УДК 663.15(0.45)

Л.А. Бахолдина, В.П. Севодин

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗАТА ПШЕНИЧНЫХ ОТРУБЕЙ НА АМБЕРЛИТЕ XAD-4

Исследования, посвященные ферулоилированным олигосахаридам, указывают на большую эффективность этих молекул в предотвращении развития рака кишечника. Описано фракционирование гидролизатов растительных субстратов на полистирольных адсорбентах с целью получения ферулоилолигосахаридов. Предварительно очищенные от крахмала и белка пшеничные отруби ферментировали и гидролизат пропускали через колонку с полистирольным адсорбентом Амберлит XAD-4. Колонку последовательно промывали водой, смесью вода – спирт (1:1) и спиртом для элюции моно/олигосахаридов, ферулоилолигосахаридов и свободной феруловой кислоты (ФК) соответственно. Количественное содержание во фракциях связанной и свободной феруловой кислоты определяли методом Фолина – Чокальтеу (в пересчете на феруловую кислоту), количественное содержание свободной феруловой кислоты – методом капиллярного электрофореза. Качественное содержание свободной и связанной феруловой кислоты во фракциях проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Было установлено, что на Амберлите XAD-4 происходит разделение моно/олигосахаридов, ферулоилолигосахаридов и свободной феруловой кислоты по фракциям. Этанол при элюировании фракции ферулоилолигосахаридов и свободной феруловой кислоты оказался более эффективным, чем метанол. Водная фракция содержала незначительное количество связанной феруловой кислоты, водно-спиртовая фракция – преимущественно связанную феруловую кислоту, а спиртовая фракция – свободную. Установлено также, что феруловая кислота и ее производные хроматографировались при первом пропускании через колонку. Упаренные фракции подвергались анализу методом ТСХ на пластинках Silicagel 60 F_{254}, после обработки парами аммиака в водноспиртовой фазе под УФ-светом пятна приобретали светло-зеленую флуоресценцию, что, по литературным данным, соответствует ферулоилолигосахаридам.

Феруловая кислота, ферулоилолигосахариды, Амберлит XAD-4, пшеничные отруби.

Введение

Пшеничные отруби – крупнотоннажный отход мукомольного производства, который используют в качестве источника пищевых волокон в пищевой промышленности. Нерастворимые пищевые волокна, а также компоненты, связанные с ними (например, фенольные кислоты), благоприятно влияют на функцию кишечника.

Гемицеллюлоза является основным нецеллюлозным полисахаридом клеточных стенок зерновых культур, основу ее составляет арабиноксилан, ацилированный C_5-гидроксильным группами α-L-арабинофуранозных фрагментов феруловой кислоты, реже *п*-кумаровой или синаповой [1, 2].

Поскольку содержание феруловой кислоты и ее производных в пшеничных отрубях составляет около 5 мг/г, причем свободной ФК около 10 % от общего количества, подробно исследован спектр ее биологического действия. Установлено, что ФК и ее производные обладают биологической активностью: противоопухолевой, антитоксической, гепатопротекторной и т.д. [3].

Интерес к выделению ферулоилированных олигосахаридов связан с тем, что эти соединения являются более эффективными в предотвращении развития рака кишечника, чем ФК и олигосахариды отдельно. Ферулоилолигосахариды (ФОС) играют роль одновременно носителя и защиты для ФК, обеспечивая ее транспорт в толстый кишечник, уменьшая риск хронических заболеваний. Более того, ФОС, выделенные из отрубей, по сравнению со свободной ФК, оказались более эффективными антиоксидантами по отношению к окислению липопротеинов низкой плотности и свободных радикалов 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила [4, 5].

ФОС получают ферментативным или кислотным гидролизом пшеничных отрубей. Кислотный гидролиз проводят разбавленными растворами трифторуксусной и щавелевой кислот, реже другими кислотами. Ферментативный гидролиз арабиноксилана протекает под действием ксиланазы, при этом ферментный препарат не должен обладать эстеразной активностью, во избежание расщепления сложноэфирной связи углевод – феруловая кислота (рис. 1).

В литературе [6, 7] описано выделение фракции ФОС из гидролизата растительных субстратов путем хроматографирования на колонке с полистирольным адсорбентом, при элюировании этой фракции используется смесь низших спиртов с водой в соотношении 1 : 1.

Целью работы является хроматографическое разделение ферментативного гидролизата гемицеллюлоз пшеничных отрубей на фракции, содержащие свободную ФК и ФОС.

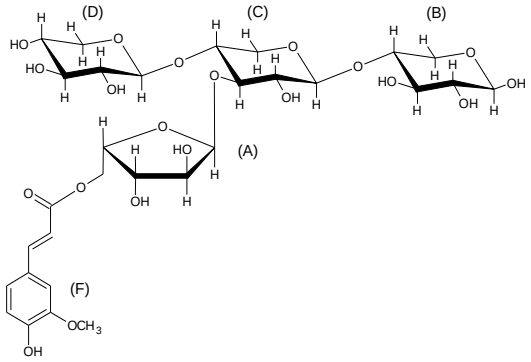

Рис. 1. Ферулоилолигосахарид
(F – феруловая кислота; A – арабиноза; B,C,D – ксилоза)

Объект и методы исследования

Объектом исследования служили отруби пшеничные (по ГОСТ 7169-66), полученные в 2012 году в ОАО «Бийский Элеватор» с содержанием белка 17,1 %, крахмала 24,5 % и влажностью 10–11 %.

Содержание белка в исследуемых пшеничных отрубях и полученных из них нерастворимых пищевых волокнах (НПВ) определяли по методу Кьельдаля (ГОСТ 10846-91). Содержание крахмала определяли по методу Эверса (ГОСТ 10845-98), влажность по ГОСТ 9404-88. Содержание фенольных веществ определяли фотометрическим методом Фолина – Чокальтеу [8] на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония), калибровочная кривая была построена по феруловой кислоте.

Для ферментативного гидролиза крахмала и белка использовали ферментные препараты Термамил 120L (термостабильная α-амилаза; Novozymes, Дания), Аттенузим (смесь амилоглюкозидазы и грибной α-амилазы; амилоглюкозидазная активность: 425,2 AGU/г; кислая α-амилная активность: 90,0 FAU-A/г; Novozymes, Дания) и Максазим NNP (бактериальная протеаза, протеолитическая активность: 700-750±5 % ед ПС/см^3; Германия). Для получения ферулоилолигосахаридов НПВ обрабатывали ферментным препаратом Брюзайм BGX (грибная гемицеллюлаза; активность препарата ксиланазная: 4200±5 % ед. КС/см^3; β-глюканазная: 530±5 % ед. β-ГкС/см^3; целлюлазная: 2100±5 % ед. КМС/см^3; Польша).

Ферментативную обработку НПВ проводили в шейкере-инкубаторе Environmental Shaker-Incubator ES-20 (Латвия), 90 об/мин, температура (42±2) °С.

Количественное содержание феруловой кислоты во фракциях определяли методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель 105М» фирмы Люмэкс (Россия, Санкт-Петербург). Капилляр – диаметр 75 мкм, рабочая длина 50 см. Анализ проводился при отрицательной полярности, pH буфера 5, состав буфера: 10мМ бензойной кислоты, 9 мМ диэтаноламина, 0,5 мМ цетилтриметиламмония бромида, 0,1 мМ трилона Б.

УФ-спектры фракций снимали на приборе Shimadzu UV-1800 (Япония).

Качественный анализ ферулоилолигосахаридов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках 25 Cromatofolhas ALTLC 20×20 cm Silicagel 60 F_{254}, в качестве подвижной фазы использовали две системы растворителей: хлороформ/этанол (10 : 1) и *н*-бутанол/этанол/вода (6 : 3 : 2). Пятна обнаруживали под УФ-светом до и после обработки парами аммиака.

Получение НПВ

100 г пшеничных отрубей выдерживали в сушильном шкафу в течение 45 мин при 121 °С. Затем добавляли 1000 мл воды и оставляли набухать в течение ночи. После этого суспензию нагревали до 60 °С и при постоянном перемешивании выдерживали 3 ч, затем температуру повышали до 85 °С и добавляли 3 мл α-амилазы (Термамил 120L), перемешивали в течение 40 мин. Температуру снижали до 60 °С и добавляли 5 мл препарата бактериальной протеазы (Максазим NNP), ферментировали в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. По истечении времени добавляли 5 мл ферментного препарата смеси амилоглюкозидазы и грибной α-амилазы (Аттенузим), смесь выдерживали при 60 °С в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Суспензию фильтровали под вакуумом через тканевый фильтр, отруби промывали четыре раза дистиллированной водой и два раза 96%-ным этиловым спиртом. Полученные нерастворимые пищевые волокна сушили на воздухе. Выход – 96 %.

Ферментативная обработка НПВ

5 г НПВ пшеничных отрубей суспензировали в 100 мл 1%-ного ферментного препарата Брюзайм BGX. Колбу помещали в шейкер-икубатор, ферментировали в темноте при перемешивании в течение 72 ч. После этого осадок отфильтровывали, фильтрат доводили до кипения и фильтровали через складчатый фильтр.

Фракционирование гидролизата на Амберлите XAD-4

50 мл ферментативного гидролизата пропускали через колонку (25 × 1 см) с Амберлитом XAD-4 (предварительно промытую 95%-ным этанолом и затем водой). Затем промывали колонку двумя колоночными объемами дистиллированной воды (фракция № 1), далее тремя колоночными объемами 50 % (об/об) водного раствора метанола или этанола (фракция № 2) и двумя колоночными объемами метанола или этанола (фракция № 3).

Результаты и их обсуждение

При анализе полученного гидролизата из НПВ методом Фолина – Чокальтеу было установлено, что в 50 мл гидролизата содержится 12,06 мг (было принято за 100 %) общего количества полифенолов в пересчете на ФК. Раствор пропускали через колонку, при этом 8,86 мг общих полифенолов (ПФ) сорбировались на колонке, а 3,2 мг смывались с нее.

Результаты распределения полифенолов по фракциям представлены в табл. 1.

Таблица 1

Распределение феруловой кислоты по фракциям

Наименование	Общее содержание феруловой кислоты	
	мг	%
Элюирование 1 (с метанолом)		
гидролизат	12,06	100,0
фракция № 1	0,40	3,3
фракция № 2	4,50	37,3
фракция № 3	1,80	14,9
гидролизат после хроматографии	3,20	26,5
Элюирование 2 (с этанолом)		
гидролизат	12,06	100,0
фракция №1	0,32	2,7
фракция №2	5,67	47,0
фракция №3	1,85	15,3
гидролизат после хроматографии	4,20	34,8

Наибольшее их содержание наблюдалось во фракции № 2 – 4,5 мг (водно-метанольный элюент) и 5,67 мг (водно-этанольный элюент). После фракционирования гидролизата с использованием метанольного элюента в колонке осталось 18 % феруловой кислоты, в то время как фракционирование с этанольным элюентом дало всего лишь 0,2 %.

Методом капиллярного электрофореза определяли свободную кислоту во всех фракциях. Феруловая кислота на электрофореграммах (с используемым буферном раствором) имеет отрицательную площадь пика, чем отличается от других кислот. Электрофореграмма фракции № 3 (этанольный элюент) представлена на рис. 2. Время миграции феруловой кислоты в среднем составляет 4,5–4,7 мин.

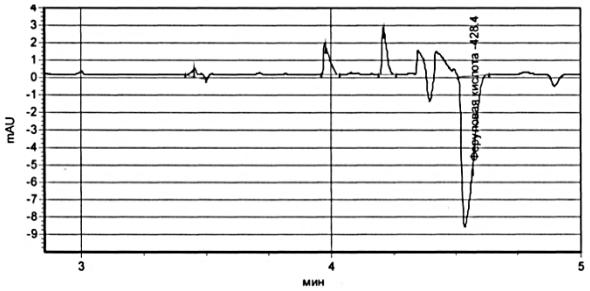

Рис. 2. Электрофореграмма фракции №3 (этанольный элюент)

Результаты количественного определения ФК в различных фракциях (табл. 2) показывают, что она не десорбируется с XAD-4 водой (фракция № 1) и очень плохо десорбируется водными растворами спиртов (фракция № 2). Для десорбции лучше всего подходят метиловый и этиловый спирты, позволяющие количественно удалить ФК с сорбента.

Контроль за ходом разделения с помощью капиллярного электрофореза показывает присутствие на электрофореграмме пиков с положительной площадью, что указывает на наличие небольшого количества других феноловых кислот.

При пропускании гидролизата через колонку с сорбентом в водной фазе на выходе из нее обнаруживаются остаточные количества полифенолов от 3,2 до 4,2 мг, определяемые по методу Фолина – Чокальтеу (в пересчете на ФК).

Таблица 2

Содержание свободной феруловой кислоты во фракциях

Фракция	Содержание свободной феруловой кислоты*	
	мг	%**
фракция № 1	не обнаружена	-
фракция № 2	0,10/0,07	2,2/1,2
фракция № 3	1,77/1,80	98,3/97,3

Примечание. * данные фракций с использованием метилового/этилового спиртов; ** в процентах от полифенолов, определяемых по Фолину-Чокальтеу

Фракцию, содержащую непоглощенные ПФ, подвергали повторному хроматографированию, которое приводило к снижению их концентрации в 2,5 раза.

Сравнение УФ-спектров фракций показывает, что при первом разделении гидролизата на Амберлите XAD-4 происходит полное поглощение ФК, для которой характерен максимум поглощения при 323 нм (рис. 3).

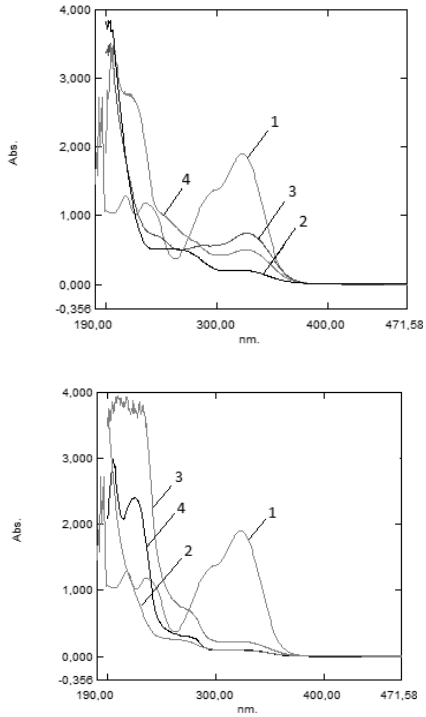

Рис. 3. УФ-спектры ФК и полученных фракций (сверху 1-е пропускание);
1 – ФК, 2 – фракция № 1, 3 – фракция № 2, 4 – фракция № 3

Анализ УФ-спектров фракций после повторного разделения показывает отсутствие поглощения при 323 нм, что позволяет сделать вывод об отсутствии производных ФК в элюатах.

Для качественного определения наличия ФОС используют тонкослойную хроматографию [1]. Полученные в результате разделения на XAD-4 фракции были сконцентрированы и подвергнуты анализу методом ТСХ. В качестве подвижной фазы использовали две системы растворителей: I – хлороформ/этанол (10:1) и II – *н*-бутанол/этанол/вода (6 : 3 : 2). Хроматограммы представлены на рис. 4.

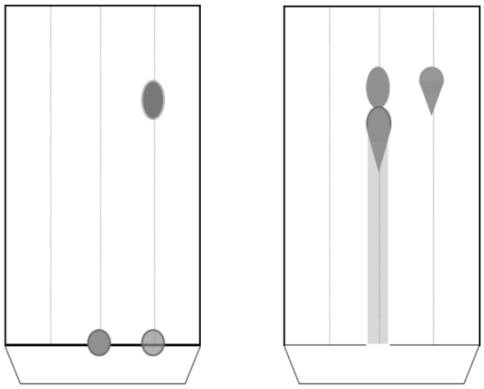

Рис. 4. Хроматограммы
(система I – слева, система II – справа)
1 – фракция № 1; 2 – фракция № 2;
3 – фракция № 3

Хроматограммы располагали под УФ-светом до и после обработки парами NH_3. После обработки NH_3 пятна бледно-фиолетового цвета начинали флуоресцировать зеленым цветом, кроме пятна, которое наблюдалось в системе I во фракции № 3, оно флуоресцировало голубым цветом. Голубое пятно идентифицировали как феруловую кислоту. Светло-зеленые пятна в системе I оставались на линии старта, пятно фракции № 2 было намного ярче (и после воздействия парами NH_3 визуализировалось в желтый цвет). В системе II во фракции № 2 свечение наблюдалось с линии старта, было видно два ярких пятна, во фракции № 3 наблюдалось одно неяркое пятно. Фракция № 1 не имела пятен в обеих системах растворителей.

Светло-зеленая флуоресценция пятен после обработки парами NH_3 указывает на то, что это феруloилолигосахариды. Феруловая кислота после обработки парами NH_3 приобретает ярко-голубую флуоресценцию в УФ-свете [9]. Таким образом, основная часть феруloилсахаридов содержится во фракции № 2, немного – во фракции № 3.

Выводы

Таким образом, по результатам хроматографирования на Амберлите XAD-4 можно сделать следующие выводы:

1. При фракционировании на Амберлите XAD-4 водной фракцией № 1 элюируются моно/олигосахариды, водно-спиртовой № 2 – феруloилолигосахариды и спиртовой № 3 – свободная феруловая кислота.

2. Этанол при элюировании фракций оказался эффективнее метанола, потери на колонке феруловой кислоты составило всего 0,2 %.

3. Установлено, что наибольшее количество феруловой кислоты содержится в связанной форме в виде феруloилолигосахаридов.

4. ФК сорбируется и подвергается хроматографии при первом пропускании через колонку с Амберлитом XAD-4.

Список литературы

1. Xiaoping Y., Jing W., Huiyuan Y. Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chemistry*, 2005, no 90, pp.759–764.

2. Lequart, C., Nuzillard J.-M., Kurek B., Debeire P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *CarbohydrateResearch*, 1999, no 319, pp. 102–111.

3. Дьяков, А.А. Противоаритмическое действие феруловой кислоты / А.А. Дьяков, В.Н. Перфилова, И.Н. Тюренков // Вестник аритмологии. – 2005. – № 39. – С. 49–52.

4. Couto, J. S. Development of a novel biocatalytic approach for the synthesis of feruloylat-ed glycosides by feruloyl esterase expressed in selected multi-enzymatic extracts. *Degree of Master of Science dissertation*. McGill University, Canada, 2011, 97 p.

5. Ohta T., Nakano T., Egashira Y., Sanada H. Antioxidant activity of ferulic acid beta-glucuronide in the LDL oxidation system. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, no 61(11), pp. 1942-1943.

6. Bunzel M. Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades*. Hamburg, 2001, 159 p.

7. Vaidyanathan S., Bunzel M. Development and application of a methodology to determine free ferulic acid and ferulic acid ester-linked to different types of carbogydrates in cereal products. *Cereal Chem*, 2012, 89 (5), pp. 247–254.

8. Методы технохимического контроля в виноделии / Под ред. Гержиковой В.Г. – Симферополь: Таврида, 2002. – 260 с.

9. Гончаров, Н.Ф. Гидроксикоричные кислоты цветков и листьев нефармакопейных видов рода боярышник / Н.Ф. Гончаров, И.В. Михайлов, Н.Н. Гончаров // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 9. – С. 146–148.

Бийский технологический институт (филиал)
ФГБОУ ВПО «Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова»,
659305, Россия, г. Бийск, ул. Трофимова, 27.
Тел.: +7 (3854) 43-22-85,
e-mail: info@bti.secna.ru

SUMMARY

L.A. Bakholdina, V.P. Sevodin

THE STUDY OF FRACTIONATION OF WHEAT BRAN FERMENTATIVE HYDROLYSATE WITH AMBERLITE XAD-4

Studies on feruloyl-oligosaccharides show high efficiency of these molecules in the prevention of colon cancer. Fractionation of hydrolysates of plant substrates on polystyrene adsorbents resulting in acquisition of feruloyl-oligosaccharides was described. Wheat bran cleared of starch and proteins were fermented, and the hydrolysate obtained was passed through a column with polystyrene adsorbent «Amberlite XAD-4». The column was successively washed with water, water-alcohol mixture (1:1) and alcohol for elution of mono/oligosaccharides, feruloyl-oligosaccharides and free ferulic acid, respectively. The quantitative content of bound and free ferulic acid in the fractions was determined using the method of Folin-Ciocalteu (in application to ferulic acid), and the quantitative content of free ferulic acid was determined with the help of capillary electrophoresis. Qualitative content of free and bound ferulic acid in the fractions was determined by TLC. It has been found that Amberlite XAD-4 fractionnates mono/oligosaccharides, feruloyl-oligosaccharides and free ferulic acid. Ethanol has shown itself more effective than methanol in elution of fractions of feruloyl-oligosaccharides and free ferulic acid. Water fraction contained a small amount of bound ferulic acid, water-alcohol fraction contained mainly bound ferulic acid, and alcohol fraction contained free ferulic acid. It has been also determined that ferulic acid and its derivatives are chromatographed during the first passage through the column. The evaporated fractions were analyzed by TLC on plates of Silicagel 60 F254. After exposure to ammonia vapors in the hydro alcoholic phase under UV light, spots acquired light green fluorescence, which corresponds to the description of feruloyl-oligosaccharides in literature.

Ferulic acid, feruloyl-oligosaccharides, Amberlite XAD-4, wheat bran.

References

1. XiaopingY., Jing W., Huiyuan Y. Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chemistry*, 2005, no. 90, pp.759–764.

2. Lequart C., Nuzillard J.-M., Kurek B., Debeire P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 1999, no. 319, pp. 102–111.

3. Dyakov A.A., Perfilova V.N., Tyurenkov I.N. Protivoaritmicheskoe deistvie ferulovoi kisloty [Antiarrhythmic action of ferulic acid]. *Vestnik aritmologii* [Herald arrhythmology], 2005, no. 39, pp. 49–52.

4. Couto J.S. Development of a novel biocatalytic approach for the synthesis of feruloylat-ed glycosides by feruloyl esterase expressed in selected multi-enzymatic extracts. *Degree of Master of Science dissertation*. McGill University, Canada, 2011, 97 p.

5. Ohta T., Nakano T., Egashira Y., Sanada H. Antioxidant activity of ferulic acid beta-glucuronide in the LDL oxidation system. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, no. 61(11), pp. 1942-1943.

6. Bunzel M. Monomere und dimere Phenolcarbonsäuren als strukturbildende Elemente in löslichen und unlöslichen Getreideballaststoffen. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades*. Hamburg, 2001, 159 p.

7. Vaidyanathan S., Bunzel M. Development and application of a methodology to determine free ferulic acid and ferulic acid ester-linked to different types of carbogydrates in cereal products. *Cereal Chem*, 2012, no. 89 (5), pp. 247–254.

8. Gerzhikovoj V.G. *Metody tehnohimicheskogo kontrolja v vinodelii* [Methods of technical and chemical control in wine-making]. Simferopol', Tavrida, 2002. 260 p.

9. Goncharov N.F., Mikhailov I.V., Goncharov N.N. Gidroksikorichnye kisloty tsvetkov i list'ev nefarmakopeinykh vidov roda boiaryshnik [Hydroxycinnamic acids of not pharmaceutical kinds of a sort an aglet]. *Fundamental'nye issledovanija* [Fundamental research], 2011, no. 9, pp. 146–148.

Biysk Technological Institute (Branch)
FSEI HPE «Altai State Technical
University of I.I. Polzunova»,
27, str. Trofimova, Biysk, Altay territory, 659305, Russia.
Phone: +7 (3854) 43-22-85,
e-mail: info@bti.secna.ru

Дата поступления: 28.01.2015