

На правах рукописи



**Красноштанова Алла Альбертовна**

**РАЗРАБОТКА НАУЧНЫХ ОСНОВ  
ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ  
ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ  
БИОПОЛИМЕРОВ  
НА ОСНОВЕ ОТХОДОВ ПИЩЕВОЙ  
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ  
ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

Специальность 03.00.23 - биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**



диссертации на соискание ученой степени  
доктора химических наук

**МОСКВА  
2009 г**

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д.И.Менделеева.

Научный консультант: доктор химических наук, профессор  
Крылов Игорь Алексеевич

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор  
Коваленко Леонид Владимирович

доктор химических наук, профессор  
Сильман Эсфирь Михайловна

доктор химических наук, профессор  
Семенова Мария Германовна

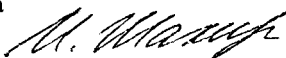
Ведущая организация: **Научно-Технический Центр**  
**«Лекарства и биотехнология»**  
**(НТЦ «Лекбиотех»)**

Защита диссертации состоится «24» ноября 2009 г в 10<sup>30</sup> часов на заседании объединенного Диссертационного совета ДМ 212.204.13 в Российском химико-технологическом университете им. Д.И. Менделеева по адресу: 125047, Миусская пл., д.9 в аудитории 443.

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «21» октября 2009г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
ДМ 212.204.13, к.т.н.



И.В. Шакир

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Разработка недорогих эффективных препаратов кормового, пищевого и медицинского назначения отечественного производства является одной из актуальных задач современной биотехнологии. Наибольшее практическое значение имеют препараты белковой, липидной, нуклеотидной и углеводной природы.

Препараты нуклеотидной природы (например, препарат ЭНКАД — смесь олигорибонуклеотидов и пиримидиновых нуклеозид-3'-фосфатов) широко применяются как лекарственные средства. Они регулируют нуклеотидный обмен, обладают иммуномодулирующими свойствами, применяются для лечения абитрофий различного происхождения, псориаза, рассеянного склероза и других социально значимых заболеваний [Шабанова с соавт., 2005].

Препараты белковой природы (гидролизаты и ферментализаты) применяются в качестве источника азота в микробиологических средах, как пищевые добавки, а при соответствующей очистке как смесь аминокислот для парентерального питания. Кроме этого, белковые гидролизаты служат сырьем для получения аминокислот, аминосульфокислоты таурина, играющей важную роль в обеспечении зрительной, кроветворной и др. функций организма человека и животных [Нестерова с соавт., 2001].

Моносахара, получаемые путем гидролиза углеводсодержащих субстратов, используют для производства кормовых и пищевых препаратов. [Мамыкин с соавт., 1998].

На основе жировых отходов возможно получение свободных жирных кислот, применяемых в производстве мыла, высших жирных кислот и спиртов для получения пищевых, парфюмерно-косметических и фармацевтических продуктов [Малахов, 2003].

В качестве сырья наиболее перспективно использовать отходы пищевой и микробиологической промышленности животного, растительного и микробного происхождения: пивную дробину — отход пивоваренной промышленности, жиросодержащие и кератинсодержащие отходы мясоперерабатывающей промышленности, биомассу хлебопекарных дрожжей — отход спиртового производства, биомассу бактерий *Brevibacterium flavum* — отход производства аминокислот и др. Практическая ценность отходов обусловлена: высоким содержанием в них липидов, белков, углеводов, нуклеиновых кислот; улучшением экологической обстановки на соответствующих производствах за счет утилизации данных отходов; возможностью организации выпуска дополнительной конкурентоспособной продукции, что позволит повысить рентабельность основного производства.

Вследствие высокого содержания в отходах биополимеров их целесообразно перерабатывать в гидролизаты пищевого, кормового или медицинского назначения. Для этого используют химический и ферментативный гидролиз.

---

### Список сокращений

БСА — бычий сывороточный альбумин, АОБ — алкилоксибензол, СВ — сухое вещество, ФС ПЖ — ферментные системы поджелудочной железы, ФС КП — ферментные системы клеток печени, ФП — ферментный препарат, ИЭТ — изоэлектрическая точка, ВМФ — высокомолекулярная фракция, НМФ — низкомолекулярная фракция, НК — нуклеиновые кислоты, ЖК — жирные кислоты.

К недостаткам первого относятся жесткие условия проведения: высокая температура, сильнокислые или сильнощелочные значения рН среды. Это приводит к образованию нежелательных побочных продуктов, а также увеличению содержания минеральных примесей в гидролизатах, что осложняет и удорожает их очистку. Вышеуказанных недостатков лишен ферментативный гидролиз, проводимый в более мягких условиях. Однако в этом случае не удастся достичь высокой степени гидролиза субстрата по причине инактивации ферментов. Для достижения высокой степени конверсии субстратов применяют дробную подачу ферментов, что ведет к повышению нормы их расхода, и, следовательно, увеличению себестоимости готового продукта и снижению эффективности ферментативного процесса. Одним из путей повышения эффективности ферментативного гидролиза является стабилизация ферментов, которую можно осуществить введением в реакционную среду или в раствор ферментного препарата модифицирующих добавок: полиолов, аминов, аминокислот, минеральных солей и др. [Горак, 2007]. Однако, как правило, стабилизация белка сопровождается ингибированием его каталитической активности [Göller, Galinski, 1999]. Поэтому разработка присмов и выяснение механизмов модификации белков, приводящей к их функциональной и операционной стабильности одновременно с повышением функциональной активности, имеет важное теоретическое и практическое значение. Также следует отметить, что у потребителей, особенно, пищевых, медицинских и кормовых препаратов могут возникнуть проблемы с качеством гидролизатов, полученных с использованием добавок. Указанную проблему можно решить применением модифицирующих добавок, получаемых из природного сырья. В качестве таких добавок можно использовать алкилксибензолы (АОБ), широко распространенные в природе, синтезируемые микроорганизмами и растениями [Kozubek, Tuman, 1998; Эль-Регистан с соавт., 1998, 2006] и обладающими функциями адаптогенов [Николаев с соавт., 2006]. Модифицированные АОБ ферменты обладают повышенной функциональной стабильностью, расширенными температурным и рН диапазонами активного катализа, что значительно снижает риск развития посторонней микрофлоры при продолжительном гидролизе и не требует поддержания стерильных условий. Кроме того, модификация белка АОБ приводит к значительному увеличению скорости ферментативного гидролиза [Мартиросова с соавт., 2005; El-Registan et al., 2005].

Другим «узким» местом ферментативного гидролиза является очистка получаемых продуктов, требующая использования дорогостоящих реагентов и препаративных методов (хроматографии, гель-фильтрации, диализа и т.п.), которые сложно масштабировать в промышленном производстве и желательно заменить более простыми и дешевыми методами.

Таким образом, утилизация отходов пищевой и микробиологической промышленности требует разработки эффективных способов получения ферментативных гидролизатов.

В условиях рыночной экономики конкурентоспособность производства зависит от его способности быстро адаптироваться к изменяющимся условиям рыночной среды и спроса на продукцию. Поэтому целесообразно разработать максимально унифицированные технологии получения ферментативных гидролизатов различной степени очистки и назначения для возможности быстрой подготовки технологических линий и получения продукции требуемого качества.

Анализ литературных данных показывает, что современные технологии получения ферментативных гидролизатов микробной, животной и растительной при-

роды существенно различаются как стадиями предварительной подготовки сырья, так и используемыми ФП и методами очистки получаемых продуктов. В связи с этим актуально разработать общие подходы к получению ферментативных гидролизатов из различных видов сырья; предложить общие пути повышения эффективности процессов ферментативного гидролиза; создать типовые кинетические схемы для количественного описания технологических стадий, что в совокупности позволит в дальнейшем предложить универсальные алгоритмы управления технологическими процессами.

**Целью исследования** является разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов белковой, липидной, углеводной и нуклеотидной природы на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности, а также повышение эффективности ферментативных процессов за счет структурной модификации и стабилизации применяемых ферментов.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) разработать технологические приемы предварительной обработки растительного, животного и микробного сырья, направленной на повышение эффективности их последующего ферментативного гидролиза;
- 2) изучить, используя кинетический метод исследований, закономерности процессов гидролиза биополимеров в реакциях, катализируемых модифицированными АОБ и нативными ферментами (на моделях высокоочищенных ферментов и субстратов); выявить общие закономерности влияния АОБ на скорость ферментативных реакций;
- 3) используя физико-химические методы анализа, выяснить возможные взаимодействия АОБ с ферментами и полимерными субстратами, способные научно обосновать наблюдаемые эффекты стимуляции или ингибирования катализа от введения АОБ в реакционную среду;
- 4) на основе выявленных на модельных системах закономерностей ферментативного гидролиза разработать пути повышения его эффективности для вариантов переработки микробного, растительного и животного сырья с применением технических ФП;
- 5) разработать технологические приемы выделения и очистки ферментативных гидролизатов белковой, липидной, нуклеотидной и углеводной природы и дать рекомендации по оптимизации условиям их получения;
- 6) провести проверку соответствия нормативных показателей получаемых препаратов требованиям соответствующих ТУ;
- 7) провести оценочные технико-экономические расчеты разработанных технологий и оценить их эколого-экономическую эффективность.

**Научная новизна.** Впервые показана возможность применения кинетического метода для описания закономерностей ферментативного гидролиза субстратов липидной, белковой и углеводной природы в составе микробного, растительного и животного сырья техническими препаратами нативных гидролаз, а также стабилизированных добавкой АОБ.

Выявлены общие для различных полимерных субстратов и ферментов закономерности ферментативных превращений, учитывающие влияние АОБ на скорость ферментативных реакций. Показано, что ключевыми стадиями, определяющими скорость ферментативного гидролиза в присутствии АОБ, являются образование комплексов фермента с АОБ и субстрата с АОБ.

Показана возможность применения подхода, разработанного для повышения активности и стабильности гидролаз в их комплексах с АОБ, к другим ферментным белкам на примере ферментных систем клеток печени, осуществляющих трансформацию серосодержащих аминокислот (цистеина и цистина) в таурин.

На основе количественного описания стадий ионного обмена и осаждения различных полимерных субстратов из водных и водно-спиртовых растворов разработаны схемы эффективной очистки гидролизатов.

Предложенные кинетические схемы предполагают возможность создания единого алгоритма управления технологическими процессами получения ферментативных гидролизатов на основе сырья различного происхождения.

Впервые с использованием квантово-химических и термодинамических расчетов, подтвержденных физико-химическими методами (УФ-, ИК-спектроскопия), показано, что образование комплекса АОБ с ферментом происходит за счет водородных связей между ОН-группами АОБ и функциональными группами аминокислот ферментного белка, расположенных в районах, прилегающих к активному центру, а также гидрофобных взаимодействий. Установлено, что образование комплексов АОБ с субстратом обусловлено теми же типами взаимодействий. Выявленные закономерности объясняют эффекты изменения каталитической активности ферментов, модифицированных АОБ.

**Практическая значимость.** Разработаны технологические режимы, обеспечивающие повышение эффективности ферментативного гидролиза биополимеров в составе отходов микробиологической и пищевой промышленности: 1) получения белковых гидролизатов из биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и бактерий *Brevibacterium flavum* с применением протосубтилина ГЗх; 2) переработки кератинсодержащего сырья в таурин с использованием протосубтилина ГЗх, ферментных систем поджелудочной железы крупного рогатого скота (ФС ПЖ КРС) и печени быка (ФС КП); 3) получения углеводной фракции из пивной дробины путем ее гидролиза ферментным комплексом (целловиридин ГЗх, глюкоамилаза *Aspergillus awamori* и панкреатическая  $\alpha$ -амилаза); 4) получения панкреатического гидролизата дрожжевой РНК и 5) гидролиза жиросодержащих отходов панкреатической липазой.

Разработаны технологические схемы переработки гидролизатов белковой, липидной, нуклеотидной и углеводной природы в конкурентоспособную продукцию медицинского, пищевого и кормового назначения.

На основе разработанных кинетических схем гидролиза различных биополимеров модифицированными АОБ гидролазами подобраны режимы ведения процессов ферментативной переработки сырья, обеспечивающие степень конверсии субстратов в присутствии АОБ не менее 90%, что позволяет сократить норму расхода ФП и время гидролиза в 2 – 8 раз.

Используя кинетический метод исследований, обоснованы оптимальные режимы выделения и очистки продуктов гидролиза, основанные на применении методов ультрафильтрации, ионного обмена и осаждения из водных и водно-спиртовых растворов.

Проведена технико-экономическая оценка разработанных технологий, которая показала, что применение АОБ для интенсификации ферментативных процессов приводит к снижению себестоимости продукции в 2-4 раза за счет снижения затрат на ФП, сокращения длительности технологического цикла и повышения вследствие этого эффективности работы оборудования. На основе экологи-

экономической оценки разработанных технологий показано, что предложенные способы переработки отходов позволяют снизить экологический ущерб на 0,5–40 млн. руб/год-завод.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы докладывались на Международных и Всероссийских научно-технических конференциях: Международной конференции «Химия и технология лекарственных средств» (Санкт-Петербург, 1994 г); 3, 4, 5 и 12 Международных конференциях «Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес, экологическое образование» (Самара – Астрахань – Самара, 1998, 1999, 2000, 2007 гг); Заочной научно-практической конференции «Биотехнология в ФЦП «Интеграция» (Санкт-Петербург, 1999 г); Международной конференции «Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов» (Москва, 2000 г); Международной конференции «От фундаментальной науки к новым технологиям. Химия и биотехнология БАВ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безопасные технологии» (Москва – Тверь, 2001 г); 1 – 5 Международных конгрессах «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2005, 2007, 2009 гг); Научно-технической конференции «Технологии живых систем» (Москва, 2003 г); XII Всероссийской конференции «Нейроиммунология» (Санкт-Петербург, 2003 г); Международной конференции «Биотехнология и медицина» (Москва, 2006 г); 4, 5 Российских конференциях «Нейроиммунопатология» (Москва, 2006, 2007 г).

**Публикация результатов исследований.** По материалам диссертации опубликованы 32 работы, в том числе 17 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, получено 6 патентов РФ на изобретения. Результаты исследования нашли отражение в 4-х учебных пособиях и монографии, написанных с участием автора.

Работа выполнена в соответствии с программой Министерства науки и образования РФ «Приоритетные направления развития науки и техники. Технологии живых систем».

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора (5 глав), методической части, результатов исследования и их обсуждения (7 глав), выводов и списка литературы из 422 наименований, в том числе 195 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 325 стр. и содержит 122 таблицы и 196 рисунков. Материалы, производственной апробации, подтверждающие основные результаты работы, приведены в приложении.

## **Глава 1. Обзор литературы.**

Обсуждены характеристики и области применения гидролизатов, получаемых на основе белкового, липидного, углеводного и нуклеотидного сырья, даны обзор и анализ существующих технологий их получения. Приведены данные по структуре и свойствам наиболее распространенных гидролитических ферментов и существующих способах стабилизации ферментов, включая использование химических, фармакологических и молекулярных шаперонов для этой цели. Приведена информация о свойствах природных алкилоксибензолов (АОБ) и возможностях их применения в качестве стабилизирующих добавок.

## Глава 2 «Материалы и методы исследования»

Объектами исследования являлись отходы пищевой и микробиологической промышленности. Их состав и годовое количество, образующееся на предприятиях средней мощности, приведены в табл. 1.

Таблица 1

Состав возобновляемых отходов растительного, животного и микробного происхождения

Наименование вторичного сырья	Среднегодовое количество отхода, т/год	Содержание, % к СВ			
		сырого протеина	углеводов	липидов	Нуклеиновых кислот
Пивная дробина	40000	30,0	70,0	отс.	отс.
Жиросодержащие отходы	10000	следы	следы	90.0	следы
Кератинсодержащее сырье	560	85.0	отс.	15.0	следы
Нативная биомасса дрожжей на примере <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10000	52.0	22.0	21.0	6.5
Нативная биомасса бактерий на примере <i>Brevibacterium flavum</i>	10000	61.2	12.2	20.0	8.3

Ферментные препараты: трипсин Г10х с активностью 2000 ед./г; рибонуклеаза Г3х панкреатическая с активностью 12000 ед./мг; амилаза Г3х панкреатическая с активностью 2000 ед./г; глюкоамилаза Г3х *Aspergillus awamori* с активностью 2000 ед./г; липаза панкреатическая с активностью 16 ед./г; протосубтилин Г3х с активностью 200 ед./г; целловиридин Г3х с активностью 200 ед./г; протеазы и пептидазы в составе поджелудочной железы крупного рогатого скота с активностью 2000 ед./г СВ; комплекс тауринообразующих ферментов в составе печени крупного рогатого скота с активностью по таурину 2000 ед./г СВ.

Содержание нуклеиновых компонентов в микробных клетках, экстрактах, гидролизатах и препаратах определяли по методу А.С. Спирина [Спирин, 1986]; содержание общего азота в микробных клетках, пивной дробине, кератинсодержащем сырье и препаратах – микрометодом Кьельдаля [Асатиани, 1964]; белковых веществ – модифицированным методом Лоури [Lowry, 1951]; аминного азота – в реакции с нингидриновым реактивом [Асатиани, 1964]; углеводов – фенол-серным методом [Жданов, 1963]; содержание воздушно-сухого вещества – по методике [Шакир с соавт., 2008]; свободных жирных кислот – по методике [Шакир с соавт., 2008], ХПК – по методу [Лобачев, 2006]; количество цистина и цистеина – титриметрически с использованием бромата и иодида калия соответственно [Критчфилд, 1965].

Активность протеаз и пептидаз ферментной системы поджелудочной железы определяли по методу Ансона [Северин, 1998]; тауринообразующих ферментов клеток печени – по методике [Сапронов, 1999]; панкреатической рибонуклеазы – по методу Калницкого [Фукс с соавт., 1990], амилазы и глюкоамилазы – спектрофотометрическим методом с 2,4-динитросалициловой кислотой [Грачева, 2001]; целловиридина – по методу [Польгалина с соавт., 2003], панкреатической липазы – титриметрическим методом [Польгалина с соавт., 2003].

Содержание мононуклеотидов в гидролизатах РНК и растворах определяли спектрофотометрически после разделения методом двуслойной ТСХ на пластине марки «Silufol-UV-254» с использованием элюентов: 1) изопропанол – аммиак – вода (45: 45: 2: 8 % об.) и 2) н-бутанол – ацетон – муравьиная кислота – вода (45: 45: 2: 8 % об.)

Спектрофотометрические измерения в ультрафиолетовой и видимой области спектра проводили на спектрофотометре марки «Спекорд М-40» (Германия). ИК-спектры снимали на ИК-спектрофотометре Фурье марки ФСМ-1201 (Россия) с использованием таблеток бромида калия, пропитанных 0,1%-ными растворами исследуемых веществ. Квантово-химические расчеты проводили с использованием стандартной программы “Nuclechem 7”, включающей полуэмпирические методы: расширенный метод Хюккеля, CNDO, INDO, MNDO, AM1, PM3, ZINDO1, ZINDO/S, а также средства визуализации для создания структур молекул и организации интерфейса с Broknoven PDB, Syly1 MOL2 и MOPAC.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартных программ решения алгебраических и дифференциальных уравнений с последующей оптимизацией их параметров и проверкой разработанных моделей на адекватность по критерию Фишера, отвечающего условию  $F_{\text{оп.}} < F_{\text{табл.}}$  для уровня значимости 0.05 [Худсон, 1970].

### **Глава 3. Результаты и обсуждение.**

Среди большого разнообразия источников биотехнологического сырья в настоящее время ведущее место занимают возобновляемые отходы пищевой и микробиологической промышленности. В табл. 1 приведен состав и среднегодовое количество отходов, образующихся на соответствующих предприятиях средней мощности.

Эти отходы характеризуются высоким содержанием биополимеров и могут служить сырьем для получения низкомолекулярных продуктов белковой, липидной, нуклеотидной и углеводной природы путем гидролиза техническими препаратами гидролаз. Схема проведения исследований приведена на рис. 1.

#### **3.1. Получение ферментативных гидролизатов белковых веществ из микробного сырья**

##### **3.1.1. Исследование количественных закономерностей ферментативного гидролиза белковых веществ на модельной системе БСА – трипсин**

Для установления количественных закономерностей ферментативного гидролиза белка на первом этапе работы исследовали гидролиз модельного белка БСА трипсином. Математически процесс описывался в соответствии с кинетической схемой Михаэлиса-Ментен, в которой вследствие различий в скоростях разрыва различных связей в молекуле белка выделяют несколько последовательных стадий. Установлено число лимитирующих стадий.

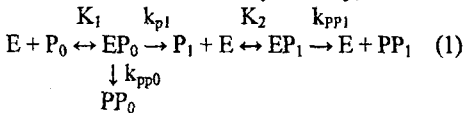
В экспериментах установлено влияние на процесс ферментативного гидролиза: 1) концентрации субстрата для обработки данных в координатах Лайнуивера-Берка; 2) концентрации фермента, необходимая для нахождения линейного участка зависимости скорости реакции от концентрации фермента; 3) температуры; 4) pH среды.

Типичные результаты экспериментов представлены на рис. 2 – 5.



Рис. 1. Принципиальная схема получения гидролизатов биополимеров.

Обработка полученных экспериментальных данных по стандартным методикам показала, что для математического описания гидролиза БСА трипсином можно использовать кинетическую схему, включающую две лимитирующие стадии:



где:  $P_0$ ,  $E$ ,  $EP_0$ ,  $EP_1$  – соответственно концентрации субстрата, фермента, продукта, фермент-субстратного комплекса;  $K_1$ ,  $K_2$  – константы равновесия образования соответствующих комплексов,  $k_{p1}$ ,  $k_{pp0}$ ,  $k_{pp1}$  – эффективные константы скорости гидролиза.

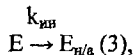
Температурная зависимость описывалась уравнением Аррениуса, а pH среды – уравнением специфического кислотно-основного катализа:

$$k = k^* / (1 + K_a \cdot [H^+]) \quad (2),$$

где:  $k^*$  – константа скорости, не зависящая от pH среды,  $K_a$  – константа равновесия образования протонированного комплекса,  $[H^+]$  – концентрация ионов водорода.

В результате обработки данных были найдены значения эффективных констант, энергий активации и параметров уравнения pH зависимости (табл.2).

Однако найденные закономерности оказались справедливыми только для начального участка кинетических кривых, а в дальнейшем экспериментальные данные по накоплению продуктов гидролиза оказались существенно ниже расчетных. Снижение скорости реакции может быть обусловлено инактивацией фермента в свободном состоянии или в комплексе с субстратом, а также ингибированием фермента продуктами гидролиза. Результаты исследования влияния начальной концентрации продукта на скорость гидролиза, а также частичной инактивации фермента (прогревом при температуре 90°C) показали, что для гидролиза БСА трипсином характерна инактивация свободного фермента при отсутствии ингибирования конечным продуктом. Дополнение предложенной кинетической схемы (1) уравнением инактивации позволило добиться адекватного описания экспериментальных данных:



где:  $k_{ин}$  – константа скорости инактивации,  $E_{и/a}$  – концентрация инактивированного фермента.

В экспериментах степень гидролиза БСА при оптимальных условиях реакции не превышала 40%. Расчеты показали нецелесообразность увеличения времени гидролиза свыше 2 ч, т.к. к этому времени 81% фермента находится в инактивированном состоянии. Согласно разработанной кинетической схеме достижение 90% конверсии БСА возможно при условиях гидролиза, приведенных в табл. 3. При этом, норма расхода трипсина возрастает до 14% от массы субстрата, а длительность гидролиза составляет не менее 14 ч. Другой способ повышения эффективности ферментативного гидролиза основан на введении в реакционную среду добавок, способных повысить активность и стабильность ФП и, соответственно, увеличить выход продуктов гидролиза.

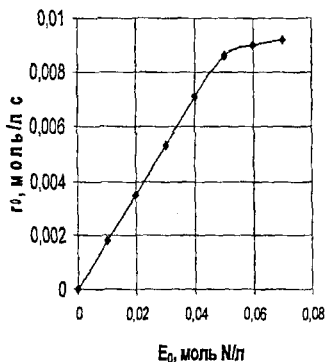


Рис.2. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от начальной концентрации фермента.

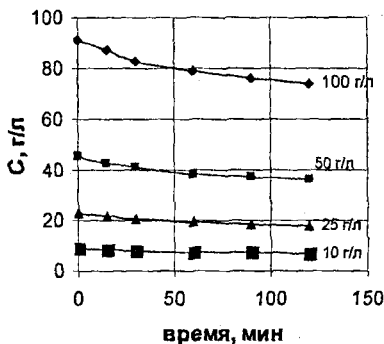


Рис.3. Влияние начальной концентрации БСА на выход продуктов его гидролиза трипсином.

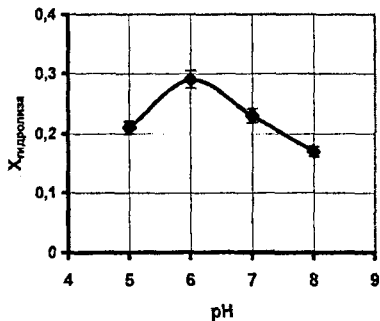
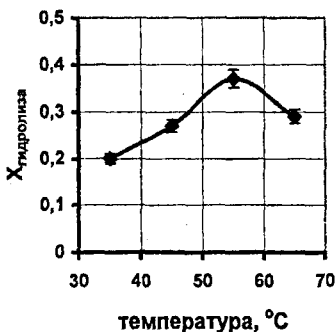


Рис. 4. Влияние температуры на выход (X\*) продуктов гидролиза БСА трипси- ном. Рис. 5. Влияние pH среды на выход продук- тов гидролиза БСА трипсином.

\* - на всех последующих рисунках обозначение X также относится к выходам продуктов при гидролизе, осаждении, ионообменном выделении и т.п.

Таблица 2

Значения эффективных констант и энергий активации отдельных стадий процесса ферментативного гидролиза БСА трипсином А) в отсутствие АОБ

Путь	E, кДж/моль	K <sub>a</sub> , л/моль	k*, с <sup>-1</sup>	K <sub>1</sub> = 0.50 ± 0.05 л/моль; K <sub>2</sub> = 0.26 ± 0.02 л/моль
k <sub>р0</sub>	42 ± 3	(3.53 ± 0.46) · 10 <sup>-6</sup>	0.0020 ± 0,0002	
k <sub>рр0</sub>	22 ± 2	(4.24 ± 0.16) · 10 <sup>-3</sup>	0.0082 ± 0,0008	
k <sub>рр1</sub>	18 ± 1	(1.05 ± 0.14) · 10 <sup>-3</sup>	0.015 ± 0,002	
k <sub>ин</sub>	20 ± 1	0.119 ± 0.015	0.00023 ± 0,0003	

Б) в присутствии С<sub>7</sub>-АОБ/ С<sub>12</sub>-АОБ

Путь	E, кДж/моль	K <sub>a</sub> , л/моль	k*, с <sup>-1</sup>
k <sub>d</sub>	26 ± 2/19 ± 1	(1,27 ± 0,17) · 10 <sup>-3</sup> / (1,02 ± 0,13) · 10 <sup>-6</sup>	0,30 ± 0,03/4,07 ± 0,45
k <sub>a</sub>	32 ± 2/24 ± 2	(6,83 ± 0,89) · 10 <sup>-3</sup> / (5,47 ± 0,71) · 10 <sup>-6</sup>	0,0013 ± 0,0001/0,0014 ± 0,009
k <sub>s</sub>	15 ± 1/17 ± 1	(2,50 ± 0,33) · 10 <sup>-3</sup> / (1,04 ± 0,14) · 10 <sup>-3</sup>	4,77 ± 0,52/9,15 ± 0,65
k <sub>рр0,d1</sub>	17 ± 1/23 ± 2	(9,37 ± 1,22) · 10 <sup>-6</sup> / (7,00 ± 0,91) · 10 <sup>-6</sup>	0,0055 ± 0,0006/0,0057 ± 0,0007
k <sub>рр1,d1</sub>	16 ± 1/15 ± 1	(1,59 ± 0,21) · 10 <sup>-3</sup> / (1,06 ± 0,14) · 10 <sup>-3</sup>	0,0087 ± 0,001/0,0085 ± 0,001
k <sub>р1,d1</sub>	24 ± 2/37 ± 3	(6,59 ± 0,86) · 10 <sup>-3</sup> / (1,06 ± 0,14) · 10 <sup>-3</sup>	0,15 ± 0,02/0,0020 ± 0,0002
k <sub>рр0,d2</sub>	18 ± 2/21 ± 2	(9,37 ± 1,22) · 10 <sup>-6</sup> / (7,00 ± 0,21) · 10 <sup>-6</sup>	0,0059 ± 0,006/0,0052 ± 0,004
k <sub>рр1,d2</sub>	17 ± 2/14 ± 1	(1,59 ± 0,21) · 10 <sup>-3</sup> / (1,06 ± 0,14) · 10 <sup>-3</sup>	0,0093 ± 0,001/0,0077 ± 0,001
k <sub>р1,d2</sub>	26 ± 2/34 ± 2	(6,59 ± 0,86) · 10 <sup>-3</sup> / (3,33 ± 0,43) · 10 <sup>-6</sup>	0,16 ± 0,02/0,0018 ± 0,0002
k <sub>инд</sub>	21 ± 2/34 ± 2	(1,46 ± 0,14) · 10 <sup>-3</sup> / (1,89 ± 0,19) · 10 <sup>-6</sup>	0,00045 ± 0,0005/0,00083 ± 0,00008
K <sub>1d</sub> = 0,25 ± 0,02 л/моль; K <sub>2d</sub> = 0,15 ± 0,01 л/моль; K <sub>3d</sub> = 0,17 ± 0,01 л/моль, K <sub>4d</sub> = 0,11 ± 0,01 л/моль			

Среди химических соединений, используемых для интенсификации ферментативных процессов: минеральных солей, ПАВ, полиолов, аминов и аминокислот,

были выбраны природные соединения, относящиеся к классу алкилоксибензолов (АОБ), вырабатываемые микроорганизмами и растениями и участвующими в контроле перехода в покоящееся состояние (анабиоз). В работе использовали два гомолога АОБ, различающихся длиной углеводородного радикала (гидрофобностью). Они были условно обозначены как С<sub>7</sub>-АОБ и С<sub>12</sub>-АОБ.

Таблица 3

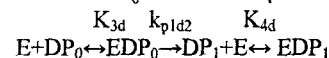
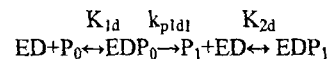
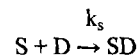
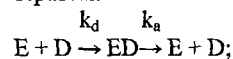
Условия ферментативного гидролиза БСА трипсином, обеспечивающие степень гидролиза не менее 95%

Расход фермента, % от субстрата	t, ч	T, °C	pH	Тип АОБ; его концентрация, моль/л, мольное соотношение АОБ: фермент
14	14	45±2	6.0±0.2	без АОБ
6	6	55±2	6.0±0.2	С <sub>7</sub> -АОБ; 2.5·10 <sup>-4</sup> , 5:1
16	16	55±2	6.0±0.2	С <sub>12</sub> -АОБ; 5.0·10 <sup>-5</sup> , 1:1

Известно, что влияние АОБ на ферментативную активность (стимуляция – ингибирование) зависит от концентрации и структуры АОБ, также наблюдается эффект расширения T- и pH-диапазонов активного катализа [Мартиросова с соавт., 2005; El-Regislan et al., 2005]. Рис. 6 иллюстрирует влияние концентрации АОБ на скорость гидролиза БСА трипсином: в случае С<sub>7</sub>-АОБ она увеличивается по сравнению с контролем в 4 раза, а в случае С<sub>12</sub>-АОБ – уменьшается в 4 раза.

Поскольку в данных экспериментах исследовалась 3-х компонентная система, то для установления кинетической схемы, описывающей участие АОБ в процессе гидролиза, были поставлены опыты по предынкубации раздельно фермента и субстрата с АОБ в ранее подобранных оптимальных концентрациях при ведении гидролиза в стандартном режиме (рис. 7 и 8). Оказалось, что при малом времени предынкубации для каждого АОБ наблюдается снижение скорости гидролиза на 10 - 20%, а при его увеличении до 20 мин — увеличение на 50 - 70%.

С позиций формальной кинетики процесс ферментативного гидролиза в присутствии АОБ может быть описан схемами превращений (1) и (2), дополненными уравнениями, учитывающими образование комплексов АОБ с ферментом и субстратом:



(4),  
где: D, ED, DP<sub>0</sub>, DP<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>D, EDP<sub>0</sub>, EDP<sub>1</sub>, – соответственно концентрации АОБ, комплексов фермента с АОБ, субстрата с АОБ, тройного интермедиата субстрата и фермента с АОБ. Остальные обозначения аналогичны схеме (1).

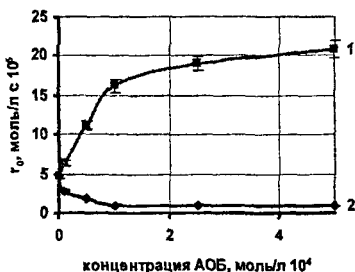


Рис. 6. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от начальной концентрации  $C_7$ -АОБ (1) и  $C_{12}$ -АОБ (2).

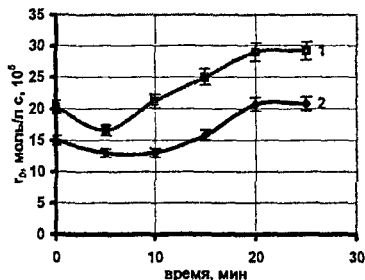


Рис. 7. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от времени предынкубации с ферментным препаратом  $C_7$ -АОБ (1) и  $C_{12}$ -АОБ (2).

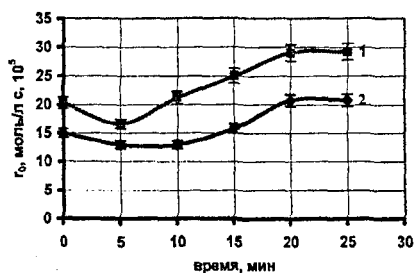


Рис. 8. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от времени предынкубации субстрата с  $C_7$ -АОБ (1) и  $C_{12}$ -АОБ (2).

Таким образом, введение АОБ в среду гидролиза БСА трипсином в оптимальных условиях позволяет сократить норму расхода ФП и время процесса в 2 раза (табл. 3).

### 3.1.2. Исследование количественных закономерностей экстракции белковых веществ из биомассы дрожжей и бактерий протосубтилином ГЗх и ФС ПЖ КРС

Полученные на модельной системе закономерности были применены к получению белковых гидролизатов из биомассы дрожжей и бактерий.

В качестве сырья для получения белковых гидролизатов использовали: биомассу дрожжей *S. cerevisiae* (отход пивоваренного производства) и биомассу бактерий *B. flavum* (отход производства аминокислот), которые характеризуются высоким содержанием сырого протеина и нуклеиновых кислот (табл. 1). Поэтому из них целесообразно получать гидролизаты белковой и нуклеотидной природы. При извлечении из микробной биомассы белковых веществ ее подвергали предварительной денуклеинизации по ранее разработанной технологии [Крылов, Волкова, 1995]: температура  $90^{\circ}\text{C}$ ; pH 9.0; время обработки клеток 1 ч; концентрация клеток 10% СВ. После обработки денуклеинизированную биомассу отделяли фильтрованием и направляли на ферментативный гидролиз. Так как наибольшее практиче-

ское значение имеют гидролизаты со степенью гидролиза белка (отношением аминного азота к общему) не менее 50%, получаемые при использовании пептидаз, в наших исследованиях применяли пептидазы в составе ПЖ КРС, подготовленные по известной методике [Неклюдов с соавт., 1995]. С целью снижения нормы расхода ПЖ КРС ферментативный гидролиз проводили в два этапа: на первом - осуществляли гидролиз микробных белков ФП протосубтилином ГЭх с целью расщепления ВМФ белка до пептидов, а на втором этапе - гидролизую пептиды протеазами ФП ПЖ КРС.

С целью повышения эффективности гидролиза ферментные препараты стабилизировали с помощью АОБ. Эксперименты показали, что процессы распада микробных белков подчиняются вышеприведенным кинетическим схемам для модельной системы и различаются только значениями параметров (табл. 4), а также тем, что ФС ПЖ КРС подвергаются ингибированию продуктами гидролиза по уравнению:

$E + P \leftrightarrow E P_{н/а}$  (5), где:  $K_{и}$  - константа ингибирования,  $E P_{н/а}$  - концентрация неактивного комплекса фермент-продукт.

Таблица 4.

Значения констант и энергий активации отдельных стадий процесса гидролиза белковых веществ дрожжей и бактерий под действием протосубтилина и ФС ПЖ КРС

А) под действием протосубтилина ГЭх

Определяемый параметр	Путь кинетической схемы, определяемый эффективной константой			
	$k_{pp0}$	$k_{pp1}$	$k_{p0}$	$k_{ин}$
Белок дрожжей				
$E, \text{кДж/моль}$	$31 \pm 2$	$17 \pm 1$	$16 \pm 1$	$50 \pm 4$
$k, \text{с}^{-1}$	$0,35 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,04$	$(1,3 \pm 0,02) \cdot 10^{-4}$
$K_{и}, \text{л/моль}$	$1,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$
$K_1 = 0,037 \pm 0,002 \text{ л/г}, K_2 = 0,018 \pm 0,003 \text{ л/г}$				
Белок бактерий				
$E, \text{кДж/моль}$	$31 \pm 2$	$17 \pm 1$	$16 \pm 1$	$50 \pm 4$
$k, \text{с}^{-1}$	$0,17 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02$	$(0,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$
$K_{и}, \text{л/моль}$	$1,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$
$K_1 = 0,53 \pm 0,04 \text{ л/моль}, K_2 = 0,26 \pm 0,03 \text{ л/моль}$				

Б) под действием ФС ПЖ КРС

Определяемый параметр	Путь кинетической схемы, определяемый эффективной константой			
	$k_{pp0}$	$k_{pp1}$	$k_{p0}$	$k_{ин}$
Белок дрожжей				
$E, \text{кДж/моль}$	$25 \pm 2$	$40 \pm 2$	$32 \pm 2$	$22 \pm 2$
$k, \text{с}^{-1}$	$1,3 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$
$K_{и}, \text{л/моль}$	$(6,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$	$(5,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(2,9 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(3,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
$K_{1д} = 47,6 \pm 5,6 \text{ л/моль}, K_{2д} = 32,0 \pm 5,6 \text{ л/моль}, K_{ид} = 350 \pm 40 \text{ л/моль}$				
Белок бактерий				
$E, \text{кДж/моль}$	$25 \pm 2$	$40 \pm 2$	$32 \pm 2$	$22 \pm 2$
$k, \text{с}^{-1}$	$0,8 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,01$	$3,4 \pm 0,3$
$K_{и}, \text{л/моль}$	$(3,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(2,9 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$(3,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
$K_1 = 0,24 \pm 0,02 \text{ л/моль}, K_2 = 0,16 \pm 0,01 \text{ л/моль}, K_{и} = 0,58 \pm 0,06 \text{ л/моль}$				

Результаты исследований влияния АОБ на ферментативный гидролиз микробных белков, обобщенные в табл. 5, показали принципиальную идентичность констант с ранее полученными для модельного процесса.

Применение С<sub>7</sub>-АОБ позволяет сократить норму расхода протосубтилина в 2 раза и, соответственно, во столько же раз сократить время ферментализации. Для достижения 50%-ного выхода аминного азота полученные на первом этапе пептиды гидролизуют ФС ПЖ КРС, в которой ферменты стабилизируют С<sub>12</sub>-АОБ, эффективным в более гидрофобной среде раствора пептидов. При ведении процесса при повышенных до 60 — 65°C температурах время гидролиза и расход ФП сокращались в 2 раза.

Таблица 5

Оптимальные условия гидролиза микробных субстратов техническими ФП протеаз

Наименование ферментативного процесса	Тип АОБ; концентрация, моль/л	Условия гидролиза			
		T, °C	pH	Расход ФП, % от субстрата	T, ч
Экстракция белковых веществ из биомассы дрожжей <i>S. cerevisiae</i> протосубтилином ГЗх	без	55 ± 2	7,4 ± 0,2	4,0	4
	C <sub>7</sub> , 1,0 · 10 <sup>-4</sup>	60 ± 2	8,0 ± 0,2	2,0	2
	C <sub>12</sub> , 5,0 · 10 <sup>-3</sup>	60 ± 2	8,0 ± 0,2	6,0	6
Экстракция белковых веществ из биомассы бактерий <i>B. flavum</i> протосубтилином ГЗх	без	55 ± 2	7,4 ± 0,2	8,0	8
	C <sub>7</sub> , 1,0 · 10 <sup>-4</sup>	60 ± 2	8,0 ± 0,2	4,0	4
	C <sub>12</sub> , 5,0 · 10 <sup>-3</sup>	60 ± 2	8,0 ± 0,2	12,0	12
Гидролиз белковых веществ дрожжей <i>S.cerevisiae</i> ФС ПЖ КРС	без	60 ± 2	6,5 ± 0,2	8,0	8
	C <sub>7</sub> , 1,0 · 10 <sup>-3</sup>	65 ± 2	6,5 ± 0,2	12,0	12
	C <sub>12</sub> , 1,0 · 10 <sup>-5</sup>	65 ± 2	6,5 ± 0,2	4,0	4
Гидролиз белковых веществ бактерий <i>B. flavum</i> ФС ПЖ КРС	без	60 ± 2	6,5 ± 0,2	16,0	16
	C <sub>7</sub> , 1,0 · 10 <sup>-3</sup>	65 ± 2	6,5 ± 0,2	20,0	20
	C <sub>12</sub> , 1,0 · 10 <sup>-5</sup>	65 ± 2	6,5 ± 0,2	8,0	8

### 3.1.4. Разработка стадий выделения и очистки белковых гидролизатов

Полученный ферментализат перерабатывался по ранее предложенной [Купов, 1990] для дрожжей р. *Candida maltosa* схеме. На заключительных стадиях очистки проводили отделение взвешанных частиц путем мембранной фильтрации с использованием полых волокон ВПУ-15 ПА; ионообменную хроматографию на катионите КУ-2х8 в статических условиях с элюцией смеси аминокислот и низших пептидов 3%-ным раствором аммиака. Применение этих обработок позволило повысить содержание аминного азота в гидролизате на 10% и снизить количество примесей углеводов в 1,7 раза. Готовый концентрат выдерживали при температуре 4-6°C в течение 8-10 ч с целью осаждения хлорида аммония, который отделяли фильтрованием. Очищенный препарат гидролизата высушивали в распылительной сушилке до остаточной влажности не более 7% (рис. 9).

Проведенные технико-экономические расчеты показали, что из 1 т дрожжей можно получить 53,5 кг гидролизата с себестоимостью около 600 руб/т. Предотвращенный экологический ущерб при переработке 1000 т дрожжевой биомассы в год составляет не менее 1,5 млн. руб.

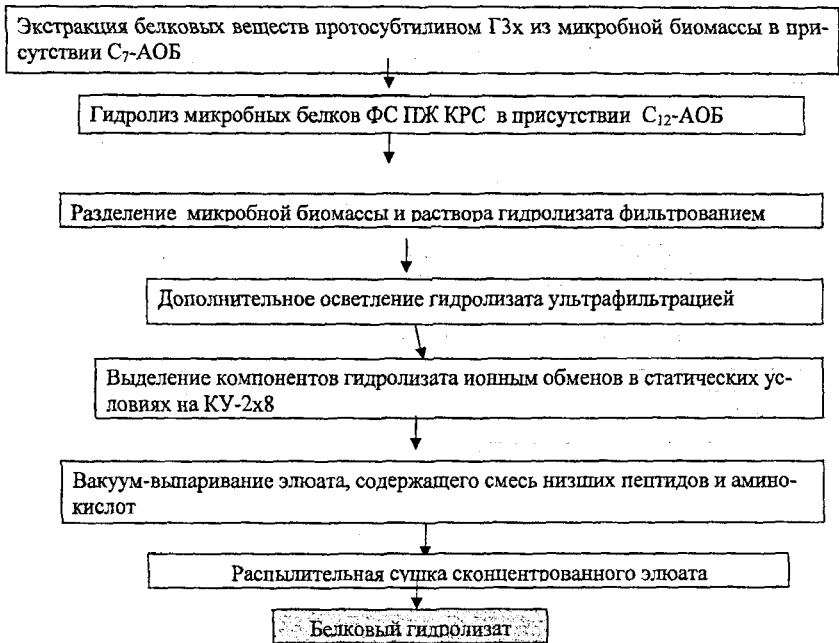


Рис. 9. Принципиальная схема получения белковых гидролизатов из микробной биомассы.

### 3.2. Получение панкреатического гидролизата дрожжевой РНК

Микробная биомасса содержит до 11% нуклеиновых кислот и может служить сырьем для получения микробной РНК, из которой можно получать деринаты (смесь олигонуклеотидов). В частности, панкреатический гидролизат РНК, который находит применение в медицине для лечения широкого круга заболеваний.

#### 3.2.1. Исследование количественных закономерностей гидролиза дрожжевой РНК панкреатической рибонуклеазой

В наших исследованиях сырьем явилась РНК, выделенная из биомассы дрожжей р. *Saccharomyces cerevisiae* по ранее разработанной технологии [Волкова, 1996], которую гидролизовали панкреатической рибонуклеазой (14000 ед./мг). Исследовали кинетику гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой и влияние АОБ на эффективность процесса. Было установлено, что в отличие от гидролиза микробных белков, в данном случае процесс может быть описан в одну стадию, а фермент подвергается как термоинактивации, так и ингибированию продуктами гидролиза (олигонуклеотидами):



При этом, согласно результатам расчетов (6), вклад термоинактивации в общую инактивацию фермента не превышает 20%, что объясняется высокой стабиль-

ностью данного фермента. В результате обработки экспериментальных данных была доказана адекватность предложенной схемы и рассчитаны ее параметры. Таким образом, можно сделать вывод о том, что ферментативный гидролиз как белков, так и нуклеиновых кислот может быть описан единой кинетической схемой, в которой различаются только численные значения параметров и число лимитирующих стадий.

Полученные кинетические схемы были использованы для подбора оптимальных условий гидролиза дрожжевой РНК как в отсутствие, так и в присутствии стабилизирующих добавок (табл. 6).

Таблица 6

Условия ферментативного гидролиза дрожжевой РНК, обеспечивающие степень гидролиза не менее 95%

Расход фермента, % от субстрата	t, ч	T, °C	pH	Тип АОБ; концентрация, моль/л; мольное соотношение АОБ: фермент
0.4	4	65±2	5.5±0.2	без
0.2	2	85±2	5.5±0.2	d <sub>1</sub> -C <sub>7</sub> , 2.5·10 <sup>-4</sup> ; 10:1
0.7	7	65±2	5.5±0.2	d <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> , 5.0·10 <sup>-4</sup> ; 20:1

В результате ферментативного гидролиза был получен гидролизат, содержащий не менее 70% олигонуклеотидов, которые отделяли от ВМФ рибонуклеотидов ультрафильтрацией на мембране УАМ-100, что позволило сконцентрировать раствор в три раза при 2-х кратной промывке водой.

Из кинетической схемы следует, что для повышения эффективности процесса целесообразно использовать С<sub>7</sub>-АОБ. Это приводит к сокращению времени процесса и нормы расхода ФП в 2 раза при выходе продукта 65% от массы РНК. Эффективность С<sub>7</sub>-АОБ при гидролизе РНК согласуется с данными для гидролиза микробных белков и подтверждает, что С<sub>7</sub>-АОБ оказывается более эффективным в гидрофильной среде, чем С<sub>12</sub>-АОБ.

### 3.2.2. Разработка стадий выделения и очистки панкреатического гидролизата дрожжевой РНК

Согласно литературным данным олигонуклеотиды выделяют осаждением из водно-спиртового раствора [Фукс, 1996]. В этом случае степень осаждения продуктов гидролиза не превышает 80%. Это связано с дополнительным гидролизом РНК примесными РНК-азами в процессе ультрафильтрации, что приводит к увеличению выхода спирторастворимой фракции. Снижения ее выхода можно добиться: 1) ведением процесса в стерильных условиях, что значительно повысит энергозатраты; 2) введением в гидролизат на стадии ультрафильтрации ингибитора нуклеаз. Второй способ предпочтителен. В качестве ингибитора нуклеаз использовали миндальную кислоту, которая, являясь медицинским препаратом, не будет ухудшать санитарно-токсикологические качества гидролизата.

Добавление миндальной кислоты в гидролизат (0.115 г/л) минимизировало образование спирторастворимой фракции и обеспечивало выход олигонуклеотидов на стадии осаждения не менее 95%. Смесь олигонуклеотидов осаждали из водно-спиртового раствора при объемном соотношении спирт : вода (10:1), температуре 4

– 6°С в течение 4 ч. Осадок отделяли центрифугированием и высушивали в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше 60°С до остаточной влажности 5-6%.

Для получения лекарственной формы готовили раствор в 0.65% NaCl (35 г/л), проводили стерилизующую фильтрацию ( $D = 200 \text{ \AA}$ ), разливали в ампулы и стерилизовали в течение 30 – 35 мин при температуре 120°С. Результаты испытаний, проведенных в соответствии с требованиями ВФС, показали, что полученный продукт не обладает токсичностью и апиrogenностью. Принципиальная схема получения панкреатического гидролизата приведена на рис. 10.

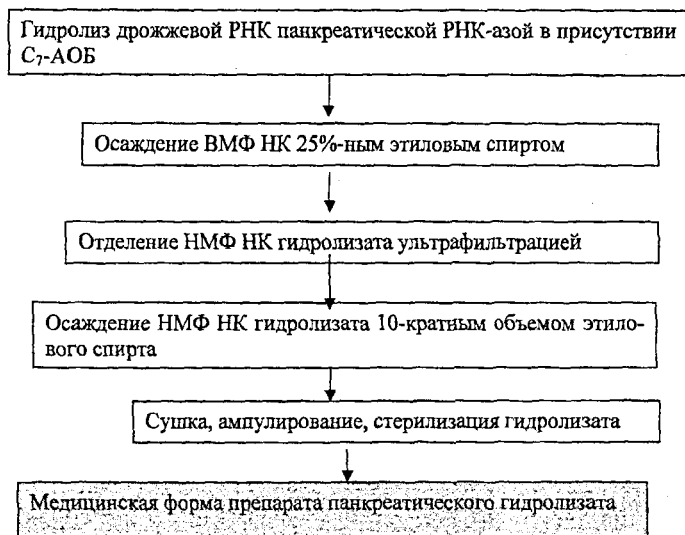


Рис. 10. Принципиальная схема получения панкреатического гидролизата РНК.

Согласно технико-экономической оценке разработанной технологии себестоимость панкреатического гидролизата РНК при мощности производства 50 кг/год составляет 190 тыс. руб/кг, что ниже, чем по известным технологиям [Шабанова, 2005] в 1,8 раза.

### 3.3. Получение ферментативных гидролизатов на основе животного сырья

В качестве сырья были выбраны отходы мясоперерабатывающих производств - кератинсодержащие и жиросодержащие, наиболее крупнотоннажные и трудноутилизуемые. Так, на мясокомбинате средней мощности образуется до 560 т/год кератинсодержащих и до 10 тыс. т/год жиросодержащих отходов.

#### 3.3.1 Получение ферментативных гидролизатов белковой природы из кератинсодержащего животного сырья

Кератинсодержащее сырье содержит до 85% сырого протеина и может быть эффективно переработано в белковый гидролизат. Характерной особенностью такого белка является высокое содержание цистина и цистеина (до 11%), в связи с чем его можно использовать для балансировки аминокислотного состава белковых

гидролизатов микробного происхождения, бедных серосодержащими аминокислотами. Не менее перспективным представляется получение на основе гидролизата кератинов препарата таурина — 2-аминосulfокислоты, находящей широкое применение в медицине и кормопроизводстве. В мировой биотехнологической практике производство таурина широко поставлено. Однако все известные технологии основаны либо на химическом синтезе, либо на переработке ценного пищевого сырья (петушинные гребни) или морских гидробионтов [пат. США №4232123, 1980; пат. США № 3692538, 1997].

Первой стадией переработки кератинсодержащего сырья является экстракция кератинов водно-щелочными (но не кислыми) растворами (по данным предварительных исследований). В качестве экстрагента использовали раствор гидроксида натрия. На рис. 11 приведены типичные кривые экстракции кератинов и расходования щелочи в данном процессе. Исследования по влиянию начальной концентрации кератинов и щелочи в среде, а также температуры, показали, что как процесс экстракции кератинов, так и расходование щелочи подчиняются уравнению первого порядка, что может быть выражено следующей схемой последовательно-параллельных превращений:

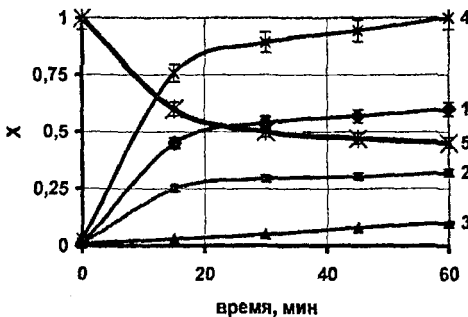
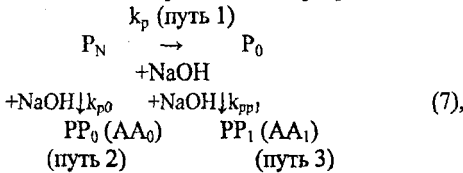


Рис. 11. Кривые расходования гидроксида натрия (5) и накопления белковых веществ: VMF (1), NMF (2), аминного азота (3), а также их сумма (4) в процессе щелочной экстракции кератинов.

Кинетика процесса подчиняется уравнениям Аррениуса и специфического кислотно-основного катализа. В результате обработки экспериментальных данных была доказана справедливость схемы (7), и найдены значения ее параметров.

На основе разработанной кинетической схемы предложены оптимальные условия экстракции кератинов: температура 90°C; концентрация гидроксида натрия 0.2 моль/л; начальная концентрация кератинов в суспензии — 10%; время экстракции — 1 ч. При данных условиях степень экстракции кератинов составляла 95-97%, а соотношение VMF и NMF белковых веществ в экстракте — 3:2, причем степень деструкции аминокислот, прежде всего, цистина, а также аргинина, не превышала 5 — 7%, что контролировалось по накоплению в растворе свободного сероводорода и аммиака. Для получения таурина необходимо, чтобы не менее 70% белковых веществ в экстракте было представлено свободными аминокислотами. По-

этому с целью глубокого гидролиза белка полученный экстракт подвергали дополнительной обработке в двух вариантах: 1) проведения экстракции в более жестких условиях для гидролиза ВМФ кератинов до НМФ; 2) ферментативного гидролиза ВМФ белков в составе экстракта до пептидов и свободных аминокислот.

В первом варианте на основе разработанной кинетической схемы были подобраны оптимальные условия экстракции кератинов, обеспечивающие 95%-ный выход НМФ белков: температура 150°C; концентрация щелочи 0,25 моль/л; время экстракции 60-90 мин. При экспериментальной проверке состав экстракта соответствовал расчетному, однако полученный раствор имел интенсивную окраску, что существенно осложняло его дальнейшую очистку.

Для реализации второго варианта необходимо было выбрать ФП для гидролиза кератинов. Отметим, что до настоящего времени не удалось подобрать эффективных протеаз и пептидаз, а использование специфических кератиназ приводит к существенному удорожанию процесса [Ноймюллер, 2003]. Мы оценили результативность применения для гидролиза кератина тех же ФП, которые использовались для гидролиза микробных белков. Результаты последовательной обработки кератинов протосубтилином ГЗх и ФС ПЖ КРС, в том числе варианты стабилизации гидролаз с помощью АОБ приведены в табл. 7.

Таблица 7  
Оптимальные условия гидролиза кератинов и трансформации цистина и цистеина в таурин техническими ферментными препаратами

Наименование ферментативного процесса	Расход ФП, % от субстрата	$\tau$ , ч	T, °C	pH	Тип АОБ; концентрация, моль/л.
Гидролиз кератинов протосубтилином	4.0	4	55 ± 2	7,4 ± 0,2	без
	10.0	10	55 ± 2	7,4 ± 0,2	C <sub>12</sub> 5,0 · 10 <sup>-5</sup>
	3.2	3	60 ± 2	7,4 ± 0,2	C <sub>7</sub> 1,0 · 10 <sup>-4</sup>
Гидролиз кератинов ФС ПЖ КРС	8.0	8	60 ± 2	6,5 ± 0,2	без
	20.0	20	60 ± 2	6,5 ± 0,2	C <sub>7</sub> 1,0 · 10 <sup>-5</sup>
	4.0	4	65 ± 2	6,5 ± 0,2	C <sub>12</sub> 1,0 · 10 <sup>-5</sup>
Трансформация цистина ФС КП	6.0	6	40 ± 2	2,0 ± 0,2	без
	9.0	7.5	50 ± 2	1,5 ± 0,2	C <sub>7</sub> 5 · 10 <sup>-5</sup>
	6.0	5.0	50 ± 2	1,5 ± 0,2	C <sub>12</sub> 5 · 10 <sup>-4</sup>
Трансформация цистеина ФС КП	10.0	10	40 ± 2	5,0 ± 0,2	без
	5.0	4.5	40 ± 2	5,0 ± 0,2	C <sub>7</sub> 5 · 10 <sup>-5</sup>
	3.5	3.0	40 ± 2	5,0 ± 0,2	C <sub>12</sub> 5 · 10 <sup>-4</sup>

Обработка соответствующих серий экспериментальных данных показала, что кинетическое описание процесса гидролиза кератиновых белков как в отсутствие, так и в присутствии АОБ, аналогично ранее установленному для микробных белков и позволяет рассчитать для данного процесса параметры согласно схемам (1) – (4), а также определить оптимальные условия процесса, которые оказались близки к ранее установленным для гидролиза дрожжевых белков. Из полученных данных следует, что последовательное применение протосубтилина ГЗх и ФС ПЖ КРС позволяет производить гидролизаты кератинов со степенью гидролиза белка

не менее 70% с содержанием в них цистина и цистеина, соответственно, 0.033 и 0.017 моль/л. Такой гидролизат в дальнейшем может быть использован для получения таурина.

### 3.3.2. Получение таурина из кератинсодержащего сырья.

Процесс получения таурина основан на биотрансформации цистина и цистеина, для чего целесообразно использовать ферментные системы клеток печени КРС (ФСКП КРС) [Неклюдов, 2005], которые можно получать непосредственно на том же мяскокомбинате, что и исходное сырье.

Из литературы известно, что биохимическая схема этого процесса сложная и многостадийная [Антипова, 2003] (рис.12).

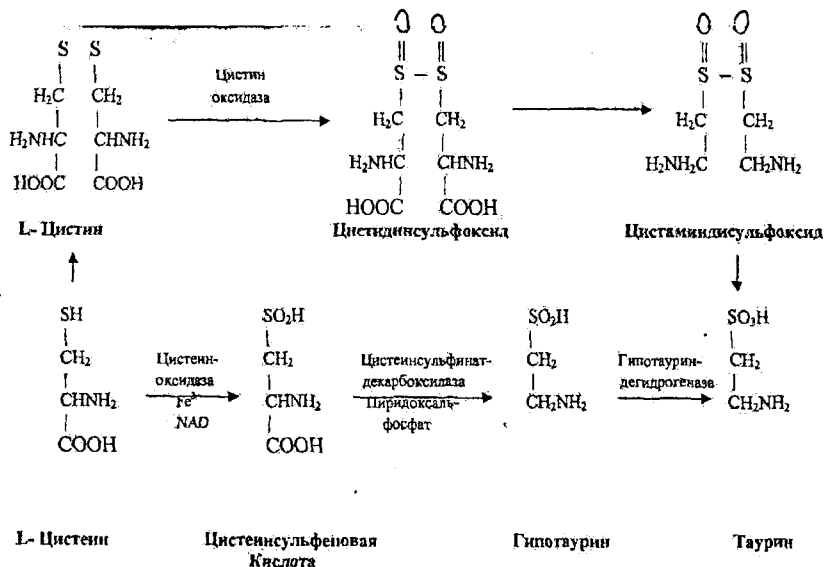


Рис. 12. Биохимическая схема биосинтеза таурина.

На первом этапе работы были изучены количественные закономерности трансформации индивидуальных аминокислот: цистина и цистеина, которые показали, что процесс может быть описан одностадийной схемой превращений Михаэлиса-Ментен и имеет одну лимитирующую стадию. Процесс трансформации осложнен термоинактивацией ФС КП и их ингибированием таурином. В результате обработки экспериментальных данных было достигнуто адекватное описание всего массива экспериментальных данных и рассчитаны параметры данной кинетической схемы.

Полученные для индивидуальных аминокислот (цистина и цистеина) закономерности были апробированы для трансформации в таурин тех же аминокислот в составе гидролизата кератинов и оказались полностью применимы к данному объекту. Поскольку трансформация цистина происходит в более жестких условиях, то процесс гидролизата кератинов следует проводить в условиях, оптимальных для этой аминокислоты: при температуре 35-40°C, pH 1.5, концентрации ФС КП 12.8

г/л (по СВ), концентрации  $C_{12}$ -АОБ 0.013 г/л. В этих условиях ведения процесса при трехкратной загрузке ФП (через каждые 2 ч) выход таурина составляет не менее 70% от суммарного содержания цистина и цистеина в гидролизате. После отделения взвешенных частиц фильтрованием был получен раствор, содержащий 0.07 моль/л таурина, 0.40 моль/л других аминокислот и 0.25 моль/л минеральных примесей, прежде всего, хлорида натрия. В этой смеси таурин является единственной аминокислотой, содержащей  $SO_3H$ -группу, поэтому для его выделения использовали метод ионообменной сорбции на анионите, а в целях сокращения объема сточных вод его проводили в статических условиях. Среди исследованных анионитов (АВ-17-2, АВ-17, ЭДЭ-10П) наибольшей емкостью по таурину (0.17 г/г смолы) обладал анионит АВ-17-2 в  $Cl^-$ -форме. Оптимальная концентрация анионита, обеспечивающая 95%-ную сорбцию таурина, составляла 5% (рис. 13). Несорбированная фракция, содержащая аминокислоты, низшие пептиды и минеральные примеси после обессоливания может быть использована для получения кормового продукта. Элюэцию таурина (рис.14), следует проводить 6%-ным раствором хлорида натрия, причем с целью концентрирования таурина элюат можно повторно использовать на стадии десорбции не менее 3-х раз.

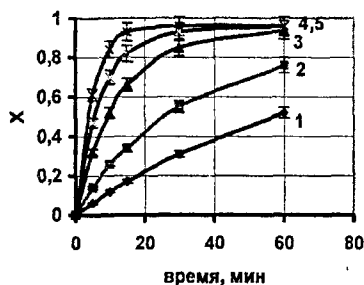
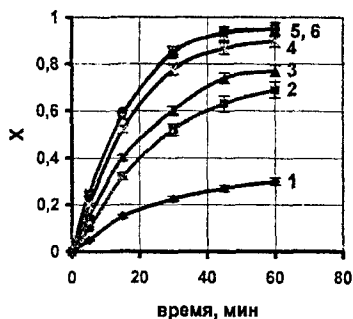


Рис. 13. Зависимость степени сорбции таурина на анионит АВ-17-2 из водного раствора (1,2,3,4,5) и из гидролизата (6) концентрации элюэнта (хлорида от %-ного содержания анионита в натрия): 1 – 1%, 2 – 4%, 3 – 8%, 4 – 12%, 5 суспензии: 1- 5%, 2 – 10%, 3 – 15%, 4 – 16%.  
 20%2,5%, 6 – 30%

Элюат, содержащий 97 г/л таурина и 60 г/л хлорида натрия, направляли на стадию кристаллизации (3 ч, 4-6°C). Степень осаждения таурина составила 90%. Полученный осадок, в расчете на СВ содержащий 62% основного вещества, подвергали перекристаллизации из водно-спиртового раствора (концентрация основного вещества не менее 100 г/л), при его охлаждении до 4-6°C и добавлении 10-ти кратного объема этилового спирта. Степень осаждения таурина составила 95%, а после двойной перекристаллизации - 96%. Влажный осадок на заключительной стадии технологического процесса высушивали в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше 70°C.

Принципиальная схема получения таурина приведена на рис. 15. себестои-

мость 1 кг таурина не превышает 3300 руб./кг, что ниже себестоимости существующих аналогов на 50%. [Антипова, 2003]. Разработанная технология позволяет предотвратить экологический ущерб от загрязнения окружающей среды в размере 1372 тыс. руб./год/завод.

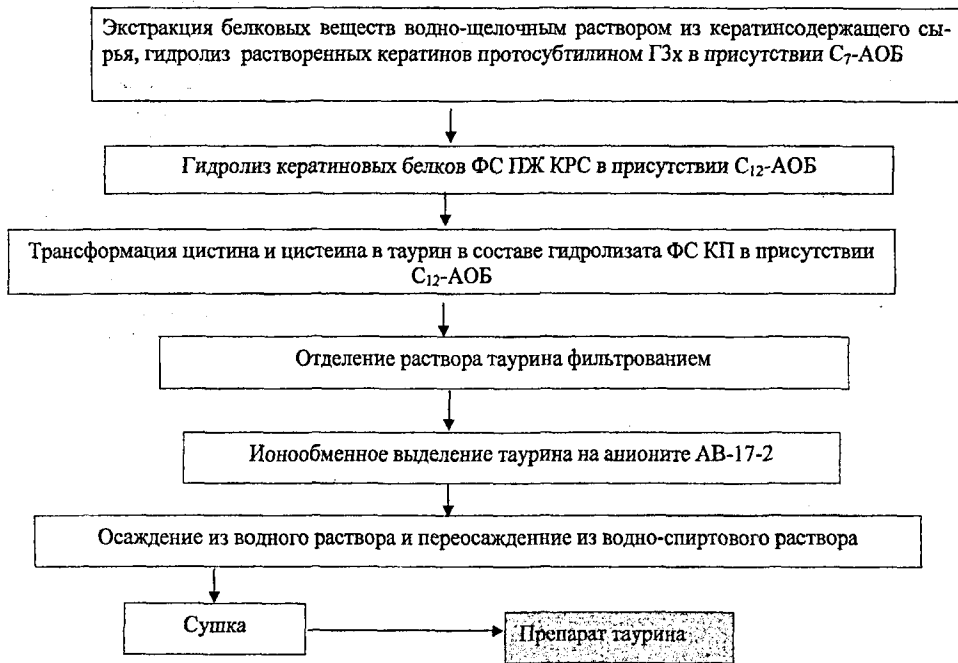


Рис. 15. Принципиальная схема получения таурина из кератинсодержащего сырья.

### 3.3.2. Получение гидролизатов на основе жиросодержащих отходов мясоперерабатывающей промышленности

Другим крупнотоннажным отходом мясоперерабатывающих производств являются жиросодержащие отходы, представляющие ценное сырье для получения жирных кислот (табл. 8). В этом разделе работы представлены результаты гидролиза жировых отходов мяскомбинатов панкреатической липазой ГЗх. Так как данный ФП является дорогостоящим, необходима разработка способов повышения его эффективности.

На первом этапе исследований были изучены закономерности гидролиза жиров панкреатической липазой на модельном субстрате – оливковом масле. Максимальная степень гидролиза масла (400 г/л воды) при однократной загрузке ФП не превышает 25%, что могло быть обусловлено неустойчивостью эмульсии оливкового масла в воде. Для повышения устойчивости эмульсии была предложена предварительная обработка ультразвуком. При частоте 25 кГц и времени санации в течение 5 – 7 мин размер капель масла снижается с 15 – 16 до 2.0 – 2.5 мкм, а степень гидролиза оливкового масла панкреатической липазой возрастает до 51% (рис.16).

Анализ количественных закономерностей данного процесса показал, что он может быть описан одностадийной схемой ферментативных превращений с учетом термоинактивации фермента и его ингибирования продуктами гидролиза.

Таблица 8

Состав жировых отходов, образующихся на Можайском мясокомбинате

Наименование показателя, размерность	Значение
плотность при 18°C, г/см <sup>3</sup>	0,939
показатель преломления при 60°C	1,4556
вязкость при 60°C, мПа·с	16
температура плавления, °C	47
иодное число, % I <sub>2</sub>	41
число омыления, мг КОН/г	207
Жирные кислоты, % от суммы:	
насыщенные	59
ненасыщенные	41
неомыляемые липиды, %	0,5
миристиновая	2,3
пальмитиновая кислота	36
стеариновая кислота	21
олеиновая кислота	29
линолевая кислота	12

Исследования по повышению эффективности гидролитической активности панкреатической липазы за счет введения АОБ проводились вышеописанным способом.

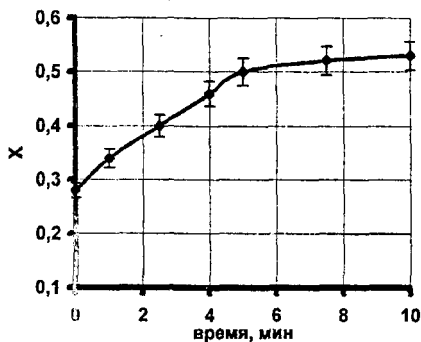


Рис. 16. Влияние времени обработки эмульсии оливкового масла в воде (400 г/л) ультразвуком при частоте 25 кГц на выход продуктов его гидролиза панкреатической липазой

Из полученных результатов (табл. 9) следует, что гидролиз следует проводить в

присутствии  $C_{12}$ -АОБ, эффективным также как и в случае ФС ПЖ КРС и ФСКП КРС в средах с высокой гидрофобностью. При этом норма расхода ФП и время ферментализации снижаются в 2 раза. Подобранные в модельной системе условия гидролиза оливкового масла оказались оптимальными и для гидролиза жировых отходов.

Таблица 9

Оптимальные условия гидролиза оливкового масла панкреатической липазой

Расход фермента, % от субстрата	t, ч	T, °C	pH	Тип АОБ; концентрация, моль/л; мольное соотношение АОБ: фермент
16.0	16	40 ± 2	7.0 ± 0.2	Без
8.0	8	45 ± 2	7.0 ± 0.2	$C_{12}, 3.0 \cdot 10^{-4}$ ; 25:1
20.0	20	45 ± 2	7.0 ± 0.2	$C_7, 5.0 \cdot 10^{-4}$ ;

Таким образом, разработаны способы утилизации двух крупнотоннажных отходов мясоперерабатывающих производств: кератин- и жиросодержащих. Эколого-экономическая оценка разработанных технологий показала, что предотвращенный ущерб в данном случае составляет 1,37 млн. руб/год на одном мясокомбинате вышеуказанной мощности.

#### 3.4. Получение ферментативных гидролизатов на основе растительного сырья

В качестве сырья использовали пивную дробину – отход пивоваренного производства, который образуется на заводах средней мощности в количестве до 40 тыс. т/год/завод. Углеводы дробины в среднем представлены крахмалом (20%) и целлюлозой (80%) [Лукин, 2006], для гидролиза которых необходимо использовать как целлюлазы, так и амилазы. В работе применяли комплексный ферментный препарат - целловиридин ГЭх, панкреатическую  $\alpha$ -амилазу, расщепляющей 1,4-гликозидные связи, и глюкоамилазу *Asp. awamori*, расщепляющую кроме того 1,6-гликозидные связи.

На первом этапе исследований были изучены кинетические характеристики гидролиза ферментными системами модельных субстратов: целлюлозы и крахмала. Процесс гидролиза в обоих случаях может быть описан одностадийной схемой ферментативных превращений, в которых амилаза и глюкоамилаза подвергаются только термoinактивации, а целловиридин помимо этого - ингибированию конечными продуктами реакции. Стандартная обработка экспериментальных данных позволила установить параметры кинетической схемы, а также рассчитать и экспериментально проверить оптимальные условия гидролиза (табл. 10). Из расчетных данных следует, что при стандартных подходах полный гидролиз полисахаридов возможен только при высоких (до 16%) нормах расхода ФП и общей продолжительности гидролиза до 16 ч. Поэтому для рассматриваемого вида сырья поиск путей повышения эффективности процесса особенно важен. Также как и при обработке других отходов в данном случае применили подход стабилизации и повышения активности гидролаз модифицирующими добавками – АОБ (табл. 10). Введение в среду ферментализации АОБ позволило существенно повысить скорость гидролиза; наиболее эффективным для гидрофильной среды оказался  $C_7$ -АОБ, примене-

ние которого привело к понижению нормы расхода ФП в 8 раз и во столько же раз - сокращению времени гидролиза.

Выявленные в модельных экспериментах условия были апробированы для гидролиза крахмала и целлюлозы в составе пивной дробины. Наши исследования показали, что для достижения 95%-ного расщепления углеводов даже в присутствии АОБ необходимо увеличить норму расхода каждого ФП до 6%, пролонгировать время гидролиза до 6 ч, что в три раза превышает время гидролиза модельных субстратов. Причиной этого могут быть высокая гетерогенность сырья, наличие в нем белка, что затрудняет доступ молекул фермента к субстрату.

Таблица 10

Оптимальные условия гидролиза углеводных субстратов техническими ферментными препаратами

Наименование ферментативного процесса	Условия гидролиза				
	T, °C	pH	Расход ФП, % от субстрата	T, ч	АОБ; его концентрация, моль/л; мольное соотношение АОБ:фермент*
Гидролиз пивной дробины α-амилазой	40 ± 2	7.0 ± 0.2	18.0	18	без
	<b>60 ± 2</b>	<b>6.5 ± 0.2</b>	<b>2.0</b>	<b>2</b>	<b>D<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, 3.0·10<sup>-4</sup>; 2:1</b>
	70 ± 2	6.5 ± 0.2	20.0	20	D <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> , 2.0·10 <sup>-4</sup>
Гидролиз пивной дробины глюкоамилазой	40 ± 2	7.0 ± 0.2	18.0	18	без
	<b>60 ± 2</b>	<b>6.0 ± 0.2</b>	<b>2.0</b>	<b>2</b>	<b>D<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, 1.0·10<sup>-4</sup>; 2:1</b>
	60 ± 2	6.5 ± 0.2	20.0	20	D <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> , 1.0·10 <sup>-3</sup>
Гидролиз пивной дробины целло-виридином	50 ± 2	6.5 ± 0.2	16.0	16	Без
	<b>50 ± 2</b>	<b>6.5 ± 0.2</b>	<b>2.0</b>	<b>2</b>	<b>D<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>, 3.0·10<sup>-4</sup></b>
	50 ± 2	5.5 ± 0.2	20.0	20	D <sub>1</sub> -C <sub>12</sub> , 1.0·10 <sup>-4</sup>

\* - приводится только для индивидуальных ферментов – амилазы и глюкоамилазы.

Возможным приемом для успешной реализации комплексной переработки пивной дробины могла быть предварительная экстракция из нее белковых веществ с получением изолята ВМФ белка.

В первом варианте, по аналогии с кератинсодержащим сырьем, экстракцию белка проводили водно-щелочными растворами. Этот процесс описывался той же кинетической схемой превращений (7). Однако, в отличие от кератинов, в данном случае дополнительное расходование щелочи в ходе экстракции не наблюдалось, что позволило учитывать в схеме превращений (7) только первый порядок по белку. Согласно рассчитанным кинетическим параметрам и кривым экстракции в оптимальных условиях (рис. 17), выход ВМФ белка не превышал 20%. В более жестких условиях экстракции выход снижался за счет увеличения скорости гидролиза ВМФ до пептидов и аминокислот. В другом варианте извлечения из дробины ВМФ белка ее обрабатывали ультразвуком при комнатной температуре и частоте 25 кГц. При установленном оптимальном времени обработки дробины (15 мин) выход ВМФ белков в ходе последующей водно-щелочной экстракции составлял 80 – 83%. После отделения дробины фильтрованием из раствора осаждали глобулиновую фракцию белковых веществ в ИЭТ (pH 4.2-4.7). Степень осаждения белка составила 76% от содержания ВМФ белковых веществ в растворе, а содержание основного вещества - 43%, в расчете на СВ, а после переосаждения в тех же условиях увеличивалось до 83%. Влажный осадок обезвоживали путем обработки одним объемом

этилового спирта и сушили под вакуумом при температуре 60°C. Результаты проверки препарата на острую токсичность показали ее отсутствие, что позволяет использовать белок дробины для кормовых целей.

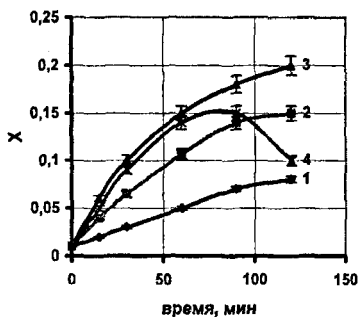


Рис. 17. Кривые извлечения ВМФ белковых веществ из пивной дробины в процессе щелочной экстракции: 1 – 60°C, 2 – 70°C, 3 – 80°C, 4 – 90°C.

Для оптимизации гидролиза высокомолекулярных углеводов пивной дробины после извлечения из нее белковых веществ было изучено влияние на интенсивность процесса: 1) режима последовательной обработки дробины ФП; 2) режима одновременной параллельной обработки несколькими ФП; 3) способов последовательной обработки путем внесения каждого следующего ФП непосредственно в гидролизат или при поэтапном отделении гидролизата, полученного на предыдущей стадии, фильтрованием; 4) ультразвуковой обработки гидролизуемого материала.

Результаты исследований показали целесообразность поэтапного внесения гидролаз при использовании препаратов амилаз. В этом варианте степень конверсии субстрата при последующем гидролизе его целловиридином повышалась на 15 – 20%. По-видимому, гидролиз крахмала обуславливает «разрыхление» пивной дробины, что приводит к увеличению поверхности взаимодействия клетчатки с целловиридином. Последовательность внесения амилаз не оказывала влияния на выход продуктов гидролиза. Что касается способов предварительной обработки пивной дробины, то суммарная степень гидролиза субстрата практически не менялась. Однако в варианте последовательного отъема ферментализата конечная концентрация глюкозы в гидролизате не превышала 8 – 10 г/л, тогда как без отъема она составляет 30 – 35 г/л. В этом случае не требуется дополнительного концентрирования гидролизата перед его использованием (в микробиологических средах), что снижает энергозатраты и тепловую деструкцию углеводов.

Таким образом, вариант последовательного внесения ФП без отделения ферментализата на каждом этапе, безусловно, является предпочтительным. Также отмечено, что предварительная ультразвуковая обработка не только повышает выход белковой фракции, но также увеличивает степень конверсии углеводов пивной дробины. На основании проведенных исследований была предложена принципиальная схема переработки пивной дробины, представленная на рис. 18.

Технико-экономическая оценка разработанной схемы показала, что себестоимость 1 кг изолята ВМФ белка дробины составляет около 13 руб., а 1 кг раствора углеводной фракции – 1100 руб. Предлагаемая технология позволяет предотвратить экологический ущерб на 40 млн. руб/год.

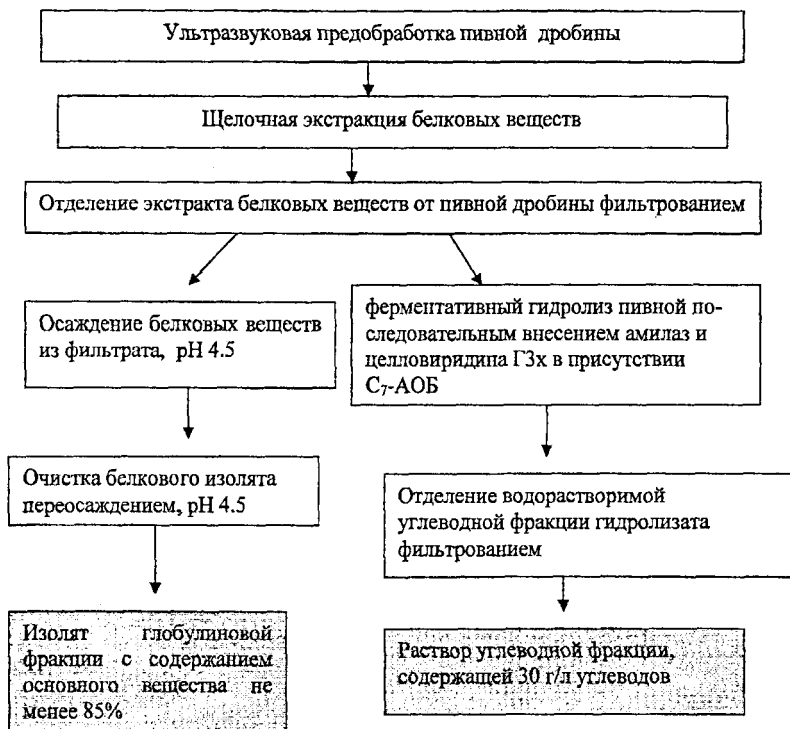


Рис. 18. Принципиальная схема переработки пивной дробины.

### 3.6. Изучение физико-химических аспектов взаимодействия АОБ с гидролитическими ферментами и их субстратами.

Задачей заключительного этапа работы было выяснение физико-химических причин наблюдаемого повышения эффективности ферментативного гидролиза в присутствии АОБ. Были выполнены физико-химические исследования взаимодействия используемых гомологов  $C_7$ - и  $C_{12}$ -АОБ с биополимерами на модельных высокоочищенных ФП и субстратах.

Анализ химического строения молекул АОБ и ферментов предполагает, что взаимодействия между ними осуществляются за счет образования водородных связей, гидрофобных и электростатических взаимодействий. В табл. 11 приведены варианты наиболее вероятных взаимодействий АОБ с аминокислотами ферментов, исходя из минимальной энергии связи и длины не более 3 Å [Кузнецова с соавт., 2006]. В рассматриваемых случаях, главным образом, образуются так называемые высокобарьерные водородные связи с энергией 2 – 15 кДж/моль.

Такой тип взаимодействия, по-видимому, характерен для  $C_7$ -АОБ. Помимо высокобарьерных водородных связей при взаимодействии АОБ с ферментами имеет место образование низкобарьерных водородных связей с энергией более 80 кДж/моль, которые характерны для взаимодействий в гидрофобной среде, а также

между АОБ и аминокислотами сложного строения, например, аргинином или гистидином, и будут свойственны, в основном, С<sub>12</sub>-АОБ.

Таблица 19

Наиболее вероятные взаимодействия АОБ с гидролитическими ферментами

Фермент / АОБ	Аминокислота в составе фермента, тип взаимодействия
Панкреатическая рибонуклеаза/С <sub>7</sub> -АОБ	Низкобарьерные водородные связи: Arg <sup>10</sup> , Lys <sup>37</sup> . Высокобарьерные водородные связи: Met <sup>30</sup> , Asp <sup>121</sup> .
Панкреатическая рибонуклеаза/С <sub>12</sub> -АОБ	Высокобарьерные водородные связи: Arg <sup>10</sup> .
Трипсин /С <sub>7</sub> -АОБ	Высокобарьерные водородные связи: Asp <sup>202</sup> , Val <sup>199</sup> , Ser <sup>54</sup> , Thr <sup>120</sup> , Tyr <sup>117</sup> .
Трипсин /С <sub>12</sub> -АОБ	Высокобарьерные водородные связи: Cys <sup>38</sup> .
Липаза /С <sub>7</sub> -АОБ	Высокобарьерные водородные связи: Ser <sup>39</sup> , His <sup>168</sup> .
Липаза /С <sub>12</sub> -АОБ	Низкобарьерные водородные связи: His <sup>132</sup> . Высокобарьерные водородные связи: Thr <sup>132</sup> , Asp <sup>262</sup> , Ser <sup>121</sup> .

Не в меньшей степени на структурную модификацию фермента оказывают влияние взаимодействия, характерные для длинноцепочечного гомолога С<sub>12</sub>-АОБ.

Доказательства образования устойчивых комплексов «биополимер-АОБ» за счет указанных выше взаимодействий были получены при изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой области смешивающихся растворов С<sub>7</sub>-, С<sub>12</sub>-АОБ, РНК-азы, трипсина, БСА и дрожжевой РНК (рис.19, 20). В процессе предынкубации трипсина с С<sub>7</sub>-АОБ наблюдаются снижение амплитуды поглощения на 20 – 40%, что, согласно, литературным данным, связано с образованием водородных связей [Кузнецова с соавт., 2006] и смещение максимума поглощения в сторону больших длин волн, что свидетельствует об образовании комплекса «фермент-АОБ». Аналогичные зависимости были получены для других исследованных в работе индивидуальных ферментов и субстратов.

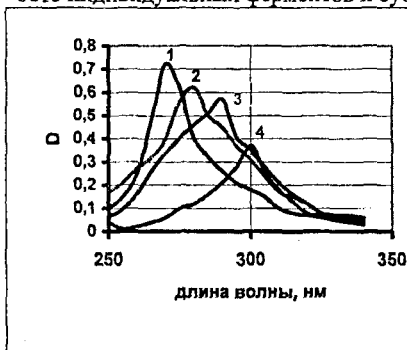


Рис. 19. Влияние времени предынкубации С<sub>7</sub>-АОБ с трипсином на спектр поглощения трипсина. Время предынкубации: 1 – 0 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин, 4 – 15 мин, 5 – 20, 25 мин.

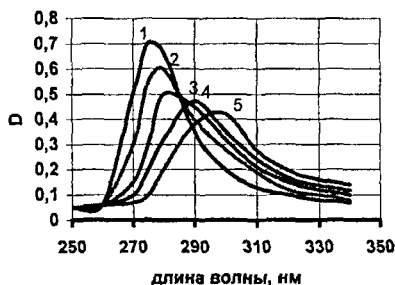


Рис. 23. Влияние времени предынкубации С<sub>7</sub>-АОБ с БСА на спектр поглощения БСА. Время предынкубации: 1 – 0 мин, 2 – 5 мин, 3 – 10 мин, 4 – 15 мин, 5 – 20, 25 мин.

Об образовании между АОБ и белком водородных связей можно также судить по результатам ИК-спектроскопии. Исследуемые вещества имели характерные полосы поглощения в ИК-спектрах, отвечающие ОН-группе, -С-С-связям в углеводородном радикале, бензольному кольцу,  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-группе, карбоксильной группе, амидам I и II белков. В процессе предынкубации ферментов и субстратов с АОБ наблюдалось заметное расширение полосы поглощения 3200 – 3400 см<sup>-1</sup>, отвечающей ОН-группе, до частоты 3600 см<sup>-1</sup>. Согласно литературным подобное изменение ИК-спектра поглощения свидетельствует об образовании водородных связей между молекулами АОБ и ферментным белком (рис. 21).

А)

Б)

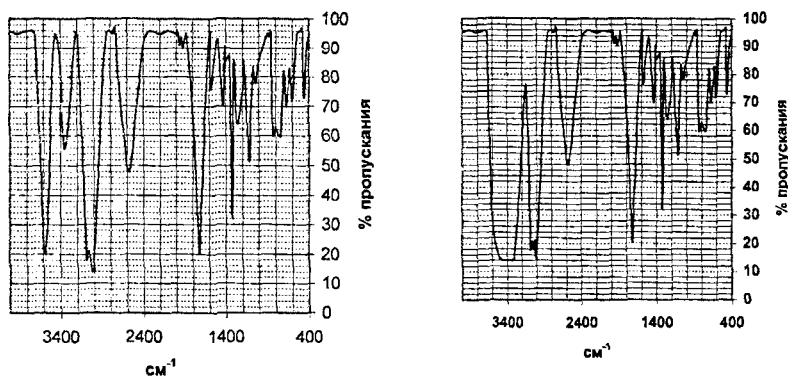


Рис. 21. ИК-спектры интермедиата АОБ d<sub>1</sub>-С<sub>7</sub> – трипсин при времени предынкубации: а) 0 – 2 мин, б) 20 – 25 мин.

Эти результаты согласуются с данными квантово-химических и термодинамических расчетов, выполненными с помощью программы Nurgchem 7. Используя параметрическую модель 3 (Метод РМ 3), находили исходные и конечные теплоты образования АОБ. На основе полученных величин теплот образования комплексов «фермент-АОБ» с использованием закона Гесса были рассчитаны энтальпии химических реакций взаимодействия АОБ с ферментами.

Для теоретического объяснения повышения скорости и степени гидролиза биополимеров при добавке в реакционную смесь АОБ были рассчитаны термодинамические функции реакций, ведущихся в оптимальных условиях при модификации ферментов (табл. 20) и полимерных субстратов.

Для сравнения те же функции энтальпии, энтропии и энергии Гиббса были рассчитаны для вариантов катализа нативными немодифицированными ферментами. Из данных табл. 20 следует, что для процессов, идущих в гидрофильной среде эффективно применение С<sub>7</sub>-АОБ, когда наблюдается сравнительное повышение энтропии и снижение энергии Гиббса. Для гидрофобных условий гидролиза оливкового масла липазой, напротив, такие же изменения термодинамических функций наблюдаются в варианте модификации липазы С<sub>12</sub>-АОБ. Эти данные подтверждают более эффективный катализ в присутствии АОБ.

Таким образом, теоретические расчеты термодинамических функций состояния реакций подтверждают полученные экспериментально результаты.

Таблица 20

Термодинамические функции состояния реакций ферментативного гидролиза модельных субстратов высокоочищенными препаратами гидролаз

Модельная система фермент-субстрат	Термодинамические функции состояния					
	В присутствии АОБ			в отсутствии АОБ		
	$\Delta H$ , кДж/ моль	$\Delta S$ , кДж/ моль	$\Delta G$ , кДж/ моль	$\Delta H$ , кДж/ моль	$\Delta S$ , кДж/К · моль	$\Delta G$ , кДж/ моль
<b>C<sub>7</sub>-АОБ</b>						
Панкреатическая РНК-аза – дрожжевая РНК	309	0,99	- 25,6	43,4	0,16	-11,1
Трипсин – БСА	277	0,93	- 18,7	17,5	0,07	-3,7
Панкреатическая $\alpha$ -амилаза – крахмал	216	0,83	- 43,8	38,9	0,14	-5,5
Грибная глюкоамилаза – крахмал	85	0,35	- 24,6	37,3	0,13	-3,5
Панкреатическая липаза – оливковое масло	51	0,24	- 25,3	28,4	0,21	-38,6
<b>C<sub>12</sub>-АОБ</b>						
Панкреатическая РНК-аза – дрожжевая РНК	33	0,12	- 7,5	43,4	0,16	-11,1
Трипсин – БСА	13	0,05	- 2,6	17,5	0,07	- 3,7
Панкреатическая $\alpha$ -амилаза – крахмал	34	0,11	- 1,7	38,9	0,14	-5,5
Грибная глюкоамилаза – крахмал	21	0,07	- 1,3	37,3	0,13	-3,5
Панкреатическая липаза – оливковое масло	69	0,36	- 45,7	28,4	0,21	-38,6

### Заключение

Анализ результатов исследований ферментативного гидролиза и путей повышения его эффективности выявил общие закономерности ферментативного гидролиза биополимеров в составе отходов пищевой и микробиологической промышленности и позволил разработать на этой основе принципиальную схему переработки отходов, пригодную для реализации на различных производствах пищевой промышленности.

Установлено, что кинетические закономерности ферментативного гидролиза биополимеров, как в индивидуальном виде, так и в составе природных субстанций идентичны и могут быть описаны уравнением Михаэлиса-Ментен и отличаться лишь количеством лимитирующих стадий, а также факторов, инактивирующих фермент и численными значениями кинетических параметров;

Повысить эффективность ферментативного гидролиза биополимеров можно за счет повышения либо гидролизруемости субстрата, либо активности фермента путем модификации его АОБ: в гидрофильной среде целесообразно использовать C<sub>7</sub>-АОБ, в гидрофобной – C<sub>12</sub>-АОБ. Кинетика гидролиза биополимеров ферментами, модифицированными АОБ, также подчинялась общим закономерностям.

Предложенные кинетические схемы ферментативного гидролиза могут служить основой для разработки алгоритма управления гидролизом, что позволит подбирать оптимальные режимы ведения процесса с целью получения гидролизатов требуемого качества и назначения.

Стадии выделения и очистки продуктов ферментативного гидролиза основаны на методах ультрафильтрации, ионного обмена и осаждения, предполагают использование стандартного технологического оборудования и не предполагают использования дорогостоящих реагентов. Это позволит предприятиям пищевой и микробиологической промышленности при минимальных дополнительных капитальных затратах организовать выпуск дорогостоящей конкурентоспособной продукции пищевого и медицинского назначения и за счет этого существенно увеличить рентабельность основного производства.

## ВЫВОДЫ

1. С использованием кинетического метода исследований установлены количественные закономерности процесса гидролиза белковых, липидных, углеводных и нуклеотидных субстратов высокоочищенными препаратами гидролаз. Процесс гидролиза может быть описан в виде одно- или двухстадийной ферментативной реакции с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен и осложнен инактивацией свободного фермента по уравнению первого порядка, а также в случае панкреатических липазы и РНК-азы - ингибированием фермента продуктами гидролиза.
2. Предложенная кинетическая схема апробирована при разработке режимов ферментативного гидролиза в производственных условиях. Установлено, что для достижения степени гидролиза субстратов не менее 90% норма расхода ферментов должна составлять 10 - 16%, а время гидролиза - 18 ч.
3. Разработаны новые подходы интенсификации ферментативных процессов на основе промышленных гидролаз за счет введения в среду гидролиза природных модификаторов ферментов, относящихся к классу алкилоксибензолов. На примере высокоочищенных препаратов гидролаз показана зависимость модифицирующего действия АОБ от их структуры и концентрации. Установлено, что в гидрофильных средах целесообразнее использовать  $C_7$ -АОБ, а в гидрофобных -  $C_{12}$ -АОБ. Установлено, что применение АОБ в количестве 0.01 - 0.1% от массы фермента позволяет сократить норму расхода последнего и время процесса в 2 - 8 раз.
4. С использованием квантово-химических и физико-химических методов исследований установлено, что взаимодействие АОБ с ферментом и субстратом происходит за счет образования водородных связей между гидроксильными группами АОБ и функциональными группами, входящими в состав высокомолекулярных соединений (ферментов и субстратов), а также посредством гидрофобных взаимодействий.
5. Разработанные кинетические схемы полностью применимы к гидролизу природных субстратов модифицированными АОБ препаратами технических гидролаз, а также к катализу ферментами других классов, например, оксидазами печени быка, осуществляющими трансформацию цистина и цистина в таурин. На основе полученных закономерностей предложены пути интенсификации с помощью АОБ гидролиза микробных и кератиновых белков протосубтилином ГЗх, пивной дробины целловиридином ГЗх, жиросодержащих

- отходов мясоперерабатывающей промышленности панкреатической липазой, дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой. Разработанные приемы позволяют сократить норму расхода фермента и время гидролиза в 1,5 – 4 раза.
6. Разработаны основы технологии получения белковых гидролизатов с различной степенью гидролиза на основе микробных, растительных и кератиновых белков с выходом 20-30% от содержания белка в сырье, включающие стадии предподготовки сырья, ферментативного гидролиза, осветления гидролизата ультрафильтрацией, ионообменной очистки. Предложены кинетические схемы каждой стадии, позволившие установить оптимальные условия их проведения.
  7. Разработаны основы технологии получения препарата таурина пищевого назначения с выходом 28% от содержания цистина в сырье на основе гидролизата кератинов путем трансформации серосодержащих аминокислот (цистина и цистеина) ферментными системами клеток печени быка. Предложены оптимальные условия проведения стадий выделения и очистки таурина – ионного обмена и осаждения из водного и водно-спиртовых растворов.
  8. Проведена технико-экономическая оценка разработанных технологий в сравнении с базовыми. Установлено, что применение модифицированных ферментов и стадий предобработки сырья позволяет снизить себестоимость продукции в 1,2 – 5,0 раз при сохранении ее качества за счет снижения норм расхода фермента, а также сократить длительность технологического цикла в 1,3 – 2,0 раза, что повышает эффективность работы оборудования. Разработанные пути утилизации отходов позволяют предотвратить экологический ущерб на сумму 0,5 – 40 млн. руб/год.

#### **Список публикаций по теме диссертации**

##### **Статьи в рецензируемых журналах**

1. *Красноштанова, А. А.* Кислотный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности процесса. 1. Исследование модельной системы альбумин - серная кислота [Текст] / А. А. Красноштанова, И. А. Крылов, М. Н. Манаков // Биотехнология. – М., 1996. – № 3. – с. 39 – 44. – ISSN 0234-2758.
2. *Красноштанова, А. А.* Кислотный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности процесса. 2. Кинетика гидролиза белковых фракций дрожжей и бактерий [Текст] / А. А. Красноштанова, И. А. Крылов, Б. С. Карло, М. Н. Манаков // Биотехнология. – М., 1996. – №3. – с. 45 – 49. – ISSN 0234-2758.
3. *Красноштанова, А. А.* Кислотный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности процесса. 3. Кинетика кислотной экстракции белковых веществ из клеток дрожжей и бактерий [Текст] / А. А. Красноштанова, И. А. Крылов, М. Н. Манаков // Биотехнология. – М., 1996. – №3. – с. 50 – 55. – ISSN 0234-2758.
4. *Красноштанова, А. А.* Ферментативный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности процесса. 1. Кинетика гидролиза белковых фракций дрожжей протосубтилином [Текст] / А. А. Красноштанова, И. А. Крылов, М. Н. Манаков // Биотехнология. – М., 1998. – №6. – с. 50 – 56. – ISSN 0234-2758.
5. *Красноштанова, А. А.* Ферментативный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности про-

- песса. 2. Кинетика гидролиза белковых фракций дрожжей и бактерий прото-субтилином [Текст] / А.А. Красноштанова, И. А. Крылов, М. Н. Манаков // Биотехнология. – М., 1998. – №6. – с. 57 – 62. – ISSN 0234-2758.
6. *Красноштанова, А. А.* Ферментативный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности процесса. 3. Гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов ферментными системами поджелудочной железы [Текст] / А. А. Красноштанова, И. А. Крылов, М. Н. Манаков // Биотехнология. – М., 1998. – №6. – с. 63 – 68. – ISSN 0234-2758.
  7. *Красноштанова, А. А.* Трансформация L-цистина и L-цистеина в таурин под действием ферментных систем клеток печени [Текст] / А. В. Соболева, А. А. Красноштанова, И. А. Крылов // Прикладная биохимия и микробиология. – М., 2004. – Т. 40., №3 – с. 282–287.
  8. *Красноштанова, А. А.* Трансформация L-цистина и L-цистеина в состав белкового гидролизата кератинов в таурин под действием ферментных систем клеток печени [Текст] / А. В. Соболева, А. А. Красноштанова, И. А. Крылов // Химическая технология. – М., 2004. – № 11. – с. 18–22.
  9. *Красноштанова, А. А.* Количественные закономерности процесса растворения природных кератинов [Текст] / А.В. Соболева, А. А. Красноштанова, И. А. Крылов // Химическая технология. – М., 2004. – № 10. – с. 6–10.
  10. *Красноштанова, А. А.* Разработка ресурсосберегающей технологии получения рибонуклеазы из поджелудочной железы КРС [Текст] / М. М. Баурина, А. А. Красноштанова, И. А. Крылов // Химическая технология. – М., 2007. – Т.8, № 4. – с. 185 – 190.
  11. *Дудникова, Е. А.* Выделение  $\alpha$ -амилазы из биомассы поджелудочной железы крупного рогатого скота [Текст] / Е. А. Дудникова, А. А. Красноштанова, И. А. Крылов // Химическая технология. – М., 2008. – Т. 9, № 4. – с. 182 – 188.
  12. *Красноштанова, А. А.* Интенсификация ферментативных процессов гидролиза биополимеров [Текст] / А. А. Красноштанова, Т. А. Рукинова, Е. А. Кашкина, М. М. Баурина, И. А. Крылов, Г. И. Эль-Регистан // Хранение и переработка сельскохозяйственного сырья. – М., 2000. – № 6. – с. 59-60.
  13. *Красноштанова, А. А.* Способ получения и характеристика иммунокорректора нуклеинового ряда [Текст] / М. М. Баурина, А. А. Красноштанова, М. Е. Шабанова, И. А. Крылов, Ю. М. Краснопольский // Нейроиммунология. – СПб., 2003. – Т.1, № 2. – с. 18 – 19.
  14. *Красноштанова, А. А.* Способ усиления пролиферантной активности костного мозга [Текст] / М. Е. Шабанова, В. В. Казаньев, М. М. Баурина, А. А. Красноштанова, И. А. Крылов // Патогенез. – М., 2006. – Т.4., №1. – с. 71.
  15. *Krasnoshtanova, A. A.* Transformation L-cystin and L-cystein into taurin with enzymatic system of bovine liver cells [Text] / A. V. Soboleva, A. A. Krasnoshtanova, I. A. Krylov // Industrial Application of Biotechnology. – New York, Nova Science Publisher, 2003. – с. 121–130. – ISBN 1-60021-039-2.
  16. *Krasnoshtanova, A. A.* Development of Resource-Saving Technology of Bovine Pancreatic Ribonuclease [Text] / M. M. Baurina, A. A. Krasnoshtanova, I. A. Krylov // Industrial Application of Biotechnology. – New York, Nova Science Publisher, 2005. – с. 55–61. – ISBN 1-60021-039-2.
  17. *Krasnoshtanova, A. A.* Elaborating Bases of Technology of Isolation of Amylase, Lipase and a Complex of Proteases from Cattle Pancreas [Text] / E. A. Dudnik-

ova, A. A. Krasnoshtanova, I A. Krylov // Industrial Application of biotechnology. – New York, Nova Science Publisher, 2006. – с. 28 – 37. – ISBN 1-60021-039-2.

### **Тезисы конференций**

1. *Красноштанова, А. А.* Современные подходы к созданию экологических производств на основе комплексной переработки отходов пищевой и микробиологической промышленности, использующих современные достижения химии и биотехнологии [Тезисы] / Рукинова Т.А., Красноштанова А.А., Крылов И.А. // Тез. докл. IV Междунар. конгресса «Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес, экологическое образование». – Самара-Астрахань-Самара, сентябрь 1999. – с.52.
2. *Красноштанова, А. А.* Интенсификация ферментативных процессов переработки отходов пивоваренной и мясоперерабатывающей промышленности с использованием ауторегуляторных факторов d микроорганизмов [Тезисы] / Крылов И.А., Красноштанова А.А., Рукинова Т.А. // Тез. докл. V Межд. конгресса "Окружающая среда для нас и будущих поколений: экология, бизнес, экологическое образование". – Самара-Астрахань-Самара, сентябрь 2000. – с.74.
3. *Красноштанова, А. А.* Стабилизация индивидуальных ферментов и ферментных систем алкилоксибензолами [Тезисы] / Г. И. Эль-Регистан, Т. А. Карпкина, И. Ю. Степаненко, Е. И. Крылова, Е. Ф. Шаненко, И. А. Крылов, А. А. Красноштанова, М. М. Баурина, Ж. Будран // Сборник трудов I Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – М., 2002. – с. 195-196.
4. *Красноштанова, А. А.* Применение лекарственного препарата Энкад в качестве средства, стимулирующего гемопоэтическую функцию костного мозга [Тезисы] / М. Е. Шабанова, М. М. Баурина, А. А. Красноштанова, И. А. Крылов // Сборник трудов (тезисов доклада) Международной конференции «Биотехнология и медицина». – М., 2006. – с. 142-143.

### **Патенты**

1. Пат. 2095478 С1 Российская Федерация, МПК<sup>6</sup> С 25 С 1/20. Способ извлечения золота из отходов [Текст] / Красноштанова А.А., Крылов И.А., Богдановская В.А., Тарасевич М.Р., Манаков М.Н.; заявитель и патентообладатель Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. – № 95108195/02; заявл. 25.04.1996; опубл. 10.11.1997. – 5 с.
2. Пат. 2115751 С1 Российская Федерация, МПК<sup>6</sup> С 22 В 11/00, 7/00, 3/18. Способ извлечения драгоценных металлов [Текст] / Красноштанова А.А., Крылов И.А., Богдановская В.А., Тарасевич М.Р., Манаков М.Н.; заявитель и патентообладатель Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. – № 97110752/02; заявл. 26.06.1997; опубл. 20.07.1998. – 4 с.
3. Пат. 2179579 С2 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> С 12 Р 1/00. Способ получения низкомолекулярных фракций биологически активных веществ из клеточных биополимеров [Текст] / Красноштанова А.А., Крылов И.А., Баурина М. М., Кухаренко А. А., Эль-Регистан Г. И., Рукинова Т.А., Шабанова М.Е.; заявитель и патентообладатель Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. – № 2000104372/13; заявл. 24.02.2000; опубл. 20.02.2002. – 4 с.
4. Пат. 2180918 С1 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> С12 N 9/22. Способ получения панкреатической рибонуклеазы [Текст] / Красноштанова А. А., Баурина М. М., Кашкина Е. А., Крылов И. А.; заявитель и патентообладатель Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. – № 2000116984/13; заявл. 30.05.2000; опубл. 27.03.2002. – 4 с.

5. Пат. 2249040 С2 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> С 12 Р 13/04, С 12 N 9/64. Способ получения таурина [Текст] / Красноштанова А.А., Соболева А.В., Крылов И.А.; патентообладатель Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. – № 2003112648/13; заявл. 05.05.2003; опубл. 27.03.2005 Бюл. № 9. – 5 с.
6. Пат. 2274658 С2 Российская федерация, МПК С12 Р 19/34 (2006.01). Способ получения панкреатического гидролизата нуклеиновой кислоты [Текст] / Красноштанова А.А., Баурина М.М., Крылов И.А., Шабанова М.Е.; патентообладатель Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева. – № 2004102936/13; заявл. 03.02.2004; опубл. 20.04.2006 Бюл. № 11. – 5 с.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'А.С.С.', with a long horizontal line extending to the right.

1

ООО «ВНИПР» 127644, Москва, Клязьминская ул., д. 15 (495) 486-80-76

зак. № 6279 от 02.10.2009 г. тираж 100 экз