

В.И. Круглик

ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ СОРБЦИИ ФЕНИЛАЛАНИНА ИЗ ГИДРОЛИЗАТОВ МОЛОЧНЫХ БЕЛКОВ ПРОМЫШЛЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ

Исучены состав и свойства ферментного гидролизата молочного белка, дана характеристика фракций. Исследована характеристика фракций ферментного гидролизата молочного белка после оптимизации параметров технологического процесса. Изучено содержание фенилаланина в разных фракциях. Отмечены результаты сравнительного анализа исходного ферментного гидролизата молочного белка и полученного продукта. Обоснован режим реализации метода на полупромышленной установке.

Ферментативный гидролизат молочных белков, фракция, фенилаланин, продукт.

Получив удовлетворительные данные по исследованию закономерностей фракционирования гидролизатов, полученных из концентратов молочных белков, проведено изучение содержания фенилаланина в полученных образцах. В дальнейшем для сорбции фенилаланина использовали метод промышленной хроматографии. В качестве носителя применяли силикагель с привитой гидрофобной фазой. Для облегчения восприятия материала приведены лишь наиболее значимые результаты.

Для реализации эксперимента использовали ферментный гидролизат молочного белка (ФГМБ), скорость нанесения гидролизата после микрофльтрации через мембрану с диаметром пор 0,2 мкм с массовой долей белков 33 % составлял 1 л/ч. В таблице 1 приведены физико-химические показатели фракций.

Получив удовлетворительные данные по исследованию закономерностей фракционирования гидролизатов, полученных из концентратов молочных белков, проведено изучение содержания фенилаланина в полученных образцах.

Таблица 1

Характеристика фракций ФГМБ

№ фракции	D280	RI, %	Отношение $\frac{D280}{RI}$	Массовая доля фенилаланина, %
1	0,32	1,0	0,32	0,024
2	1,12	5,5	0,20	0,017
3	2,40	9,2	0,26	0,046
4	2,98	6,8	0,44	0,136
5	2,70	3,3	0,82	0,438
6	2,14	1,6	1,34	1,242
Исходный ФГМБ	202	33,0	6,12	2,942

Элюацию вели водой, расход которой устанавливали 1,0 л/ч. Отсеченные фракции сливали в дренаж. Хроматографию вели на полупромышленной колонке ХАД-16 (44×100 см), элюент - обратноточеская вода, скорость элюирования 1,5 л/мин.

Выявлено, что исходный образец характеризовался присутствием различных фракций молочных белков, несмотря на предварительную мембранную обработку, которая, однако, позволила практически полностью исключить фракции белков с размером более 28,2 кД. Фракционирование ферментативного гидролизата не только с помощью промышленной хроматографии, но и отбором фракций после мембранного разделения существенно изменяло молекулярно-массовое распределение белков. Так, в первой фракции основную долю белковых фракций (более 50 %) составляли пептиды с молекулярной массой от 4,5 до 11,5 кД, во второй фракции более 50 % пептидов имело молекулярную массу от 1,4 до 4,5 кД, а также незначительное количество азотистых веществ с молекулярной массой более 4,5 кД, но не более 11,5 кД. В третьей фракции все пептиды имели молекулярную массу не более 4,5 кД, весьма значительно представлена пиковая область олигопептидов с молекулярной массой менее 1,4 кД.

Дальнейшее фракционирование белковых гидролизатов ведет к возрастанию доли фракций олигопептидов с меньшей молекулярной массой, однако, вероятно, вследствие появления эффекта концентрационной поляризации в пятой и шестой фракциях отмечается появление пептидов с молекулярной массой более 4,5 кД. В этой связи естественно предположить, что практический интерес эти фракции иметь не будут.

Для дополнительной оценки результатов проведена серия дополнительных экспериментов. После объединения собранных первой, второй, третьей и четвертой фракций установлено, что баланс по колонке характеризуется следующим образом: срыв сухих и ароматических циклических соединений (АЦС) 85,4 и 7,2 % соответственно, массовая доля сухих веществ во фракциях 1-4 составляла 68,2 %, выход АЦС составил 3,4 %, отношение $\frac{D280}{RI} = 0,303$. Включение пятой фракции приведет к

получению следующих значений: 78,2 %; 4,7 % и 0,369 соответственно. При физическом объединении фракций с первой по четвертую получался препарат с выходом 54 % и долей фенилаланина 0,06 %. В дальнейшем для оптимизации метода

промышленной хроматографии были частично изменены параметры технологического процесса. ФГМБ после ферментативной обработки и ультрафильтрации подвергали промышленной хроматографии на колонке ХАД-16 (2,5×40 см), элюировали водой со скоростью 2,0 мл/мин.

В таблице 2 приведены физико-химические показатели фракций ФГМБ после проведения процесса мембранного фракционирования.

Таблица 2

Характеристика фракций ФГМБ после оптимизации параметров технологического процесса

№ фракции	D280	RI, %	Отношение $\frac{D280}{RI}$	Массовая доля фенилаланина, %
1	0,51	2,5	0,203	0,019
2	2,34	7,4	0,316	0,016
3	3,09	5,7	0,542	0,036
4	3,15	3,0	1,05	0,117
5	3,24	1,8	1,8	0,368
6	3,20	0,9	3,56	0,451
1-4	2,27	4,8	0,472	58,4
1-3	1,98	5,2	0,381	51,0
Исходный ФГМБ	244	47,0	5,19	2,784

Хроматографический анализ позволяет констатировать, что молекулярно-массовое распределение пептидов, как и в ранее рассмотренном случае, существенно зависело от свойств отобранных фракций. В исходном образце ферментативного гидролизата молочных белков все пептиды имели молекулярную массу от 0,9 до 10,5 кД, причем четко прослеживалось присутствие пептидов с молекулярной массой от 5,4 до 10,5 кД, однако в количествах, не превышающих четверти (в относительном содержании) от доли всех представленных остатков белковых молекул.

С увеличением номера фракции количество низкомолекулярных пептидов возрастало, причем пики имели более выраженную форму, что свидетельствует о более четком их фракционировании. Отсечение и последующее удаление пятой и шестой фракций в связи с обострением нежелательных процессов, связанных с концентрационной поляризацией на поверхности мембран и попаданием крупномолекулярных пептидов указывает на нецелесообразность дальнейшего фракционирования ФГМБ. Начиная с пятой фракции процесс мембранного разделения существенно затягивался во времени, что являлось неоправданным.

Можно констатировать, что удалось снизить содержание фенилаланина во фракциях с 3,4 (в первой серии экспериментов от первоначального) до 1,3 % (во второй серии экспериментов), что можно признать достижением цели при реализации поставленной технической задачи.

С целью получения препарата, лишённого балластных элементов, в частности остаточных количеств жировой фазы, ферментативный гидролизат

молочных белков подвергали микрофильтрации через мембрану с размером пор 0,65 мкм. После обработки на колонку ФГМБ наносили ХАД-16, скорость элюирования 1,5 л/мин (обратноосмотическая вода).

Проводили хроматографический анализ полученного продукта и исходного гидролизата методом ВЭЖХ на колонке TSK GEL G 2000 LX SW (0,8×30 см), предварительно откалиброванной по стандартным глобулярным водорастворимым белкам известной молекулярной массы, а также по белкам сыворотки коровьего молока. Длина волны спектрофотометрического проточного детектора составляла 280 нм, скорость элюирования - 0,2 мл/мин, элюент - 0,2 М хлористый натрий и азид натрия.

Детализация пептидного профиля образца после физического и мембранного фракционирования приведена на рис. 1. Результаты определения фенилаланина в ферментативных гидролизатах молочных белков в высоко- и низкомолекулярной фракции после ультра- и нанофильтрации приведены в таблице 3.

Таблица 3

Содержание фенилаланина в разных фракциях ФГМБ

Образец	Массовая доля фенилаланина, %
Фракция 1	0,006
Фракция 2	0,008
Фракция 3	0,038
Фракция 4	0,081
Фракция 5	3,97
Осадок перед хроматографией	5,13
Низкомолекулярная фракция ФГМБ, полученная нанофильтрацией	4,22
Высокомолекулярная фракция ФГМБ, полученная ультра- и нанофильтрацией	2,36
ФГМБ, полученный ультрафильтрацией	4,54

Анализ полученных результатов показал, что использование многоступенчатой обработки позволяет последовательно снизить массовую долю фенилаланина до требуемого уровня. Минимальным содержанием сорбируемой аминокислоты характеризуются фракции с первой по четвертую, причем во второй фракции его количество на 33,3 % больше, чем в первой, а в третьей - уже на порядок больше, чем во второй.

После проведения процесса промышленной хроматографии, отбора низкомолекулярных фракций и получения на их основе продукта установленные результаты, которые приведены в таблице 4.

Показано, что в готовом продукте количество фенилаланина составляло менее 1 % от первоначального, массовая доля сухих веществ в продукте колебалась на уровне 2,8 %, выход сухих веществ детерминирован на уровне 38,8 %.

Полученный результат является удовлетворительным, поскольку позволяет с уверенностью кон-

статировать возможность использования ферментативного гидролиза, мембранной обработки и промышленной хроматографии для получения молочной основы, обедненной фенилаланином, в связи с созданием продуктов питания для детей, больных фенилкетонурией.

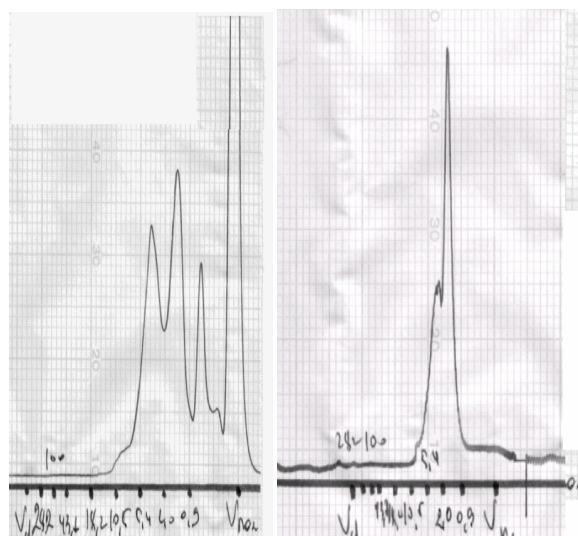
Таблица 4

Результаты сравнительного анализа исходного ФГМБ и полученного продукта

Образец	D280	RI, %	Отношение $\frac{D280}{RI}$	Массовая доля фенилаланина, %	Выход по сухим веществам, %
Исходный ФГМБ	193,0	39,0	4,95	100	100
Продукт	0,341	2,8	0,12	0,95	38,8

В последующем приведенные хроматограммы можно использовать в качестве эталона при получении гидролизатов, предназначенных для селективной сорбции фенилаланина.

Таким образом, для реализации метода на полупромышленной установке необходимо не допускать попадания щелочи в процессе сбора продукта в элюирующую воду. Для этого необходимо очистить верхний фильтр от остатков нерастворившейся щелочи, образовавшихся в процессе регенерации колонки с использованием раствора щелочи на тех



а) б)

Рис. 1. Хроматограмма образцов:
а) ФГМБ после микрофльтрации через мембрану с диаметром пор 0,65 мкм; б) пептидный профиль низкомолекулярных фракций

нической воде, и в дальнейшем использовать регенерирующий раствор щелочи, полученный на обратнoосматической воде.

Целесообразно использовать глубокий ФГМБ, полученный без добавления щелочи в процессе гидролиза и, как минимум, два раза пропущенный через ультрафильтрационную мембрану 2,0 кД. Возможно для получения продукта с содержанием фенилаланина менее 0,002 % использование фильтра, получаемого при нанофльтрации глубокого гидролизата ФГМБ.

ОАО «Нутринвестхолдинг»,
125167, г. Москва, Ленинградский пр-т, 37А, стр. 14

SUMMARY

V.I. Kruglik

Studying of laws sorbtion phenylalanin from hydrolysat dairy fibers an industrial chromatography

Are studied structure and properties fermental hydrolysat dairy fiber, it is given harakteri-stika fractions. The characteristic of fractions fermental hydrolysat dairy the squirrel after optimi-sation of parametres of technological process is investigated. It is studied containing-nie phenylalanin in different fractions. Results of the comparative analysis is hodnogo fermental hy-drolisat dairy fiber and the received product are noted. The mode of realisation of a method on the semiplant is proved.

Enzyme hydrolysat, dairy fibers, fraction, phenylalanin, a product.

