

Послеспиртовая зерновая барда как фармацевтический источник биологически активных соединений

Н. Ш. Кайшева¹✉, А. Ш. Кайшев², М. В. Ларский¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, Россия, e-mail: caisheva2010@yandex.ru

²Межрегиональное управление Росалкогольрегулирования по Северо-Кавказскому федеральному округу, Ессентуки, Россия

Поступила в редакцию: 10.09.2021 г.; после доработки: 17.11.2021 г.; принята в печать: 24.11.2021 г.

Аннотация – Даже при использовании типового сырья и типовой технологии переработки состав вторичных сырьевых ресурсов может варьироваться, что вызвало необходимость изучения содержания биологически активных соединений в промышленных образцах послеспиртовой кукурузной барды. К таким классам соединений относятся аминокислоты, углеводы, минеральные элементы. Целью исследования явилось изучение качественного и количественного состава биологически активных соединений в послеспиртовой кукурузной барде для ее потенциального применения в качестве фармацевтического сырья. В работе использованы химические (качественные реакции, титриметрия), физико-химические (ВЭЖХ, спектрофотометрия, спектрография, гравиметрия) методы анализа. В жидкой и твердой фазах барды (после гидролиза) наличие аминокислот установлено по качественным цветным реакциям (с биуретовым реактивом, нингидрином), методами спектрофотометрии, ВЭЖХ. В сравнении со стандартными образцами аминокислот доказано присутствие в барде 12 аминокислот: Asp, Gly, Thr, Ser, His, Glu, Ala, Arg, Tyr, Val, Leu, Lys с содержанием в пересчете на сухой остаток в жидкой фазе 28 – 29% (методы ВЭЖХ и спектрофотометрии) с преобладанием Gly (5,0%), Glu (4,3%), в твердой фазе – 1,8%. По специфической реакции термоллиза N-метилированных аминокислот установлено наличие бетаинов в жидкой фазе барды. Методом ВЭЖХ в сравнении со стандартными образцами углеводов в жидкой фазе барды идентифицированы: глюкоза и мальтоза с количественным содержанием 14,0% и 3,5% в пересчете на сухой остаток соответственно, что в 35 раз превосходит норму, лимитированную производственным технологическим регламентом на получение спирта из крахмалистого сырья для предприятия ООО «Суворовский» (не более 0,5%). Установлено содержание минеральных элементов в барде (различных видов золы: общей, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной, сульфатной), из которых преобладают калий, натрий, очевидно, входящие в состав используемых в спиртовых технологиях добавок. Сравнительная оценка барды до и после выделения указанных соединений по показателю «Химическое потребление кислорода», являющемуся показателем техногенного воздействия на окружающую среду, показала снижение показателя в 3,9 раз, в результате чего барду после переработки можно считать безопасным промышленным стоком.

Ключевые слова: послеспиртовая барда, аминокислоты, восстанавливающие сахара, минеральные элементы, химическое потребление кислорода.

Utilization and biodegradation of wastes

UDC 615.31:663.52:658.567.1].070

DOI: 10.25514/CHS.2021.2.20005

Distillery grain as a pharmaceutical source of biologically active compounds

Nelli Sh. Kaisheva¹✉, Alexander Sh. Kaishev², and Mikhail V. LarSKIY¹

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - a branch of the federal state budgetary educational institution of higher education "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russia, e-mail: caisheva2010@yandex.ru

²Interregional Administration of Rosalkogolregulirovanie for the North Caucasian Federal District, Essentuki, Russia

Received: September 10, 2021; Revised: November 17, 2021; Accepted: November 24, 2021

Abstract – Even when using standard raw materials and typical processing technology, the composition of secondary raw materials can vary, which has caused the need to study the content of biologically active compounds in industrial samples of post-alcohol corn grain. These classes of compounds include amino acids, carbohydrates, and mineral elements. The aim of the study was to study the qualitative and quantitative composition of biologically active compounds in post-alcohol corn grain for its potential use as a pharmaceutical raw material. We used chemical (qualitative reactions, titrimetry), physicochemical (HPLC, spectrophotometry, spectrography, gravimetry) methods of analysis. In the liquid and solid phases of vinasse (after hydrolysis), the presence of amino acids was established by qualitative color reactions (with a biuret reagent, ninhydrin), spectrophotometry, HPLC. In comparison with standard samples of amino acids, the presence of 12 amino acids in vinasse was proved: Asp, Gly, Thr, Ser, His, Glu, Ala, Arg, Tyr, Val, Leu, Lys with a content in terms of dry residue in the liquid phase of 28-29% (HPLC and spectrophotometry methods) with a predominance of Gly (5.0%), Glu (4.3%), in the solid phase - 1.8%. According to the specific reaction of thermolysis of N methylated amino acids, the presence of betaines in the liquid phase of vinasse was established. HPLC in comparison with standard samples of carbohydrates in the liquid phase of vinasse identified: glucose and maltose with a quantitative content of 14.0% and 3.5% in terms of dry residue, respectively, which is 35 times higher the norm, limited by the production process regulations for the production of alcohol from starchy raw materials for the enterprise LLC "Suvorovsky" (no more than 0.5%). The content of mineral elements in vinasse (various types of ash: total, insoluble in a 10% solution of hydrochloric acid, sulfate) has been established, of which potassium and sodium prevail, which are obviously included in the additives used in alcohol technologies. Comparative evaluation of vinasse before and after the isolation of the indicated compounds according to the indicator "Chemical oxygen consumption", which is an indicator of the technogenic impact on the environment, showed a 3.9-fold as a result of which the stillage after processing can be considered a safe industrial wastewater.

Keywords: distillery grain, amino acids, reducing sugars, mineral elements, chemical oxygen demand.

ВВЕДЕНИЕ

Интерес исследователей к послеспиртовой зерновой барде, особенно в последние десятилетия, обусловлен рядом факторов: уникальностью состава соединений, в том числе не синтезируемых в организме человека, масштабностью данного ресурса, превосходящего в 12 – 13 раз объём целевого продукта (спирта), ценовая доступность, практическая неприменимость, кроме добавок для птицеводства и животноводства [1, 2, 3]. С другой стороны, малый срок хранения барды, обусловленный, по-видимому, лабильностью компонентов под влиянием внешних факторов, создает экологические проблемы при сбросе барды в окружающую среду [4].

Содержащиеся в барде соединения, безусловно, при доказательстве их биологической активности и отсутствии практической токсичности, могли бы использоваться в фармацевтической практике в качестве лекарственных и/или вспомогательных веществ. Однако, для этого необходимы глубокие доклинические химические, биофармацевтические, биологические исследования. Начальным этапом этих исследований является изучение качественного и количественного состава биологически активных соединений в послеспиртовой кукурузной барде для ее потенциального применения в качестве фармацевтического сырья, что и определило цель данной работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объекты исследования

Объектами исследования служили 5 промышленных серий послеспиртовой кукурузной барды производства ООО «Суворовский» (Ставропольский край), полученные по гидроферментативной технологии переработки зерна в соответствии с производственным технологическим регламентом на получение спирта из крахмалистого сырья [5] в разные периоды. Выбор указанного производителя обусловлен использованием им типовой технологии переработки зерна, характерной для подавляющего большинства отечественных спиртовых заводов [5, 3], и высокой производительностью (в сутки): 2000 дал спирта и 27000 дал барды [5]. Качество исходной барды соответствовало требованиям технических условий [6]. Предполагая возможный различный состав жидкой и твердой фаз барды по содержанию биологически активных соединений, барду последовательно фракционировали декантацией, процеживанием, центрифугированием (5000 об./мин, 20 мин); твердую фазу высушивали при 100 ± 5 °C до постоянной массы.

Те же серии послеспиртовой кукурузной барды, но освобожденные от аминокислот, восстанавливающих веществ, минеральных веществ [7, 8, 9, 10], послужили объектом исследования для сравнительной оценки химической безопасности отходов. Освобождение аминокислот от указанных групп веществ заключается в следующих этапах:

- разделение барды на жидкую и твердую фазы процеживанием и фильтрацией;

- осаждение углеводов жидкой фазы барды избытком кальция оксида (1:4) в виде кальция сахарата, нейтрализация жидкой фазы аммония оксалатом, отделение осадка кальция сахарата фильтрацией;
- концентрирование фильтрата жидкой фазы, гидролиз белков и пептидов концентрированной хлористоводородной кислотой (6,0 М, 1:1, 72 час) до образования аминокислот;
- метилирование аминокислот йодметаном (1:4) в присутствии натрия карбоната (2:1) до образования бетаинов;
- гидрохлорирование бетаинов концентрированной хлористоводородной кислотой;
- кристаллизация смеси хлоридов бетаинов и металлов, очистка смеси спиртом 96%, концентрированной хлористоводородной кислотой;
- фильтрация, концентрирование фильтрата до образования кристаллической массы;
- кристаллизация, отделение и перекристаллизация бетаинов гидрохлоридов (0 – 5°C, 8 час) с образованием маточных растворов, используемых для анализа химического потребления кислорода.

В качестве веществ сравнения в число объектов исследования входили стандартные образцы аминокислот (с массовой долей основного вещества не менее 99,0%): аспарагиновой кислоты (Asp), треонина (Thr), серина (Ser), глутаминовой кислоты (Glu), глицина (Gly), аланина (Ala), валина (Val), изолейцина (Ile), лейцина (Leu), тирозина (Tyr), гистидина (His), лизина (Lys), аргинина (Arg), метионина (Met), фенилаланина (Phe), а также стандартные образцы углеводов (с массовой долей основного вещества не менее 99,0%): мальтозы, глюкозы, сахарозы.

В работе приведены средние результаты, полученные при анализе 5 промышленных серий барды (отклонения от средних результатов не превышают $\pm 2\%$) в 6-ти повторностях для каждой серии барды.

Качественный и количественный анализ аминокислот в барде

Учитывая наличие в барде свободных и связанных (белков, пептидов) аминокислот [1], аминокислотный состав жидкой и твердой фаз барды изучен после кислотного гидролиза. Согласно Государственной фармакопее Российской Федерации [11], гидролиз проводили в колбе, снабженной обратным водяным шариковым холодильником, на водяной бане, путем обработки барды концентрированной соляной кислотой (плотность 1,097 г/мл, концентрация 6,0 моль/л) в соотношении барда : кислота 1:1 при температуре $110 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 72 ч.

Для обнаружения аминокислот в гидролизатах барды использовали качественные цветные реакции с биуретовым реактивом, нингидрином, специфическую качественную реакцию термического разложения N-метилованных α -аминокислот (бетаинов) [12].

Наличие аминокислот в гидролизатах барды изучали также методом спектрофотометрии по реакции взаимодействия гидролизатов с нингидрином путем выявления положения максимума поглощения при длине волны 566 ± 2

нм в сравнении со стандартным образцом Gly [11], используя спектрофотометр «СФ-104» с программным обеспечением UVWIN для Windows («Аквилон», г. Москва).

Указанным методом, по той же реакции, при том же аппаратурном оснащении в кислотных гидролизатах барды изучали количественное содержание аминокислот при длине волны 566 нм и толщине рабочего слоя 10 мм [2, 11]. При анализе жидкой фазы барды её навеску объёмом 10,0 мл доводили водой до метки в мерной колбе вместимостью 100 мл, для анализа отбирали 5,0 мл аликвотной части. Из твердой фазы барды путем обработки навески массой около 5,0 г (точная навеска) 50 мл воды (1:15, 70°C, 1 ч) получали водное извлечение, которое фильтровали через бумажный фильтр «красная лента», охлаждали, доводили водой до метки в мерной колбе вместимостью 50 мл, для анализа отбирали 5,0 мл аликвотной части. Расчет количественного содержания аминокислот (в пересчете на Gly и на сухой остаток жидкой фазы) (X, %) проводили с учетом удельного показателя поглощения продукта взаимодействия стандартного образца Gly с нингидрином ($A_{1\text{см}}^{1\%} = 0,673$ [2]) по формуле (1) [11]:

$$X = \frac{A_X \cdot V_1 \cdot 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot l \cdot a \cdot V_2 \cdot (100 - W)} \quad (1)$$

где: а – навеска анализируемого образца, г (мл);
W – потеря в массе при высушивании, %;
V₁ – объем исходного испытуемого раствора, мл;
V₂ – объем аликвотной части исходного испытуемого раствора, мл;
l – толщина рабочего слоя, см;
A_X – оптическая плотность испытуемого раствора при 566 нм

Для подтверждения (или опровержения) полученных результатов мы провели изучение аминокислотного состава барды на автоматическом аминокислотном анализаторе «Amino Acid Analyzer T 339 M» с обращенно-фазовыми хроматографическими колонками «Waters AccQ Tag» (3,9x150 мм), заполненными сорбентом C18 (5 мкм) [11]. Объем вводимых проб составлял по 20 мкл. Разделение аминокислот проводили при температуре 40±2°C в градиентном режиме с использованием подвижных фаз: элюент I (pH 3,5): кислота лимонная - натрия цитрат – натрия хлорид – кислота каприловая – тиогликоль (в %: 28,6:16,1:40,6:0,3:14,4); элюент II (pH 4,25): та же система (в %: 20,2:24,5:48,3:0,3:6,7); элюент III (pH 9,5): кислота лимонная - натрия цитрат – натрия хлорид – кислота борная – натрия гидроксид – кислота каприловая – тиогликоль (в %: 11,5:59,8:9,6:4,5:8,8:0,2:5,6). Элюенты разбавляли буферной смесью (pH 2,2): кислота лимонная – натрия хлорид – кислота каприловая – тиогликоль (в %: 30,7:25,2:0,2:43,9). Детектирование зон адсорбции проводили с помощью 1% раствора нингидрина, приготовленного на основе ацетатного буфера (pH 5,5). Анализ подвергали кислотный гидролизат жидкой фазы

барды в сравнении с 2,0% растворами стандартных образцов аминокислот. Идентификацию аминокислот осуществляли по времени удерживания пиков с использованием программного обеспечения к хроматографу, количественное содержание – по высоте соответствующих пиков. Эффективность хроматографического разделения пиков оценивали по параметрам: числу теоретических тарелок, коэффициентам удерживания, коэффициентам асимметрии хроматографических пиков (ГФ). Расчет количественного содержания аминокислот (X, %) в гидролизате в пересчете на сухой остаток жидкой фазы барды проводили по формуле (2) [11]:

$$X = \frac{H_X \cdot C_{CO} \cdot 100}{H_{CO} \cdot (100 - W)} \quad (2)$$

где: H_X и H_{CO} – высота пика определяемой аминокислоты на опытной и стандартной аミノграммах соответственно, см;

C_{CO} – концентрация стандартного раствора аминокислоты, %;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Качественный и количественный анализ восстанавливающих сахаров в барде

Разделение, качественный и количественный состав восстанавливающих сахаров в жидкой фазе барды, где преобладают аминокислоты, определяли методом ВЭЖХ с использованием для количественного определения метода внешних стандартов [11, 13]. Анализ проводили на хроматографе «UltiMate 3000» («Dionex», США) с колонками (250x4,6 мм), заполненными аминмодифицированным диоксидом кремния (Eclipse XDB-C18, 5 мкм). Для сравнения использовали стандартные образцы углеводов с концентрацией основных веществ $\geq 99,9\%$. Анализу подвергали жидкую фазу барды и раствор стандартных образцов, одновременно содержащий 0,15% мальтозы, 1,5% глюкозы, 0,25% сахарозы, с добавлением смеси воды и метанола (3:1). Условия хроматографирования: температура колонки $30,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, скорость потока 1,3 мл/мин, подвижная фаза: ацетонитрил и вода (80:20), объем вводимой пробы 20 мкл, рефрактометрический детектор. Для сбора и обработки данных использовали программу «Chromeleon, версия 7» («Dionex», США). Идентификацию углеводов проводили по времени удерживания пиков, количественное содержание – по площади пиков. Количественное содержание углеводов в пересчете на сухой остаток жидкой фазы барды (X, %) рассчитывали по формуле (3) [13]:

$$X = \frac{S_X \cdot C_{CO} \cdot 100}{S_{CO} \cdot (100 - W)} \quad (3)$$

где: S_X и S_{CO} – площадь пика компонента на опытной и стандартной хроматограммах соответственно, мм²;

C_{CO} – концентрация стандартного раствора углевода, %;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Изучение минерального и элементного состава барды

Минеральный состав барды изучали по показателям: зола общая [11]; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте [11]; сульфатная зола [11]. Показатель «Тяжелые металлы» определяли путем сравнения с эталонным раствором, содержащим ионы свинца (II) (5 мкг/мл) [11].

Элементный анализ общей золы барды изучали методом эмиссионного спектрографического анализа [11] путем вдувания проб в двухполюсный дуговой разряд с последующей регистрацией спектров возбужденных атомов на спектрографе СТЭ-1.

Определение химического потребления кислорода

Оценка химической безопасности промышленных серий послеспиртовой кукурузной барды до и после выделения аминокислот, восстанавливающих веществ, минеральных веществ [7, 8, 9, 10] проведена по показателю «химическое потребление кислорода». Показатель «Химическое потребление кислорода» или суммарное содержание в отходах окисляемых веществ определяли по количеству израсходованного химически связанного кислорода. Данный показатель является интегральным и одним из наиболее информативных показателей, характеризующих степень антропогенного загрязнения окружающей среды отходами. Он выражается количеством мг атомарного кислорода, необходимого для окисления веществ в 1 дм³ отходов раствором дихромата калия (мг О/дм³) [14].

Для определения химического потребления кислорода в колбу со шлифом вносили 10 см³ барды, 10 см³ 16,626 ммоль/дм³ раствора калия дихромата, 1,283 ммоль сульфата серебра (I), 30 см³ концентрированной серной кислоты. Содержимое колбы, соединенной с обратным холодильником, кипятили в течение 2 ч. После охлаждения реакционной смеси до комнатной температуры, к ней добавляли 7 – 8 капель 4,690 ммоль/дм³ раствора N-фенилантраниловой кислоты и титровали 0,025 моль/дм³ раствором соли Мора до перехода окраски из травянисто-зеленой в изумрудно-зеленую [14]. Параллельно проводили титрование контрольной пробы (без добавления барды).

Показатель «Химическое потребление кислорода» (X, мг О/дм³) рассчитывали по формуле (4) [14]:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) C K 8 1000}{V_3} \quad (4)$$

где: V_1 и V_2 – объемы раствора соли Мора, израсходованного на титрование контрольной и анализируемой проб соответственно, см³;

C – концентрация раствора соли Мора, ммоль/дм³;

K – поправочный коэффициент к титрованному раствору соли Мора;

V_3 – объем анализируемой пробы, см³;

8 – масса кислорода (мг), соответствующего 1 см³ калия дихромата.

Статистическая обработка результатов эксперимента

Обработку результатов химического эксперимента проводили с помощью компьютерной программы Excel 2010 (Microsoft Office 2010) версия 14.0.7015.1000 Standard (июль 2013) в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты качественного и количественного анализа аминокислот в барде

Проведенные в обеих фазах барды *качественные реакции* на наличие аминокислот дали положительные результаты, как с биуретовым реактивом, так и с нингидрином, с проявлением в обеих реакциях, особенно в жидкой фазе, выраженных аналитических эффектов: интенсивного фиолетового окрашивания продуктов реакции.

Наряду с этим, проведенная специфическая качественная реакция термического разложения N-метилированных α -аминокислот также дала положительный результат (характерный запах), но только для жидкой фазы барды.

Полученные результаты свидетельствуют о присутствии аминокислот в обеих фазах барды, а также о наличии бетаинов в жидкой фазе барды.

Спектры поглощения продуктов взаимодействия гидролизатов обеих фаз барды с нингидрином в видимой области спектра в сравнении со стандартным образцом Gly приведены на рисунке 1.

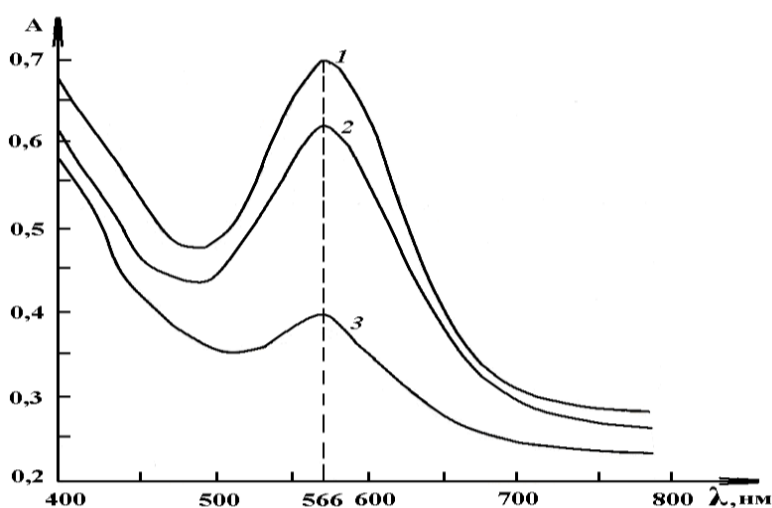


Рис. 1. Спектры поглощения продуктов взаимодействия нингидрина со стандартным образцом Gly (1), гидролизатами жидкой (2) и твердой (3) фаз барды.

Fig. 1. Absorption spectra of the products of the interaction of ninhydrin with a standard sample of Gly (1), hydrolysates of liquid (2) and solid (3) phases of vinasse.

Сравнение спектральных кривых свидетельствует об идентичности их характера и совпадении положения максимума поглощения при 566 ± 2 нм, что подтвердило наличие аминокислот в обеих фазах барды.

Количественное определение суммы аминокислот в барде методом спектрофотометрии по реакции взаимодействия с нингидрином в максимуме поглощения 566 нм позволило получить достоверные результаты, приведенные в таблице 1.

Таблица 1. Результаты определения содержания аминокислот в барде методом спектрофотометрии по реакции взаимодействия с нингидрином

Table 1. Results of determining the content of amino acids in vinasse by spectrophotometry by the reaction of interaction with ninhydrin

№	а, мл (г)	W, %	V ₁ , мл	V ₂ , мл	A _x	X (в пересчете на Gly и сухой остаток фазы), %
Жидкая фаза барды						
1	10,0	93,6	100	5,0	0,621	$X = \frac{0,621 \cdot 100 \cdot 100}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 10,0 \cdot 5,0 \cdot (100 - 93,6)} = 28,8$
2	10,0	92,8	100	5,0	0,692	$X = \frac{0,692 \cdot 100 \cdot 100}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 10,0 \cdot 5,0 \cdot (100 - 92,8)} = 28,6$
3	10,0	93,9	100	5,0	0,601	$X = \frac{0,601 \cdot 100 \cdot 100}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 10,0 \cdot 5,0 \cdot (100 - 93,9)} = 29,3$
4	10,0	93,8	100	5,0	0,597	$X = \frac{0,597 \cdot 100 \cdot 100}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 10,0 \cdot 5,0 \cdot (100 - 93,8)} = 28,6$
5	10,0	93,8	100	5,0	0,601	$X = \frac{0,601 \cdot 100 \cdot 100}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 10,0 \cdot 5,0 \cdot (100 - 93,8)} = 28,8$
Средн.		93,6				28,8
Твердая фаза барды						
1	5,3822	0	50	5,0	0,652	$X = \frac{0,652 \cdot 50}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 5,3822 \cdot 5,0} = 1,8$
2	5,3690	0	50	5,0	0,542	$X = \frac{0,542 \cdot 50}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 5,3690 \cdot 5,0} = 1,5$
3	5,3667	0	50	5,0	0,614	$X = \frac{0,614 \cdot 50}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 5,3667 \cdot 5,0} = 1,7$
4	4,7936	0	50	5,0	0,742	$X = \frac{0,742 \cdot 50}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 4,7936 \cdot 5,0} = 2,3$
5	5,3648	0	50	5,0	0,686	$X = \frac{0,686 \cdot 50}{0,673 \cdot 1,0 \cdot 5,3648 \cdot 5,0} = 1,9$
Средн.						1,8

Полученные данные свидетельствуют о преимущественном (в 16 раз больше) накоплении аминокислот в жидкой фазе барды в сравнении с твердой фазой.

Результаты изучения качественного и количественного состава аминокислот в гидролизатах жидкой и твердой фаз барды на аминокислотном анализаторе приведены на ВЭЖХ-хроматограммах (рис. 2, 3) в сравнении с хроматограммой стандартных образцов аминокислот (рис. 4).

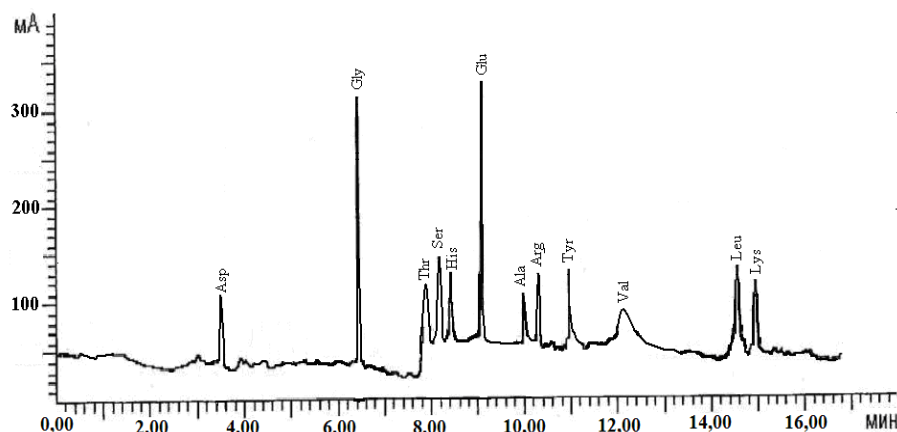


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот жидкой фазы барды.

Fig. 2. HPLC-chromatogram of amino acids in the liquid phase of vinasse.

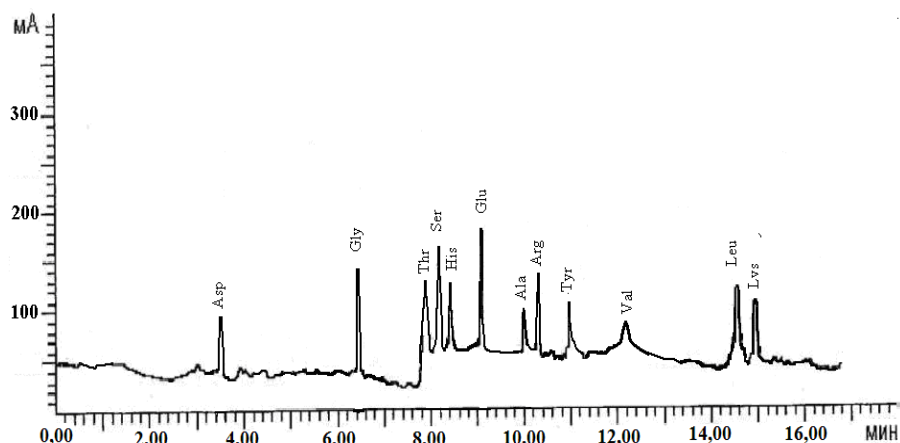


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограмма аминокислот твердой фазы барды.

Fig. 3. HPLC-chromatogram of the solid phase amino acids of vinasse.

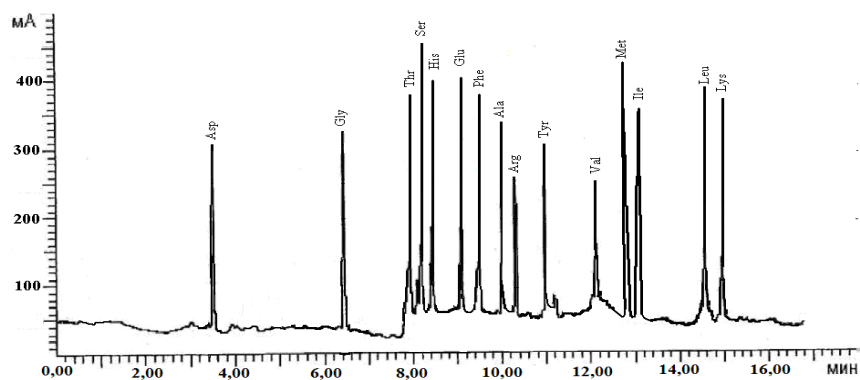


Рис. 4. ВЭЖХ-хроматограмма стандартных образцов аминокислот.

Fig. 4. HPLC-chromatogram of standard samples of amino acids.

Путем сравнения испытуемых и стандартной ВЭЖХ-хроматограмм в обеих фазах барды установлено наличие 12 аминокислот: Asp, Gly, Thr, Ser, His, Glu, Ala, Arg, Tyr, Val, Leu, Lys, из которых 6 являются незаменимыми (Thr, Val, Leu, His, Lys, Arg), однако, по количественному содержанию различия между фазами очевидны: в твёрдой фазе содержание аминокислот ниже.

ВЭЖХ-хроматограммы аминокислот жидкой фазы барды охарактеризованы по показателям: время удерживания пиков ($t_{уд.}$, мин), коэффициент разделения (R_s), коэффициент асимметрии (A_s), количество теоретических тарелок (N) и относительное стандартное отклонение площадей пиков (RSD, %) (таблица 2).

Таблица 2. Эффективность разделения и идентификации аминокислот в жидкой фазе барды методом ВЭЖХ

Table 2. Efficiency of separation and identification of amino acids in the liquid phase of vinasse by HPLC

Компоненты	$t_{уд.}$, мин	R_s	A_s	N	RSD, %
Asp	3,54	3,40	1,16	7165	1,75
Gly	6,37	3,64	1,07	30690	1,63
Thr	7,97	2,21	0,91	38459	1,82
Ser	8,09	2,31	0,80	38685	1,66
His	8,13	2,25	0,80	6482	1,82
Glu	9,15	2,56	1,12	70633	1,69
Ala	10,07	3,55	1,14	75665	1,73
Arg	10,36	2,38	0,86	60735	1,84
Tyr	11,02	3,61	0,81	112150	1,77
Val	12,21	4,66	0,80	98930	1,81
Leu	14,62	5,93	1,08	184516	1,78
Lys	14,91	6,35	0,85	63459	1,75
Критерии приемлемости	-	≥ 2	0,8 – 1,5	≥ 1500	≤ 2

Приведенные хроматографические характеристики свидетельствуют об удовлетворительной эффективности разделения хроматографических пиков.

Результаты количественного определения аминокислот в жидкой фазе барды относительно стандартных образцов аминокислот приведены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты количественного определения аминокислот в жидкой фазе барды методом ВЭЖХ

Table 3. Results of quantitative determination of amino acids in the liquid phase of vinasse by HPLC

Аминокис- лоты	Стандартные образцы		№ 1 (W 93,6%)		№ 2 (W 92,8%)		№ 3 (W 93,9%)		№ 4 (W 93,8%)		№ 5 (W 93,8%)		Среднее X, %*
	С _{СО} , %	Н _{СО} , см	Н _Х , см	Х, %*	Н _Х , см	Х, %*	Н _Х , см	Х, %*	Н _Х , см	Х, %*	Н _Х , см	Х, %*	
Asp	2,0	9,20	0,53	1,80	0,67	2,02	0,49	1,75	0,54	1,89	0,49	1,72	1,84
Gly	2,0	9,90	1,58	4,99	1,80	5,05	1,47	4,87	1,62	5,28	1,47	4,79	5,00
Thr	2,0	11,40	0,61	1,67	0,74	1,80	0,57	1,64	0,68	1,92	0,57	1,61	1,73
Ser	2,0	13,90	0,72	1,62	0,97	1,94	0,62	1,46	0,74	1,72	0,67	1,55	1,66
His	2,0	12,20	0,66	1,69	0,84	1,91	0,63	1,69	0,72	1,90	0,61	1,61	1,76
Glu	2,0	12,30	1,66	4,22	1,94	4,38	1,54	4,11	1,70	4,46	1,55	4,07	4,25
Phe	2,0	11,30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ala	2,0	10,30	0,56	1,70	0,53	1,43	0,50	1,59	0,57	1,79	0,51	1,60	1,62
Arg	2,0	7,80	0,66	2,64	0,68	2,42	0,61	2,56	0,68	2,81	0,62	2,56	2,60
Tyr	2,0	9,20	0,68	2,31	0,80	2,42	0,72	2,57	0,70	2,45	0,64	2,24	2,40
Val	2,0	7,60	0,44	1,81	0,47	1,72	0,41	1,77	0,46	1,95	0,40	1,70	1,79
Met	2,0	12,90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	2,0	10,90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Leu	2,0	11,90	0,69	1,81	0,70	1,63	0,64	1,76	0,71	1,92	0,64	1,73	1,77
Lys	2,0	11,60	0,67	1,80	0,81	1,94	0,58	1,64	0,58	1,61	0,63	1,75	1,75
Итого:				28,06		28,66		27,41		29,70		26,93	28,15

* В пересчете на сухой остаток жидкой фазы барды.

Результаты количественного содержания аминокислот, полученные методом ВЭЖХ, коррелируются с результатами спектрофотометрического анализа, что подтверждает достоверность данных. Метрологические характеристики результатов определения: $x \pm \Delta x = 28,15 \pm 1,95$; $\varepsilon = 6,9\%$.

Таким образом, высокая концентрация аминокислот в жидкой фазе барды обосновывает возможность ее использования как фармацевтического источника аминокислот.

Результаты качественного и количественного анализа восстанавливающих сахаров в барде

Поскольку восстанавливающие сахара, регламентированные в барде в концентрации, не превышающей 0,5% [5], могут быть компонентами, как сопутствующими, так и мешающими выделению аминокислот, то их определение является необходимым. Результаты идентификации восстанавливающих сахаров в жидкой фазе барды методом ВЭЖХ представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты идентификации углеводов в жидкой фазе барды методом ВЭЖХ
Table 4. Results of the identification of carbohydrates in the liquid phase of vinasse by HPLC

t _{уд.} , мин		Компоненты
Стандартные образцы	Жидкая фаза барды	
6,02±0,09	6,03±0,09	Глюкоза
8,52±0,11	-	Сахароза
11,02±0,14	11,05±0,14	Мальтоза
	16,11±0,22	Не идентифицирован

По полученным данным можно сделать заключение о наличии в жидкой фазе барды глюкозы, мальтозы, что свидетельствует о практически неполном протекании процессов гидролиза крахмала и спиртового брожения в спиртовых технологиях переработки зерна.

Количественное определение углеводов методом ВЭЖХ в жидкой фазе барды (рисунок 5) в сравнении со стандартными образцами углеводов: глюкозой, сахарозой, мальтозой (рисунок 6) позволило рассчитать содержание углеводов (X, %) в пересчете на сухой остаток жидкой фазы барды (таблица 5).

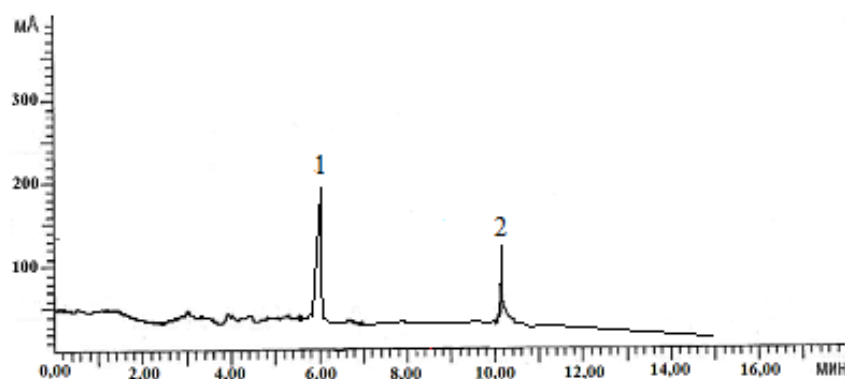


Рис. 5. ВЭЖХ-хроматограмма жидкой фазы барды.

Fig. 5. HPLC-chromatogram of the liquid phase of vinasse.

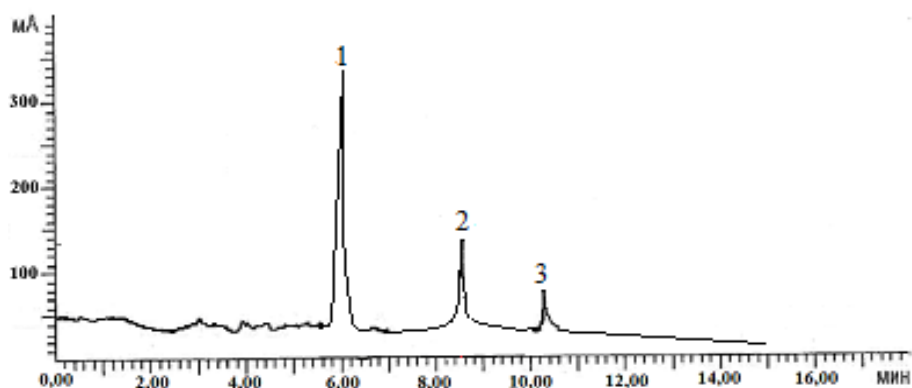


Рис. 6. ВЭЖХ-хроматограмма смеси стандартных образцов углеводов: глюкозы (1), сахарозы (2), мальтозы (3).

Fig. 6. HPLC-chromatogram of a mixture of standard samples of carbohydrates: glucose (1), sucrose (2), maltose (3).

Таблица 5. Результаты количественного определения углеводов в жидкой фазе барды методом ВЭЖХ

Table 5. Results of quantitative determination of carbohydrates in the liquid phase of vinasse by HPLC

СО	C _{CO} , %	W, %	S _X , мм ²	S _{CO} , см ²	X, %
Глюкоза	1,5	93,6	37,44±0,45	62,68±0,69	$X = \frac{37,44 \cdot 1,5 \cdot 100}{62,68 \cdot (100 - 93,6)} = 14,0$
Мальтоза	0,15		23,72±0,31	15,92±0,21	$X = \frac{23,72 \cdot 0,15 \cdot 100}{15,92 \cdot (100 - 93,6)} = 3,5$

Полученные данные свидетельствуют о высоком содержании в жидкой фазе барды восстанавливающих сахаров в пересчете на сухой остаток: 17,5% (3,5% мальтозы, 14,0% глюкозы), что в 35 раз превосходит норму. В этой связи, можно барду рассматривать, наряду с аминокислотами, как сырьевой ресурс восстанавливающих сахаров.

Результаты изучения минерального и элементного состава барды

Минеральные элементы, как и восстанавливающие сахара, интересны с точки зрения веществ, сопутствующих доминирующему в барде классу соединений – аминокислотам. Результаты определения минеральных веществ в барде по показателям различных видов золы приведены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты определения минеральных веществ в барде по показателям золы

Table 6. Results of determination of mineral substances in vinasse by indicators of ash

Показатели	Масса навески барды, г	Масса золы, г	Содержание, %
Зола общая	4,9870±0,1995	0,0710±0,0033	1,42±0,0639
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	4,9870±0,1995	0,0042±0,0002	0,08±0,0037
Сульфатная зола	0,9180±0,0420	0,0160±0,0007	1,74±0,0783

При испытании барды по показателю «Тяжелые металлы», после соответствующей обработки [11], 10 мл полученного раствора выдержали испытание в сравнении с эталонным раствором свинца (II) (5 мкг/мл). Это свидетельствует о концентрации тяжелых металлов в барде, не превышающей 0,001%. Таким образом, относительно высокое содержание сульфатной золы в барде не обусловлено накоплением тяжелых металлов.

Элементный состав общей золы, полученной из барды и установленный полуколичественно методом эмиссионного спектрографического анализа с регистрацией спектров возбужденных атомов на спектрографе СТЭ-1, представлен в таблице 7.

Таблица 7. Элементный состав золы барды, определенный методом эмиссионного спектрографического анализа

Table 7. Elemental composition of stillage ash, determined by the method of emission spectrographic analysis

Элементы	Концентрация в общей золе, %	Элементы	Концентрация в общей золе, %
Калий	36,0	Висмут	<0,0001
Натрий	9,0	Медь	<0,0001
Фосфор	2,0	Кадмий	<0,0001
Магний	1,0	Ртуть	<0,0001
Кальций	0,2	Скандий	<0,0001
Кремний	<0,05	Иттрий	<0,0001
Литий	<0,05	Лантан	<0,0001
Цинк	<0,05	Титан	<0,0001
Железо	<0,02	Цирконий	<0,0001
Марганец	<0,005	Гафний	<0,0001
Свинец	<0,0001	Ванадий	<0,0001
Стронций	<0,0001	Ниобий	<0,0001
Бериллий	<0,0001	Тантал	<0,0001
Барий	<0,0001	Хром	<0,0001
Индий	<0,0001	Молибден	<0,0001
Таллий	<0,0001	Вольфрам	<0,0001
Галлий	<0,0001	Кобальт	<0,0001
Германий	<0,0001	Никель	<0,0001
Олово	<0,0001	Иттербий	<0,0001
Мышьяк	<0,0001	Серебро	<0,00001
Сурьма	<0,0001		

Полученные данные свидетельствуют о богатом элементом составе барды, из которого обращают на себя внимание калий и натрий, содержащиеся в необычайно высоких концентрациях. Очевидно, это связано со спецификой спиртовых технологий, предусматривающих использование неорганических солей для повышения активности, улучшения качества и увеличения выхода

дрожжей [5]. Кроме того, по результатам минерального анализа примечательны еле уловимые концентрации тяжелых металлов.

Таким образом, в результате анализа минерального состава барды установлено высокое содержание сульфатной золы и преимущественное накопление в золе калия и натрия.

Результаты определения химического потребления кислорода

Результаты определения химического потребления кислорода, как показателя химической безопасности послеспиртовой кукурузной барды до и после выделения из нее соединений трех выше описанных классов [7, 8, 9, 10], приведены в таблице 8. Для сравнения нами использованы промышленные серии послеспиртовой пшеничной барды, переработанные по аналогии с кукурузной бардой.

Таблица 8. Результаты определения химического потребления кислорода послеспиртовой зерновой бардой до и после выделения биологически активных соединений

Table 8. Results of determining the chemical oxygen consumption of post-alcohol grain before and after the isolation of biologically active compounds

Объекты анализа	Химическое потребление кислорода, мг О/дм ³	
	До переработки	После переработки
Пшеничная барда	(54611÷62418)±3120	(13731÷15497)±770
Кукурузная барда	(55709÷64184)±3109	(14712÷16870)±842
Средние значения	(55160-63301) ±3111	(14222-16184)±802

Полученные результаты свидетельствуют о том, что после выделения аминокислот, восстанавливающих веществ и минеральных элементов химическое потребление кислорода бардой снижается в 3,9 раз. По-видимому, это связано с предотвращением различных химических и биохимических процессов, свойственных указанным классам соединений, что являлось причиной скорой порчи барды и, как следствие, возникновения экологических проблем при сбросе барды в водоемы и на поля. Следует отметить, что при предельно допустимой норме показателя «Химическое потребление кислорода» в пределах 50000–80000 мг О/дм³ [14] переработанная послеспиртовая кукурузная барда по указанному показателю соответствует экологически безопасным промышленным стокам [15, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая, что даже при использовании типового сырья и типовой технологии переработки, соответствующей производственному технологическому регламенту, состав вторичных сырьевых ресурсов может варьироваться, в связи с чем необходимо изучение содержания основных и сопутствующих соединений в исследуемых промышленных образцах послеспиртовой кукурузной барды. К таким классам соединений относятся белки и протеины, восстанавливающие сахара, минеральные элементы. В жидкой и твердой фазах барды (после кислотного гидролиза) наличие аминокислот установлено по качественным цветным реакциям (с биуретовым

реактивом, нингидрином), методами спектрофотометрии по реакции взаимодействия с нингидрином, ВЭЖХ. В сравнении со стандартными образцами аминокислот доказано присутствие в барде 12 аминокислот: Asp, Gly, Thr, Ser, His, Glu, Ala, Arg, Tyr, Val, Leu, Lys с содержанием в пересчете на сухой остаток в жидкой фазе 28–29% (методы ВЭЖХ и спектрофотометрии) с преобладанием Gly (5,0%), Glu (4,3%), в твердой фазе – 1,8%. По специфической реакции термического разложения N-метилованных α-аминокислот установлено наличие бетаинов только в жидкой фазе барды.

Методом ВЭЖХ в сравнении со стандартными образцами углеводов в жидкой фазе барды идентифицированы углеводы: глюкоза и мальтоза с количественным содержанием в пересчете на сухое вещество 14,0% и 3,5% соответственно, что в 35 раз превосходит лимитированную регламентом норму [5]. Установлено содержание минеральных элементов в барде (различных видов золы), из которых преобладают калий, натрий, очевидно, входящие в состав добавок, используемых в спиртовых технологиях. Сравнительная оценка послеспиртовой кукурузной барды до и после выделения указанных соединений по показателю «Химическое потребление кислорода», являющемуся показателем техногенного воздействия на окружающую среду, показала снижение этого показателя в 3,9 раз, что позволяет отнести барду к безопасным промышленным стокам.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

CONFLICT OF INTERESTS:

The authors declare no conflict of interests.

Список литературы:

1. Кайшев А.Ш., Кайшева Н.Ш. (2013). *Научные основы фармацевтического использования сырьевых ресурсов спиртового производства*. Волгоград: ВГМУ.
2. Кайшев А.Ш. Дисс. ... канд. фармац. наук. Пятигорск: ПГФА, 2011.
3. Винаров А.Ю., Ковальский Ю.В., Заикина А.И. (2004). Промышленная биотехнология переработки отходов спиртовых заводов. *Экология окружающей среды стран СНГ*, 2, 84–86.
4. Кайшев А.Ш., Кайшева Н.Ш., Челомбитко В.А., Василенко Ю.К., Смоленская Г.В. (2012). Экологические аспекты переработки послеспиртовой зерновой барды. *Экология и промышленность России*, 1, 23–25.
5. Производственный технологический регламент (ПТР) на получение спирта из крахмалистого сырья для предприятия ООО «Суворовский» (утв. Минсельхоз Российской Федерации 15.01.2004).
6. ТУ 9296-248-00008064-98. Барда зерновая.
7. Пат. 2404766 РФ, 2010.
8. Кайшев А.Ш., Кайшева Н.Ш., Василенко Ю.К., Маршалкин М.Ф. (2012). Разработка биоконпозиций антиоксидантного и гастропротекторного действия на основе спиртовых отходов. *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*, 5-6(329–330), 52–55.
9. Пат. 2662064 РФ, 2016.
10. Пат. 2630466 РФ, 2016.

11. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание, 2018.
12. Лутцева Т.Ю., Садчикова Н.П., Арзамасцев А.П. (2002). Методы анализа и стандартизации лекарственных четвертичных аммониевых оснований. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*, 3, 17–20.
13. ГОСТ 32167-2013. Мёд. Метод определения сахаров.
14. Ушнурцева О.А., Ковязина А.Г., Конышев С.А. (2003). Комплексная технология очистки сточных вод предприятий спиртовой промышленности. *Ликероводочное производство и виноделие*, 6(42), 13–14.
15. Инструкция по технохимическому и микробиологическому контролю спиртового производства (утв. руководителем Федерального агентства по сельскому хозяйству 2005 г.).
16. Новиков В.Б., Зверев С.В. (2007). Барда в законе. *Производство спирта и ликероводочных изделий*, 2, 31–34.

References:

1. Kaishev, A.Sh. & Kaisheva N.Sh. (2013). *Scientific basis for the pharmaceutical use of raw materials for alcohol production*. Volgograd: VSMU (in Russ.).
2. Kaishev A.Sh. (2011). *Study of biologically active substances of alcohol production waste* (Ph.D. dissertation). Pyatigorsk: PGFA (in Russ.).
3. Vinarov, A.Yu., Kovalsky, Yu.V. & Zaikina, A.I. (2004). Industrial biotechnology of distillery waste processing. *Ecology of the environment of the CIS countries*, 2, 84–86.
4. Kaishev, A.Sh., Kaisheva, N.Sh., Chelombitko, V.A., Vasilenko, Yu.K., Smolenskaya & G.V. (2012). Environmental aspects of post-alcohol grain stillage processing. *Ecology and Industry of Russia*, 1, 23–25.
5. Production technological regulations (PTP) for the production of alcohol from starchy raw materials for the enterprise LLC "Suvorovsky". Approved by the Ministry of Agriculture of the Russian Federation on 15.01.2004 (in Russ.).
6. TU (State Standard) 9296-248-00008064-98. Grain bard (in Russ.).
7. Pat. 2404766, Russian Federation, 2010.
8. Kaishev, A.Sh., Kaisheva, N.Sh., Vasilenko, Yu.K. & Marshalkin, M.F. (2012). Development of antioxidant and gastroprotective biocompositions based on alcohol waste. *Proceedings of higher educational institutions. Food Technology*, 5-6(329–330), 52–55.
9. Pat. 2662064, Russian Federation, 2016.
10. Pat. 2630466, Russian Federation, 2016.
11. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition, 2018.
12. Lutseva, T.Yu., Sadchikova, N.P. & Arzamastsev A.P. (2002). Methods for the analysis and standardization of medicinal quaternary ammonium bases. *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*, 3, 17–20.
13. GOST (State Standard) 32167-2013. Honey. Method for the determination of sugars (in Russ.).
14. Ushnutseva, O.A., Kovyazina, A.G. & Konyshev, S.A. (2003). Integrated technology of wastewater treatment for alcohol industry enterprises. *Distillery and winemaking*, 6(42), 13–14.
15. Instructions for the technochemical and microbiological control of alcohol production (approved by the head of the Federal Agency for Agriculture 2005).
16. Novikov, V.B. & Zverev, S.V. (2007). Bard in law. *Production of alcohol and alcoholic beverages*, 2, 31–34.