

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО
ВОДОРАСТВОРИМОГО КОМПЛЕКСА БИОПОЛИМЕРОВ
ВИНОГРАДНОЙ ЯГОДЫ

Е. Н. ДАТУНАШВИЛИ, Е. Г. МАНРИКЯН, В. Н. ЕЖОВ, Т. П. ЛЕДЕНКОВА

Из виноградного сока выделены водорастворимые препараты высокомолекулярной природы. Методами последовательного фракционирования предпринята попытка выделить свободный от примесей препарат полисахаридов. Во всех изучаемых фракциях, включая наиболее очищенные, выявлен ряд аминокислот и фенольных веществ, а также металлов. Наличие в препаратах таких индивидуальных веществ, идентифицированных после кислотного гидролиза, как оксипролин, серин, эпикатехин и цис-коричная кислота, а также галактоза и арабиноза, позволяет предполагать присутствие в виноградной ягоде водорастворимых высокомолекулярных комплексов белка, полисахаридов и полифенолов или их олигомерных фрагментов.

Ключевые слова: биохимия винограда, аминокислоты, биополимеры.

В нашем предыдущем сообщении [4] были представлены результаты исследования возможной химической природы комплекса биополимеров клеточных стенок виноградной ягоды. Показано, что вероятными звеньями связи биополимеров в комплекс являются: в составе полисахаридов— арабиноза, галактоза и ксилоза; в белках— оксипролин, серин и фенилаланин; среди фенольных компонентов—эпикатехин.

Представляло интерес установить, образуются ли комплексы между водорастворимыми высокомолекулярными соединениями виноградной ягоды, каковы их химическая природа и возможный источник образования.

Систематических исследований такого рода, насколько нам известно, нет. Большинство доступных нам работ посвящено главным образом биополимерам виноградных вин, и распространять имеющиеся в них сведения на нативные компоненты виноградной ягоды можно лишь в первом приближении. Наиболее полно из индивидуальных высокомолекулярных соединений виноградной ягоды изучены белки [9, 11]: представлена их классификация по Осборну; установлена молекулярная гетерогенность и электрофорезом в геле ПАА идентифицированы зоны, дающие положительное окрашивание одновременно на белок и углеводы. На всех стадиях технологического процесса приготовления красных вин изучены фенольные вещества [2], определены возможные пути их конденсации с образованием нерастворимых осадков. Анало-

гичным образом исследовали полисахариды [6] и липиды виноградного сока и вин [10]. О возможном присутствии в виноградных винах протеин-полисахарид-полифенольного комплекса говорится в работе Датунашвили и сотр. [6]; высказывается предположение о наличии в соке винограда гликопротеидов [8].

В числе фундаментальных исследований, касающихся комплекса биополимеров других представителей высших растений, необходимо отметить прежде всего работы Вухерифеинга [13], показавшего на примере черной смородины возможность образования комплекса полифенолов с пектином, а также исследования Оссо [12], наблюдавшего образование белок-полисахаридного комплекса в малиновом соке.

Одним из распространенных в биохимии растений приемов, используемых для определения состава комплекса высокомолекулярных соединений, является ступенчатое фракционирование, предусматривающее очистку доминирующего компонента от минорных примесей, с последующим качественным и количественным анализом выделенных препаратов. Этот принцип, предполагающий очистку полисахаридов от не связанных с ними белковых и фенольных компонентов [5, 19], был использован нами для исследования комплекса биополимеров винограда.

Материал и методика. Исследовались спиртонерастворимые осадки, полученные из виноградного сока после добавления к нему этанола (3:1, об/об). Осадки отделяли центрифугированием (6000), промывали разбавленным (50% об.) и 96%-ным спиртом, затем высушивали над хлористым кальцием или пятиокисью фосфора под вакуумом. Исходный препарат (СНО) суспендировали в 10-ти объемах концентрированного Na—фосфатного буфера (рН 3, 2), затем центрифугированием отделяли водонерастворимый остаток ВНО (схема). Супернатант подвергали диализу против дистиллированной воды в течение 24 ч и водорастворимую фракцию ВРО получали осаждением этанолом (3:1, об/об).

Выделенный водорастворимый препарат обрабатывали папаином, для удаления свободного белка— 0,03% вес., 37°, 72 ч, и далее диализовали против воды, в результате чего была получена частично очищенная фракция ВРО₁. Затем следовала обработка суспензией фенол: вода (1:1 об/об, модуль 1:10, 5°, 1 ч) для удаления липопротеидов и частично— свободных фенольных веществ [5]. Следующий этап предусматривал центрифугирование суспензии, отделение водной фазы и осаждение этанолом, в результате получали очищенную фракцию ВРО₂.

Водонерастворимый остаток «депротенизировали» с помощью папаина, затем ацетилировали. Процедура ацетилирования включала нагрев с пиридином (модуль 1:40, 70°, 2 ч), суспендирование в уксусном ангидриде (4:15, об/об) с тщательным перемешиванием в течение 72 ч в темноте. Полученную смесь вливали в воду (1:3, об/об), нерастворимую фракцию отделяли центрифугированием, промывали последовательно водой, этанолом, серным эфиром и сушили над хлористым кальцием или пятиокисью фосфора. С целью исчерпывающего ацетилирования процедуру обработки уксусным ангидридом повторяли еще дважды. Поскольку ацетилированный препарат ВНО не образовывал в дальнейшем фракций с использованием пиридина и смеси хлороформ: этанол [19], его дезацетилировали в растворе едкого калия (20°, 24 ч) и нейтрализовывали на льду до рН 5,0. При этом часть препарата теряла растворимость, она была отделена центрифугированием (ВНО₁), растворимая часть выделялась осаждением этанолом (5:1, об/об) и в результате была получена очищенная фракция ВНО₂.

В полученных препаратах определяли аминокислотный состав гидролизата белкового компонента, состав полисахаридов, связанные фенольные вещества и ме-

**Схема фракционирования спиртонерастворимых препаратов,
выделенных из виноградного сока.**

С О К

осаждение этанолом,
отделение осадка,
промывка, высушивание

С Н О

(спиртонерастворимый остаток)

обработка концентрированным
фосфатным буфером, pH 3,2

ОСАДОК

РАСТВОР

центрифугирование,
промывка этанолом,
высушивание, обработка
папанином

диализ, осаждение этанолом,
обработка папанином (0,03%
вес, 37°, 72 ч)

В Н О

В Р О₁

(водонерастворимый
остаток)

(водорастворимый остаток)

ацелирование,
фракционирование
пиридином и смесью хлоро-
форм: этанол, дезацелиро-
вание, нейтрализация

обработка суспензией фенол:
вода (1:1,1 ч, 5°), центрифуги-
рование, отделение водной
фазы, осаждение этанолом,
промывка, высушивание

ОСАДОК

В Р О₂

(водорастворимый остаток)

центрифугирование,
промывка, высушивание

РАСТВОР

В Р О₁

(«водонерастворимый»
остаток)

промывка, высушивание
осаждение этанолом,

В Н О₂

(«водонерастворимый»
остаток)

таллы по методике, описанной нами ранее [4]. В некоторых фракциях дополнительно определяли содержание гексозаминов с использованием реактива Эльсона-Моргана [3].

Результаты и обсуждение. Данные об изменении по мере очистки состава полисахаридов сока приведены в табл. 1.

В исходном препарате СНО из сока в составе полисахаридов доминируют галактоза, глюкоза и ксилоза. Очищенный препарат ВРО₂ содержал только 47% углеводов, что говорит о возможном присутствии в нем интересующих нас комплексов. Нерастворимая в воде часть (ВНО) содержала гораздо меньше полисахаридов (около 7%), и это количество мало изменялось в ходе фракционирования. В составе очищенной фракции ВНО₂ преобладала манноза, галактуроновая кислота и арабиноза; два последних моносахарида и глюкоза составили основу очищенной водорастворимой фракции.

Отличительной чертой высокомолекулярной водорастворимой фракции виноградной ягоды явилось то, что при ее выделении путем осаж-

Таблица 1

Углеводный состав гидролизатов высокомолекулярных фракций виноградного сока

Моносахаридные составляющие, % вес.	Выделенные фракции и их процентное соотношение			
	СНО—100%	ВРО ₂ —2,75	ВНО—54,5	ВНО ₂ —19,9
Галактуроновая кислота	2,16	11,05	следы	3,41
Глюкуроновая кислота	следы	0,98	—	—
Рамноза	следы	4,62	—	—
Галактоза	4,9	3,78	1,55	0,8
Глюкоза	4,22	9,92	0,47	0,59
Манноза	1,44	2,79	1,21	4,14
Арабиноза	0,63	12,2	3,32	1,23
Ксилроза	3,29	2,05	следы	0,32
Сумма	16,64	46,49	6,55	10,49

дения этанолом часть биополимеров (ВНО) утратила первоначальную растворимость в воде. Тот факт, что препараты ВНО не отличаются высоким содержанием углеводов, позволяет не считать полисахариды определяющей причиной потери водорастворимости.

Белковая часть высокомолекулярной водорастворимой фракции виноградной ягоды представлена 15-ю аминокислотами, идентифицированными методами газожидкостной хроматографии (ГЖХ) (табл. 2).

Таблица 2

Аминокислотный состав гидролизата высокомолекулярных соединений сока, % к сумме

Аминокислота	Наименование фракции			
	СНО	ВРО ₂	ВНО	ВНО ₂
Валин	следы	следы	следы	2,01
Глицин	2,01	9,78	8,2	6,22
Изолейцин	1,38	следы	следы	1,0
Лейцин	следы	18,5	4,1	30,0
Метионин	4,83	следы	следы	—
Аспарагин	5,44	3,26	4,92	3,01
Орнитин	следы	следы	4,92	следы
Лизин	следы	следы	4,1	следы
Треонин	2,42	4,35	следы	3,01
Глутамин	35,42	15,3	12,3	15,1
Фенилаланин	3,22	13,0	13,1	3,01
Тирозин	6,44	13,0	14,8	11,0
Серин	11,27	14,1	следы	13,0
Пролин	9,66	8,7	5,74	7,02
Оксипролин	17,71	следы	27,86	5,52

Большинство очищенных фракций и все исходные содержали оксипролин—аминокислоту, являющуюся своеобразным «маркером» гликопротеинов, или протеогликанов высших растений [18]. Процентная доля этой аминокислоты в исходной фракции СНО составила около 18%, а в водонерастворимом препарате ВНО—свыше 25% от суммы amino-

кислот. Столь высокое содержание оксипролина характерно для коллагеноподобных белков растительного происхождения [1], обнаруженных в клеточных стенках.

Из других аминокислот в исходном препарате СНО из сока в больших количествах найдены глутамин, пролин и серин. В отличие от оксипролина, последний представляет интерес в связи с тем, что может образовывать иной тип белок-полисахаридной связи— через галактозил-серин [16].

По мере фракционирования водорастворимых и водонерастворимых фракций спиртоосажденного препарата из сока содержание оксипролина резко снижалось. Это может быть объяснено тем, что при удалении неассоциированного протеина путем обработки папаином происходило разрушение части белок-углеводного комплекса по типу, описанному для маннан-белкового комплекса дрожжей [7].

В очищенных водорастворимой (ВРО₂) и водонерастворимой (ВНО₂) фракциях из сока преобладали лейцин, глутамин, серин, тирозин; во фракции ВРО₂ обнаружено также большое количество фенилаланина.

Выборочное определение гексозаминов во фракции СНО сока показало отсутствие указанных соединений. Это позволяет предположить, что белок-полисахаридный комплекс виноградного сока не может быть отнесен к гликопротеинам [14].

Содержание фенольных веществ в анализируемых образцах представлено в табл. 3.

Таблица 3

Фенольный состав гидролизатов высокомолекулярных фракций виноградного сока

Фенольный компонент	Фракция, содержание фенольных в-в, % вес			
	СНО	ВРО ₂	ВНО	ВНО ₂
Эпигаллокатехин	3,14	—	—	—
(—) эпикатехин	0,91	7,74	3,97	следы
Фенолоксиклоты:				
шикимовая	26,9	следы	следы	—
цис-коричная	2,93	следы	37,89	18,67
сиреневая	0,13	0,41	следы	—
галловая	0,01	—	—	—
протокатеховая	0,01	следы	следы	—
гентиизиновая	следы	—	—	—
п-кумаровая	следы	0,43	следы	—
хинная	следы	—	—	—
ванилиновая	следы	следы	—	—
Неидентифицированные фенольные вещества, с температурой удерживания, °С	177, 192, 199, 200, 213	124, 139	142	—

Наиболее часто встречающимся фенольным компонентом во фракциях, выделенных из сока, является эпикатехин, который может рассматриваться как наиболее вероятный «мостик», осуществляющий связь с полисахаридами. Значительные количества этого вещества бы-

ли найдены нами ранее в клеточных стенках виноградной ягоды [4].

В исходном препарате СНО в значительных количествах обнаружены пикимовая и дис-коричная кислоты. Однако первая из них в остальных фракциях практически отсутствует, что позволяет предположить ее соосаждение по адсорбционному механизму при выделении фракции СНО. Дис-коричная кислота в составе очищенной фракции ВРО₂ обнаружена в следовых количествах, в препарате ВНО ее содержание очень велико, 37,9% (ВНО) и 18,7% (ВНО₂). Это позволяет говорить о связи дис-коричной кислоты с высокомолекулярными соединениями, выделенными из сока. При изучении арабиногалактана пшеничной муки было показано, что одна из оксикоричных кислот—феруловая—осуществляет связь с пентозанами [15]. По Маквэлдеру и Ньюкому [17], при окислительной конденсации двух молекул феруловой кислоты, ассоциированной с полисахаридами, происходит «сшивка» молекул полисахарида и понижение их растворимости в воде. Этот процесс может быть положен в основу интерпретации полученных нами данных.

Источником комплекса водорастворимых биополимеров виноградной ягоды являются, по-видимому, клеточные стенки, о чем свидетельствует схожесть аминокислотного, углеводного и фенольного состава фракций, выделенных из клеточных стенок и водорастворимых компонентов, в частности, наличие оксипролина, серина, эпикатехина, галактозы и арабинозы. Созревание и размягчение виноградной ягоды может сопровождаться гидролитическими процессами, обуславливающими деградацию биополимеров клеточных стенок и переход их крупных фрагментов в водорастворимое состояние. Затем, в условиях присутствия свободных оксикоричных кислот, возможно их связывание с эпикатехин-белок-углеводным комплексом, сопровождающееся окислительной конденсацией молекул и снижением их водорастворимости.

Очищенный препарат комплекса биополимеров ВРО₂ с целью его более подробной характеристики был подвергнут хроматографии на колонке, заполненной целлюлозой ДЭАЭ (табл. 4), в результате чего эта фракция разделилась на две (колонка уравновешена фосфатом) и пять элюируемых зон (боратный буфер). Две из последних— «неудерживаемая» и элюируемая 0,7М боратом— углеводов практически не содержали. Наибольшее содержание моносахаридов найдено в зоне, элюируемой едким натром (фосфатная форма) и 1,28М боратом— 18,69 и 24,69% соответственно. В составе полисахаридов и белка доминируют арабиноза, галактоза, глутамин, тирозин, серин, фенилаланин. Тот факт, что последовательное фракционирование с последующей ионообменной хроматографией не приводит к значительному преобладанию того или иного компонента в составе биополимеров, может говорить о наличии нескольких вариантов их связи в комплекс.

Полуколичественный анализ содержания металлов в изучаемых препаратах из сока показал присутствие в больших количествах же-

Хроматография очищенной фракции водорастворимых биополимеров
виноградной ягоды на ДЭАЭ-целлюлозе

Моносахариды и аминокислоты в составе комплекса биополимеров	Содержание в элюате, мг, для колонки в форме						
	фосфатной		боратной				
	неудерживаемая зона	0,1 н едкий натр	неудерживаемая зона	0,2 м борат	0,7 м борат	1,2 м борат	0,1 н едкий натр
У г л е в о д ы							
Галактуроновая кислота	—	5,16	—	—	—	4,62	3,39
Галактоза	—	2,85	—	—	—	4,47	—
Глюкоза	0,62	2,46	следы	6,6	—	2,43	2,29
Манноза	0,51	3,0	следы	—	—	3,12	1,47
Арабиноза	0,76	3,03	следы	3,24	—	6,12	2,3
Рамноза	0,87	2,19	—	—	—	3,93	2,52
Сумма	2,76	18,69	следы	9,84	—	24,69	11,97
А м и н о к и с л о т ы							
Валин	0,09	0,077	0,065	0,087	0,116	0,080	0,083
Глицин	0,052	0,08	0,038	0,065	0,086	0,072	0,048
Изолейцин	0,033	0,03	0,014	0,005	0,036	0,041	0,014
Лейцин	0,055	0,068	0,027	0,013	0,068	0,055	0,027
Метионин	следы	—	следы	—	—	—	—
Аспарагин	0,041	0,034	—	—	0,023	0,075	0,016
Орнитин	следы	—	следы	следы	—	—	—
Лизин	следы	—	—	—	—	—	—
Треонин	0,024	0,094	0,01	—	0,026	0,022	0,022
Глутамин	0,068	следы	0,034	—	0,084	0,107	0,057
Фенилаланин	0,035	0,050	0,019	0,026	0,048	0,079	0,026
Тирозин	0,019	0,026	0,005	0,026	0,026	0,093	0,026
Серин	0,050	0,062	0,047	следы	0,091	0,086	0,062
Пролин	следы	следы	следы	следы	следы	следы	следы
Оксипролин	следы	—	следы	—	—	—	—
Сумма	0,467	0,521	0,259	0,222	0,604	0,710	0,381

леза, кальция, кремния, фосфора, в малых—алюминия, магния, меди, хрома. По мере фракционной очистки практически не снижалось только содержание железа и кальция, остальные металлы были найдены в исчезающе-малых количествах. Наличие кремния в препаратах может объясняться, согласно нашей гипотезе, их происхождением из клеточных стенок ягоды. Согласно Бардинской [1], в клеточных стенках высших растений встречаются отложения солей типа $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Таким образом, проведенные исследования показали, что по крайней мере часть водорастворимых биополимеров виноградной ягоды представлена в виде комплексов. Наиболее вероятными звеньями связи индивидуальных соединений в комплекс являются: в полисахаридах— арабиноза, галактоза; в белках— оксипролин, серин, тирозин и фенилаланин; в составе фенольных веществ—эпикатехин и цис-коричная кислота.

ԽՍՂՈՂԻ ՊՏՂԻ ԶՐՈՒՄ ԼՈՒՄԵԼԻ ԲԱՐՁՐ ՄՈԼԵԿՈԼԻՅԱՐ
ՐԻՈՊՈԼԻՄԵՐ ԿՈՄՊԼԵՔՍԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ

Ե. Ն. ԴԱՏՈՆԱՏՎԻԼԻ, Ե. Գ. ՄԱՆՐԻԿՅԱՆ, Վ. Ն. ԵՅՈՎ, Տ. Պ. ԼԵԴԵՆԿՈՎԱ

Կատարված է խաղողի պղպղի ջրում լուծելի բարձր մոլեկուլյար միացու-
թյունների անջատում և ֆրակցիոն մաքրում:

Մաքրման ընթացքում և ալյուճեան մաքրված պրեպարատները ենթարկ-
վել են բրոմատոգրաֆիկ հետազոտման՝ ԳԷՄԷ-ցելուլոզայի վրա որոշելով պո-
լիշաքարների, սպիտակուցների և ֆենոլային միացությունների քանակական
և որակական կազմը: Կատարված է նաև մետաղների կիսաքանակական անա-
լիզ: Հաստատված է, որ պոլիշաքարների, սպիտակուցների և ֆենոլային նյու-
թերի մի մասը քաղցուի մեջ ներկայացված են կոմպլեքսների ձևով: Առանձ-
նացված են քաղցուի քաղաղրանյութերի ավելի հավանական կապեր առա-
քինողայի և զալակտոզայի միջոցով՝ պոլիշաքարների կազմում, օքսիպրոլի-
նի, սերինի, ֆենիլալանինի և տիրոպինի՝ սպիտակուցներում, էպիկատեխինի
և ցիսկորինային թթվի՝ ֆենոլային նյութերի կազմում:

Զրում լուծվող բարձր մոլեկուլյար նյութերի մաքրված ֆրակցիաներում
ցույց է տրված որոշ մետաղների սուկսյուլֆոն՝ այդ թվում կրկաթի և կրեմնի:

INVESTIGATIONS OF THE HIGH MOLECULAR WATER-
SOLUBLE COMPLEX OF BIOPOLYMERS OF A GRAPE BERRY

E. N. DATUNASHVILY, E. G. MANRIKIAN, V. N. EZHOV, T. P. LEDENKOVA

High molecular weight water-soluble preparations were isolated from grape juice. An attempt was made to isolate free of contaminations poly-saccharide preparation, using methods of step-by-step fractionation, including enzymatic degradation, removal of contaminants, acetylation with the consequent separation, chromatography on DEAE cellulose column. The presence of a number of amino acids and phenolic compounds as well as metals was shown in all fractions under investigation including the most purified ones. The presence of the compounds such as hydroxyproline, serine, epicatechin and cis-cinnamic acid as well as galactose and arabinose in the preparations allows to suppose the presence of water-soluble, high molecular weight complexes of proteins, polysaccharides and polyphenols or their oligo-residues..

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бардинская М. С. Растительные клеточные стенки и их образование. М., 160, 1964.
2. Валуйко Г. Г. Биохимия и технология красных вин. М., 296, 1973.
3. Готтилак А. Гликопротеины, 1, М., 530, 1972.
4. Датунашвили Е. Н., Манрикий Е. Г., Ежов В. Н., Упервицкий Е. Ю. Биолог. ж. Ар-
мении, 32, 7, 682—690, 1979.
5. Датунашвили Е. Н., Ежов В. Н. Прикл. биохим. и микроб., 12,5, 767, 1976.
6. Датунашвили Е. Н., Павленко Н. М., Маликова В. Я. Влияние технологических
приемов обработки вин на стабильность их к коллоидным помутнениям. 3, Сим-
ферополь, 1971.

7. Исаева В. С., Жвирблянский А. Ю. Успехи микробиологии, 11, 174, 1976.
8. Каменская Э. В., Бутков В. В., Захарова Е. В. Реф. сб. Винодельческая промышленность, 5, 8, 1974.
9. Миндадзе (Любаревич) Т. А. Автореф. канд. дисс., Тбилиси, 1980.
10. Мехуэла Н. А., Курганова Г. В., Нагайчук В. В. Садов., винопр. и винод. Молдавии, 3, 34, 1977.
11. Павленко Н. М. Канд. дисс., Кишинев, 1969.
12. Aoussat A., Latrasse A. Ann. Nutr. Alim, 32, 1149, 1978.
13. Wucherpeddenning K., Millies K. D. und Langraf H. Flüssiges Obst, 1970.
14. Whistler R. Z., Smarth C. Polysaccharide Chemistry, N. Y.—Lond. 185, 1953.
15. Gallus H. P. K., Jennings A. C. Austr. J. Biol. Sci, 24, 747, 1971.
16. Monro J. A., Baily R. W., Penny D. Phytochemistry, 15, 175, 1976.
17. Markwalder H., Neukom H. Phytochemistry, 15, 5, 836, 1976.
18. Hillestadt A., Wold Jens K., Engen T. Phytochemistry, 6, 12, 1947, 1977.
19. Feather M. S., Whistler R. Z. Arch. Biophys, 98, 111, 1962.