitė R, Čibirkaitė A, Zeleckytė V, Lazdinytė G, Dženkaitis M. A Lithuanian Case of Tyrosinemia Type 1 with a Literature Review: A Rare Cause of Acute Liver Failure in Childhood. *Medicina (Kaunas)*. 2024 Jan 11;60(1):135. DOI: [10.3390/medicina60010135](https://doi.org/10.3390/medicina60010135)
49. Rose, A.J. Amino Acid Nutrition and Metabolism in Health and Disease. *Nutrients* 2019, 11, 2623. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11112623>
50. Singer W.M., Zhang B. Mian R. Huang H. Soybean Amino Acids in Health, Genetics, and Evaluation. *Soybean for Human Consumption and Animal Feed* DOI: [10.5772/intechopen.89497](https://doi.org/10.5772/intechopen.89497)
51. Sobko, O.; Stahl, A.; Hahn, V.; Zikeli, S.; Claupein, W.; Gruber, S. Environmental Effects on Soybean (*Glycine Max (L.) Merr*) Production in Central and South Germany. *Agronomy* 2020, 10, 1847. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10121847>
52. Sonker M, Sahore V, Woolley AT. Recent advances in microfluidic sample preparation and separation techniques for molecular biomarker analysis: A critical review. *Anal Chim Acta*. 2017 Sep 15;986:1-11. DOI: [10.1016/j.aca.2017.07.043](https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.043)
53. Sun, W.; Shahrajabian, M.H.; Kuang, Y.; Wang, N. Amino Acids Biostimulants and Protein Hydrolysates in Agricultural Sciences. *Plants* 2024, 13, 210. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants13020210>
54. Svarchevska O.Z. , Shved O., Ohorodnyk N.Z., Gubrii Z. V., Butsyak V. I. Influence of limiting amino acids on certain biochemical indicators in animals *CTAS*. 2020; 93-101. DOI: <https://doi.org/10.23939/ctas2020.02.093>
55. Van den Berg, L.A., Mes, J.J., Mensink, M., Wanders, A.J. Protein Quality of Soy and the Effect of Processing: A Quantitative Review. *Front. Nutr.* 2022, 9, 2148 DOI: [10.3389/fnut.2022.100475](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.100475)
56. Wang X, Fan B, Li Y, Fei C, Xiong Y, Li L, Liu Y, Tong L, Huang Y, Wang F. Effect of Germination on the Digestion of Legume Proteins. *Foods*. 2024; 13(17):2655. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13172655>

57. Yang QQ, Suen PK, Zhang CQ, Mak WS, Gu MH, Liu QQ, Sun SS. Improved growth performance, food efficiency, and lysine availability in growing rats fed with lysine-biofortified rice. *Sci Rep.* 2017 May 2;7(1):1389. DOI: [10.1038/s41598-017-01555-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-01555-0)
58. Zuñiga Vinueza AM. Recent Advances in Phenylketonuria: A Review. *Cureus.* 2023 Jun 15;15(6):e40459. DOI: [10.7759/cureus.40459](https://doi.org/10.7759/cureus.40459).