

І.В. Попова, Г.П. Феценко, аспіранти
Г.Є. Поліщук, канд. техн. наук
Г.О. Лезенко, канд. хім. наук

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ БІЛКОВИХ РЕЧОВИН З ВУГЛЕВОДАМИ У МОЛОЧНО-ЦИКОРНИХ СУМІШАХ

Досліджено та проаналізовано взаємодію білкових речовин з вуглеводами цикорію у модельних молочно-цикорних сумішах для подальшого використання при розробленні технологій цикорієвмісних молочних продуктів. Такі типи взаємодії встановлено поляриметричними, хроматографічними та електрофоретичними методами в модельних системах та промислових зразках.

Ключові слова: цикорій, молоко, білки, вуглеводи, електрофорез, питома поляризація.

Цикорій звичайний (*Cicorium intabus* L.) відомий людям із сивої давнини як рослина, всі частини якої (корені, стебла, листя тощо) використовуються як засоби народної медицини [1–3].

У коренях цикорію виявлено значний вміст цінного полісахариду інуліну, білкові й дубильні речовини, монози (глюкозу і фруктозу), органічні кислоти, пектин, холін, вітаміни, глікозиди, макро- та мікроелементи [3–5].

Незважаючи на яскраво виражену і підтверджену багатовіковим досвідом лікувальну дію цикорію, його застосування лишається на рівні народної медицини, а виробництво препаратів і продуктів із нього не набуло широкого промислового масштабу.

Зважаючи на викладене вище, для поліпшення якості харчування населення і збагачення харчових продуктів біологічно цінними речовинами, що мають загальнозміцнювальну й лікувальну дію, слід вважати актуальним і доцільним розроблення технологій цикорієвмісних харчових продуктів, зокрема молочних.

Перспективним є розроблення технологій молочних продуктів з екстрактом цикорію, а також з крупкою із сушеного та обсмаженого коріння цикорію.

Вивчення перетворень складових речовин цикорію в процесах виготовлення цикорієвмісних молочних продуктів (зокрема, взаємодії складових цикорію зі складовими молока) може слугувати підґрунтям для розроблення технологій молочних продуктів із наперед заданими органолептичними, фізико-хімічними та мікробіологічними показниками. У цих технологіях можливість утворення сполук між вуглеводами і білками має позначатися на структурних властивостях та стійкості молочних продуктів з добавками порошку й екстракту цикорію.

Мета цієї роботи — дослідження взаємодії білкових речовин з вуглеводами цикорію у модельних молочно-цикорних сумішах для подальшого використання при розробленні технологій цикорієвмісних молочних продуктів.

Розробляючи рецептури і технології харчових продуктів, треба враховувати той факт, що біологічна цінність будь-якого виробу зумовлена якісним складом продукту [6]. При цьому важливою характеристикою є вміст білкових речовин. На думку М.П. Чернікова, цінність харчового білка — поняття комплекс-

The interaction of protein substances with chicory carbohydrates in model milk — chicory mixtures have been learned and analysed for further using by development the technology of chicory-containing milk products. Such kinds of interaction were established by the polarimetric, chromatographic and electrophoretic methods in model systems and industrial samples.

Key words: chicory, milk, protein, carbohydrates, electrophoresis, specific, polarization.

не, яке складається з таких головних характеристик: якісний склад білка; наявність і збалансованість усіх есенціальних амінокислот; ступінь перетравлюваності білка і доступності для організму людини [7].

Вміст амінокислот визначали на автоматичному аналізаторі амінокислот ТТТ 339 виробництва Чехії, використовуючи катіонообмінну смолу LD ANB з активною групою SO_3^- . Зразок, приготовлений за стандартною методикою, розчиняли у 15...20 cm^3 буфера з рН 2,2 та наносили на іонообмінну колонку ААА Т-339 за допомогою дозатора (об'єм 0,2 cm^3). Якісний склад суміші амінокислот визначали, порівнюючи хроматограми стандартної і досліджуваної суміші їх (табл.1).

Таблиця 1

Результати аналізу амінокислотного складу молока (розрахунок на 100 cm^3 зразка)

Амінокислота	Зразок					
	Молоко без цикорію			Молоко з масовою часткою цикорію 1,2 %		
	Маса, мг	% до маси	СКОР, %	маса, мг	% до маси	СКОР, %
Лізин	180,563	7,56	137	150,887	7,39	134
Гістидин	61,684	2,58		52,194	2,56	
Аргінін	84,760	3,55		57,885	2,83	
Аспарагінова кислота	126,141	5,28		104,313	5,11	
Треонін	98,373	4,12	103	81,978	4,01	100
Серин	118,642	4,97		103,467	5,07	
Глутамінова кислота	478,240	20,03		490,000	23,99	
Пролін	296,700	12,42		241,500	11,82	
Гліцин	50,662	2,12		42,020	2,06	
Аланін	77,303	3,24		62,300	3,05	
Цистин	13,187	0,55	89	10,286	0,50	81
Валін	159,964	6,70	134	127,166	6,23	125
Метіонін	60,887	2,55		47,522	2,33	
Ізолейцин	116,849	4,89	122	91,210	4,47	112
Лейцин	233,774	9,79	140	190,423	9,32	133
Тирозин	112,660	4,72	161	91,346	4,47	155
Фенілаланін	117,615	4,93		98,154	4,81	
Сума	2388,006	100,0		2042,648	100,0	

Незначне зменшення кількості амінокислот можна пояснити передбачуваною взаємодією під час теплового оброблення між білковими речовинами молока і вуглеводами цикорію. Також це можна по-

яснити розведенням молока екстрактом цикорію, що додається. А збільшення глютамінової кислоти у молочно-цикорних сумішах пояснюється її високим вмістом безпосередньо в екстракті цикорію.

Через низьку активну кислотність екстракту цикорію можуть відбуватися структурні зміни білкових молекул у молочно-цикорних сумішах. Окрім того, не досліджено природу зв'язків між білковими речовинами молока та вуглеводами цикорію. Зважаючи на вищезазначене, доцільним є ретельний аналіз стану білків молока, один із методів якого — електрофорез у поліакриламідному гелі.

Електрофоретичний аналіз білків молока включає широкий спектр сучасних методичних і технічних підходів: використання різних буферних систем (з кислим чи лужним значенням рН), ізоелектрофокусування, двовимірний і капілярний електрофорез і т.ін.

Для якісного і кількісного аналізу білків молока в роботі використовували метод диск-електрофорезу в системі Лемлі. Ця методика проста у виконанні, не потребує громіздкого і дорогого устаткування і дає змогу в поєднанні із сучасними методами обчислення електрофореграм дістати відомості про якісний і кількісний склади білків молочних продуктів, а також кількісно охарактеризувати кожен білковий компонент окремо.

Відмінною рисою диск-електрофорезу є полімеризація в пластині двох гелів: робочого дрібнопористого і безпосередньо над ним — "концентрувального" з великими порами. Використання гелю, що концентрує, сприяє ефективному поділу білків у діапазоні від 1000 до 400 000 Да без застосування спеціальних методичних "прийомів".

Змінюючи густину поліакриламідного гелю в рамках цієї системи із зміненням відсотка поліакриламід у процесі формування пластини, можна досягти максимально ефективного поділу білкових смуг у тій зоні молекулярних мас, що потрібна для конкретного білкового препарату.

Електрофорез проводили на апараті Нооїєг Мі[^]Біу 8та11 (АтегзБат Біоасієпсез) при силі струму 19 мА для „концентрувального” і 36 мА — для розподільного гелів. Візуалізацію поліпептидних зон проводили забарвленням їх у 0,1% -му розчині кумасі С-250, у 25%-му ізопропіловому спирті та 10%-й оцтовій кислоті протягом 10... 15 хв з наступним відмиванням 10% -м розчином оцтової кислоти. На *рис.1* наведено електрофореграму зразків молока з екстрактом цикорію та без нього.

Щоб одержати зразки, використовувані при електрофоретичному аналізі молочних продуктів,

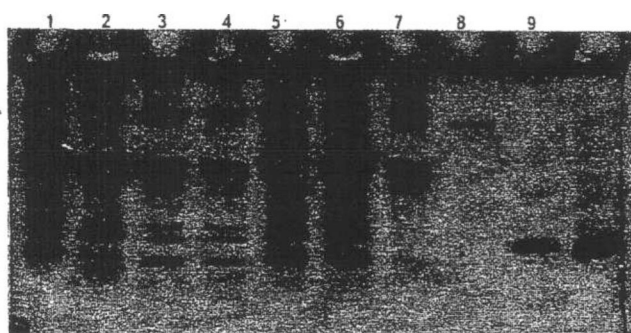


Рис. 1. Електрофореграма результатів аналізу зразків білків молока з екстрактом цикорію (2, 4, 6-й треки) и без неї (1, 3, 5-й треки); 7-й трек — препарат казеїну; 8-й — альбумін (67 кДа); 9-й — лізоцим (14,3 кДа); 10-й трек — α -лактоглобулін (14,2 кДа)

застосовували комбінування методів осадження білків оцтовою кислотою, сірчанокислим амонієм і трихлороцтовою кислотою.

Електрофореграми обробляли за допомогою програми Іта[^]е Мазієг Тоіаі БаБ у.2.01 (АтегзБат Біоасієпсез). Результати вимірювань і розрахунків наведено в *таб. 2*.

Таблиця 2

Якісний і кількісний склади білків у зразках молока з екстрактом цикорію і без нього (за даними диск-електрофорезу)

	Концентрація білка , мг/мл	
	з цикорієм	без цикорію
120...118	0,499	0,423
112...107	0,19	0,158
104...102	0,147	0,066
83...81	0,15	0,2
79... 78	0,178	0,254
76... 72	0,479	0,21
30...29	2,039	2,473
27	1,650	1,863
26...25	1,224	1,613
19... 18	1,02	0,728
17...15	1,364	1,412
14...13	0,575	0,734
Сума	9,555	10,136

Порівнюючи електрофоретичні характеристики молока з екстрактом цикорію і без нього, можна дійти висновку, що за винятком білкових смуг з молекулярними масами 19...18, 104...102, 112...107, 120...18 кДа, у зразку молока з екстрактом цикорію відповідні білки мають меншу концентрацію порівняно зі зразком молока без екстракту. Можна припустити, що внесення цикорію спричинює дестабілізацію структури білків, а це під час теплового оброблення стимулює денатурацію й осадження порівняно із звичайним молоком. Підвищення концентрації окремих білкових смуг у зразку з екстрактом може свідчити про стабілізуювальну дію цикорію саме на ці білкові зони в процесі теплового оброблення, що і сприяє тривалому збереженню їх порівняно із звичайним молоком.

Зважаючи на те що методом електрофорезу визначається вільний білок в іонній формі, то парадоксальне на перший погляд зменшення кількості білків та амінокислот після пастеризації за наявності добавок цикорію можна пояснити тим, що в разі нагрівання білків з вуглеводами цикорію (під час пастеризації) білкові речовини частково зв'язуються у комплексні сполуки з вуглеводами, які є нерухомими в електричному полі, а тому не можуть бути визначені стандартними електрофоретичними методами.

Щоб з'ясувати природу зв'язків між білками та вуглеводами у молочно-цикорних сумішах, треба глибше вивчити вуглеводний склад екстракту цикорію. Для оцінення вмісту вуглеводів у порошок та екстракті цикорію ми зупинили свій вибір на хроматографії в закріпленому тонкому шарі, використовуючи пластинки "CorMiI" марки ПТСХ-АФ-А з силікагелем типу С ТХ-1А на алюмінієвій основі розміром 10 на 15 см. Під час розроблення методики значну увагу приділено добору компонентів суміші роз-

чинників та їх співвідношенню як головному чиннику, що впливає на тривалість визначення і на значення R_t досліджуваних компонентів.

Випробувано ряд сумішей розчинників, які порівнювали за тривалістю проходження фронту розчинника. Найкращі результати як за швидкістю визначення, так і за розділенням компонентів (різницею значень R_t) одержано в разі використання суміші складу етилацетат : етанол : вода = 3:4:2. Спостерігалось чітке розділення компонентів вуглеводного комплексу за порівняно невеликої тривалості проходження фронту розчинника — 1,5 год. Як проявник обрано о-толуїдин у спиртовому розчині (0,5 мл о-толуїдину, 0,4 г саліцилової кислоти в 10 мл 96%-го спирту).

Порівняння вуглеводних складів порошку й екстракту цикорію доводить, що відносна кількість моносахаридів і фруктанів нижчого ступеня полімеризації в екстрактах перевищує аналогічні показники для порошоків цикорію, що можна пояснити частковим гідролізом інуліну у складі цикорію під час промислового екстрагування цикорію при температурі 80 °С.

Для того щоб можна було дослідити взаємодію вуглеводів з білковими речовинами молока, складено модельні суміші вуглевод — амінокислота і вуглевод — білок. У ряду вуглеводів випробувано інулін і продукти його гідролізу — моносахариди фруктозу й глюкозу, дисахарид сахарозу. Щоб одержати повнішу інформацію про вплив будови молекули вуглеводу, зокрема довжини ланцюга глікозних залишків, відновлювальної здатності тощо, на взаємодію з амінокислотами і білками та встановити загальні залежності й закономірності, ряд продуктів безпосереднього гідролізу інуліну цикорію (фруктоза, глюкоза, сахароза) доповнено відновлювальним дисахаридом лактозою, а також трисахаридом рафінозою.

Щоб контролювати зміни у поведінці вуглеводів за наявності амінокислот і білків, вимірювали кут обертання площини поляризації в серіях досліджуваних сумішей. При цьому виходили з тих міркувань, що будь-які види взаємодії оптично активної речовини з іншими речовинами мають змінити значення поляризації вихідної сполуки. Тобто зміна поляризації розчину вуглеводу з додаванням білкових речовин, що відрізняється від поляризації при звичайному розведенні, мають свідчити про наявність взаємодії між вуглеводом і доданою сполукою.

З метою усунення похибок від впливу інших оптично активних речовин під час оцінювання поляризації таких сумішей в перших серіях дослідів вивчали взаємодію вуглеводів з оптично неактивною амінокислотою (з тих, що входять до складу молока) — гліцином. А для того щоб усунути можливість змінення поляризації розчину внаслідок звичайної мутаротації, властивої моносахаридам і відновлювальним дисахаридам, досліджували взаємодію гліцину з сахарозою.

Взаємодію систем вуглевод — амінокислота в загальному випадку вивчали в сумішах з молярними співвідношеннями 1:1, 1:2 та 2:1. А в системах, де складовими були біополімери інулін та альбумін, використовували відповідні масові співвідношення, зважаючи, з одного боку, на різний порядок молекулярних мас полімеру і мономеру, а з другого боку — на те, що мономер з полімером у цих серіях дослідів (наприклад, глюкоза з альбуміном або гліцин з інуліном) має взаємодіяти одночасно кількома молекулами по окремих ланках полімерного ланцюга.

Поляризацію вимірювали окремо в кожному вихідному розчині зразу після змішування та після кількох годин відстоювання при кімнатній температурі. Щоб пришвидшити взаємодію, реакційну суміш інколи нагрівали.

На рис. 2 наведено деякі діаграми залежності питомої поляризації систем вуглевод — амінокислота та вуглевод — білок від складу системи (ряд 1 — співвідношення 1:1, ряд 2 — 1:2, ряд 3 — 2:1; для системи інулін — гліцин ряд 1 — 10:1, ряд 2 — 10:2, ряд 3 — 20:1, ряд 4 — 10:4, ряд 5 — 1:1, ряд 6 — 10:2 з нагріванням).

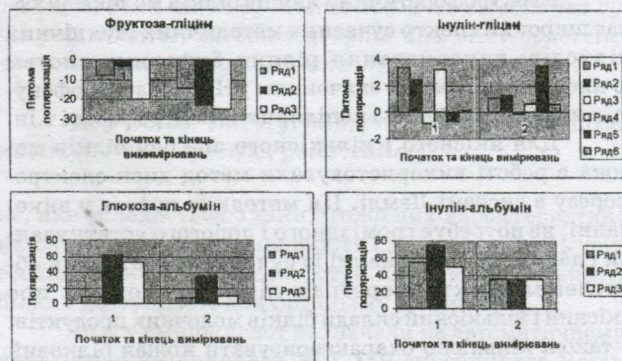


Рис.2. Залежність поляризації сумішей від їхнього складу

Із порівняння результатів вимірювання поляризації зазначених розчинів видно, що в усіх досліджених сумішах спостерігається помітне відхилення значень поляризації розчинів після певного часу реакції від вихідних даних. Особливо суттєвим є таке відхилення для сумішей амінокислоти з фруктозою — основною структурною одиницею молекули інуліну.

Оскільки поляризації сумішей, з яких вуглевод і білкова сполука взяті в різних співвідношеннях, суттєво відмінні, то можна припустити, що вуглеводи з білками утворюють комплекси різного складу, які різняться фізико-хімічними характеристиками, зокрема оптичною активністю.

Отже, результати дослідження поляризації розчинів сумішей вуглеводів з амінокислотами і білками вказують на наявність взаємодії між зазначеними біоорганічними сполуками, яка полягає в утворенні комплексів з різним співвідношенням складових, про що свідчать різні значення питомого обертання таких сумішей. Механізми утворення вуглеводно-білкових комплексів та склад їх потребують подальшого детального дослідження.

Висновки:

1. З допомогою тонкошарової хроматографії в закріпленому шарі досліджено вуглеводний склад екстрактів цикорію, одержаних у промислових і лабораторних умовах; встановлено відносно збільшення частки моносахаридів, зокрема фруктози, а також фруктанів меншої молекулярної маси внаслідок зменшення частки інуліну в екстрактах порівняно з порошком цикорію.

2. Досліджено залежність поляризації розчинів модельних систем вуглевод — амінокислота та вуглевод — білок від співвідношення компонентів системи; встановлено наявність взаємодії між вуглеводами цикорію і білковими речовинами, що, можливо, сприяє утворенню комплексних сполук з різним співвідношенням компонентів.

3. Проаналізовано амінокислотний склад зразків пастеризованого молока з додаванням екст-

ракту цикорію та без нього; встановлено відхилення сумарної кількості амінокислот у зразку з цикорієм порівняно з пастеризованим молоком.

4. Проведено електрофоретичний аналіз білкового складу досліджених зразків; встановлено відхилення сумарного значення концентрацій окремих фракцій білків молока за молекулярною масою.

5. Поляриметричними, хроматографічними та електрофоретичними методами встановлено взаємодію між вуглеводами цикорію та амінокислотами і білками молока в модельних системах і промислових зразках молочного-цикорних сумішей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. России №2000802. Сбор лекарственных трав для лечения сахарного диабета "Лидия" / Пономарева А.Г., Поверин Д.И.- Заявл.08.10. 92; Опубл. 15.10. 93, Бюл. №37-38.

2. Яворський О.І. Ліки з цикорію — цінні та ефективні засоби в арсеналі практичного лікаря // Практична медицина. — 1997. — №1-2. — С.48-53.

3. Яворський О.І., Зузук Б.М., Роговська Л.Я. Біологічно активні речовини та фармакологічна активність коренів цикорію // Фармацевт, журн — 1993. — №1. — С.70-75.

4. Inuiin and Inuiin-sopaiipine Stovv (Eiieie by A.PisBz). — Aшвiегсіат — Бопйоп — Ме^ Уогк — Токуо*8сіепсе рiвiвiнд, 1993. — С.418.

5. КоБеоIII МЛ, Уап Ёоо ^А, ОiБзон ОЛ. ТЪе ЁiШогепіс пайге о& сЫсору іпiііп ап<i ііз Бугіроіузіз ргоіуісіз // «I. Ииіг. —1998. — Уoi.128 MI — С.11-19.

6. Остерман ЛА. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование: — М.: Наука, 1981. — 286 с.

7. Уап Неккен ОХ., ТНотрзон М.Р. Аррііаііоп о і РЪааіЗузіеш іо іЪе геаоііуоп о& ЁОУПЕ тіік ргоіеіпв оп игеа-роіуасгуіаііе &e! еіесігорЪогезіз. // <I. Баігу 8сі. — 1992. — Мау; 75 (5). — С.1204-1210.

Надійшла до редколегії 07.04.05 р.