

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В АНАЛИЗЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

Е.И. Макарова, В.В. Будаева

С помощью ВЭЖХ на жидкостном микроколоночном хроматографе Милихром А-02 проведен качественный и количественный анализ ферментативных гидролизатов, полученных из предварительно химически обработанных плодовых оболочек овса. Установлено, что состав сахаров в гидролизатах представлен глюкозой и ксилозой: в гидролизате лигноцеллюлозного материала (обработка сырья разбавленным раствором азотной кислоты) концентрация глюкозы составила 43,2 мг/мл, ксилозы – 5,6 мг/мл, в гидролизате волокнистого продукта (обработка сырья разбавленным раствором гидроксида натрия) – 36,6 мг/мл и 8,3 мг/мл, соответственно.

Ключевые слова: плодовые оболочки овса, ферментативный гидролизат, ВЭЖХ, глюкоза, ксилоза.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка биотехнологических способов трансформации целлюлозосодержащего сырья предусматривает обязательный контроль концентрации редуцирующих веществ (сахаров), которые могут быть как целевыми продуктами [1–2], так и сырьем для последующего биосинтеза [3–4]. Спектрофотометрический метод определения редуцирующих веществ, основанный на цветной реакции редуцирующего вещества с 3,5-динитросалициловой кислотой и определении оптической плотности полученного раствора при длине волны 530 нм, широко используется и позволяет определить только сумму сахаров в пересчете на выбранный исследователями индивидуальный моносахарид [5]. Особенно востребован данный метод при исследовании гидролиза выделенных из растительного сырья целлюлозы или гемицеллюлоз для анализа глюкозы и ксилозы, соответственно. Гораздо более сложная задача определения качественного и количественного состава моносахаридов в гидролизатах, полученных из многокомпонентных субстратов. В таких случаях рекомендовано использование метода ВЭЖХ [6–7]. Но, как правило, обсуждается контроль содержания индивидуальных моносахаридов в гидролизатах с низкими концентрациями суммы редуцирующих веществ в диапазоне 1–30 г/л. В данной работе представлены первые результаты применения ВЭЖХ для контроля основных индивидуальных сахаров в водных гидролизатах, полученных ферментативным гидролизом предварительно химически обработанных плодовых оболочек овса, при высоком значении начальной концентрации субстратов. Ак-

туальность такого рода исследований обусловлена необходимостью масштабирования биотехнологических процессов по объему для реализации их в промышленности.

Цель работы – исследование качественного и количественного состава ферментативных гидролизатов плодовых оболочек овса с использованием ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовался микроколоночный жидкостной хроматограф «Милихром А-02» (ЗАО ИХ «ЭкоНова, Новосибирск, Россия) с колонкой размером Ø2x75 мм, заполненной сорбентом ProntoSIL 120-5 C18 AQ (Bischoff, Германия). Регистрацию хроматограмм и расчет площадей пиков и основных параметров удерживания проводили с помощью персонального компьютера с аналого-цифровым преобразователем и программой «МультиХром» [8].

В качестве контрольных веществ сахаров использовались фармацевтические субстанции лекарственных веществ с содержанием основного вещества не ниже 98 % («Sigma», США): глюкоза, ксилоза, галактоза. Для приготовления элюентов применялись ацетонитрил (ОСЧ 4) и трифторуксусная кислота (ТФУ) (х.ч.).

Анализ состава гидролизатов проводился методом, разработанным авторами [9] и основанном на реакции дериватизации редуцирующих веществ гидролизата с помощью 2,4-динитрофенилгидразина. Главным достоинством метода является отсутствие сложной подготовки образца перед анализом.

Условия хроматографического опреде-

ПРИМЕНЕНИЕ ВЭЖХ В АНАЛИЗЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ПЛОДОВЫХ ОБОЛОЧЕК ОВСА

ления. Элюент А – 0,1 % ТФУ, Б – 0,1 % ТФУ, 70 % ацетонитрил. Градиент 2200 мкл 16–27 % Б, 200 мкл 27–100 % Б, 600 мкл 100 % Б. Скорость подачи элюента 150 мкл/мин, температура 35 °С. Для детектирования использовали длину волны 360 нм. Объем пробы 5 мкл [10]. Погрешности определения концентраций: глюкозы 0,006 мг/мл в интервале концентраций 0,1–1,0 мг/мл, ксилозы 0,005 мг/мл в интервале концентраций 0,04–0,10 мг/мл, галактозы 0,001 мг/мл в интервале концентраций 0,05–0,20 мг/мл.

Объектами исследования были гидролизаты, полученные ферментативным гидролизом двух различных субстратов – продуктов химической обработки плодовых оболочек овса: образца лигноцеллюлозного материала после обработки сырья разбавленным раствором азотной кислоты (гидролизат ЛЦМ) и образца волокнистого продукта после обработки сырья разбавленным раствором гидроксида натрия (гидролизат ВП). Гидролиз проводился в водной среде при начальной концентрации субстрата 60 г/л. Более подробно особенности получения субстратов и гидролизатов из них представлены в работах [11–13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам ВЭЖХ стандартов-сахаров были определены времена удерживания: глюкозы – 11,5 мин, ксилозы – 14,9 мин, галактозы – 10,7 мин.

Хроматограммы, полученные после ВЭЖХ ферментативных гидролизатов плодовых оболочек овса, представлены на рисунке 1. На рисунках а и б имеются два ярко выраженных пика с временами удерживания 11,5 мин и 15,0 мин для гидролизата ЛЦМ и 11,4 мин и 14,8 мин для гидролизата ВП. Учитывая значения времени удерживания стандартов-сахаров, эти пики идентифицированы как глюкоза и ксилоза. Возможно присутствие в гидролизате в малой концентрации также третьего сахара – галактозы, который невозможно определить из-за перекрывания с пиком глюкозы.

Учитывая площадь каждого пика, были определены средние значения концентрации глюкозы и ксилозы: в гидролизате ЛЦМ они составили 43,2 мг/мл и ксилозы 5,6 мг/мл, в гидролизате ВП – 36,6 мг/мл и 8,3 мг/мл соответственно. Полученные данные согласуются со способом получения субстратов и их химическим составом.

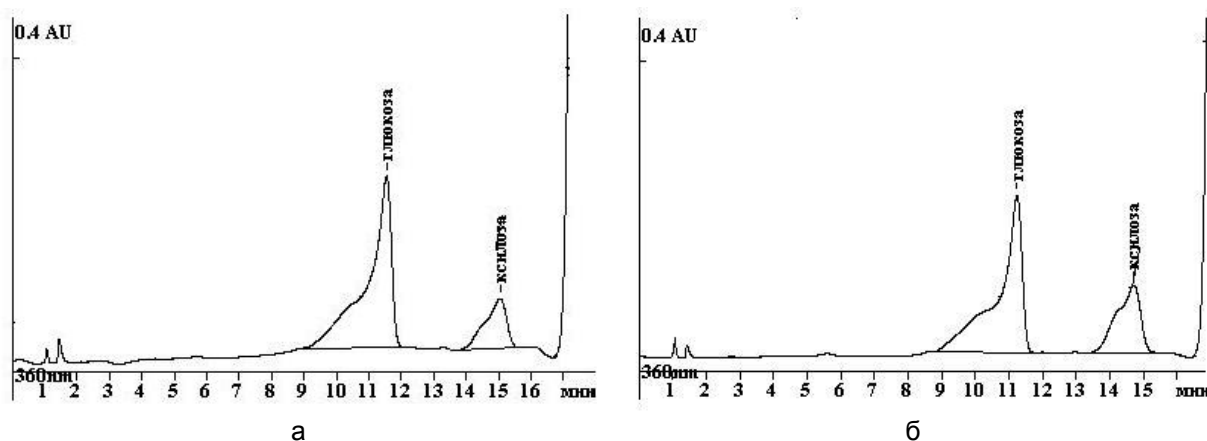


Рисунок 1 – Хроматограммы ферментативных гидролизатов плодовых оболочек овса:
а – гидролизат ЛЦМ; б – гидролизат ВП

ВЫВОДЫ

С помощью ВЭЖХ на жидкостном микроколоночном хроматографе Милихром А-02 проведен качественный и количественный анализ ферментативных гидролизатов, полученных из предварительно химически обработанных плодовых оболочек овса, при высоких значениях начальной концентрации субстратов. Установлено, что состав сахаров представлен глюкозой и ксилозой, другие сахара не обнаружены. В гидролизате ЛЦМ концен-

трация глюкозы составила 43,2 мг/мл, ксилозы – 5,6 мг/мл, в гидролизате ВП – 36,6 мг/мл и 8,3 мг/мл соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Макарова, Е. И. Глюкозный гидролизат из гидротропной целлюлозы мискантуса (влияние «Tween 80») / Е. И. Макарова, М. Н. Денисова, И. Н. Павлов, В. В. Будаева, Г. В. Сакович // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2014. – № 9. – С. 2156–2159.

2. Makarova, E. I. Enzymatic Hydrolysis of cellulose from oat husks at different substrate concentrations / E. I. Makarova, V. V. Budaeva, E. A. Skiba // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2014. – Vol. 40, № 7. – P. 726–732.

3. Байбакова, О. В. Исследование одновременного процесса осахаривания-сбраживания для получения биоэтанола на примере мискантуса и плодовых оболочек овса / О. В. Байбакова // Фундаментальные исследования. – 2016. – № 6-1. – С. 14–18.

4. Гладышева, Е. К. Результаты рентгенографических исследований бактериальной целлюлозы / Е. К. Гладышева // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 7-2. – С. 240–244.

5. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G. L. Miller // Anal Chem. – 1959. – № 31. – P. 426–428.

6. Ioelovich, M. Study of kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose materials / M. Ioelovich // ChemXpress. – 2015. – Vol. 8, № 4. – P. 231–239.

7. Yu, Z. Evaluation of the factors affecting avicel reactivity using multi-stage enzymatic hydrolysis / Z. Yu, H. Jameel, H. Chang, R. Philips, S. Park // Biotechnology and Bioengineering. – 2012. – Vol. 5, № 5. – P. 1449–1463.

8. Барам, Г. И. Развитие метода микроколонной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для решения комплексных аналитических задач: диссертация в виде научного доклада на соискание ученой степени д-ра хим. наук / Барам Г. И. – Иркутск, 1997. – 56 с.

9. Куприянова, Л. Я. Метод количественного определения сахаров в моче с помощью ВЭЖХ / Л. Я. Куприянова, Л. А. Кожанова // Сборник научных трудов «Современные медицинские технологии», 1999. – С. 292–295.

10. Федорова, Г. А. Применение микроколонной высокоэффективной жидкостной хроматографии в медицине. Часть 2 / Г. А. Федорова, Л. А. Кожанова, И. Н. Азарова // Вестник восстановительной медицины. – 2008. – № 2 (24). – С. 47–50.

11. Байбакова, О. В. Химико-энзиматическая конверсия в биоэтанол отходов злаковых культур / О. В. Байбакова // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6, № 2(17). – С. 51–56.

12. Байбакова, О. В. Превращение лигноцеллюлозного материала из плодовых оболочек овса в биоэтанол / О. В. Байбакова, Е. А. Скиба // Ползуновский вестник. – 2014. – № 3. – С. 181–185.

13. Байбакова, О. В. Плодовые оболочки овса в качестве сырья для получения биоэтанола при масштабировании процесса по объему / О. В. Байбакова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 9-2. – С. 215–218.

Макарова Екатерина Ивановна, кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), e-mail: massl@mail.ru, тел.: (3854) 30-59-85.

Будеева Вера Владимировна, кандидат химических наук, доцент, заведующая лабораторией биоконверсии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), e-mail: budaeva@ipcet.ru, тел.: (3854) 30-59-85.