

ГЛЮКУРОНОКСИЛАНЫ НЕТРАДИЦИОННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ

Килименчук Е.А., канд. техн. наук, доцент, Величко Т.А., канд. техн. наук, доцент
Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

В статье приведены результаты исследования биополимеров нетрадиционных растительных отходов (стеблей хмеля, клещевины, обрезков фруктовых деревьев), которые играют существенную роль при биотехнологической переработке сырья.

The article presents the research results of biopolymers unconventional vegetable waste (stalks of hops, castor-oil plant, cuttings of fruit trees), which play an essential role in the biotechnological processing of raw materials.

Ключевые слова: биополимеры, растительное сырье, глюкуронооксиланы, обрезки фруктовых деревьев, стебли хмеля, клещевины, экстракция, гидролиз, окисление.

В биотехнологических производствах источником питательных веществ для культивирования микроорганизмов после определенной подготовки служит, преимущественно, растительное сырье, а вернее – отходы растительного сырья: подсолнечная лузга, коробочки хлопчатника, кукурузные кочерыжки, гузая, древесные опилки, солома, ряд других источников и исследованные нами стебли хмеля (СХ), стебли клещевины (СК), обрезки фруктовых деревьев (ОФД).

Анализ существующих научно-практических подходов к исследованию растительного сырья как объекта биотехнологической переработки позволяет сделать вывод об особом месте биополимеров, которые играют ключевую роль при переработке его на кормовые, пищевые, функциональные добавки и различные химические вещества.

Вопросы рациональной, комплексной переработки того или иного вида растительного сырья и определение потенциальной возможности получения целевых продуктов из него можно квалифицированно решать только с учетом особенностей его технологических свойств и химического состава.

Целью данной работы стало – доказать целесообразность использования стеблей хмеля, клещевины и обрезки фруктовых деревьев для дальнейшей биотехнологической переработки. Поэтому первоочередной задачей было изучить технологические свойства, химический и биополимерный состав этих отходов.

В данной статье представлены результаты исследования биополимерного состава нетрадиционных растительных отходов сельского хозяйства, поскольку технологические свойства и химический состав были опубликованы ранее [1, 2] и подтвердили, что исследуемые растительные отходы в целом и их отдельные анатомические части характеризуются высоким содержанием полисахаридов, экстрактивных веществ, что позволяет использовать их в качестве сырья для получения питательных субстратов.

Выделение и очистка индивидуальных полисахаридов из растительных тканей – процесс сложный и трудоемкий. Объясняется это тем, что полисахариды прочно связаны друг с другом и другими высокомолекулярными компонентами растительной ткани, кроме того, гемицеллюлозы легко окисляются, подвергаются деполимеризации и ферментации [3]. При выделении полисахаридов методом экстракции обычно получают экстракт, содержащий их смесь или фракции с преобладающим содержанием одного из них. Разделить такую смесь на отдельные полисахариды сложно, и связано с большими трудностями, так как их молекулы обладают сходными химическими свойствами и имеют близкие по значению молекулярные массы.

Методы выделения полисахаридов чрезвычайно разнообразны и варьируют в зависимости от вида исходного сырья. Каждый из них имеет свои достоинства и недостатки. Выбор того или иного метода является ключевым при установлении строения полисахаридов. Любой из методов сводится к решению трех основных задач: 1) отделение низкомолекулярных веществ; 2) отделение полимеров неуглеводной природы (белки, лигнин и др.); 3) разделение смеси на индивидуальные полисахариды [4].

Рационально выбранная схема выделения уже в процессе экстрагирования даёт возможность расфракционировать те либо иные полисахариды и получить ряд фракций, во многих отношениях отличающихся друг от друга.

Выделение полисахаридов из анатомических частей сырья проводили методом последовательной экстракции различными растворителями. Условия выделения и экстрагент выбирались, исходя из данных химического состава анатомических частей. Экстракцию вели по схеме, приведенной на рис. 1. Чистоту выделенных полисахаридов проверяли по постоянству соотношения компонентов после многократного их

пересадження. Применение в качестве экстрагентов воды, растворов соляной кислоты, щелочи и спиртового раствора азотной кислоты позволяло последовательно создавать условия для перехода в раствор отдельных полисахаридов. Варьируя концентрацию и природу экстрагента, добивались избирательного извлечения определенного полисахарида. Наличие крахмала в образцах доказали: положительная реакция с йодом, высокая степень атакемости α -амилазой и специфика УФ-спектра его йодного комплекса.

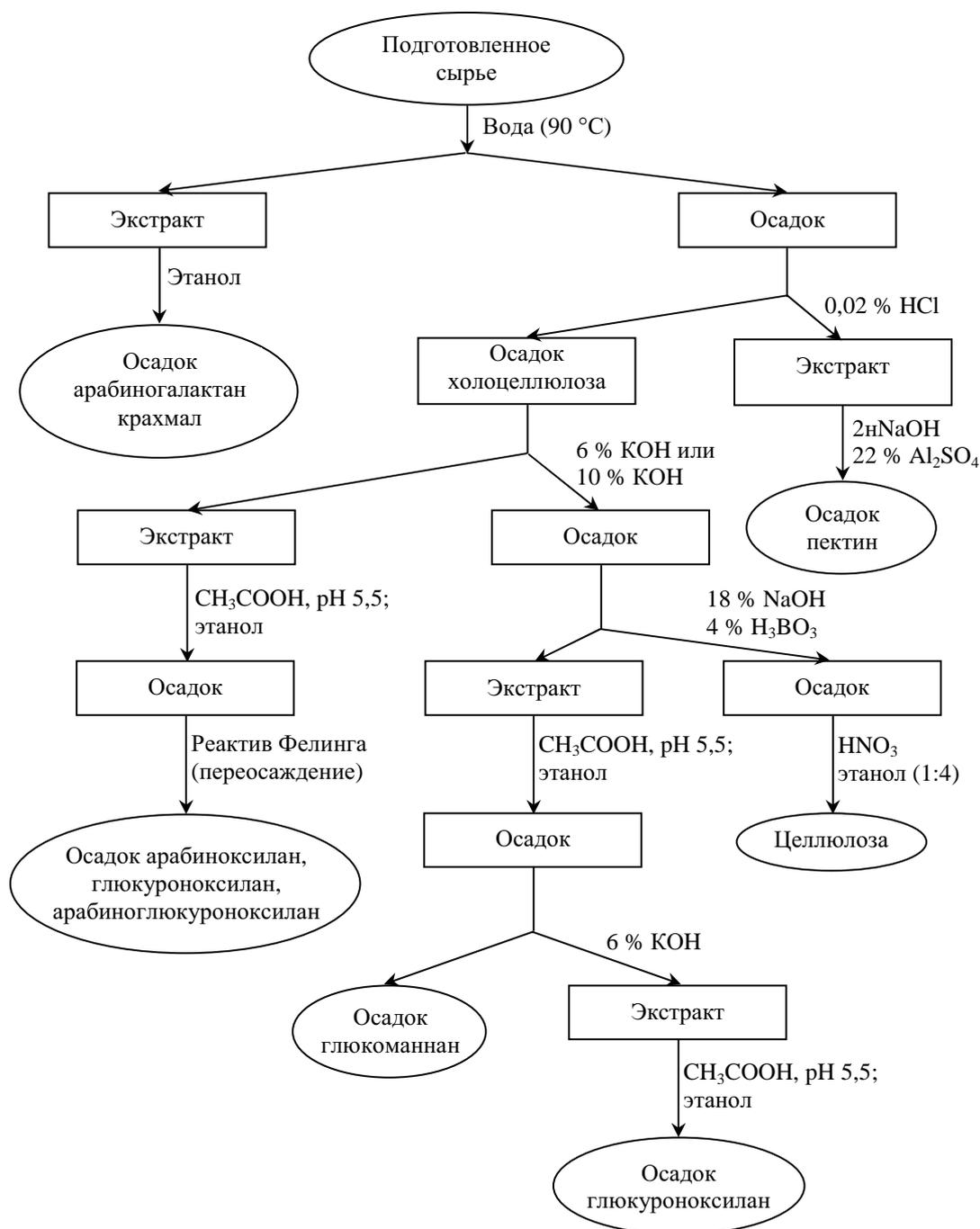


Рис. 1 – Схема выделения полисахаридов анатомических частей сырья

Основывались на том, что растворимость полисахаридов различного химического состава в натриевой и калиевой щелочи неодинакова, например, в гидроксиде калия более легко растворимы глюкуроноксиланы, а в гидроксиде натрия лучше глюкоманнаны, причем в присутствии борной кислоты растворимость усиливается [5]. Последовательное применение КОН и NaOH позволило нам отделить глюкуроноксилан от глюкоманнана.

Учитывая, что при использовании щелочных растворов в качестве экстрагентов может происходить омыление сложноэфирных группировок полисахаридов, отщепление ацетильных групп и снижение молекулярной массы полимера вследствие его возможной деструкции по редуцирующим сахарам, экстракцию полисахаридов щелочными растворами вели при комнатной температуре в атмосфере азота. В процессе фракционирования сырья учитывали специфику углеводного состава полисахаридов.

Таким образом, используя комплекс методов фракционирования с учетом специфики строения индивидуальных полисахаридов, нам удалось выделить полимеры углеводов с максимально сохранившимися в них межмолекулярными связями, по своему составу и свойствам, приближающимся к нативным свойствам сырья.

Строение, свойства полисахаридов растительного сырья зависят от ботанических, морфологических и анатомических особенностей, формирующих его ткань. В связи с этим целесообразно изучить строение полисахаридов ОФД, СХ и СК в отдельных анатомических частях.

Для установления строения полисахаридов были выбраны фракции, выделенные раствором КОН, массовой долей 10 %. Далее, пересажая суммарные препараты через медный комплекс, фракционируя цетавлоном, получили полисахариды, гомогенные в условиях: хроматографирования на ДЭАЭ-целлюлозе; гель-фильтрации на сефадексах G-75 и G-100 и электрофореза в боратном буфере (рис. 2).

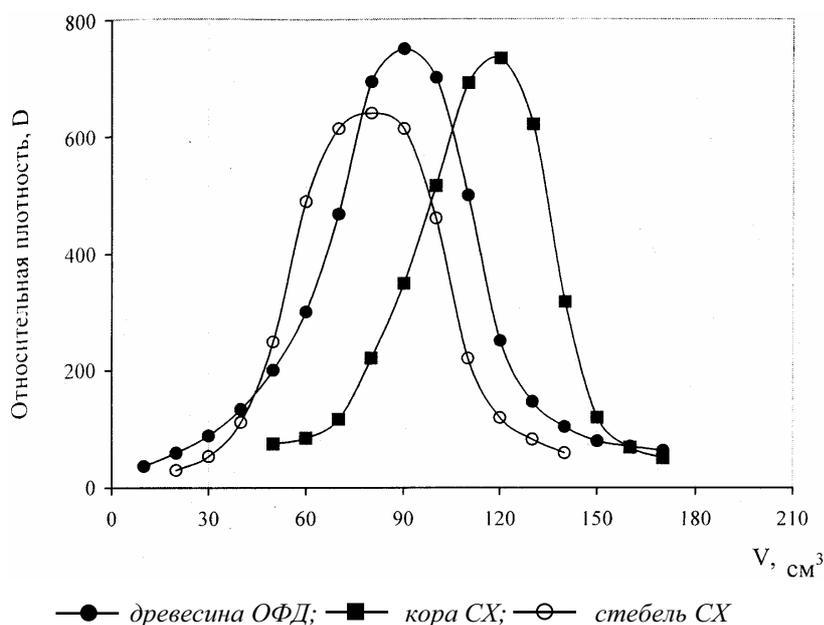


Рис. 2 – Выходные кривые гель-фильтрации на сефадексе G-100

Хроматографический анализ гидролизатов фракций показал, что в них содержатся ксилоза, уроновые кислоты в соотношении: древесина ОФД – 5:1; кора СХ – 7,5:1; стебель СХ – 9:1 соответственно и позволил сделать заключение, что выделенные полисахариды – глюкуронозиланы (см. табл. 1).

Таблица 1 – Характеристика глюкуронозиланов анатомических частей ОФД, СХ

Глюкуронозилан	Содержание полисахарида, %	Зола, %	[α] _D ²⁰	Степень полимеризации (СП)	Молярные соотношения	
					ксилоза	уроновые кислоты
Древесины ОФД	99,10	0,19	- 72,80	146	82,75	17,25
Коры СХ	98,75	0,34	- 84,35	112	88,20	11,80
Стебля СХ	99,25	0,15	- 80,10	154	90,12	9,80

Данные таблицы свидетельствуют о высокой массовой доле полисахаридов в выделенных препаратах: 98,75 % – в коре СХ; 99,10 % – в древесине ОФД; 99,25 % – в стебле СХ. Количественной характеристикой гидролизатов полисахаридов методом хроматографии установлено, что основными их структурными компонентами являются D-ксилоза и уроновые кислоты в тех же соотношениях, что и во фракциях гель-хроматографии. Гехроматографией уроновых кислот обнаружено присутствие D-глюкуроновой и 4-О-метил-D-глюкуроновой кислот. Следовательно, выделенные полисахариды являются глюкуронозиланами, которые отличаются между собой как степенью полимеризации, так и соотношением ксилозы и уроновых кислот.

Анализ литературных данных по характеристике ксиланов свидетельствует, что по мономерному составу исследуемые полисахариды аналогичны ксиланам, выделенным из древесины лиственных пород деревьев, например из березы [6], вяза [7], липы [8], по молекулярной массе аналогичны 4-О-метил-глюкуроноксианам, выделенным из бука [9], стебля джута [10], кукурузной кочерыжки [11], подсолнечной лозги [10], виноградной лозы [11].

Выделенные глюкуроноксианы анатомических частей ОФД, СХ оптически активны. Отрицательное удельное вращение их растворов указывает на преобладание β -конфигурации большинства гликозидных связей в макромолекулах. Поскольку основным продуктом гидролиза идентифицированных глюкуроноксианов является D-ксилоза, очевидно она и образовала основную цепь. Дальнейшее исследование было направлено на установление состава основных и боковых цепей, и характера связи между моносахаридными остатками макромолекулы.

Для установления состава основной и боковых цепей был проведен гидролиз ксиланов в мягких условиях, при котором расщепляются только более слабые связи боковых цепей, основная же цепь при этом не затрагивается. В этих условиях от молекул ксиланов отщепится D-ксилоза и уроновые кислоты, что подтверждает построение основной цепи из ксилопиранозных остатков, а в боковых ответвлениях находятся D-ксилоза и уроновые кислоты. Для установления характера связи и наличия точек ветвления в полисахаридах нами было проведено метилирование, периодатное окисление, распад по Смитту.

В результате окисления NaJO_4 количество выделившейся HCOOH составило для ксилана древесины ОФД – 27 молей на молекулу полисахарида (при СП = 146), коры – 19 (СП = 112), стебля СХ – 24,6 (СП = 154), что соответствует степени ветвления 25, 17 и 22 соответственно.

Полностью окисленный ксилан восстанавливали боргидридом натрия (NaBH_4) и подвергали гидролизу. Среди продуктов распада разделенных ГЖХ идентифицированы глицерин, ксилоза и 2-О- β -D-ксилопиранозил глицерин.

Образование глицерина возможно только при наличии 1 \rightarrow 4 связи между углеродными атомами остатков ксилопираноз.

Окончательное заключение о строении глюкуроноксианов атомических частей сырья было сделано на основании полного метилирования по Хакомори [12]. Полностью метилированные полисахариды (в ИК-спектре отсутствовала полоса поглощения гидроксила ($3500 - 3600 \text{ см}^{-1}$) подвергали расщеплению до мономеров с последующей их идентификацией.

В гидролизате и метанолизате метилированных продуктов методом газожидкостной хроматографии, хроматографией на бумаге и в тонком незакрепленном слое силикагеля при сопоставлении результатов анализа со свидетелями были обнаружены 2-О-метил-D-ксилопираноза, 3-О-метил-D-ксилопираноза, 2,3-ди-О-метил-D-ксилопираноза, 2,3,4-три-О-метил-D-ксилопираноза и метилированные уроновые кислоты.

Основной компонент 2,3-ди-О-метил-D-ксилопираноза является продуктом преобразования D-ксилопиранозных остатков исходного глюкуроноксиана, связанных (1 \rightarrow 4)-гликозидными связями, 2-О-метил-D-ксилопираноза, 3-О-метил-D-ксилопираноза образуются из таких же звеньев, но с ответвлением у С-2, либо С-3 (табл. 2).

Таблица 2 – Мономерный состав гидролизатов метилированных глюкуроноксианов (в молярных соотношениях)

Мономеры	Анатомические части			Тип связи
	Древесина ОФД	Кора СХ	Стебель СХ	
2-О-метил-D-ксилоза	8,29	5,45	11,50	$\rightarrow 4$ -Xylp-(1 \rightarrow 3 ↑
3-О-метил-D-ксилоза	17,40	12,30	10,47	$\rightarrow 4$ -Xylp-(1 \rightarrow 2 ↑
2,3-ди-О-метил-D-ксилоза	48,10	65,00	56,48	$\rightarrow 4$ -Xylp-(1 \rightarrow
2,3,4-три-О-метил-D-ксилоза	8,70	5,05	11,24	Xylp-(1 \rightarrow
Метилированные уроновые кислоты	17,05	12,00	10,12	GlcUAp-(1 \rightarrow

Исследования показали, что в глюкуроноксиане древесины ОФД ~ 25,0 %, коры СХ ~ 18,0 %, стебля СХ ~ 22,0 % метилированных моносахаридов представлены монометильными производными ксилозы, столько же составляют в сумме метилированные 2,3,4-три-О-метил-D-ксилопираноза и уроновые кислоты. Такое распределение метилированных производных указывает на то, что в среднем на 100 мономерных единиц макромолекулы, в основе которой лежит цепь, состоящая из остатков β -D-ксилопираноз,

соединенных (1→4)-гликозидными связями, приходится 25, 18 и 22 ветвления соответственно. В общем виде структурная формула глюкуроноксианов анатомических частей ОФД и СХ представлена на рис. 3–5.

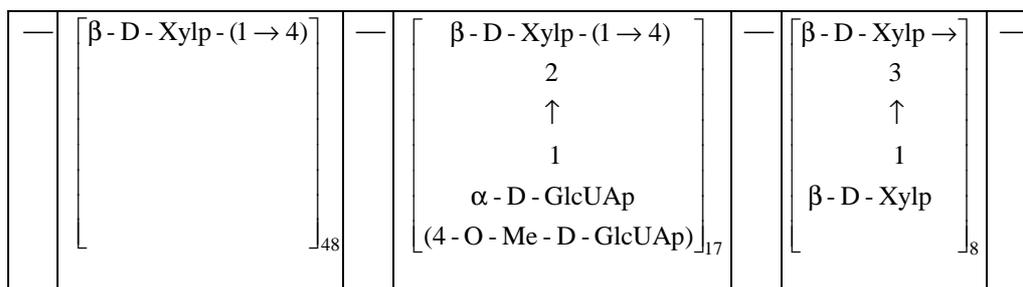


Рис. 3 – Структурная формула глюкуроноксиана древесины ОФД

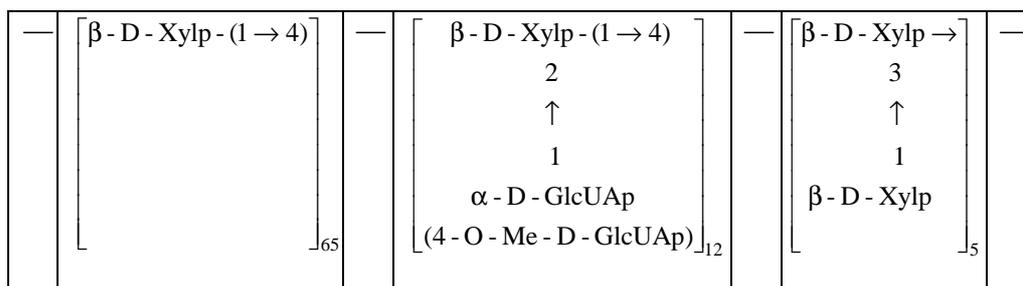


Рис. 4 – Структурная формула глюкуроноксиана коры СХ

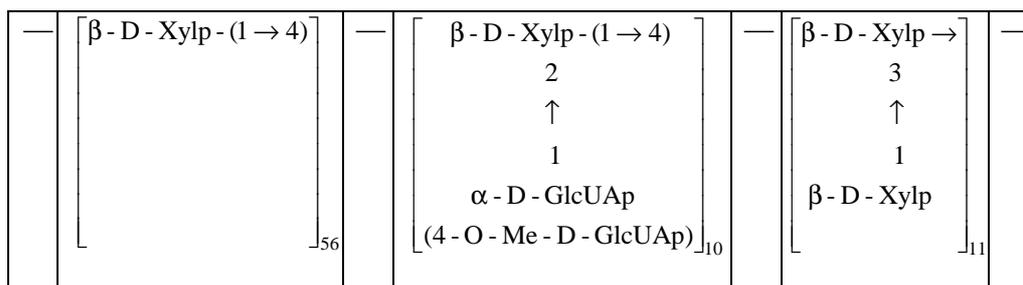


Рис. 5 – Структурная формула глюкуроноксиана стебля СХ

По строению макромолекулы глюкуроноксианы древесины ОФД, коры СХ и стебля СХ близки между собой и приближаются к таковым, выделенным из растительного сырья [9, 13, 14]. Отличие наблюдается лишь в степени ветвления основной цепи.

В результате проведенных исследований показано, что основная цепь глюкуроксианов анатомических частей ОФД и СХ построены из остатков D-ксилопираноз, соединенных по месту 1→4-β-гликозидными связями. В молекулах ксиланов имеет место три типа ответвлений, состоящих из остатков D-ксилозы, D-глюкуроновой кислоты, 4-О-метил-D-глюкуроновой кислоты.

На основании проведенных исследований и опубликованных ранее данных по химическому составу сырья, его технологическим свойствам можно сделать заключение о том, что все компоненты сырья будут оказывать существенную роль на условие его ферментативной деструкции, состав гидролизата, подготовку питательной среды и выбор потенциального микроорганизма – продуцента.

Литература

1. Величко Т.А., Килименчук Е.А. Гидролизаты нетрадиционных растительных отходов – питательная среда для роста дрожжевых культур / Мат. межд. наук. конф. «Хранительна наука, техника и технологи 2004», «FOODS SCIENCE, TECHNIQUE AND TECHNOLOGIES 2004». НАУЧНИ ТРУДОВЕ. Т.11, Св.3, – Пловдив, 26 – 29 окт. 2004. – С. 211 – 214.
2. Величко Т.О., Килименчук О.О. Біотехнологія одержання біологічно активних речовин на основі рослинної сировини // Наук. пр. ОДАХТ. – О., 2001. – Вип. 22. – С. 68 – 71.

3. Методы химии углеводов // Под ред. Н.К. Кочеткова. – М.: Мир, 1967. – 565 с.
4. Greenwood C.T. Aspects of the physical chemistry of starch // Adv. Carbohydrate Chem. – 1956. – № 11. – P. 335 – 393.
5. Гемидцеллюлозы / М.С. Дудкин, В.С. Громов, Н.А. Ведерников, Р.Г. Каткевич, Н.К. Черно. – Рига: Зинатне, 1991. – 488 с.
6. Кочетков Н.К., Чижов О.С. Избирательные методы расщепления полисахаридных цепей. Ч. 2: Избирательное расщепление ксилана березы // Н.К. Кочетков, О.С. Чижов // Изв. АН СССР. Сер. Хим. – 1968. – № 9. – С. 2089 – 2091.
7. The biochemistry of plants / A. Darwill, M. Macneil, P. Albersheim et al. – N. Y.: Acad. Press. – 1980. – Vol. 1. – P. 92 – 162.
8. Song M.J. Structure of a xylan from basswood (*Tilia americana* L.) / M.J. Song, T.E. Timell // Cellulose Chem. Technol. – 1971. – Vol. 5, № 1. – P. 67 – 74.
9. Kohn R. Distribution pattern of uronic acid units in 4-O-Methyl-D-glucurono-D-xylan of beech (*Fagus sylvatica* L.) // Coll Czechosl. Chem. Communications. – 1986. – Vol. 51, № 10. – P. 2243 – 2249.
10. Шарков В.И. Химия гемидцеллюлоз // В.И. Шарков, Н.И. Куйбина. – М.: Лес. пром-сть, 1972. – 440 с.
11. Голивец Г.И., Величко Т.А. Характеристика строения ксиланов стебля хмеля // Химия, биохимия и использование гемидцеллюлоз. Тез. докл. III Всесоюз. конф. – Рига, 1985. – С. 23 – 24.
12. Nakamori S.A. Rapid permethylation of glycolipid and polysaccharides catalyzed by methylsulfanyl carbanion in dimethyl sulfoxide // J. Biochem. – 1964. – Vol. 55. – № 2. – P. 205 – 207.
13. Дудкин М.С. Строение глюкоманнана древесины *Fraxinus excelsion* / М.С. Дудкин, Н.Г. Шкантова, М.А. Парфентьева // Химия природных соединений. – 1973. – № 5. – С. 598 – 600.
14. Шарков В.И. Исследование ксилоуронида из древесины осины / В.И. Шарков, Н.И. Куйбина, Ю.П. Соловьева // Журн. приклад. химия. – 1967. – Т. 40. – № 11. – С. 2609 – 2611.

УДК 577.11/12:66.022.1_035.2

КОМПЛЕКСНАЯ ПЕРЕРАБОТКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ С ПОЛУЧЕНИЕМ ЛИЗОЦИМСОДЕРЖАЩИХ БИОПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Озолина С.А., канд. хим. наук, доцент; Тирон-Воробьева Н.Б., м.н.с. ПНИЛ
Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса

*Предложена схема комплексной переработки регионального растительного сырья с получением биополимерных комплексов с лизоцимной активностью. В качестве лизоцимсодержащего сырья рассмотрены растения семейства капустных (Brassicaceae): хрен обыкновенный (*Armoracia rusticana*) и капуста белокочанная (*Brassica oleracea*).*

*A scheme for complex processing of regional plant materials was proposed. The main products were biopolymer complexes with lysozyme activity. As raw examined cabbage family plants (Brassicaceae): horseradish (*Armoracia rusticana*) and cabbage (*Brassica oleracea*).*

Ключевые слова: лизоцим, лизоцимная активность, лизоцимсодержащие биополимерные комплексы, растения семейства капустных.

В последние годы в развитых странах мира интенсифицируется производство лизоцима – фермента класса гидролаз. Основная функция лизоцима в организме человека и животных заключается в препятствии проникновению чужеродных бактерий (создание так называемого «барьера»). Этим обусловлено присутствие лизоцима в составе физиологических жидкостей организма: слез, слюны, носовой слизи, а также молока.

Он широко используется для обогащения продуктов детского питания на молочной основе. Такая необходимость определяется полной утратой лизоцимом его активности при термической обработке молока, используемого для их производства [1]. В пищевой индустрии лизоцим получил распространение как консервант, позволяющий удлинить сроки хранения колбасных изделий, молочных продуктов, плодов, овощей [2]. С лечебной и профилактической целью фермент находит применение в медицине и косметологии [3-5].

Для указанных целей, как правило, употребляют лизоцим животного происхождения, производимый в промышленных масштабах из белка куриных яиц методом прямой кристаллизации [6-8]. Однако выделение фермента упомянутым способом из других сырьевых источников не представляется возможным.