

УДК 663.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОЛИМЕРЫ СОКОВ МЕТОДОМ ПЛАНАРНОЙ ГЕЛЬПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Мартазанова Р.М., Султыгова З.Х., Саламов А.Х., Темирханов Б.А.

ФГБОУ ВПО «Ингушский государственный университет», Назрань, e-mail: бага@inbox.ru

Разработаны мультимензимные системы для плодово-ягодного сырья (свежие яблоки, черная смородина и слива) и условия их ферментативной обработки. Оценена эффективность воздействия ферментов на высокомолекулярные полимеры соков методом планарной гельпроникающей хроматографии (ППХ). Установлена прямая зависимость скорости миграции веществ от угла наклона камеры. Выявлены закономерности при определении скорости миграции стандартных белков, что позволило рекомендовать для хроматографирования сефадексы с большой степенью сшивки G-50 и G-75. При этом угол наклона камеры составляет от 12 до 15°. Показано, что наклон 15° позволяет проводить разделение белков на сефадексе G-75 с молекулярной массой до 80 000. С использованием ППХ был изучен состав белковых и полисахаридных фракций плодовых соков, анализ которого позволяет сделать вывод о необходимости подбора ферментов протеолитического и гемицеллюлазного действия.

Ключевые слова: хроматография, биокатализ, плодово-ягодное сырье

INVESTIGATION ON THE INFLUENCE OF ENZYMATIC HIGH POLYMERS JUICE AND WINE BY GEL PERMEATION CHROMATOGRAPHY PLANAR

Martazanova R.M., Sultygova Z.K., Salamov A.K., Temirkhanov B.A.

FGBOU VPO «Ingush State University», Nazran, e-mail: бага@inbox.ru

Multimenzimnye developed systems for fruit and berries (fresh apples, black currant and plum) and conditions of enzymatic treatment. The efficiency effects of enzymes on polymers vysokomolekulnye juices planar method of gel permeation chromatography. A direct dependence of the rate of migration of substances from the camera angle. The regularities in determining the rate of migration of standard proteins, which allowed to recommend for Sephadex chromatography with a high degree of cross-linking G-50 and G-75. The angle of inclination of the chamber is from 12 to 15°. The slope 15° allows the separation of proteins on safadekse G-75c molekulyaronyy weight up to 80 000. Using planar gel permeation chromatography has been studied the composition of protein and polysaccharide fractions of fruit juice, the analysis of which leads to the conclusion about the necessity of selection of proteolytic enzymes and hemicellulase activities.

Keywords: chromatography, biocatalysis, fruit and berry raw materials

В плодовом виноделии одним из важных аспектов является наличие в составе сырья высокомолекулярных полимеров, таких как протопектин, гемицеллюлоза, а также белковые и фенольные вещества [1, с. 76; 2, с. 5–9]. С одной стороны, они участвуют в формировании вкуса и аромата продукции, с другой, являются источниками помутнений. Переход этих веществ и их комплексов в соки и виноматериалы определяет не только качество виноматериалов, но и стабильность готовых изделий при хранении [5, с. 25].

Материалы и методы исследования

Целью настоящей работы явилось применение метода планарной гельпроникающей хроматографии (ППХ) в исследовании полимолекулярных соединений и их комплексов в процессе ферментативной обработки плодово-ягодного сырья.

В качестве объекта исследования выбраны соки из яблочного, сливового и черносмородинового сырья.

Исследуемые соки концентрировали упариванием на роторном испарителе ИП-1М2 при 35°C в 10 раз. Остаток хроматографировали на сефадексе G-25 для удаления низкомолекулярной фракции. Полученный элюат снова концентрировали на роторном испарителе при тех же условиях.

Биополимеры (белки и полисахариды) удаляли осаждением, действуя последовательно хлорными и вольфрамовыми кислотами с последующим центрифугированием.

Для планарной гельпроникающей хроматографии использовали стеклянные пластины с размером 100×120 мм.

Для нанесения гелевой суспензии на пластину применяли простое размазывающее устройство в виде стеклянного стержня с диаметром 10 мм. По краям пластины закреплена липкая лента, толщина которой не превышает 0,5 мм. После всех приготовлений камера устанавливалась на нужный угол для проведения опыта. При нанесении образцов биополимеров камера находилась в горизонтальном положении.

Образцы, содержащие не более 100 мкг исследуемого вещества в объеме 1–3 мкл, наносили на стартовую линию капилляром в виде капли, не прикасаясь к поверхности, во избежание повреждения слоя. Устанавливали камеру с пластинами на определенный угол и выдерживали в течение 1–3 часов. Поскольку при элюировании фронт растворителя неразличим, скорость движения растворителя определяли с помощью соединений с заранее известной массой – маркеров. Для этой цели использовали окрашенные белки природного происхождения, например гемоглобин, цитохром С. В зависимости от скорости движения маркеров регулировали угол наклона камеры, задавая тем самым скорость движения элюента.

Для обнаружения веществ в тонком слое использовалась методика [4, с. 54].

После детектирования путь миграции для неизвестных веществ рассчитывали относительно пути миграции стандартных веществ – маркеров – и наносили на диаграмму против их молекулярных масс или, что удобнее, их десятичного логарифма (lg). Молекулярную массу можно тогда легко вычислить по таблице антилогарифмов.

Для выбора оптимального угла наклона и проведения дальнейших экспериментов в условиях наиболее эффективного разделения и определения молекулярных масс исследуемых объектов нами в условиях планарной гелепроникающей хроматографии со стандартными белками были проведены следующие экспериментальные изыскания. Оптимальным углом наклона оказался угол от 10 до 20°, при котором вещества, мигрирующие в так называемом «свободном объеме», имеют скорость 1–5 см/ч.

Для проведения анализа были использованы сефадексы марки: G-50, G-75, G-100, G-150 и G-200 «Суперфайн» при разных углах наклона камеры.

Величину молекулярных масс (ММ) определяли по стандартным белкам в качестве которых применяли: инсулин (цепь В) – ММ 5800; рубониклеазу – ММ 13700; химотрипсин – ММ 25000; трипсин – ММ 25500, овальбумин – ММ 45000; бычий сывороточный альбумин – ММ 67000. Элюирующими системами были: фосфатный буфер (рН 8,0), раствор хлорида натрия и вода.

Результаты исследования и их обсуждение

Была установлена прямая зависимость скорости миграции веществ от угла наклона камеры. Оценку эффективности воздействия ферментов и на высокомолекулярные поли-

меры соков и виноматериалов осуществляли подобранным нами методом планарной гелепроникающей хроматографии.

Чем больше был угол наклона, тем быстрее мигрировали вещества на пластине.

Ранее было установлено [3, с. 107], что при одинаковом угле наклона скорость на слабо сшитых сефадексах, таких как G-100 и G-200 – «Суперфайн», меньше, чем на сефадексах с более высокой степенью сшивки, таких как G-50 и G-75».

При работе на сефадексе G-200 скорость веществ, мигрирующих со «свободным объемом» (т.е. не проникающих в гранулы геля), не должна превышать 2см/ч; на гелях сефадекса с высокой степенью сшивки скорость может быть несколько больше. Указать заранее оптимальный угол наклона для данного типа геля невозможно, поскольку он зависит от многих факторов, например от свойств партии геля и консистенции суспензии. Пробег для веществ, мигрирующих со «свободным объемом», должен составлять не менее 15 см, при большем пробеге (до 30–40 см) наблюдается лучшее разрешение и вместе с тем не происходит заметного размывания зон [4, с. 17].

В табл. 1 представлены данные миграции образцов, полученные при оптимизации угла наклона на примере сефадекса G-75.

Аналогично были проведены исследования для сефадексов G-100, G-150, G-200, полученные результаты сведены в табл. 2 и 3.

Таблица 1

Характеристика миграции белковых метчиков при оптимизации угла наклона (сефадекс G-75, рН = 8,0, время элюирования 90 мин)

Длина пробега белков, миллиметры						
Угол наклона	Инсулин	Рибонуклеаза	Химотрипсин	Трипсин	Овальбумин	Бычий сывороточный альбумин
10°	42,3	61	75	77	91	104,5
12°	49	68	84	84	99	109
15°	53	71	88	88	103,5	114
18°	56	75,5	92	91	108	120
20°	60	81	103	104	120	140

Таблица 2

Характеристика миграции белковых метчиков при оптимизации угла наклона (сефадекс G-100, рН = 8,0, время элюирования 150 мин)

Длина пробега белков, миллиметры						
Угол наклона	Инсулин	Рибонуклеаза	Химотрипсин	Трипсин	Овальбумин	Бычий сывороточный альбумин
10°	33	50	63	64	78	85
12°	37,5	51	66,5	67	81	91
15°	42	58	71,5	72	86	96
18°	46	43,5	76	76	90	101
20°	52	69	83	84	97	108

Таблица 3

Характеристика миграции белковых метчиков при оптимизации угла наклона (сефадекс G-200, pH = 8,0, время элюирования 180 мин)

Длина пробега белков, миллиметры						
Угол наклона	Инсулин	Рибонуклеаза	Химотрипсин	Трипсин	Овальбумин	Бычий сывороточный альбумин
10°	27	34	42	43	49	55
12°	31	41	48	49	56	82
15°	35	45	54	53	61	67
18°	40	50	59	60	67	73
20°	46	57	66	67	75	85

Выявленные закономерности при определении скорости миграции стандартных белков позволяют рекомендовать для сефадексов с большей степенью сшивки: G-50, G-75 углы наклона камеры от 12 до 15°, даже наклон 15° позволяет проводить разделения на сефадексе G-75 белков с ММ до 80000; дальнейшее увеличение угла наклона нецелесообразно, так как приводит к уменьшению разрешающей способности, особенно высокомолекулярных биополимерных фракций. Для сефадексов с меньшей степе-

ню сшивки G-100 и G-200 рекомендуется применять угол наклона камеры не меньше 15°, так как определяемые на этих сефадексах биополимеры имеют ММ > 6000; уменьшение скорости разделения приводит к значительному увеличению длительности анализа (до 5 часов), что не соответствует технологическим задачам метода.

На основании полученных данных для сефадексов G-75 и G-100 был выбран угол наклона камеры 15°, для сефадексов G-150 и G-200 – угол наклона 20°.

Таблица 4

Средняя скорость миграции стандартных белков с разной ММ в зависимости от марки сефадекса в оптимальных условиях (угол наклона)

Марки геля	G-75	G-100	G-150	G-200
Угол наклона	$\alpha = 15^\circ$	$\alpha = 15^\circ$	$\alpha = 20^\circ$	$\alpha = 20^\circ$
ММ белка	Средняя скорость миграции, см/ч			
5800	2,0	1,8	1,5	1,1
13700	3,0	2,6	2,4	1,9
25000	3,5	3,1	2,8	2,3
25500	3,5	3,1	2,8	2,3
45000	3,6	3,7	3,4	2,9
67000	4,2	4,3	4,0	3,4

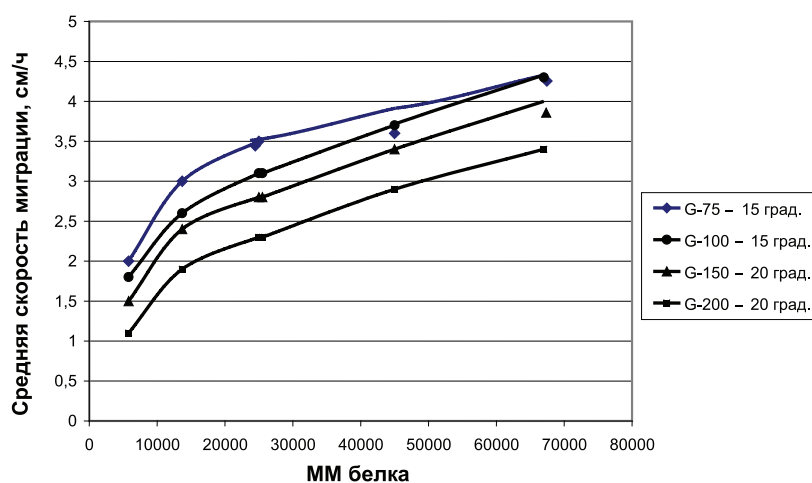


Рис. 1. Калибровочный график для определения молекулярных масс белковых фракций

Средняя скорость миграции стандартных белков с разной молекулярной массой в зависимости от марки сефадекса в оптимальных условиях (угол наклона) представлена в табл. 4.

На основании данных табл. 4 был построен калибровочный график (рис. 1), который в дальнейшем использовали для определения молекулярных масс белковых фракций соков (до и после осветления).

Аналогично строится калибровочный график для определения молекулярных масс обнаруженных фракций полисахаридов (рис. 2).

Выводы

Полученные результаты указывают на некоторую эффективность использования метода осветления плодово-ягодного сока путем проведения сульфитации и флокуляции. Однако данный метод обладает определенными недостатками: токсичность сернистого ангидрида; образующие сернистым ангидридом с углеводами бисульфитные производные белково-полисахаридных комплексов способствуют их агрегации и выпадению в осадок, но при этом оставшиеся белковые фракции могут приводить

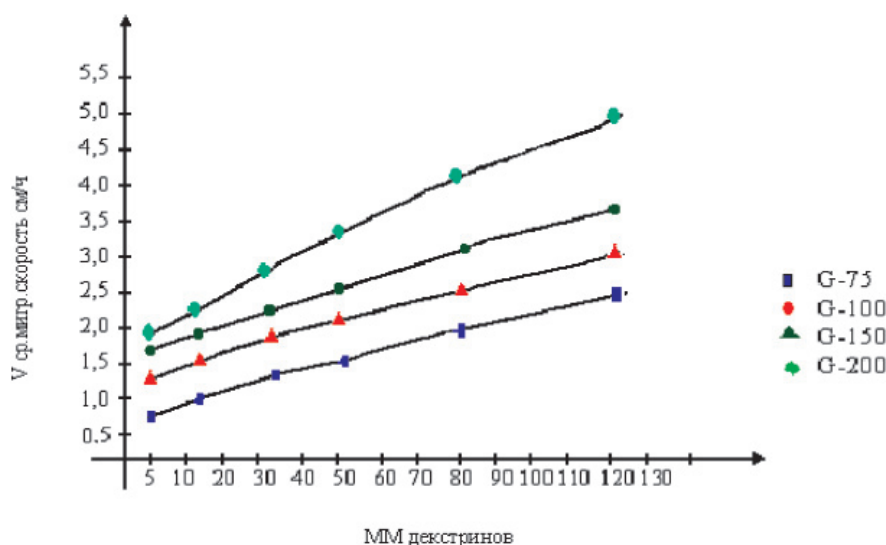


Рис. 2. Калибровочный график для определения молекулярных масс полисахаридных фракций

Таблица 5

Средняя скорость миграции стандартных декстринов с разной ММ в зависимости от марки сефадекса в оптимальных условиях (угол наклона)

Марки геля	G-75	G-100	G-150	G-200
Угол наклона	$\alpha = 15^\circ$	$\alpha = 15^\circ$	$\alpha = 20^\circ$	$\alpha = 20^\circ$
ММ декстринов	Средняя скорость миграции, см/ч			
800	1,8	1,5	1,3	0,8
16000	2,3	1,8	1,5	1,0
35000	2,8	2,3	1,8	1,4
51000	3,5	2,6	2,1	1,7
80000	4,3	3,3	2,5	2,1
120000	5,2	4,0	3,0	2,8

В качестве метчиков использовали декстрины с фиксированными ММ в интервале от 800 до 120000 (табл. 5).

к образованию в дальнейшем коллоидных полимеров и вызывать повторное помутнение вина и виноматериалов.

Разработанный метод планарной гелепроникающей хроматографии дает возможность объективно оценить воздействие сульфитации, флокулянтов и ферментативных систем на белково-полисахаридные соединения, научно обосновать и экспериментально подтвердить эффективность подобранного комплекса ферментов.

Список литературы

1. Джарулаев Д.С. Предотвращение окисления яблочного сока // Пиво и напитки. – 2002. – № 2. – С. 76.
2. Кожухова М.А., Теркун А.Н., Рожков С.Е. Биотехнологические методы в производстве плодовоовощных соков и нектаров // Известия вузов. Пищевая технология. – 2003. – № 4.
3. Мартазанова Р.М.. Разработка технологии плодовых вин на основе ферментативного катализа полимеров плодово-ягодного сырья: дис. ... канд. техн. наук. – М., 2009.
4. Султыгова З.Х. Бекбузаров М.Б. особенности биокатализа белковых полимеров соков и вин под действием

комплекса ферментов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. – № 11.

5. Султыгова З.Х. Новые физико-химические особенности процессов протекающих в растворах при производстве вин: дис. ... д-ра техн. наук. – Уфа, 2004.

References

1. Dzharulaev D.S. Predotvrashhenie okisleniya jablochnogo soka // Pivo i napitki. 2002. no. 2. pp. 76.
2. Kozhuhova M.A., Terkun A.N., Rozhkov S.E. Biotehnologicheskie metody v proizvodstve plodovoovoshnyh sokov i nektarov // Izvestija vuzov. Pishhevaja tehnologija. 2003. no. 4.
3. Martazanova R.M.. Razrabotka tehnologii plodovyh vin na osnove fermentativnogo kataliza polimerov plodovo-jagodnogo syr ja: dis. ... kand. tehn. nauk. M., 2009.
4. Sultygova Z.H. Bekbuzarov M.B. osobennosti biokataliza belkovykh polimerov sokov i vin pod dejstviem kompleksa fermentov // Hranenie i pererabotka sel hozsyr ja. 2007. no. 11.
5. Sultygova Z.H. Novye fiziko-himicheskie osobennosti processov protekajushhijh v rastvorah pri proizvodstve vin: dis. ... d-ra tehn. nauk. Ufa, 2004.