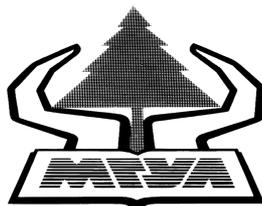


Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ЛЕСА»

А.Н. Иванкин, А.А. Красноштанова

БИОПОЛИМЕРЫ И ИХ ДЕГРАДАЦИЯ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ



Москва
Издательство Московского государственного университета леса
2016

УДК 546
И 18

Рецензенты: д.т.н., профессор Устинова А.В., главный научный сотрудник ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова РАСХН;
д.т.н., профессор В.Е. Цветков, зав. кафедрой древесных плит и пластиков МГУЛеса

Работа подготовлена на кафедре химии и химических технологий лесного комплекса МГУЛ и кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева

Иванкин, А.Н.

И 18 Биополимеры и их деградация в окружающей среде: учеб. пособие / А.Н. Иванкин, А.А. Красноштанова. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2016. – 396 с.

В книге рассмотрены современные научные данные, посвященные химическому и биохимическому гидролизу важнейших макромолекулярных систем природного происхождения белковой, полисахаридной, липидной и полинуклеотидной природы, которые содержатся в объектах животного, микробного и растительного происхождения и широко используется в пищевой, парфюмерной, биотехнической отраслях промышленности, а также медицине. Показаны достижения последних десятилетий в изучении механизма гидролиза биополимеров с акцентом на физико-химическое состояние превращаемых веществ, составляющих нано- и микроуровень трансформируемых компонентов, обсуждаются структурно-функциональные особенности веществ при их переходе из макромолекулярного состояния в трансформированные продукты различных форм, для их последующего практического применения.

Книга предназначена для бакалавров, магистров и аспирантов очной и заочной форм обучения по техническим специальностям, в том числе по направлению «Химическая технология», а также научных работников.

ISBN 5-0000-0000-0

© А.Н. Иванкин,
А.А. Красноштанова, 2016
© ГОУ ВПО МГУЛ, 2016

Авторы книги



ИВАНКИН Андрей Николаевич – доктор химических наук, заведующий кафедрой химии и биотехнологии Московского государственного университета леса, гл. научн. сотрудник ВНИИМП им. В.М. Горбатова РАСХН, присвоены ученые звания старшего научного сотрудника по специальности «Биотехнология» и профессора по кафедре химии. Научные интересы – исследования в области получения биологически активных веществ, экохимия, получение новых пищевых добавок, биотехнология.



КРАСНОШТАНОВА Алла Альбертовна – доктор химических наук, доцент кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д.И.Менделеева, присвоено ученое звание доцента по кафедре биотехнологии. Научные интересы – Комплексная переработка микробного и биологического сырья с получением продуктов белковой, углеводной и нуклеотидной природы, интенсификация ферментативных процессов с помощью алкилоксибензолов и изучение физико-химических основ механизмов его взаимодействия с ферментами и субстратами, ферментативная и химическая кинетика, разработка основ технологии выделения ферментов из микробного и животного сырья.

Предисловие

Развитие современной науки в Российской Федерации в последние годы сталкивается с известными трудностями, связанными, прежде всего, с непониманием со стороны руководящих структур страны истинных возможностей использования научных достижений для устойчивого развития общества.

На протяжении последних двух десятилетий происходит фатальное перераспределение ресурсов отнюдь не в пользу науки и образования, что приводит к утрате целых научных направлений, которые всегда были сильны в России. Одной из таких традиционно развитых областей деятельности были масштабные исследования, которые проводились научными коллективами в системе академической и отраслевой науки в области технологии живых систем. Речь идет о гидролитической переработке сырья растительного, морского, животного и иного происхождения в необходимые продукты пищевого, медицинского, сельскохозяйственного и технического назначения.

Над данной проблематикой работали большие научные коллективы. Среди известных российских ученых, внесших заметный вклад в развитие данного направления, следует упомянуть Антонова В.К., Беликова В.М., Латова В.К., Неклюдова А.Д., Волика В.Г., Крылова И.А., Римареву Л.В., Телишевскую Л.Я. и многих других, кто способствовал развитию науки о направленном гидролизе макромолекул.

В данной книге мы попытались обобщить научные данные, полученные как авторами, так и описанные в научной литературе, связанные с гидролитическим распадом биомacroмолекулярных систем – белков, жиров, полинуклеотидов и полисахаридов, содержащихся в сырье биологического происхождения. Развитие нового направления – индустрии нанотехнологий наноматериалов представляется в данном случае совершенно связанным с гидролизом макросистем, поскольку это является естественным и достаточно изученным механизмом или, если угодно, технически реализуемым способом, перехода от макро- и микроуровня (размеры биомacroмолекул) к наноуровню (молекулярные кластеры аминокислот и жирных кислот, моносахаров, нуклеотидов), где размеры основных частиц составляют несколько нанометров.

Разумеется, авторы не претендуют на полноту изложения всех аспектов проблемы, но надеются, что данное издание будет способствовать обобщению технологий, позволяющих получать столь необходимые нанобиоматериалы.

ВВЕДЕНИЕ

Нанотехнологии – ключевое понятие начала XXI века, символ новой, третьей, научно-технической революции. Это "самые высокие" технологии, на развитие которых ведущие экономические державы тратят сегодня миллиарды долларов. По прогнозам ученых нанотехнологии в XXI веке произведут такую же революцию в манипулировании материей, какую в XX веке произвели компьютеры в манипулировании информацией. Их развитие открывает большие перспективы при разработке новых материалов, совершенствовании связи, развитии биотехнологии, микроэлектроники, энергетики, здравоохранения и вооружения. Среди наиболее вероятных научных прорывов эксперты называют значительное увеличение производительности компьютеров, восстановление человеческих органов с использованием вновь воссозданной ткани, получение новых материалов, созданных напрямую из заданных атомов и молекул, а также новые открытия в химии и физике.



Успехи в развитии нанотехнологий, то есть работы с объектами, размеры которых соответствуют наноуровню – менее 0,1 мкм или 100 нм, позволяют сегодня создавать новые материалы и композиты разнообразного назначения, свойства которых отличаются от традиционных форм применяемых веществ.

Базовыми веществами, составляющими основу всех живых образований, являются белки, полисахариды, полинуклеотиды и липиды, которые в индивидуальном состоянии или в более распространенном виде сложных макрокомплексов образуют основу всех живых клеток, которые в виде сырья используются человеком с древнейших времен.

Как видно из представленной выше шкалы размеров некоторых объектов, упомянутые биополимеры по своей природе являются макромолекулами, размеры которых находятся на условной границе перехода в область наносистем. Разрушение – деградация или гидролиз таких объектов

приводит к получению продуктов с частицами, размеры которых лежат в нанообласти.

Основная особенность вопроса заключается в том, что все работы, выполненные до сих пор в данной области (достаточно посмотреть на докторские диссертации авторов данной книги) выполнялись с позиций макромолекулярного подхода, то есть сырье обрабатывалось традиционными физико-химическими или биотехнологическими приемами с получением целевых продуктов, размеры частиц которых, как правило, не рассматривались.

Известно, что при переходе от традиционных линейных размеров к наноразмерным объектам физико-химические свойства веществ меняются кардинальным образом. Например, температура плавления Au равна 1337 К, в то время как наночастицы Au диаметром в 50...100 нм плавятся при температуре почти в три раза меньшей, проявление токсичности наночастиц может быть на несколько порядков выше, чем объектов микро- и более высокого уровня, импрегнирование (армирование) полимеров наполнителем, в качестве которого применяются наночастицы, например введение в полиэтилен 10 % масс. наноуглеродных трубок, приводит к упрочнению материала, изменению жесткости, температур плавления и перехода из кристалличности в аморфную фазу, температурного интервала перехода в высокоэластическое состояние и т.д. То есть нанотехнологии – как технологии создания материалов с частицами наноразмеров – действительно являются сегодня новым направлением развития научной мысли.

Гидролиз – универсальный природный механизм перехода от большого к малому. Расщепление макромолекул на фрагменты под воздействием различных факторов – простой и хорошо изученный способ получения нанопродуктов, которые правильнее называть *нанобиокомпозитами* – веществами биологического происхождения с частицами наноразмеров индивидуального или сложного состава.

Данная монография является попыткой обобщения работ научных коллективов, работавших в разное время во Всероссийском научно-исследовательском институте мясной промышленности им. В.М. Горбатова (А.Н. Иванкин), на кафедре химии и биотехнологии Московского государственного университета леса (А.Д.Неклюдов, А.Н.Иванкин, А.Б.Герман), на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического института им. Д.И.Менделеева (И.А.Крылов, А.А.Красноштанова), в Полярном НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии им. Н.М.Книповича (В.А.Мухин), в Институте пищевых веществ (В.М.Беликов), в Московском государственном университете прикладной биотехнологии (Ю.В. Маевский, А.В.Бердутина) и др.

Сокращения

N-Ас-5-БОТФ – N-ацетил-D,L-5-бензилокситриптофан,
d₁-C₇ фактор 4-метилрезорцин,
d₁-C₁₂ фактор 4-*n*-гексилрезорцин,
γ-АПТЭС – носитель γ-аминопропилтриэтоксисилан,
АОБ – алкилоксибензол,
АСВ – абсолютно сухие вещества (сухой остаток),
АТФ – аденозинтрифосфат (АТР),
ε-АКК – ε-аминокапроновая кислота,
БАВ – биологически активные вещества,
БАД – биологически активные добавки,
БСА – бычий сывороточный альбумин
БЭВ – безазотистые экстрактивные вещества,
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография,
ВМФ – высокомолекулярная фракция
ВФС – временная фармакопейная статья
ГА – глутаровый альдегид,
ГАМК – γ-аминомасляная кислота,
ГОСТ Р – государственный стандарт Российской Федерации,
ГПХ – гель-проникающая хроматография,
ГФ – государственная фармакопея,
ДВБ – дивинилбензол,
ДТТ – дитиотрейтол,
ДМФА – диметилформамид,
ДОВ – дисперсия оптического вращения,
ДОФА – диоксифенилаланин,
ДФГ – дифосфат глюкозы,
ДЭАЭ – диэтиламиноэтил,
ЖК – жирные кислоты,
ИАА – иммобилизованная аминоксилаза,
ИОХ – ионообменная хроматография,
ИФП – иммобилизованный ферментный препарат,
ИПТГ – β-D-тиогалактопиранозид,
кД – единица молекулярной массы (ММ = 1000 или 1 кD или 1 кДа),
КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза,
КРС (к.р.с.) – крупный рогатый скот,
КФ – классификация ферментов,
КФППА – комплексный ферментный препарат с пептидазной активностью,
КЧ – кислотное число,
ЛП – липидные продукты,
МАО – моноаминоксидаза,
ММ – молекулярная масса,

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты,
МТА – мембранотропные агенты,
МШ – молекулярный шаперон,
МЭРМ – метиловые эфиры жирных кислот из рапсового масла,
НДФС – нуклеозиддифосфатсахара,
НЖК – ненасыщенные жирные кислоты,
НМК – низкомолекулярная фракция,
НМФ – низкомолекулярная фракция,
L-5-ОТФ – L-5-окситриптофан,
ОП – оптическая плотность,
ПАВ – поверхностно-активные вещества,
ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты,
ПП – парентеральное питание,
ПБП – парентеральное белковое питание,
ПРО – проинсулин,
РБ – рекомбинантный белок,
РНК-аза – рибонуклеаза
СОЕ – статическая обменная емкость ионитов,
ТНБС – тринитробензолсульфо кислота,
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан,
УДФ – уридиндифосфат,
УДФГ – уридиндифосфат глюкозы,
ФАСФ – 3-фосфоаденозин-5-фосфосульфат,
ФП – ферментный препарат
ФС ПЖ КРС – ферментные системы поджелудочной железы крупного рогатого скота
ФС КП КРС – ферменты клеток печени крупного рогатого скота
ХС – хондроитинсульфат,
ХШ – химический шаперон
ЦНС – центральная нервная система,
ЭДТА – этилендиаминтетрацетат,
ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса,
GLA – линоленовая кислота,
DE – динамическая емкость сорбента,
DHA – докозагексаеновая кислота,
EPA –эйкозапентаеновая кислота.
LD₅₀ – летальная доза,
SDS-Na – додецилсульфат натрия.

ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БЕЛКОВЫХ СИСТЕМ

Глава 1

Свойства и основы применения белковых гидролизатов

Потребность в белках для организма человека достаточно высока из-за значительной скорости метаболизма тканевых белков (приблизительно 240 г/день), сопровождающегося повторным использованием части аминокислот и потерей аминокислот, выделяемых из организма. Фактически потребность в пищевом белке обуславливается доступностью незаменимых и заменимых аминокислот (пищевой азот), которые требуются для поддержания нормального пищевого статуса взрослого человека, беременных женщин, спортсменов, людей с заболеваниями различной природы, а также для нормального роста и развития детей различного возраста.

В соответствии с традиционными нормами принято считать, что для поддержания нормального питательного статуса у здорового взрослого человека рекомендуется потреблять 0,7–1,0 г белка на 1 кг массы тела в день.

Приведем данные о значении некоторых аминокислот для человеческого организма.

Гистидин является незаменимой аминокислотой не только для детей и больных уреимией, но и для взрослого человека.

Синтез *аргинина* в организме некоторых животных и человека ограничен и для полного удовлетворения потребностей в этой аминокислоте она должна поступать в организм вместе с пищей. Добавление аргинина к рационам для парентерального питания нормализует деятельность цикла мочевины и снижает опасность аммонийной интоксикации. Особенно эффективно совместное действие аргинина и гистидина.

Тирозин и *цистеин* могут быть отнесены к полузаменимым аминокислотам, т.к. синтез их у недоношенных и грудных детей, а также у отдельных взрослых людей либо ограничен, либо осуществляется со скоростью, недостаточной для адекватного восполнения потребности в этой аминокислоте.

Превращение метионина в цистеин осуществляется медленно, поэтому при парентеральном введении аминокислотных растворов, не содержащих цистеин, концентрация этой аминокислоты в плазме существенно снижается. Цистеин также играет важную роль в адсорбции железа из пищевых рационов.

Глутаминовая и *аспарагиновая кислоты*, а также их амиды являются важными составными частями большинства белков. При кислотном гидролизе амиды превращаются в соответствующие аминокислоты. Многие исследователи при составлении рецептур различных препаратов считают целесообразным включать в их состав 20–25 % данных кислот.

Из 100 г аминокислот, поступающих в организм человека, обычно

38 % приходится на долю незаменимых аминокислот и 20–25 % на долю дикарбоновых кислот и их амиды. Всасывание амидов аминокислот в желудочно-кишечном тракте происходит быстрее, чем всасывание свободных дикарбоновых кислот.

Пролин составляет 1/3 от общей суммы аминокислот, входящих в коллаген, в больших дозах оказывает стимулирующее воздействие на гормон роста.

Аланин также входит в состав коллагена, но содержание его гораздо ниже, чем пролина.

При посттравматических ситуациях возникает потребность в восстановлении соединительной ткани, а, следовательно, и в синтезе коллагена. В этих условиях эндогенных запасов пролина и аланина может оказаться недостаточно, в результате чего аланин и пролин становятся лимитирующими аминокислотами.

Вероятно, в силу этих обстоятельств исследователи пришли к выводу о необходимости обязательного включения пролина и аланина в диффузионные растворы для парентерального питания.

Глицин входит в состав большинства белков животного и растительного происхождения – особенно его много в соединительной ткани. Дефицит глицина наблюдается при ревматизме и острых артритях различного происхождения, поэтому глицин часто добавляют в препараты, предназначенные для лечения и профилактики этих заболеваний. Отмечен также стимулирующий эффект глицина на выделение гормона роста. Все эти данные свидетельствуют о необходимости включения глицина в аминокислотные смеси любого назначения.

Потребности в незаменимых аминокислотах для организма человека были определены еще в середине 50-х гг. (табл. 1.1), но этот вопрос остается актуальным и сегодня в связи с разработкой новых трансфузорных средств для парентерального питания, а также аминокислотных препаратов, предназначенных для лечения и профилактики различных патологий [1, 2, 3, 6].

Общепризнано, что белки женского молока и куриного яйца имеют наилучший аминокислотный состав и соотношение между заменимыми и незаменимыми аминокислотами, поэтому аминокислотные показатели выпускаемых гидролизатов сравниваются с этими биологическими продуктами.

Благодаря сбалансированному аминокислотному составу, гидролизаты дрожжей, отходов мясной и птицеперерабатывающей промышленности находят все большее применение в различных отраслях промышленности и медицине.

При недостатке полноценного белка в пище организм переходит в состояние катаболизма, используя свои собственные белки в качестве источника азота. Чтобы избежать этого необходимо своевременное обеспе-

чение организма белками или незаменимыми и заменимыми аминокислотами, источниками которых, как известно, могут быть не только белки, но и белковые гидролизаты, а также индивидуальные аминокислоты.

В связи с этим продукты, содержащие аминокислоты и их производные, заняли одно из ведущих мест в медицинской, микробиологической, пищевой и комбикормовой промышленности.

Таблица 1.1

Потребности в незаменимых аминокислотах и белке для людей различного возраста в мг/кг веса тела в день по данным ФАО/ВОЗ [2]

Аминокислота	Потребности новорожденных	Потребности детей школьного возраста	Потребности взрослых
Валин	93	33,3	10
Гистидин	29	–	–
Изолейцин	70	28	10
Лейцин	61	49	14
Метионин и цистин	58	59	12
Треонин	116	27	13
Триптофан	17	34	7
Фенилаланин + тирозин	125	27	35
Сумма аминокислот	801	261	14
Общая потребность в белке	1600	700	425
Общее содержание незаменимых аминокислот	50%	36%	19,6%

Исходя из этих соображений, сегодня основными сферами применения белковых гидролизатов с различной степенью конверсии вплоть до свободных аминокислот являются медицинская, пищевая, комбикормовая, микробиологическая и некоторые другие отрасли промышленности.

Для получения белковых гидролизатов в настоящее время используются различные источники сырья, которое можно по происхождению разделить на три группы: микробное, животное и растительное.

Рациональное использование вышеназванных видов сырья может привести не только к значительной экономии материальных ресурсов, но и имеет важное социальное значение, так как позволяет создать безотходные технологии и способствует оздоровлению окружающей среды.

Дадим характеристику важнейших областей применения белковых гидролизатов.

В медицинской промышленности белковые гидролизаты стали применяться в более 40 лет назад, при различных патологиях, сопровождающихся нарушением пищеварения, уменьшением или отсутствием всасывания пищи в желудочно-кишечном тракте, а также при различных пищевых аллергиях.

Понимание процессов деградации и образования аминокислот в организме, их структурно-функциональных взаимосвязей и участие в синтезе

белков, гормонов и других жизненно важных соединений привело к успешному развитию исследований, направленных на разработку лекарственных средств самого широкого спектра действия.

Очищенные гидролизаты различного происхождения используются в медицине в качестве препаратов для парентерального и других видов питания. В медицинской практике известно использование препарата «аминосол», «аминопептид» для парентерального белкового питания [1]. Они содержат до 70 % свободных аминокислот и обладают высокой питательной ценностью.

Существенное значение при создании рецептур аминокислотных препаратов для парентерального и других видов питания имеет правильный выбор соотношения заменимых и незаменимых аминокислот [2, 3]. Уменьшение соотношения незаменимых аминокислот к заменимым (E/N) от 0,3 и ниже свидетельствует о низкой питательной ценности используемых препаратов, в большинстве эталонных препаратов оно близко к 1 [2].

К патологиям, связанным с невозможностью покрыть потребности организма в белке обычным путем, могут быть отнесены ожоги различной степени тяжести, посттравматические состояния, связанные со значительной потерей белка организмом, потеря сознания, панкреатиты, синдром короткого кишечника, болезнь Крона и т.д. В этих случаях решающее значение приобретает лечебное питание [8]. При лечебном питании питательные вещества вводятся либо через зонд или фистулу в пищеварительную систему – зондовое питание, либо непосредственно в кровь, внутривенно – парентеральное питание. Во всех этих случаях белок должен быть предварительно гидролизован, причем степень гидролиза зависит как от патологии организма, так и от выбранного способа введения. Так, при энтеральном введении могут быть использованы частично гидролизованные белки, содержащие наряду со свободными аминокислотами смеси олигопептидов различной молекулярной массы. При этом организм человека в зависимости от вида заболевания способен с той или иной степенью эффективности усваивать введенные через зонд или фистулу питательные смеси, содержащие пептиды, аминокислоты или даже интактные белки. Эффективность их усвоения зависит не только от степени нарушения переваривания и всасывания, но и от вида пищевых смесей и прежде всего их молекулярно-массового состава [9].

Совсем иной состав должны иметь пищевые рационы при парентеральном питании. В этом случае желательно, чтобы они вообще не содержали пептидов, а представляли собой инфузионные растворы на основании кристаллических аминокислот, принципы получения которых, изложены в обзоре [10].

Применение белковых гидролизатов для парентерального питания может осложниться побочными реакциями, вызванными присутствием пептидов различной молекулярной массы, а также недостаточной степе-

нию их очистки [11]. Поэтому более широкое применение белковые гидролизаты нашли в качестве основы при создании препаратов лечебного питания для перорального введения. Причем в качестве субстратов для получения таких препаратов чаще всего используют казеин и белки молочной сыворотки. Так, японскими исследователями из белков молочной сыворотки получена смесь низкомолекулярных пептидов, которые использовали в качестве осмотического агента при перитональном гемодиализе [12].

Ряд патологий требует соблюдения специальной белковой диеты. К таким заболеваниям относится фенилкетонурия, для успешного лечения которой требуется исключить из белковых компонентов пищи аминокислоту фенилаланин [13].

В последние годы интерес к белковым гидролизатам, используемым в лечебном питании, возрос, так как появились новые данные по их использованию для устранения пищевых аллергий [14].

Для получения препаратов лечебного питания чаще всего используются гидролизаты белков животного происхождения (яичного альбумина, казеина, белков крови), в составе которых есть все незаменимые аминокислоты и отсутствуют модификации аминокислот и низкомолекулярных пептидов, способные вызвать побочные реакции при их введении. Иными словами, для препаратов лечебного питания используются гидролизаты высококачественных пищевых белков, поэтому перспективными являются исследования, направленные на изучение возможности замены этих ценных пищевых субстратов отходами пищевой промышленности [3].

Белковые гидролизаты, полученные ферментативным методом, удовлетворяют требованиям, предъявляемым к препаратам парентерального питания, после тщательной очистки от пептидных фракций. Будучи глубоко расщепленными, очищенными и сбалансированными по составу, такие белковые гидролизаты по своим питательным и лечебным свойствам не уступают препаратам, получаемым из синтетических аминокислот, а в ряде случаев являются предпочтительными [4]. Это обусловлено тем, что в сбалансированных гидролизатах имеются в достаточных количествах все незаменимые аминокислоты, а также в нужном соотношении находятся практически все заменимые аминокислоты, отсутствуют их D-изомеры. Содержащиеся в них ди- и трипептиды усваиваются также эффективно, как и свободные аминокислоты. Кроме того, препараты на основе белковых гидролизатов дешевы и доступны. Следует отметить еще одно преимущество белковых гидролизатов перед препаратами на основе синтетических аминокислот: их низкая осмолярность и присутствие в растворе таких незаменимых аминокислот как тирозин и цистин, отсутствующих из-за плохой растворимости в большинстве препаратов на основе синтетических аминокислот [5].

Использование гидролизатов в пищевой промышленности.

В традиционной европейской кухне белковые гидролизаты издавна используются для приготовления соусов, приправ, бульонов, высококалорийных добавок. В национальных восточных рецептах присутствуют гидролизаты соевого белка, частично гидролизованные рыбные продукты. Особенностью всех этих блюд с применением белковых гидролизатов является их высокая питательная эффективность [15].

Наиболее широкое использование белковые гидролизаты получили, прежде всего, для приготовления специальных рационов для людей пожилого возраста, спортсменов и тех, кто должен поддерживать свои весовые характеристики на постоянном уровне. Как известно, для многих людей пожилого возраста, характерно уменьшение массы тела, связанное, прежде всего, с уменьшением потребления белка в силу самых различных причин, включая и социальные факторы [10]. В этой связи потребление ими жидких пищевых рационов или напитков, обогащенных водорастворимыми белковыми гидролизатами, является наиболее простым решением проблемы адекватного обеспечения этих людей полноценным белковым питанием [16].

В конце 80-х годов было убедительно показано, что потребность в белке существенно возрастает при физических нагрузках. В связи с этим для многих спортсменов, особенно тех, кто занимается тяжелой атлетикой, потребность в белке была установлена в количестве не менее чем 300 г/день. При меньшем потреблении белка спортивные достижения могут пойти на убыль за счет истощения мышечных белков как источников пищевого азота. Однако интактные белки, особенно при физических нагрузках, имеют существенно более длительный период всасывания и усвоения по сравнению с пептидами, особенно содержащими два-три аминокислотных остатка. Поэтому белковые гидролизаты рекомендуется добавлять в пищевые рационы для спортсменов, что существенно улучшает их спортивные показатели [17].

Многие пищевые рационы для снижения массы тела основаны на низком содержании калорий в таком рационе. Однако при этом часто происходит существенная потеря и нарушение синтеза мышечных белков, что приводит к значительному ослаблению организма. С помощью белковых гидролизатов можно с успехом составлять низкокалорийные белковые рационы, обеспечивающие контролируемое уменьшение массы тела не приводящее к каким-либо патологическим последствиям [18].

Кроме того, как было обнаружено в 1992 г, фосфопептиды, содержащиеся в гидролизатах казеина, существенно повышают сорбцию кальция из желудочно-кишечного тракта, и, следовательно, способствуют повышению прочности и эластичности костной ткани. В опытах на животных было показано, что гидролизаты казеина всасываются существенно быстрее, чем гидролизаты сои [19].

За последние 10–20 лет пищевая промышленность накопила большой опыт по применению белковых гидролизатов, полученных из отходов пищевой и других видов продукции. Так, японскими исследователями из частично гидролизованных отходов молочной промышленности получают продукт, способный улучшать вкусовые и технологические характеристики мясных продуктов, такие как эластичность и влагоудерживающая способность [20]. Частичный гидролиз протеазами отходов птицеперерабатывающей промышленности, например таких, как куриные головы, ноги и другие малоценные части, дает возможность после соответствующей очистки получать белковые гидролизаты, по своим органолептическим показателям близкие к куриным бульонам [21].

Хорошие результаты получены при использовании ферментативных гидролизатов телячьих костей в качестве заменителя желатина. Мясной запах и вкус, а также желирующие свойства позволили применять гидролизат для производства супов, соусов и подливок [22].

Методы гидролиза белков широко применяли и для улучшения качества мясных продуктов. Гидролиз соединительной ткани ферментными препаратами, обладающими коллагеназной активностью, значительно улучшает качество мясных полуфабрикатов. Для этого проводится шприцевание мясных продуктов или введение протеаз в кровь непосредственно перед убоем [23, 24]. Кроме того, для повышения питательной ценности мясных полуфабрикатов в них путем шприцевания могут быть введены белковые гидролизаты с полноценным аминокислотным составом, в результате чего удастся получить мясные продукты, которые по своей эффективности близки к эталонным белкам [25].

Полипептидная фракция, содержащая от 5 до 50 остатков аминокислот, полученная ферментативным гидролизом казеина, была с успехом использована в качестве эмульгатора, а кислые гидролизаты казеина - в качестве влагосвязывающих веществ для отдельных видов пищевых продуктов, например, рыбных консервов [26].

Показана возможность использования методов ферментативного гидролиза для восстановления органолептических свойств сублимированного мяса [27]. Апробация восстановленного мяса в составе фаршей рубленых полуфабрикатов показала, что готовые продукты обладают выраженной сочностью, хорошим вкусом и запахом, имеют высокую перевариваемость.

Широкое использование получили белковые гидролизаты и в качестве основы для различных ароматизаторов и вкусовых добавок, имитирующих запах и вкус мяса, рыбы, грибов и т.д. [28].

В качестве субстратов для получения таких ароматизаторов могут быть использованы белки животного, растительного и микробного происхождения, белковые отходы пищевой промышленности и отдельные серосодержащие аминокислоты. В основе получения большинства таких ароматизаторов лежит не только ферментативный или кислотный гидролиз

белка, но и хорошо известная реакция Майера, протекающая между сахарами и аминокислотами [29].

Американские ученые провели ряд экспериментов с гидролизатами рогокопытного сырья. Белковый продукт, полученный в результате гидролиза с различными добавками, предполагается использовать для приготовления печенья, кофейного торта, блинов [30]. Автор утверждает, что получаемый белковый продукт содержит все незаменимые аминокислоты. При необходимости его смешивают с 1,75 % триптофана. Белковый продукт можно применять в виде суспензий для многих напитков, соков. Эти суспензии стабильны, не дают осадков и могут быть использованы для приготовления апельсинового и виноградного соков, шоколадных напитков.

Изучалась возможность замены 1/3 обычной муки мукой, полученной из шерсти, сои, казеина, травы, субпродуктов. Для этой цели сырье подвергали воздействию папаина. Проверке были подвергнуты бисквиты, пышки, хлеб и имбирное печенье, при выпечке которых обычная мука была частично заменена мукой, приготовленной из вышеперечисленных ингредиентов. Бисквиты, выпеченные из муки, состоящей на 37 % из упомянутых видов белковой муки, не уступали по своим свойствам обычным бисквитам. Сходные результаты были получены и с другими хлебобулочными изделиями [31].

Одной из наиболее распространенных областей применения белковых гидролизатов в пищевой промышленности является получение натуральных колбасных оболочек. Для этих целей используются гидролизаты коллагенсодержащего сырья в виде голиевого спилка, обрезка шкур с голов или подкожной клетчатки, которые можно подвергать химическому и ферментативному гидролизу [32]. В качестве химических методов гидролиза используется последовательная щелочно-гидролизная деградация сырья. Методом ферментативного гидролиза коллагеновую массу получают, используя комплексный ферментный препарат протосубтилин Г10х (продуцент *Bac. subtilis*) в концентрации 0,1 % к массе сырья. Качество колбасных изделий в натуральной колбасно-белковой оболочке значительно выше, чем качество аналогичных изделий в целлофане.

Отходы мясной промышленности, содержащие коллаген, подвергают действию ферментов, и из оставшегося негидролизованного коллагена после его механической или химической обработки получают колбасные оболочки. Как показывают исследования, качество колбасных изделий в натуральной белковой оболочке значительно выше, чем качество аналогичных изделий в целлофане [16, 19].

Известно, что отдельные белки, такие как белки яиц, молока, молочной сыворотки (а-лактальбумин, в-лактоглобулин), сои и земляных орехов вызывают аллергические реакции у некоторых индивидуумов. Причем, даже очень незначительное содержание таких белков в пищевых продуктах может оказать аллергенное действие. В этом случае данные белки могут

быть заменены на соответствующие белковые гидролизаты, что оказалось оптимальным при получении продуктов детского питания, так как 4–6 % грудных и 1–2 % маленьких детей подвержены аллергическим реакциям [33].

Известно, что пищевые аллергии тесно связаны с иммунологическим механизмом, и их основными симптомами являются нарушение деятельности желудочно-кишечного тракта, острые респираторные заболевания, головная боль, гипотония и даже в отдельных случаях анафилактический шок [34].

Чаще всего в качестве белковых гидролизатов для получения гипоаллергенных продуктов используются гидролизаты казеина или белков сыворотки молока с достаточно высокой степенью конверсии, обеспечивающей разрушение аллергенных веществ [35]. Однако во многих случаях, как уже отмечалось ранее, такой гидролиз приводит к появлению у гидролизатов горького вкуса и специфического запаха, что мешает их использовать для приготовления пищевых гидролизатов, особенно для детского питания.

В связи с этим в последнее время стали обращаться к иным пищевым белкам, не образующим горьких пептидов и аллергенных продуктов при их гидролизе, например к желатину и неполноценным белкам, которые могут быть добалансированы недостающими аминокислотами в соответствии с требованиями, предъявляемыми к таким продуктам. Подобные продукты выпускает фирма Sandoz, например, Vivonex или Tolorex [36]. Эти продукты успешно устраняют симптомы хронических аллергий у детей различного возраста, но их обычно не используют в течение длительного времени. Таким образом, создание гипоаллергенных продуктов на основе белковых гидролизатов, обладающих удовлетворительными вкусовыми характеристиками и полноценным аминокислотным составом, является одной из основных проблем современности.

Из приведенных данных видно, что потребности в пищевых белковых гидролизатах достаточно велики, и это требует существенного расширения сырьевой базы для их получения, в частности, более полная переработка отходов пищевой промышленности и других производств.

Применение белковых гидролизатов для получения комбинированных кормов. Продуктивность животноводства в значительной мере зависит от качества используемых кормов, в частности, от вида и количества кормов животного происхождения. Высокое содержание полноценных белков в последних определяет их особое место в создании кормовой базы животноводства. Для производства кормов используется белоксодержащее сырье, которое уже не удастся применить в пищевой промышленности: кератинсодержащее, костное, перопуховое, кожевенное, эндокринно-ферментное и прочее. Гидролизаты, полученные из подобных отходов, часто имеют несбалансированный аминокислотный состав и, следовательно-

но, низкую питательную эффективность по сравнению с гидролизатами, получаемыми из высококачественного белкового сырья. В связи с этим для повышения их питательной ценности можно с успехом использовать метод совместного гидролиза различных видов белкового сырья с использованием эффекта их взаимного обогащения [37].

В сельском хозяйстве продукты переработки непищевых отходов убоя скота и птицы широко используются для получения различных кормовых смесей – добавок, существенно повышающих питательную ценность кормов [8, 38, 39, 40, 41]. Так, при скармливании свиньям 1 кг кормов, содержащих добавки отходов мясной промышленности, получен дополнительный привес животных по сравнению с контрольными группами. При добавлении в корм концентрата из рогов и копыт, гидролизованных мочевиной, привес составил 783 г, гидролизованных NaHSO_3 – 350 г, а рогакопытной муки – 194 г; концентрат из малоценного пера, гидролизованного мочевиной – 417 г, гидролизованного NaHSO_3 – 139 г [42].

В микробиологической промышленности в последнее время все чаще используются гидролизаты непищевых белков или отходов пищевой промышленности [11].

В качестве сырья для получения гидролизатов могут быть использованы отдельные органы сельскохозяйственных животных (печень, почки, селезенка) или их смеси, эмбрионы кур и куриные яйца, слизистая оболочка желудка или двенадцатиперстной кишки, внутренние органы домашних птиц, мясные отходы производства вакцин, а также отходы рыбы и морепродуктов [43, 44]. Полноценной основой питательных сред для выращивания широкого круга патогенных и непатогенных микроорганизмов может служить гидролизат белково-витаминных концентратов [45].

Перечисленные выше гидролизаты близки по своему составу, общего азота в них содержится от 10,0 до 12,4 %, аминного – от 3,0 до 6,0 % [46].

Питательные среды, имеющие полноценный аминокислотный состав, находят широкое применение как субстраты для роста культур клеток. Однако, требования к таким препаратам очень высокие, наличие незначительных примесей высокомолекулярных пептидов, рацематов аминокислот недопустимо [11].

Преимущество гидролизных препаратов для создания питательных сред состоит в их относительно низкой стоимости, практически неограниченной сырьевой базе и возможности создания безотходных технологий. Замена дорогостоящих питательных сред из пищевых продуктов гидролизатами из непищевого сырья позволяет сэкономить ценные продукты питания. Разнообразие методов гидролиза белоксодержащих субстратов позволяет получать гидролизные препараты различных составов и варьировать этот состав в зависимости от области применения данного препарата [11, 46].

В микробиологической промышленности возможно применение бел-

ковых гидролизатов в качестве основного компонента питательной среды – пептона [47].

Преимущество гидролизных препаратов для создания питательных сред состоит в их относительно низкой стоимости, практически неограниченной сырьевой базе и возможности создания безотходных технологий. Замена дорогостоящих питательных сред из пищевых продуктов гидролизатами из непищевого сырья позволяет сэкономить ценные продукты питания. В этой области ведущая роль принадлежит белковым гидролизатам микробного происхождения, прежде всего дрожжевым.

Биологическая ценность дрожжей определяется аминокислотным составом белка, однако, многие исследователи относят их к нестандартным источникам белка [48–50]. Вместе с тем, как отмечают авторы обзора [51], кормовые дрожжи характеризуются высоким содержанием лизина, лейцина, изолейцина, аспарагиновой и глутаминовой кислот (3–5 %), по содержанию незаменимых аминокислот белок дрожжей может быть приравнен к белку куриного яйца.

Известно, что кормовые дрожжи содержат до 20 % углеводов, 16 % липидов, 2 % углеводов, 6–8 % нуклеиновых кислот и остатки питательной среды, витамины, прежде всего, группы В, макро- и микроэлементы. Наличие указанных классов химических соединений, содержание которых может изменяться в широких интервалах, ставит перед исследователями сложную задачу по получению белковых гидролизатов. Пути решения этой проблемы предполагают предварительное выделение изолята дрожжевого белка или постадийную очистку получаемых в ходе гидролиза аминокислотнопептидных фракций.

В [52] отмечается, что главной особенностью белковых гидролизатов, получаемых из микробной биомассы, является высокое содержание в них углеводов, наряду с азотсодержащими соединениями. Характерной особенностью вышеуказанных классов химических соединений является наличие реакционноспособных функциональных групп NH–, COOH–, SH–, взаимодействующих между собой. Это обстоятельство ограничивает возможности использования белковых гидролизатов из микробного сырья [53].

Вместе с тем в работе [53] отмечается, что дрожжевой белок считается относительно дешевым и доступным сырьем для получения смесей пептидов и аминокислот, способных найти самое разнообразное применение, вплоть до аминокислотных препаратов для парентерального питания. По мнению авторов обзора [51], наиболее перспективно использование микробных клеток после получения из них белковых концентратов или изолятов. Тем не менее, многие исследователи рассматривают биомассу дрожжей и бактерий как наиболее перспективный источник белковых гидролизатов вследствие их невысокой стоимости. Кроме того, важное значение имеет тот факт, что микробная биомасса является наиболее крупнотон-

нажным отходом в биотехнологической промышленности при получении препаратов БАВ.

Белковые гидролизаты находят применение и в других отраслях народного хозяйства, например, в литейном производстве. Например, щелочные гидролизаты кератинсодержащего сырья используют в качестве быстротвердеющего вещества. Они обеспечивают легкую выбивку стержней из отливок. Этот материал обладает большой относительной прочностью, скоростью твердения и меньшей прилипаемостью. Предпосылкой для производства быстротвердеющего связующего крепителя из рогокопытного сырья послужило его свойство под действием щелочей давать вязкие и клейкие растворы продуктов частичного гидролиза белка при их упаривании [54]. Также белковые гидролизаты служат сырьем для получения аминокислот, используются в качестве комплексообразователей при производстве драгоценных и редких металлов из руд [55].

В косметологии белковый продукт на основе гидролизатов рогокопытного сырья можно применять как составную часть различных препаратов, в том числе шампуней, кремов для кожи, средств ухода за волосами [56].

На основе белковых гидролизатов получают препараты индивидуальных аминокислот. Например, на основе кератинсодержащего сырья можно получить серосодержащие аминокислоты, прежде всего, цистин и цистеин, которые, в свою очередь, являются основой для получения медицинского препарата – таурина. Дадим более подробную характеристику данному препарату.

Практическое значение таурина. Таурин, 2-аминоэтансульфоновая кислота ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$), химически стабильное природное соединение, содержащееся в основном в возбудимых тканях организма животных и человека. Выпускается в качестве медицинского препарата для лечения глазных болезней под названием «тауфон».

Таурин широко распространен в животном мире и необходим для нормальной жизнедеятельности. Некоторые животные способны синтезировать таурин в достаточном количестве, например, крысы и морские моллюски, другие же получают его в основном с пищей. К последним относятся кошки, кролики, некоторые обезьяны и человек. Таурин был впервые обнаружен в 1827 г. в мясе быка, отсюда и происходит его название. Эта аминокислота может быть синтезирована на основе двух серосодержащих аминокислот: метионина и цистеина. В отличие от классических аминокислот, которые служат для формирования белков, таурин остается в клетке в свободной форме. Соединяясь с холиевыми (желчными) кислотами в виде таурохолевых кислот, таурин выделяется из печени в тонкий кишечник, где он участвует во всасывании и обмене жиров в организме. Он содержится в тканях мышц (сердца), центральной нервной системы, сетчатки

глаза, где его концентрация достигает 10 ммоль/г. Именно эти органы страдают при недостатке таурина в рационе питания или при нарушении обмена веществ в результате какой-либо патологии.

Наиболее высокое содержание таурина наблюдается в сердце, мышцах и сетчатке глаза вследствие способностей этих тканей к эндогенному синтезу таурина или его накоплению в результате активности специфической транспортной системы.

Таурин долгое время считался метаболически инертным соединением, являющимся конечным продуктом серосодержащих аминокислот (метионина, цистеина, цистина). Однако в последнее десятилетие доказано прямое участие таурина в некоторых важных физиологических процессах, что позволяет отнести его к важнейшим биологически активным веществам.

Это соединение обладает широким спектром физиологических и биохимических воздействий. Так, таурин выступает в качестве регулятора кровяного давления и улучшает светочувствительность сетчатки, являясь безвредным средством улучшения зрения людей в условиях низкой освещенности. Таурин необходим для поддержания целостности сетчатки глаза. Его концентрация в сетчатке глаза превышает концентрацию в крови в 100–400 раз. В 1975 г было установлено, что недостаток таурина в течение длительного времени вызывает прогрессирующую дегенерацию (перерождение) сетчатки, приводящую к полной слепоте меньше, чем за два года. Характерной особенностью таурина является его способность стимулировать репаративные процессы при дистрофических нарушениях сетчатки глаза, травматических поражениях ткани глаза. Для медицинского применения таурин выпускается в виде 4 %-ного водного раствора под названием тауфон [57].

Таурин стимулирует выделение инсулина и регулирует содержание глюкозы в крови, поэтому его используют для лечения сахарного диабета. При сахарном диабете таурин уменьшает уровень триглицеридов в крови, значительно снижает глюкозурию, т.е. снижает содержание сахара в крови. Его применение позволяет снизить дозу инсулина или уменьшить количество сахаросодержащих препаратов, многие из которых, как известно, обладают побочными действиями на печень и почки. Таурин подобным действием не обладает. Он не только снижает нагрузку на эти органы за счет уменьшения дозы гипогликемических средств, но и способствует нормализации их функций [58].

Таурин также необходим для правильного развития и функционирования нервной системы и мышц. Особенно высока потребность в таурине в младенческий период, когда идет быстрое развитие организма, поэтому считается, что необходимо добавлять таурин в детское питание, что и делается во многих странах.

Концентрации мочевой кислоты и таурина, обладающие 50 %-ным

ингибирующим эффектом, выше в плаценте женщин с нормально протекающей беременностью и родами, чем при преждевременных родах сроком 28–36 недель.

У новорожденных детей, матери которых в период беременности работали во вредных производственных условиях, нередко наблюдается проявление дезадаптационного синдрома в первые сутки после рождения. С целью его корректировки были апробированы варианты введения тауфона беременным накануне родов.

В результате было обнаружено значительное повышение уровня таурина в пуповинной крови новорожденных. Таким образом, вследствие высокой потребности плода в таурине накануне родов и его относительной незаменимости происходит максимальный плацентарный перенос этой аминокислоты.

При анализе периода ранней адаптации новорожденных было обнаружено улучшение их общесоматического статуса. Физиологическая убыль массы тела в них была меньше, проявления синдрома рвоты и срыгивания в первые сутки жизни отмечались в два раза реже. Снижалась также первоначальная диэнцефальная активность (двигательное беспокойство, стереотипные навязчивые движения, тремор, повышение мышечного тонуса). Наблюдалась меньшая степень выраженности желтушного синдрома, что коррелировало с низким уровнем свободного билирубина в пуповинной крови [59].

Таурин соответствует требованиям соединения, способного устранить аминокислотный и метаболический дисбаланс при атеросклерозе. Так, показано, что он относится к группе биологически активных антиоксидантов, оказывает гиполлипидемическое и гипохолестеринемическое действие, активизирует реакции всасывания липидов, митохондриальные ферменты, регламентирующие функционирование цикла трикарбоновых кислот, увеличивает содержание фосфолипидов, восстановленного глутатиона, способствует устранению аминокислотного дисбаланса и функционального состояния печени. Кроме того, нейромодуляторные свойства и высокие концентрации таурина тромбоцитах определяют его участие в процессах агрегации, тромбообразования артерий и регуляции сосудистого тонуса [60–65].

Защитные эффекты таурина связывают с его участием в окислительно-восстановительных реакциях. У млекопитающих таурин в невысоких концентрациях присутствует в тканях, активно продуцирующих оксиданты. В культуре клеток он хлорируется, нейтрализуя токсичную гипохлорную кислоту (НСЮ), продуцируемую миелопироксидазой, формируя стабильные хлорамины и предохраняя клетки от автолиза [66, 67]. Доказано, что тауринхлорамины защищают ткани от кислородного поражения, ингибируя продукцию фактора некроза некоторых опухолей, проявление которого связано с тканевым повреждением [68].

Таурин снижает артериальное давление у пациентов с гипертонической болезнью и практически не влияет на его уровень у больных с сердечно-сосудистой недостаточностью. При длительном применении таурина у больных с гипертензией наблюдается уменьшение колебаний артериального давления, незначительное, но стойкое снижение как систолического, так и диастолического давления.

Также таурин способствует повышению работоспособности при тяжелых физических нагрузках и стрессах.

В настоящее время в России сложилась неблагоприятная обстановка с потреблением продуктов питания животного происхождения, особенно морепродуктов, в которых содержится наибольшее количество таурина.

Все вышесказанное свидетельствует о необходимости разработки дешевой технологии промышленного получения таурина из доступных источников сырья [69].

Таким образом, анализ литературных данных позволяет выделить ряд физико-химических и структурных свойств белковых гидролизатов, которые имеют принципиальное значение для определения области их применения. Дадим характеристику этих свойств.

Физико-химические и структурные свойства белковых гидролизатов. В настоящее время совершенно очевидно, что основные физико-химические свойства белковых гидролизатов определяются, прежде всего, выбранным для гидролиза исходным субстратом, аминокислотным составом последнего, его биологической и питательной эффективностью, способом конверсии в смесь мономеров и олигомеров, степенью конверсии и последующей очисткой.

При использовании в качестве основного инструмента для получения гидролизатов биокатализаторов различной субстратной специфичности можно получить несколько видов белковых гидролизатов: смесь высокомолекулярных олигопептидов, так называемых «протеоз», смесь олигопептидов со средней молекулярной массой, то есть пептон, смесь коротких пептидов, смесь аминокислот и низкомолекулярных пептидов, а в отдельном случае смесь свободных аминокислот [70].

Как известно из ряда публикаций, для получения смесей аминокислот и низкомолекулярных пептидов и для получения смесей свободных аминокислот чаще всего приходится использовать несколько ферментов с различной субстратной специфичностью [71].

Совершенно очевидно, что в зависимости от степени конверсии, то есть соотношения азота свободных и связанных в белок аминокислот AN/TN, физико-химические и биологические свойства гидролизатов будут различными. В связи с этим интересно оценить эффективность использования гидролизатов молочных, сывороточных, соевых и других белков и их физиологическое действие как гипоаллергенных продуктов питания. Первое поколение гипоаллергенных гидролизатов, которое стали исполь-

зовать на практике, характеризовалось высокой степенью конверсии белка, (то есть соотношением свободных аминокислот к пептидам), равной 70 %, причем пептиды обычно содержали не более чем 7–8 аминокислотных остатков. Второе поколение гидролизатов характеризовалось степенью конверсии белка равной 40–60 % с количеством аминокислотных остатков в пептидах равным 12. И, наконец, последнее, третье поколение белковых гидролизатов содержало 20 % свободных аминокислот и 80 % пептидов со средним количеством аминокислотных остатков, равным 15 [72], то есть со средней молекулярной массой 1800–2000 Дальтон, соответствующее пептону.

Следует отметить, что частично гидролизованные белки со степенью конверсии 30–50 % уже довольно сложно классифицировать, так как на практике они имеют широкое молекулярно-массовое распределение пептидов и обязательное наличие свободных аминокислот. Как правило, даже наличие широкого спектра ультрафильтрационных мембран не позволяет получать гидролизаты с близкими значениями молекулярных масс входящих в них пептидов.

Большинство физико-химических свойств белковых гидролизатов, таких как растворимость, вязкость, способность к эмульгированию, пенообразованию и желатинизации, а также вкусовые качества определяются белками, выбранными для гидролиза. Белковые гидролизаты отличаются от интактных белков степенью конверсии, которая, как уже упоминалось ранее, тесно связана с выбранными ферментами и условиями гидролиза [10, 70, 73, 19].

Физико-химические свойства белковых гидролизатов. При гидролизе пептидных связей имеют место следующие изменения в свойствах белков: 1) увеличение числа ионизированных групп (NH_4^+ , COO^-) с сопутствующим увеличением гидрофильности и общей величины заряда; 2) уменьшение молекулярного размера полипептидных цепей с соответствующим понижением антигенности исходного белка; 3) изменение в молекулярной структуре, приводящее к освобождению гидрофобной части белковой молекулы и появлению остатков гидрофобных аминокислот на поверхности образующихся олигопептидов [56].

Эти физико-химические изменения приводят к искусственному упрощению структуры белковой молекулы. Окружающая среда, рН, ионная сила, тип и концентрация солей в растворе оказывают влияние на степень гидролиза и вид получающихся гидролизатов. Присутствие коллоидов, эмульгаторов, интактных белков и углеводов в растворе так же будет оказывать существенное влияние на функциональные свойства гидролизатов. Подобное действие оказывает высокая температура, используемая при стерилизации растворов, что существенно влияет на гидрофобные взаимодействия (пептид-пептид или пептид-белок) компонентов и, следовательно-

но, на функциональные свойства, как самих гидролизатов, так и содержащих их пищевых продуктов.

Некоторые функциональные свойства белковых гидролизатов играют особую роль по сравнению с другими и определяют выбор тех или иных гидролизатов для практического использования. Одним из самых значимых свойств является *уменьшение или увеличение аллергенности гидролизата по сравнению с интактным белком*. Если аллергенность гидролизата существенно ниже, чем у исходного белка, то это является одним из наиболее важных оснований для его рекомендации в качестве пищевого продукта, даже если у него хуже другие физико-химические свойства, например, эмульгирующая или пенообразующая способность [74, 75].

Растворимость и термостабильность. Одним из положительных свойств гидролизатов является их растворимость в широком диапазоне значений pH, температуры, концентраций, содержания солей в растворе. Существенное увеличение растворимости белковых гидролизатов по сравнению с интактными белками отмечено многочисленными исследователями, даже при относительно низких значениях конверсии [76, 77]. Особенно сильно растворимость повышается при значениях pH 4–5, то есть в слабокислой среде. Подобное повышение растворимости вполне понятно, так как имеет место не только уменьшение молекулярной массы молекулы белка, но и более сильная ионизация amino- и карбоксильных групп, и следовательно, повышение гидрофильности [78]. Это свойство гидролизатов особенно важно при получении гипоаллергенных детских продуктов и специальных фруктовых соков или напитков, что позволяет контролировать их осмолярность.

Еще одним важным свойством гидролизатов является их *большая термостабильность* по сравнению с исходным белком, что особенно важно при тепловой стерилизации продуктов, содержащих гидролизаты [79]. Термостабильность гидролизатов проявляется даже при небольших степенях конверсии (3–10%) в присутствии солей двухвалентных металлов, например CaCl_2 в интервале pH от 3 до 11 при нагревании их при температурах 100–130°C [80]. Причем эта закономерность характерна для гидролизатов белков молочной сыворотки, казеина, сои и других источников белка. Растворимость и термостабильность белковых гидролизатов можно повысить, добавляя галактуроновую кислоту [81].

Эмульгирующие свойства. Как известно, эти свойства особенно важны при получении продуктов детского питания, а также для получения специальных пищевых композиций для взрослых людей. Совершенно очевидно, что при изучении этих свойств белковых гидролизатов речь идет о ферментативном, а не о кислотном способе гидролиза.

Целый ряд исследователей занимались изучением зависимости эмульгирующей способности гидролизатов от степени конверсии белка [82–84]. При этом использовались два основных метода определения

эмульгирования: эмульгирующая способность (г эмульгированного масла / г белка) и эмульгирующая активность (площадь взаимодействия, стабилизированная отдельными частицами белка, мг/г). В результате было установлено, что эмульгирующие свойства гидролизатов улучшаются при контролируемом гидролизе белка. Так, исследователями было обнаружено значительное усиление эмульгирующей способности при степени конверсии изолята соевого белка 5–7 %, но при повышении ее до 9 % эмульгирующая способность уже снижалась. Подобное явление было характерно и для гидролизатов белков молочной сыворотки и казеина при использовании в качестве биокатализатора трипсина [79]. Увеличение эмульгирующей способности белков с ограниченным протеолизом, по мнению исследователей, объясняется выходом на поверхность молекулы гидрофобных аминокислотных остатков [85], способствующих образованию устойчивых эмульсий.

Однако более глубокий гидролиз, широко применяющийся для получения гипоаллергенных гидролизатов, приводит практически к полной потере эмульгирующих свойств гидролизатов, причем понижение эмульгирующей способности гидролизатов во многих случаях прямо пропорционально степени конверсии [86]. В связи с этим было установлено, что гидролизаты, содержащие пептиды с 20-ю и более аминокислотными остатками, обладают хорошей эмульгирующей способностью. Таким образом, для многих белков граница их эмульгирующей способности находится в области средних молекулярных масс 2400–2500 Дальтон [81].

На основании многих исследований весьма важным фактором, влияющим на эмульгирующую способность гидролизатов, является их гидрофобность. Так, была установлена определенная корреляция между эмульгирующей способностью и гидрофобностью гидролизатов казеина [87]. Исходя из этих данных, был сделан вывод, что специфичность ферментов сильно влияет на эмульгирующие свойства гидролизатов, полученных под их воздействием на интактные белки [82].

В связи с низкой эмульгирующей способностью гидролизатов белков с высокой степенью конверсии было предложено при получении из них пищевых продуктов добавлять различные производные крахмала, модифицированные жирными органическими кислотами, которые не только обеспечивают получение устойчивой эмульсии, но и достаточно стабильны при стерилизации, замораживании и многочасовом выдерживании при комнатной температуре [88].

Реологические свойства. При расщеплении пептидных связей наблюдалось сильное уменьшение вязкости у белкового гидролизата по сравнению с интактным белком [89]. При нагревании белковых гидролизатов у последних в отличие от интактных белков практически не происходило никакой желатинизации, т.е. образования гелевых структур. Последнее, по мнению исследователей, объясняется существенным падением гид-

рофобности гидролизатов, а также увеличением их степени ионизации [90]. Подобное уменьшение способности к желатинизации является положительным фактором при создании пищевых рационов с высоким содержанием азотистых компонентов, так как существенно облегчает их дальнейшую технологическую обработку, например, транспорт таких продуктов через трубопроводы в процессе приготовления, изменения в объеме в аппаратах по приготовлению пищевых продуктов, а также в процессе распылительной сушки.

Следовательно, белковые гидролизаты со средней степенью конверсии можно с успехом добавлять ко многим пищевым продуктам для облегчения технологии их приготовления и получения рационов с высоким содержанием пищевого азота [91].

На примере гидролизатов казеина было показано, что изменение вязкости гидролизатов в зависимости от глубины гидролиза имеет логарифмический характер и добавление к интактному казеинату натрия даже небольших количеств трипсинового или α -химотрипсинового гидролизатов приводит к резкому уменьшению способности к агрегации интактного белка [92]. На основании этих экспериментальных данных было высказано предположение, что пептиды гидролизата взаимодействуют с интактным белком за счет гидрофобного взаимодействия, понижают гидрофобность поверхности последнего и тем самым снижают его способность к агрегации.

Как уже отмечалось ранее, уменьшение вязкости гидролизатов является также положительным процессом при их сушке в распылительных сушилках, так как позволяет существенно увеличить концентрацию азотистых компонентов в растворе, предназначенном для сушки [76].

Осмолярность. Как известно, осмолярность является важной физико-химической величиной, характеризующей качество продуктов детского питания и пищевых рационов для людей пожилого возраста. Продукт с высокой осмолярностью приводит к увеличению количества жидкости в тонком кишечнике и вызывает расстройства кишечника, его возможную дегидратацию и нарушение электролитного баланса, тошноту, рвоту и другие нежелательные явления. Осмолярность обычно определяется количеством осмотически активных частиц в ммольях, растворенных в 1 кг раствора [82] и выражается, как известно, в миллиосмолях на кг воды (мОсм / кг H₂O). Таким образом, осмолярность является функцией числа и размера молекулярных и ионных частиц в продукте. Совершенно очевидно, что осмолярность белковых гидролизатов существенно возрастает при увеличении степени их конверсии в смеси аминокислот и пептидов.

Для уменьшения осмолярности продуктов, содержащих белковые гидролизаты, необходимо знать количество гидролизованных продуктов, добавляемых в пищевые рационы, их степень гидролиза и молекулярно-массовое распределение.

С целью уменьшения осмолярности продуктов, содержащих белковые гидролизаты, к ним может быть добавлен крахмал, который не только уменьшает осмолярность, но и обеспечивает хорошую стабилизацию продуктов в процессе их приготовления [76].

Вкусовые качества гидролизатов. Известно, что гидролизаты имеют специфический вкус и запах и могут использоваться как вкусоароматические добавки [10]. Однако, в процессе гидролиза казеина, лактальбумина и других белков, полученные белковые гидролизаты часто обладают горьким вкусом и не могут быть использованы для получения пищевых продуктов.

В связи с этим еще с начала 50-х годов прошлого столетия началось изучение причины горького вкуса белковых гидролизатов. Уже тогда было установлено, что горечь гидролизатов была вызвана наличием в них горьких пептидов, которые можно было удалить сорбцией на активированном угле.

В 70-х годах прошлого столетия установлено, что горечь и в ряде случаев неприятный вкус белковых гидролизатов, вызываемые пептидами, содержащими в качестве концевых аминокислот такие гидрофобные аминокислоты, как изолейцин, тирозин, фенилаланин и триптофан, то есть горечь белковых гидролизатов была тесно связана с их гидрофобностью [82]. У интактных белков остатки гидрофобных аминокислот обычно находятся внутри молекулы и не соприкасаются с вкусовыми рецепторами при их использовании в пищевых целях. При гидролизе структура белка нарушается, и остатки гидрофобных аминокислот становятся доступны для вкусовых рецепторов. Однако при высоких степенях конверсии горечь гидролизатов часто становится значительно меньше, что привело исследователей к мысли о том, что снижение горечи можно обеспечить расщеплением горьких пептидов на свободные аминокислоты [93].

В дальнейшем на ряде пептидов, выделенных из гидролизатов и обладающих горьким вкусом, было показано, что гидролиз этих пептидов до свободных аминокислот существенно снижал гидрофобность и приводил к уменьшению или полному устранению горечи [94].

В настоящее время предложено несколько методов для устранения горечи гидролизатов [95]. Эти методы включают в себя: селективное отделение горьких пептидов от гидролизатов, добавление различных компонентов к белковым гидролизатам для маскировки их горького вкуса и дополнительную обработку гидролизатов экзопептидазами.

Еще в 50-х годах для удаления горьких пептидов была предложена процедура их селективного удаления, однако, она получила свое дальнейшее развитие только в 80-х годах. В качестве сорбента для отделения горьких пептидов может быть использован активированный древесный уголь [96], однако при пропускании через него гидролизатов наблюдалась потеря 26% белкового азота, прежде всего за счет сорбции как пептидов, содер-

жащих триптофан и фенилаланин, так и тех же свободных аминокислот. Одновременно с уменьшением горького вкуса происходило и осветление белковых гидролизатов.

Другими адсорбентами для удаления горьких пептидов из гидролизатов могут быть гексилсефароза [97], гексилцеллюлоза [98], фенольно-формальдегидные смолы [99]. Особенно перспективной в этом отношении оказалась аффинная хроматография с сорбентами-носителями антител, специфичных для гидрофобных пептидов [100], однако получение таких адсорбентов является достаточно дорогим процессом, приводящим и к увеличению стоимости очищенных белковых гидролизатов.

Для удаления горького привкуса гидролизатов казеина использовали колонки с фенольной смолой и смолами C_{18} (октадецилсилоксан) и C_8 (октасилоксан). В результате удаления горечи в гидролизатах возрастало общее содержание азота. Наиболее эффективными оказались колонки со смолой C_{18} . После удаления горечи снижалась и антигенность белковых гидролизатов [101].

Экономически более перспективным оказались стекловолокно, силикагель, картон и другие фильтры, которые хорошо зарекомендовали себя для адсорбции горьких пептидов из молочных гидролизатов [98]. Для этих целей эффективным методом оказалась и экстракция горьких пептидов вторичным бутиловым спиртом, а также этанолом [102].

Другим приемом удаления горького вкуса является «маскировка», для которой использовались многие химические соединения. Так, еще в конце 60-х годов было показано, что добавление полифосфатов в процессе гидролиза существенно уменьшает горький вкус получаемых гидролизатов [103]. Заметное уменьшение горького вкуса может быть достигнуто и добавлением желатинизированного крахмала [104].

Было также показано, что горечь в пептидах уменьшается при добавлении к белковым гидролизатам органических кислот, в частности, глутаминовой или аспарагиновой кислот. Однако последние, устраняя горький вкус из гидролизатов, придавали им кислый вкус. В дальнейшем было обнаружено, что добавление таурина также эффективно устраняет горький вкус гидролизатов и при этом не придает им кислого вкуса. Однако для проявления этого эффекта следовало добавлять большое количество этой аминокислоты [104].

Еще одним приемом удаления горького вкуса является ферментативная обработка гидролизатов экзопротеазами. В 1970-80 гг. было показано, что реакция образования пластеинов является весьма эффективной для устранения горького вкуса гидролизатов и образования белковоподобных веществ со свойствами, отличными от свойств интактных белков [105].

Другим, ранее упомянутым методом, явилась обработка белковых гидролизатов экзопротеазами с целью отщепления от горьких пептидов гидрофильных аминокислотных остатков. Так, было показано, что обра-

ботка гидролизата казеина, имеющего горький вкус, гомогенизатором свиных почек, содержащих аминопептидазу Р, приводит к существенному уменьшению горького вкуса этого гидролизата [106]. Аналогичный результат был достигнут при использовании в качестве биокатализатора карбоксипептидазы [107]. Недостатком последнего метода является существенное увеличение глубины гидролиза (более 30 %), что приводит к уменьшению вязкости, эмульгируемости и повышению осмолярности вновь полученных гидролизатов [108, 109].

Таким образом, подводя итог вышеизложенному, можно прийти к заключению, что в ряде случаев свойства получаемых белковых гидролизатов позволяют их использовать как дополнительный источник азота в пищевых рационах для людей различного возраста. Однако при этом следует учитывать структурно-функциональные и физико-химические свойства получаемых гидролизатов, и их влияние на функциональные свойства интактных белков входящих наряду с белковыми гидролизатами в пищевые рационы.

Очевидно, что определяющее влияние на качество белковых гидролизатов оказывают условия его гидролиза. Поэтому далее рассмотрим технологии гидролиза белковых субстратов.

Список литературы

1. Калмыков П.Е., Голубев Т.И. Белковый препарат для парентерального питания – аминопептид. // Советская медицина. – 1956. – №3. – С. 66–69.
2. Денякина Е.К., Неклюдов А.Д., Герасимова Е.В. О количественном соотношении аминокислот и пептидов в белковых гидролизатах для парентерального питания. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1983. – Т. 19. – № 4. – С.503–506.
3. Неклюдов А.Д., Навашин С.М., Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1983. – Т.19. – №7. – С. 3–17.
4. Таранич А.В., Анохина В.И., Кононенко А.В. Способ получения кормовой добавки из отходов мехового сырья. // Патент СССР № 3671661/28-13. Оpubл. 23.04.1985
5. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. и др. Получение пищевых гидролизатов из отходов мясопереработки в присутствии ферментов поджелудочной железы. //В сб. научных трудов ВНИИПМ – М.: ВНИИМП. – 1998. – С. 70–78.
6. Veil E., Ноеррнер А., Wolff Н.С. Способ получения частично гидролизованных белков. // Патент ГДР № 2008493. Оpubл. 03.09.1970.
7. Артюхин В.И., Шепелин А.П., Киселева В.Н. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред: Производство и применение продуктов микробиологических производств. //Обзорная информацияВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР. – 1990. – Вып. 9–10. – 52 с.
8. Ju Н.Р., Okumiya M., Nishizono S., Ki M. et al.// Food Chem. Toxicol. – 1997. – V. 35. – N 7. – P. 663–668.
9. Taylor S.L. //J. Food Protect. – 1986. – N 49. – P. 239–250.
10. Ивашов В.И., Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Хромова Р.А. Получение и применение белковых гидролизатов. М.: АгроНИИТЭИММП. – 1991. – 44 с.

11. Неклюдов А. Д., Навашин С. М. // Прикл. биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21. – Вып. 1. – С. 3–17.
12. Osmotic agents for peritoneal hemodialysis. // Pat. Japan N 6260563. – 1987.
13. Preparation of peptides with low content of phenylalanine for the treatment of phenylketonuria. // Pat. Japan N 6168426. МКІ А 61 К 37/18. – 1986.
14. Flaczyk E. // Przem. Spozyw. – 1997. – V. 51. – N 3. – P. 6–8, 31.
15. Пивненко Т.Н., Эпштейн Л.М., Позднякова Ю.Н., Давидович В.В. Ферментативные способы приготовления белковых гидролизатов с использованием протеолитических ферментов различной специфичности. // Вопросы питания. – 1997. – № 5. – С. 34–38.
16. Frokjaer S. Use of hydrolysates for protein supplementation. // Food Technol. – 1994. – V. 48. – N 10. – P. 86–88.
17. Berthelsen. J.H., Frokjaer S., Saltin B. Additive for use in any energy supplementation and use of a protein hydrolyzate for the preparation of energy supplementation. // PCT Int. Appl. WO 97 39,641 (Cl. A23L2/66). 30 Oct. 1997.
18. Tsumura K., Kugimiya W., Hoshino K. A protein hydrolyzate and process for producing it. Eur. Pat. Appl. EP 797,928 (Cl. A23J3/34). 1 Oct. 1997.
19. Flaczyk E. // Przem. Spozyw. – 1997. – V. 51. – N 4. – P. 43–45.
20. Hagi T., Hatta H., Kobayashi M., Yoshikawa K. Meat containing food with improved elasticity and water retention. // Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 09,121,814 [97,121,814] (Cl. A23L1/31). 13 May 1997.
21. Surowka K., Fik M. Recovery of proteinaceous substances from chicken heads by proteolysis with trypsin. // Nahrung. – 1996. – 40. – № 3. – С. 132–137.
22. Linder Michel, Rozan P., Lamghari El. Kossori R., Janni J., Villaume C., Mejean L., Parmentier M. Nutritional value of veal bone hydrolysate. // J. Food Sci. – 1997. – V. 62. – № 1. – С. 183–189.
23. Титов Е.И., Апраксина С.К. Модифицированные белковые препараты из коллагенсодержащего сырья / // Науч.-техн. прогресс в пищ. пром-сти: Междунар. науч.-техн. конф., Могилев, 22 – 24 ноября, 1995: Тез. докл. – Могилев, 1995. – С. 104.
24. Sakata R., Segava Shoji, Morita H. Tenderization of hog casings. Application of organic acids and proteases. // Fleischwirtschaft. – 1998. – V. 78. – N 6. – P. 703–704.
25. Tomizawa T. Food containing protein hydrolyzates of the squid. // Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 10 113,152 [98 113,152] (Cl. A23L1/333), 6 May 1998.
26. Diaz O., Gouldsworthy A.H. Identification of peptide released from casein micelles by limited trypsinolysis. // J. Agr. and Food Chem. – 1996. – V. 44. – N 9. – P. 2517–2522.
27. Антипова Л.В., Кадачев А.А., Новрузов Б.Н. Восстановление сублимированного мяса с применением ферментных препаратов. // АгроНИИТЭИММП. Сер. Мясная промышленность. Научно-техн. информ. сборник. – 1991. – N 5. – С. 16–19.
28. Beck R.H., De Sadelur J.W. Process for the production of glutamic acid and the use of protein hydrolyzates in this process. // Eur. Pat. Appl. EP N 834573. 8 Apr. 1998.
29. Ленинджер А. Биохимия. – М.: Мир, 1976. – 957 с.
30. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. – М.: Аграрная наука, 2000. – 295 с.
31. Файвишевский М.Л., Либерман С.Г. Производство животных кормов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 307 с.
32. Dyula D., Shandor L. Способ получения кормовых средств из протеинсодержащих отходов переработки животного сырья. // Патент СССР № 1028236. Опубл. 07.07.1983.
33. Линд Р.М., Гмошинский И.В., Зорин С.Н., Линд А.Р. Характеристика белкового состава и антигенности молочной сыворотки, подвергнутой ферментативному гидролизу. // Вопросы питания. – 1996. – N 3. – С. 20–23.

34. Гальперин Ю.М. Парезы, параличи и функциональная непроходимость кишечника. – М.: Медицина, 1975. – 219 с.
35. Martinez S.B., Leary H.L., Nichols D.J. Milk protein partial hydrolysate and infant formula containing same. // Патент США N 5405637. – 1995.
36. Schmidl M.K., Taylor S.L., Nordlee J.A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. // Food Technol. – 1994. – V. 48. – N 10. – P. 77–80, 85.
37. Артюхин В.И., Шепелин А.П., Киселева В.Н. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред: Производство и применение продуктов микробиологических производств. // Обзорная информация ВНИИСЭНТИ Минмедпрома СССР. – 1990. – Вып. 9–10. – 52 с.
38. Куприна Е.Э., Водолажская С.В., Няникова Г.Г. Исследование процессов деструкции и гидролиза белков при их экстрагировании электрохимическим способом. // Журнал прикладной химии. – 2003. – Т.76. – N 9–10. – с.663–666.
39. Маслова Г.В., Егорова Е.С., Прокошенков А.А., Василевский П.Б. Способ получения белкового гидролизата из гидробионтов. // А.с. СССР № 1687213. Оpubл. 30.10.91.
40. Мухин В.А., Новиков В.Ю. Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. – Мурманск: Изд-во ПИПРО, 2001. – 97 с.
41. Неклюдов А.Д., Иванкин А.В., Бердугина А.В. Свойства и применение белковых гидролизатов. // Приклад. биохимия и микробиология. – 2000. – Т.36. – № 5. – С. 525–534.
42. Няникова Г.Г., Куприна Е.Н., Водолажская С.В. Белковые гидролизаты, полученные из ракообразных электрохимическим способом, как основа микробиологических питательных сред. // Приклад. биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39. – N 4. – С. 489–492.
43. Batista I., Nunes M.L. Preparatio of enzymic hydrolyzates from fish wastes. // Dev. Food Sci. – 1997. – V. 38 (Seafoods from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality). P. 59–70.
44. Hyun Ch.-K., Shin H.K. Utilization of animal blood proteins as nitrogen sources for the cultivation of lactic acid bacteria. // Sanop Misaengmul Nakhoechi. – 1997. – V. 25. – N2. – P. 218–223.
45. Любич Ф.Д., Лавченко Е.Т., Чудинова А.Д. и др. Биологическая оценка качества питательных сред, приготовленных из отходов производства. // В сб.: Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. / Тез. докл. II Всесоюзной конференции. – М., 1981. – С. 130–131.
46. Lyons T.P. Proteinases in industry. // Crit.Rev.Biotechnol. – 1988. – V. 8. – N 2. – 1988. – P. 99–110.
47. Bournier E. Способ обработки отходов. // Патент Франции № 2412263. Оpubл. 20.07.1979.
48. Остапец Н.Г. Качество кормового белкового концентрата, получаемого из кератинсодержащего сырья. // Мясная индустрия СССР. – 1981. – № 8. – С. 33–38.
49. Папков Н.Ф., Комлев А.П., Чеховский А.А. и др. Способ изготовления белковой колбасной оболочки. // А.С. СССР № 686710. Оpubл. 25. 09.1979.
50. Hamelton C.S. Производство пенообразователя из кератинсодержащего сырья. // Патент США № 298848. Оpubл. 20.05.1884.
51. Горяев М.И., Быкова Л.Н. и др. Способ получения пептона из кератинсодержащего сырья. // Патент СССР № 2808824128-13. Оpubл. 15.05.1981.
52. Раскин Б.М., Гриднева Н.И., Исаева З.А. и др. Разработка и производство препаратов медицинской биотехнологии. // ЖМЭИ. – 1990. – № 5. – С. 25–32.

53. Максименко А.В., Надирашвили Л.А., Абрамова В.В., Еркомашвили Г.С. и др. // Биотехнология. – 1990. – № 6. – С. 29–32.
54. Docken I. M. Способ переработки измельченных отходов мяса птицы для получения корма и продуктов питания. // Патент ФРГ № 1208168. Оpubл. 30.12.1965.
55. Богдановская В.А., Тарасевич М.Р., Крылов И.А., Манаков М.Н. Способ извлечения драгоценных металлов. // Патент РФ № 2115751. Оpubл. 20.07.98.
56. Крылова В. Б., Попов В. П. Способ получения белкового гидролизата из кератин-содержащего сырья (к.р.с.) //А. с. 1161064 СССР. МКИ А23 1/10. Оpubл. 15.06.85.// Бюл. № 9. – С. 14.
57. Елизарова Е.П., Ходжакушев Б.Г., Заволовская Л.И., Черногубова Е.П. Фармакинетика таурина. – 1995. – № 4. – С. 69–70.
58. Кахновский И.М., Королева Т.В., Захаренко В.Н., Ларионов С.М.. Таурин в лечении сахарного диабета. // Клиническая фармакология и терапия. – 1997. – № 6. – С. 3.
59. Сапронов Н.С., Самойленко А.В., Торкунов П.А., Юров А.Ю. Применение таурина в медицине. // Российский физиологический журнал. – 1998. – Т.84. – № 1 – 2. – С. 39–44.
60. Орлова Ц.Р., Елизарова Е.П., Рыфор И.М., Фетисова Н.И., Митькина Л.И. Использование таурина для лечения застойной сердечной недостаточности. //Кардиология. – 1991. – № 6. – С. 77– 80.
61. Заволовская Л.И., Елизарова Е.П., Орлов В.А. Клиническая эффективность тауфона в комбинированном лечении больных с хронической недостаточностью кровообращения. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1995. – Т. 58. – № 6. – С. 29 – 32.
62. Гуревич В.С. Таурин и функция возбудимых клеток. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1986. – № 5. – С. 44–47.
63. Майстер А. Биохимия аминокислот. – М.: Мир, 1961. – 386 с.
64. Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов. – Под ред. Г.В. Ковалева. – Волгоград: Труды ВГМИ, 1986. – С. 12–15.
65. Marques L.A., Dunford H.B. Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate //J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269. – №22. – P. 7950–7956.
66. Vogt W., Hess D. Oxidants generated by the myeloperoxidase-halide system activate the fifth component of human complement, C5. // Immunobiology. – 1994. – V. 192. – № 1–2. – P. 1 – 9.
67. Schuller-Levis G., Qvinn M.R., Wright C. et all. Taurine protects against oxidant-induced lung injury: possible mechanism(s) of action. // Adv. Exp. Med. Biol. – 1994. – V. 359. – P. 31 – 39.
68. Доценко В.А., Мосийчук Л.В. Нарушение липидного обмена и взаимосвязь с инсулинорезистентностью у больных ожирением.//Материалы VII Всероссийского конгресса «Здоровое питание населения России». – Т. 1. – М., 2003. – С. 165.
69. Красноштанова А.А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности. Дисс...докт. хим.наук. – М.: РХТУ, 2009. – 40 с.
70. Mahmoud M.I., Malone W.T., Cordle C.T. // J. Food Sci. – 1992. – V.57 – N5. – P. 1223–1229.
71. Неклюдов А. Д., Навашин С. М. // Прикл. биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21. – Вып. 1. – С. 3–17.
72. Siemensma A.D., Weijer W.J., Bak H.J. //Trends in Food Sci. – 1991. –N 4. – P. 16–21.

73. Lyons T.P. Proteinases in industry. // *Crit.Rev.Biotechnol.* – 1988. – V. 8. – N 2. – 1988. – P. 99–110.
74. Ju H.P., Okumiya M., Nishizono S., Ki M. et al.// *Food Chem. Toxicol.* – 1997. – V. 35. – N 7. – P. 663–668.
75. Taylor S.L. // *J. Food Protect.* – 1986. – N 49. – P. 239–250.
76. Nielsen P.M.// *Food Sci. Technol. (N.Y.)*. – 1997. – N 80. – P. 443–472.
77. Chobert J.M., Bertrand-Harb C., Dalgarrando M., Nicolas M.G. // *J. Food Biochem.* – 1989. – N 13. – P. 335–352.
78. *Comprehensive biotechnology. The principles of biotechnology. V.2 /Ed. Moo-Young M.* – N.Y.: Pergamon press, 1985. – 670 P.
79. Haque, Z.U., Mozaffar, Z. Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. // *Food hydrocolloids.* – 1992. – N 5. – P. 559–571.
80. Hidalgo J., Gamper E.// *J. Dairy Sci.* – 1977. – N 60. – P. 1515–1518.
81. Hagi T., Hatta H., Kobayashi M. et al. // *Pat. Japan.* – 1997. – N 09-107886.
82. Mahmoud M.I. // *Food Technol.* – 1994. – V. 48. – N 10. – P. 89–95.
83. Agboola S.O., Dalgleish D.G. // *J. Agr. Food Chem.* – 1996. – V. 44. – N 11. – P. 3631–3636.
84. Agboola S.O., Dalgleish D.G.// *J. Agr. and Food Chem.* – 1996. – V. 44. – N 11. – P. 3637–3642.
85. Caessens P.W., Gruppen H., Visser S., van Aken G.A., Voragen A.G.J. Plasmin Hydrolysis of β -Casein: Foaming and Emulsifying Properties of the Fractionated Hydrolyzate. // *J. Agr. and Food Chem.* – 1997. – V. 45. – N 8. – P. 2935–2941.
86. Agboola, S.O.; Singh, H.; Munro, P.A.; Dalgleish, D.G.; Singh, A.M. Destabilization of Oil-in-Water Emulsions Formed Using Highly Hydrolyzed Whey Proteins.// *J. Agr. and Food Chem.* – 1998. – V. 46. – N 1. – P. 84–90.
87. Szpendowski, J. Hydrophobicity of milk proteins and their functional properties. // *Przem. Spozyw.* – 1997. – V. 51. – N 8. – P. 16–18, 31.
88. Kotani S., Ageta A. Stable isothiocyanate emulsion compositions for food additives. // *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 09308454 [97 308454] (Cl. A23L1/22).* – 2 Dec. 1997.
89. Diniz F.M.; Martin A.M. Effects of extent of enzymic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolyzate.// *Food Sci. Technol.* – 1997. – V. 30. – N 3. – P. 266–272.
90. Mangino, M.E., Kim, J.H., Dunkerly, J.A., Zadow, J.G. Factors important to the gelation of whey protein concentrates.// *Food hydrocolloids.* – 1987. – N1. – P. 277–282.
91. Berthelsen. J.H., Frokjaer S., Saltin B. Additive for use in any energy supplementation and use of a protein hydrolyzate for the preparation of energy supplementation. // *PCT Int. Appl. WO 97 39,641 (Cl. A23L2/66).* 30 Oct. 1997.
92. Haque Z.U., Casay G.A., Wilson W.W., Antila P., Antila V. Effect of casein hydrolysates on association properties of milk proteins as seen by dynamic light scattering. // *J. Agr. and Food Chem.* – 1993. – V. 41. – N 3. – P. 203–207.
93. Xu Yonghong. Control of bitter taste of enzymic hydrolyzates of proteins. // *Shipin Gongye Keji.* – 1997. – N 3. – P. 1–3.
94. Aubes-Dufau I., Combes D. Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolyzates.// *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1997. – 67. N1–2. – P. 127–138.
95. Pedersen B. Removing bitterness from protein hydrolysates. // *Food Technol.* – 1994. – V. 48. – N 10. – P. 96–98.
96. Неклюдов А.Д., Цибанов В.В., Купов Х.А., Беликов В.М. Получение аминокислотных смесей из дрожжевых автолизатов. Исследование процесса очистки дрожжевого автолизата на различных сорбентах.// *Хим.-фарм. ж.* – 1983. – N 11. – С. 1348–1352.

97. Lalasidis, G., Sjoberg, L.B. Two new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with exceptionally high content of essential amino acids. //J. Agr. and Food Chem. – 1978. – V. 32. – P. 709–723.
98. Helbi N.B., Ho L., Chirsty G.E., Nakai S. Debittering of skim milk hydrolysates by adsorption for incorporation into acidic beverages. //J. Food Sci.–1980.– V.45.– P.331–335.
99. Roland, J.F., Mattis, D.L., Kiang, S. Hydrophobic chromatography: Debittering protein hydrolysates.// J. Food Sci. – 1978. – V. 43. – P. 1491–1493.
100. van Leeuwen, H.J. Removal of a bitter peptide form tryptic hydrolysates of casein coprecipitate by immunoabsorbent affinity chromatography. //Agric. Biol. Chem. – 1978. – V. 42. – P.1375–1378.
101. Lin S.B., Nelles L.P., Cordle Ch.T., Thomas R.L. Debittering casein hydrolysates with octadecyl-siloxane columns. //J. Food Sci. – 1997. – V.62. – N 4. – P. 665–670.
102. Chakrabarti R. A method of debittering fish protein hydrolysate. //J. Food Sci. Technol. – 1983.– V. 20. – P. 154–156.
103. Tokita F. Enzymatische und nicht enzymatische Ausschaltung des Bittergeschmacks bei enzymatischen Eiweisshydrolysaten.// Z. Lebensm.Untersuch. Forsch. – 2008. – B.4. – S. 351–355.
104. Tamura M., Mori N., Miyoshi T., Koyama S., Kohri H., Okai H. Practical debittering using model peptides and related compounds//Agric. Biol. Chem. –1990. – V.54. – P.41–51.
105. Fujimaki M., Yamashita M., Arai S., Kato H. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. Part 1. Enzymatic proteolysis and plastein synthesis application for preparing bland protein-like substances. //Agric. Biol. Chem. – 1970. – V. 34. – P. 1325–1332.
106. Clegg K.M., Lim C.L., Manson W. The structure of a bitter peptide derived from casein by digestion with papain. //J. Dairy Res. – 1974. – V. 41. – P. 283–287.
107. Umetsu H., Matsuoka H., Ichishima E. Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxy peptidase// J. Agric. Food Chem. – 1983. –V.31. – P.50–53.
108. Slattery H., Fitzgerald R.J. Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a Bacillus proteinase.// J. Food Sci. – 1998. – V. 63. – N 3. – P. 418–422.
109. Aubes-Dufau I.; Combes D. Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolysates.// Appl. Biochem. Biotechnol. – 1997. – V. 67. – N 1–2. – P. 127–138.

Глава 2

Химические основы гидролиза белковых макромолекул

Белки – важнейшие органические соединения, входящие в состав всех известных живых организмов, а также продуктов их технической переработки. Составляя основу цитоплазмы клеток и также входя в состав многих структурообразующих веществ, например костей и соединительной ткани, белки выполняют основную роль в жизнедеятельности живых организмов.

Белковый состав является одним из важнейших медицинских показателей организма человека, а также неотъемлемой характеристикой пищевых композиций, продуктов питания человека и сельскохозяйственных кормов [1].

Белки не являются индивидуальными химическими соединениями. Употребляя термин «общий белок», «содержание белка» или просто «белок» подразумевается, что речь идет о сумме всех белков (различного строения полипептидной цепи на уровне составляющих аминокислот и молекулярной массы), входящих в данный объект [2 – 7].

Общее содержание белка в анализируемом образце можно определить по методу Йенике-Кьельдаля (методика 2.1) [7, 11].

Методика 2.1. Определение содержания общего белка по данным элементного анализа определения азота. Метод Йенике-Кьельдаля. Метод удобен для определения белка в нерастворимых биологических объектах, например в клеточной биомассе или продуктах животного или рыбного происхождения. Принимается, что в белках содержится в среднем 16 % азота. Найденное по Кьельдалю количество азота умножают на 6,25, чтобы определить количество белка в растворе с последующим пересчетом на массу взятого образца.

РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ: 1. Стандартный раствор аммония сульфата, содержащий 6 мкг азота в 1 мл. 2. Фенольный реактив. Для получения комплекса 1 мл 85 %-ного раствора фенола смешивают с 2,5 мл 0,2 %-ного раствора нитропруссид натрия и 36,5 мл воды. 3. Щелочной раствор гипохлорита: 0,02 М NaClO в 2,5 М растворе NaOH. 4. 57 %-ный раствор HClO₄.

ОБОРУДОВАНИЕ: Термошкаф (210 °С), спектрофотометр с кюветами, пробирки, бюретки с реактивами.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ. 1. Для построения калибровочного графика в 5 пробирок вносят 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 мл стандартного раствора аммония сульфата с известной концентрацией азота, равной 6 мкгN/мл и доводят общий объем раствора в каждой пробирке водой до 1 мл. В 6-ю пробирку вносят 1 мл воды (холостая проба). Во все пробирки добавляют по 0,1 мл 57 %-ного раствора HClO₄, 1 мл фенольного реактива и 0,4 мл щелочного раствора гипохлорита. Выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре и измеряют поглощение при 580 нм или при зеленом (оранжевом) светофильтре на фотоколориметре.

2. Величины оптической плотности (D) откладывают на оси ординат, а значения концентрации азота (C, мкг/мл) – по оси абсцисс и получают калибровочный график зависимости оптической плотности от содержания азота.

3. К 0,1 мл раствора белка, содержащего примерно 0,5 мг/мл, прибавляют 0,1 мл 57 %-ного HClO₄, пробирку прикрывают неплотно стеклянной пробкой и ставят на минерализацию, выдерживая пробу в течение 20 мин при температуре 210 °С в термошкафу, затем пробу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 1 мл воды, 1 мл фенольного реактива, 0,4 мл щелочного раствора гипохлорита, смесь выдерживают в течение 20 мин и измеряют поглощение при

580 нм. По калибровочному графику находят количество азота в исследуемом растворе. Найденное количество азота умножают на 6,25, чтобы определить количество белка в растворе, мкг/мл. Зная общую массовую концентрацию растворенного вещества, рассчитывают массовое содержание белка в образце в процентах.

В табл. 2.1 приведено среднее содержание белковых веществ (белка) в объектах различного происхождения.

Таблица 2.1

Основной химический состав объектов различного происхождения

Наименование	Белок, %	Вода, %	Минеральные соли, %
Говядина	18–22	66–76	0,9–1,2
Свинина	14–21	40–65	0,4–1,1
Баранина	15–17	58–65	0,8–1,0
Птица	15–23	55–75	0,9–1,1
Яйцо птицы	12–13	73–74	1–1,1
Волос	80	8–10	0,8–1,5
Перо птиц	85	5–8	1–2
Рога и копыта к.р.с.	77–90	5–9	1–2
Кость животная	15–25	15–40	37–54
Микроорганизмы			
<i>E. coli</i>	14–15	69–72	0,5–0,8
<i>Sach. Sereviciae</i>	12–14	70–72	0,5–0,7
Животная кровь	18	75–80	0,4–0,6
Овощи	1–2	75–92	0,5–1,5
Фрукты	0,5–1,2	85–90	0,3–1
Рыба	14–21	70–82	0,9–1,6
Зерно	10–11,5	13,5–14	1,5–3
Бобовые	22–35	12–14	2–3
Мед	1	18–20	0,3–0,5
Молоко коровье	1–6	80–88	0,4–1
Желатин пищевой	85–88	10	1,5–2

Средний уровень потребления белка независимо от научно установленных норм сильно различается по факту в зависимости от уровня развития конкретной страны (табл. 2.2) и составляет 90 – 120 г/сутки (в том числе 55 – 75 % животный протеин) для населения США и Западной Европы, 50 – 100 г/сутки для России и среднеразвитых стран.

Таблица 2.2

Суточная потребность человека в белке в период активного роста (г/сут) [8]

Возраст	Общий белок	Животный белок
До года	35	30
до 10 лет	50 – 80	35 – 45
до 18 лет	80 – 100	50 – 60

Белки, содержащиеся в различных объектах, проявляют различные свойства. Эти свойства можно рассматривать с двух точек зрения.

Во-первых, биофизические и физико-химические свойства белков, определяющие физическую форму, механическую прочность, цветность, а также питательную ценность белоксодержащих веществ.

Во-вторых, доступность белка с точки зрения возможности его использования, выделения из образца для последующего количественного анализа, а также его доступность в сочетании с аминокислотным составом для процесса переваривания, то есть проявления питательных свойств.

Химической основой гидролиза белка является гидролитический распад пептидных связей под воздействием кислот (H^+) или оснований (OH^-) с образованием сначала олигопептидов, затем коротких пептидов и окончательно аминокислот [7, 10, 11].

Гидролиз белковых молекул на первом этапе приводит к образованию небольших белковых фрагментов, что сказывается на молекулярно-массовом распределении, которое обычно оценивают методом электрофореза в полиакриламидном геле (методика 2.2) [10, 11].

Методика 2.2. Электрофоретическое изучение фракционного состава белков в полиакриламидном (18 %-ом) геле.

Белки и полипептиды имеют разную молекулярную массу. Полипептиды соответствуют по классификации олигомерам с молекулярной массой $(1-10) \cdot 10^3$, белки имеют, как правило, большую молекулярную массу. Такого условного разделения придерживаются не всегда, особенно для веществ с молекулярной массой в несколько тысяч и пользуются общим наименованием "белки". Для белков часто пользуются единицей измерения молекулярной массой в 1 Дальтон (Да). Например, для основного белка крови альбумина молекулярная масса равна 69103 или 69 кДа, инсулина – 6000 или 6 кДа.

Получить белок в индивидуальном виде, соответствующем его химической формуле, очень сложно. Любой товарный образец белка содержит, как правило, 5–10 % влаги и примеси других белков с разными молекулярными массами. Технические белки могут содержать в виде примесей соли (хлорид натрия, сульфат аммония) и другие вещества, например липидной или полисахаридной структуры. Состав примесей определяется условиями получения и очистки белка.

Для изучения молекулярно-массового распределения часто используют электрофоретический метод [12]. Химическая структура любого белка представляет собой полимерную цепь (R) с боковыми функциональными группами, в качестве которых чаще всего выступают карбоксильные $-COOH$ и амино $-NH_2$ группы (т.е. белки являются полиамфолитами). В растворе эти ионогенные группы диссоциируют и, в зависимости от pH, молекула белка имеет отрицательный заряд ($R-COOH \rightarrow R-COO^-$) или положительный заряд ($R-NH_2 \rightarrow R-N^+H_3$).

При наложении электрического поля под действием постоянного тока молекулы белка будут двигаться к катоду (–), если они заряжены положительно, и к аноду (+), если они заряжены отрицательно. Разные по молекулярной массе (и заряду) белки будут двигаться с разной скоростью. Движение больших белков будет происходить медленнее, чем маленьких, которые за одинаковое время "пройдут" большее расстояние к электроду. Если осуществлять такое движение в вязком растворе полимера (геле), то после определенного времени молекулы белка оказываются разделенными по молекулярной массе или по заряду и могут быть зафиксированы в таком состоянии после высушивания геля. Если гель прокрасить красителем, который не окрашивает гелеобразующий полимер, а прокрашивает полосы белков, то можно получить картинку молекулярно-массового распределения данного белка. Эта картинка называется электрофореграммой. При использовании специальных фотоэлектрических денситометров можно провести процесс сканирования геля – количественно, в процентах, измерить какова доля каждой белковой фракции в данном образце белка. Считается, что хорошо очищенные белки содержат до 98–99 % монофракции белка.

Предел обнаружения составляет 0,5–2 мкг в зависимости от условий обработки и природы анализируемого белка. Наилучшим образом в 18 %-ном полиакриламидном геле разделяются белки с ММ от 5 до 200 кДа [10–13].

ОБОРУДОВАНИЕ. Лабораторный прибор для проведения вертикального электрофореза, включающий источник постоянного тока на 600 В и электрофоретическую стеклянную или пластмассовую камеру. Денситометр для сканирования гелей или хроматограмм. Микрошприц на 100 мкл. Стаканы, пипетки, стеклянные бутылки для растворов. **РЕАКТИВЫ:** 1. N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД). 2. Акриламид (АА), х.ч. 3. N,N'-метиленбисакриламид (МБА), х.ч. 4. 2-амино-2(гидрокси метил)-1,3-пропандиол (ТРИС), х.ч. 5. Натрия додецилсульфат (СДС), х.ч. 6. Аммония персульфат (АПС), х.ч. 7. Краситель кумасси R-250, Serva (ФРГ). 8. Кислота соляная, х.ч. 9. Кислота уксусная ледяная, х.ч. 10. Глицин, х.ч. 11. 2-Меркаптоэтанол. 12. Спирт этиловый. 13. Краситель бромфенолблау, Serva (ФРГ). 14. Глицерин. 15. Стандартные маркерные белки с молекулярной массой от 6 до 80 кДа.

ПРОВЕДЕНИЕ РАБОТЫ. 1. До начала проведения работы необходимо ознакомиться с инструкцией (паспортом) по работе с лабораторным прибором для электрофореза.

2. Готовят растворы: А – раствор 30 г акриламида (АА), 0,15 г N,N'-метиленбисакриламида (МБА) и воды до 100 мл, В – раствор 18,2 г 2-амино-2(гидрокси метил)-1,3-пропандиола, 0,4 г додецилсульфата натрия (СДС), конц. HCl до pH 8,8, воды до 100 мл, С – раствор 9,1 триса, 0,4 СДС, конц. HCl до pH 6,8, воды до 100 мл, D – 10 % водный раствор

аммония персульфата (АПС), E – раствор 30 г АА, 0,8 МБА и воды до 100 мл. Электродный буфер – разбавленный водой 1:4 концентрат состава: 24 г трис, 115 г глицина, 40 мл 20 % раствора СДС, воды до 2000 мл. Окрашивающий раствор для геля – 11 г кумасси R-250, 2 л этанола, 0,5 л уксусной кислоты, воды 2 л. Обесцвечивающий раствор – 0,5 л этанола, 0,35 л уксусной кислоты и 2 л воды. Буфер для растворения белковых проб – 0,4 мл 2-мер-каптоэтанола, 0,8 мл 20 % водного раствора СДС, 0,4 мл 1 М трис буфера рН 6,8, 0,8 мл 0,05 % раствора бромфенолблау, 5 мл воды и 5 мл глицерина. Растворы хранят в холодильнике при температуре + 4 °С в течение 1 месяца.

3. В соответствии с инструкцией собирают камеру для плоского электрофореза. Для этого две стеклянные пластинки крепят вертикально в пластмассовую рамку с трубчатыми прокладками, образуя пространство для заливки геля 115×115×1 мм.

4. Готовят растворы для получения полимерного геля:

Состав для нижнего сепарирующего геля (мл): 18,0 А + 7,5 В + 4,3 воды + 0,01 ТЕМЕД + 0,2 D. Состав для верхнего формирующего геля: 1,3 E + 2,5 C + 6,2 воды + 0,01 ТЕМЕД + 0,1 D. Растворы используют немедленно после приготовления.

Заливают в камеру (в количестве примерно 3/4 объема камеры) состав для нижнего сепарирующего геля и выдерживают камеру вертикально в течение 2 ч при комнатной температуре для завершения процесса полимеризации. В полученном полимерном слое геля будет происходить основное разделение белков.

Заливают в камеру на поверхность полученного геля до верхних краев стеклянных пластинок состав для верхнего формирующего геля, вставляют в раствор специальную гребенку для формирования в геле углублений, в которые будут наноситься анализируемые образцы, и проводят повторно полимеризацию в аналогичных условиях.

5. Собирают в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибор для проведения электрофореза. Для этого камеру с гелем освобождают от нижнего шнура (для сообщения геля с электродным раствором), зажимают ее винтами в ванне прибора, помещают электроды и заливают во все отсеки электродный буфер так, чтобы буферный раствор покрывал верхний край камеры с гелем.

6. Для подготовки проб навески белка растворяют в буфере для растворения проб, нагревая при необходимости 5–100 мкг белка в 1 мл буфера при температуре 90–100 °С в течение 5 мин.

7. На дно углублений верхнего геля микрошприцем осторожно вносят по 5–30 мкл анализируемой пробы (1–50 мкг белка). Введение проб осуществляют медленно, так, чтобы вводимый раствор белка не всплывал со дна углублений. Для этого в состав буфера для растворения проб входит глицерин, утяжеляющий вводимый раствор.

8. Включают электрический ток и проводят процесс при плотности постоянного тока $2,5 \text{ мА/см}^2$ геля в течение 1–2 часов.

Время процесса зависит от состояния геля (насколько свежими были использованные растворы), а также от расстояния, на которое необходимо продвинуть белки.

В ходе электрофореза окрашенные в фиолетовый цвет полосы белков сначала собираются на дне углублений верхнего геля, затем быстро продвигаются в верхнем геле вниз. Происходит формирование молекул белка под воздействием тока (движение) и распрямление белковых глобул в присутствии СДС – вещества, способствующего разворачиванию молекул белка (добавление 1,5 г СДС на 1 г белка вызывает его полную денатурацию).

В зависимости от pH раствора окраска полос может меняться на желтую из-за влияния красителя бромфенолблау.

После прохождения белков через верхний гель полосы собираются на границе двух гелей, входят в нижний сепарирующий гель и происходит разделение белка на его составные части (фракции).

Путь, который проходит каждая полоса R_f , прямо пропорционален молекулярной массе белковой фракции.

9. После завершения процесса, то есть когда нижние низкомолекулярные белковые фракции оказываются примерно в 1 см от нижнего края геля, прибор выключают, электродный буфер сливают, камеру разбирают и извлекают гель на поверхность стекла. Отделенный гель переносят в окрашивающий раствор и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. Обесцвечивание геля проводят в обесцвечивающем растворе в течение 1–24 часов.

В результате получают полиакриламидный гель, в котором видны окрашенные в синий цвет полосы фракций белка. Соотнесение этих полос с полосами маркерных белков позволяет сделать заключение о составе исходного белка и молекулярной массе каждой фракции.

Денситометрирование белковых полос позволяет провести количественную оценку состава белка в процентах. Анализ полос можно выполнить без денситометра, приблизительно оценивая ширину и толщину данной полосы по отношению к размерам стандартных полос. Принимается, что при одинаковом содержании белка, окрашенные полосы стандарта и анализируемой пробы одинаковы. При различии в содержании белка в два раза полосы имеют толщину, различающуюся примерно в два раза.

В качестве стандартных маркерных белков, позволяющих анализировать фракционный состав растворенных белков с молекулярной массой от 6 до 80 кДа используют чистые белки с известными молекулярными

массами: инсулин 6 кДа, проинсулин 8,6 кДа, цитохром 12,5 кДа, овальбумин 45 кДа, альбумин 69 кДа, трансферин 80 кДа.

На рис. 2.1 дана в качестве примера структура белкового фрагмента, аминокислотная последовательность которого совпадает со структурой проинсулина человека [10].

Полный гидролиз такой молекулярной последовательности приведет к образованию свободных аминокислот, остатки которых приведены на схеме рис. 2.1.

Контроль протекания процесса химической деградации до свободных аминокислот проще всего осуществлять методом формольного титрования (методика 2.3) [2, 11].

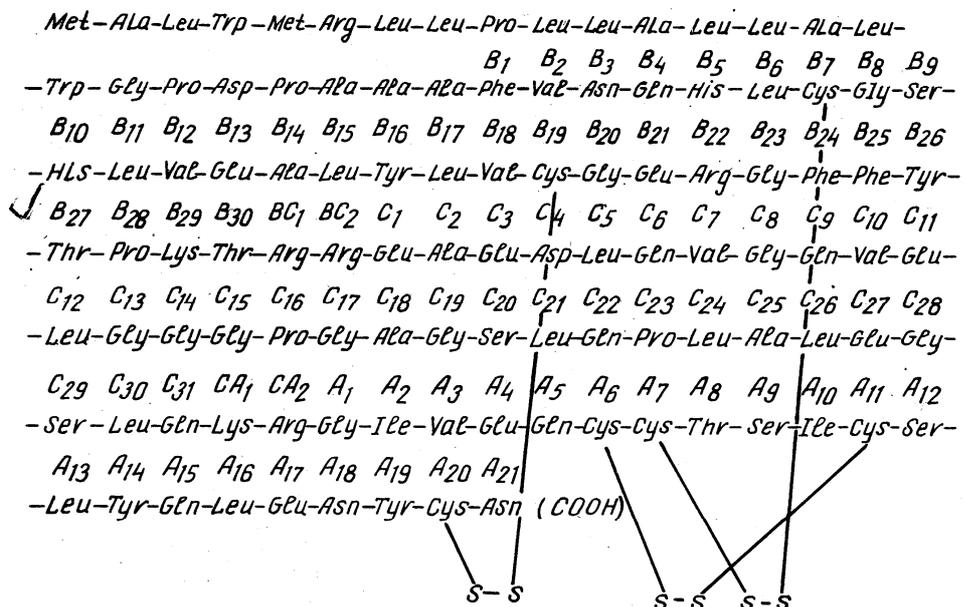
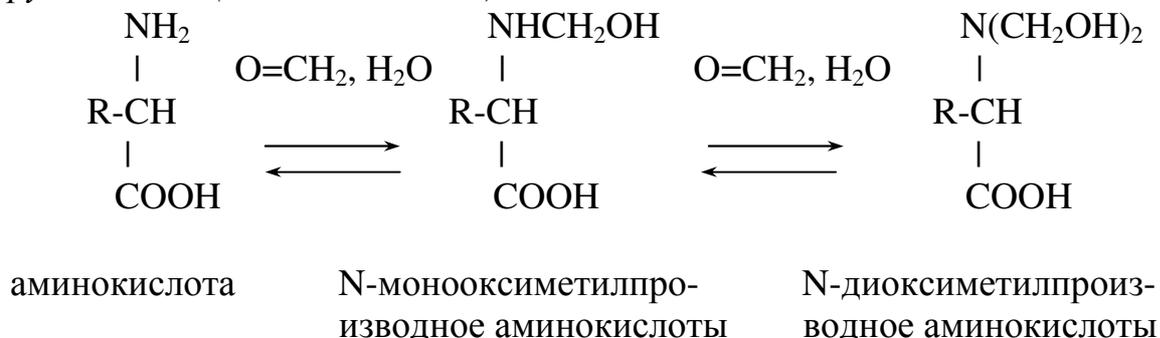


Рис. 2.1. Полная аминокислотная последовательность B₁-A₂₁ проинсулина человека с присоединенным лидерным пептидом Met...Leu [10]

Методика 2.3. Определение содержания азота свободных аминогрупп в белке (аминного азота).



При биохимических исследованиях возникает необходимость определять количество азота свободных аминогрупп, содержащихся в белках, пептидах или их гидролизатах. Такое определение может быть осуществ-

влено методом формольного потенциометрического титрования (по Зеренсену - Гаврилову) продуктов гидролитического распада белков.

В процессе гидролиза белка при расщеплении пептидных (амидных) связей $-NH-CO-$ образуются свободные amino- и карбоксильные группы.

Метод формольного титрования основан на блокировании формальдегидом в нейтральной среде свободных аминогрупп с последующим титрованием карбоксильных групп щелочью. Количество свободных карбоксильных групп эквивалентно количеству свободных аминогрупп.

ОБОРУДОВАНИЕ. Лабораторный рН-метр с бюреткой вместимостью 50 мл. Химические стаканы и пипетки. **РЕАКТИВЫ:** 1. 37 %-ный раствор формалина. 2. Гидроксид натрия хч, 0,2 М, 0,1 М, 0,05 М водные растворы NaOH. 3. Растворы H_2SO_4 : 0,2 н., 0,1 н., 0,05 н. 4. Гидролизат белка или питательная среда. 5. 1 % раствор фенолфталеина.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ. В химический стакан вносят точно 1 мл анализируемого препарата (питательной среды или гидролизата), затем приливают 10 мл воды. Доводят рН раствора до значения рН 7 потенциометрически, по рН-метру, используя для этого 0,05 М, 0,1 М, 0,2 М растворы гидроксида натрия и серной кислоты (концентрация растворов определяется наличием карбоксильных групп).

В отдельной емкости нейтрализуют примерно 20 мл 37 %-ного формалина потенциометрически до значения рН 7. Для нейтрализации используют те же растворы NaOH и H_2SO_4 .

В химический стакан с препаратом опускают электроды рН-метра, приливают 6 мл свеженейтрализованного формалина. Значение рН при этом сдвигается в кислую сторону из-за освобождения карбоксильных $-COOH$ групп после взаимодействия формалина с аминогруппами. Не вынимая электроды из стакана, пробу титруют 0,1 М раствором NaOH при перемешивании до значения рН 9,1.

Параллельно проводят контрольный опыт, где вместо препарата берут 1 мл воды (холостая проба). Титруют потенциометрически.

Содержание аминного азота X (в граммах аминного азота на 100 мл раствора препарата) рассчитывают по формуле: $X = [(A - B) K 1,4 100] / Y$, где A – количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование пробы, мл; B – количество 0,1 М раствора NaOH, пошедшего на титрование контроля (холостой пробы), мл; K – поправка к титру 0,1 М раствора NaOH ($K = 1$ при использовании точно титрованного 0,1 М раствора NaOH); 1,4 – количество азота (в мг), эквивалентное точно 1 мл пробы; Y – объем пробы, взятой на определение, мл; 100 – пересчет на 100 мл пробы.

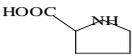
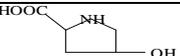
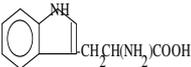
Для оценки содержания свободных аминогрупп в пептидно-аминокислотных объектах, выраженное в процентах, определение азота свободных аминогрупп можно проводить следующим образом. 1 мл анали-

Исходя из химической схемы, в результате полного гидролитического расщепления теоретический выход свободных аминокислот из 100 г белка составляет около 118 г [13].

Состав аминокислот обычно определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием аминокислотного анализатора – автоматического хроматографа, настроенного на определение содержания индивидуальных аминокислот в смеси [11, 13, 14]. Список важнейших аминокислот, встречающихся в природных объектах приведен в табл. 2.3.

Таблица 2.3

Наиболее распространенные α -аминокислоты

Русское и англ. наименование (+ заменимые, – незаменимые аминокислоты)		Символ		Структурная формула	ММ	рI	Растворимость, г/100 г			Т _{раз.} , °С
		рус.	англ.				в воде при 20 °С	в воде при 100 °С	в этаноле при 20 °С	
Алифатические аминокислоты										
Глицин	Glycine	Гли	Gly	$\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$	75,1	5,97	25	67	0,043	292
Аланин	Alanine	Ала	Ala	$\text{H}_2\text{NCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$	89,1	6,02	16	37	0,16	297
γ -аминомасляная кислота	4-aminobutyric acid	–	GABA	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	103,1	7,0	10	–	–	205
+Валин	Valine	Вал	Val	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	117,2	5,97	8	18	0,57	315
+Лейцин	Leucine	Лей	Leu	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	131,2	5,97	2	5	–	337
+Изолейцин	Iso-leucine	Иле	Ile	$(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CHCH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	131,2	6,02	4	8	–	284
Циклические аминокислоты										
Пролин	Proline	Про	Pro		115,1	6,10	16	23	1,5	222
Оксипролин	Oxyproline	Опр	Opr		131,1	5,78	–	–	–	200
Ароматические аминокислоты										
+Фенилаланин	Phenylalanine	Фен	Phe	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	165,2	5,88	3	10	–	284
+Триптофан	Tryptophane	Трп	Trp		204,6	5,88	1	5	–	282
Тирозин	Tyrosine	Тир	Tyr	$\text{HO}\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	181,2	5,65	0,05	0,5	–	344
Серосодержащие аминокислоты										
+Метионин	Methionine	Мет	Met	$\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	149,2 5,75		3	17	–	285

Продолжение таблицы 2.3

Цистеин	Cystein	Цис	Cys	$\text{SHCH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	121,3	5,02	–	–	–	178
Цистин	Cystin			Cys-S-S-Cys	240,3	5,06	0,01	0,1	–	260
Аминокислоты										
Аспарагиновая кислота	Aspartic acid	Асп	Asp	$\text{HOOCCH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	133,1	2,87	0,5	7	–	270
Аспарагин	Asparagine	Аспн	Asn	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	132,1	5,41	2	55	–	236
Глутаминовая кислота	Glutamic acid	Глу	Glu	$\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	147,1	3,22	1	14	–	249
Глутамин	Glutamine	Глн	Gln	$\text{H}_2\text{N}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_2)_2 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	146,1	5,65	3	–	–	185
Основные аминокислоты										
+Лизин	Lysine	Лиз	Lys	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	146,2	9,74	–	–	–	224
±Аргинин	Arginine	Арг	Arg	$\text{H}_2\text{NC}(=\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_3 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	174,2	10,7	15	–	–	238
±Гистидин	Histidine	Гис	His	 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	155,2	7,58	0,4	–	–	277
Орнитин	Ornithine	Орн	Orn	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	132,1	5,5	13	–	–	197
Гидроксикислоты										
Серин	Serine	Сер	Ser	$\text{HOCH}_2 - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	105,1	5,68	5	32	–	228
+Треонин	Threonine	Тре	Thr	$\text{HOCH}(\text{CH}_3) - \text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$	119,1	6,53	–	–	–	253

При анализе состава белковых смесей на содержание в них аминокислот необходимо помнить, что анализ белка предполагает, как правило, полный кислотный его гидролиз до аминокислот с последующей хроматографической идентификацией (методика 2.4) с целью определения аминокислотного состава белка [11, 14].

Методика 2.4. Аминокислотный анализ белков. Определение содержания свободных и связанных в белке аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием автоматического аминокислотного анализатора

ОБОРУДОВАНИЕ. Анализатор аминокислот LC 3000 с компьютером фирмы «Errendorf-Biotronic» (Германия) или другой прибор подобного класса с автоматическим термостатируемым устройством ввода пробы и баллоном со сжатым He или N₂ квалификации «ОСЧ для хроматографии». Пластиковые пробирки для проб вместимостью 0,5 мл. Устройство в виде фильтра «in line», надеваемого на шприц, или воронка с колбой

для вакуумного фильтрования растворов через фторопластовый фильтр с номинальным размером пор 0,22 мкм производства Millipore (США). Автоматические пипетки на 10–1000 мкл для разбавления проб. рН-метр с точностью определения $\pm 0,001$ единицы рН в интервале рН 1–14. Установка для кислотного гидролиза белков, представляющая собой термостат на 120 °С, в который помещают запаиваемые на газовой горелке стеклянные ампулы или толстостенные пробирки «Pirex» (США) с плотно завинчивающимися тефлоновыми пробками, удерживающими давление паров HCl. Аналитические весы типа «Sartorius» (Германия) с точностью взвешивания $\pm 0,00001$ г. Устройство для заполнения ампул инертным газом, представляющее собой баллон с Ar с редуктором и барбатажной трубкой или то же с устройством для вакуумирования и заполнения аргонном замороженных при –70 °С ампул. Роторный испаритель типа Rotavapor R-144, «Vichi» (Швейцария) с вакуумным насосом для отгонки водных растворов HCl. Центрифуга 8000 G. Измельчитель белковых проб, ступка, стаканы, колбы, пробирки.

РЕАКТИВЫ. Этиловый спирт, хлороформ, соляная кислота 6 М раствор и концентрированная, о-фосфорная кислота, вода бидистиллированная (безаминокислотная для хроматографии), цитрат натрия, тиодигликоль, каприловая кислота, трихлоруксусная кислота, ацетат натрия, метанол, муравьиная кислота, уксусная кислота, борная кислота, этилендиаминтетраацетата динатриевая соль, гидроксид натрия, вода для HPLC, нингидрин, гидридантингидрат, метилцеллозольв. Все реактивы только квалификации «х.ч.», «осч» или «для хроматографии». Стандартный раствор, содержащий по 2,5 мкМоль/мл ASP, THR, GLU, PRO, GLY, ALA, CYS, VAL, MET, ILEU, LEU, TYR, PHE, HIS, LYS и ARG.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА. Анализ содержания аминокислот выполняют на аминокислотном анализаторе типа LC 3000 фирмы "Erpendorf-Biotronic" (Германия). Для разделения аминокислот используют буферную систему в соответствии с нормативной документацией, приложенной к анализатору, рекомендуемый состав компонентов буферных растворов указан в табл. 2.11. рН буферных растворов устанавливают с помощью ортофосфорной кислоты и гидроксида натрия, растворы перед введением в анализатор подвергают фильтрованию через фторопластовый фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Принцип определения аминокислот заключается в следующем. 20 мкл анализируемой пробы помещают в пластиковый сосуд, который устанавливают в поворачивающийся штатив автоматического термостатированного инжектора. Закол пробы осуществляется в соответствии с программой после промывки и регенерации хроматографической колонки, имеющей температуру 47 °С и заполненной ионообменником, катионитом марки ВТХ-С с карбоксильными ионогенными группами в Na⁺-форме. Подача элюента осуществляется по капиллярным шлангам высо-

кого давления с внутренним диаметром 0,2 мм. Разделение аминокислот осуществляется автоматически в соответствии с заданной программой. После разделительной колонки раствор поступает в термостатированный реактор для проведения цветной реакции. Подача в реактор нингидринового раствора, содержащего: 15 г/л нингидрина, 0,55 г/л гидридантингидрата, 1 % метилцеллозоля, 10 % метанола в 0,1М ацетатном буфере рН 4,8, позволяет при температуре реактора 125 °С осуществлять цветную реакцию анализируемых и прошедших аминокислот с нингидрином. Далее окрашенный раствор с комплексом аминокислот с нингидрином подается насосом в УФ детектор. Запись хроматограмм, после введения в хроматограф автосамплером или микрошприцем 20 мкл пробы осуществляют автоматически в соответствии с инструкцией по эксплуатации аминокислотного анализатора. Регистрацию аминокислот, связанных в комплексе с нингидрином, осуществляют автоматически при 570 нм, пролин и оксипролин анализируют соответственно при 440 нм.

Работа анализатора выполняется по программе, предусматривающей ступенчатое изменение вида буфера и температуры хроматографической колонки на каждой стадии. Стандартное время анализа от момента ввода пробы до завершения выхода последнего пика, соответствующего аргинину, составляет 50 минут при скорости подачи элюента 0,22 мл/мин. Основные параметры программы анализа аминокислот приведены в табл. 2.13.

Используемый метод позволяет определять с точностью \pm (5–10) % наличие до 17 аминокислот с минимальным уровнем их содержания в растворе ($0,500 \pm 0,006$) мкмоль/мл. Минимальный интервал надежного определения сигнала аминокислот, составляющий > 200 мВ, получают для концентрации $> 0,3$ мкг/мл взятого на анализ белка в пробе.

Полный аминокислотный состав белков определяют в гидролизате, полученном по стандартной методике обработкой 6 М раствором HCl при температуре 120 °С в течение 24 ч в токе аргона с последующей трехкратной отгонкой летучих компонентов досуха и окончательным растворением пробы в буфере с рН 2,2, содержащем: цитрата натрия 9,8 г, концентрированной HCl 8,3 мл, тиодигликоля 1 мл и каприловой кислоты 50 мкл на литр [31, 33].

Свободные аминокислоты определяют в продукте после его обработки добавлением 10 % об. трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, нейтрализацией до рН 2, фильтрацией через мембранный фильтр типа Миллипор с номинальным диаметром пор 0,22 мкм с последующим разбавлением фильтрата в буфере для растворения проб рН 2,2 [32].

Количественную оценку содержания отдельных аминокислот проводят путем сравнения площадей пиков на аминокислотной хроматограмме, рассчитанных с помощью интегрирующих систем, например Winpeak фирмы "Erpendorf-Biotronic" (Германия) или другой аналогичного уровня, с площадями пиков,

полученных при анализе стандартной смеси аминокислот, содержащей например 2,5 мкмоль каждой аминокислоты в 1 мл стандартного раствора (рис. 2.4).

Содержание аминокислоты (X) в мкМ/мл (или в мг/мл, %, условных машинных единицах или мм по высоте пиков в соответствии с заданной автоматической программой компьютерного обсчета хроматограмм) осуществляют автоматически по формуле: $X = S_1/S_2 \cdot C$, где S_1 – площадь пика определяемой аминокислоты на аминокрограмме; S_2 – площадь пика той же аминокислоты в стандартной смеси; C – концентрация аминокислоты в стандартной смеси, мкМ/мл. Результаты определения рассчитывают до второго десятичного знака, и округляют до первого десятичного знака после запятой.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Точность определения в параллельных опытах по отдельным аминокислотам составляет от ± 10 до ± 20 %, воспроизводимость в независимых определениях составляет от ± 20 до ± 40 %. Для Три, Про, Цис и Мет воспроизводимость в независимых определениях составляет от ± 40 до ± 65 %.

Типичный аминокислотный состав белка животного происхождения может быть записан в (г/100г белка): TAU – 0.2, ASP – 9.2, THR – 3.5, SER – 3.6, GLU – 19.6, PRO – 3.7, GLY – 6.0, ALA – 5.2, CYS – 1.1, VAL – 4.9, MET – 1.9, ILEU – 3.6, LEU – 6.2, TYR – 3.9, PHE – 3.7, HIS – 3.8, OPN – 0.1, LYS – 7.5, ARG – 7.7 (всего 95.4 г/100г белка). Запись в скобках показывает реально получаемую степень гидролиза белка, которая теоретически может составлять до 118 % (масс.) за счет присоединения воды при разрыве пептидных связей [11].

Реальные белковые объекты природного происхождения содержат кроме связанных в белковых макромолекулах аминокислот некоторое количество так называемых свободных аминокислот (методика 2.5). Их количество обычно колеблется от нескольких десятых долей до 1 – 2 %. Этот уровень является фоновым и отражает естественное состояние белкосодержащего объекта. При длительном хранении происходит, как правило, увеличение уровня содержания свободных аминокислот, что свидетельствует о развитии посторонней микрофлоры.

Проведение химического или ферментативного гидролиза приводит к возрастанию доли свободных аминокислот в зависимости от условий осуществления процесса и достигает 99 – 100 % [15, 16].

Методика 2.5. Определение свободных аминокислот. Проводят по модифицированной методике [17]. 5 г образца последовательно растирают в ступке с 50, 25 и 15 мл 96 %-ного этанола, разделяя осадок и надосадочную жидкость на центрифуге (6000 об/мин, 15 мин, $G = 60$). Экстракцию растертого образца повторяют последовательно 80 % и 50 % водным этанолом. Отделенные центрифугированием водно-

спиртовые экстракты от всех экстракций объединяют и подвергают троекратному экстрагированию (1 : 5) хлороформом. Хлороформный слой, содержащий спирт, отбрасывают. Водную вытяжку упаривают в вакууме на роторном испарителе, типа системы Rotavapor R-144, «Vichi» (Швейцария) досуха. К сухому остатку добавляют 60 мл цитратного буфера рН 2,2 для автоматического аминокислотного анализа, который проводят аналогично описанному выше.

Содержание аминокислоты (X) в мкМ/мл (в мг/мл или в % в соответствии с заданной автоматической программой компьютерного об-счета хроматограмм) осуществляют автоматически по формуле: $X = S_1/S_2 \cdot C$, где S_1 – площадь пика определяемой аминокислоты на аминокислотной хроматограмме; S_2 – площадь пика той же аминокислоты в стандартной смеси; C – концентрация аминокислоты в стандартной смеси, мкМ/мл.

Таблица 2.4

Аминокислотный состав различных белковых объектов природного происхождения, г/100 г белка

Аминокислота	Мука рыбная кормо- вая	Мясо- костная (30 %) говяжья смесь	Мясо- костная (30 %) свиная смесь	Альбумин яиц	Мякоть свини- ны	Мякоть говя- дины	Хлеб белый пшеничный
	1	2	3	4	5	6	7
Незамени- мые, в т.ч.	26,58	20,74	29,33	53,9	48,61	50,0	25,77
ИЛЕ	1,94	1,85	3,03	6,9	4,66	4,93	2,69
ЛЕЙ	6,63	4,20	5,64	8,2	8,41	8,57	5,56
ЛИЗ	8,10	4,28	6,48	7,6	10,3	10,65	1,50
МЕТ	0,81	0,30	0,43	4,8	3,21	3,35	0,83
ЦИС	0,27	0,11	0,11	1,9	1,12	1,18	1,85
ФЕН	1,01	2,60	3,20	4,8	4,62	4,55	4,07
ТИР	1,12	1,30	2,25	5,8	3,77	3,98	2,19
ТРЕ	2,63	2,40	3,21	7,0	5,81	5,91	2,35
ТРП	0	0	1,14	2,0	1,24	1,32	1,13
ВАЛ	4,07	3,70	3,84	4,9	5,47	5,56	3,60
Замени- мые, в т.ч.	64,51	62,74	55,17	54,7	46,15	46,2	59,1
АЛА	6,39	7,90	6,08	6,7	3,41	3,63	3,04
АРГ	2,25	6,66	6,61	5,7	7,32	7,80	3,08
АСП	11,47	6,52	7,28	9,3	7,75	7,98	3,48
ГАМА	–	–	–	–	–	–	–
ГИС	1,47	2,57	3,10	2,4	3,32	3,46	2,39
ГЛИ	11,74	15,81	9,47	3,1	3,26	2,24	3,93
ГЛУ	21,81	10,44	13,08	16,5	15,9	16,4	29,25

Продолжение таблицы 2.4

Аминокислота	Кровь к.р.с.	Рога к.р.с.	Копыта к.р.с.	Перо-пуховые отходы кур	Соя	Дрожжи пивные
	8	9	10	11	12	13
Незаменимые, в т.ч.:	46,5	35,28	45,63	36,33	35,9	34,41
ИЛЕ	3,5	3,03	4,70	4,02	4,85	3,62
ЛЕЙ	12,0	5,64	10,02	9,14	6,98	6,64
ЛИЗ	4,1	6,48	4,26	3,20	5,70	5,23
МЕТ	2,2	0,43	0,89	0,98	1,21	0,82
ЦИС	1,6	6,12	6,49	2,38	1,61	0,03
ФЕН	4,7	3,20	1,95	3,71	4,47	4,14
ТИР	4,6	2,25	5,53	1,15	2,89	3,25
ТРЕ	4,7	3,21	4,57	4,64	2,18	4,31
ТРП	1,3	1,08	1,14	1,02	1,25	0,77
ВАЛ	7,8	3,84	6,08	6,09	4,76	5,60
Заменимые, в т.ч.	49,9	55,17	52,32	53,05	55,65	59,97
АЛА	8,9	6,08	3,63	5,31	3,71	6,90
АРГ	5,5	6,61	8,72	3,91	6,53	6,46
АСП	6,0	7,28	7,26	7,22	10,95	9,53
ГАМА	0	0	0	0	0	2,30
ГИС	2,0	3,10	1,11	6,47	2,15	3,49
ГЛИ	5,3	9,47	3,51	6,36	3,76	4,50
ГЛУ	10,2	13,08	14,36	13,25	16,58	14,52

	1	2	3	4	5	6	7
ОРН	–	–	–	–	–	–	–
ПРО	5,89	9,63	6,28	5,1	3,17	3,10	10,04
СЕР	3,49	3,21	3,27	5,9	2,02	1,59	3,89
ИТОГО	91,09	83,48	84,50	108,6	94,76	96,2	84,87
Е/Т*, %	29,1	24,8	31,1	49,5	51,3	51,9	30,4
МЕТ/ИЛЕ	0,40	0,16	0,14	0,70	0,68	0,68	0,31
Протеин, %	42,1	22,70	16,0	12,5	16,8	18,1	9,8

Окончание таблицы 2.4

	8	9	10	11	12	13
ОРН	0	0	0	0	0	3,01
ПРО	4,7	6,28	6,84	4,40	6,08	3,92
СЕР	7,3	3,27	6,89	6,13	5,89	5,34
ИТОГО	96,4	84,44	97,95	89,18	91,56	94,36
Е/Т, %*	48,2	41,8	46,6	40,7	39,2	36,4
МЕТИЛЕ	0,62	0,14	0,19	0,24	0,25	0,22
Массо- вая доля протеи- на, %	18,0	83,4	91,5	85,0	34,5	6,5

*) Е/Т – соотношение заменимых аминокислот к общему количеству содержащихся в белке аминокислот.

На рис. 2.2 приведена стандартная хроматограмма смеси природных аминокислот, которая может использоваться для расчета данных аминокислотного состава реальных объектов природного происхождения, содержащих от 1 до 50 % белка.

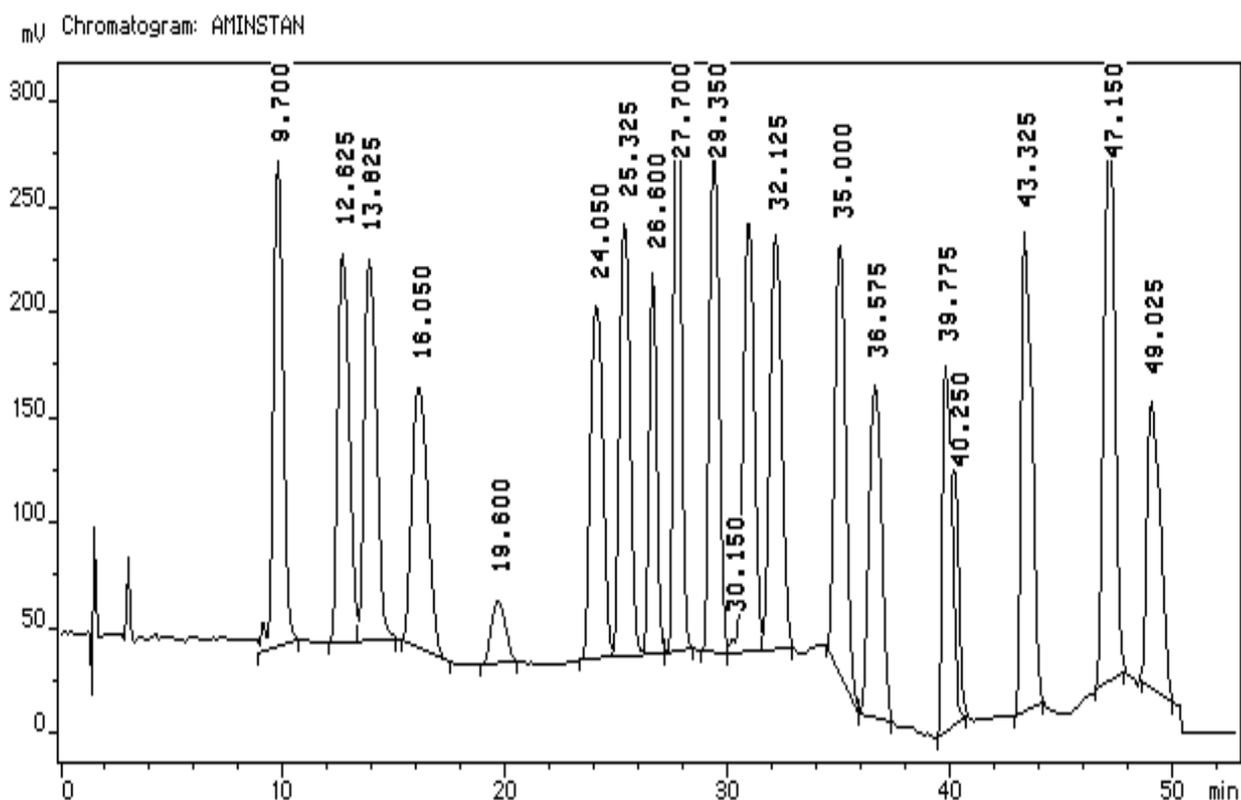


Рис. 2.2. Типичная аминокромограмма стандартной смеси аминокислот

Подходы к описанию механизма гидролиза белков. Одновременно с разработкой способов получения белковых гидролизатов начались попытки создания схем, позволяющих описать ход процесса гидролиза, и тем самым приблизиться к пониманию его механизма.

Одну из первых гипотез о механизме протеолиза предложили еще в 1939 г исследователи Гизелиус и Эриксон-Квенсольт [18].

Они предположили, что ферментативный гидролиз белков проходит по принципу «все или ничего», то есть часть молекул белка гидролизуются сразу до конечных продуктов, а остальные молекулы остаются неизменными. Таким образом, в растворе присутствуют только нерасщепленные молекулы исходного белка и конечные продукты реакции, а промежуточные соединения отсутствуют. Однако попытка описать такую схему с помощью классического уравнения Михаэлиса-Ментен оказалась безуспешна. В начальный момент процесса гидролиза на стационарной фазе величина константы скорости реакции в уравнении имела отрицательное значение. Действительно, как показали дальнейшие исследования [19], в реакционной среде присутствовали не только начальные и конечные продукты, но и промежуточные соединения. В связи с этим было высказано предположение о постепенном гидролизе субстрата до промежуточного, а затем уже до конечных продуктов гидролиза [18, 19, 20]. Наблюдаемый характер процесса зависел от соотношения скоростей отдельных стадий: если исходный белок расщеплялся быстрее, чем промежуточные продукты, то наблюдался постепенный характер процесса гидролиза, если быстрее расщеплялись промежуточные продукты, то их присутствие можно было вообще не заметить, и, в этом случае, процесс выглядел как «взрывной распад белка» сразу же до конечных продуктов, то есть соответствовал гипотезе Гизелиуса и Эриксона-Квенсоля.

В работе [20] анализировались еще два механизма протеолиза: «частичный протеолиз» и «протеолиз с торможением». Сущность «частичного протеолиза» заключается в избирательном отщеплении протеазой от субстрата одного или нескольких пептидных фрагментов, в результате чего остается крупномолекулярный остаток белковой природы. Примером такого процесса является гидролиз яичного альбумина протеазой из *Bac. subtilis*, то есть механизм частичного протеолиза принципиально не отличается от механизма постепенного гидролиза белка.

«Протеолиз с торможением» по сути дела является примером снижения скорости реакции гидролиза за счет ингибирования фермента продуктами гидролиза и наиболее часто встречается на практике. Кинетические кривые протеолиза в этом случае практически не имеют начального прямолинейного участка и скорость гидролиза начинает снижаться с самого начала процесса. Приближение к асимптоте происходит медленно, то есть кривые выходят на квазистационар [21, 22]. При этом, довольно часто на начальном участке кинетические кривые имеют S-образную форму, то есть реакция идет с лаг-периодом [23]. Оба эти обстоятельства осложняют задачу определения начальной скорости гидролиза, а, следовательно, и расчет констант в уравнении Михаэлиса-Ментен. Кроме того, практически нереально измерить убыль субстрата и поэтому контроль процесса прихо-

дится осуществлять по накоплению продуктов реакции. В связи с этим, в работах [24, 25] предложено определение начальных скоростей реакции гидролиза белков пор модифицированному уравнению Михаэлиса – Ментен, которое в конечном итоге сводится к формуле:

$$P = bt + ct^2, \quad (2.1)$$

где: P – концентрация продуктов гидролиза, t – время процесса гидролиза, a и b – эмпирические константы.

Тогда можно записать:

$$dP/dt = b + 2ct. \quad (2.2)$$

В начальный момент реакции $t = 0$, $dP/dt = V_o = b$, то есть коэффициент b равен начальной скорости процесса гидролиза V_o . Этот коэффициент можно легко найти из экспериментальных данных, представленных в координатах $P/t = f(t)$, после экстраполяции прямой на ось ординат. Учитывая, что скорость гидролиза белка в данном случае убывает со временем, можно с определенной степенью приближенности сказать, что в этом случае начальная скорость гидролиза близка к максимальной скорости. Сделав указанные допущения и приняв, что скорость протеолиза уже с начального момента протекает не по псевдонулевому, а по псевдопервому порядку, можно рассчитать эффективные константы в уравнении Михаэлиса–Ментен так, как это сделано в работах [26, 27, 28]. При этом можно рассчитать так называемую «быструю» и «медленную» стадии гидролиза, то есть с определенной степенью приближения объединить все три вышеизложенных возможных механизма гидролиза.

Попытки описания механизма протеолиза в рамках формальной ферментативной кинетики с учетом самых различных типов ингибирования широко практиковались в середине 70-х – начале 80-х годов. Однако, как правило, большинство из предложенных моделей, хотя и позволяют рассчитать кинетические константы, но, как правило, не дают удовлетворительные результаты при использовании индивидуальных ферментов и субстратов с известными молекулярными массами. Среди этих моделей нельзя не отметить работу Беликова В.М. [29], в которой предложен относительно простой метод определения кинетических констант гидролиза казеина панкреатином с учетом ингибирования фермента продуктами реакции по уравнению:

$$t = K_m/V_m[(1+C_\infty-C/K_p) \ln(C_\infty-C_o)/(C_t-C_o) - (C_t-C_o)/K_p], \quad (2.3)$$

где: t – время гидролиза, C_o , C_t , C_∞ – концентрации освобождающихся аминокрупп в начальный момент времени, в момент времени t и при теоретически полном гидролизе соответственно, K_m , V_{max} и K_p – эффективные константы гидролиза.

Вышеприведенные уравнения 2.1, 2.2 и 2.3 во многих случаях позволяют удовлетворительно описать экспериментальные данные даже в случае многокомпонентных субстратов. Однако в отдельных случаях наличие максимума на кривой гидролиза и последующее снижение скорости реак-

ции наблюдалось и в отсутствие ингибирования фермента продуктами гидролиза [19, 30].

В этом случае снижение скорости реакции объясняли тем, что в белке существует большое количество пептидных связей, различающихся по прочности [23], причем вклад скорости гидролиза каждой связи в общую скорость процесса мал. Фактически такое объяснение сводится к тому, что при высокой концентрации белка истинная концентрация каждого субстрата, то есть пептидных связей каждого типа, мала и, следовательно, фермент не насыщен субстратом.

Кроме того, из-за существования в белке большого количества разных по реакционной способности химических связей, высказано предположение, что даже в условиях насыщения фермента субстратом гидролиз каждой из связей происходит с максимальной скоростью, но эти связи гидролизуются в порядке убывания их реакционной способности, что и приводит к снижению наблюдаемой суммарной скорости гидролитической деградации белка [23, 31].

В этом случае гипотеза о наличии быстрой и медленной стадий процесса может с определенной долей вероятности дать сведения об эффективных кинетических константах. В связи с этим необходимо упомянуть работы, описывающие кинетику и механизм получения неполных ферментативных гидролизатов различных белков, пригодных для создания пищевых модулей [28, 32, 33].

Ввиду сложности механизма протеолиза, многокомпонентности белков и ферментных препаратов отдельные исследователи для описания кинетики предлагают вообще отойти от общепризнанного уравнения Михаэлиса-Ментен и пользоваться уравнениями обычной классической кинетики, позволяющими без особой сложности получать положительные значения констант реакции [34].

Таким образом, подводя итог вышесказанному, можно прийти к заключению о чрезвычайной сложности механизма протеолиза и относительности знаний в этой области исследований.

Список литературы

1. Справочник лабораторных и функциональных показателей здорового человека. – М.: "Развитие", 1992. – 28 с.
2. Крылова Н.Н., Лясковская Ю.Н. Физико-химические методы исследования продуктов животного происхождения. – М.: Пищевая промышленность, 1965. – 316 с.
3. Крылова Н.Н., Лясковская Ю.Н. Биохимия мяса. – М.: Пищевая промышленность, 1968. – 349 с.
4. Иванкин А.Н., Герман А.Б., Тележкин В.В., Осотов А.А. Практикум по основам биотехнологии. Учебное пособие/Под ред. А.Д. Неклюдова. – М.: МГУЛ, 1996. – 100 с.
5. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – С. 34 – 133.

6. Поглазов Б.Ф. Структура и функции сократительных белков. – М.: Наука, 1965. – 223 с.
7. Практическая химия белка: Пер. с англ./Под ред. А. Дарбре. – М.: Мир, 1989. – 621 с.
8. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982. – 354 с.
9. Устинова А.В., Тимошенко Н.В. Мясные продукты для детского питания. – М.: Изд – во ВНИИ мясной промышленности, 1997. – 251 с.
10. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Биологически активные соединения из природных объектов. Свойства и структурно-функциональные взаимосвязи. – М.: МГУЛ, 2003. – 404 с.
11. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: ВНИИМП, 2001. – 408 с.
12. Гааль Э., Медьеша Г., Верещей Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 447 с.
13. Amino acids. Tables and charts. Part 4. – Токуо: Ajinomoto Co., 1990. – 28 p.
14. Аминокислотный анализатор АРАКУС. – РМА GmbH, 2008 – 100 с.
15. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Основы биохимической переработки животного и комбинированного сырья. – М.: ВНИИМП, 2003. – 116 с.
16. Ентц Г.Ю., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д., Олиференко Г.Л., Лунев Г.Г. О некоторых биохимических изменениях стабилизированных мясных продуктов при длительном хранении //Хранение и переработка сельхозсырья. – 1999. – №9. – С. 46 – 48.
17. Рядчиков В.Г., Андропова И.Н., Дрозденко Н.П., Птак И.Р. Методы определения аминокислот в кормах, животноводческой продукции и продуктах обмена. – Дубровицы: ВАСХНИЛ, 1967. – С. 11 – 19.
18. Баер Н.А., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. //Пат. 2112397 РФ /Бюлл. – 1998. – N 16. С. 19–20.
19. Ивашов В.И., Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Хромова Р.А. Получение и применение белковых гидролизатов. – М.: АгроНИИТЭИММП, 1991. – 44 с.
20. Иммуобилизованные клетки и ферменты. Методы: Пер. с англ./ Под ред. Д.Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
21. Антонов В.К. Химия протеолиза. – М.: Наука, 1984. – С. 113–161.
22. Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. //Dan. Kemi. – 1986. – V. 67. – N 1. – P. 19–25. – V. 67. – N2. – p. 36–43.
23. Богатков С.В., Фролова Т.Т., Грачева И.М. и др. Оптимизация гидролиза белков щелочной протеиназой *Bac.subtilis* //Прикл. биохим. и микробиол. – 1982. – Т. 18. – № 1. – С. 71–75.
24. Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Илюхина В.П., Лисица Е.П. Ферментативный профиль автолизированной дрожжевой биомассы рода *Saccharomyces*// Прикл. биохимия и микробиология. – 1993. – Т. 29. – N 5. – С. 734–743.
25. Сиймер Э.Х., Паппель К.Э., Кестнер А.И. Метод описания кинетики ферментативных реакций. // Труды Таллинского политехнического института. – 1979. – № 424. – С. 13–17.
26. Неклюдов А.Д., Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Мосина Г.И., Петракова А.Н., Хромова Р.А. Ферментативный гидролиз боенской крови дрожжевыми протеазами с целью получения добавок пищевого назначения // 4-й Междунар. симп. «Экол. человека: пищ. технол. и продукты», 25-28 окт., 1995 : Тез. докл. Ч.2 . – М.; Видное, 1995. – С. 246–247 .

27. Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Илюхина В.П., Лисица Е.П. Ферментативный профиль автолизированной дрожжевой биомассы рода *Saccharomyces*// Прикл. биохимия и микробиология. – 1993. – Т. 29. – № 5. – С. 734–743.
28. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Мосина Г.И. и др. Гидролизующая способность дрожжевых протеаз по отношению к белковым субстратам.//Прикл. биохимия и микробиол. – 1996. – Т. 32. – № 2. – С. 231–236.
29. Беликов В.М., Антонова Т.В., Квасов Б.В. Кинетика гидролиза казеина протеолитическими ферментами//Биоорганическая химия. 1979. –Т. 5. – № 3. – С. 449–457.
30. Ивашов В.И., Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Хромова Р.А. О некоторых макрокинетических закономерностях протеолиза белков//Доклады АН СССР. – 1992. – Т. 322. – № 5. – С. 989–993.
31. Федорова Н.В., Неклюдов А.Д. Влияние концентрации дрожжевой биомассы и экзогенных протеолитических ферментов на интенсивность процесса автолиза пекарских дрожжей. //Прикладная биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21. – № 6. – С. 714–718.
32. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. и др. Макрокинетический подход к решению целевой задачи получения аминокислотных смесей пищевого назначения из сырья животного происхождения //Сборник научных трудов. – М.: ВНИИМП, 1999. – С. 110–120.
33. Неклюдов А. Д., Иванкин А. Н., Бердугина А. В. и др. Получение пищевых гидролизатов из отходов мясопереработки в присутствии ферментов поджелудочной железы // В сб. научных трудов ВНИИМП. – М.: ВНИИМП, 1998. – С.70–78.
34. Красноштанова А.А., Крылов И.А., Манаков М.Н. Ферментативный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. 1. Кинетика гидролиза белковых фракций дрожжей и бактерий протосубтилином. //Биотехнология. – 1998. – № 6. – с. 50-56.

Глава 3

Основы технологии получения и очистки белковых гидролизатов

За последние годы интерес к получению и применению белковых гидролизатов напоминает волнообразную кривую [1] с подъемами (50–70-е, 90-е годы) и спусками (80-е годы). Это объясняется успехами использования очищенных белковых гидролизатов в медицинской практике в качестве средств парентерального и энтерального зондового питания [2–6] и до последнего времени их сравнительно ограниченным применением в пищевой промышленности, прежде всего, из-за горького вкуса пептидов, образующихся в процессе гидролиза. Эти вопросы подробно изложены в главе 1.

В настоящее время оформилась определенная концепция использования белковых гидролизатов в пищевой и других отраслях промышленности, которая свидетельствует о трех основных направлениях их получения и очистки:

- 1) гипоаллергенные белковые гидролизаты с низкой (5 – 7 %) степенью конверсии белка,

2) белковые гидролизаты со средней степенью конверсии белка (10 – 30 %) и, наконец,

3) белковые гидролизаты с высокой степенью конверсии белка (свыше 50 %), используемые в качестве пищевых добавок и компонентов искусственных фруктовых соков и напитков.

Несмотря на наличие многочисленных публикаций, посвященных различным способам получения и очистки гидролизатов, в отечественной и зарубежной литературе практически отсутствуют аналитические обзоры, обобщающие достижения в этой области исследований за последние 15 – 20 лет. Такой попытке обобщения имеющихся литературных данных посвящено, например, сообщение [1].

В качестве сырья для получения белковых гидролизатов используют микробное, растительное и животное сырье. В настоящее время общепризнанными являются следующие основные способы гидролиза белков для получения гидролизатов различного качества и назначения: ферментативный гидролиз, кислотный гидролиз, и совместный кислотно-ферментативный или ферментативно-кислотный гидролиз.

Щелочной гидролиз белков используется существенно реже из-за значительной рацемизации и разрушения аминокислот и пептидов, входящих в состав щелочных гидролизатов [7–10].

Щелочной гидролиз белка обычно проводят при температуре 100 – 130 °С в течение 2 – 24 ч, используя в качестве гидролизующего агента аммиак или гидроксид натрия [11]. Однако при щелочном гидролизе, во-первых, происходит полное разрушение таких аминокислот как триптофан, цистеин и тирозин, а во-вторых, степень гидролиза часто не превышает 30%, что недостаточно и ограничивает области применения таких гидролизатов. В связи с этим, щелочной гидролиз белка на практике используется сравнительно редко.

Для получения белковых гидролизатов с низкой и средней степенью конверсии белка используют ферментативный гидролиз ферментами животного и микробного происхождения. Однако в случае использования последних, требуется обязательное разрешение на их применение в пищевой промышленности [12].

Основное преимущество ферментативного гидролиза белка состоит в том, что он протекает в среде близкой к нейтральной при температуре 35–50 °С в течение 8–48 ч [13]. Обычно для гидролиза белков в препаративных целях применяют неочищенные ферментные препараты из поджелудочной железы или слизистой оболочки кишечника свиней и других сельскохозяйственных животных [14], а также ферменты растительного, например, папаин, и микробного происхождения.

Условия проведения ферментативного гидролиза (температура, pH, время гидролиза) зависят от выбранных ферментных препаратов и гидролизующих субстратов [15]. Для большинства используемых в промышлен-

ности гидролаз оптимум рН колеблется в пределах значений 4,5–7,5. Известно использование щелочных протеаз с рН оптимумом 8,5–9,5 [16]. Из кислых протеаз наиболее широкое применение получил пепсин, рН оптимум которого составляет 2,2 [17]. Температурный оптимум в процессах ферментации подбирают таким образом, чтобы по возможности снизить вероятность бактериального заражения получаемых гидролизатов [17].

Из ферментов животного происхождения чаще всего используют пепсин, трипсин, α -химотрипсин, карбокси- или аминопептидазы в индивидуальном виде или в виде смесей ферментов, примерами которых может служить панкреатин, широко используемый как в медицине, так и в пищевой промышленности, а также плазмин и сычужные ферменты [18–25]. Причем наиболее близки по свойствам к ферментам желудочно-кишечного тракта человека ферменты, выделяемые из организма свиней [26, 27].

Из ферментов микробного происхождения чаще всего для получения белковых гидролизатов используются бактериальные и грибковые протеазы. Последние, являясь в большинстве случаев смесью нескольких ферментов, обычно обладают более широкой субстратной специфичностью и обеспечивают более глубокую степень гидролиза белка [28–32].

Для получения белковых гидролизатов с низкой степенью конверсии чаще всего используют пепсин, трипсин или комплекс сериновых протеиназ, продуцируемых *Bac. subtilis* [19].

При необходимости увеличить степень конверсии белка до 15 – 50 % отдают предпочтение панкреатину или комплексу протеаз грибного происхождения, например используют проназу или протеазу С [33–39].

В работах [40–41] показано, что применение свиного пепсина позволяет получать гидролизаты белков молока и крови со степенью конверсии 5–10 %, что в ряде случаев снижает их аллергенные свойства и позволяет использовать в качестве основы для создания продуктов питания детям и больным с недостаточной деятельностью желудочно-кишечного тракта.

В обзорах [10, 42, 43] показано, что для получения белковых гидролизатов с различной степенью конверсии могут быть использованы не только нативные, но и иммобилизованные ферменты. Однако, как выяснилось при дальнейших исследованиях, использование иммобилизованных ферментов дает определенный эффект при гидролизе водорастворимых белков в концентрациях 1–2 %, но малоэффективно при гидролизе концентрированных растворов белков или вообще не эффективно при гидролизе нерастворимых в воде белков, например белков сои, мяса [10], но в этом случае определенный эффект могут дать ферменты, иммобилизованные на полиэлектролитных полимерных матрицах, например, на карбоксиметилцеллюлозе [37, 43, 44].

В связи с этими обстоятельствами, несмотря на кажущуюся экономическую и технологическую эффективность использования иммобилизо-

ванных биокатализаторов, их применение оказалось весьма ограниченным для получения гидролизатов с различной степенью конверсии белка и практически непригодным для переработки отходов пищевой и сельскохозяйственной продукции.

Таким образом, те надежды, которые возлагались в 60–70-е годы на использование иммобилизованных ферментов для получения белковых гидролизатов с различной степенью конверсии, не оправдались на практике и оказались полезны, главным образом, для трансформации низкомолекулярных соединений: ацил-аминокислот, пептидов, стероидов, антибиотиков, олигосахаридов и т.д. [10, 45].

С точки зрения ряда исследователей [46, 47] более перспективной заменой иммобилизованным ферментам является совмещение процесса гидролиза белков с одновременной ультрафильтрацией. Действительно, в этом случае продукты гидролиза удаляют из реакционной смеси, тогда как сам фермент и гидролизуемый белок остаются в последней, что позволяет не только контролировать степень конверсии белка в смеси аминокислот и пептидов, но и существенно уменьшить процесс ингибирования ферментов продуктами гидролиза. Причем в зависимости от пористости мембран можно в определенной степени регулировать молекулярно-массовое распределение продуктов гидролиза, прошедших через мембраны, что особенно важно для получения белковых гидролизатов со средней степенью конверсии белка, содержащих пептиды с молекулярной массой от 1 до 10 кД наиболее усваиваемых в желудочно-кишечном тракте [3, 48–50].

Такое совмещение позволяет использовать не только нативные, но и частично сшитые стабилизированные ферменты, а также биокатализаторы, иммобилизованные на полиэлектролитных комплексах [51].

По сути дела в этом случае мы имеем дело с техническим моделированием функций желудочно-кишечного тракта, в частности с функцией гидролитического расщепления и всасывания (удаления) продуктов гидролиза из реакционной (перевариваемой) смеси.

Недостатком такого метода гидролиза является низкая концентрация продуктов гидролиза в растворе, прошедшем через мембраны, требующего последующего концентрирования раствора при помощи вакуумного выпаривания или обратного осмоса [52].

В последнее время в качестве биокатализаторов для гидролиза стало наиболее перспективным использовать ферменты из термофильных микроорганизмов, так как в этом случае гидролиз можно проводить при температурах 65–70 °С, что, с одной стороны, сокращает время проведения процесса, а, с другой стороны, обеспечивает пастеризацию реакционной смеси и, вследствие этого, существенное уменьшение микробной контаминации последней [53].

Следует особо отметить актуальность гидролиза отходов мясной и молочной промышленности, так как после получения различных изделий

пищевого назначения остается около 50 % белковых отходов, которые требуют обязательной утилизации.

Учитывая, что убой сельскохозяйственных животных и соответственно получение молочных продуктов за последнее десятилетие сократился в нашей стране, как минимум, в два раза, задача переработки отходов мясной, молочной и других отраслей промышленности становится особенно актуальной для получения дополнительного пищевого белка [54–62].

Как показывает анализ, в сыворотке молока и, особенно в отходах мясной промышленности содержится 10 – 15 % белка, который может быть использован на пищевые нужды [63, 64].

Аналогичная проблема возникает и при реализации отходов с использованием микроорганизмов. Как показали недавние исследования [65, 66], отходы пивоваренной и дрожжевой промышленности содержат до 10–12 % белка, не уступающего по своей эффективности белкам сои, а также 30–40 % полисахаридов различной химической природы. Очевидно, переработка таких отходов в смеси аминокислот, пептидов моно- или олигосахаридов может дать не только дополнительные пищевые ресурсы, но и служить основой для создания самых различных питательных средств и кормовых добавок, чему посвящены различные публикации и обзоры [10,67]. Следует особо отметить работы А.Н. Несмеянова, В.М. Беликова, В.К. Латова и других исследователей [68–71], посвященных переработке пекарских и пивных дрожжей в смеси аминокислот и пептидов, предназначенных для различных целей, включая медицинское применение [72]. Учитывая, что дрожжи и другие микроорганизмы содержат значительное количество гидролитических ферментов, расщепляющих биополимеры различного химического состава, очевидно последние можно использовать не только для гидролиза биополимеров, входящих в состав самих дрожжей, то есть в качестве инструментов автолиза, но и для гидролиза других субстратов [73, 74]. Как показано в работе [74], после двухчасовой активации ферментных систем дрожжевой биомассы при 50 °С они с успехом могут быть использованы для получения белковых гидролизатов из сырьевых источников, совершенно отличных от дрожжевой биомассы, например боненской крови. При этом, дрожжевые ферменты, гидролизуя свои собственные и чужеродные белки, способны обогащать получаемые белковые гидролизаты отдельными незаменимыми аминокислотами, например в случае белков крови – изолейцином, в результате чего конечная аминокислотно-пептидная смесь имеет более высокую биологическую ценность [66, 75–77].

Таким образом, используя пекарские дрожжи, относящиеся к виду *Saccharomyces*, не только как белковый продукт, но и как источник ферментных препаратов, можно получать белковые гидролизаты с малой и средней степенью конверсии, то есть дрожжи способны найти себе применение в различных отраслях пищевой промышленности и в медицине в ка-

честве основы для создания диет, предназначенных для лечебного питания [78–81].

В случае необходимости дрожжи, совместно с экзогенными ферментами, могут быть использованы и для получения белковых гидролизатов с высокой степенью конверсии белка или даже для получения смесей аминокислот, как это показано в работах [65, 82], которые после специальной очистки и добалансировки их метионином, фенилаланином и триптофаном могут быть использованы в качестве основы для получения инфузионных растворов [83] и, конечно же, в качестве пищевых добавок в соки и напитки различного назначения.

Для улучшения аминокислотного состава технической боенской крови может быть с успехом использована в качестве ферментного препарата биомасса пекарских и пивных дрожжей [84]. Полученный гидролизат содержит существенно большее количество изолейцина, витамины группы В и геминное железо, и может быть использован для кормления молодняка свиней и крупного рогатого скота, особенно тех, которые страдают железодефицитными анемиями.

В некоторых случаях, для предварительного набухания трудногидролизуемых белков с целью их последующей обработки ферментами иногда используют разбавленные растворы щелочей или аммиака [85].

Глубокий гидролиз белка можно осуществить смесью нескольких ферментных препаратов. При этом хорошие результаты дает использование того же принципа, что и в пищеварительной системе: на первой стадии белок подвергают действию протеаз, например, трипсина, химотрипсина, микробных ферментных препаратов и др., на второй – действию различных пептидаз [86]. Многие исследователи использовали для глубокого гидролиза белков смесь нескольких ферментных препаратов одновременно: смесь различных протеаз и пептидаз или комплексные ферментные препараты микробного или животного происхождения с широкой субстратной специфичностью [86, 87]. Использование панкреатина, субтилизина, лейцинаминопептидазы и пролидазы дает возможность достичь полного гидролиза отдельных белков до свободных аминокислот. Однако при осуществлении такого процесса в промышленном масштабе максимальный выход аминокислот составляет не более 75 % [88, 89]. Тем не менее, ведутся интенсивные поиски условий проведения направленного ферментативного гидролиза вплоть до получения смесей свободных аминокислот, не содержащих пептидов. В этом отношении существенный интерес приобретают работы ряда исследователей [90, 91], пытающихся совместить ферментативный гидролиз с ультрафильтрацией для удаления продуктов реакции из реакционной среды и смещения равновесия в сторону дальнейшего гидролиза оставшегося белка или пептидов. Ряд авторов предлагают конструкцию различных типов реакторов, при использовании которых можно избежать ингибирования фермента продуктами реакции и проводить гид-

ролиз белков в течение достаточно длительного времени без добавления свежих порций фермента. Один из таких реакторов представляет собой ячейку для ультрафильтрации, к мембране которой присоединен фермент путем ковалентного связывания. Продолжительная работа реактора под давлением практически не сказывалась на активности ферментного препарата [91].

Таким образом, для получения высококачественных белковых гидролизатов желательное использование ферментативных методов гидролиза. К основным достоинствам ферментативных методов гидролиза следует отнести мягкие условия ведения процесса, наиболее полное сохранение биологической ценности гидролизуемого белкового сырья, отсутствие сколько-нибудь заметной рацемизации и деструкции образующихся в результате гидролиза гуминовых соединений, летучих аминов, карбонильных соединений, которые обладают нежелательной биологической активностью и ухудшают качество гидролизатов. Для проведения энзиматического гидролиза белкового сырья не требуется коррозионноустойчивое оборудование. Среди новых наиболее интересных разработок в этом направлении являются работы, в которых используются несколько ферментных препаратов с широкой субстратной специфичностью [92, 93].

Проведя анализ различных методов переработки белка, можно прийти к заключению, что ферментативный метод гидролиза имеет бесспорные преимущества перед другими методами трансформации, но, однако, не может полностью заменить кислотный метод превращения белков в смеси аминокислот. Этот метод широко используется в мировой практике, не только для аналитических целей – установления аминокислотного состава исследуемого белка или смеси белков [94–99], но и для переработки белков, оставшихся после получения белковых гидролизатов ферментативным путем.

Действительно, использование ферментов хотя и предотвращает разрушение большинства аминокислот и обеспечивает практическое получение гидролизатов, однако, позволяет превратить гидролизуемый белок или смесь белков в свободные аминокислоты только при использовании нескольких, часто весьма дорогостоящих ферментных препаратов [34]. Следовательно, после получения белковых гидролизатов с различной степенью конверсии в реакционной смеси остается от 20 до 70 % непрогидролизованного белка, причем часто содержащего ингибиторы многих протеиназ [108].

Поэтому, для дальнейшего использования оставшейся реакционной массы, что имеет не только практическое, но и экологическое значение, лучше всего использовать минеральные кислоты, как наиболее простой инструмент утилизации остатков после гидролиза в смесь аминокислот [100].

Кислотный гидролиз белков проводят обычно при температуре 100 –

130 °С в течение 2 – 24 ч с использованием минеральных кислот (соляной, серной и ортофосфорной).

Наиболее часто для получения кислотных гидролизатов используют солянокислотный гидролиз [71]. В работе [72] для нейтрализации соляной кислоты использовали гидроксид кальция. Авторы [72] рекомендуют в качестве гидролизующего агента использовать газообразный хлороводород. Процесс гидролиза белкового материала проводят в автоклаве при температуре 90 – 100 °С в течение 2 ч. Избыток хлороводорода по окончании процесса удаляют дегазацией.

Помимо соляной, для получения белковых гидролизатов используется серная кислота. Ее преимущество – простота удаления из гидролизата избытка сульфат-ионов, например, осаждением в виде сульфата кальция [67].

Для получения препаратов пептонов используют ортофосфорную кислоту [73]. Избыток ортофосфат-ионов из гидролизатов удаляют осаждением в виде ортофосфата кальция. Однако ортофосфорная кислота значительно дороже серной. Однако гидролизаты, получаемые путем кислотного гидролиза, имеют степень расщепления белка не более 40%. Достижение большей степени гидролиза субстрата возможно только при более высоких концентрациях кислоты и в более жестких условиях, что усложняет дальнейшую очистку гидролизата.

Поэтому, по-прежнему актуальным являются способы предотвращения деструкции лабильных аминокислот, прежде всего, цистина, триптофана, серина и метионина за счет осуществления специфического кислотного гидролиза в атмосфере инертного газа в присутствии антиоксидантов и стабилизаторов, в качестве которых применяют тиоспирты, производные индола и другие органические вещества [95, 103].

В ряде случаев, при гидролизе коллаген или кератин содержащих белков, плохо растворимых в воде и содержащих большое количество связей, не поддающихся ферментативному гидролизу, например, пептидные связи образованные глицином, аланином и некоторыми другими аминокислотами с пролином, используют предварительный гидролиз растворами кислот, а затем, уже после их частичного или полного перевода в растворимое состояние возможно дальнейшее превращение в гидролизаты с желаемой степенью конверсии. Подобные приемы широко используются для получения белково-пептидных рецептур в парфюмерной промышленности [104–106].

В работе [107] приведена кинетика сернокислотного гидролиза перопуховых отходов для получения гидролизатов, предназначенных для кормовых и других целей. Показано, что при кислотном гидролизе практически полностью разрушается метионин, а деструкция гистидина, цистина и серина происходит на 80, 35 и 30 % соответственно, что может существенно ухудшить свойства полученного гидролизата.

Следовательно, кислотный гидролиз является практическим дополнением ферментативного гидролиза и их сочетание чаще всего дает определенный экономический, технологический и, особенно, экологический эффект при переработке отходов пищевой промышленности [108].

Наиболее удобно при получении белковых гидролизатов различного назначения использовать тактику создания пищевых или других смесей, то есть гидролизатов с разной степенью конверсии белка с целью их последующего смешивания и получения на их основе тех или иных пищевых рационов, микробиологических основ для питательных сред, шампуней, средств для парфюмерных и косметических целей. Основные подходы к созданию таких моделей предложены в ряде сообщений [104, 109], при этом, в зависимости от назначения, модельные гидролизаты обязательно должны проходить соответствующую медико-биологическую оценку.

Многие виды сырья животного происхождения, прежде всего кератин и коллаген относятся к трудногидролизуемым белковым субстратам, поэтому для гидролиза пептидных связей в них используется сочетание нескольких методов, чаще всего кислотный гидролиз, однако, при наличии ферментных препаратов, обладающих коллагеназной или кератиназной активностью, может быть использован и ферментативно-кислотный гидролиз [110].

В ряде случаев перед обработкой ферментами трудногидролизуемый субстрат, например кератин, предварительно обрабатывается водными растворами щелочей для набухания и снятия кутикулярной оболочки, а также растворами аммиака, мочевины и другими щелочными реагентами [111].

Получение гидролизатов с высокой специфичностью конверсии белков становится возможным путем проведения совместного кислотно-ферментативного гидролиза, обеспечивающего расщепление наиболее трудногидролизуемых ферментами связей пролина с другими аминокислотами. Этот принцип положен в основу метода получения препарата «Фибриносола», обладающего высокой анаболической активностью [112].

В работе [113] показана возможность использования биомассы пивных дрожжей в качестве полиферментных препаратов для гидролиза крови убойных животных. Приведены кинетические характеристики процесса гидролиза и энергии активации белков крови убойных животных в присутствии активированной биомассы пивных дрожжей и нейтральной протеазы из *Bac. subtilis*. Было обнаружено, что биомасса пивных дрожжей может быть использована не только в качестве ферментов широкой субстратной специфичности, но и в качестве обогатителя гидролизуемых субстратов незаменимыми аминокислотами, в частности изолейцином, что позволило увеличить биологическую эффективность белков крови на 15–30%.

Практическая неисчерпаемость ресурсов для выращивания микробной биомассы, независимость производства от времени года и климатических условий, образование микробной биомассы в качестве отхода на

предприятиях пищевой и микробиологической промышленности, относительно невысокая стоимость получаемых гидролизатов дают возможность рассматривать микробное сырье в качестве перспективного источника для получения гидролизатов белка пищевого назначения, а также сырья для получения медицинских препаратов.

Ферментативно-кислотный гидролиз может быть также использован для улучшения качества мясокостной муки или, вернее, сырья, идущего на ее получение. В работе [95] предложен метод ферментативно-кислотного гидролиза мясокостного фарша и получения гидролизатов с помощью ферментного комплекса гомогенатов поджелудочной железы, протосубтилина и водных растворов серной кислоты. Такая обработка дает возможность полностью перевести это сырье в смесь аминокислот и пептидов, которые, по предварительным данным, могут найти применение не только в комбикормовой, но и в микробиологической промышленности.

Следует отметить, что химические методы гидролиза еще не исчерпали своих возможностей и могут быть с успехом использованы для глубокого гидролиза белка. Основными путями совершенствования этих методов является переход к более мягким условиям гидролиза и подбор наиболее удачных гидролизующих агентов и специальных селективных катализаторов. Последние разработки в этом направлении позволили значительно сократить деструкцию и рацемизацию образующихся при гидролизе аминокислот.

Однако наиболее перспективным является путь сочетания энзиматических и химических методов гидролиза. При таком подходе удастся максимально сохранить биологическую ценность белкового сырья и одновременно провести практически полный его гидролиз. Различные методы получения белковых гидролизатов позволяют получать продукты с заданными свойствами, и в зависимости от назначения продукта, используется либо один метод, либо сочетание нескольких методов.

Очистка белковых гидролизатов. В зависимости от вида использованных субстратов, ферментов, метода гидролиза и необходимой степени конверсии белка требуется более простая или более сложная очистка продуктов.

Ферментативные гидролизаты при использовании для их получения пищевых белков и очищенных индивидуальных ферментов или очищенных ферментных комплексов могут в отдельных случаях не требовать специальных процессов очистки [27, 115, 116]. При использовании растительных белков в составе гидролизатов могут оставаться высокомолекулярные белковые примеси способные вызывать анафилактические и аллергические реакции после их попадания в организм человека.

Поэтому для очистки таких гидролизатов их обычно фракционируют на смеси олигопептидов различной молекулярной массы, для чего может быть использована ультрафильтрация растворов гидролизатов через

полупроницаемые мембраны с различным размером пор, обеспечивающая не только фракционирование гидролизатов, но и их частичную очистку, в частности, осветление растворов [117, 118]. В случае необходимости можно ограничиться обычной фильтрацией гидролизатов через активированные угли различных марок, бентониты, неорганические соединения кальция [27, 119]. Из-за низкой скорости фильтрации гидролизатов, особенно ферментативных, существует достаточно высокая вероятность микробной контаминации, поэтому перед сушкой гидролизатов целесообразно проводить их стерильную фильтрацию [120].

Значительно более сложной является очистка кислотных гидролизатов, а также дрожжевых автолизатов. В случае кислотного гидролиза или автолиза белковые гидролизаты, наряду со свободными аминокислотами и пептидами, содержат соли минеральных и органических кислот, амины, нуклеотиды, окрашенные смолообразные примеси (гуминовые компоненты) и другие остатки клеточных биополимеров и продуктов их деградации.

Обычно очистка кислотных гидролизатов начинается с подбора условий их нейтрализации подходящим щелочным реагентом. С этой целью могут быть использованы гидроксиды щелочных или щелочноземельных металлов или аниониты. Для осветления окрашенных гидролизатов и адсорбции окрашенных пигментирующих веществ могут быть использованы активированные угли или специальные ионообменники [121, 122].

В отдельных случаях могут быть также использованы для этих целей природные или синтетические комплексообразователи, например танины, соли цинка или олова [27, 123, 124]. Выпавшие в осадок нерастворимые соли отфильтровывают, чаще в виде смеси с добавленным твердым адсорбентом, например активированным углем, или другим осветляющим сорбентом. В случае использования синтетических ионообменников собирают фракции с максимальным содержанием аминокислот, затем проводят выпаривание и высушивают для получения конечного продукта. В ряде случаев происходит выпадение из растворов глутаминовой кислоты и тирозина, которые отделяют фильтрацией.

В случае необходимости содержание глутаминовой кислоты в гидролизате может быть сведено до минимума автоклавированием раствора при 120–125 °С в течение 3–4 часов. Образующаяся при этом пироглутаминовая кислота удаляется после экстракции раствора этилацетатом [125]. При осуществлении этой процедуры следует помнить, что при столь длительном автоклавировании в растворе увеличивается содержание гуминовых компонентов за счет протекания реакции Майера при наличии в растворе даже небольшого количества сахаров. В результате, после автоклавирования раствора, приходится его дополнительно осветлять на активированном угле, в результате чего в нем происходит существенное уменьшение содержания фенилаланина, что, однако, позволяет рекомендовать ольных фенилкетонурией [126].

Оригинальный метод удаления анионов серной кислоты, при использовании последней в качестве гидролизующего агента, заключается в нейтрализации раствора гидроксидом натрия до рН 10,0 – 12,0, концентрировании под вакуумом, подкислении серной кислотой до рН 6,0 – 7,0, охлаждении до температуры 0 – 5 °С, выдерживании при этой температуре в течение нескольких часов с последующим отделением выпавшего осадка $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Одновременно с сульфатом натрия происходит отделение гуминовых компонентов [121].

В случае проведения солянокислотного гидролиза, часть соляной кислоты обычно удаляется в процессе концентрирования раствора под вакуумом с последующей нейтрализацией оставшейся кислоты добавлением NaOH , Na_2CO_3 или при помощи анионитов различных марок [122, 126], или, получившим широкое распространение в последнее время, электродиализом [124], или обратным осмосом [52].

В этом случае удается получить растворы аминокислот и пептидов практически не содержащие ионов натрия, калия и хлора.

Удовлетворительный эффект очистки солянокислотного гидролизата крови убойных животных удалось достичь при обработке гидролизата активированным углем и фильтрацией через анионит ЭДЭ-10п, причем для уменьшения потерь аминокислот в процессе фильтрации смолу рекомендуют обрабатывать раствором гидроксида натрия до рН 8,0–9,0. Последующая очистка гидролизата на смоле типа КУ 2х20 и добавление к раствору недостающего триптофана позволяет получать инфузионные растворы для парентерального белкового питания с низким содержанием пептидов [10].

Особое место среди субстратов для гидролиза белков, как отмечалось выше, занимают дрожжи в силу их несомненной перспективности для этих целей [82]. В процессе очистки и фракционирования дрожжевых автолизатов и гидролизатов обычно проводят следующие операции: отделение нерастворимых клеточных остатков, обесцвечивание раствора, отделение аминокислот и пептидов от примесных компонентов и, в случае необходимости, дополнительный гидролиз пептидов до свободных аминокислот [65, 66]. Для уменьшения возможности бактериального загрязнения гидролизатов, целесообразно добавлять к реакционной массе 4 – 5 % масс. толуола, спирта или хлороформа, а также, в отдельных случаях, ацетата натрия, обладающего бактериостатическим действием.

Важная технологическая операция процесса очистки – отделение клеточных оболочек, которые, как известно, плохо усваиваются организмом млекопитающих. Для этого могут быть использованы сепараторы различных марок, центрифуги, барабанные вакуум-фильтры или другие виды фильтрационного оборудования. Для более полного отделения клеточных оболочек сепарированием или центрифугированием приходится совмещать операции с микро- или ультрафильтрацией [72, 120–122].

Раствор, полученный после отделения клеточных оболочек, обычно содержит до 60–80% свободных аминокислот и может быть использован для пищевых и других целей после удаления из него остатков нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Это обычно достигается фронтальной фильтрацией раствора через различные аниониты, например ИА-1р, АН-511, ЭДЭ 10п и др. [74]. В случае необходимости можно осуществить концентрирование на сульфокатионите КУ 2х8 с последующей десорбцией смеси аминокислот и пептидов растворами гидроксида натрия, или водно-аммонийными растворами при 50 °С. В последнем случае удается существенно увеличить десорбцию со смолы триптофана и аргинина [76].

В случае необходимости, можно устранить пирогенность таких растворов путем их пропускания через смесь специально приготовленного апиrogenного угля и окиси алюминия. Более подробное описание процесса получения таких растворов, содержащих смеси аминокислот и пептидов и пригодных для получения медицинских препаратов и компонентов для пищевых целей приводится в работах [6, 125, 126].

Одним из существенных недостатков использования биомассы дрожжей для получения белковых гидролизатов, как впрочем, и для других биотехнологических производств является проблема переработки клеточных оболочек, которых после всех операций очистки, остается не менее 50 % от массы сухих дрожжей.

Таким образом, подводя итог всему вышесказанному, можно прийти к следующим выводам. В настоящее время практически решена проблема получения белковых гидролизатов с любым аминокислотным составом и требуемым молекулярно-массовым распределением олигопептидов и оставшихся после гидролиза фрагментов белков. Причем, во многих случаях для полной трансформации подобных субстратов в гидролизаты с желаемой степенью конверсии и утилизации остающихся отходов приходится использовать оба вида гидролиза – ферментативный и кислотный со всеми вытекающими отсюда преимуществами и недостатками. Каждый из полученных гидролизатов имеет свои особенности и свойства, что позволяет их широко использовать в различных отраслях, прежде всего, пищевой и медицинской.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что для получения белковых гидролизатов с целью упрощения стадий их дальнейшей очистки целесообразно использовать ферментативный гидролиз, действующим началом которого являются ферментные препараты. Ниже приводится характеристика наиболее промышленнозначимых ферментных препаратов.

Список литературы

1. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Получение и очистка белковых гидролизатов // Прикладная биохим. и микробиол. – 2000. – Т. 36. – N 4. – С. 373–381.
2. Gray D., Schmelkin N.S., Alexander J., Mark D.A., Twyman D. Enteral formulation designed for optimized nutrient absorption and wound healing.// US Pat. 5723446 (Cl. 514-21; A61K38/00). – 1998.
3. Grimble G.K Protein hydrolyzates as vehicles for the application of di- and tripeptides in clinical nutrition (Peptides in Mammalian Protein Metabolism).// Portland Press Proc. – 1998. – P. 119–139.
4. Препараты для парентерального питания: Современные кровезаменители / П. С. Васильев, В. В. Суздалева, А. Д. Неклюдов и др. – М.: ВНИИ медицинской информации. – 1980. – С. 29 – 43.
5. Кошелев Н. Ф., Головина Н. К. Опыт использования микробных пептидаз в приготовлении белковых гидролизатов для парентерального питания. / В кн.: Актуальные вопросы парентерального питания. – Рига: Зинатне, 1982. – С. 157–162.
6. Черненко Г. Т., Сорокин В. В., Неклюдов А.Д., Цибанов В. В. Сравнительная оценка пригодности дрожжевых автолизатов и ферментативного гидролизата крови при интрагастральном введении. / В сб.: Энтеральное зондовое питание у больных с острой хирургической патологией. – М.: НИИ скорой помощи им. Н. В. Склифосовского, 1982. – С. 124–130.
7. Kolomaznik K.; Mladek M.; Langmaier F.; Taylor M.; Diefendorf E.; Brown E.; Marmer W.; Tribula I. Process for preparing hydrolyzate of proteinaceous waste of animal origin. // Pat. Czech Rep. CZ 280,655 (Cl. C12S3/14), 13 Mar 1996.
8. Крылова В. Б., Попов В. П. Способ получения белкового гидролизата из кератинсодержащего сырья (к.р.с.) // А. с. 1161064 СССР. МКИ А23 1/10. Оpubл. 15.06.85. // Бюл. № 9. – С. 14.
9. Таранич А.В., Анохина В. И., Кононенко Л. В. Способ получения кормовой добавки из отходов мехового сырья // А.с. 1151236 СССР. МКИ А23 1/10. Заявлено 08.12.83. Оpubл. 23.04.85. // Бюл. № 7. – С. 7.
10. Неклюдов А. Д., Навашин С. М. Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21. – № 1. – С. 3–17.
11. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Федорова Н.П., Бабурина М.И. Гидролиз как способ переработки боенской крови // Мясная промышленность. – 1994. – N2. – С.21–23.
12. Неклюдов А.Д. Аминокислотные лекарственные препараты. Методы получения и структурно-функциональные взаимосвязи. Автореф. дисс... докт. хим. наук. – М.: 1984. 40 с. – Р. 218–223.
13. Любич Ф.Д., Лавченко Е.Т., Чудинова А.Д. и др. Биологическая оценка качества питательных сред, приготовленных из отходов производства. // В сб.: Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов. / Тез. докл. II Всесоюзной конференции. – М., 1981. – С. 130–131.
14. Lyons T.P. Proteinases in industry. // Crit.Rev.Biotechnol. – 1988. – V. 8. – N 2. – 1988. – P. 99–110.
15. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Коллаген: получение, свойства и применение: монография. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. – 336 с.
16. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Свойства и применение белковых гидролизатов. // Прикладная биохим. и микробиол. – 2000. – Т.36. – N5. – С. 525–534.
17. Aubes-Dufau I.; Combes D. Effect of different proteases on bitterness of hemoglobin hydrolyzates.// Appl. Biochem. Biotechnol. – 1997. – V. 67. – N 1–2. – P. 127–138.

18. Diaz O., Gouldsworthy A.H., Leaver J. Identification of peptide released from casein micelles by limited trypsinolysis. //J. Agr. and Food Chem. – 1996. – V. 44. – N 9. – P. 2517–2522.
19. Zhao X. Shipin Lexue. //Food Sci. – 1996. – V. 17. – N 5, P. 3–6.
20. Trujillo A., Guamis B., Carreto C. Hydrolysis of bovine and caprine caseins by reanet and plasmin model system. //J. Agr. and Food Chem. – 1998. – V. 46. – N 8. – P. 3066–3072.
21. Pintado M.E.; Pintado A.E.; Silva E.R.; Malcata F.X. Evaluation of whey protein hydrolysis using protease A and trypsin. //Meded.-Fac. Landbowk d. Toegepaste Biol. Wet. (Univ. Gent) 1997. – V. 62. – N 4a. – P. 1365–1368.
22. Batista I., Nunes M.L. Preparatio of enzymic hydrolyzates from fish wastes.// Dev. Food Sci. – 1997. – N38 (Seafoods from Producer to Consumer, Integrated Approach to Quality). – P. 59–70.
23. Lorenzen P., Schulzen D., Schulte D., Schlimme E. Caseinolyse mit lab. und chymosin boviner sowie gentechnischer herkunft. //Dtsch. Milehwirt. – 1996. – G. 47. – N 11. – S. 492–495.
24. Adamson N.J., Reynolds E.C. Relationship between degree of casein hydrolysis and phosphopeptide release. //J. Dairy Res. – 1997. – N 4. – P. 505–514.
25. Пивненко Т.Н., Эпштейн Л.М., Позднякова Ю.Н., Давидович В.В. Ферментативные способы приготовления белковых гидролизатов с использованием протеолитических ферментов различной специфичности. // Вопросы питания. – 1997. – № 5. – С. 34–38.
26. Неклюдов А. Д., Иванкин А. Н., Баер Н. А., Бердугина А. В., Дубина В. И. Источники резервного белка для получения пищевых гидролизатов из животного сырья // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1998. – № 3. – С. 24–25.
27. Lahl W.J., Braun S.D. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. // Food Technol. – 1994. –V. 48. –N 10. –P. 68–71.
28. Diniz F.M., Martin A.M. Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. //Food Sci. Technol. Int. (London). – 1998. – V. 4. – N2. – P. 91–98.
29. Fik M., Surowka K. Enzymic hydrolysis of proteins from chicken heads using Alcalase and Esperase. //Acta Aliment. – 1997. – V. 26. – N 1. – P. 35–45.
30. Римарева Л.В. Использование комплексного ферментного препарата амилопроторизина для гидролиза дрожжевого белка. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1996. – N 2. – С. 39–40.
31. Yoshimoto T., Kabashima T., Fujii M. Novel salt-resistant prolyl oligopeptidase from *Sphingomonas capsulata*, cloning of its gene, and use of the enzyme for preparing flavoring agents. // Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 10 66,570 [98 66,570] (Cl. C12N9/48). 10 Mar. 1998.
32. Ito T., Saito T. Whey beverages and their manufacture with proteases. //Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 10 33, 115 [98 33,115] (Cl. A23C9/123). 10 Feb. 1998.
33. Fanst P.L. Expression of the yeast aspartyl protease, proteinase A //J. Biol. Chem. – 1989. – V. 264. – N 1. – P. 479–488.
34. Enari T.M., Fogarty W.M., Kelly C.T. Microbial amilases, pectic enzymes and microbial cellulases. In: Microbail enzymes and biotechnology/Fogarty W.M. ed. – London: Applide Science, 1988. – 267 p.
35. Enzymes and related biochemicals.–Freehold: Worthington Biochem. Div., 1990.–212 p.
36. Bilinski C.A., Stnart G.G. Yest proteases and brewing.//Bioproass Technol. – 1990. – N5 (Yeast). – P. 147–162.
37. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бабурина М.И. Получение и свойства панкреатина, иммобилизованного на карбоксиметилцеллюлозе //Прикл. биохимия и микробиол. – 1998. –Т. 34. – N 1. –С. 57–61.

38. Guerman A.V., Ivankin A.N., Nekludov A.D. Biodegradable catalysts for aminoacid enantiomers production // Congr. proceed. 4 th Int. Conf.on Ecomaterials,10-12 Nov. – 1999, Gifu Japan. – P. 177.
39. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бабурина М.И. Имобилизованный на карбоксиметилцеллюлозе панкреатин и его использование для получения пищевых гидролизатов//4-й Междунар. симп. "Экология человека, пищ.технол. и продукты 25-28 окт.1995/ Тез. докл. – Ч. 2. – М.: Видное, 1995. – С. 246.
40. Wahn U., Wahl R., Rugo E. Comparison of residual allergenic activity of six different hydrolyzed protein formulas. // J. Pediatrics. – 1992. – V. 121. – P. 580–584.
41. Sampson H.A., Mendelson L., Rosen J.P. Fatal and nearfatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. // N. Eng. J. Med. – 1992. – N 327. – P. 380–384.
42. Mahmoud M.I., Malone W.T., Cordle C.T. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. // J. Food Sci. – 2007.– V. 57. – N 5. – P. 1223–1229.
43. Ивашов В.И., Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Хромова Р.А. Получение и применение белковых гидролизатов. – М.: АгроНИИТЭИММП, 1991. – 44 с.
44. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы: Пер. с англ./ Под ред. Д.Вудворда. –М.:Мир, 1988. – 215 с.
45. Неклюдов А.Д., Евстафьева Е.А., Козлова Н.Д. Сравнительная оценка сорбционных свойств карбоксиметилцеллюлозы по отношению к гемину и глобину// Прикл. биохимия и микробиология. – 1996. –Т. 32. – N 3. – С. 290–293.
46. Введение в прикладную энзимологию. Имобилизованные ферменты./ Под ред. Березина И. В. и Мартинекка К. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 383с.
47. Lin S.B., Chiang W., Cordle Ch.T., Thomas R.L. Functional and immunological properties of casein hydrolysate produced from a two-stage membrane system.// J. Food Sci. – 1997. – V. 62. – N 3. – P. 480–483.
48. Kuriki H., Motojima H., Minagawa E., Sugano Ch., Tsukashiro F. Preparation of proteose peptone component-3 from milk as additive to food, cosmetics, and pharmaceuticals. //Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 09,110,896 [97,110,896] (Cl. C07K1/34). 28 Apr. 1997.
49. Ellis L. , Kalnins, D., Corey M., Brennan J., Pencharz P., Durie P., Do infants with cystic fibrosis need a protein hydrolyzate formula? A prospective, randomized, comparative study. //J. Pediatr. (St. Louis). – 1998. – V. 132. – N 2. – P. 270–276.
50. Yoshihara D. ,Nakamura T., Yanai M., Takeshita Ya.Effect of coexistence of di-, tripeptides, and amino acids on absorption of nitrogen source.// Nippon Eiyo, Shokuryo Gakkai-shi. – 1997. – V. 50. – N 6. – P. 411–416.
51. Gray D., Schmelkin N.S., Alexander J., Mark D.A., Twyman D. Enteral formulation designed for optimized nutrient absorption and wound healing. //Pat. U.S. US 5,723,446 (Cl. 514-21; A61K38/00). 3 Mar. 1998.
52. Ферментация и технология ферментов: Пер. с англ./Уонт Д., Кооней И., Домайн А., и др. –М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. – 336 с.
53. Nakamura T., Syukunobe Y., Sakurai T., Igota T. Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. // Milchwissenschaft . – 1993. – V. 48 – N 1. – P. 11–14.
54. Comprehensive biotechnology. The principles of biotechnology. V2 /Ed. Moo-Young M. –N.Y.:Pergamon press, 1985. – 670 P.
55. Неклюдов А.Д., Лисицын А.Б. Комплексная переработка боенской крови химическим и биотехническим методами/В сб.: Тезисы докладов научно-техн. конференции "Научные основы прогрессивных технологий хранения и переработки с/х продукции для создания продуктов питания человека 9-12 окт. 1995. – Углич: РАСХН. – С. 341.

56. Использование биотехнологических способов переработки отходов потрошения птицы на кормовые, пищевые и медицинские цели. / Волик В.Г., Булгакова Л.В., Исмаилова Ю.Д. // Науч.-теор. конф. «Науч. основы прогрес. технол. хранения и перераб. сельхозпродукции для создания продуктов питания человека», [Углич], 9-12 окт., 1995. – Углич, 1995. – С. 290–291.
57. Linder Michel, Rozan P., Lamghari E., Kossori R., Janni J., Villaume C., Mejean L., Parmentier M. Nutritional value of veal bone hydrolysate // J. Food Sci. – 1997. – V. 62. – № 1. – С. 183–189.
58. Tamura M., Mori N., Miyoshi T., Koyama S., Kohri H., Okai H. Practical debittering using model peptides and related compounds//Agric. Biol. Chem. –1990. – V.54. – P.41–51.
59. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Баер Н.А., Бердугина А.В., Дубина В.И., Карпо Б.С. Получение гидролизатов из мясо-костного сырья //Мясная индустрия. – 1998. –N 6. – С. 42–43.
60. Бердугина А.В., Неклюдов А.Д.,Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Миталева С.И. Кинетика ферментативного гидролиза смесового белка животного происхождения в присутствии полиферментного комплекса поджелудочной железы // Сб. научн.трудов ВНИИМП. – М.: Изд-во ВНИИМП, 2001. – С. 175–190.
61. Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д., Экологические основы биотехнологических процессов // Учебное пособие. – М.:МГУЛ, 2002. – 402 с.
62. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Коллаген: получение, свойства и применение: монография – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. – 336 с.
63. Surowka K., Fik M. Recovery of proteinaceous substances from chicken heads by proteolysis with trypsin // Nahrung. – 1996. – V. 40. – № 3. – С. 132–137.
64. Неклюдов А.Д., Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Мосина Г.И., Петракова А.Н., Хромова Р.А. Ферментативный гидролиз боенской крови дрожжевыми протеазами с целью получения добавок пищевого назначения // 4-й Междунар. симп. «Экол. человека: пищ. технол. и продукты», 25-28 окт., 1995: Тез. докл. Ч.2 . – М.; Видное, 1995. – С. 246–247 .
65. Федорова Н.В., Неклюдов А.Д. Влияние концентрации дрожжевой биомассы и экзогенных протеолитических ферментов на интенсивность процесса автолиза пекарских дрожжей //Прикл. биохимия и микробиол. – 1985. – Т. 21. – N 6. – С. 714–718.
66. Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Илюхина В.П., Лисица Е.П. Ферментативный профиль автолизированной дрожжевой биомассы рода *Saccharomyces*// Прикл. биохимия и микробиология. – 1993. – Т. 29. – N 5. – С. 734–743.
67. Иванкин А.Н. Биологически активные вещества из животной ткани и микроорганизмов. Методы получения и структурно функциональные взаимосвязи. Автореф. дисс... докт. хим. наук. – 1998. – 40 с.
68. Латов В.К. Получение смесей аминокислот ферментативным гидролизом белков и их применение./В кн.:Аминокислоты для пищевой промышленности, с/х, здравоохранения и научных исследований.//Тез.докл. совещания. –Фрунзе: Илим, 1987. – С.10–13.
69. Беликов В.М., Бабаян Т.Л. Смеси аминокислот в питании человека и животных. В кн.: Химические и физиологические проблемы создания и использования синтетической пищи. Рига: Зинатне, 1972. – С. 5–59.
70. Беликов В.М., Антонова Т.В., Квасов Б.В. Кинетика гидролиза казеина протеолитическими ферментами//Биоорганическая химия. 1979. –Т. 5. – N 3. – С. 449–457.
71. Волик В.Г. //Мясная индустрия. – 1999. – N 4. – С. 36–38.
72. Неклюдов А.Д., Купов Х.А. Дрожжи как источник получения аминокислотных препаратов.// Антибиотики и химиотерапия. – 1988. – Т. 33. – N 9. – С. 701–708.

73. Борисенко Е.Г. Автолиз дрожжей рода *Candida*.// Микробиология. – 1967. – Т. 36. – N 2. – С. 240.
74. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Мосина Г.И. и др. Гидролизующая способность дрожжевых протеаз по отношению к белковым субстратам.//Прикл. биохимия и микробиол. – 1996. – Т. 32. – N 2. – С. 231–236.
75. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Хромова Р.А. Перспективы комплексной переработки боенской крови // Мясная промышленность. – 1993 – N2. – С. 6–7.
76. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Федорова Н.П., Бабурина М.И. Гидролиз как способ переработки боенской крови//Мясная промышленность. – 1994. – N2. –С.21–23.
77. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Трифонова В.В.Способ получения белкового гидролизата дрожжевой биомассы. // Патент РФ N 96101956/13. Оpubл. 10.02.98/ Бюлл. N 4.
78. Ивашов В.И., Неклюдов А.Д., Федорова Н.В., Хромова Р.А. О некоторых макрокINETических закономерностях протеолиза белков//Доклады АН СССР. – 1992. – Т. 322. – N 5. – С. 989–993.
79. Nekludov A.D., Lissitsyn A.B., Fiodorova N.B., Ivankin A.N., Yevstafieva E. Hydrolysis of the slaughter cattle blood by yeast proteases./ В сб.: Proc. The 41-th Annual Int. Congress of meat science and technology. San Antonio, Texas, USA. Aug. 20-25. – 1995. – P. 260.
80. Nekludov A.D., Lisicin A.B., Ivankin A.N. , Hromova P.A., Mosina G.I., Petrakova A.N. Poboljsanje kvaliteta krui zaklanih zivotinja hidroliticnom metodom// Proc. 44th Simposium "Achievements and development of meat hygiene and technology", 14-16 juna 1995, Beograd.// Tehnology mesa. – 1995. – V. 36. – N 2–3. – P. 50.
81. Московский В.Д., Коптелов М.М., Тюменцев В.В. Способ получения витаминo-аминокислотного концентрата. //Патент РФ N 96113479/13. / Бюлл. – 1998. – N 1.
82. Федорова Н.В. Гидролиз белково-пептидных субстратов протеазами дрожжей *Saccharomyces*. Автореф. дисс... канд. хим. наук. –М., 1991. – 18 с.
83. Неклюдов А.Д. Аминокислотные лекарственные препараты. Методы получения и структурно-функциональные взаимосвязи. Автореф. дисс... докт. хим. наук. –М.: 1984. 40 с.
84. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Федорова Н.П., Бабурина М.И. Гидролиз как способ переработки боенской крови//Мясная промышленность. –1994. – N2. – С.21–23.
85. Kludas K. U., Kamieth R., Stache B. Stepwise preparation of protein hydrolysate with enzymes, asids and base. // Patent DDR. № 244760. – 1987. – C12K 1/00.
86. Баер Н.А., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Дубина В.И., Бердутина А.В.. Способ получения белкового гидролизата из мясного и мясокостного сырья. //Патент РФ № 2112397. – Оpubл. 10. 06.1998.
87. Мисеева М.В. Токсико-гигиеническая характеристика иммобилизованных ферментов. //В кн.: Получение и применение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, промышленности и медицине./ Тез. Докл. III Всесоюзного симпозиума. – Л.: ВНИИТИАФ, 1980. – С. 195.
88. Васильев П.С., Суздалева В.В., Неклюдов А.Д. Препараты для парентерального питания.// в кн.: Современные кровезаменители. – М.: ВНИИ Мед. Информ. – 1980. – С. 28 – 43.
89. Kilara A. Enzyme-modified protein food ingredients. //Process Biochem. – 1985. – V. 20. – №3. – P. 146 – 157.
90. Антонов В.К. Химия протеолиза. – М.: Наука, 1984. – С. 113 – 161.
91. Alder-Nisson J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. //Dan. Kemi. – 1986. – V. 4. – № 67. – P. 19 – 25. Sakata R., Segava Shoji, Morita H. Tenderization of hog casings. Appli-

- cation of organic acids and proteases. //Fleischwirtschaft. – 1998. – V. 78. – N 6. – P. 703–704.
92. Tomizawa T. Food containing protein hydrolyzates of the squid. // Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 10 113,152 [98 113,152] (Cl. A23L1/333), 6 May 1998.
 93. Linder Michel, Rozan P., Lamghari El. Kossori R., Janni J., Villaume C., Mejean L., Parmentier M. Nutritional value of veal bone hydrolysate . // J. Food Sci. – 1997. – V. 62. – № 1. – С. 183–189.
 94. Карпо Б.С., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Мосина Г.И., Изучение аминокислотного состава мясных продуктов и гидролизатов боенской крови./В сб.: Тезисы докладов 2-й Всероссийской конференции "Прогрессивные экологически безопасные технологии хранения и переработки сельскохозяйственной продукции для создания продуктов питания повышенной пищевой и биологической ценности", 1-4 октября 1996 г. – Углич, 1996. – С. 226–227.
 95. Практическая химия белка: Пер. с англ./Под ред. А.Дарбре. – М.:Мир, 1989. –С. 291.
 96. Якубке Х.Д.,Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. – М.:Мир, 1985. – С. 262–271.
 97. Amino acids. Tables and charts. Part 4. – Tokyo: Ajinomoto Co., 1990. – 28 p.
 98. Isugita A., Scheffler I.I. A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic and hydrochloric acid //Eur. J. Biochem. – 1982. – V. 124. – N 3. – P. 585–588.
 99. Lisicin A.B., Nekludov A.D., Ivankin A.N., Mosina G.I., Petrakova A.N., Carpo B.S. Investigations of amino acids composition of cattle muscles./ In: " Meat for the consumer", 42-nd ICoMST, 1-6 September, 1996. / Eds K.I.Hildrum, E.G. Larsen. – Lillehammer: MATFORSK, 1996. – P. 334–335.
 100. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. и др. Макрокинетический подход к решению целевой задачи получения аминокислотных смесей пищевого назначения из сырья животного происхождения //Сборник научных трудов. – М.: ВНИИМП, 1999. – С. 110–120.
 101. Levine Rodney L. Rapid benchtop method of alkaline hydrolysis of proteins. // J. Chromatography. – 1982. – V. 236. –N 2. – P. 499 –502.
 102. Konbeck Winfried, Pytrik Heinz. Preparation of mineral salts by electrolytic neutralization and reduction. // Ger. Offen DE 37112825. Оpubл. 03.11.88.
 103. Руководство по методам анализа качества и безопасности пищевых продуктов / Под ред. И.М. Скурихина, В.А.Тутельяна . – М.: Брандес-Медицина,1988. –342 с.
 104. Hart J., Polla Ch., Hull J.C. Oat fractions// Cosmet. Toiletries. – 1998. – V. 113. –N 3. – P. 45–50, 52.
 105. Nadulla A., Braun P., Balzer W.R., Deutz H. Hair dye composition containing beeswax and protein hydrolyzate or amino acids. //Ger. DE N19637966 (Cl. A61K7/13). 12 Feb. 1998.
 106. Hollenberg D., Ehlert M., Goddinger D. Hair conditioners containing carboxamido vinyl polimers. //Ger. Offen. DE 19,540,853 (Cl. A63K7/08). 7 May 1997.
 107. Неклюдов А.Д., Бердугина А.В., Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Осока А.В. Гидролиз кератинсодержащего сырья водными растворами серной кислоты // Прикладная биохимия и микробиология. – 1999. – Т. 35. – № 1. – С. 45–49.
 108. Баер Н.А., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Дубина В.И., Бердугина А.В., Баканов Н.А. //Патент РФ 2112397./ Бюлл. – 1998. – N16.
 109. Morelle J., Lauzanne E., Rothfuss J. Compositions free from proteins and peptides obtained from whole animal protein for cosmetic, pharmaceutical, and agricultural uses.// Fr.Demande FR 2,751,177 (Cl. A23K1/10). 23 Jan. 1998.

110. Неклюдов А. Д., Иванкин А. Н., Бердугина А. В. и др. Получение пищевых гидролизатов из отходов мясопереработки в присутствии ферментов поджелудочной железы // Сб. научных трудов ВНИИМП. – М.: ВНИИМП, 1998. – С.70–78.
111. Martinez S.B., Leary H.L., Nichols D.J. Milk protein partial hydrolysate and infant formula containing same. //Патент США N 5405637. – 1995.
112. Антонов В.К. Химия протеолиза. – М.: Наука, 1984. – С. 113–161.
113. Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. //Dan. Kemi. – 1986. – V. 67. – N 1. – P. 19–25. – V. 67. – N2. – p. 36–43.
114. Schmidl M.K., Taylor S.L., Nordlee J.A. Use of hydrolysate-based products in special medical diets. //Food Technol. –1994. – V. 48. – N 10. – P. 77–80, 85.
115. Неклюдов А. Д., Иванкин А. Н., Бердугина А. В. и др. Получение пищевых гидролизатов из отходов мясопереработки в присутствии ферментов поджелудочной железы // В сб. научных трудов ВНИИМП. – М.: ВНИИМП, 1998. – С.70–78.
116. Охрименко О.В., Власенко Л.М., Толодиков Д.В., Мищадин Д.М. Продукты диетического и лечебного питания. //Молочная промышленность. – 1998. – N 1. – С. 18.
117. Huang X.L., Catignani G.L., Swaisgood H.E. Improved emulsifying properties of β -barrel domain peptides obtained by membrane-fractionation of a limited tryptic hydrolysate of β -lactoglobulin. //J. Agr. and Food Chem. – 1996. – V. 44. – N 11. – P. 3437–3445.
118. Zumbusch P., Kulke W., Brunner G. Elektro-Ultrafiltration von biotechnischen Lösungen.//Chem. Jad.Techn. – 1997. – V. 69. – N 9. – S. 1226–1227.
119. Горская Н. А. Адсорбционная хроматография на активированных углях при получении белковых гидролизатов. /В кн.: Лечебные препараты из крови и тканей. – Л.: Медицина, 1974. – С. 171–173.
120. Samuelsson E.G. A peptide preparation, a process for producing it and use of the peptide preparation. //European patent 0226221. – 1987.
121. Webster J. D., Ledward D. A., Lawrie A. A. Protein hydrolysates from meat industry byproducts. //Meat Science. – 1982. – V. 7. – N 2. – P. 147–157.
122. Flaczyk E. Technological and nutritional aspects of protein hydrolyzates. Part I: Preparation and chemical characterization. //Przem.Spozyw. – 1997. – V. 51. – N 3. – P. 6–31.
123. Бравова Г.Б., Иванова Н.Г., Шишкова Э.А., Сухих О.А., Иншутина Н.Б., Фокина С.С., Эль-Регистан Г.И., Козлова А.Н. Способ получения осветленного экстракта автолизированных дрожжей. //Патент РФ N 94011521/13. / Бюлл. – 1997. – N 20.
124. Джафаров А.Ф., Коршунов Б.А., Мотильская С.П., Щукина Н.И. Способ получения аминокислотного концентрата. //Патент N 93021411/13. / Бюлл. – 1997. – N 27.
125. Nielsen P.M A method of obtaining protein hydrolyzates.// PCT Int. Appl. WO 97 43910 (Cl. A23J3/34). 27 Nov. 1997.
126. Morelle, J.; Lauzanne, E.; Rothfuss, J. Compositions free from proteins and peptides obtained from whole animal protein for cosmetic, pharmaceutical, and agricultural uses. //Fr.Demande FR 2751177 (Cl. A23K1/10). 23 Jan. 1998.

Глава 4

Важнейшие протеолитические ферменты

Характеристика протеолитических ферментов. В настоящее время для получения ферментативных белковых гидролизатов обычно используют ферментные препараты из животного сырья (поджелудочной же-

лезы крупного рогатого скота – ПЖ КРС), содержащие преимущественно эндопротеазы (трипсин и химо tripsин). Использование микробных протеаз нежелательно из-за высокой вероятности попадания токсичных метаболитов, особенно в случае получения продуктов для парентерального питания.

Как следует из вышеизложенного, для гидролиза белков и пептидов применяются различные ферментные препараты, проявляющие протеазную (протеиназную) активность. Оценку протеазной активности проще всего осуществлять по субстрату – казеину (методика 4.1).

Методика 4.1. Определение протеиназной активности ферментных препаратов [1].

*Ряд микробных ферментов, например сериновая протеаза из *Staphylococcus aureus*, имеет молекулярную массу 27000, $E_{280} = 11,5$, оптимум pH 4,0–7,8 по гемоглобину и обладает способностью к специфическому расщеплению полипептидной цепи по COOH-концам аминокислотных остатков Asp или Glu. Ингибиторами протеазы являются диизопропилфторфосфат и некоторые анионы: Cl⁻, F⁻, CH₃COO⁻, NO₃⁻, Br⁻. Многие другие ферментные препараты также обладают пептидазной активностью.*

За единицу пептидазной активности (ЕД) принимается количество фермента, которое высвобождает растворимые аминокислоты эквивалентно изменению скорости поглощения раствора 0,001D₂₈₀ в минуту при температуре 37 °С и pH 7,8.

Реактивы и материалы: 1. 1 %-й раствор казеина в 0,05 М Трис-PO₄ буфере pH 7. Готовят растворением 1 г не содержащего витаминов казеина в 50 мл 0,01 М (0,4 г/л) NaOH. К раствору добавляют 40 мл дистиллированной воды и 5 мл 1 М раствора Триса, который получен растворением 121,14 г трис(гидроксиметил)аминометана NH₂C(CH₂OH)₃ в 1 л воды, устанавливают pH раствора равным 7, добавляя концентрированный раствор H₃PO₄, и доводят общий объем раствора до 100 мл.

2. 10 %-й раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Растворяют 10 г CCl₃COOH в 90 мл воды. 3. 1 мг/мл раствор ферментного препарата. Готовят растворением чистой протеазы или используют клеточные био-препараты. 4. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед, термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 30–40 °С. Воронки с фильтровальной бумагой.

Ход определения. 1. В две пробирки вносят по 5 мл 1 %-го раствора казеина, термостатируют при температуре 37 °С в течение 5 мин, добавляют в 1-ю пробирку 10 мл дистиллированной воды (контроль), во 2-ю – 1 мл раствора ферментного препарата (проба). Добавляемый объем раствора может быть уменьшен до 20 мкл в зависимости от актив-

ности фермента. Пробы перемешивают и выдерживают при температуре 37 °С в течение 10 мин.

2. В обе пробирки добавляют по 5 мл раствора ТХУ, выдерживают в течение 10 мин при комнатной температуре и фильтруют через бумажные фильтры.

3. Измеряют на спектрофотометре значение оптической плотности против контроля.

Рассчитывают значение протеазной активности (A) по формуле: $A, \text{ ЕД/мг} = (D_{280\text{пробы}} - D_{280\text{контроль}})/10g$, где: $D_{280\text{пробы}}$ – $D_{280\text{контроль}}$ – разность значений оптических плотностей растворов пробы и контроля; 10 – время, мин; g – содержание фермента (навеска) во взятом на определение объеме раствора (в 10 мл). При анализе неизвестного ферментного раствора допускается вместо значения g использовать значение объема раствора, тогда найденная активность будет выражаться в ЕД/мл.

Однако для промышленных целей целесообразно использовать дешевые и доступные ферменты, обладающие к тому же высокой активностью. Среди протеаз к таким ферментам относится протосубтилин ГЗх, а в качестве источника пептидаз можно рассматривать ферментные системы поджелудочной железы свиньи или крупного рогатого скота. Именно эти ферментные препараты чаще всего используются. Рассмотрим их более подробно.

Протосубтилин представляет собой комплексный ферментный препарат протеолитического действия, продуцируемый микробной культурой *Bacillus subtilis*. Содержит в своем составе комплекс нейтральных и щелочных протеаз, в том числе нейтральных – 70 ед/г, α -амилазу – 5 ед/г, β -глюканазу – 40 ед/г, целлюлазу – 1 ед/г, ксиланазу – 1 ед/г. Входящая в состав протосубтилина нейтральная протеаза – один из наиболее активных протеолитических ферментов, гидролизующих высокомолекулярные белки до олигопептидов [2 – 4].

Поджелудочная железа является крупной пищеварительной железой, обладающей внешнесекреторной (экзокринной) и внутрисекреторной (эндокринной) функциями, участвует в пищеварении и регуляции углеводного, жирового и белкового обмена [5 – 8]. Эти процессы обеспечиваются тремя основными группами ферментов – протеолитическими, амилолитическими и липолитическими. Среди протеолитических ферментов для нас наибольший интерес представляют трипсин и химотрипсин.

Трипсин – это эндогенный протеолитический фермент, разрывающий пептидные связи в молекуле белка. Расщепляет также высокомолекулярные продукты распада белков, полипептиды типа пептонов, а также некоторые низкомолекулярные пептиды, содержащие определенные аминокислоты (аргинин, лизин). Трипсин представляет собой белок с относительной молекулярной массой около 21000 Da. Образуется в поджелудоч-

ной железе млекопитающих, где содержится в виде неактивного трипсиногена; переход последнего в трипсин происходит под влиянием другого фермента – энтерокиназы, а также под воздействием самого образовавшегося трипсина. Фермент активен при рН 5,0–8,0 с оптимумом активности при рН – 7,0 [9].

Удельная активность трипсина зависит от метода количественного определения. Наиболее часто для количественной характеристики фермента используют синтетический субстрат (методика 4.2).

Методика 4.2. Определение удельной активности очищенного кристаллического трипсина [1].

Трипсин, выделенный из панкреатического сырья хроматографическими методами, является протеолитическим ферментом, имеет молекулярную массу 23800, оптимум рН 8, изоэлектрическую точку 10,5; $E_{280} - 1,3$ и обеспечивает гидролиз (расщепление) полипептидной цепи белка по С-концам аминокислотных остатков лизина Lys и аргинина Arg. В этом проявляется специфическое действие трипсина. Фермент активируется в присутствии ионов Ca^{2+} и ингибируется диизопропилфторфосфатом и ионами Ag^+ .

*Реактивы и материалы: 1. 0,46 М Трис-НСI/0,0115 М $CaCl_2$ буфер рН 8,1. Готовят растворением 55,7 г трис(гидроксиметил)аминометана $NH_2C(CH_2OH)_3$ и 2,5 г $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,5 л воды, устанавливают рН раствора равным 8,1, добавляя конц. раствор НСI, и доводят общий объем раствора до 1 л. 2. 0,01 М раствор *n*-толуолсульфонил-L-аргинина метилового эфира (ТАМЕ). Готовят растворением 3,789 г ТАМЕ $C_{14}H_{22}N_4O_4S \cdot HCl$ в 1 л дистиллированной воды. 3. 0,001 М раствор НСI. 4. Раствор трипсина. Готовят растворением 10 мкг фермента в 1 мл 0,001 М раствора НСI. 5. Спектрофотометр с кюветами 1 см. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл, пробирки, градуированные пипетки. Холодильник или лед. Воронки с фильтровальной бумагой. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20–30 °С.*

Ход определения. Вносят в 2 кюветы по 2,6 мл 0,46 М Трис-НСI/0,0115 М $CaCl_2$ буфера и 0,3 мл 0,01 М раствора ТАМЕ, инкубируют в термостате при температуре 25 °С в течение 3 мин. Во 2-ю кювету добавляют 0,1 мл 0,001 М раствора НСI (контрольная проба), в 1-ю кювету вносят 0,1 мл раствора фермента и измеряют при 247 нм изменение значение оптической плотности D против контрольной пробы в течение первых 3 мин после внесения раствора фермента.

Вычисляют значение удельной активности трипсина A (ЕД/мг) по формуле: $A, \text{ЕД/мг} = (\Delta D_{247}/\text{мин} \cdot 1000 \cdot 3) / 540 \cdot g$, где $\Delta D_{247}/\text{мин}$ – изменение значения оптической плотности в единицу времени; g – количество трипсина в мг, содержащееся в 0,1 мл пробы взятой в кювету на анализ.

Коммерческие препараты высокоочищенного трипсина имеют, как правило, удельную активность более 170 ЕД/мг по субстрату ТАМЕ.

Исследования строения активного центра трипсина ведутся достаточно давно. Так, авторы работы [10] получили некоторые данные о природе групп в активном центре трипсина и тромбина. Эти данные были получены на основе анализа зависимостей pK_m и $\log V_{max}$ от pH среды. Соответствующие зависимости были получены как для свободных ферментов, так и в присутствии ионов Ca^{2+} и Ni^{2+} . Было установлено, что активный центр каждого из этих ферментов образован тремя и более группами атомов, которые обуславливают образование фермент-субстратных комплексов и разложение субстрата. Некоторые из этих групп одинаковы для обоих ферментов, а некоторые специфичны для каждого из них.

Дальнейшие исследования различий в FT-IR спектрах «трипсин+ингибитор» были использованы для изучения процесса переноса протонов в активном центре сериновых протеаз, к которым относится трипсин. Модификация участка “Ser – 195” ясно показана путем различия в спектрах трипсина и ангидротрипсина. Эта модификация изменяет взаимное расположение участков Asp – 102 и His – 57. При pH – 3,0 протон в $OH-N=O$ H^+ – N водородной связи связывается с Asp – 102 в ангидротрипсине, тогда как у трипсина наблюдается уменьшение количества протонированного His – 57. Это показывает, что в данном случае равновесие смещается вправо [11].

Прямая информация о каталитическом механизме взаимодействия участков серина, аспарагиновой кислоты и гистидина была получена путем анализа спектров, полученных при взаимодействии трипсина и ангидротрипсина с ингибиторами.

В случае трипсина комплекс тетраэдрического интермедиата при pH 3,0 не образуется. Он, однако, частично образуется при pH 7,0. При pH 7,0 равновесие реакции образования интермедиата смещается вправо. В этом случае His – 57 протонирован. Он остается таковым благодаря сильному влиянию His – 57 – Asp – 102 водородной связи. В результате такого расположения в пространстве активного центра водородная связь сильно поляризована. Это очень важный этап при осуществлении следующего этапа процесса – распада фермент-субстратного комплекса.

В настоящее время уже точно установлено, что активный центр сериновых протеаз состоит из остатков His – 57, Ser – 195, Asp – 102 (рис. 4.1) [12].

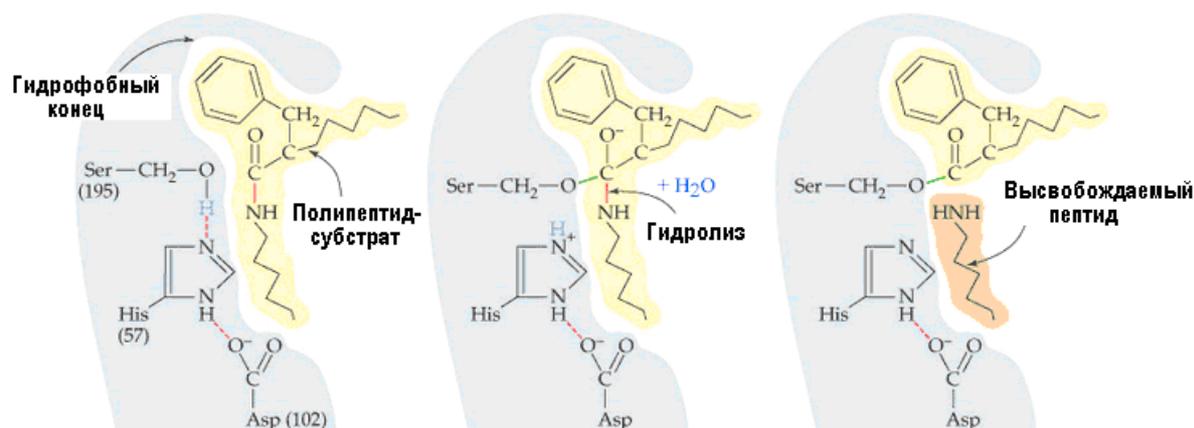


Рис. 4.1. Механизм действия сериновых протеаз (трипсина)

Существование кристаллической структуры сериновых протеаз не дает полного ответа на ряд фундаментальных вопросов, касающихся их каталитической активности. В работе [13] была поставлена задача изучить пространственную структуру активного центра трипсина внутри него самого, а также окружающей его части молекулы. Было установлено наличие классических водородных связей C – O – H между ацетат-ионами. Существование большой компактной молекулы в водной среде авторы связали с расположением остатка Asp – 184 внутри активного центра. Было также показано, что на одном участке молекулы находится связь сульфат-иона и ацетат-иона. Связь Ser–195-C^β-O^γ-His–57 в каталитической реакции образования фермент-субстратного комплекса является промежуточной между соответствующими связями ES-комплекса и нативной молекулой. На рис. 4.1 представлен известный к настоящему времени механизм действия сериновых протеаз, который предполагает образование тетраэдрического переходного состояния в виде интермедиата ацил-фермента.

Химотрипсин является протеолитическим ферментом, образующимся в поджелудочной железе млекопитающих. В соке поджелудочной железы содержится в неактивном состоянии в виде химотрипсиногена А и В, которые активизируются под влиянием трипсина, причем из химотрипсиногена А образуется ряд форм: *a*-, *v*-, *g*-, *s*- и *p*-химотрипсина, а из химотрипсиногена в – химотрипсин В. Все формы химотрипсина близки по ферментативным свойствам, но отличаются активностью. *a*-Химотрипсин является белком с молекулярной массой 21600–27000 Да. Подобно трипсину гидролизует белки и пептоны с образованием пептидов. В отличие от трипсина расщепляет преимущественно связи, образованные остатками ароматических кислот (тирозин, триптофан, фенилаланин). В некоторых случаях химотрипсин осуществляет более глубокий гидролиз белка, чем трипсин. Он также более устойчив по сравнению с трипсином и медленнее инактивируется [14].

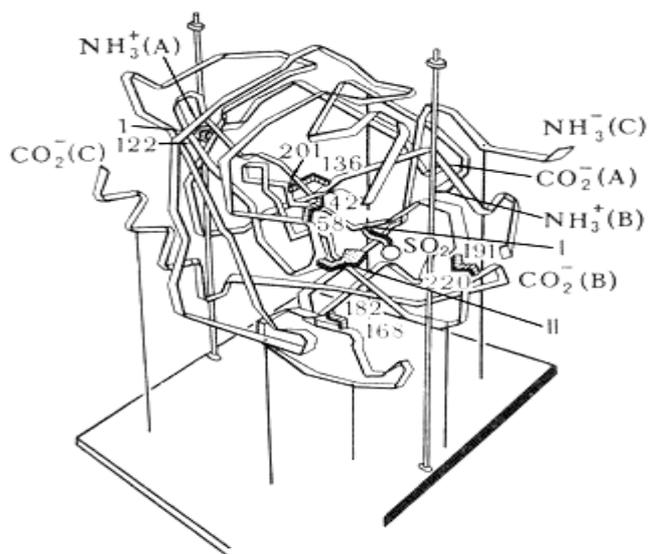


Рис. 4.2. Строение активного центра химотрипсина

Методами рентгеноструктурного анализа удалось установить пространственное строение химотрипсина (рис. 4.2). Каталитическая роль химотрипсина обусловлена наличием в активном центре молекулы системы переноса заряда, образованной тремя сближенными в пространстве аминокислотными остатками гистидина (His - 57), серина (Ser - 195), аспарагиновой кислоты (Asp - 102). Ключевую роль в этой системе выполняет His-57 за счет кислотно-основных свойств имидазольного кольца [14].

На поверхности молекулы есть углубление, устланное неполярными гидрофобными группами. Форма и размер этого углубления точно соответствует наиболее крупному боковому радикалу аминокислотного остатка триптофана. Благодаря стремлению гидрофобных связей сомкнуться так, чтобы контакт с водой был минимальным, боковой радикал триптофана входит в углубление на поверхности фермента. При этом остов цепи ориентируется таким образом, что пептидная группа, следующая за остатком триптофана, оказывается в непосредственной близости от оксигруппы бокового радикала серина, также входящего в активный центр химотрипсина.

В обычных условиях такая оксигруппа не реагирует с группами $=CO$ или $=NH$, однако, в активном центре она находится в окружении имидазольных колец – боковых радикалов гистидина. В этих условиях она приобретает нуклеофильные свойства и вступает в реакцию с карбонильной группой $=CO$ пептидной связи. Последняя разрывается, и освобожденная часть атакуемой белковой молекулы следующей за остатками триптофана, уходит. Вновь образовавшаяся эфирная связь $-O-C=O$ в окружении остатков гистидина также оказывается непрочной и вскоре от молекулы фермента отделяется и другая часть белковой молекулы.

К гидролитическим ферментам, часто применяемым в последнее

время для гидролиза субстратов животного или морского происхождения, относятся коллагеназы, которые выделяют из животного или микробного сырья [15]. Полученные коллагеназы обладают слабой протеолитической активностью и выраженной коллагенолитической (методика 4.3 и 4.4).

Методика 4.3. Количественное определение коллагенолитической активности [1]. За единицу коллагенолитической активности принимают такое количество фермента, которое при взаимодействии с N α -бензоил-D,L-аргинина-p-нитроанилидом (BAPNA) в течение 30 мин при pH 7,5 и температуре 37 °C увеличивает оптическую плотность раствора на 1,0 при длине волны 410 нм.

Оборудование и материалы: спектрофотометр на 410 нм. Микропипетки на 0,1–10 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Колбы мерные вместимостью 25, 100 мл. Цилиндры мерные вместимостью 25 и 100 мл. Пробирки вместимостью 10 мл с пришлифованными пробками. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20–40 оС

Реактивы: стандартный раствор коллагеназы (ГСО). N α -бензоил-D,L-аргинина-p-нитроанилид (BAPNA), 1 мг/мл раствор BAPNA в 0,05 М трис-HCl буферном растворе pH 7,5. Уксусная кислота, 30 % раствор. Соляная кислота хч, 0,1 М раствор из фиксанала. Кальция хлорид, хч. Диметилформамид хч. Вода дистиллированная.

Подготовка к работе: 0,05 М трис-HCl буферный раствор pH 7,5 готовят в мерной колбе на 100 мл растворением 2,43 г трис(гидроксиметил)аминометана (трис) в 90 мл воды и доводят объем раствора до 100 мл (раствор А). 5 мл полученного раствора А вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 45 мл 0,1 М раствора HCl и доводят объем раствора до 100 мл. В полученном растворе устанавливают pH 7,5 добавлением 0,1 М раствора HCl или раствором А и прибавляют 11,1 г кальция хлорида до растворения. Срок хранения раствора при 7 °C 10 сут.

0,1 % раствор ферментного препарата готовят в мерной колбе на 25 мл растворением навески 0,025 г фермента в 20 мл 0,05 М трис-HCl буферного раствора pH 7,5 и доводят объем буфером до 25 мл. Срок хранения раствора при 7 °C 8 ч.

Раствор N α -бензоил-D,L-аргинина-p-нитроанилида (BAPNA) готовят в мерной колбе на 25 мл растворением навески 0,025 г BAPNA в 1 мл диметилформамида и доводят объем раствора субстрата 0,05 М трис-HCl буферным раствором pH 7,5 до 25 мл. Срок хранения раствора BAPNA при 7 °C 48 ч.

Ход определения: в четыре пробирки вместимостью 10 мл вносят пипеткой по 0,5 мл 1 мг/мл раствора BAPNA в 0,05 М трис-HCl буферном растворе pH 7,5 и помещают в термостат с температурой 37 °C на

10 мин в пробирки 1 и 2 пипеткой добавляют 0,1 мл 0,1 % раствора испытуемого препарата и 0,1 мл стандартного раствора коллагеназы.

Все пробирки перемешивают и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 3 мин. Через 30 мин во все четыре пробирки пипеткой прибавляют по 1 мл 30 % раствора уксусной кислоты, а в пробирки 3 и 4 пипеткой вносят 0,1 мл 0,1 % раствора испытуемого препарата и 0,1 мл стандартного раствора коллагеназы ГСО соответственно.

В пробах определяют значение оптической плотности при длине волны 410 нм в слое 1 см. В качестве сравнения используют раствор пробирок 3 и 4.

Коллагенолитическую активность коллагеназы X (ЕД/мг) вычисляют по формуле: $X = A_{СТ} \cdot (D_1 / D_2) \cdot (P_2 / P_1)$, где D_1 и D_2 – значения оптических плотностей растворов пробирок 1 и 2 соответственно; P_1 и P_2 – разведения 0,1 % растворов препарата и коллагеназы соответственно; $A_{СТ}$ – коллагенолитическая активность ГСО коллагеназы, ЕД/мг.

Удельную коллагенолитическую активность препарата на мг белка (A , ЕД/мг белка) определяют по формуле: $A = X / B$, где B – содержание белка в мг протеина на мг ферментного препарата. Удельная коллагенолитическая активность ферментного препарата по нормативным требованиям должна быть не менее 20 ЕД/мг белка.

Методика 4.4. Количественное определение коллагенолитической активности коллагеназы по оксипролину [1, 2].

За единицу коллагенолитической активности принимают такое количество фермента, которое при воздействии на субстрат (коллаген) в условиях опыта в течение 1 мин при температуре 37 °С выделяет 1 мкм оксипролина при 540 нм.

Оборудование и материалы. Спектрофотометр на 540 нм. Микропипетки на 0,1–10 мл. Весы аналитические с точностью взвешивания 0,0002 г. Колбы мерные вместимостью 25, 100 мл. Цилиндры мерные вместимостью 25 и 100 мл. Пробирки вместимостью 10 мл с пришлифованными пробками. Термостаты, обеспечивающие поддержание температуры в интервале 0–100 °С и 100–150 °С. Ампулы из термостойкого стекла вместимостью 10–20 мл или пробирка с герметично завинчивающейся тефлоновой пробкой «Пирекс». Стаканчики вместимостью 25 мл. Устройство для фильтрования через бумажный фильтр.

Реактивы. Кислота уксусная ледяная, хч. Натрия ацетат хч. Вода дистиллированная. Тимол крист., чда. Кальция ацетат 0,3 М раствор. Кислота соляная хч, 0,01; 0,1; 6 М раствор. Натрия гидроксид хч, 0,01; 0,1; 6 М раствор. Хлорамин Б. Эфир диэтиловый чда. Пропиловый спирт хч. Этанол, хч. Лимонная кислота хч. *n*-Диметиламинобензальдегид чда, перекристаллизованный из спирта этилового. Хлорная кислота хч, 42 % раствор. Коллаген животный ММ 80 кДа или полученный по методике. Оксипролин хч.

Подготовка к работе. 0,1 М ацетатный буфер рН 5,6. Готовят растворением 0,58 мл уксусной кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до 100 мл (раствор А). 1,36 г ацетата натрия растворяют в небольшом количестве воды в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора до 100 мл (раствор Б). Смешивают растворы А и Б в соотношении 1:8. Срок хранения раствора при 7 °С – 5 сут.

0,3 М раствор кальция ацетата готовят растворением навески 5,28 г ацетата кальция в мерной колбе вместимостью 100 мл в воде и доводят объем раствора до 100 мл. Срок хранения раствора при 7 °С – 5 сут.

Реактив для окисления готовят растворением в мерной колбе вместимостью 25 мл 0,3525 г хлорамина Б в 2,5 мл воды, добавляют 2,5 мл пропилового спирта и доводят объем раствора до 25 мл прибавлением буферной смеси. Буферную смесь готовят растворением в 20 мл воды 5 г лимонной кислоты, 1,2 мл ледяной уксусной кислоты, 12 г натрия ацетата, 3,4 г NaOH, и доводят объем раствора А до метки – 100 мл (рН 6,0). Отдельно смешивают 30 мл пропилового спирта с 20 мл воды, получая раствор Б. Смешивают растворы А и Б в соотношении 2:1. Реактив для окисления готовят перед использованием.

Реактив для проведения цветной реакции готовят суспензированием в мерной колбе вместимостью 25 мл 2,5 г п-диметиламинобензальдегида в 15 мл пропанола, прибавляют 6,5 мл 42 %-ного раствора HClO₄, доводят объем раствора до 25 мл прибавлением пропанола. Реактив для проведения цветной реакции готовят перед использованием.

Подготовка коллагена. Парные или свежесзамороженные ахилловы сухожилия крупного рогатого скота, очищенные от посторонних тканей, гомогенизируют с 4 объемами воды при 5 °С в течение 2 мин. Выделение коллагена проводят при указанной температуре. Полученную массу экстрагируют (3 x 2 ч) 10 объемами 1 % раствора NaCl до отрицательной пробы на растворимые белки в экстрагенте.

Пробу на белок проводят, добавляя к 1 мл раствора 1 мл 10 % раствора NaOH и 2 капли 1 % раствора CuSO₄, при взбалтывании не должно быть фиолетового окрашивания.

Экстрагированную ткань отделяют, промывают водой на сите до отрицательной реакции на хлориды. Пробу на Cl⁻ проводят, добавляя к 2 мл раствора 10 капель 1 % раствора AgNO₃, не должно образовываться осадка хлорида серебра.

Отделенную и промытую массу гомогенизируют с 15 объемами 0,1 М раствора NaOH в течение 2 мин и центрифугируют при 5000 G в течение 15 мин. Массу вновь гомогенизируют с 15 объемами

0,1 М раствора NaOH в течение 2 мин и центрифугируют при 5000 G в течение 15 мин. Надосадочные слои сливают. Осадок суспензируют в 50 объемах воды, рН смеси устанавливают 7,0 добавлением 0,1 М раствора HCl. Образовавшийся осадок отделяют от раствора на сите, промывают водой и гомогенизируют в 100 объемах 0,01 М раствора HCl в течение 3 мин. Гомогенат центрифугируют 5 мин при 3000 G, всплывшую пленку отбрасывают, надосадочную жидкость сливают в охлажденную емкость и медленно по каплям нейтрализуют 0,1 М раствором NaOH до рН 7,0.

Волокнистый осадок коллагена отделяют на сите, промывают 3 раза водой, обезвоживают, перемешивая в этаноле в течение 20 мин, в эфире в течение 10 мин и высушивают на воздухе. Срок хранения коллагена при -10°C составляет 6 мес.

Содержание оксипролина в коллагене проводят следующим образом. В две ампулы из термостойкого стекла или пробирки Пирекс помещают навески по 10 мг коллагена и прибавляют по 6 мл 6 М раствора HCl. Ампулы запаивают и проводят гидролиз при 100°C в течение 18 ч. Содержимое ампул количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, нейтрализуют 6 М раствором NaOH до рН 6, доводят объем раствора до 25 мл и фильтруют через бумажный фильтр. Далее содержание оксипролина в коллагене X (% масс.) определяют так, как это описано далее при определении коллагенолитической активности. Расчет проводят по формуле:

$$X = g \cdot 10^{-9} \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100 / 0,5 \cdot 0,01(100-B),$$
 где: $g \cdot 10^{-9}$ – количество оксипролина, найденное по калибровочному графику, моль; 0,5 – объем раствора, взятого для цветной реакции, мл; 0,01 – навеска коллагена, г; B – содержание влаги в коллагене, %. Количество оксипролина в коллагене должно быть $> 0,1\%$.

Для построения градуировочного графика навеску 6,25 мг оксипролина растворяют в мерной колбе в 250 мл воды и получают раствор с содержанием оксипролина $190 \cdot 10^{-3}$ микромоль/мл. Разведения в табл. 4.1.

К содержимому каждой пробирки прибавляют 1 мл реактива для окисления, перемешивают, выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин, затем во все пробирки вносят по 1 мл реактива для проведения цветной реакции, пробирки закрывают пришлифованными пробками, выдерживают при 60°C в течение 15 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры проточной водой и измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм против контрольного раствора. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс общее количество оксипролина в микромолях, а по оси ординат – соответствующие оптические плотности.

Ход определения. Навеску фермента в количестве 10 мг растворяют в 10 мл ацетатного буфера. В две пробирки на 10 мл помещают по 60 мг коллагена, 4 мл раствора ферментного препарата, 1,2 мл раствора ацетата кальция, 0,8 мл ацетатного буфера и несколько кристалликов тимола. Пробирки закрывают пробками и выдерживают при $(37,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч.

Ход определения. Навеску фермента в количестве 10 мг растворяют в 10 мл ацетатного буфера. В две пробирки на 10 мл помещают по 60 мг коллагена, 4 мл раствора ферментного препарата, 1,2 мл раствора ацетата кальция, 0,8 мл ацетатного буфера и несколько кристалликов тимола. Пробирки закрывают пробками и выдерживают при $(37,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч

Таблица 4.1

Разведения растворов для определения оксипролина

№№ п/п	Раствор оксипролина, мл	Вода, мл	Содержание оксипролина, $\text{мкм} \cdot 10^{-3}$
1	0,2	1,8	38
2	0,4	1,6	76
3	0,6	1,4	114
4	0,8	1,2	152
5	1,0	1,0	190
6	1,2	0,8	228
7	1,4	0,6	266
9	1,6	0,4	304
Контроль	0	2,0	0

Остатки коллагена отделяют фильтрованием через бумажные фильтры в пробирки вместимостью 10 мл. По 2 мл фильтрата переносят в ампулы из термостойкого стекла, прибавляют 2 мл концентрированной соляной кислоты, ампулы запаивают на газовой горелке и проводят гидролиз при температуре 110°C в течение 6 ч или при температуре 130°C в течение 3 ч.

После охлаждения содержимое ампул количественно переносят в стаканчики вместимостью 25 мл, нейтрализуют содержимое 6 М раствором NaOH, до pH 6,0, количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки, растворы фильтруют через бумажный фильтр.

В две опытные пробирки с притертыми пробками вносят по 2 мл нейтрализованного раствора, а в две контрольные пробирки – по 2 мл воды. Затем во все пробирки прибавляют по 1 мл реактива для окисления, встряхивают смесь при комнатной температуре в течение 20 мин, вносят по 1 мл раствора для проведения цветной реакции, перемешивают и закрывают пробирки стеклянными пробками.

Пробирки выдерживают при температуре $(60,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ в течение 15 мин, быстро охлаждают до комнатной температуры и не позднее, чем в течение 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 540 нм в толщине слоя 5 см против контрольного раствора.

Расчет. Коллагенолитическую активность коллагеназы в миллиединиц действия X (мЕД/мг) вычисляют по формуле:

$X = A \cdot 10^{-6} \cdot P / 1000g$, где $A \cdot 10^{-6}$ – количество оксипролина, найденное по градуировочному графику в миллимолях (среднее из 2 определений); P – разведение (в условиях опыта $P = 93,75$); g – навеска ферментного препарата, мг.

Разведение оценивают по формуле: $X = V_1 \cdot V_3 \cdot V_5 / V_2 \cdot V_4 \cdot V_6$, где V_1 – объем раствора ферментного препарата, мл; V_2 – объем раствора ферментного препарата, взятый для анализа, мл; V_3 – объем раствора препарата взятый для инкубирования с коллагеном, мл; V_4 – объем раствора ферментного препарата, взятый для кислотного гидролиза, мл; V_5 – объем раствора после нейтрализации, мл; V_6 – объем раствора взятый для цветной реакции, мл.

Активность медицинского препарата с коллагенолитической активностью по ВФС 42–2483–96 составляет не менее 0,8 миллиЕД/мг.

Рассмотрев общие вопросы ферментативного гидролиза, перейдем к описанию некоторых примеров получения белковых гидролизатов из сырья микробного, растительного и животного происхождения.

Список литературы

1. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: ВНИИМП, 2001. – 408 с.
2. Касаткина А.Н. Зерновая дробина как основа для получения биологически активных добавок с пробиотическими свойствами. – автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. – М., 2008.
3. Кочетов Т.А. Практическое руководство по энзимологии – М :Химия, 1989 г.
4. Березин И.В., Мартинек К. Введение в прикладную энзимологию. – М.: МГУ, 1982. – С. 382.
5. Пивненко Т.Н., Жданюк В.М., Эйнштейн Л.М. Способ получения протеолитического комплекса. // Патент РФ № 2034028. Оpubл. 10.04.95. /Бюлл. – 2002. – N7.
6. Cheryan M., Deeslic W.D. Production of protein hydrolysatein ultrafiltration enzyme reactors. // Polym. Sci Technol. – 1980. – V.13. – P. 591–601.
7. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Мосина Г.И. Свойства и получение белковых гидролизатов. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т.32. – N 2. – С. 231–236.
8. Васильев П.С., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Осока А.В. Определение макрокинетических констант кислотного гидролиза кератинсодержащего сырья. // В сб. Тез. докл. Международной конф. Лечебно-профилактическое и детское питание. – С. Петербург, 1996. –С.83.

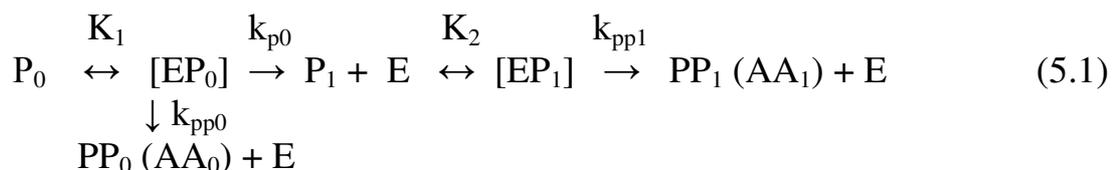
9. Калашникова Н.А., Гребешкова Р.Н., Виноградова И.Н. Получение белковых гидролизатов с использованием микробных протеолитических ферментов. // В кн. Новое в получении и приготовлении ферментов. – М.: Наука, 1978. – 412 С.
10. Jursh Louis B., Mikelvy Jeffrey F. An aminopeptidase from bovin brain wich catalized the hydrolysis of enkefalin. // J. Naturochem. – 1981. – V. 36. – №1. – P. 171 – 178.
11. Zamost Bruce L., Brantlay Ountin J., Elm Dana D., Reck Carol M. Production and characterisation of a termostable protease produced by an asparagenous mutant of Bac. Stearothermophilus. // J. Ind. Microbion. – 1990. – V. 5. – №5. – P. 303 – 312.
12. Ronwin E. The active center of thrombin and trypsin. // Biochimica et Biophysica acta. – V. 33. – № 2. – 1959. – P. 326 – 332.
13. Weller N., Zundel G. Proton tranfer processes in the hydrogen – bonded structure of the active centre of serine proteases – ann FT–IR study. // J. of Molecular structure. – V. 317. – № 3. – 1994. – P. 249 – 259.
14. Johnson A., Gautham N., Pathabhi V. Crystall structure at 1,63 Å resolution of the native form of porcine β -trypsin; revealling an acetate ion binding site and functional water network. // J. Protein Structure and Molecular Enzymology. – V. 1435. – № 1 – 2. – 1999. – P. 7 – 21.
15. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Коллаген: получение, свойства и применение: монография. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. – 336 с

Глава 5

Количественные закономерности ферментативного гидролиза белковых веществ на модельной системе бычий сывороточный альбумин (БСА) – трипсин

В ходе исследований количественных закономерностей процесса ферментативного гидролиза БСА трипсином, прежде всего, была изучена зависимость выхода растворимых низкомолекулярных (НМФ) и распада высокомолекулярных (ВМФ) белковых фракций во времени от температуры (30–60 °С), соотношения масс фермента и субстрата (1:25–1:200), рН среды (4,0 – 7,0) и исходной концентрации субстрата (10 – 100 г/л). Концентрации ВМФ и НМФ белковых веществ, оценивали, используя свойство первых образовывать осадки с трихлоруксусной кислотой (ТХУ). На рис. 5.1 в координатах выход (X) – время приведены кинетические кривые гидролиза БСА трипсином и накопления НМФ белка, из которого следует, что вид полученных зависимостей типичен для ферментативных реакций.

Последовательное изучение влияния начальной концентрации субстрата, начальной активности фермента в растворе, температуры и рН среды на скорость процесса позволило установить, что максимальные ее значения наблюдаются в интервале температур 40–50 °С и показателя рН среды 5,5 – 6,5. По аналогии с ранее изученными закономерностями серно-кислотного гидролиза БСА [1] можно предположить, что и в данном случае реализуется та же схема последовательно-параллельных превращений, но с учетом специфики ферментативного катализа:



где: P_0 , P_1 , $[EP_0]$, $[EP_1]$, $PP_0 (AA_0)$, $PP_1 (AA_1)$, E – концентрации соответственно исходного белка, промежуточного интермедиата ВМФ, комплекса трипсина с ВМФ БСА и интермедиатом, НМФ белковых веществ, свободного фермента, K_1 и K_2 – константы равновесия образования комплексов $[EP_0]$ и $[EP_1]$, k_{p0} , k_{pp0} , k_{pp1} – константы скорости отдельных стадий ферментативного гидролиза.

Влияние начальной концентрации фермента на начальную скорость гидролиза представлено на рис. 5.2, из которого следует, что линейный участок наблюдается в интервале активностей фермента в растворе от 0 до 8750 ед./г. Этот интервал и был принят в дальнейшем в качестве рабочего. Обработка серий кинетических кривых, полученных при разных начальных концентрациях субстрата в области линейной зависимости скорости гидролиза от внесенного в среду фермента, выполненная в координатах Лайнуивера-Берка, позволила оценить численные значения равновесной константы K_1 и кинетических k_{pp0} и k_{p0} в качестве основных параметров гидролиза белка. После проведения оптимизации их значения были сведены в табл. 5.1.

Схема превращений 5.1, как оказалось, не в состоянии адекватно описать даже начальные участки кинетических кривых, выполненных при постоянной концентрации субстрата и разных начальных активностях трипсина. Рассчитанные значения концентрации ВМФ белков, отвечающие времени ферментализации 10 – 20 мин, располагаются ниже экспериментальных. Наблюдаемый факт связан, вероятнее всего, с ингибированием фермента. Общеизвестно, что в ингибировании ферментов могут участвовать продукты реакции, а также происходить другие нежелательные превращения, приводящие к инактивации фермента или фермент-субстратных комплексов. Поэтому необходимо было провести последовательную проверку этих факторов, чтобы в дальнейшем дополнить выбранную схему превращений соответствующими уравнениями.

Экспериментальная проверка возможности ингибирования трипсина продуктами гидролиза белков была осуществлена путем проведения ферментализации БСА трипсином в среде, содержащей различные концентрации продуктов гидролиза БСА. Результаты этих опытов показали полное отсутствие влияния последних на скорость исследуемого процесса.

Следующий этап проверки предусматривал возможность инактивации свободного трипсина в ферментационной среде. Эта часть работы была выполнена путем проведения серии экспериментов по гидролизу БСА трипсином, предварительно инактивированным при температуре 90 °С в

течение 5, 10, 15, 20 мин. Соответствующие зависимости расходования ВМФ БСА представлены на рис. 5.3, из которого следует, что с увеличением времени прогрева трипсина наблюдается снижение скорости гидролиза белков. Это свидетельствует о наличии инактивации свободного фермента и позволяет дополнить схему превращений (5.1) уравнением:



где: $E_{н/а}$ – инактивированная форма фермента, а $k_{ин}$ – константа скорости инактивации свободного фермента.

Схема превращений (5.1), объединенная с уравнением (5.2), без учета образования и распада интермедиата P_1 хорошо описывает начальные участки кинетических кривых в сериях пассивных экспериментов, выполненных при различных начальных концентрациях субстрата и фермента. С увеличением степени гидролиза ВМФ БСА расчетные значения выхода НМФ оказываются меньше экспериментальных, что подтверждает наличие дополнительного пути образования НМФ за счет распада интермедиата P_1 . Тогда для адекватного описания процесса гидролиза необходимо найти значения констант K_2 , k_{p0} и k_{pp1} . Найти их возможно в ходе интегрирования системы дифференциальных уравнений, отвечающих схемам превращений (5.1) и (5.2). Такая обработка экспериментальных данных позволила найти значения вышеуказанных констант, которые оставались постоянными в пределах доверительного интервала для полученных серий кривых и адекватно их описывали.

Аналогичные расчеты были проделаны в отношении серий кинетических кривых, полученных при различных температурах и значениях рН среды. В качестве уравнения связи эффективной константы с температурой использовали уравнение Аррениуса, а с рН среды – уравнение специфического кислотно-основного катализа:

$$k_{эфф} = k \cdot (1 + a_H / K_a) \quad (5.3)$$

где: K_a – константа протонирования фермент-субстратного комплекса, a_H – величина активности ионов водорода.

В результате обработки экспериментальных данных путем линеаризации уравнений Аррениуса и (5.3) были установлены значения энергий активации и констант K_a и k^* для каждой стадии в объединенной схеме превращений (5.1) и (5.2). Они приведены в табл. 5.1 и как параметры, количественно описывающие ферментолит БСА, в сочетании с установленной схемой превращений определяют кинетическую схему исследуемого процесса. Полученную кинетическую схему процесса можно использовать для создания алгоритма управления, под которым мы будем понимать математическое описание процесса, позволяющее определить выход продукта при заданных условиях гидролиза, а также условия его проведения для получения заданного выхода. В условиях реального производства матема-

тическое описание, естественно, должно быть оформлено в виде компьютерной программы.

Таблица 5.1

Значения эффективных констант и энергий активации отдельных стадий процесса ферментативного гидролиза БСА трипсином

Путь	Е, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹
k_{p0}	42±3	$(3,53 \pm 0,46) \cdot 10^{-6}$	0,0020 ± 0,0002
k_{pp0}	22±2	$(4,24 \pm 0,16) \cdot 10^{-5}$	0,0082 ± 0,0008
k_{pp1}	18±1	$(1,05 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	0,015 ± 0,002
$k_{ин}$	20±2	$(0,12 \pm 0,02) \cdot 10^{-5}$	0,00023 ± 0,0003
$K_1 = 0,50 \pm 0,05$ л/моль; $K_2 = 0,26 \pm 0,02$ л/моль			

С помощью разработанной для гидролиза БСА трипсином кинетической схемы была доказана двухстадийность данного процесса. Из литературы известно, что аспарагиновая кислота, треонин и метионин образуют в белках легкогидролизуемые связи, а валин – трудногидролизуемые [2, 3]. Поэтому с помощью предложенного математического описания были подобраны условия, обеспечивающие максимальный выход интермедиата P_1 . Ими оказались: температура – 40 °С, рН среды – 6,5, время гидролиза – 1,5 ч. При этом выход интермедиата P_1 достигал 70 % от массы исходного БСА. Полученный продукт был выделен далее путем осаждения в ИЭТ (рН 4,5).

С помощью аминокислотного анализа было установлено, что промежуточный продукт P_1 характеризуется пониженным содержанием аспарагиновой кислоты (в 1,6 раза) и метионина (в 3,6 раза) и повышенным содержанием валина (в 1,7) раза по сравнению с исходным белком (см. табл. 6.2). Наблюдаемые факты подтверждают более низкую скорость гидролиза P_1 по сравнению с исходным БСА (значение эффективной константы k_{pp1} в 4 раза меньше константы k_{pp0}). Кроме того, разработанная кинетическая схема была использована для подбора оптимальных условий процесса гидролиза БСА трипсином. Результаты расчетов с последующей экспериментальной проверкой показали, что при использовании оптимальной для промышленных условий концентрации белка 100 г/л и соотношении фермент: субстрат 1:50 максимальный выход продуктов гидролиза БСА достигается при температуре 40–45 °С, рН 5,8 – 6,2. Однако достигаемая при этом степень гидролиза белков не превышает 36 %, что явно недостаточно.

Из литературных данных известно, что на практике в подобных случаях используется прием дробной загрузки ФП. Полученные данные представлены на рис. 5.4.

Таблица 5.2

Аминокислотный состав БСА и интермедиата Р₁, полученного при гидролизе БСА трипсином

Название аминокислоты	Содержание аминокислоты, г/100 г белка	
	БСА	Интермедиат Р ₁
Аспарагиновая	9,6	6,0
Тирозин	4,1	4,0
Серин	4,6	4,4
Глутаминовая	11,8	12,6
Аланин	4,5	5,1
Валин	8,3	13,3
Метионин	4,5	1,3
Изолейцин	0,8	2,9
Лейцин	10,7	11,3
Треонин	7,7	8,5
Фенилаланин	4,9	4,6
Тирозин	7,1	7,4
Гистидин	5,9	5,2
Лизин	8,2	6,4
Пролин	6,5	7,0

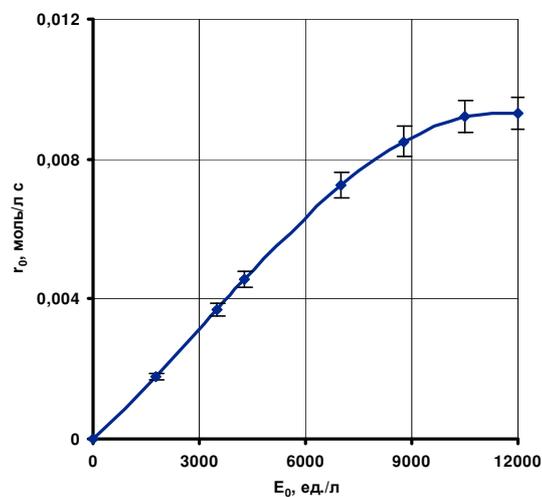
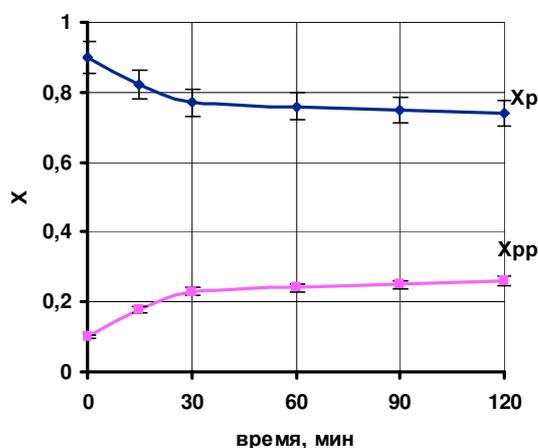


Рис. 5.1. Кинетические кривые расхода ВМФ и накопления НМФ БСА при гидролизе трипсином. Условия: температура – 45 °С, рН 6,0; начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность фермента – 8000 ед./л (2 % по отношению к массе субстрата). Обозначения: X_p, X_{pp} – соответственно доля ВМФ и НМФ в гидролизате от массы белка

Рис. 5.2. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от начальной активности фермента. Условия: температура 45 °С, рН 6,0; начальная концентрация БСА – 100 г/л

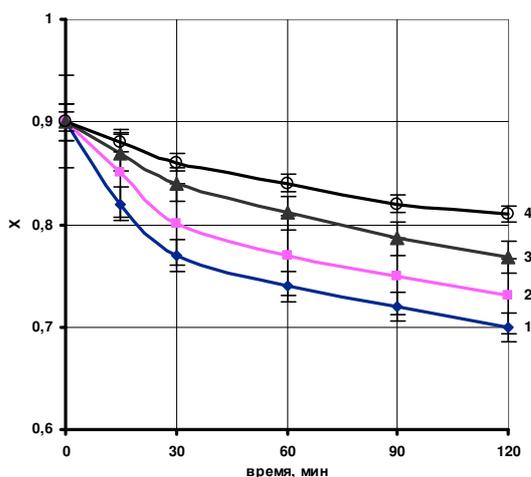


Рис. 5.3. Влияние времени инактивации трипсина при температуре 90°C на кинетику гидролиза БСА трипсином. Условия: температура – 45 °С, рН 6,0; начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л. Обозначения кинетических кривых, отвечающих времени инактивации трипсина при 90 °С: 1 – 0 мин, 2 – 10 мин, 3 – 20 мин, 4 – 30 мин

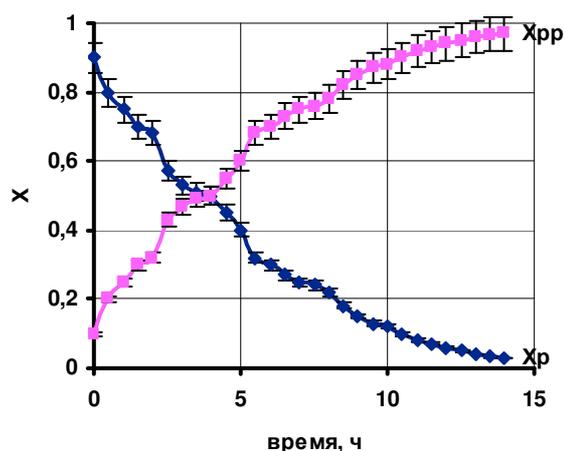


Рис. 5.4. Кинетика расходования субстрата (БСА) и накопления продуктов гидролиза БСА трипсином. Условия: температура – 45 °С, рН 6,0; начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л (2 % от массы субстрата). Обозначения: X_p и X_{pp} – доли соответственно ВМФ и НМФ белковых веществ в гидролизате, момент времени внесения ФП в среду – 2,5 ч

Результаты расчетов, подтвержденные экспериментом, показали, что решение вышеуказанной задачи возможно, если процесс ферментации проводить в изотермическом режиме и рН-стабилизации в оптимальных условиях с периодической загрузкой ФП через каждые 2 ч. При этом число загрузок для гидролизующего БСА должно быть не менее 7.

Полученные данные показывают, что суммарный расход ФП, необходимый для достижения 95 %-ной степени гидролиза белка, составляет 14 % от массы субстрата.

Ввиду того, что трипсин не относится к числу дешевых реагентов, целесообразно разработать пути интенсификации процесса ферментации. Среди всего многообразия способов стабилизации ферментов был выбран прием введения в среду гидролиза стабилизаторов из числа природных соединений, которые не ухудшали бы качества получаемых гидролизатов. В качестве таковых были выбраны вырабатываемые микробными клетками ауторегуляторы, называемые факторами d_1 , которые стабилизируют ферментные системы клетки и обеспечивают ее выживание в анабиозе [4, 5].

Известно, что данные соединения относятся к классу алкилоксибензолов (АОБ). Среди всего многочисленных гомологов АОБ были взяты 4-*n*-гексилрезорцин (C_{12} -АОБ) и 4-метилрезорцин (C_7 -АОБ), поскольку первый является гидрофобным соединением, а второй гидрофильным, вслед-

ствие чего они могут по-разному изменять ферментативную активность в различных средах. Также важными преимуществами вышеуказанных гомологов является доступность и относительно невысокая стоимость.

Из литературных данных известно, что факторы d_1 , внесенные в среду ферментализа в определенных концентрациях, способны смещать, сужать и расширять температурный и рН оптимумы действия фермента.

Поэтому на первом этапе работы было изучено влияние концентрации C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ в диапазоне $1,0 \cdot 10^{-5} - 5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что соответствует мольному соотношению АОБ: фермент 1: 8 – 1: 0,16.

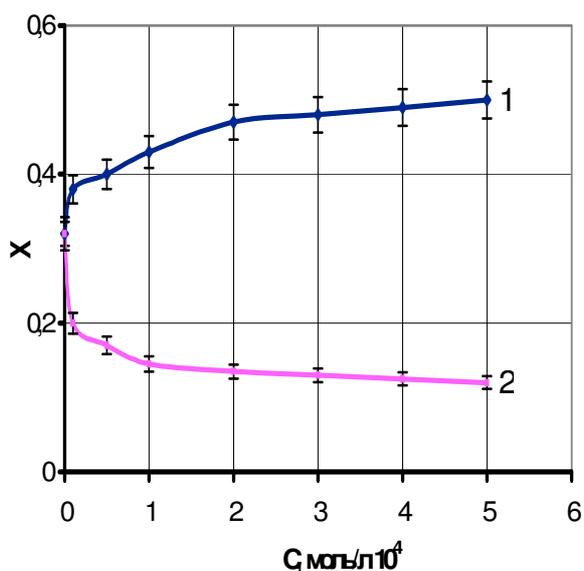


Рис. 5.5. Влияние концентрации химических аналогов ауторегуляторных факторов C_7 -АОБ (1) и C_{12} -АОБ (2) на выход НМФ белковых веществ при гидролизе БСА трипсином. Условия: температура – 45 °С, рН 6,0, начальная концентрация БСА – 100 г/л, активность ФП – 8750 ед./л

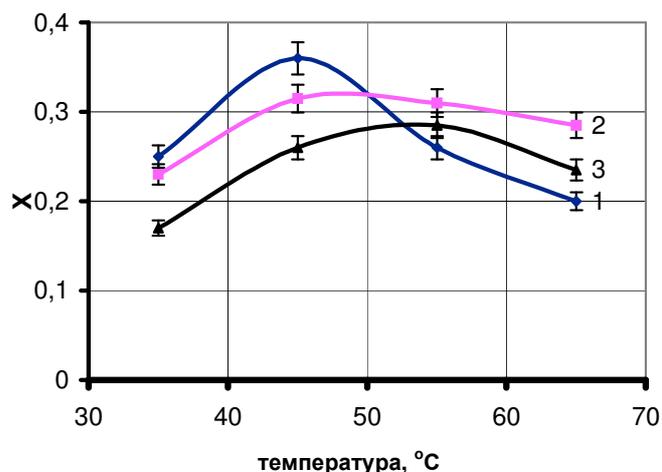


Рис. 5.6. Влияние температуры на выход НМФ белковых веществ при гидролизе БСА в отсутствии (1) и в присутствии химических аналогов C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: рН 6,0, начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Эксперимент проводили в оптимальных условиях гидролиза БСА трипсином, а именно: концентрация БСА – 100 г/л, активность ФП – 8750 ед./л, температура – 45 °С, рН – 6,0. Полученные результаты представлены на рис. 6.5. Из него следует, что введение в среду гидролиза C_7 -АОБ в концентрации $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л (мольное соотношение C_7 -АОБ:ФП – 1:0,16) повышает выход продуктов гидролиза с 35 % до 50 %, (т.е. в 1,43 раза). Что касается C_{12} -АОБ, то во всем исследованном интервале концентраций наблюдается снижение выхода продуктов гидролиза (при концентрации АОБ $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л максимальная степень гидролиза не превыша-

ет 13 %). Однако из представленных данных нельзя сделать однозначный вывод об эффективности применения S_7 -АОБ и S_{12} -АОБ, поскольку эффект воздействия АОБ на активность фермента может быть различным в зависимости от температуры и рН среды.

Поэтому далее было исследовано влияние этих факторов на выход НМФ белковых веществ в присутствии АОБ. Соответствующие экспериментальные данные приведены на рис. 6.6 и 6.7. Из представленных данных следует, что фактор S_7 -АОБ расширяет рН оптимум до величины 7,0, а температурный – до 65 °С. При этом выход продуктов гидролиза при температурах ниже 50 °С снижается в 1,1 – 1,2 раза, а при температурах выше 50 °С – повышается в 1,2 – 1,5 раза. Выход НМФ белков во всем исследованном диапазоне рН повышается в 1,4 раза. S_{12} -АОБ при общей тенденции снижения активности фермента сдвигает оптимум его действия в сторону более высоких температур (70 °С), рН оптимум остается на том же уровне (около 6,0) и расширения его не происходит.

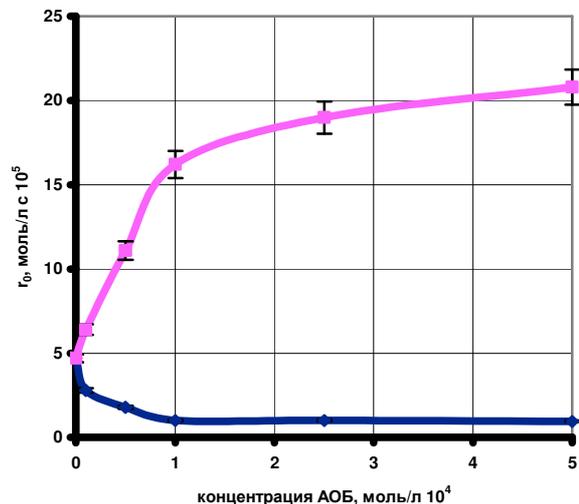
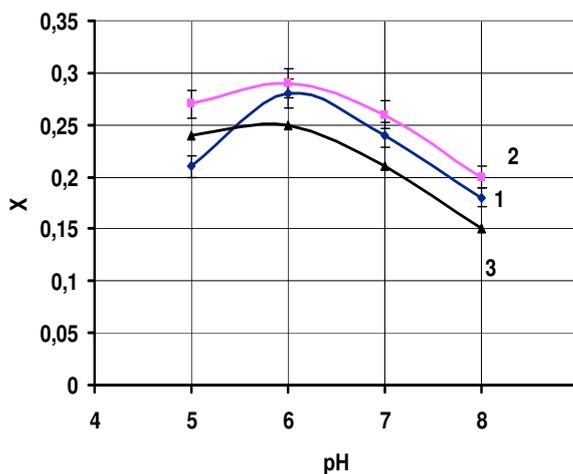


Рис. 5.7. Влияние рН среды на выход НМФ белков при гидролизе БСА в отсутствие (1) и в присутствии S_7 -АОБ (2) и S_{12} -АОБ (3). Условия: температура – 45 °С, концентрация БСА – 100 г/л, активность ФП – 8750 ед./л, концентрация S_7 -АОБ и S_{12} -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Рис. 5.8. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от начальной концентрации АОБ в среде. Условия: температура – 45 °С, концентрация БСА – 100 г/л, активность ФП – 8750 ед./л. Обозначения: 1 – S_7 -АОБ, 2 – S_{12} -АОБ

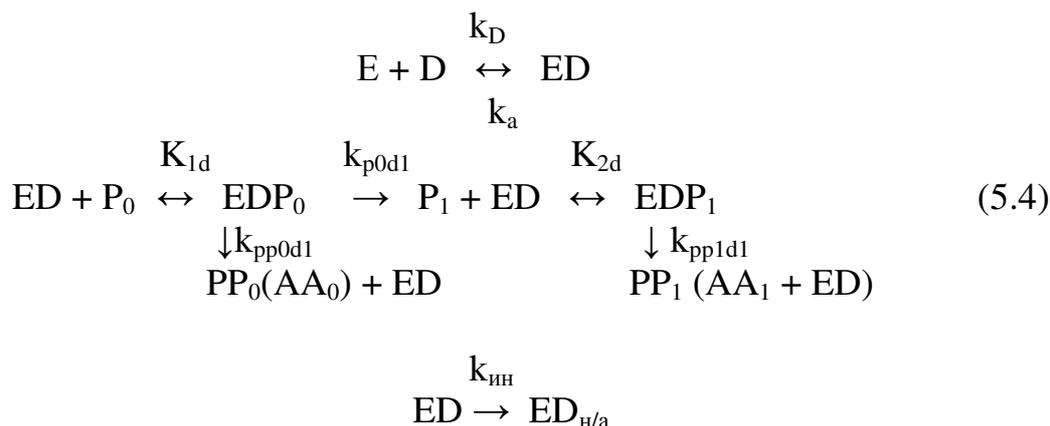
Таким образом, исходя из представленных результатов, можно сделать вывод о том, что использование S_7 -АОБ с целью повышения активности трипсина более перспективно, чем S_{12} -АОБ. Однако окончательные выводы можно сделать только после изучения количественных закономерностей взаимодействия факторов АОБ с ферментом и субстратом.

Для разработки кинетической модели исследуемого процесса необходимо было предположить возможные типы взаимодействий между 3-мя компонентами системы: субстратом, ферментом, АОБ. Расчет молярных концентраций БСА, трипсина и АОБ, отвечающих условиям максимального воздействия АОБ на ферментолит, показал, что они составляют соответственно $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $9,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л и $1,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Таким образом, концентрации компонентов сопоставимы по величине, поэтому говорить о химическом взаимодействии между ними вполне правомерно.

На рис. 5.8 – 5.10 представлены зависимости аналогичные рис. 5.4 – 5.7, на которых представлено влияние концентрации АОБ на начальную скорость ферментативного гидролиза. Из сопоставления представленных данных следует, что эти зависимости аналогичны. Это позволяет сделать вывод о том, что уже на начальном этапе ферментолита между компонентами реакционной системы происходят некие взаимодействия. Для того чтобы установить их, были поставлены эксперименты по взаимодействию 3-х компонентов исследуемой системы попарно, т.е. «трипсин – АОБ» и «БСА – АОБ».

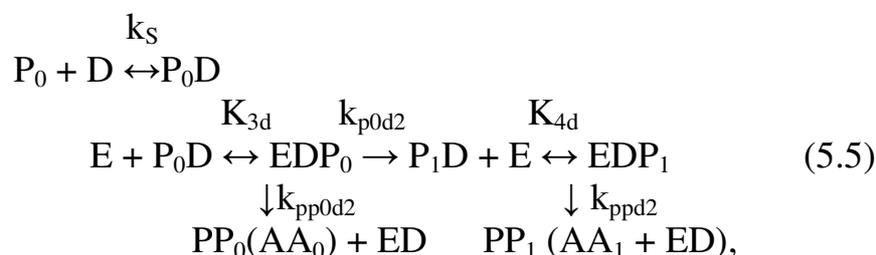
Исследования возможных взаимодействий в системе «трипсин – АОБ» проводились путем изучения прединкубации раствора трипсина (с активностью 8750 ед./л) и С₇-АОБ с концентрацией $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л в течение 0 – 20 мин. По истечении времени прединкубации полученный раствор добавляли к субстрату, и проводили ферментативный гидролиз в ранее подобранных оптимальных условиях. На рис. 5.11 представлены зависимости начальной скорости гидролиза БСА от времени прединкубации d_1 с трипсином. Анализируя полученные зависимости, можно заметить, что в обоих случаях при малом времени прединкубации наблюдается заметное снижение начальной скорости гидролиза по сравнению с контролем (отсутствие прединкубации). Это позволяет сделать предположение о том, что в начальный момент времени фермент образует с фактором d_1 интермедиат (ED), который способен катализировать гидролиз субстрата с иной скоростью, чем свободный фермент.

При образовании интермедиата часть молекул фермента обратимо взаимодействует с АОБ и не участвует непосредственно в ферментолите. Это и приводит к снижению скорости ферментолита при малом времени прединкубации. С увеличением времени прединкубации наблюдается увеличение скорости гидролиза выше уровня контроля. Это объясняется, вероятно, тем, что образовавшийся интермедиат обладает ферментативной активностью и способен превращать субстрат в продукт. Наблюдаемые закономерности могут быть представлены в виде следующей схемы превращений:



где: D , ED , EDP_0 , EDP_1 – концентрации, соответственно, АОБ, интермедиатов фермента с АОБ, субстратом, интермедиатом P_1 ; k_{p0d1} , k_{pp0d1} , k_{pp1d1} , k_a , k_D – эффективные константы скоростей соответствующих стадий; K_{1D} , K_{2D} – константы равновесия образования интермедиатов EDP_0 , EDP_1 .

На рис. 5.12 приведены зависимости начальной скорости гидролиза БСА трипсином от времени прединкубации БСА с C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ. Полученные зависимости также позволяют сделать предположение о наличии взаимодействий между субстратом и АОБ. Характер зависимостей свидетельствует о том, что в начальный момент гидролиза происходит образование некоего интермедиата субстрата с АОБ, который в дальнейшем подвергается расщеплению ферментом, что может быть выражено схемой превращений:



где: P_0D , EP_0D , EP_1D – концентрации интермедиатов АОБ с субстратом, ферментом, интермедиатом P_1 ; k_{p0d2} , k_{pp0d2} , k_{pp1d2} , k_S – эффективные константы скоростей соответствующих стадий; K_{3D} , K_{4d} – константы равновесия образования тройного интермедиата.

Дополнение схемы превращений (5.1), (5.2) уравнениями (5.4) и (5.5) и последующая интегральная обработка экспериментальных данных позволила достичь адекватного описания серий кинетических кривых, отвечающих различным начальным концентрациям C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ, а также различным условиям прединкубации фермента и субстрата с факторами. В дальнейшем аналогичным образом была проведена интегральная обработка серий экспериментальных данных, отвечающих различным температурам и рН среды для каждого из факторов, в результате чего были найдены все значения эффективных констант, отвечающих схемам превращений

(5.4) и (5.5). Эти значения были обработаны с использованием вышеприведенных уравнений связи констант с температурой и pH среды, в результате чего были найдены параметры кинетической схемы, которые представлены в табл. 5.3.

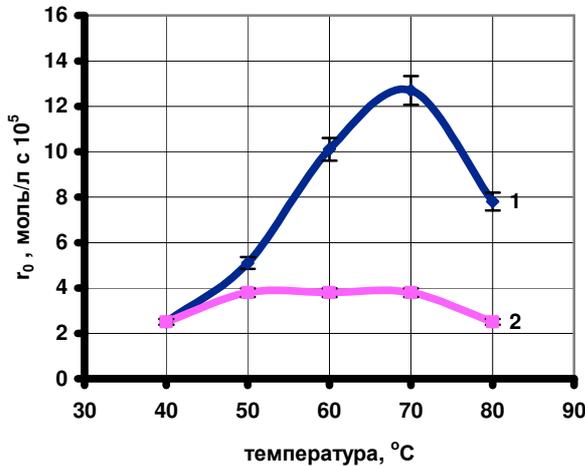


Рис. 5.9. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином в присутствии АОБ от температуры. Условия: pH 6,0; начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л, начальная концентрация АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1 – C₇-АОБ, 2 – C₁₂-АОБ

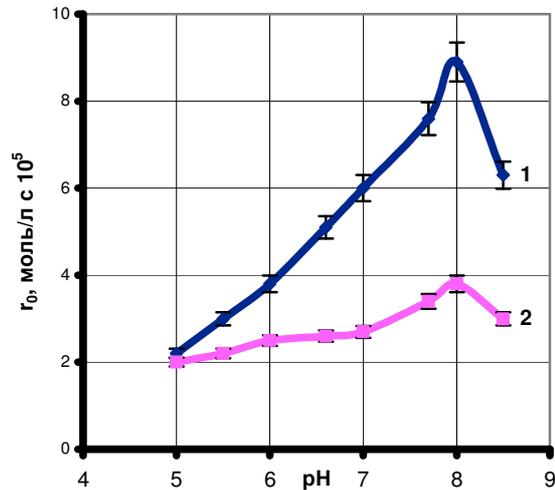


Рис. 5.10. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином в присутствии АОБ от pH среды. Условия: температура 45 °С, начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л, начальная концентрация АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1 – C₇-АОБ, 2 – C₁₂-АОБ

С помощью предложенной кинетической модели для описания процесса гидролиза БСА трипсином мы попытались оценить, какие стадии в схемах превращений (5.1) и (5.2) являются лимитирующими при гидролизе. Было установлено, что определяющее значение имеют стадии образования интермедиатов АОБ – субстрат и АОБ – фермент, из которых далее образуются продукты реакции. Поэтому дальнейшие исследования данного процесса должны быть направлены на подтверждение физико-химическими методами факта образования вышеуказанных промежуточных соединений [1 – 4].

Здесь же рассмотрим только практическое значение факторов d_1 , которое выражается в повышении эффективности ферментативного процесса за счет снижения нормы расхода ФП и (или) сокращения времени ферментативного гидролиза.

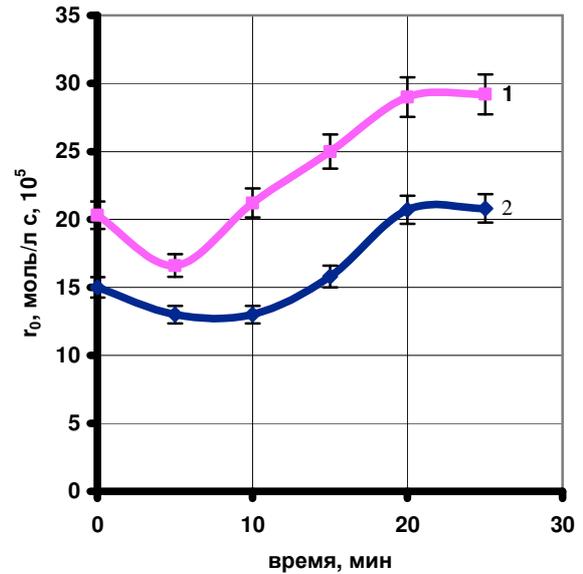
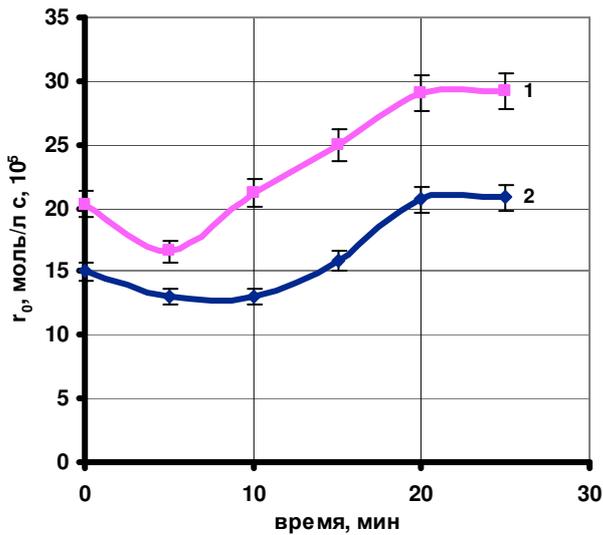


Рис. 5.11. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от времени прединкубации АОБ с ферментным препаратом. Условия: температура – 45 °С, pH 6,0; начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л, начальная концентрация факторов d_1 – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1–С₇-АОБ; 2 – С₁₂-АОБ.

Рис. 5.12. Зависимость начальной скорости гидролиза БСА трипсином от времени прединкубации субстрата с АОБ. Условия: температура – 45 °С, pH 6,0; концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л, начальная концентрация АОБ $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1– С₇-АОБ, 2 – фактор С₁₂-АОБ.

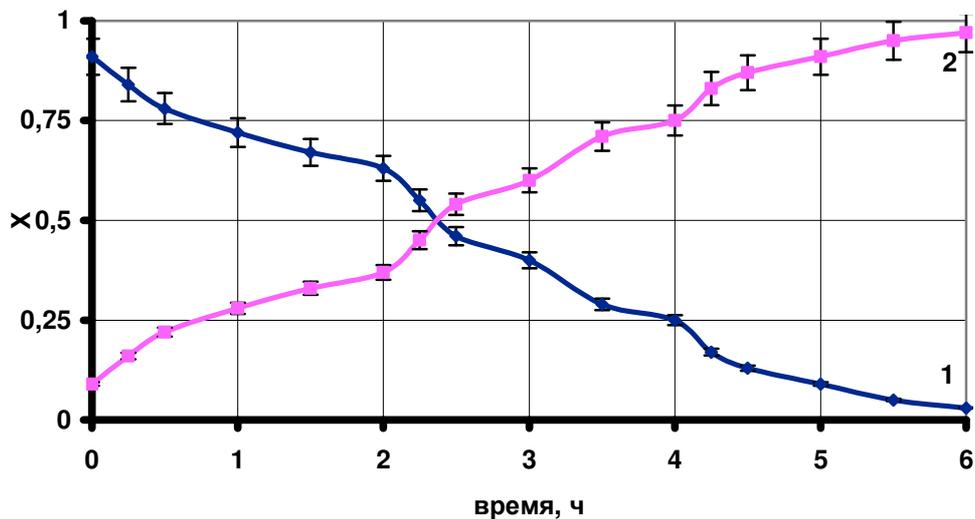


Рис. 5.13. Кинетика расходования субстрата (1) и накопления продуктов гидролиза (2) БСА трипсином в присутствии С₇-АОБ. Условия: температура – 70 °С, pH 6,0; время прединкубации фермента с АОБ и субстрата с АОБ – 15 мин; начальная концентрация БСА – 100 г/л, начальная активность ФП – 8750 ед./л, начальная концентрация С₇-АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Начальный момент времени внесения ФП – 2 ч

Таблица 5.3

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза БСА трипсином в присутствии C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ

Путь	E, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹
C_7 -АОБ/ C_{12} -АОБ			
k_d	26±2/19±1	$(1,27 \pm 0,17) \cdot 10^{-5} / (1,02 \pm 0,13) \cdot 10^{-6}$	$0,30 \pm 0,03 / 4,07 \pm 0,45$
k_a	32±2/24±2	$(6,83 \pm 0,89) \cdot 10^{-6} / (5,47 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$0,0013 \pm 0,0001 / 0,0014 \pm 0,009$
k_s	15±1/17±1	$(2,50 \pm 0,33) \cdot 10^{-5} / (1,0 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	$4,77 \pm 0,52 / 9,15 \pm 0,65$
$k_{pp0,d1}$	17±1/23±2	$(9,37 \pm 1,22) \cdot 10^{-6} / (1,04 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	$0,0055 \pm 0,0006 / 9,15 \pm 0,65$
$k_{pp1,d1}$	16±1/15±1	$(1,59 \pm 0,21) \cdot 10^{-5} / (7,00 \pm 0,91) \cdot 10^{-6}$	$0,0087 \pm 0,001 / 0,0057 \pm 0,0007$
$k_{p1,d1}$	24±2/37±3	$(6,59 \pm 0,86) \cdot 10^{-6} / (1,06 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	$0,15 \pm 0,02 / 0,0085 \pm 0,001$
$k_{pp0,d2}$	18±2/21±2	$(9,37 \pm 1,22) \cdot 10^{-6} / (3,33 \pm 0,43) \cdot 10^{-6}$	$0,0059 \pm 0,006 / 0,0020 \pm 0,0002$
$k_{pp1,d2}$	17±2/14±1	$(1,59 \pm 0,21) \cdot 10^{-5} / (7,00 \pm 0,21) \cdot 10^{-6}$	$0,0093 \pm 0,001 / 0,0052 \pm 0,004$
$k_{p1,d2}$	26±2/34±2	$(6,59 \pm 0,86) \cdot 10^{-6} / (1,06 \pm 0,14) \cdot 10^{-5}$	$0,16 \pm 0,02 / 0,0077 \pm 0,001$
$k_{инд}$	21±2/24±2	$(1,46 \pm 0,14) \cdot 10^{-6} / (3,33 \pm 0,43) \cdot 10^{-6}$	$0,00083 \pm 0,00008$
$K_{1d} = 0,25 \pm 0,02$ л/моль/ $0,25 \pm 0,02$ л/моль; $K_{2d} = 0,15 \pm 0,01$ л/моль/ $0,15 \pm 0,01$ л/моль; $K_{3d} = 0,17 \pm 0,01$ л/моль/ $0,16 \pm 0,01$ л/моль; $K_{4d} = 0,11 \pm 0,01$ л/моль/ $10 \pm 0,01$ л/моль			

Как показали результаты исследований системы БСА – трипсин, для интенсификации данного процесса целесообразно применять C_7 -АОБ, который максимально повышает скорость ферментативного гидролиза при следующих условиях ведения процесса: концентрация C_7 -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, температура 70 °С, прединкубация фермента с C_7 -АОБ – 15 мин.

Для данных условий процесса были рассчитаны кривые гидролиза ВМФ и накопления НМФ белковых веществ, которые представлены на рис. 5.13, и в дальнейшем были подтверждены экспериментально. Из представленных данных следует, что ведение гидролиза БСА трипсином в присутствии фактора C_7 -АОБ позволяет снизить норму расхода фермента в два раза и во столько же раз сократить время гидролиза. Кроме того, удастся повысить температуру процесса до 70°С, что приведет к снижению риска развития посторонней микрофлоры и позволит упростить аппаратное оформление процесса.

Таким образом, представленная кинетическая модель ферментативного гидролиза БСА трипсином в присутствии АОБ является адекватной и может быть использована для интенсификации процесса. Как показали

исследования, данная модель может быть использована для получения белковых гидролизатов на основе сырья различного происхождения. Поэтому далее рассмотрим некоторые примеры получения таких гидролизатов.

Список литературы

1. Красноштанова А.А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности. Дисс... докт.хим.наук. – М.: РХТУ, 2009. – 40 с.
2. А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман. Основы биохимии. /Под ред. Ю.А. Овчинникова. – М.: Мир, 1981.– 3 т. – 1978 с.
3. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: ВНИИМП, 2002. – 408 с.
4. Бердугина А.В., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Миталева С.И. /Сб. науч. трудов ВНИИМП. –М.: Изд-во ВНИИМП, 2001. – С .175 – 190.
5. Антонов В.К. Химия протеолиза. – М.: Наука, 1984. – С. 113– 161.

Глава 6

Ферментативная экстракция белковых веществ из биомассы дрожжей и бактерий в присутствии протосубтилина ГЗх

В качестве сырья для получения белковых гидролизатов целесообразно использовать биомассу микроорганизмов, являющуюся отходом основного производства, например, дрожжи *p. Saccharomyces cerevisiae* (отход пивоваренного производства) и бактерии *p. Brevibacterium flavum* (отход производства аминокислот), которые содержат не менее 50% сырого протеина и до 10% нуклеиновых кислот. При извлечении из микробной биомассы белковых веществ ее подвергали предварительной денуклеинизации по ранее разработанной технологии [1]. Денуклеинизированную биомассу отделяли фильтрованием и направляли на ферментативный гидролиз. Последний проводили в два этапа: на первом осуществляли гидролиз белков протосубтилином с целью расщепления ВМФ белка до пептидом, а на втором этапе – гидролизовали пептиды протеазами ПЖ КРС до аминокислот.

В опытах по экстракции белковых веществ из микробной биомассы протосубтилином изучали зависимость выхода растворимых белковых фракций во времени от температуры (40 – 70 °С), рН среды (6,0 – 8,0), активности ФП в растворе (200 – 1000 ед./л) и содержания сухих клеток в суспензии (2,5 – 10 %).

На рис. 6.1 приведены кинетические кривые экстракции клеточного белка при ферментализе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а на рис. 6.2 – при ферментализе бактерий *Brevibacterium flavum*, протекающих в услови-

ях близких к оптимальным. Из данных рисунков следует, что выход ВМФ белков на протяжении всего процесса экстракции не превышает 10 % от содержания сырого протеина в биомассе. Воздействие протосубтилина в течение 2 ч на клетки дрожжей позволяет выделить из них около 50 % белковых веществ, для клеток бактерий эта величина составляет 30 %. В дальнейшем выход белковых веществ не изменяется. Как показали предварительные исследования, увеличение выхода продукта возможно при дробной загрузке ФП.

Установлено, что для достижения выхода белковых веществ 80 %, в случае дрожжей необходима двукратная загрузка протосубтилина через каждые 2 часа гидролиза, а в случае бактерий – 4-х кратная.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ингибирования протосубтилина, т.е. наблюдается та же самая ситуация, что и в случае гидролиза БСА трипсином. Поэтому стратегия поиска возможной схемы превращений основывалась на результатах анализа данных кинетики ферментативного гидролиза БСА. Ранее проведенные исследования показали, что «глобулины» и альбумины, выделенные из одного источника, гидролизуются с одинаковыми скоростями.

На рис. 6.3 приведены кинетические кривые гидролиза «глобулинов», выделенных из биомассы дрожжей и бактерий в ходе кислотной экстракции белков. Вид полученных зависимостей типичен для ферментативных реакций и аналогичен зависимостям, полученным ранее для гидролиза БСА трипсином.

Поэтому для описания кинетики процесса было предложено использовать ту же схему превращений (5.1). Обработка кинетических кривых в координатах Лайнуивера-Берка позволила оценить численные значения констант k_{p0} , k_{pp0} и K_1 .

Однако эта схема описывала только начальные участки кинетических кривых, что потребовало поиска путей ингибирования фермента.

Экспериментальная проверка возможности ингибирования протосубтилина продуктами гидролиза белков была осуществлена путем проведения ферментализации «глобулинов» протосубтилином в среде, содержащей высокие концентрации (10 – 20 г/л) продуктов гидролиза БСА протосубтилином. Результаты этих опытов показали полное отсутствие влияния продуктов гидролиза белка на скорость исследуемого процесса.

Следующий этап проверки состоял в оценке возможности инактивации свободного протосубтилина, которая проводилась ранее описанным способом. Проведение расчетов с использованием уравнения (6.2) подтвердило наличие термоинактивации свободного фермента. Для достижения адекватного описания кинетических кривых был проведен подбор значений эффективных констант k_{pp1} , K_2 путем численного интегрирования системы дифференциальных уравнений (6.1) и (6.2).

Аналогичные расчеты были проделаны для серий кинетических кривых, отвечающих различным температурам и значениям рН среды. Обработка полученных значений эффективных констант проводилась с использованием тех же уравнений, что и раньше, их рассчитанные параметры приведены в таблице 6.1.

Вид кинетических кривых (отсутствие точек перегиба), представленных на рис. 6.1 и 6.2, позволяет не учитывать ферментолиз белков внутри клетки. Это дает возможность установленную выше схему превращений применить непосредственно для количественного описания процесса обработки суспензий микробных клеток протосубтилином. Результаты обработки экспериментальных данных и последующая проверка адекватности предложенной кинетической схемы показали справедливость ее применения для описания процесса экстракции белков из биомассы дрожжей и бактерий протосубтилином.

Таблица 6.1

Значения констант и энергий активации отдельных стадий в схеме превращений (5.1) и (5.2) для биомассы дрожжей и бактерий

Определяемый параметр	Наименование эффективной константы			
	k_{pp0}	k_{pp1}	k_{p0}	$k_{ин}$
Энергия активации, кДж/моль	$31,4 \pm 2,2$	$17,3 \pm 1,0$	$16,2 \pm 0,9$	$50,0 \pm 4,4$
Ка, л/моль, 10^6	$1,2 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$
k^* , c^{-1} (для денуклеинизированных дрожжей)	$0,35 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,04$	$(1,32 \pm 0,02) \cdot 10^{-4}$
k^* , c^{-1} (для денуклеинизированных бактерий)	$0,17 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02$	$(0,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$
$K_1 = 0,37 \pm 0,02$ л/моль, $K_2 = 0,18 \pm 0,03$ л/моль				

Таким образом, были установлены оптимальные условия извлечения компонентов белковых веществ из 10 %-ных микробных суспензий: температура – 50 °С, рН 7,4, количество ФП – 4,0 % от массы дрожжевых клеток (суммарная активность 800 ед./л) и 8,0 % от массы бактериальных (суммарная активность – 1600 ед./л), загружаемого соответственно двумя и четырьмя равными частями через каждые 2 ч ферментолиза, продолжительность ведения процесса – 4 ч для дрожжевой и 8 ч для бактериальной биомассы, что обеспечивает выход белковых веществ не менее 80 %.

На следующем этапе исследований была изучена возможность интенсификации процесса гидролиза белков дрожжей и бактерий протосубтилином с помощью С₇-АОБ и С₁₂-АОБ и проверена справедливость применения для этого случая ранее предложенной кинетической схемы гидролиза БСА трипсином.

Исследование влияния АОБ на ферментативную экстракцию микробных белков протосубтилином проводили в той же последовательности,

что и для модельной системы. Поскольку, как показали предыдущие исследования, гидролиз микробных белков, независимо от их происхождения, подчиняется общим закономерностям, то эксперимент в полном объеме был выполнен для случая экстракции белков из биомассы дрожжей, и только на заключительном этапе были проведены проверочные опыты по экстракции белков из биомассы бактерий.

Таблица 6.2

Значения эффективных констант и энергий активации отдельных стадий процесса экстракции дрожжевых белков протосубтилином в присутствии АОБ

Путь	Значения констант		
	Е, кДж/моль	К _а , л/моль	к*, с ⁻¹
Фактор d ₁ -C ₇ /d ₁ -C ₁₂			
k _d	22±2/14±1	(8,6±1,2)·10 ⁻⁷ /(1,87±0,29)·10 ⁻⁷	164±17/326 ± 32
k _a	29±2/29±2	(1,3±0,2)·10 ⁻⁶ /(1,00±0,13)·10 ⁻⁶	0,0078±0,0007/0,0073 ± 0,0007
K _s	18±1/16±1	(1,5±0,2)·10 ⁻⁶ /(1,34±0,17)·10 ⁻⁶	275±25/212 ± 21
k _{pp0,d1}	19±1/11±2	(4,4±0,6)·10 ⁻⁶ /(2,02±0,26)·10 ⁻⁶	5,0±0,4/3,8 ± 0,4
k _{pp1,d1}	19±1/17±1	(1,2±0,2)·10 ⁻⁶ /(1,68±0,22)·10 ⁻⁶	7,3±0,7/5,5 ± 0,6
k _{p1,d1}	23±2/9±1	(8,9±1,2)·10 ⁻⁷ /(2,18±0,28)·10 ⁻⁶	4,5±0,5/3,3 ± 0,3
k _{pp0,d2}	19±1/14±2	(4,4±0,6)·10 ⁻⁷ /(1,82±0,23)·10 ⁻⁶	2,5±0,3/2,8 ± 0,3
k _{pp1,d2}	22±1/20±1	(1,2±0,2)·10 ⁻⁶ /(1,96±0,25)·10 ⁻⁶	3,7±0,4/4,1 ± 0,4
k _{p1,d2}	23±2/11±1	(8,9±1,2)·10 ⁻⁷ /(1,51±0,20)·10 ⁻⁶	2,2±0,2/2,5 ± 0,3
k _{инд}	49±5/53±5	(1,4 ± 0,2)·10 ⁻⁷ /(1,7±0,2)·10 ⁻⁷	0,0053±0,0005/0,0047 ± 0,0005
K _{1d} = 0,43±0,03 л/моль/0,43±0,03 л/моль, K _{2d} = 0,17±0,02 л/моль/0,17±0,02 л/моль, K _{3d} =0,28±0,03 л/моль/0,28±0,03 л/моль, K _{4d} = 0,081±0,008 л/моль/0,081±0,008 л/моль			

Таблица 6.3

Значения эффективных констант и энергий активации отдельных стадий процесса экстракции бактериальных белков протосубтилином в присутствии АОБ

Путь	Значения констант		
	Е, кДж/моль	К _а , л/моль	к*, с ⁻¹
C ₇ -АОБ/C ₁₂ -АОБ			
k _d	22±2/14 ± 1	(8,6 ± 1,2)·10 ⁻⁷ /(1,87±0,29)·10 ⁻⁷	82 ± 9/163 ± 16
k _a	29±2/29±2	(1,3 ± 0,2)·10 ⁻⁹ /(1,00±0,13)·10 ⁻⁶	0,0035±0,0004/0,035±0,0004
k _s	18±1/16±1	(1,5 ± 0,2)·10 ⁻⁶ /(1,34±0,17)·10 ⁻⁶	138 ± 14/106 ± 10
k _{pp0,d1}	19±1/11±2	(4,4 ± 0,6)·10 ⁻⁷ /(2,02±0,26)·10 ⁻⁶	2,5 ± 0,3/1,9 ± 0,2
k _{pp1,d1}	19±1/17±1	(1,2 ± 0,2)·10 ⁻⁶ /(1,68±0,22)·10 ⁻⁶	3,7 ± 0,4/2,7 ± 0,3
k _{p1,d1}	23±2/19±1	(8,9 ± 1,2)·10 ⁻⁷ /(2,18±0,28)·10 ⁻⁶	2,2 ± 0,2/1,7 ± 0,2
k _{pp0,d2}	19±1/14±2	(4,4 ± 0,6)·10 ⁻⁷ /(1,82±0,23)·10 ⁻⁶	1,3 ± 0,1/1,4 ± 0,1
k _{pp1,d2}	22±1/20±2	(1,2 ± 0,2)·10 ⁻⁶ /(1,51±0,20)·10 ⁻⁶	1,9 ± 0,2/2,1 ± 0,2
k _{p1,d2}	28±3/11±1	(8,9 ± 1,2)·10 ⁻⁷ /(1,96±0,25)·10 ⁻⁶	1,1 ± 0,1/1,3 ± 0,1
k _{инд}	49±5/53±5	(1,4 ± 0,2)·10 ⁻⁷ /(1,7 ± 0,2)·10 ⁻⁷	0,0053±0,0005/0,0024 ±

			0,0002
$K_{1d} = 0,21 \pm 0,02$ л/моль/ $0,21 \pm 0,02$ л/моль, $K_{2d} = 0,10 \pm 0,01$ л/моль/ $0,10 \pm 0,01$ л/моль, $K_{3d} = 0,14 \pm 0,01$ л/моль/ $0,14 \pm 0,01$ л/моль, $K_{4d} = 0,052 \pm 0,006$ л/моль/ $0,052 \pm 0,006$ л/моль			

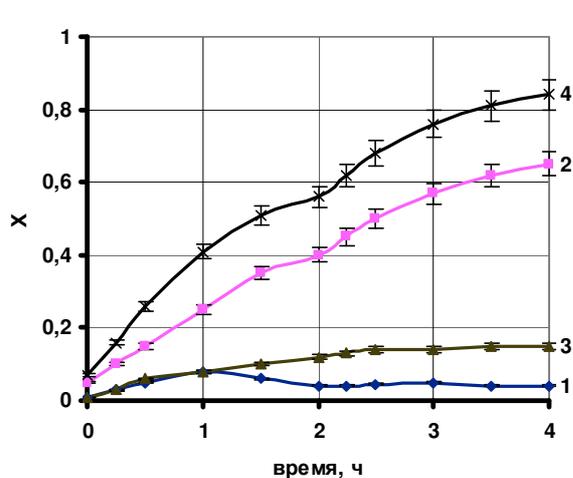


Рис. 6.1. Зависимость степени извлечения белковых веществ от времени обработки суспензии денуклеинизированной биомассы дрожжей протосубтилином. Условия: температура – 60 °С, pH 7,4; СВ – 10 %, активность вносимого ФП – 400 ед./л при каждой загрузке. Обозначения: ↓ - момент времени внесения ФП, 1, 2, 3, 4 – соответственно доли извлечения в раствор белковых фракций: ВМФ, НМФ, аминного азота и их суммарного количества

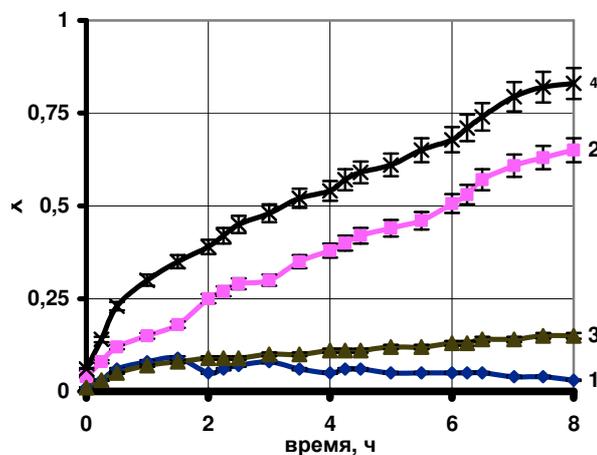


Рис. 6.2. Зависимость степени извлечения белковых веществ от времени обработки суспензии денуклеинизированной биомассы бактерий протосубтилином. Условия: температура – 60 °С; pH 7,4; СВ – 10 %, активность вносимого ФП – 400 ед./л при каждой загрузке. Обозначения аналогичны рис. 6.1

На рис. 6.4 – 6.8 приведены результаты экспериментов по влиянию концентрации АОБ, температуры, pH среды, времени прединкубации АОБ с ФП и субстратом, а в табл. 6.2 и 6.3 – параметры кинетических схем для экстракции дрожжевых и бактериальных белков.

Анализ экспериментальных данных выявил общие закономерности влияния АОБ на ферментативную экстракцию белков из различных видов биомасс протосубтилином, которые состоят в следующем:

1) использование C_7 -АОБ в концентрации выше $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л приводит к повышению скорости ферментативного гидролиза в 1,6 раза по сравнению с контролем, применение C_{12} -АОБ во всем исследованном диапазоне концентраций приводит к снижению скорости гидролиза в 1,6 раза;

2) применение C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ приводит к снижению выхода НМФ белковых веществ во всем исследованном диапазоне температур в 1,4 раза для C_7 -АОБ и в 2,0 раза для C_{12} -АОБ ;

3) в присутствии АОБ происходит смещение рН оптимума действия протосубтилина в сторону щелочных значений рН среды (8,0 – 8,5), при

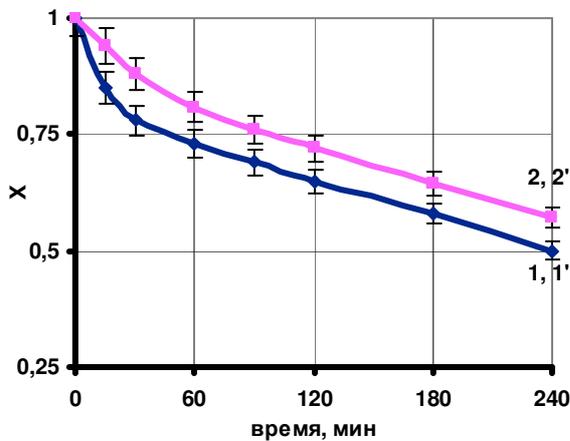


Рис. 6.3. Кинетические кривые гидролиза «глобулинов» и альбуминов, выделенных из денуклеинизированной биомассы дрожжей (1, 1') и бактерий (2, 2') под действием протосубтилина ГЗх. Условия: начальная концентрация белка – 100 г/л, активность вносимого ФП – 800 ед./л, температура – 60 °С; рН 7,4; СВ – 10 %

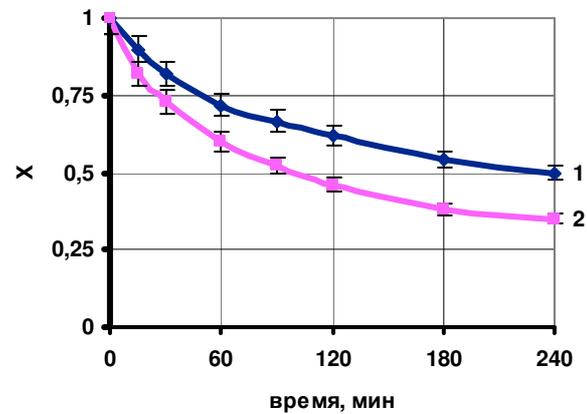


Рис. 6.4. Влияние концентрации C_7 -АОБ (1) и C_{12} -АОБ (2) на выход белковых веществ в процессе их экстракции из биомассы дрожжей протосубтилином. Условия: температура – 55 °С, рН 7,4, начальная концентрация биомассы – 10 % СВ, начальная активность протосубтилина – 400 ед./л

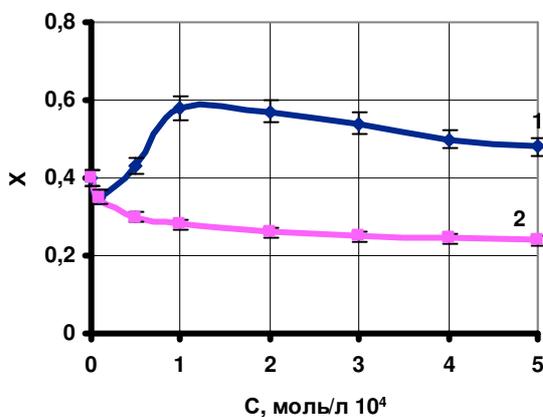


Рис. 6.5. Влияние температуры на выход белковых веществ при экстракции из биомассы дрожжей протосубтилином в отсутствии (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: рН 7,4, начальная концентрация биомассы клеток – 10 % СВ, начальная активность протосубтилина – 400 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

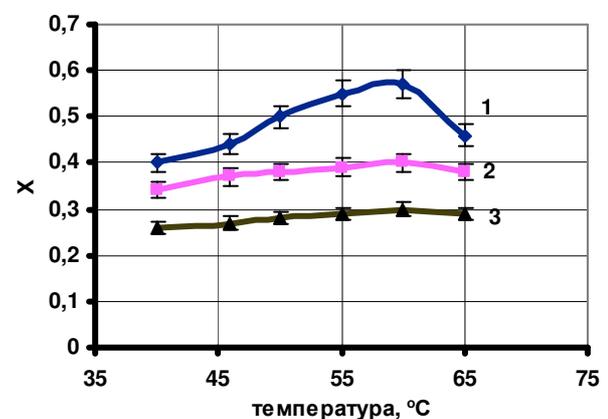


Рис. 6.6. Влияние рН среды на выход белковых веществ при экстракции из биомассы дрожжей протосубтилином в отсутствии (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: температура – 55 °С, начальная концентрация биомассы клеток – 10 % СВ, начальная активность ФП – 400 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

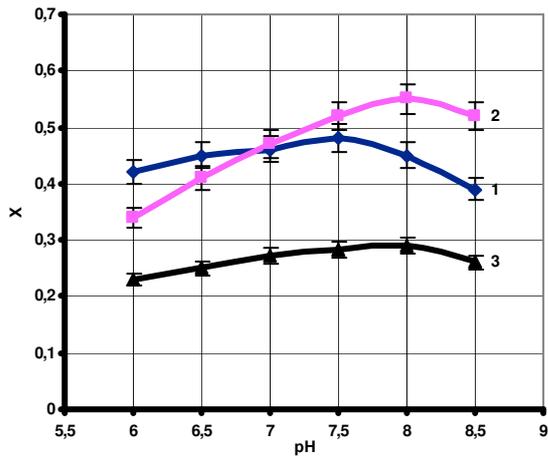


Рис. 6.7. Зависимость начальной скорости экстракции белковых веществ из биомассы дрожжей протосубтилином от времени прединкубации АОБ с ФП. Условия: начальная концентрация биомассы клеток – 10 % СВ, начальная активность ФП – 400 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

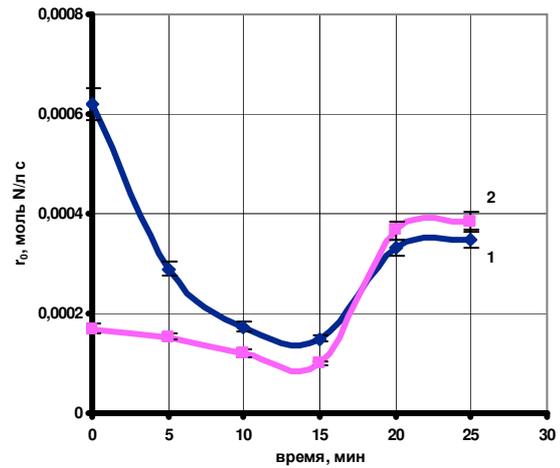


Рис. 6.8. Зависимость начальной скорости экстракции белковых веществ из биомассы дрожжей протосубтилином от времени прединкубации АОБ с субстратом. Условия: начальная концентрация биомассы клеток – 10 % СВ, начальная активность ФП – 400 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

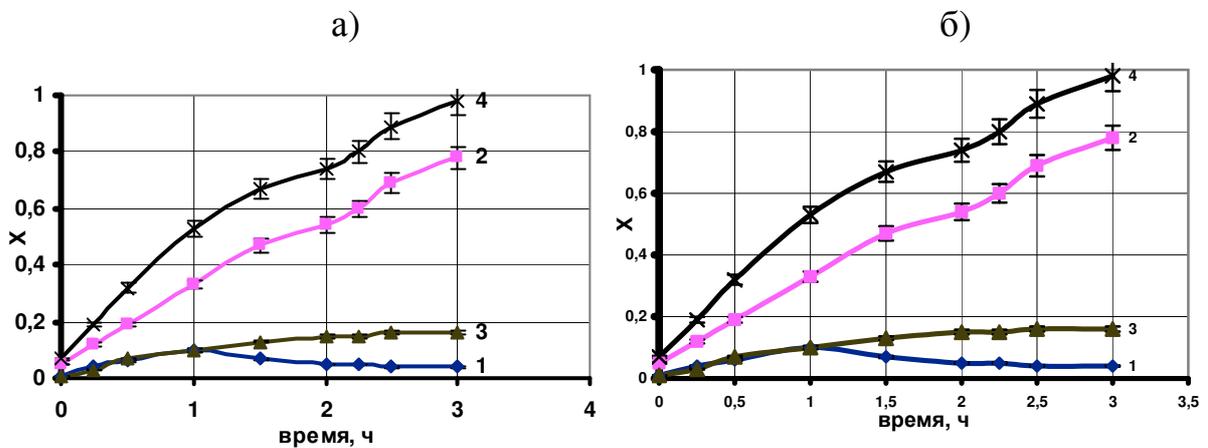


Рис. 6.9. Кинетика экстракции белковых веществ протосубтилином в присутствии C_7 -АОБ в оптимальных условиях: а – из биомассы дрожжей, б – из биомассы бактерий. Условия: температура – $55\text{ }^\circ\text{C}$, pH 8,0, начальная концентрация биомассы – 10 % СВ, начальная активность ФП – 400 ед./л при каждой загрузке, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: ↓ - момент времени внесения ФП, 1, 2, 3, 4 – соответственно доли извлекаемых белковых фракций ВМФ, НМФ, аминного азота и их сумма

этом в случае С₇-АОБ выход НМФ повышается в 1,2 раза, а С₁₂-АОБ – понижается в 1,5 раза по сравнению с контролем;

4) прединкубация АОБ с ФП в случае как С₇-АОБ, так и С₁₂-АОБ приводит к снижению начальной скорости ферментализа соответственно в 1,3 и 2,0 раза. Причем, в случае С₇-АОБ при времени прединкубации свыше 20 мин наблюдается возрастание начальной скорости гидролиза до уровня контроля, но превышения последнего не происходит;

5) при прединкубации АОБ с субстратом наблюдается аналогичная п.4 зависимость: в случае С₇-АОБ при прединкубации в течение 5 мин происходит снижение скорости гидролиза в 2,0 раза, а в случае С₁₂-АОБ – в 1,7. При этом выход продукта в случае С₇-АОБ на уровень контроля наблюдается при прединкубации в течение 15 мин. Таким образом, прединкубация обоих АОБ с ФП и субстратом не приводит к росту эффективности процесса. На основе вышеизложенных закономерностей можно рекомендовать для интенсификации экстракции микробных белков С₇-АОБ при следующих оптимальных условиях: температура – 55 °С, рН среды 8,0 – 8,5, начальная концентрация С₇-АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л без прединкубации с ФП и субстратом, продолжительность гидролиза дрожжевых белков – 3 ч и бактериальных – 6 ч, в каждом случае осуществляется дробная загрузка ФП через каждые 2 ч в количестве 2 % от массы субстрата при каждой загрузке (соответствующие суммарные активности 600 ед./л и 1200 ед./л).

На рис. 6.9 (а и б) приведены соответствующие кривые экстракции белковых веществ из биомассы дрожжей и бактерий протосубтилином в присутствии С₇-АОБ. Сопоставление результатов с данными по гидролизу тех же белков в отсутствие АОБ позволяет сделать вывод о том, что во всех случаях применение АОБ С₇-АОБ позволяет сократить время ферментативного гидролиза в 1,4 раза, а норму расхода ФП – в 1,5 раза. Однако во всех случаях содержание аминного азота в гидролизатах не превышает 10–15 %, что ограничивает области их применения таких гидролизатов.

Поэтому изучение возможности получения белковых гидролизатов с более высокой степенью конверсии белка представляется важным.

Глава 7

Количественные закономерности ферментативного гидролиза микробных белков ферментными системами поджелудочной железы (ПЖ) крупного рогатого скота (КРС)

Анализ литературы позволяет заключить, что наибольшее практическое значение имеют ферментативные гидролизаты со степенью гидролиза белка (отношением аминного азота к общему) не менее 50 %. Такие гидролизаты могут быть использованы в микробиологии, для выделения редких и драгоценных металлов из руд, а также в медицине для парентераль-

ного питания. Протосубтилин и другие протеазы, как было показано выше, нельзя использовать для достижения такой глубокой степени гидролиза белка. Применительно к промышленным условиям наиболее реально использовать для этой цели ферментные системы ПЖ КРС, подготовленные известными способами. В качестве объектов исследования данного этапа работы были выбраны протосубтилиновые экстракты дрожжевых и бактериальных белков.

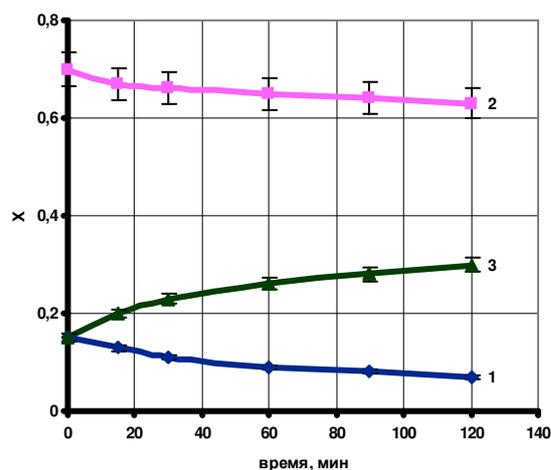


Рис. 7.1. Зависимость выходов НМФ белковых веществ (пептидов (2) и аминного азота (3)) и расхода ВМФ (1) при ферментации протосубтилинового гидролизата белковых веществ ферментами ПЖ КРС. Условия: температура – 50 °С, рН 5,7; исходная концентрация белковых веществ – 50 г/л, исходная протеолитическая активность клеток ПЖ КРС – 20000 ед./л

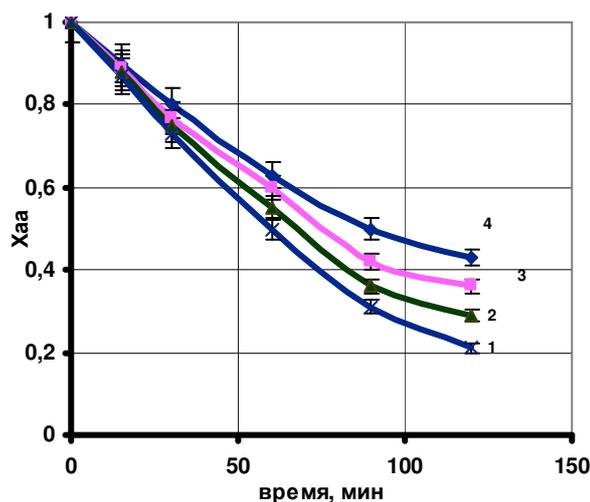


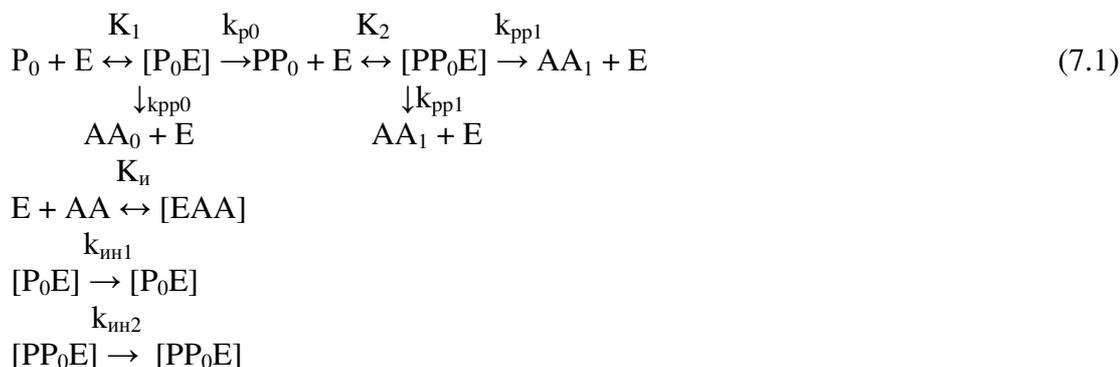
Рис. 7.2. Влияние различных начальных концентраций аминного азота на скорость гидролиза ВМФ белковых веществ дрожжей ферментами ПЖ КРС. Условия: температура – 50 °С, рН 5,7; исходная концентрация белковых веществ – 50 г/л, исходная протеолитическая активность клеток ПЖ КРС – 20000 ед./л. Обозначения начальных концентраций аминного азота: 1 – 0,03 г/л, 2 – 0,06 г/л, 3 – 0,09 г/л, 4 – 0,12 г/л

Изменяемыми параметрами процесса ферментации были температура (40 – 60 °С), рН среды (5,0 – 7,5), начальная концентрация субстрата (1 – 10 % масс.), массовое соотношение субстрат : ФП (20:1 – 4:1), что соответствовало интервалу изменения протеолитической активности 5000 – 25000 ед./л. На рис. 7.1 приведены типичные кривые гидролиза белков в составе ферментализатов дрожжей и накопления НМФ белков и аминного азота. Так же, как и в случае протосубтилина, не было установлено различий в кинетике ферментации белковых фракций, полученных из одного и того же объекта, и отмечено, что дрожжевые белки гидролизуются с более высокой скоростью, чем бактериальные. Представленные на рис. 7.1 зависимости и результаты предварительных опытов показали, что наибольшее

влияние на выход аминного азота оказывает дробное внесение ПЖ КРС в среду. Это означает, что на скорость процесса оказывает существенное влияние ингибирование ферментов ПЖ. Аналогично вышеизложенному были исследованы возможные пути ингибирования данного процесса. Для этого была поставлена серия экспериментов по влиянию различных начальных концентраций аминного азота в среде протосубтилинового гидролизата белка дрожжей, на скорость исследуемого процесса. Полученные при этом зависимости приведены на рис. 7.2.

Установленный вид кривых указывает на наличие ингибирования процесса конечным продуктом реакции, однако, влияние этого фактора не столь существенно, поскольку скорость гидролиза хотя и снижается, но не стремится к нулю, как это видно из рис. 7.2. Это указывает на то, что данный вид ингибирования не является единственным. Существует, по крайней мере, еще один путь, который, скорее всего, связан с инактивацией самого фермента или его фермент-субстратных комплексов.

Сохраняя принятый выше порядок исследования ферментативного процесса, последовательно проводили дифференциальную обработку кинетических кривых по начальным скоростям для оценки значений констант K_1 , k_{p0} , k_{pp0} , а затем интегральную по кинетическим кривым, полученным для различных начальных концентраций фермента и субстрата. В результате такой обработки было установлено, что принятая выше для описания ферментализа белковых субстратов схема превращений может быть использована и в данном случае, однако, она должна быть дополнена следующими уравнениями, учитывающими ингибирование исследуемого ФП:



где: $[P_0E]$, $[PP_0E]$, AA_0 , AA_1 – концентрации интермедиатов ферментов ПЖ с исходным субстратом, промежуточными продуктами (полипептидами) и аминным азотом, образующегося на разных стадиях, K_i – константа ингибирования фермента продуктами гидролиза.

Как следует из этой схемы, ингибирование исследуемого ФП обусловлено не только продуктами ферментализа, но и инактивацией фермент-субстратных комплексов. Как показали расчеты, константа $k_{ин2}$ на порядок ниже $k_{ин1}$, ее значение незначимо, поскольку связанное с ней превращение не влияет на ход кинетических кривых. Таким образом, исследо-

вание кинетики ферментолиза белков показало, что накопление аминного азота при гидролизе белков различного происхождения подчиняется схеме превращений (7.1) с учетом ингибирования ферментных систем аминным азотом и инактивации фермента в составе его комплекса с субстратом.

Полученные результаты показывают, что для проведения ферментолиза белков требуется повышенное содержание ФП в виде подготовленных клеток поджелудочной железы. Ввиду того, что объемы ее производства относительно невелики, важно, особенно в крупнотоннажном производстве, иметь технологии, позволяющие максимально интенсифицировать процесс. Это можно сделать как путем повышения активности самой ферментной системы, так и путем интенсификации процесса ферментолиза.

Нами была предпринята попытка интенсифицировать процесс ферментолиза микробных белков путем введения в реакционную среду АОБ. Исследование влияния АОБ на гидролиз ферментными системами ПЖ КРС микробных белков проводили по ранее разработанной схеме. Диапазоны изменения параметров варьировали в следующих пределах: температура 40 – 70 °С, рН среды 5,0 – 8,0, время прединкубации АОБ с ФС ПЖ КРС – 0... 20 мин, время прединкубации АОБ с субстратом – 0... 20 мин.

Таблица 7.1

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

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

Исследование влияния температуры и рН среды на скорость данного процесса с использованием тех же уравнений, что и ранее, показало, что их оптимальные значения находятся в интервалах 50 – 55 °С; 6,5 – 7,2 соответственно. Принятая выше схема превращений, значения констант и энергий активации отдельных стадий, представленных в таблице 7.1, были использованы для расчета кривых образования аминного азота в процессах глубокого гидролиза белков дрожжей и бактерий. При этом была постав-

лена задача найти число минимальных загрузок ФП и моменты времени их внесения в ферментационную среду, обеспечивающих получение ферментолита с соотношением аминного азота к общему не ниже 0,5. Было установлено, что данная задача решается, если процесс ферментолита проводить в изотермическом режиме и рН статировании в оптимальных условиях с периодической загрузкой ФП через каждые 2 часа. При этом число загрузок для гидролизующихся дрожжевых белков должно быть не менее 4-х, а для бактериальных – не менее 6-ти. Соответственно, время гидролиза первых составляет не менее 8 ч, а вторых – 12 ч. Соответствующие зависимости представлены на рис. 7.3 – 7.4.

Полученные результаты представлены на рис. 7.5 – 7.9. Установлено, что и в данном случае наблюдается аналогичный вид зависимостей, что позволяет сохранить ранее предложенную схему превращений для описания данного процесса. Обработка экспериментальных данных, проведенная аналогично вышеизложенному, позволила добиться адекватного описания всего массива экспериментальных данных и рассчитать параметры вышеупомянутой схемы превращений, которые представлены в табл. 7.2.

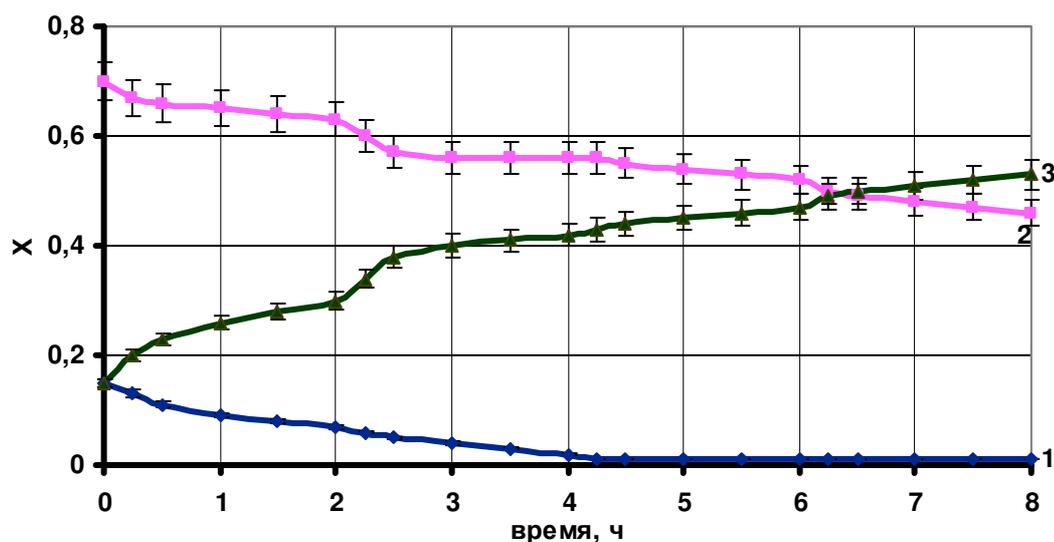


Рис. 7.3. Кривые гидролиза ВМФ (1) и НМФ (2) белковых веществ и накопления аминного азота (3) при ферментализе протосубтилинового гидролизата белка дрожжей ФС ПЖ КРС. Условия: температура – 50 °С, рН 5,7; исходная концентрация белковых веществ – 50 г/л, исходная протеолитическая активность клеток ПЖ КРС – 20000 ед./л. Начальный момент времени внесения ФП в среду – 2 ч

Оценка возможности использования АОБ для интенсификации гидролиза белков ФС ПЖ КРС показала, что для выбора оптимальных условий гидролиза необходимо руководствоваться следующим:

1) применение C_7 -АОБ для интенсификации процесса гидролиза белков ФС ПЖ КРС во всем исследованном диапазоне концентраций не приводит к заметному повышению скорости накопления аминного азота, применение же АОБ C_{12} -АОБ в концентрациях выше $0,1 \cdot 10^{-4}$ моль/л позволяет увеличить выход аминного азота в 1,3 раза;

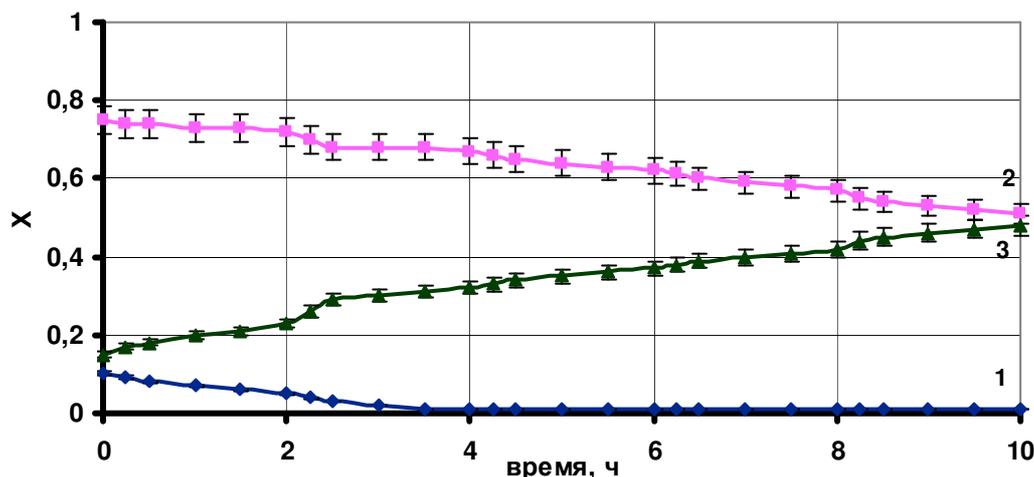


Рис. 7.4. Кривые гидролиза ВМФ (1) и НМФ (2) белковых веществ и накопления аминного азота (3) при ферментации протосубтилинового гидролизата белка бактерий ФС ПЖ КРС. Условия: температура – $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5,7; исходная концентрация белковых веществ – 50 г/л, исходная протеолитическая активность клеток ПЖ КРС – 20000 ед./л. Начальный момент времени внесения ФП в среду – 2,5 ч

2) прединкубация C_7 -АОБ с ферментом в течение 15 – 20 мин позволяет увеличить скорость накопления аминного азота в 1,4 раза, тогда как в случае АОБ C_{12} -АОБ происходит снижение скорости накопления аминного азота сначала в 1,5 раза с последующим выходом на уровень контроля, но не выше него;

3) прединкубация АОБ C_7 -АОБ с субстратом приводит к снижению скорости гидролиза в 2 раза, а C_{12} -АОБ в течение 20 мин повышает скорость гидролиза в 1,3 раза;

4) введение в исследуемый ферментативный процесс АОБ не приводит к смещению температурного оптимума действия фермента. Однако в случае C_7 -АОБ происходит увеличение выхода продукта в 1,3 раза, а в случае C_{12} -АОБ – снижение в 2,0 раза;

5) оба исследуемых АОБ смещают pH оптимум действия фермента в сторону кислых значений, особенно это заметно в случае C_{12} -АОБ. Что касается выхода продукта, то введение в среду C_{12} -АОБ при оптимальном значении pH увеличивает выход продукта в 1,3 раза, а C_7 -АОБ – оставляет его практически неизменным.

Анализируя наблюдаемые закономерности по влиянию АОБ на процесс гидролиза микробных белков ФС ПЖ КРС, можно сделать вывод о том, что влияние АОБ на различные белковые субстраты не зависит от типа гидролизуемого белка. Такую же закономерность мы наблюдали и при изучении гидролиза тех же белковых субстратов протосубтилином.

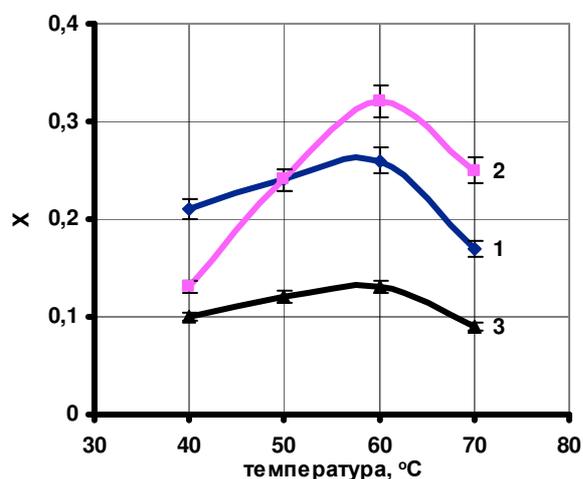


Рис. 7.5. Влияние температуры на выход аминного азота при гидролизе высокомолекулярной фракции дрожжевого белка в составе белкового экстракта ФС ПЖ КРС в отсутствие (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: pH 6,5; начальная активность ПЖ КРС – 20000 ед./л, начальная концентрация АОБ: C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

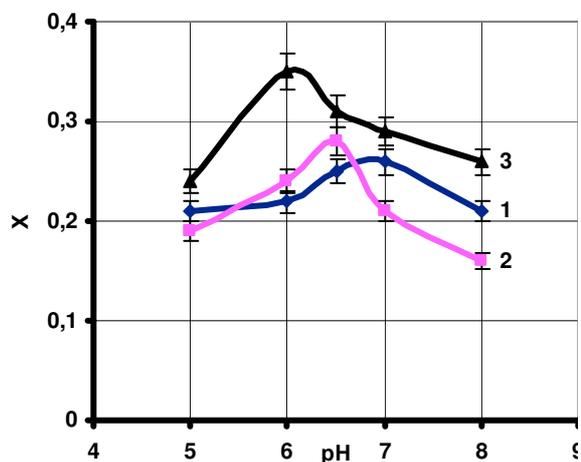


Рис. 7.6. Влияние pH среды на выход аминного азота при гидролизе высокомолекулярной фракции дрожжевого белка в составе белкового экстракта ФС ПЖ КРС в отсутствие (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: температура – 55 °C, начальная активность ПЖ КРС – 20000 ед./л, начальная концентрация АОБ: C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

Таким образом, на основе полученных данных можно предложить следующие оптимальные условия гидролиза микробных белков ФС ПЖ КРС: температура – 60 °C, pH среды – 6,0; начальная концентрация C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л, без прединкубации с ФС ПЖ КРС, прединкубация субстрата с АОБ – 20 мин, продолжительность гидролиза для дрожжевых и кератиновых белков – 4 ч, для бактериальных – 8 ч. В каждом случае осуществляется дробная загрузка ФП через каждые 2 ч в количестве 20000 ед./л.

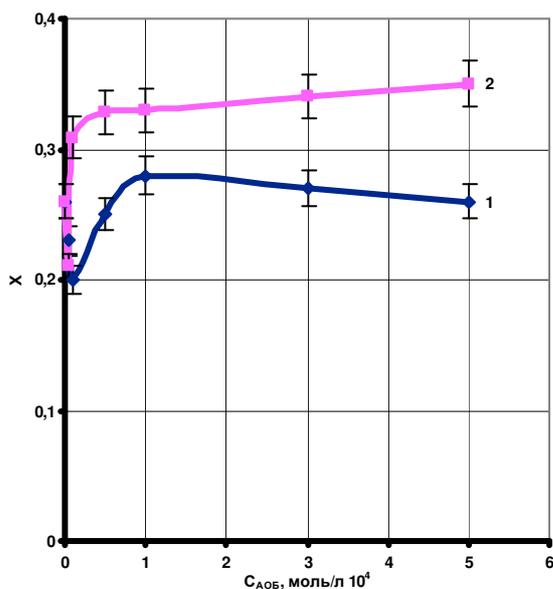


Рис. 7.7. Влияние концентрации С7-АОБ и С12-АОБ на выход аминного азота при гидролизе высокомолекулярной фракции дрожжевого белка в составе белкового экстракта ФС ПЖ КРС. Условия: температура – 55 оС, рН 6,5; начальная активность ПЖ КРС – 20000 ед./л. Обозначения: 1 – С7-АОБ, 2 – С12-АОБ

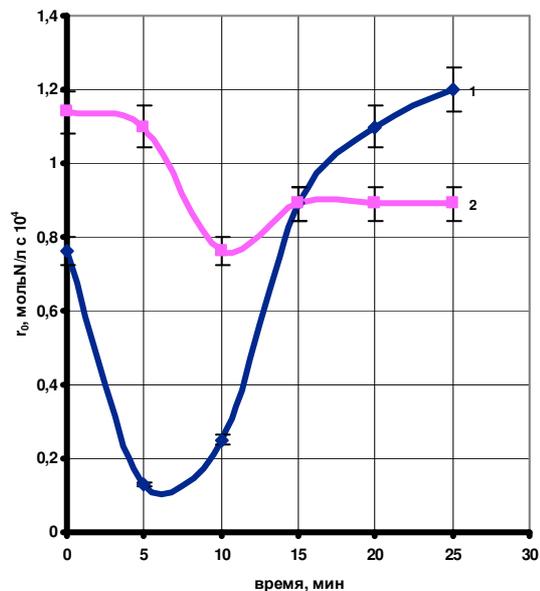


Рис. 7.8. Зависимость начальной скорости гидролиза белковых веществ дрожжей ФС ПЖ КРС от времени прединкубации АОБ с ФС ПЖ КРС. Условия: температура – 55 оС, рН 6,5; начальная активность ПЖ КРС – 20000 ед./л. Обозначения: 1 – С7-АОБ, 2 – С12-АОБ

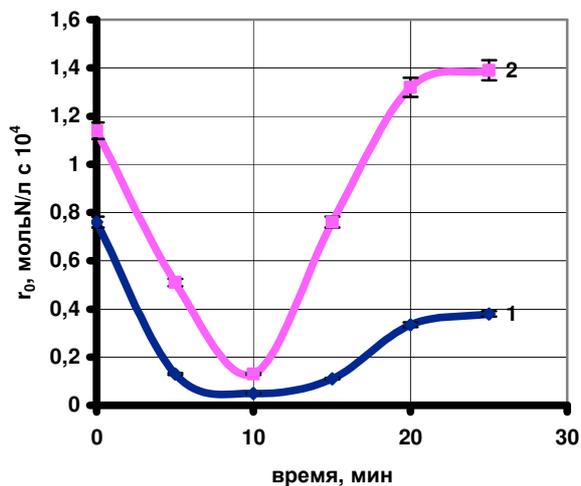


Рис. 7.9. Зависимость начальной скорости гидролиза белковых веществ дрожжей ФС ПЖ КРС от времени прединкубации АОБ с субстратом. Условия: температура – 55 °С, рН 6,5; начальная активность ПЖ КРС – 20000 ед./л. Обозначения: 1 – С7-АОБ, 2 – С12-АОБ

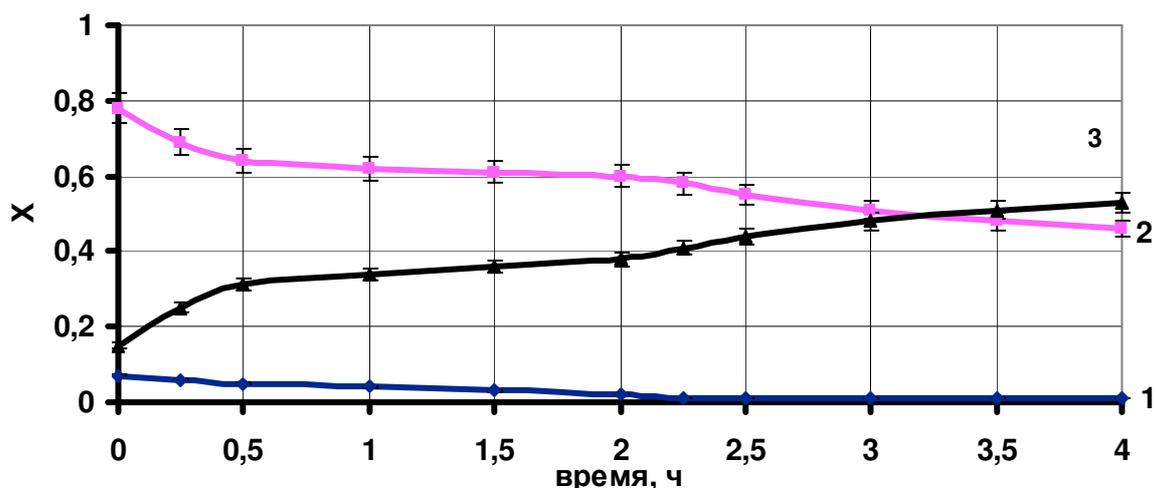


Рис. 7.10. Кривые гидролиза белковых веществ дрожжей ФС ПЖ КРС в присутствии C_{12} -АОБ. Условия: температура – 60 °С, pH 6,0; начальная активность ПЖ КРС – 20000 ед./л при каждой загрузке, начальная концентрация C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Обозначения: ↓ - момент времени внесения ФП, 1, 2, 3 – соответственно доли извлекаемых белковых фракций ВМФ, НМФ, аминного азота

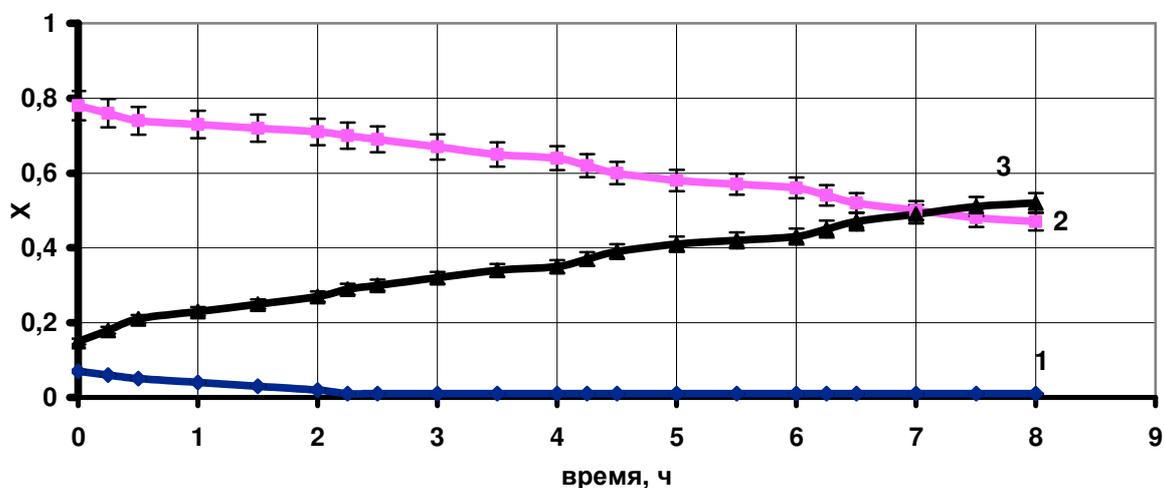


Рис. 7.11. Кривые гидролиза белковых веществ бактерий ФС ПЖ КРС в присутствии C_{12} -АОБ. Условия: температура – 60 °С, pH 6,0; начальная активность ПЖ КРС – 20000 ед./л при каждой загрузке, начальная концентрация C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Момент времени внесения ФП – 2 и 4 ч, 1, 2, 3 – соответственно доли извлекаемых белковых фракций ВМФ, НМФ, аминного азота

Таблица 7.2

Значения констант и энергий активации стадий процесса гидролиза белков дрожжей под действием ФС ПЖ КРС в присутствии АОБ

Путь	E, кДж/моль	Значение параметра	
		k^* , c^{-1}	K_a , л/моль
C ₇ -АОБ/C ₁₂ -АОБ			
k_d	19±1/18±1	83± 9/ 769± 85	$(2,40±0,31) \cdot 10^{-5}/(1,18±0,15) \cdot 10^{-5}$
k_a	32±2/21±2	0,054± 0,006/ 0,061± 0,007	$(7,08±0,92) \cdot 10^{-6}/(1,65±0,21) \cdot 10^{-6}$
k_s	26±2/13±1	455± 50/ 667± 73	$(2,74±0,36) \cdot 10^{-5}/(1,49±0,19) \cdot 10^{-5}$
k_{p0d1}	52±4/26±2	3,70± 0,41/ 5,03± 0,55	$(2,24±0,29) \cdot 10^{-5}/(1,05±0,14) \cdot 10^{-5}$
k_{pp0d1}	55±4/24±2	1,11± 0,12/ 3,85± 0,42	$(8,23±1,07) \cdot 10^{-5}/(3,54±0,46) \cdot 10^{-6}$
k_{pp1d1}	38±3/30±2	1,43± 0,16/ 3,45 ±0,38	$(1,38±0,18) \cdot 10^{-5}/(5,45±0,71) \cdot 10^{-6}$
$k_{инд1}$	20±2/18±1	0,094± 0,009/ 0,0094± 0,0008	$(3,27±0,31) \cdot 10^{-6}/(3,44±0,32) \cdot 10^{-6}$
k_{p0d2}	38±3/25±2	5,92± 0,52/ 1,20± 0,10	$(8,05±0,80) \cdot 10^{-5}/(1,05±0,11) \cdot 10^{-5}$
k_{pp0d2}	17±2/27±2	2,23± 0,21/ 1,75 0,16	$(1,44±0,12) \cdot 10^{-6}/(3,57±0,34) \cdot 10^{-6}$
k_{pp1d2}	31±2/32±3	1,78± 0,17/ 1,07± 0,10	$(1,23±0,11) \cdot 10^{-5}/(5,46±0,52) \cdot 10^{-6}$
$k_{инд2}$	27±2/18±2	0,045± 0,005/ 0,014 ±0,002	$(3,27±0,32) \cdot 10^{-6}/(3,15±0,29) \cdot 10^{-6}$
$K_{1d}=0,20± 0,02$ моль/л/ $0,42± 0,04$ моль/л; $K_{2d} = 0,12± 0,01$ моль/л/ $0,18± 0,02$ моль/л; $K_{ид} = 1,2± 0,1$ моль/л/ $1,23± 0,14$ моль/л			

На рис. 7.10 – 7.11 приведены соответствующие кривые гидролиза исследуемых белков ФС ПЖ КРС в присутствии АОБ C₁₂-АОБ в оптимальных условиях.

Сопоставление полученных результатов с данными по гидролизу тех же белков в отсутствие АОБ позволяет сделать вывод о том, что во всех случаях применение C₁₂-АОБ сокращает время ферментативного гидролиза в 2,0 раза, и норму расхода ФП также в 2,0 раза, что позволяет получить гидролизат с содержанием аминного азота не менее 50 %.

Анализ полученных результатов показывает, что разработанный для модельной системы БСА – трипсин подход к математическому описанию ферментативного гидролиза полностью применим к техническим ферментным препаратам, а также к ферментам в составе сложных субстанций, которой является поджелудочная железа КРС. Также следует отметить, что наличие поджелудочной железы в среде гидролиза увеличивает гидрофобность среды, и поэтому наиболее эффективным для интенсификации процесса гидролиза является C₁₂-АОБ.

Глава 8

Методы очистки ферментативных гидролизатов из биомассы дрожжей и бактерий в присутствии протосубтилина ГЗх и протеаз поджелудочной железы животного происхождения

Полученные в результате обработки биомассы дрожжей и бактерий протосубтилином ГЗх и протеазами и пептидазами ПЖ гидролизаты имели состав, приведенный в табл. 8.1.

Анализ приведенных данных показывает, что данные гидролизаты характеризуются достаточно высокой степенью гидролиза белка и содержат относительно небольшое количество пигментов, что позволяет рекомендовать для их очистки метод ионного обмена. Согласно литературным данным для этой цели в промышленности используют сильнокислотный катионит КУ-2х8 в H^+ -форме [1, 2], способный сорбировать белки, крупные пептиды и, как показали наши исследования, высокомолекулярные пигменты. Учитывая специфику проведения ферментативных процессов в промышленности, нельзя исключить возможность получения бракованных партий ферментализатов, содержащих негидролизованые пептиды и ВМФ пигментов. Кроме того, готовые ферментализаты, освобожденные от шлама центрифугированием, всегда содержат взвешанные частицы, что неблагоприятно отражается на работе ионитовых фильтров. Поэтому было предложено ввести стадию предварительной очистки ферментализатов методом ультрафильтрации на полых волокнах ВПУ-15ПА, позволяющих не менее, чем в 2 раза снизить содержание взвешенных и пигментов [6]. Данная мембрана практически не задерживает аминокислоты, но при переработке доброкачественных гидролизатов снижает содержание ВМФ примерно на 20 – 25 %. Проведение данной стадии может оказаться целесообразным и по другой причине. Как показали предварительные опыты, чем выше выход аминного азота, тем меньше требуется элюента в виде 2 %-ного водного раствора аммиака на десорбцию аминокислот с катионита.

Среди известных схем переработки растворов, содержащих аминокислоты, мы выбрали, по нашему мнению, наиболее оптимальную, изложенную в [3, 4]. Она предусматривает сорбцию аминокислот и низших пептидов на катионите КУ-2х8 в статическом режиме, что позволяет интенсифицировать стадию ионообменной очистки аминокислот за счет значительного сокращения времени проведения процесса, расхода элюента, регенерирующих растворов и воды на промывку сорбента и повысить выход целевого продукта.

Длительность сорбции раствора компонентов ферментализата не превышала 1 ч, емкость сорбента составила до 15,0 моль аминного азота на 1 л смолы. Десорбцию целевого продукта проводили 2-мя способами: 1) традиционно путем последовательной 7 – 8-ми кратной обработки сорбента 2 – 3 %-ным раствором аммиака при температуре 40 – 50 °С в тече-

ние 15 – 20 мин или 2) 4-х кратной обработкой его 1 %-ным раствором гидроксида натрия при комнатной температуре с тем же гидромодулем и в течение того же времени. Было установлено, что составы элюатов в обоих случаях практически одинаковы.

В качестве примера состав водно-аммиачного элюата приведен в табл. 8.1.

Таблица 8.1

Состав полупродуктов, получаемых на стадиях выделения смеси аминокислот и низших пептидов из микробной биомассы

Наименование полупродукта	Наименование показателей							
	Общий азот, г/л	ВМФ бел-каг/л	НМФ бел-ка,г/л	Амин-ный азот, г/л	Общие сахара, г/л	СВ, г/л	Цвет-ность, опт. ед	Степень гидролиза белка, %
Гидролизат белков дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>								
Ферментоллизат после отделения клеточных оболочек	12,60	4,68	35,28	6,21	2,66	88,3	0,25	49
Ферментоллизат, очищенный ультра-фильтрацией	11,51	отс.	33,16	6,20	1,06	75,2	0,12	54
Водно-аммиачный элюат	2,31	отс.	5,06	1,50	0,063	14,9	0,02	65
Гидролизат белков бактерий <i>Brevibacterium flavum</i>								
Ферментоллизат после отделения клеточных оболочек	15,00	5,58	42,00	7,39	1,77	96,3	0,28	49
Ферментоллизат, очищенный ультра-фильтрацией	13,69	отс.	39,48	7,37	0,71	88,0	0,13	54
Водно-аммиачный элюат	2,75	отс.	6,02	1,79	0,081	17,6	0,02	65

Таким образом, применение ионного обмена позволяет снизить примесь углеводов с 1,4 до 0,45 % и увеличить степень гидролиза белковых веществ до 65 %. Объединенные элюаты нейтрализовывали соляной кислотой и упаривали под вакуумом до 10 – 12 % сухих веществ, выпадающий после охлаждения концентрата осадок хлорида натрия или аммония отделяли фильтрованием, осадок на фильтре промывали водой с гидромодулем 1 и высушивали распылением в токе горячего воздуха. Полученный препарат с содержанием не более 7 % остаточной влаги и 3 – 5 % минеральных примесей представляет собой гигроскопичный порошок светло-желтого цвета, в котором соотношение аминного азота к общему составляет 0,60 – 0,65. Его выход составляет 25 – 30 % от массы сухих клеток.

Таблица 8.2

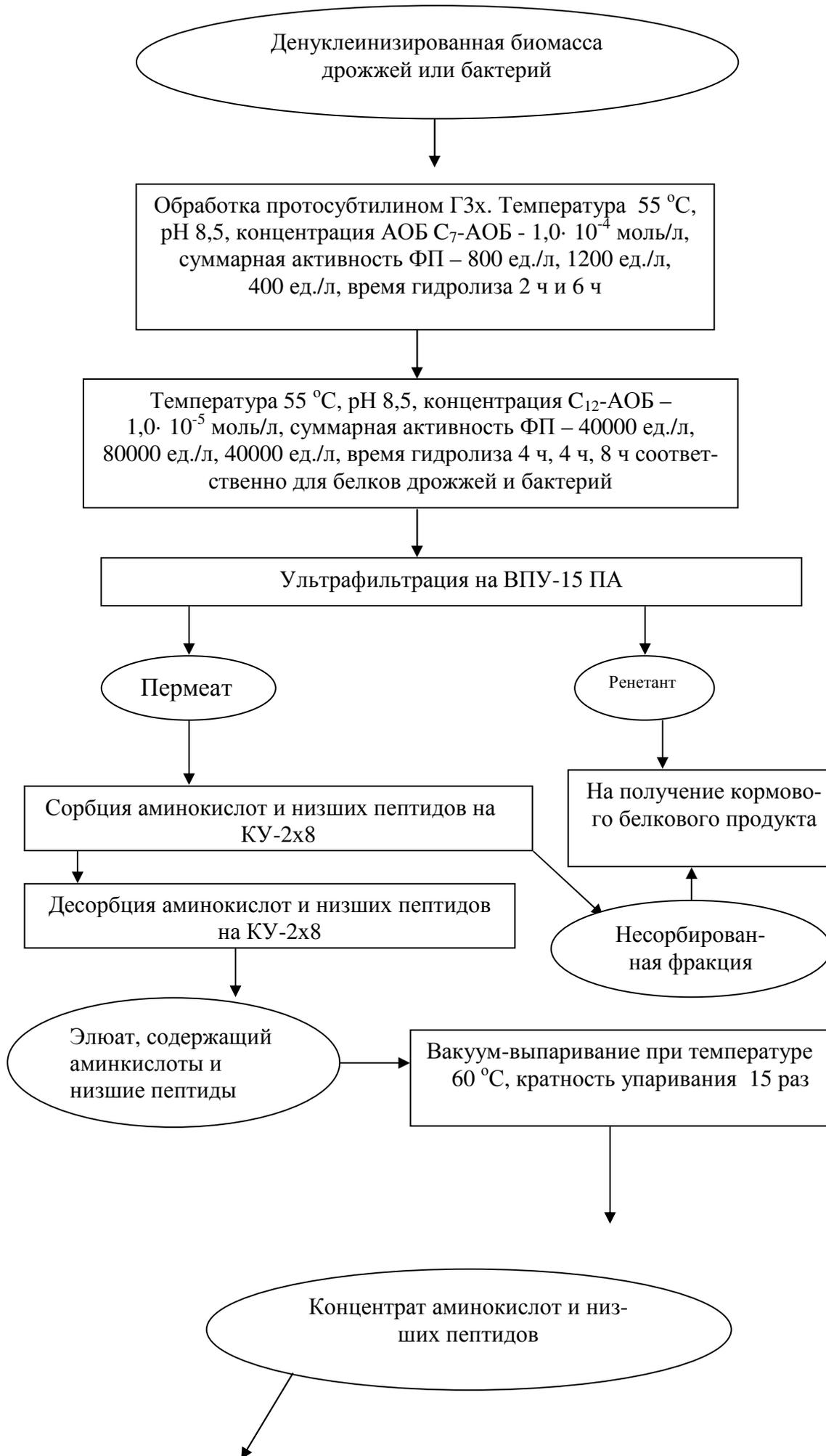
Физико-химический и аминокислотный состав белковых гидролизатов

Наименование показателей	Очищенный белковый гидролизат дрожжей	Очищенный белковый гидролизат бактерий
Аминный азот, %	10,3	5,7
Общий азот, %	16,9	10,8
Влага, %	7,0	7,0
Пептиды, %	35,0	25,6
Углеводы, %	0,5	0,1
Нуклеиновые кислоты, %	–	–
Аммиак, %	1,00	1,0
Оптическая плотность D_{440}	0,08	0,07
pH 1 %-го раствора	6,7	6,5
Аминокислоты, %:		
Аспарагиновая	9,2	9,8
Треонин	12,1	9,2
Серин	0,03	0,04
Глутаминовая	12,8	16,8
Глицин	4,6	7,5
Аланин	3,7	1,0
Валин	5,2	5,7
Метионин	1,1	1,3
Цистин	–	–
Цистеин	–	–
Изолейцин	5,3	4,5
Лейцин	8,2	8,3
Тирозин	6,8	6,6
Фенилаланин	8,9	6,4
Лизин	11,4	10,3
Гистидин	6,5	8,7
Пролин	4,2	3,9

В предлагаемом технологическом процессе образуется ряд твердых и жидких отходов, которые могут быть использованы для получения кормового продукта. Для этого была предложена следующая схема утилизации. Клеточные оболочки, отработанный ферментный препарат и ультраконцентрат после разбавления до 5 % СВ могут быть объединены с суспензией дрожжей и направлены на получение микробной биомассы. В случае использования в качестве элюента водного раствора аммиака образующийся хлорид аммония может быть утилизирован на стадии биосинтеза микробной биомассы, что определяет предпочтительное использование данного элюента на стадии ионного обмена. Принципиальная схема приведена на рис. 8.1, а в табл. 8.2 приведен аминокислотный состав полученных гидролизатов.

По предлагаемой технологической схеме были проведены технико-экономические расчеты получения белкового гидролизата из биомассы пекарских дрожжей при мощности производства 53500 т/год, что соответствует средней мощности пивоваренных заводов. Было выполнено сравнение двух вариантов технологических схем: базовой (ферментативный гидролиз в отсутствие интенсифицирующих факторов) и усовершенствованной – ферментативный гидролиз в присутствии интенсифицирующих факторов. Кроме того, был выполнен расчет предотвращенного экологического ущерба [5].

Проведенные расчеты показали, что предложенный способ интенсификации ферментативного гидролиза не приводит к заметному изменению структуры себестоимости. Происходит лишь некоторое снижение затрат на сырье и материалы с 84 до 79 %, что влечет за собой некоторое относительное увеличение остальных статей затрат. Предложенный способ интенсификации приводит к снижению себестоимости белкового гидролизата в 1,5 раза, капитальных затрат на 15 %, срок окупаемости снижается в 3,75 раза, а рентабельность производства и продукции возрастает в 4 раза. Утилизация отработанной биомассы дрожжей позволяет предотвратить экологический ущерб, наносимый природе.



Таким образом, на основе проведенных расчетов можно сделать вывод об экономической целесообразности как самой разработанной технологии, так и предложенного способа повышения ее эффективности.

Список литературы

1. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердутина А.В. Основы биохимической переработки животного и комбинированного сырья. – М.: ВНИИМП, 2003. – 116 с.
2. Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Экологические основы биотехнологических процессов. – М.: МГУЛ, 2002. – 404 с.
3. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. Пер. с англ. В 2-х частях. – Ч. 1. – М.: Мир, 1989 – 692 с.
4. Джафаров А.Ф. Производство желатина. – М.: АГРОПРОМИЗДАТ, 1990. – 287 с.
5. Красноштанова А. А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности: Автореф. дисс...докт. хим. наук. – М.:РХТУ, 2009. – 40 с.
6. Каталевский Е.Е. Полупроницаемые мембраны Владипор для концентрирования и очистки биопрепаратов. – Черкассы: НИИТЭХИМ, 1979. – С. 1–29.

Глава 9

Разработка научных основ технологии получения белковой фракции из пивной дробины

В качестве примера растительного сырья для получения белковых препаратов была выбрана пивная дробина – отход пивоваренных производств, образующаяся на предприятии средней мощности в количестве не менее 40000 тонн/год. При получении белковой фракции из пивной дробины была выбрана щелочная обработка, т.к. для кислотной обработки растительного сырья используют, как правило, либо концентрированные растворы кислот, либо высокие (140–190 °С) температуры, что приводит к химической деструкции многих аминокислот, снижает выход ВМФ, а также увеличивает скорость коррозии оборудования. Однако при щелочной обработке в жестких условиях происходит образование токсичных энантиомеров (D-форм аминокислот), поэтому мы были вынуждены ограничить условия ее проведения рН 7,0 – 9,0 и температурой 60 – 90 °С. Соответствующие зависимости приведены на рис. 9.1 и 9.2.

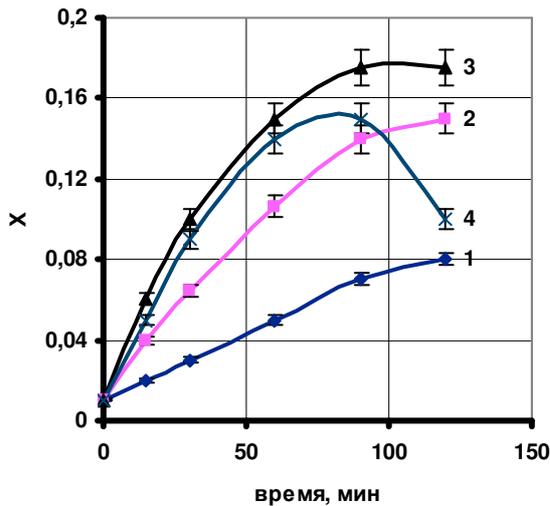


Рис. 9.1. Кривые извлечения ВМФ белковых веществ из пивной дробины в процессе щелочной экстракции, отвечающие различным температурам процесса. Условия экстракции: рН 9,0; концентрация пивной дробины в суспензии – 5 % СВ. Обозначение: 1 – 60 °С, 2 – 70 °С, 3 – 80 °С, 4 – 90 °С

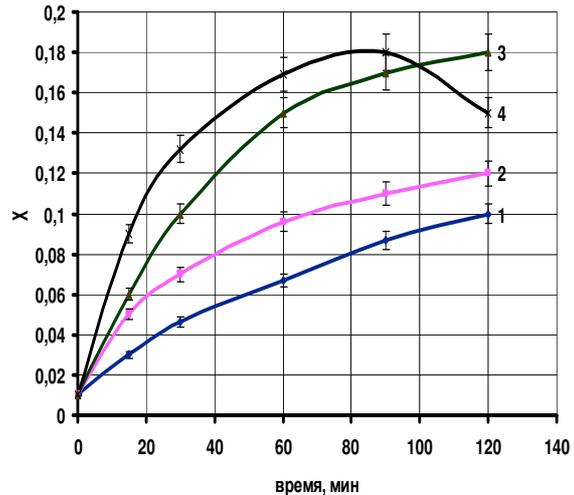
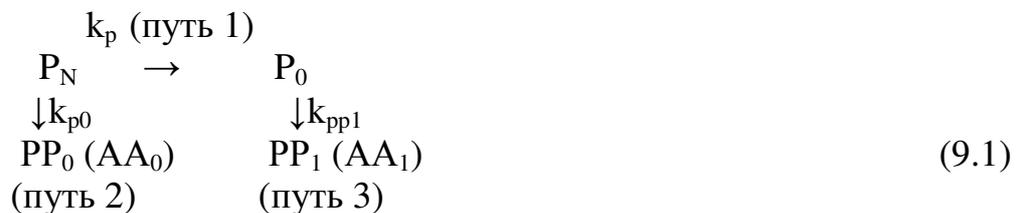


Рис. 9.2. Кривые извлечения ВМФ белковых веществ из пивной дробины в процессе щелочной экстракции, отвечающие различным значениям рН процесса. Условия экстракции: температура 80 °С; концентрация пивной дробины в суспензии – 5 % СВ. Обозначение: 1 – рН 7,0; 2 – рН 8,0; 3 – рН 9,0; 4 – рН 10,0

Сравнение вида кинетических кривых извлечения ВМФ белков из пивной дробины с ранее полученными данными по щелочной экстракции кератинов (а данных в тексте нет, либо приводим, либо ссылка), а также отсутствие в данном случае расхода щелочного агента, позволило сделать предположение, что кинетическая схема экстракции белков из пивной дробины будет иметь вид:



где: P_N – белок в твердой фазе, а P_0 и $PP_0 (AA_0)$, $PP_1 (AA_1)$ соответственно ВМФ и НМФ белковых веществ в растворе.

Обработка экспериментальных данных осуществлялась аналогично тому, как это было описано ранее для экстракции микробных белков. Результаты обработки приведены на рис. 9.3 и 9.4.

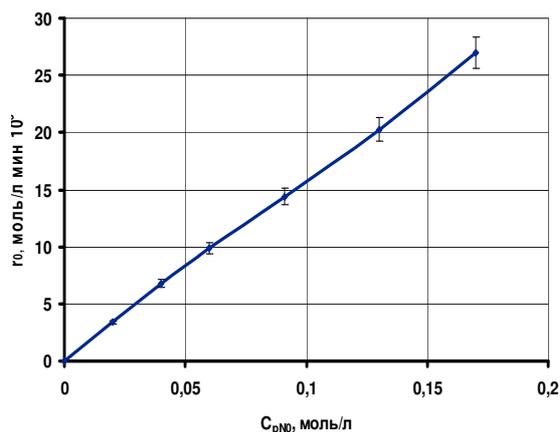


Рис. 9.3. Зависимость начальной скорости экстракции ВМФ белков пивной дробины от начальной концентрации сырого протеина в суспензии. Условия: температура – 90 °С, начальная концентрация гидроксида натрия – 0,25 моль/л, содержание СВ в суспензии – 10 % масс.

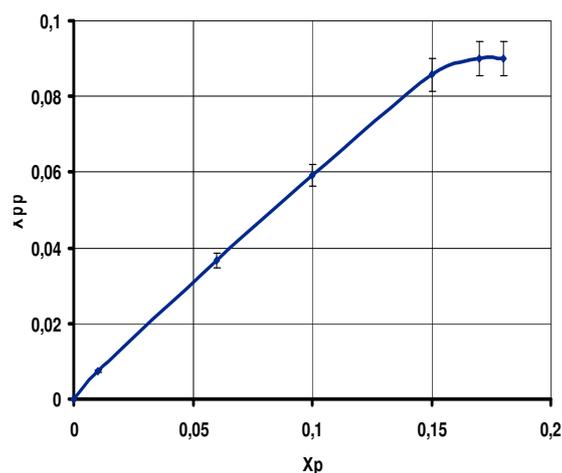


Рис. 9.4. Соотношение количества ВМФ и НМФ белковых веществ, образующихся в процессе щелочной экстракции белков пивной дробины в различные моменты времени. Условия: температура – 80 °С, рН 9,0, содержание СВ – 5 % масс.

В результате обработки экспериментальных данных были рассчитаны параметры k^* , K_b и E для каждой стадии в схеме превращений (9.1), которые приведены в табл. 9.1.

Как показали последующие расчеты, подтвержденные экспериментом, схема превращений (9.1) определяет кинетическую схему экстракции ВМФ белков пивной дробины в водном растворе гидроксида натрия в выбранных интервалах изменения температуры и рН среды.

Результаты расчетов, подтвержденные экспериментом, показали, что максимальный выход ВМФ белка из пивной дробины наблюдается при рН 9,0, температуре 80 °С, концентрации пивной дробины 10 % СВ, времени экстракции 120 мин. Однако, его значение не превышало 20 %.

Таблица 9.1

Значения параметров процесса экстракции ВМФ белков из пивной дробины водно-щелочным раствором

Путь	$E, \text{ кДж/моль}$	$K_b, \text{ л/моль}$	$k^*, \text{ с}^{-1} \cdot 10^3$
1	44 ± 3	$0,12 \pm 0,01$	37 ± 4
2	23 ± 2	$0,14 \pm 0,01$	20 ± 2
3	74 ± 4	$3,94 \pm 0,23$	14 ± 1

С целью увеличения выхода ВМФ белковой фракции исследовали возможность предобработки исходной дробины ультразвуком при комнатной температуре и частоте 25 кГц. Влияние времени ультразвуковой обработки на выход ВМФ белковых веществ показано на рис. 9.5, из которого следует, что оптимальное время обработки дробины ультразвуком составляет 15 мин. При этом выход ВМФ белков в ходе последующей водно-щелочной экстракции составляет 80 – 83 %.

После проведения водно-щелочной экстракции пивную дробину отделяли фильтрованием, а из раствора осаждали «глобулиновую» фракцию белковых веществ в изоэлектрической точке (рН 4,2 – 4,7) по методике разработанной для микробных белков. Степень осаждения белка составила 76 % от содержания ВМФ белковых веществ в растворе. Полученный осадок белка содержал 43 % основного вещества в расчете на СВ.

Для очистки полученного белкового изолята использовали переосаждение в изоэлектрической точке. Для этого осадок глобулиновой фракции растворяли в слабо-щелочной среде (рН 9,0) до концентрации 10 г/л.

После этого проводили осаждение в изоэлектрической точке в тех же условиях, что и первое осаждение. Осадок отделяли фильтрованием, обрабатывали одним объемом этилового спирта и высушивали в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60 °С. Конечный продукт содержал не менее 85 % основного вещества при влажности не более 6 %.

Полученный препарат был проверен на острую токсичность. Результаты испытаний показали, что данный белковый продукт не обладает острой токсичностью, что позволяет использовать его в качестве продукта кормового назначения. Потери углеводов с экстрактом белковых веществ составляют 8–10 % от их содержания в дробине, что позволяет в дальнейшем использовать депротеинизированную пивную дробину для получения гидролизатов углеводной природы.

На следующем этапе исследований с целью гидролиза клетчатки депротеинизированную пивную дробину обрабатывали целловиридином ГЗх. с целью получения гидролизатов углеводной природы. Полученные данные по кинетике гидролиза представлены на рис. 9.5 и 9.6.

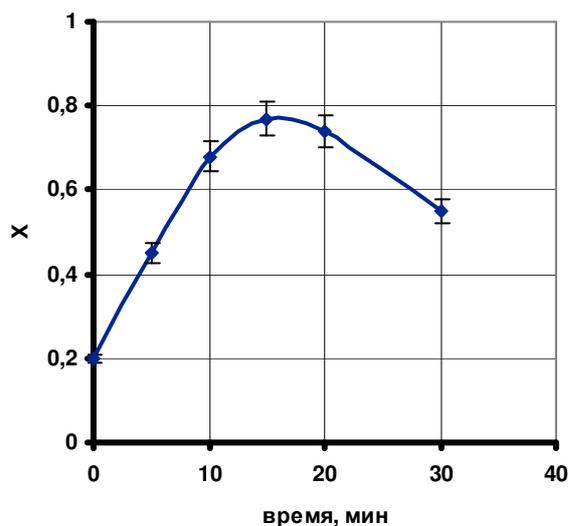


Рис. 9.5. Влияние времени предварительной ультразвуковой обработки на выход ВМФ белковых веществ при последующей щелочной экстракции. Условия: обработка ультразвуком с частотой 25 кГц, концентрация пивной дробины в суспензии 5 % СВ, щелочная экстракция белковых веществ – 80 °С, рН 9,0; время экстракции – 2 ч

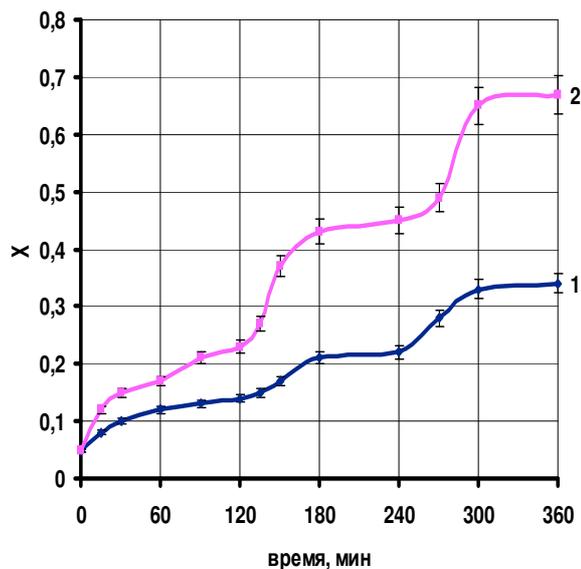


Рис. 9.6. Накопление НМФ углеводов при гидролизе клетчатки пивной дробины предварительно обработанной ультразвуком (25 кГц, 15 мин) целлювиридином ГЗх. Условия: температура – 40°С, рН 6,5; начальная активность ФП – 500 ед./л, начальная концентрация клетчатки – 75 г/л. Обозначения: 1 – пивная дробина до извлечения белка, 2 – депротеинизированная пивная дробина

Из них следует, что вышеописанная предварительная обработка пивной дробины позволяет сократить время гидролиза и норму расхода ФП не более чем в 2 раза. Исследования по выбору оптимальных условий гидролиза пивной дробины целлювиридином ГЗх не привели к большему повышению эффективности данного процесса.

На основе полученных данных было сделано предположение, что выбранный ФП не в состоянии гидролизовать все полисахариды дробины. Поэтому далее была исследована возможность применения для этой цели, помимо целлюлаз амилолитических ФП. Более подробно данные вопросы будут рассмотрены в главе 20.

Глава 10

Технологические приемы получения гидролизатов белковой природы на основе кератинсодержащего сырья

Кератин образуется исключительно в эпителиальных тканях, особенно в наружных слоях кожи. Кератины являются структурными белками волос, шерсти, перьев, рогов и копыт.

Высокая стабильность и нерастворимость кератина обусловлена большим числом поперечных дисульфидных связей между его пептидными цепями. Разрыв поперечных дисульфидных связей кератина в результате окисления, восстановления и гидролиза приводит к образованию растворимого продукта, расщепляющегося протеолитическими ферментами.

В кератинсодержащем сырье содержится до 85 % белков со значительным количеством незаменимых аминокислот. В табл. 10.1 представлен аминокислотный состав кератинов различного происхождения. Как показывает анализ аминокислотного состава, кератин отличается необычайно высоким содержанием серосодержащих аминокислот (цистина и цистеина).

Таблица 10.1

Аминокислотный состав некоторых кератинов

Аминокислота	Содержание, г аминокислоты/ 100 г белка		
	в рогах и копытах	в пере	в шерсти
Аланин	3,6	5,4	3,8
Аргинин	8,7	7,5	9,7
Аспарагиновая кислота	7,3	7,5	6,9
Валин	6,0	8,8	5,5
Гистидин	1,9	0,7	3,1
Глицин	3,5	7,2	5,8
Глутаминовая кислота	14,4	9,7	14,5
Изолейцин	4,7	6,0	3,8
Лейцин	7,0	8,0	7,9
Лизин	4,3	1,7	0,9
Метионин	2,2	0,5	0,6
Пролин	6,8	10,0	6,8
Серин	6,9	14,0	7,8
Тирозин	5,5	2,2	5,2
Треонин	4,6	4,8	6,6
Фенилаланин	2,0	5,3	3,7
Цистин	10,6	8,2	12,8

Так, кератин волос человека и кератин шерсти содержит 11 – 12 % цистина, что соответствует содержанию 3 % серы. В других кератинах содержание серы может достигать 5 % [1]. Кроме того, кератины характеризуются высоким содержанием глутаминовой кислоты, лейцина, серина, пролина и валина. Таким образом, наибольшая ценность кератинсодержащего сырья связана с наличием в нем аминокислот цистина и цистеина, которые практически отсутствуют в белках микробного происхождения.

Из всех применяемых для получения гидролизатов белков субстратов кератин труднее всего подвергается ферментативному гидролизу. Известно, что фермент вначале должен действовать только на доступные связи субстрата. Таким образом, существует предварительная стадия гид-

ролиза, в ходе которой белок «подготавливается» для дальнейшего разложения. Но протеолиз никогда не начнется, если фермент не найдет точки для атаки [2, 3]. Ферментативному гидролизу кератина, как правило, предшествует предварительная подготовка сырья. Она заключается в механическом его измельчении, термической обработке, частичном химическом гидролизе. Это в какой-то степени разрушает структуру белка, тем самым, предоставляя ферменту скрытые ранее от него участки молекулы. Для предварительной обработки используется щелочной или кислотный гидролиз.

Процесс щелочного гидролиза кератинсодержащего сырья протекает постепенно. Вначале в растворе щелочи происходит набухание сырья и разрушение фибриллярных волокон, затем расщепление белка кератина по месту дисульфидных связей с образованием растворимых продуктов – высокомолекулярных пептидов. При более длительном действии щелочи происходит дальнейший распад полипептидов и образование аминокислот и продуктов распада с выделением аммиака и сероводорода [4].

Полный щелочной гидролиз приводит к частичной рацемизации аминокислот и разрушению цистина, но триптофан и треонин сохраняются полностью. Первоначальная реакция кератина со щелочью сводится к гидролитическому расщеплению или разрыву дисульфидных мостиков, в результате чего образуется сульфеновая кислота и сульфогидрильные производные.

Время растворения кератина раствором щелочи находится в прямой зависимости от температуры и концентрации реагента, поэтому процесс гидролиза может длиться от нескольких минут до нескольких дней [5, 6].

Разработан способ щелочного гидролиза кератинсодержащего сырья, при котором сохраняются ароматические аминокислоты, но частично разрушаются серосодержащие соединения. Гидролиз сырья проводят в 3 – 4 %-ном растворе гидроксида натрия при атмосферном давлении и температуре 18 – 20 °С в течение 5 суток или при температуре до 100 °С в течение 6 – 10 ч. Жидкий гидролизат нейтрализуют ортофосфорной кислотой и высушивают в распылительной сушилке. Гидролиз можно также осуществлять 2 %-ным раствором гидроксида натрия при давлении 0,3 – 0,4 МПа и температуре 130 – 135 °С в течение 2 – 3 ч. Таким способом получают муку из гидролизованного сырья первого сорта, содержащую 75 % белка. Было установлено, что снижения питательной ценности при скормлении животным кормов, в которых этой мукой заменено 3 % мясокостной, не происходит [7].

Разработан способ получения и рецептура белковожироуглеводной основы заменителя цельного молока, в состав которого входит щелочной гидролизат кератинсодержащего сырья, позволяющий удовлетворить потребность в некоторых незаменимых аминокислотах. Гидролиз кератина проводят 2–3 %-ным раствором щелочи, взятым в трехкратном количестве

к сырью, нейтрализуют раствором концентрированной ортофосфорной кислоты [8].

Применение аммиака в качестве щелочного реагента не приводит к повышению эффективности процесса гидролиза по сравнению с едким натром, однако, исключает необходимость нейтрализации кислотой, что требуется при использовании, например, едкого натра или едкого кали. За счет этого удается получить продукт с низким содержанием золы (1,25 %). Кроме того, в результате обработки аммиаком, гидролизат содержит значительно больше азотистых веществ, чем при использовании других щелочных агентов (16,5 % против 12,5 %). Вместе с тем, этот метод гидролиза сопряжен с необходимостью строго соблюдения правил техники безопасности вследствие применения такого взрывоопасного и токсичного реагента как аммиак.

Анализ методов щелочного гидролиза позволяет сделать вывод о том, что при такой обработке сырья не всегда сохраняется аминокислотный состав, происходит разрушение некоторых заменимых и незаменимых аминокислот, а также их значительная рацемизация [9]. Кроме того, при щелочном гидролизе не достигается полное разрушение прочных дисульфидных связей, в продуктах неполного гидролиза кератинов сохраняется трехмерная структура кератина, обуславливающая неполную растворимость кормовой муки и, следовательно, низкую ее перевариваемость и усвояемость [10].

Кислотный гидролиз также приводит к разрушению ряда аминокислот, кроме того, при этом образуются гуминовые вещества, летучие амины, карбонильные соединения, многие из которых обладают нежелательной биологической активностью или токсичностью [11].

Однако кислотный гидролиз хорошо зарекомендовал себя при переработке такого трудногидролизуемого сырья как кератин. Хорошие результаты были получены при гидролизе кератинсодержащих материалов при сочетании щелочной и кислотной обработки [12]. Получаемые на основе данных гидролизатов кормовые добавки успешно применяются как индивидуальные смеси, а также в сочетании с белковыми гидролизатами более сбалансированными по аминокислотному составу [13, 14]. Метод кислотного гидролиза широко используется при создании безотходных технологий переработки животного сырья, что значительно повышает рентабельность предприятий пищевой промышленности [15]. К несомненным достоинствам этого метода следует отнести возможность полного гидролиза белоксодержащего сырья до аминокислотных смесей, а также простоту технологической схемы [16].

Из 100 кг кератинового сырья при кислотном гидролизе можно выделить следующие количества аминокислот: глутаминовой кислоты 3–6 кг, тирозина 2–3 кг, цистеина 5–7 кг, аргинина 6–7 кг, гистидина 0,5 – 1,0 кг, лизина 1–2 кг, лейцина 3–4 кг, фенилаланина 2–3 кг [17, 18].

Украинскими исследователями разработана технологическая схема получения кормовых белковых гидролизатов из кератинсодержащего сырья. 100 кг сырья гидролизуют 250–300 л 2–6 %-ной соляной кислотой в течение 6 – 10 ч при температуре 133 – 152 °С и давлении 0,2 – 0,4 МПа. Нейтрализацию проводят кальцинированной содой до рН 6,5 – 7,0. Готовый препарат белкового гидролизата хорошо растворим в воде при комнатной температуре. Его выход составляет 90–95 % от содержания кератина в сырье. 1 кг препарата может заменить до 20 % белков основного рациона свиней и 2 кг мясокостной муки при откорме бройлеров [19].

Немецким исследователям удалось получить белоксодержащую муку из пера путем кипячения последнего при давлении 4,5 атм в растворе ортофосфорной кислоты в течение 1 ч. Смесь на основе полученного гидролизата и дрожжевого экстракта имеет на 72 % большую степень усвоения, чем каждый ее компонент в отдельности [20].

В настоящее время метод кислотного гидролиза совершенствуется с целью получения гидролизатов более высокого качества. Так, для уменьшения степени деструкции и окисления лабильных аминокислот выбирают мягкие режимы гидролиза в атмосфере инертного газа [21]. Например, использование 6 Н соляной кислоты, не содержащей примесей, и проведение гидролиза в атмосфере азота обеспечивает на 80 – 95 % сохранение лабильных аминокислот и на 15–20 % сохранение триптофана. Добавление к реакционной смеси антиоксидантов, тиоспиртов и производных индола еще в большей степени уменьшает опасность окислительной деструкции аминокислот. В препаративных целях для предотвращения деструкции триптофана и окисления метионина, серная и соляная кислоты могут быть заменены сернистой кислотой [22]. Добавление к кислотному гидролизу бисульфита натрия приводит к значительному уменьшению окраски раствора и увеличению содержания в нем триптофана и других аминокислот [23].

Поэтому целесообразно на стадии предварительной щелочной или кислотной обработки сырья не добиваться высокой степени гидролиза кератина, а лишь его растворения и частичного гидролиза до пептидов. Глубокий гидролиз растворенных кератинов целесообразно проводить с помощью ферментов.

Так, в США получен ферментативный гидролизат пищевого назначения из пера домашней птицы с использованием фермента кератиназы в водной среде в присутствии восстановителя – меркаптоэтанола или сульфита натрия, разрушающего дисульфиды [24].

В США из перьев домашней птицы также получен пищевой белковый продукт путем гидролиза в водной среде, содержащей ферменты типа щелочной или нейтральной протеазы или их смесь и восстановитель - меркаптоэтанол, расщепляющий дисульфиды [25].

Для действия протеолитических ферментов на кератинсодержащее

сырье необходима предварительная его обработка для ослабления водородных связей в молекуле белка кератина. С этой целью используют различные растворители.

В США запатентован способ получения белковых гидролизатов из кератинсодержащего сырья для косметической промышленности, заключающийся в следующем. Сырье сначала гидролизуют кислотой (соляной, серной или ортофосфорной) при температуре 80 °С и рН равном 2 в течение 4 ч. После этого осуществляют ферментативный гидролиз в присутствии мочевины, используя щелочные протеазы при рН 9–13 (этот диапазон оптимален для большинства из них). Продолжительность гидролиза 4–24 ч при температуре 40–65 °С, полученные гидролизаты имеют молекулярную массу от 1000 до 8000 Да [26]. Согласно вышеуказанному способу, сырье предварительно обрабатывают минеральной кислотой, подвергают ферментативному гидролизу щелочной протеазой, полученной из микроорганизмов *Bac. licheniformis*, *Bac. alcalophilicus*, *Bac. subtilis*, *Bac. mesentericus* и *Streptomyces griseus*. Полученный продукт обладает полным набором незаменимых аминокислот. Также проводятся исследования по ферментативному гидролизу пера ферментными препаратами, полученными из *Bac. licheniformis* и *Cefalosporium sp.*

К сожалению, до настоящего времени в России не организован промышленный выпуск высокоэффективных ферментных препаратов, гидролизующих кератин, в результате чего все кератинсодержащее сырье перерабатывается с использованием различных кислот и щелочей.

Оригинальный метод получения белкового гидролизата как источника аминокислот для бактериальных культур был предложен немецкими исследователями. В основу этого метода положено сочетание ферментативного гидролиза белков – казеина, агглютинина, кератина – панкреатическими ферментами или другими протеазами с химическими методами гидролиза. Полученный частичный ферментативный гидролизат разделяли на равные порции и подвергали одну часть щелочному гидролизу гидроксидом калия при температуре 110 °С в течение 1 ч, а другую часть – гидролизу серной кислотой в течение 1 ч при температуре 110 °С. Затем растворы смешивали, получали нейтральный раствор, обладавший высокой рост-стимулирующей активностью. Относительно мягкие условия гидролиза позволяют избежать значительной рацемизации аминокислот, а также деструкции триптофана и аргинина [27].

Список литературы

1. Дудникова Е.А. Разработка гибкой технологии комплексной переработки поджелудочной железы крупного рогатого скота с получением гидролитических ферментов. Автореф. дисс...канд. техн. наук. – М., 2009.
2. Шестаков С.С., Мулярчук М.В. Комплексное производство природных аминокислот из белкового сырья. – М.: ЦНИИТИПицепром. – 1979.

3. Визбуле А.Д., Беликов В.М., Арен А.К. Сложный вид ингибирования при гидролизе белков микробными протеолитическими ферментами. //Известия АН Латв. ССР – 1982. – №7. – С. 110 – 114.
4. Крылов И.А., Красноштанова А.А., Манаков М.Н. Ферментативный гидролиз белков биомассы промышленных микроорганизмов.// Биотехнология. – 1998. – № 6. – С. 63 – 68.
5. Гауровиц Ф. Химия и функции белков. Пер. с англ. В.В. Борисова, М.И. Верховецкой. //Под ред. В.О. Шпикитера. – М.: Мир,1965. – С. 252 – 257.
6. Денякина Е.К., Неклюдов А.Д., Герасимова Е.В. О количественном соотношении аминокислот и пептидов в белковых гидролизатах для парентерального питания. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1983. – Т. 19. – № 4. – С. 503–506.
7. Неклюдов А.Д., Навашин С.М. Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами. //Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 21. – № 1. – С. 3–17.
8. Васильев П.С., Суздалев В.В., Неклюдов А.Д. и др. Препараты для парентерального питания. //В кн.: Современные кровезаменители. – М.: ВНИИМИ, 1980. – С. 28 – 43.
9. Бердутина А.В., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Осока А.В. Определение макрокинетических констант кислотного гидролиза кератинсодержащего сырья. // В сб. тез.докл. Межд. конф. «Лечебно-профилактическое и детское питание». – С.-Петербург, 1996. – С. 83.
10. Савченко И.Л., Благодатский В.Н. Способ получения белкового гидролизата из сухих белоксодержащих отходов животного происхождения. // А.С. СССР № 1214061. – 1986.
11. Крылова В.Б., Попов В.П. Способ получения белкового гидролизата из кератинсодержащего сырья. // АС СССР № 3701630/28-13. – 1985.
12. Антипова Л.В., Пащенко Л.П., Шамханов Ч.Ю., Курилова Е.С. Получение и характеристика пищевого кератинового гидролизата. //Хранение и переработка сельскохозяйственного сырья. – 2003. – №7. – С. 63–65.
13. Либерман С.Г., Шевкунов К.Ф., Щербаков А.Р. Переработка кератинсодержащего сырья. //Обзорная информация. Серия «Мясная промышленность». – М.: ЦНИИТЭИмясомолпром, 1979. – С. 30.
14. Бердутина А.В., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Осока А.В. Изучение процесса кислотного гидролиза кератинсодержащего сырья. //В сб. тез. докл. 2-ой Всероссийской конф. «Прогрессивные экологически безопасные технологии хранения и переработки сельскохозяйственной продукции для создания продуктов питания повышенной пищевой и биологической ценности». – Углич, 1996. – С. 48.
15. Berdutina A.V., Nekludov A.D., Ivankin A.N., Karpo B.S., Osoka A.V. Study of the process of acid hydrolysis of keratin-containing raw materials as a method for manufacture of food additives.// 43 rd ICOMST Congr. Proceedings. – Auckland, New Zeland. – 1997. – P. 482 – 483.
16. Антипова Л.В. Полянских С.Н., Кочергина Н.В. Биотехнология переработки кератинсодержащих отходов. //Птицеводство. – 1998. – №2. – С. 26–29.
17. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Баер Н.А., Бердутина А.В., Дубина В.И. Источники резервного белка для получения пищевых гидролизатов из животного сырья. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 1998. – № 3. – С. 24 – 25.
18. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. и др. Способ получения кормовых средств из протеинсодержащих отходов переработки животного сырья. //Патент СССР № 1028236. – 1993.
19. Способ получения белкового продукта. // Патент ФРГ №284047. – 1994.
20. Кудрявцев Р.М., Степаненко Е.С., Волков Е.Н. Использование биосульфита натрия для кислотного гидролиза. // Труды ВНИИКонсервной и овощной промышленности. – 1980. – № 16. – С. 38 – 41.

21. Антипова Л.В., Шамханов Ч.Ю. Универсальная технологическая схема получения ферментативных гидролизатов из кератина пера. // Тез. докл. IV Междунар. научн.-техн. конф. «Пища. Экология. Человек». – М., 2001. – С. 318–321.
22. Способ приготовления белкового продукта. // Патент США № 3578461. – 1994.
23. Пивненко Т.Н., Жданюк В.М., Энштейн Л.М. Способ получения протеолитического комплекса. // Патент РФ № 2034028. /Бюлл. – 1995. – № 12.
24. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Свойства и применение белковых гидролизатов (обзор)// Прикладная биохимия и микробиология. – 2000. – Т.36. – №5. – С. 525–534.
25. Braeumer K., Eckmayer Z. Способ получения водорастворимых гидролизатов кератинсодержащих материалов. Method for making water-soluble hydrolyzates of keratinaceous materials // Патент США № 4232123. Оpubл. 04.11.1980.
26. Weeks L.E; Wildi B.S. Способ приготовления белкового продукта. // Патент США № 3578461. Оpubл. 11. 05.1971.
27. Способ приготовления белковых гидролизатов, имеющих аромат мяса. // Патент США № 3692538. – 1997.

Глава 11

Биодеградация важнейшего структурного белка – коллагена животных и гидробионтов

Использование объектов животного происхождения в пищевых целях имеет длительную историю. Мясо и различные мясные изделия составляют заметную долю в рационе питания человека. Часть мясного сырья отличается повышенным содержанием жестких белков, прежде всего, соединительной ткани, включающей коллаген. Вкус мясной продукции, выработанной из такого сырья, не всегда приятный и потребители, естественно, предпочитают использовать мягкое мясо.

Повышение качества мясных изделий может быть осуществлено путем специальной технологической обработки, связанной с возможностью целевой биодеградации каркасных белков, входящих в состав мясных изделий и придающих им «жесткий» вкус, в частности фибриллярного биополимера небольшой эластичности – коллагена [1 – 9, 78].

Как уже неоднократно упоминалось в данной монографии, семейство фибриллярных белков, относящихся к коллагенам различного типа, является одним из самых распространенных белковых образований млекопитающих и обычно составляет от 25 до 35 % от общего количества белка в организме (около 6 % от массы тела) [10, 11]. Отличительными признаками коллагена являются его специфичный аминокислотный состав, химическая инертность в физиологических условиях и способность превращаться в желатин при длительном нагревании в кислых или щелочных водных растворах [12].

Таблица 11.1

Способность к развариванию и перевариванию мяса (баранина)

в зависимости от зоны отбора проб по туше животного и содержания коллагена соединительной ткани

Содержание белка, %	Место отбора пробы в соответствии с разрубкой туши животного	окси-Prо, мг %	Развариваемость, %	Доля соединительной ткани к белку, %	Переваримость <i>in vitro</i> , мг Тур/г белка		
					Пепсином	Трипсином	Условная сумма
17,5	Пашина	240	50	11	12,7	9,6	22,3
20,5	Передняя голяшка	340	30	13	1,0	9,0	20,0
19,8	Т/б отруб	240	50	10	10,8	10,7	21,5
20,3	Поясничная часть	200	50	8	11,6	10,0	21,6
19,9	Вырезка	175	52	7	12,1	11,2	23,3
18,3	Реберная часть	235	46	10	10,4	10,1	20,5
18,7	Кострец	250	48	10	10,0	9,2	19,2
18,0	Лопатка	265	44	12	10,8	10,1	20,9
17,8	Шея	300	40	14	9,0	10,2	19,2
17,1	Грудинка	260	55	12	9,6	10,1	19,7
20,6	Задняя голяшка	330	31	13	11,2	9,1	20,3
17,7	Подлопаточная часть	280	42	12	10,7	10,0	20,7

В мясе и продуктах мясопереработки содержание коллагена колеблется от нескольких долей процента в высококачественном мясе (мышечная ткань *m. longissimus dorsi*) до 10...25 % (масса мышечной и соединительной животной ткани мышц: т/б среднегодичная *m. glutaeus medius*, т/б полусухожильная *m. semitendineus*, т/б полуперепончатая *m. semimembranosus*, т/б приводящая *m. adductor femoris*, т/б гребешковая *m. pectineus*, т/б двухглавая *m. biceps femoris*, т/б четырехглавая *m. quadriceps femoris*, лопатка трехглавая *m. triceps brachii*, лопатка предостная *m. supraspinatus*, лопатка заостренная *m. infraspinatus*, длинейшая мышца *m. longissimus dorsi*, мышца поясничная *m. longissimus dorsi lum*, шейная мышца *subcutaneus colli*), некоторые продукты мясопереработки, до настоящего времени рационально не используемые (говяжий гольевый спилок, свиная шкура, продукты жиловки мяса – жилка) из-за высокого содержания в них коллагеновой массы, которая может превышать треть химического состава [11, 12].

Содержание коллагена может быть косвенно оценено по количеству соединительной ткани в конкретном образце. Оно различается в зависимости от того, в какой части туши животного осуществляют отбор пробы (табл. 11.1). Причем, если в мясе с самыми высокими потребительскими характеристиками (вырезка) содержание коллагеновой соединительной ткани минимально, то для образцов животной ткани, взятой из других час-

тей туши животного, массовая доля соединительной ткани значительно выше, а в некоторых зонах, особенно вблизи конечностей, мясо содержит много соединительной ткани, переходящей в хрящи. В этих областях мясная ткань является очень жесткой и её использование в пищевых целях затруднено.

Считается, что около 80 % соединительной ткани говядины составляет коллаген и около 20 % – эластин.

Ранее уже упоминалось, что коллаген животного происхождения, как объект биохимической деградации, обычно рассматривается как фибриллярный белок, который при комнатной температуре практически не растворяется в воде, слабых кислотах и щелочах, а также в солевых растворах, например хлористого натрия или сульфата аммония. В нативном состоянии коллаген животного происхождения резистентен к действию большинства протеолитических ферментов. По физико-химическим свойствам он существенно отличается от других белков животного происхождения.

Различные типы коллагенов с точки зрения возможности их эффективного гидролитического расщепления, были достаточно подробно изучены современными физико-химическими методами и имеют, как показали электронно-микроскопические исследования, характерную поперечно-полосатую структуру крупных белковых доменов [13, 14]. Коллагены кожных оболочек, соединительной ткани и сухожилий скота обычно состоят из нескольких спиралевидных структурных субъединиц и содержат высокие концентрации пролина и оксипролина (около 20 % от всех остальных аминокислот), а также глицина и аланина (свыше 50 % от общего содержания других аминокислот). Как известно, коллаген характеризуется также отсутствием триптофана и низким содержанием ароматических, гетероциклических и серосодержащих аминокислот, в силу чего он обладает невысокой питательной ценностью. Известно также, что он плохо переваривается в организме человека, из-за низкого содержания коллагеназ в желудочно-кишечном тракте [13].

Кроме того, нативный, не подвергшийся биodeградации коллаген находит ограниченное применение в пищевой промышленности, так как обладает недостаточной водосвязывающей и эмульгирующей способностью [15].

Современная теория адекватного питания предусматривает обязательное наличие в продуктах питания человека пищевых волокон, роль которых, наряду с растительными белками, могут с успехом выполнять различные фракции коллагена, способствующие не только нормальному пищеварительному процессу, но и удалению из организма человека тяжелых металлов, токсинов, канцерогенов и других веществ, потенциально опасных для здоровья [16].

Было показано, что отдельные специально полученные фракции коллагена обладают хорошей водосвязывающей и эмульгирующей способностью для других пищевых белков, что послужило основанием для рекомендации их применения в различных отраслях пищевой промышленности [17–19].

Примеси коллагенового волокна в мясопродуктах с одной стороны способствуют улучшению пищеварения и должны улучшать работу кишечника человека в целом, однако с другой стороны наличие жесткого коллагена придает мясным изделиям грубый привкус и в целом ухудшает вкусовую гамму продуктов, что делает их менее привлекательными для потребителя.

В литературе описаны многочисленные попытки устранить или, по крайней мере, уменьшить этот недостаток путем размягчения соединительной ткани. Такое размягчение достигается за счет использования различных протеолитических и коллагенолитических ферментов, в частности коллагеназ камчатского краба [20].

Коллагеназа камчатского краба – протеолитический фермент (протеиназа) разрушающий пептидные связи в природном коллагене. Коллагенолитические протеиназы краба проявляют высокую активность по отношению к различным типам природного коллагена, особенно типа III из кожи теленка и коллагену типа IV из хрусталика глаза быка, которые устойчивы к действию микробных коллагеназ рода *Clostridium*.

Коллагеназы краба не гидролизуют пептидный фрагмент коллагена Z–Gly–Pro–Ala–Gly–Pro–Ala, легко гидролизуемый коллагеназами *Clostridium* sp, что свидетельствует о различной субстратной специфичности коллагеназ краба и истинных животных коллагеназ. В отличие от микробных коллагеназ, коллагеназы краба гидролизуют синтетические субстраты химотрипсина, трипсина и эластазы и относятся к классу сериновых протеиназ [21–23]. У этих ферментов проявляется трипсино- и химотрипсиноподобная, а также катепсиновая активность [24].

Некоторые коллагеназы получают из *Clostridium histolyticum*. Они действуют в кислой среде и эффективны в отношении коллагена. Эластазу получают из свиной поджелудочной железы, она действует в щелочной среде при pH около 8,8. Таким образом, оба эти фермента являются синергистами, причем один фермент активен в щелочной среде парной говядины до посмертного окоченения, другой – во время посмертного окоченения в кислой среде. Посмертное окоченение сопровождается периодическим спонтанным образованием молочной кислоты.

Проблема деградации коллагена в мясных продуктах имеет свою достаточно длинную историю, решение которой не утратило актуальности даже до последнего времени [19, 25–30].

Поскольку послеубойное созревание и введение протеолитических ферментов обычно повышают нежность мяса, не размягчая соединитель-

ную ткань, необходимо, пусть даже частично, расщепить коллаген и эластин одним или несколькими ферментами.

В. Е. Williams на фирме «Hodges Research and Development Company» разработал способ, при котором подлежащую размягчению тушу шприцуют с помощью игольчатого устройства после убоя и разделки водным раствором ферментов, которые размягчают коллаген и эластин соединительной ткани. Единственными ферментами, способными атаковать нативный коллаген и эластин, являются коллагеназа и эластаза (соответственно) [32].

Коллагеназа в этом случае выступает как фермент, разрушающий нативный коллаген, стойкий к действию всех известных протеолитических ферментов и специфически воздействующий только на коллаген и продукты его распада, не влияя на родственные белки или синтетические субстраты.

Схема применения вышеназванного способа заключается в следующем. Несколько говяжьих полутуш шприцевали раствором, содержащим по 1 г коллагеназы и эластазы и 2,8 л питьевой воды и составляющим примерно 3 % от массы полутуши. Содержание соли в растворе составляло 0,8 %. Соль не повышает нежность мяса, ее функция – поддерживать естественное содержание соли в говядине. Для тепловой обработки полутуши помещали в камеру с перегретым острым паром, где поддерживалась температура чуть ниже 48,8 градусов, и выдерживали, пока внутренняя температура *l. dorsi* (поясничного и реберного «глазка») не поднялась до 40,5...43,3 °С. Для этого требовалось 1...2 ч. После нагревания полутуши поместили в обычный холодильник и охлаждали до +1,6 °С.

Затем, пользуясь оборудованием для диатермического нагрева, полутуши в течение нескольких минут равномерно доводили до вышеназванной температуры. В этом случае критическим фактором является не продолжительность нагрева, а достигаемая температура. Тепловая обработка, ускорившая посмертное окоченение, значительно способствовала проявлению действия коллагеназы, которая активна в кислом диапазоне рН, т. е. во время посмертного окоченения. Следовательно, нагревание намного усилило эффект фермента, воздействующего на коллаген, который, как упоминалось выше, составляет до 80 % соединительной ткани говяжьей туши. Без тепловой обработки нельзя добиться какого-либо существенного размягчения ни через сутки, ни через пять, а при нагревании коллагеназа и эластаза давали положительные результаты через 24 ч и через 5 сут.

Таким образом, решение проблемы расщепления коллагена в мясных продуктах путем использования эффективных ферментов, воздействующих на коллаген, позволяет разрабатывать современные способы повышения качества мясных изделий на основе энзиматической биodeградации примесных белков с жесткой структурой.

Оптимальные условия действия коллагеназы из гепатопанкреаса камчатского краба. Проявление энзиматической активности. Фермент из гепатопанкреаса камчатского краба производства Полярного НИИ морского рыбного хозяйства и океанографии (ПИНРО) обладает средней протеолитической активностью 620 тир ед./г и колагеназной активностью – 1,1 мЕД/мг [9, 20].

На рис. 11.1 представлена зависимость ферментативной активности (ПА) коллагеназы от величины рН. Как видно из представленных данных данный фермент по протеолитической активности может быть формально отнесен к нейтральным протеиназам с оптимумом рН приближающимся к 6,5 – 7,0.

Максимальная активность фермента как протеиназная, так и коллагеназная проявляется при 37 °С, а при температурах более 50 °С фермент полностью теряет свою активность, что соответствует литературным данным о невысокой температурной устойчивости ферментного комплекса, выделяемого из гепатопанкреаса камчатского краба [32, 33].

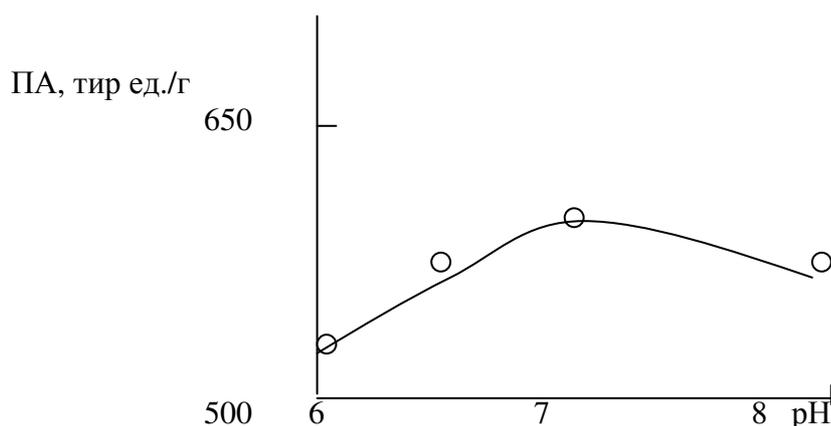


Рис. 11.1. Определение рН оптимума фермента. Зависимость протеолитической активности коллагеназы от величины рН

Этот факт может быть использован в дальнейшем в технологии мясных изделий как способ дезактивации остаточных количеств используемого фермента при температурной обработке мясных изделий.

В табл. 11.2 приведены значения величины протеолитической активности фермента коллагеназы камчатского краба в зависимости от температуры реакции.

Как указывалось выше, воздействие ферментных препаратов на белковые субстраты животного происхождения приводит к их энзиматической деградации с образованием свободных аминокислот и олигопептидов. Такие продукты, обработанные ферментами с протеиназной и коллагеназной активностью *in vitro*, должны, кроме проявления других новых свойств,

обладать повышенной биодоступностью к ферментам пищеварительного тракта *in vivo* в желудке млекопитающих. То есть переваримость ферментированных коллагенсодержащих продуктов должна увеличиваться [25, 34].

Таблица 11.2

Температурная зависимость энзиматической активности

Температура, °С	Величина протеолитической активности, тир ед./г	Коллагеназная активность, мЕД/мг
4	110	–
10	120	–
22	185	0,7
37	625	1,1
40	305	–
45	175	–
50	105	–
60	0	0
70	0	0
75	0	0

Так перевариваемость коллагена, выделенного из сухожилий молодняка крупного рогатого скота (к.р.с.), оцененная по стандартной методике в присутствии пепсина и трипсина составляет около 7 % (по отношению к альбумину) [9]. Этот же коллаген, обработанный в присутствии 0,1 % фермента ПИНРО (40 °С, 6 ч, рН 7,4, гидромодуль 1 : 4) приводит к получению дисперсии животного коллагена с уровнем переваримости более 35 %, что не только косвенно подтверждает наличие коллагеназной активности препарата ПИНРО, воздействующей непосредственно на соединительные белки животной ткани, но и позволяет повышать биологическую и пищевую ценность пищевых композиций, включающих в свой состав белки, относящиеся к группе коллагена.

В аналогичных условиях обработка животного коллагена микробным ферментом с коллагеназной активностью из *Serratia proteamaculans-94* приводила к получению коллагеновой массы с переваримостью 35...45 % [41].

Характер и эффективность воздействия препарата коллагеназы может быть оценена, в частности, методом электрофореза в 10 %-ном полиакриламидном геле [9, 35, 36]. Как известно, коллагеназы, специфичные к нативному коллагену, обладают способностью гидролизовать молекулу коллагена, причем считается, что такое воздействие происходит, по крайней мере, в одной точке, на расстоянии примерно в $\frac{3}{4}$ от N-конца цепи коллагена [37].

Используемые ферменты – коллагеназы из гидробионтов или микробного происхождения, являются по существу полиферментными комплексами, обладающими и коллагеназной и достаточно выраженной протеолитической активностью. Поэтому на электрофореграммах обработанной ферментом животной ткани (рис. 11.2), видно, что в области более 170 кД белковые полосы с большими молекулярными массами практически отсутствуют. То есть обработка животной ткани коллагеназами приводит к существенному уменьшению содержания высокомолекулярных белков в обрабатываемом животном сырье (табл. 11.3).

Молекулярно-массовое распределение основных белковых фракций в деградированном ферментом объекте отличается от исходного. Известно, что в процессе ферментативной деградации животной ткани, происходят структурные изменения основных мышечных белков – актина и миозина, являющихся белками с глобулярно-фибриллярной структурой.

Молекула миозина имеет молекулярную массу 470 кДа, состоит из двух идентичных субъединиц и четырех коротких цепей, которые легко отщепляются под действием химических реагентов.

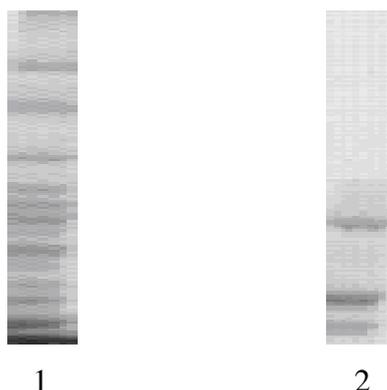


Рис. 11.2. Результаты электрофоретического разделения животных белков (нежированная говядина). 1 – не обработанная ферментом говядина; 2 – говядина, подвергнутая обработке 0,05 % масс. фермента из гепатопанкреаса камчатского краба

Актин в отличие от миозина является водорастворимым глобулярным белком с молекулярной массой 42 кД [38].

Скелетные мышцы содержат в 2 раза больше (по массе) миозина, чем актина. Другие органы – напротив, намного больше актина, чем миозина. Следует отметить наличие в мышцах тропомиозина с молекулярной массой 70 кД, состоящего из двух идентичных L-спиральных полипептидных цепей, закрученных друг относительно друга, и имеющего сравнительно простое строение молекулы.

Таблица 11.3

Молекулярно-массовое распределение основных фракций говядины *l. dorsi*, обработанной коллагеназой камчатского краба

электрофореграммах наблюдаются только субъединичные белковые фракции. Из сопоставления денситограмм можно сделать вывод, что через несколько суток в экстрактах появляются четко выраженные низкомолекулярные фракции с молекулярной массой 9...18 кДа, содержание которых незначительно в составе белков исходного мяса. Появление этой фракции свидетельствует о явном деструктивном влиянии процесса обработки на коллагеновые белки мяса.

Поскольку наиболее усвояемыми белками являются фракции с молекулярными массами 6...15 кД [42], то мясные продукты, полученные из ферментированного мяса, будут иметь большую пищевую ценность, чем продукты, полученные из мяса, не обработанного ферментами.

Таким образом, анализ белковых фракций мяса и продуктов его переработки позволяет разрабатывать научные подходы к рациональному получению пищевой продукции, в том числе из низкосортного мясного сырья и реализовать их в дальнейшем на практике.

Известно, что содержание доступного животного белка в мясе говядины, свинины, баранины составляет 14...22 % масс., количество белка в овощах и фруктах составляет 0,5...3 % масс., а в зернобобовых 10...35 % масс. [9]. В последние годы разработаны и широко поступают в продажу большое число пищевых комбинированных продуктов, содержащих смеси животных и растительных компонентов. К такого рода продуктам относятся как собственно мясные изделия, включающие в себя мясные полуфабрикаты, содержащие в качестве добавок от 1 до 40 % соевого белка, так и другие традиционные продукты на основе мясо-растительных и мясо-овощных смесей.

Ранее уже отмечалось, что одним из возможных методов обработки белка в составе мясных продуктов является метод энзиматической биодеградации, основанный на проявлении эффекта энзиматического расщепления белков в присутствии специфических ферментов. В качестве таких ферментов можно использовать различные протеиназы (протеазы), например трипсин, панкреатин, коллагеназу и другие ферменты, проявляющие протеиназную активность, то есть способность расщеплять белки до аминокислот и коротких пептидов [43, 44], придавая мясным изделиям совершенно другие потребительские свойства.

Для осуществления ферментативного гидролиза белоксодержащего сырья можно использовать комплекс протеиназ из гепатопанкреаса камчатского краба, полученный по технологии ПИНРО [45]. Для сравнения использовали также микробную коллагеназу, полученную из продуцента *Serratia proteamaculans*-94 [41].

Процесс ферментативного расщепления в данном эксперименте проводили следующим образом. Мясное сырье диспергировали в воде в соотношении 1:10, добавляли фермент в количестве 10 % к массе взятого мясного сырья, и выдерживали при непрерывном перемешивании при

температуре 20...50 °С в течение 0...4 ч. Процесс контролировали по накоплению свободных аминокислот, которые определяли методом формольного титрования.

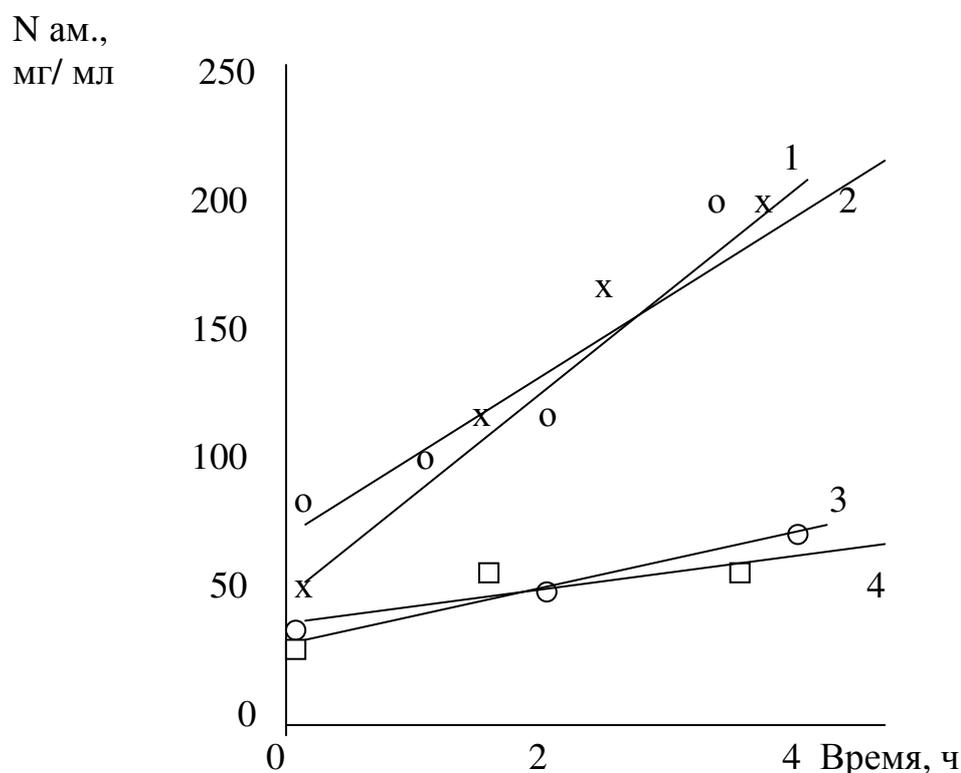


Рис. 11.3 Зависимость величины содержания азота свободных аминокислот в белке в продуктах гидролиза мясного сырья в присутствии коллагеназы из гепатопанкреаса (КГ) камчатского краба и микробной коллагеназы (КМ) от времени гидролитического расщепления. 1 – говядина + КГ; 2 – баранина + КГ; 3 – говядина + КМ; 4 – баранина + КМ. Реакционная смесь содержит в 10 мл воды 0,7 г мясного сырья и 0,07 г фермента (10 % к массе сырья), обработка при 50 °С в течение 0...4 ч

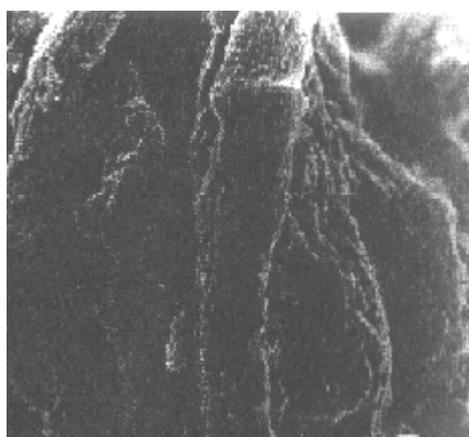
На рис. 11.3 представлены зависимости количества свободных аминокислот (по аминному азоту), образующихся в результате ферментативной обработки сырья, от времени гидролиза.

Поскольку протеазная активность фермента из гепатопанкреаса камчатского краба ниже аналогичной активности фермента микробного происхождения, можно констатировать, что процесс биodeградации животного белка в случае использования протеиназы из гепатопанкреаса камчатского краба происходит с большой скоростью. Это может иметь как положительное значение, например, в случае дальнейшего использования ферментированного продукта для приготовления легко усвояемых диетических мясных продуктов, так и отрицательное, например, при изготов-

лении мясной продукции в технологических условиях из-за образования «дряблой», не имеющей товарного вида и вкусовой привлекательности консистенции.

Микроструктурные исследования продуктов, подвергнутых энзиматической биодegradации в присутствии фермента из гепатопанкреаса камчатского краба позволяют визуально оценить результаты биохимического воздействия на белковые структуры, находящиеся в составе животной ткани, однако, поскольку световой микроскоп позволяет изучать объекты размерами более 100 нм, представленные далее рисунки можно отнести к изображениям микро и макроструктур.

Изучение образцов коллагенсодержащих тканей животного происхождения под микроскопом при увеличениях более чем в 100 раз позволяет визуально наблюдать изменения в коллагеновых и других белковых агрегатах, происходящие под воздействием гидролитических ферментов.



а



б

Рис. 11.4. Результаты ферментативного воздействия 0,5 % масс. протеиназы краба на животные объекты: а – срез исходной соединительной ткани (говядина); б – результат обработки того же объекта ферментом при 10 °С в течение 3 сут

Результаты микроструктурных исследований образцов животной ткани (говядина) показывают наличие изменений из-за энзиматической дегradации (рис. 11.4). В мышечной ткани контрольных необработанных ферментом образцов отчетливо просматривается характерная для говядины поперечная исчерченность. Границы между волокнами хорошо просматриваются. Ядра волокон имеют палочковидную форму с зернистой структурой хроматина.

Таблица 11.4

Аминокислотный состав образцов белка (Б) говяжьего спилка

Аминокислота	Нативный спилок		Содержание свободных аминокислот, мг/100 г образца	
	г/100 г образца	г/100 г белка	Исходный образец	Образец, обработанный 0,1 % фермента
АСП	1,58	6,79	13,70	59,44
о-ПРО	0,36	1,55	19,60	82,64
ТРЕ	0,44	1,88	13,4	55,32
СЕР	0,8	3,43	12,8	54,27
ГЛУ	2,6	11,19	126,9	507,6
ПРО	3,18	13,72	10,1	41,48
ГЛИ	3,91	16,86	28,7	117,83
АЛА	2,08	8,97	29,7	111,22
ЦИС	–	–	0,5	2,99
ВАЛ	0,73	3,15	2	9,17
МЕТ	0,06	0,24	4,7	14,55
ИЛЕ	0,44	1,91	10,35	49,89
ЛЕЙ	0,89	3,84	22,88	104,08
ТИР	0,16	0,69	17,73	71,32
ФЕН	0,57	2,44	15,24	58,16
ГИС	0,6	2,59	49,2	208,38
ЛИЗ	0,98	4,23	15,32	66,9
АРГ	1,96	8,43	23,12	97,51
Итого	21,33 (Б)	91,92	415,94	1712,75
			1,94 % от белка	8,03 % от белка

Деструктивные изменения выявлялись в отдельных волокнах в виде микротрещин и поперечно-щелевидных нарушениях регулярной структуры.

В результате ферментативной обработки часть мышечных волокон становилась менее набухшей, а основная масса волокон находилась в состоянии множественной фрагментации с участками зернистого распада. Участки соединительной ткани характеризовались разволокнением, фрагментацией и частичным лизисом коллагеновых волокон.

Таким образом, в основном компоненте, определяющим «жесткость» мяса и мясных изделий – соединительной ткани, наблюдалось развитие деструктивных процессов, в первую очередь, связанную с разрушением коллагена под воздействием фермента.

Описанные выше результаты воздействия коллагеназы камчатского краба на мясное сырье показывают, что применяемые коллагеназы обладают высокой коллагеназной активностью, то есть субстратной специфичностью по отношению к коллагену мяса. Представляет определенный интерес оценить результат воздействия такого фермента на некоторые продукты мясопереработки, содержащие достаточно высокий уровень коллагена. В качестве таких объектов животного происхождения можно рассматривать три основных коллагенсодержащих источника: сухожилия

крупного рогатого скота (жилка) и подкожный слой (спилок) крупного рогатого скота, а также кожный покров свиней.

Таблица 11.5

Аминокислотный состав образца белка (Б) жилки говяжей

Аминокислота	Жилка		Содержание свободных аминокислот, мг/100г образца	
	г/100 г образца	г/100 г белка	Исходный образец	Образец, обработанный 0,1 % фермента
АСП	1,33	8,60	16,74	71,33
о-ПРО	0,63	4,07	18,81	86,64
ТРЕ	0,39	2,52	11,41	44,36
СЕР	0,56	3,60	10,84	47,78
ГЛУ	1,77	11,41	106,86	452,67
ПРО	1,93	12,47	9,32	40,81
ГЛИ	1,38	8,91	24,66	112,67
АЛА	0,74	4,79	28,55	125,44
ЦИС	0,12	0,75	0,54	2,77
ВАЛ	0,53	3,43	2,38	11,88
МЕТ	0,34	2,17	3,99	14,31
ИЛЕ	0,28	1,79	11,45	50,50
ЛЕЙ	0,64	4,11	28,68	122,29
ТИР	0,19	1,20	18,23	81,07
ФЕН	0,49	3,13	13,84	59,17
ГИС	0,50	3,22	38,450	177,55
ЛИЗ	0,88	5,64	16,32	71,41
АРГ	1,58	10,19	28,12	128,58
Итого	14,27 (Б)	92,01	389,19	1701,23
			2,72 % от белка	11,9 % от белка

Мы сообщали об использовании этих объектов в качестве источника фракций животного коллагена, получаемых водно-солевой экстракцией [46]. Однако выход растворимых фракций без специальной механической обработки не превышает 5...15 % от содержащегося белка. В зависимости от условий водно-солевой экстракции могут образовываться белковые фракции только с низким водо- и жирно-связывающим потенциалом, что делает такие фракции коллагена недостаточно привлекательными для их последующего использования в составе пищевых рецептур.

Таблица 11.6

Аминокислотный состав белков (Б) из свиной шкурки

Аминокислота	Изолированный коллаген свиной шкурки		Содержание свободных аминокислот, мг/100г образца	
	г/100г белка	г/100 г сырья	Исходный образец	Образец, обработанный 0,1% фермента
АСП	6,8	2,83	18,74	162,36
о-ПРО	14,6	6,08	26,81	315,34
ТРЕ	2,3	0,95	19,45	242,33
СЕР	4,3	1,79	14,33	177,62
ГЛУ	11,2	4,66	119,24	1611,36
ПРО	14,4	6,01	8,16	102,24
ГЛИ	26,6	11,08	26,53	331,42
АЛА	9,6	4,23	34,57	443,98
ЦИС	–	0,1	0,48	6,72
ВАЛ	2,5	1,04	6,18	81,52
МЕТ	0,8	0,33	5,46	72,44
ИЛЕ	1,9	0,79	12,45	154,34
ЛЕЙ	3,7	1,54	24,14	259,96
ТИР	0,2	0,08	19,82	244,48
ФЕН	2,4	1,06	22,66	302,24
ГИС	0,8	0,39	31,42	379,88
ЛИЗ	4,0	1,62	15,15	198,12
АРГ	8,2	3,41	27,44	384,16
Итого	114,3	47,99 (Б)	433,03	5470,51
			0,9 % от белка	11,3 % от белка

Использование достаточно эффективного фермента из гепатопанкреаса камчатского краба с полисубстратной специфичностью позволяет осуществлять более глубокую биохимическую обработку коллагенового сырья.

В табл. 11.4 – 11.6 представлен основной аминокислотный состав обрабатываемого коллагенсодержащего сырья. Как видно из представленных данных обработка ферментом, обладающим протеолитической и коллагеназной активностью, приводит к определенной деградации белков, содержащихся в сырье, с одновременным высвобождением свободных аминокислот. Количество и состав продуктов деградации определяется многими факторами, в том числе и природой обрабатываемого субстрата.

Таким образом, использование фермента из гепатопанкреаса камчатского краба для обработки коллагенового сырья приводит не только к рас-

паду собственно коллагена, но и к достаточно выраженному процессу глубокой деградации животного белка, степень которой может в ряде случаев оказываться полезной с точки зрения повышения биологической ценности продуктов с использованием данного вида сырья. В ряде случаев развитие таких процессов может ухудшить технологические свойства, поэтому при разработке конкретной продукции необходимо проводить оптимизацию условий обработки по всем параметрам.

Испытания возможности использования ферментированных коллагеновых масс из говяжьего спилка и жилованной массы (жилки) показывают, что белковые продукты обработки данного вида животного сырья обладают очень низкой водо- и жироземмулирующей способностью. Такая тенденция характерна как для ферментных препаратов и гепатопанкреаса камчатского краба, так и для микробных коллагеназ [47, 48].

В рассматриваемом случае процесс ферментной обработки сырья приводит не только к заметному росту содержания свободных аминокислот, но и расщеплению структурных белковых образований с высвобождением коротких пептидов, повышая биологическую ценность полученных таким образом продуктов. Однако, развитие процессов энзиматической биодеградации, приводящее к разрушению нативных белковых структур, ухудшает технологические свойства продуктов в составе комбинированных мясных изделий, в которых достаточно важно обеспечивать высокую водо- и жироземмулирующую способность.

В случае использования в качестве сырья для ферментативной обработки кожного покрова свиней (шкур) процесс быстрого гидролиза белковых компонентов (например, 6 ч, 30 °С, 0,1 % масс коллагеназы краба) хотя и протекает аналогично, однако, вследствие компонентного состава сырья, а также за счет варьирования условий обработки приводит к получению белковых субстанций с частично фрагментированной структурой, повышенным содержанием свободных аминокислот и частичным сохранением водо- и жироземмулирующей способности (примерно на 50 % от исходной величины).

Варьирование условий ферментативной обработки и водно-солевой экстракции свиной шкуры позволяет рассматривать данный процесс как перспективный для возможного получения функционального животного белка и его использования в составе комбинированных мясных продуктов.

Применение коллагеназы из гепатопанкреаса камчатского краба для повышения качества низкосортных мясных полуфабрикатов. Результаты по изучению изменения низкосортного мясного сырья под воздействием коллагенолитического фермента из гепатопанкреаса камчатского краба показали, что данный фермент достаточно активен по отношению к различным видам мясного сырья и может быть использован для обработки коллагеновых включений с общим изменением комплекса свойств.

Таблица 11.7

Обработка говядины II категории коллагеназой камчатского краба

Показатель	Время, ч	Контроль без фермента		Количество добавленного фермента, % масс. к сырью			
		Посол без воды	Посол с водой	0,05	0,1		0,2
					Вар. 1	Вар. 2	
рН	0	5,3	5,1	5,2	5,2	5,4	5,3
	72	5,4	5,7	5,3	5,4	5,5	5,4
	96	6,6	6,7	6,2	6,2	6,3	6,3
Содержание воды, %	0	60,6	63,0	63,4	63,1	64,2	62,3
	72	67,7	70,2	73,0	69,4	70,4	73,1
	96	66,9	71,4	74,3	74,7	75,8	73,8
Содержание NaCl, %	0	0,19	0,19	0,35	0,45	0,43	0,44
	72	0,38	0,39	0,43	0,50	0,49	0,48
	96	0,44	0,43	0,48	0,58	0,57	0,55
Влаго-связывающая способность, % [34]	0	76,0	76,5	85,0	71,3	71,3	74,8
	72	80,9	81,7	88,4	85,6	86,7	91,6
	96	82,1	82,2	83,9	92,5	94,3	93,0

Стратегия использования данного фермента с учетом рН и температурного оптимума предполагает его достаточно эффективное применение при температурах 25...35 °С. В этом случае заметный эффект по изменению свойств, в зависимости от вида мясного сырья, достигается в пределах нескольких часов (6...24 ч).

Параллельное протекание побочных процессов, связанное с действием посторонней микрофлоры, приводит к ухудшению потребительских свойств мясного сырья (потеря свежести).

Поэтому, при выборе параметров использования исследуемого фермента учитывалась возможность сохранения потребительских свойств мясного сырья при пониженных температурах, а также необходимость эффективной биотрансформации коллагена.

Опыт показывает, что данный процесс целесообразно совмещать с консервирующей обработкой мясного сырья, в качестве которой традиционно используется обыкновенный посол.

Результаты по ферментативному кондиционированию мясного сырья, в качестве которого использовали измельченный на мясорубке с решеткой 3 мм фарш говядины II категории, представлены в табл. 11.7.

Обработку проводят следующим образом.

1. Смесь соли (1 % масс. к сырью) и фермента (0,05...0,2 % масс. к сырью) смешивают с фаршем и выдерживают в посоле при 6 °С в течение 0...96 ч (табл. 11.7 – вариант 1).

2. В водный раствор 1 % масс. соли вносят при перемешивании 0,05...0,2 % масс (к сырью) фермента из гепатопанкреаса камчатского краба, добавляют фарш (количество рассола составляет 20 % к сырью) и выдерживают в посоле при 6 °С в течение 0...96 ч (табл. 11.7 – вариант 2).

Микроструктурные исследования показали, что в ферментированных в течение 72 ч образцах наблюдалось резкое разрыхление колагеновых волокон, проявлялись деструктивные изменения в виде отдельных микротрещин. Соединительные и мышечные фрагменты приобретали характер сплошной гомогенизированной массы пучков коллагеновых волокон, наблюдался лизис клеточных элементов и дезорганизация эластичных волокон (рис. 11.5 – 11.6).

В контрольных образцах без применения фермента проявлялась четко выраженная структура волокон в мышечных пучках с характерной широкой поперечной исчерченностью и ядрами волокон вытянутой формы.

Полученные ферментированные продукты обладают большей степенью однородности гомогенной микроструктуры, обладают высокой влагосвязывающей способностью и могут быть использованы в качестве добавок, например, в колбасные изделия, либо в рецептурах мясных и мясорастительных консервов.

По технологическим соображениям 2-ой вариант посола является более предпочтительным и можно считать, что наиболее оптимальными условиями ферментативной обработки низкосортной говядины при температуре 6 ± 2 °С является время – 3 сут, рассол – 1 % масс. (к сырью) NaCl, содержащий 0,1 % (к сырью) колагеназы, добавляемый к измельченному мясному сырью в количестве 1 ч. на 5 ч. фарша.

В табл. 11.8 – 11.10 приведены изменения в аминокислотном составе обработанного и необработанного ферментом низкосортного мясного сырья – говядины 2 категории. Из представленных данных видно, что область исследованных концентраций фермента из гепатопанкреаса камчатского краба 0,05 – 0,2 % масс. к взятому сырью обеспечивает на молекулярном уровне биодеградацию животного белка с высвобождением свободных аминокислот в количестве более 2 – 3% от уровня содержания белка.

Таблица 11.8

Аминокислотный состав животного сырья – говядины 2 категории. Обработка ферментом из гепатопанкреаса камчатского краба
(условия обработки фарша: температура 6 °С, время – 72 ч,
1 % рассол хлорида натрия с 0,05 % фермента)

Аминокислота	Исходное сырье, г/100 г образца	Содержание свободных аминокислот, мг/100г образца	
		Исходный образец	Образец, обработанный ферментом
TAU	0,06	13,2	77,4
ASP	1,84	10,4	49,9
THR	0,93	13,7	74,13
SER	0,83	15,3	91,52
GLU	3,01	2,2	11,97
PRO	0,51	5,7	35,16
GLY	0,78	13,1	77,48
ALA	1,26	48,9	255,93
CYS	0,24	2,4	14,23
VAL	1,06	16,8	87,89
MET	0,42	5,3	30,16
ILEY	0,89	12,4	66,43
LEY	1,59	22,1	120,65
TYR	0,78	11,9	68,14
PHE	0,85	15,6	85,38
HIS	0,55	6,6	34,61
LYS	1,13	17,9	95,12
ARG	1,06	12,4	68,79
ИТОГО	17,79 (содержание белка, %)	245,9	1344,89
		1,38 % от белка	7,55 % от белка

Параллельное развитие процессов лизиса животной ткани, которое хорошо просматривалось при проведении микроструктурных исследований, сопровождается и изменением молекулярно-массового распределения растворимых белковых фракций. Уровень содержания хорошо усвояемых низкомолекулярных фракций белка, наличие которых повышает биологическую ценность продукции, во всех случаях возрастало (табл. 11.11).

Таблица 11.9

Аминокислотный состав животного сырья – говядины 2 категории. Обработка ферментом из гепатопанкреаса камчатского краба (условия обработки фарша: температура 6 °С, время – 72 ч, жидкая среда – 1 % рассол хлорида натрия с 0,1 % фермента коллагеназы)

Аминокислота	Исходное сырье, г/100 г образца	Содержание свободных аминокислот, мг/100г образца	
		Исходный образец	Образец, обработанный ферментом
TAU	0,06	13,2	100,87
ASP	1,84	10,4	79,14
THR	0,93	13,7	66,59
SER	0,83	15,3	133,16
GLU	3,01	2,2	27,14
PRO	0,51	5,7	38,89
GLY	0,78	13,1	134,9
ALA	1,26	48,9	289,14
CYS	0,24	2,4	17,23
VAL	1,06	16,8	132,13
MET	0,42	5,3	55,14
ILEY	0,89	12,4	102,13
LEY	1,59	22,1	165,43
TYR	0,78	11,9	90,16
PHE	0,85	15,6	132,14
HIS	0,55	6,6	59,19
LYS	1,13	17,9	145,17
ARG	1,06	12,4	88,74
ИТОГО	17,79 (содержание белка, %)	245,9	1857,29
		1,38 % от белка	10,3 % от белка

Таким образом, дополнительная биохимическая обработка животного сырья ферментным препаратом из гепатопанкреаса камчатского краба позволяет на стадии посола мяса повышать его биологическую ценность и изменять в благоприятную сторону белково-аминокислотный баланс мясного сырья.

Таблица 11.10

Аминокислотный состав животного сырья – говядины 2 категории. Обработка ферментом из гепатопанкреаса камчатского краба (условия обработки фарша: температура 6 °С, время – 72 ч, 1 % рассол хлорида натрия с 0,2 % фермента)

Аминокислота	Исходное сырье, г /100 г образца	Содержание свободных аминокислот, мг/100 г образца	
		Исходный образец	Образец, обработанный ферментом
TAU	0,06	13,2	120,34
ASP	1,84	10,4	93,56
THR	0,93	13,7	120,13
SER	0,83	15,3	140,17
GLU	3,01	2,2	19,16
PRO	0,51	5,7	47,17
GLY	0,78	13,1	115,19
ALA	1,26	48,9	399,37
CYS	0,24	2,4	16,19
VAL	1,06	16,8	172,34
MET	0,42	5,3	48,13
ILEY	0,89	12,4	122,28
LEY	1,59	22,1	210,19
TYR	0,78	11,9	111,29
PHE	0,85	15,6	135,56
HIS	0,55	6,6	66,23
LYS	1,13	17,9	154,71
ARG	1,06	12,4	149,24
ИТОГО	17,79 (содержание белка, %)	245,9	2241,25
		1,38 % от белка	12,5 % от белка

В общем случае процесс биохимической деградации животного сырья в присутствии неорганических солей и фермента, обладающего протеиназной и коллагеназной активностями, может быть представлен в виде двух ассимптотических кривых (рис. 11.7).

1 – нарастающей зависимости концентрации свободных аминокислот, образующихся в результате ферментативного гидролиза животных белков с тенденцией к увеличению до практически недостижимого в условиях обработки предельного значения, равного той концентрации аминокислот, которая образуется при полном распаде всех белков (рис. 11.9).

Необходимо отметить, что очень высокая степень содержания свободных аминокислот в продукте может придавать ему горький привкус [49–52], поэтому целесообразно ограничивать результат биodeградации по аминокислотам на уровне 5...10 % от их содержания в сырье.

2 – ниспадающая ассимптотическая зависимость суммарного содержания высокомолекулярных пептидов (рис. 11.7), процесс распада которых до коротких пептидов и аминокислот проявляется в ходе гидролиза на

всех стадиях и завершается полным исчерпанием крупных белковых фракций вследствие их полной деградации.

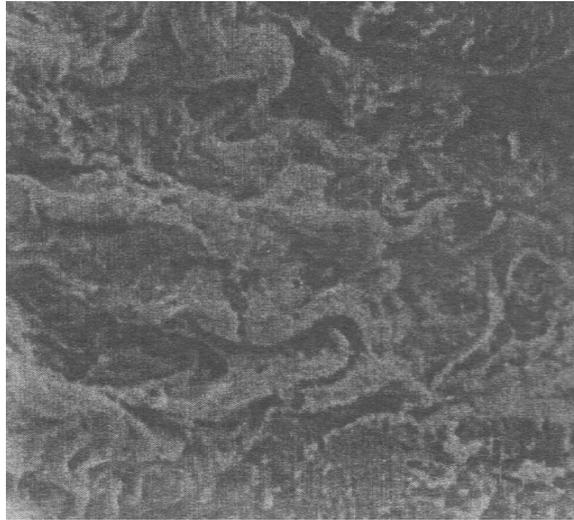


Рис. 11.5. Результаты ферментативного воздействия 0,05 % масс. крабового фермента на животные объекты. Срез ткани говядины в результате обработки объекта ферментом при 6 °С в течение 2 сут в рассоле

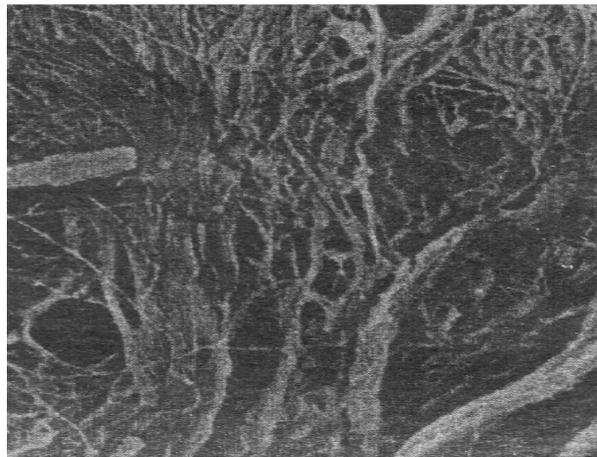


Рис. 11.6. Результаты ферментативного воздействия 0,1 % масс. крабового фермента на животные объекты. Срез ткани говядины в результате обработки объекта ферментом при 6 °С в течение 3 сут в рассоле

Целесообразно отметить также и уровень содержания наиболее интересной с точки зрения скорости усвоения низкомолекулярной пептидной фракции животного белка со средней молекулярной массой 10 ± 5 кДа, содержание которой вначале возрастает, а затем постепенно снижается за счет развития процессов тотальной деградации в условиях высокой протеиназной активности.

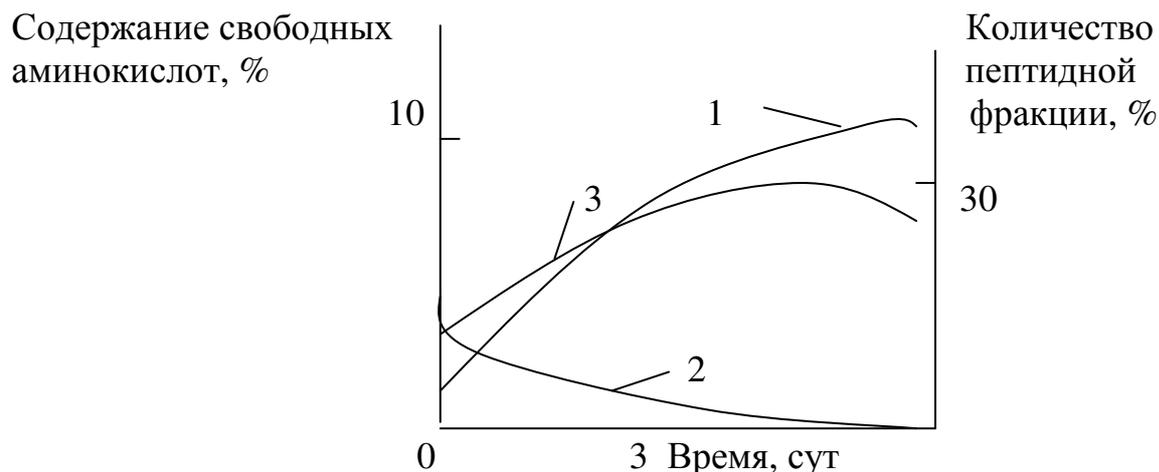


Рис. 11.7. Результаты ферментативного воздействия крабового фермента на животные объекты (говядина). 1 – содержание свободных аминокислот, 2 – высокомолекулярные пептидные фракции, 3 – низкомолекулярные фракция 10 кД. Обработка ферментом в 1 %-ном рассоле

Таким образом, появление доступного ферментного комплекса из гепатопанкреаса камчатского краба открывает новые возможности по улучшению качества сырья в мясной промышленности. Эти возможности распространяются как на подготовку низкосортного мясного сырья, так и на возможность получения глубоко ферментированных продуктов для специального и диетического питания.

Характер воздействия коллагеназы камчатского краба на низкосортное мясное сырье (спилок, жилка, шкура, говядина II категории) показывает, что данный фермент, обладая протеолитической и коллагеназной активностью, приводит к распаду белковых составляющих мясного сырья с изменением фракционного состава белка и высвобождением свободных аминокислот.

Ферментативная обработка некоторых видов коллагенового сырья (спилок, жилка) не приводит к получению продуктов с удовлетворительными влаго- и жиросвязывающими характеристиками, что не позволяет использовать данный фермент для эффективного получения пищевых веществ из этих видов сырья.

Таблица 11.11

Молекулярно-массовое распределение основных белковых фракций говядины II категории, обработанной коллагеназой камчатского краба (условия обработки фарша: температура 6 °С, время – 72 ч, 1 % рассол хлорида натрия с 0,1 % фермента)

Мол. масса	Содержание белковой фракции, %
------------	--------------------------------

фракции, кД	Говядина, не обработанная ферментом	Говядина, обработанная коллагеназой из гепатопанкреаса камчатского краба
> 400 – 600	0,9	–
230 – 400	1,6	1,5
170 – 230	8,1	5,1
100 – 170	10	36,8
40 – 100	25,9	11,2
20 – 40	29	18,1
10 – 20	24,5	26,3
< 10	–	1,0

Процесс биодegradации может осуществляться как в присутствии только фермента в водной среде, так и в процессе посола мясного сырья с использованием хлорида натрия.

Воздействие коллагеназ на объекты морского происхождения, содержащие коллаген. Производство пресервов, соленой продукции, а также соленых полуфабрикатов для копчения из морепродуктов основано преимущественно на ферментативных превращениях, приводящих к появлению специфических свойств у продукта [53]. В последние годы возникла необходимость производства соленой продукции из новых видов сырья, не обладающего выраженной способностью к биохимическому созреванию, основанному на сложных биохимических процессах с использованием протеолитических ферментов [54–56]. Такие процессы связаны с реализацией возможностей биодegradации коллагена и других белков в объектах морского происхождения, в результате чего пищевая продукция приобретает специфический “мягкий” вкус. Ряд морепродуктов может использоваться на пищевые цели только после биообработки в присутствии протеолитических ферментов в солевых растворах.

Сырье рыбного происхождения, традиционно используемое для производства соленой продукции, как правило, обладает достаточно высокой протеолитической активностью, что и позволяет добиться созревания, не прибегая к дополнительной стимуляции этого процесса извне. Однако, ткани ряда гидробионтов, которые могли бы составить сырьевую базу для производства слабосоленой деликатесной пищевой продукции, имеют низкий уровень активности протеиназ. Этот факт приводит к необходимости разработки технологий, позволяющих интенсифицировать частичный протеолиз, стимулирующий процесс созревания, за счет внесения ферментных препаратов [56].

Для стимуляции созревания в литературе описаны попытки использования протеиназ грибного [57–59], бактериального [60, 61], животного [62, 63] и растительного происхождения [64]. Исследователи с различной степенью успеха добивались активации протеолиза сырья.

Определенной стимулирующей способностью обладает ферментный препарат, полученный из отходов переработки – гепатопанкреаса камчатского краба, в частности, как это описано в работе [55, 65]. Авторы получили препарат, который содержит более 90 % белка и проявляет активность в нейтральной среде по отношению к различным белковым субстратам: казеинату натрия (700 Е/мг); гемоглобину (100 Е/мг) и коллагену (120 Е/мг по Мандлу). Изучали влияние соотношения сырья и ферментного препарата; соотношение сырья и тузлука; температуры и продолжительности посола на качество получаемой пищевой продукции. Ранее данный препарат коллагеназ был использован в процессе получения ферментативных белковых гидролизатов из различных тканей гидробионтов для микробиологических сред с глубокой степенью расщепления белков [66, 67]. Исследования авторов показали, что при высокой концентрации ферментного препарата и оптимальных условиях гидролиза (температура, рН, гидромодуль) можно добиться практически полного перевода белков субстрата в растворимую форму. Данный факт свидетельствует о высоком субстратном сродстве протеиназ краба к тканям гидробионтов.

При производстве слабосоленой деликатесной продукции основной задачей является получение нежной консистенции и хорошего вкуса конечного продукта, что достигается не полным, а частичным гидролизом, протекающим равномерно во всем объеме сырья. Ограничение интенсивности протеолиза обеспечивается путем подбора концентрации вносимого фермента и изменением условий гидролиза.

В качестве экспериментального сырья использовали мышцы рыб: пинагора *Cyclopterus lumpus*, морского петуха (серой триглы) *Trigla gurnardus* и окуня-клювача *Sebastes mintella*, и мышечные ткани моллюсков: трубака *Neptunea despecta* и серрипеса *Serripes groenlandicus* [65].

Принято считать, что выбранные для исследований ткани не способны приобретать вкус созревшей продукции в процессе посола. В то же время запасы данных видов гидробионтов довольно велики, и технология получения новых видов продукции позволяет использовать их более рационально. Результаты проведенных исследований показали, что изучаемые параметры процесса для всех видов сырья претерпевают закономерные изменения, которые обусловлены, прежде всего, концентрацией вносимого фермента и продолжительностью посола.

Эксперименты по стимулированию созревания мяса пинагора показали, что за трое суток тузлучного посола тушки пинагора со средней массой 100 г приобретали более мягкую консистенцию. Однако при концентрации ферментного препарата 0,5 % на поверхности просаливаемых кусочков образовывалась слизь, что свидетельствует о неравномерности протеолиза. Процесс слишком интенсивно протекал на поверхности. О высокой потенции тканей к дальнейшей белковой деградации свидетельствует их высокая протеолитическая активность, которая линей-

но возрастала в зависимости от концентрации вносимого фермента. Выдерживание сырья в солевом рассоле в течение 8 сут приводило к практически полному перевариванию белков – содержание аминного азота $N_{ам}$ достигало 0,4...0,45 %, что характерно для сырья с признаками перезревания [53]. Авторы рекомендовали осуществлять ферментативную обработку сырья в следующих условиях: предварительная выдержка пинагора 3 сут в холодильнике в 7 % тузлуке, соотношение рыба : тузлук 1:3, для стимуляции равномерного протеолиза мышечной ткани пинагора, концентрация фермента должна быть не более 0,1 % при уменьшении объем кусочков для просаливания.

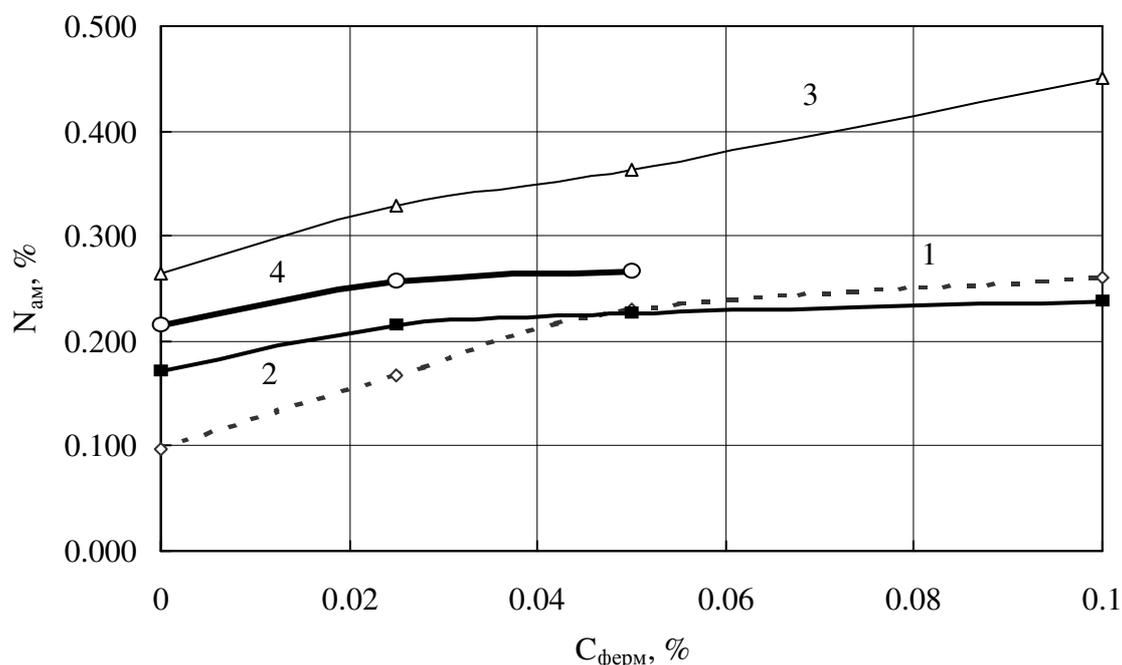


Рис. 11.8. Содержание аминного азота в мышцах окуня-клювача в зависимости от концентрации вносимого фермента. Предварительная подготовка: 1 – 3-е сут в холодильнике в 7 % тузлуке. Соотношение рыба: тузлук 1:3; 2 – 18 ч при комнатной температуре и 2-е сут в холодильнике в 7 % тузлуке. Соотношение рыба: тузлук 1:3; 3 – 18 ч при комнатной температуре и 2-е сут в холодильнике в 7 % тузлуке. Соотношение рыба: тузлук 1:3. Затем 10 сут в холодильнике (без тузлука); 4 – смешанный посол: без фермента (1 сут при комнатной температуре). Затем 3 сут в 7 % тузлуке в холодильнике. Соотношение рыба : тузлук 2:1 [55]

Изучение активности протеиназ из коллагеназы камчатского краба по отношению к мышечной ткани окуня-клювача показало, что условия обработки данного вида сырья являются аналогичными указанным выше, однако, определено, что 0,1 %-ная концентрация фермента в тузлуке при всех режимах посола приводит к проявлению слишком высокой протеолитической активности и быстрому накоплению аминного азота (рис. 25.8) и

низкомолекулярных белков, что позволило рекомендовать более низкие концентрации фермента 0,025 – 0,05 % [55].

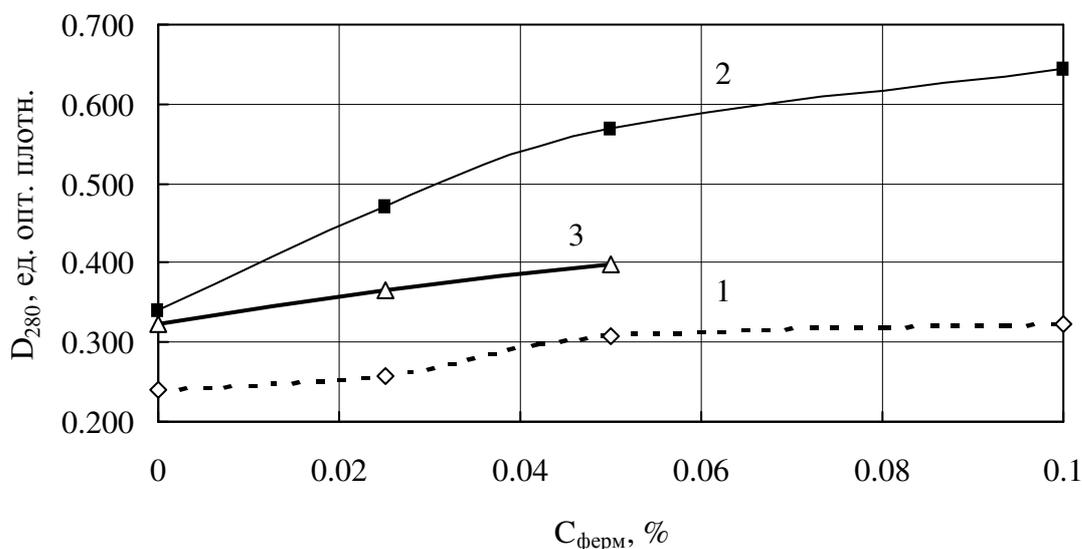


Рис. 11.9. Содержание ТХУ-неосаждаемых белковых продуктов (ММ менее 2 кД) в мышцах морского петуха в зависимости от концентрации внешнего фермента. Предварительная подготовка: 1 – 18 ч при комнатной температуре и 2-е сут в холодильнике в 7 % тузлуке. Соотношение рыба: тузлук 1:3; 2 – 18 ч при комнатной температуре и 2-е суток в холодильнике в 7 % тузлуке. Соотношение рыба: тузлук 1:3. Затем 10 суток в холодильнике (без тузлука); 3 – Смешанный посол: без фермента (1 сут при комнатной температуре), затем 3 сут в 7 % тузлуке в холодильнике. Соотношение рыба: тузлук 2:1 [55]

Были изучены биохимические характеристики созревания мышечной ткани морского петуха, которая практически не способна созревать в процессе выдержки в 1...7 %-ных растворах хлорида натрия. Как и для тканей окуня оптимальным оказался режим смешанного посола с предварительной выдержкой в солевом растворе и окончательной выдержкой 1...3 сут с ферментным препаратом в концентрации 0,025...0,05 %. На рис. 11.9 показана зависимость содержания низкомолекулярных фракций от времени и условий ферментативной обработки рыбного сырья, которые оценивали по модифицированному методу Ансона основанному на осаждении нерасщепленных белков и полипептидов с молекулярной массой более 2 кДа 10 %-ной ТХУ. Субстратом служил 1,5 %-ный раствор казеината натрия, рН 7,0. Единица протеолитической активности – изменение оптической плотности при 280 нм (D_{280}) на 1 ед. на 1 г ткани за 1 мин инкубации при 50 °С [55]. Анализ химического состава показал, что средняя степень гидролиза белков в пресервах с хорошими вкусовыми качествами из окуня-клювача и морского петуха составляет чуть более 13 %.

Исследования условий ферментативной обработки рыбного сырья – трубача коллагеназой камчатского краба показали, что, несмотря на очень

жесткую исходную консистенцию, ножка трубача под воздействием ферментов в концентрации 0,2...0,4 % в тузлуке, за 10 сут преобразовалась практически в гель, о чем свидетельствует чрезвычайно высокое содержание азота свободных аминогрупп. Такая ферментативная обработка приводила к существенной деградации коллагена и других жестких каркасных белков.

Проведенные процитированными выше авторами исследования показали, что оптимальным режимом посола для рыб является смешанный посол: при комнатной температуре в течение 1 сут, затем тузлучный посол в течение 3-х сут при 4 °С, с ферментом в концентрации 0,025...0,05 % и соотношении тузлук : сырье равном 1 : 2. В таком процессе реализуется как чисто протеолитическая активность крабовой коллагеназы, так и ее собственно коллагеназная активность.

Таким образом, биохимические исследования показывают возможность использования препарата протеиназ, полученного из гепатопанкреаса камчатского краба, для изготовления пресервов из плохо созревающих тканей гидробионтов. Частичный протеолиз белков гидробионтов, включая коллаген, может быть доведен до разных стадий и регулируется путем изменения условий протекания процесса, прежде всего его продолжительности, а также изменением концентрации применяемого ферментного препарата.

Получение и свойства кормовых белковых гидролизатов из отходов промысла исландского гребешка. Гидролиз белоксодержащего сырья (некондиционный мускул и отходы переработки исландского гребешка *Chlamys islandicus* – мантия, гонады, жабры) проводили в термостатируемых емкостях при температурах от 45 до 55 °С. Продолжительность гидролиза составляла от 1 до 7 ч. Количество вносимого протеолитического фермента изменяли от 1 до 20 г на 1 кг сырья. Гидролиз останавливали кипячением реакционной смеси в течение 10...20 мин. Высушивание растворов кормовых гидролизатов проводили в вакууме при температуре 50...60 °С [55].

В процессе изучения гидролиза белков, содержащихся в отходах промысла исландского гребешка, была исследована динамика изменения основных показателей интенсивности белкового расщепления: степени гидролиза, содержания аминного азота, количества неосаждаемых трихлоруксусной кислотой (ТХУ) белковых соединений (рис. 11.10, 11.11). Все исследуемые характеристики имели схожую тенденцию изменения с увеличением времени гидролиза.

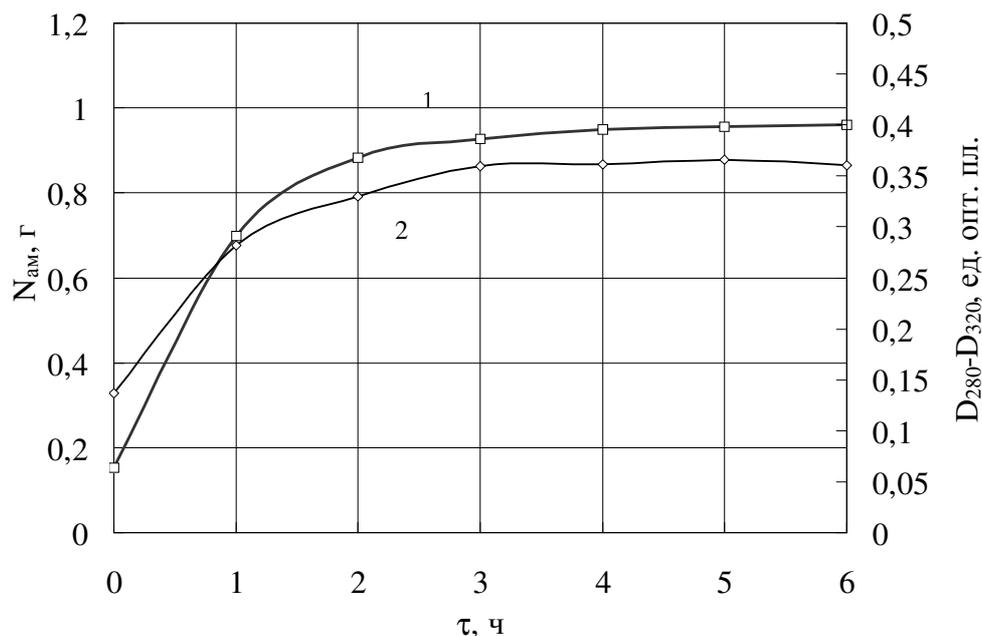


Рис. 11.10. Изменения содержания $N_{ам}$ и ТХУ-неосаждаемых белковых веществ в растворе в процессе гидролиза белковых отходов исландского гребешка. Условия гидролиза: рН 6,5; температура 50°C ; гидромодуль 1:10; 20 г фермента из гепатопанкреаса краба/кг сырья: 1 – оптическая плотность раствора в ТХУ, 2 – масса $N_{ам}$. [55]

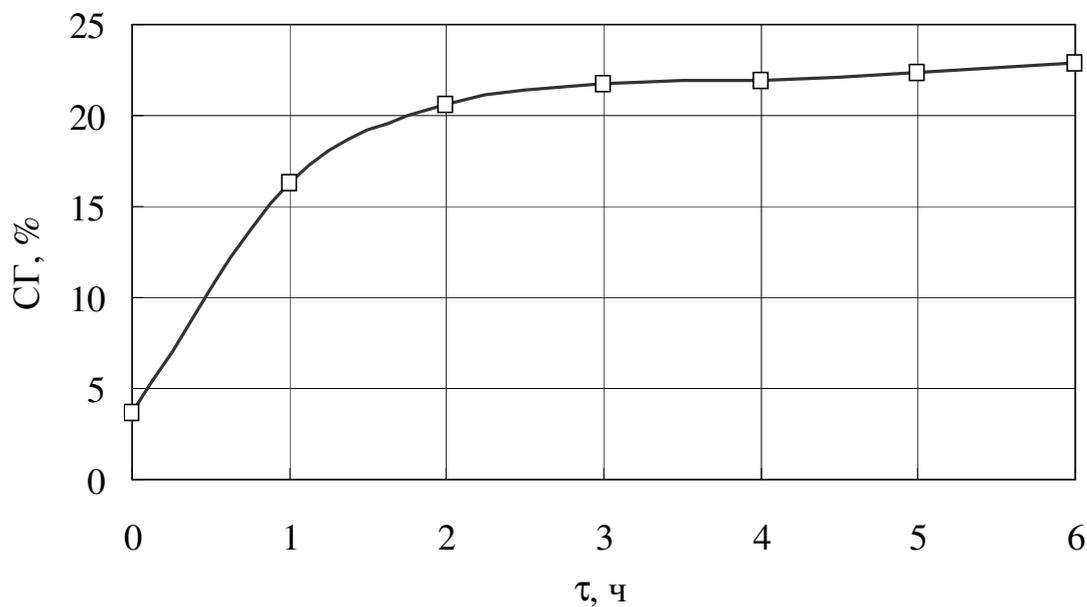


Рис. 11.11. Изменение степени гидролиза белков в растворе в процессе гидролиза отходов промышленного морского гребешка. Условия гидролиза: рН 6,5; температура 50°C ; гидромодуль 1:0; 20 г фермента из гепатопанкреаса камчатского краба / кг сырья [55]

По общему химическому составу и энергетической ценности кормовой гидролизат и исходное сырье близки, в то время как качественный со-

став белковой компоненты (степень гидролиза белков) обнаруживает существенные отличия (табл. 11.12).

Таблица 11.12

Некоторые характеристики кормового гидролизата и исходного сырья

Образец	Массовая доля, % (пересчет на сухой остаток).						Степень гидролиза белков, %
	Зола	Липиды	Вещества белковой природы	N _{общ}	N _{ам}	Свободные аминокислоты	
Высушенные отходы исландского гребешка	12,2	3,30	84,5	11,26	0,415	0,83	3,69
Кормовой гидролизат из отходов исландского гребешка	14,5	5,19	80,3	11,05	1,927	9,76	16,76

Анализ аминокислотного состава показал, что в кормовом гидролизате и исходном сырье преобладают одни и те же аминокислоты: аргинин, лизин, глицин, лейцин и изолейцин, таурин (табл. 11.12). В кормовом гидролизате отмечено достаточно высокое содержание глицина и глутаминовой кислоты. Эти аминокислоты являются важнейшими стимуляторами роста сельскохозяйственной птицы. Общее содержание свободных аминокислот отличается более чем на порядок – 9,76 и 0,83 % для кормового гидролизата и исходного сырья, соответственно.

Описанные в данном разделе результаты, полученные авторами [54 – 56], показывают принципиальную возможность использования трудногидролизуемого сырья с высоким содержанием коллагена морского происхождения для получения ценных деградированных продуктов – кормовых гидролизатов. Следует отметить, что описанные здесь результаты согласуются с общей биохимической картиной гидролиза сложных белковых матриц, содержащих в своем составе значительное количество коллагена, в данном случае морского происхождения.

Химико-ферментативная деградация смеси мышечной и костной тканей животного происхождения. Ранее уже указывалось, что кожа, кости и сухожилия в основном содержат коллаген типа I. Смеси мышечной и костной тканей животного происхождения представляют собой белковые отходы мясопереработки и могут рассматриваться как сложная, поликомпонентная белковая масса, содержащая в своем составе от 15 до 45 % белка, большая часть которого представлена коллагенами, по крайней мере I – IV типами [78].

Таблица 11.13

Состав свободных аминокислот в сырье и гидролизате, % масс.

Аминокислота	Высушенные ОПГ	Кормовой гидролизат ОПГ
Цистин	0,00	0,00
Гистидин	0,00	0,00
Метионин	0,00	0,33
Таурин	0,00	0,40
Пролин + оксипролин	0,00	0,33
Треонин	0,00	0,15
Серин	0,13	0,22
Глицин	0,42	0,74
Валин	0,02	0,28
Тирозин	0,00	0,47
Аланин	0,07	0,45
Глутаминовая кислота	0,00	0,15
Фенилаланин	0,00	0,63
Лизин	0,10	1,85
Аспарагиновая кислота	0,00	1,15
Аргинин	0,04	1,54
Лейцин + изолейцин	0,04	1,08
Всего:	0,826	9,761

Для описания кинетических закономерностей протекания ферментативного гидролиза сложной смеси мышечной и костной тканей животного происхождения в присутствии полиферментного комплекса поджелудочной железы свиней была использована кинетическая модель, предусматривающая наличие «быстрой» и «медленной» стадий процесса [49, 68–72]. Согласно этой модели, гидролиз белка рассматривают как сумму субстратов, скорость распада каждого из которых определяется его концентрацией и кинетическими характеристиками. В этом случае кинетические константы можно определить по уравнениям, которые можно получить путем преобразования уравнения (11.1). В этом случае в момент времени t (или τ) скорость гидролиза V , пептидных связей, обладающих близкой реакционной способностью, можно определить по уравнениям (11.1 – 11.3):

$$V_t = V_{max}e^{-Kt} , \quad (11.1)$$

где V_{max} – максимальная скорость гидролиза, $\text{г л}^{-1}\text{с}^{-1}$; K_i – константа эффективности протекания процесса гидролиза пептидных связей i -того типа, с^{-1} , причем V_t условно считается равной величине P/t .

Подобное допущение можно считать справедливым для гидролиза смеси белков смесью ферментов. В случае, когда $t \rightarrow 0$, очевидно $(P/t) \rightarrow V_o$, но так, как V_o в условиях многокомпонентности белков и ферментов в случае описываемой модели определить практически весьма сложно, а при гидро-

лизе белков реакция идет по псевдонулевому порядку, то с известной долей вероятности в данном случае можно считать, что $V_0 \approx V_{\max}^{\text{эф}}$. Тогда прологарифмировав зависимость (11.1), получим:

$$\ln V_{\tau} = \ln (P/t) = \ln V_{\max} - kt. \quad (11.2)$$

На основании уравнений (11.1) и (11.2) можно определить эффективную константу Михаэлиса K_M по методу Холдейна:

$$K_M = V_{\max}/K_i \quad . \quad (11.3)$$

На рис. 11.12 представлена экспериментальная зависимость накопления продуктов гидролиза белков в суспензии мясокостного фарша от времени, выраженная в количестве свободных концевых групп, освобождающихся в единицу времени. В результате линеаризации кинетических кривых гидролиза в координатах $P/t = f(t)$, условно считая, что гидролиз белков протекает в две стадии: «быструю», когда в белке расщепляются легко гидролизующиеся пептидные связи и «медленную», когда происходит гидролиз образовавшихся олигопептидов до пептидов меньшего размера и свободных аминокислот, можно определить эффективные максимальные скорости гидролиза V_{\max} и другие псевдокинетические константы (см. табл. 11.11). Анализируя полученные данные (табл. 11.14), можно заметить, что значения энергий активаций на «быстрой» и «медленной» стадиях весьма близки между собой.

В табл. 11.14 приведены кинетические константы, полученные при анализе «быстрой» стадии процесса при температуре, наиболее оптимальной для практического проведения процесса гидролиза. Подобным образом можно вычислить кинетические константы для любой температуры до тех пор, пока процесс подчиняется уравнению Аррениуса.

На рис. 11.12, 11.13(а–е) представлены характерные зависимости накопления некоторых аминокислот в ходе ферментативного гидролиза мясокостного фарша при различных температурах. Подобный вид зависимостей был типичным и для других исследованных аминокислот. Аналогично приемам, используемым для определения общих констант расщепления белка, кинетические кривые выхода свободных аминокислот также удалось условно аппроксимировать двумя прямолинейными участками, характеризующими «быструю» и «медленную» стадии процесса.

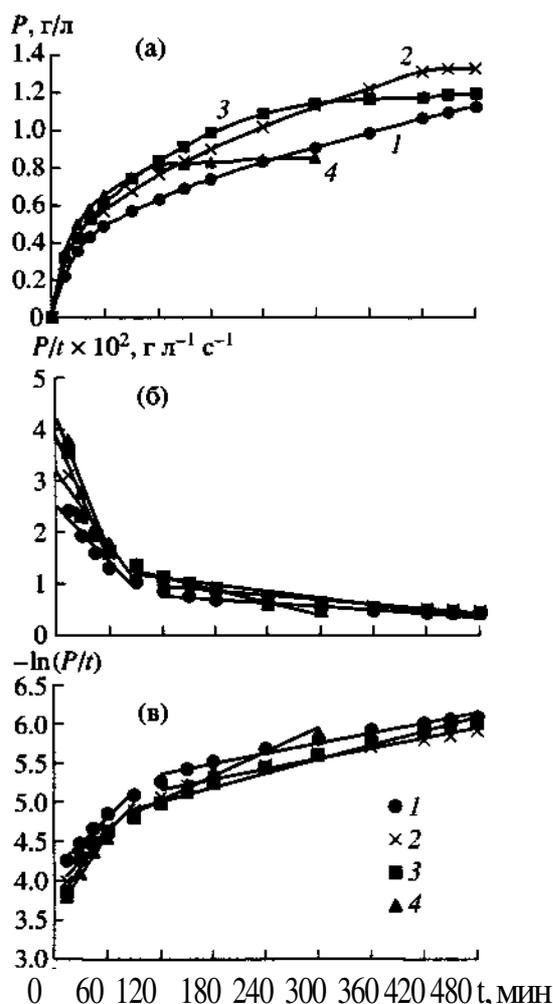


Рис. 11.12. Зависимость скорости накопления продуктов гидролиза суспензии смеси белков мышечной и костной тканей в присутствии ферментного комплекса поджелудочной железы свиней при различных температурах: 1 – 40; 2 – 45; 3 – 50; 4 – 55°C (а); графическое определение максимальных кажущихся скоростей (б) и констант интенсивности (в) процесса ферментативного гидролиза

В качестве примера в табл. 11.15 приведены кинетические константы, полученные при анализе «быстрой» стадии процесса при температуре, наиболее оптимальной для практического проведения процесса гидролиза. Подобным образом можно вычислить кинетические константы для любой температуры до тех пор, пока процесс подчиняется уравнению Аррениуса.

Из полученных данных установлено, что наиболее интенсивно происходило накопление свободных аргинина, лизина, лейцина и тирозина, о чем свидетельствовали достаточно высокие значения V_{\max} для этих аминокислот как на «быстрой», так и на «медленной» стадиях процесса.

Несколько менее интенсивно происходило высвобождение фенилаланина, гистидина и валина. Для гистидина, аргинина и тирозина выход

после 7 ч гидролиза при температуре 45 °С составил 48...72 %, а для валина, лизина, лейцина и фенилаланина 24...38 %. Аланин, серин и аспарагиновая кислоты образовывались в процессе гидролиза преимущественно на «быстрой» стадии. Выход аспарагиновой кислоты и глицина не превышал 2 %.

Таблица 11.14

Макрокинетические характеристики процесса гидролиза белков суспензии мясокостного фарша ферментами поджелудочной железы свиней

Макрокинетические характеристики процесса	Температура, °С			
	40	45	50	55
«Быстрая» стадия				
$V_{\max} \cdot 10^4, \text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	2,53 ± 0,17	3,20 ± 0,28	3,87 ± 0,38	4,25 ± 0,20
$K_i \cdot 10^4, \text{с}^{-1}$	1,87 ± 0,03	2,02 ± 0,07	2,75 ± 0,17	2,75 ± 0,03
$K_m, \text{г} \cdot \text{л}^{-1}$	1,36 ± 0,11	1,59 ± 0,10	± 0,12	1,54 ± 0,11
$E_a, \text{кДж/моль}$	29,83 ± 0,81			
«Медленная» стадия				
$V_{\max} \cdot 10^4, \text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	0,93 ± 0,08	1,1 ± 0,08	1,38 ± 0,10	1,63 ± 0,13
$K_i \cdot 10^4, \text{с}^{-1}$	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,85 ± 0,03
$K_m, \text{г} \cdot \text{л}^{-1}$	2,67 ± 0,18	3,09 ± 0,20	2,77 ± 0,20	1,92 ± 0,13
$E_a, \text{кДж/моль}$	32,20 ± 0,04			

Анализируя все вышесказанное, можно предположить, что ферменты поджелудочной железы гидролизовали в первую очередь актомиозин, миозин, миоглобин и затем уже коллаген и родственные ему белки, о чем свидетельствует низкое содержание в гидролизатах глицина, аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, серина, а также пролина, т.е. тех аминокислот, которые преимущественно содержатся в коллагене.

Энергия активации для валина, треонина, тирозина, аргинина, гистидина и фенилаланина также оказалась весьма велика (см. табл. 11.15), что может свидетельствовать о наличии в ферментном комплексе поджелудочной железы протеаз, которые расщепляют большее количество пептидных связей, образованных указанными аминокислотами, и требуют для этого больших энергетических затрат.

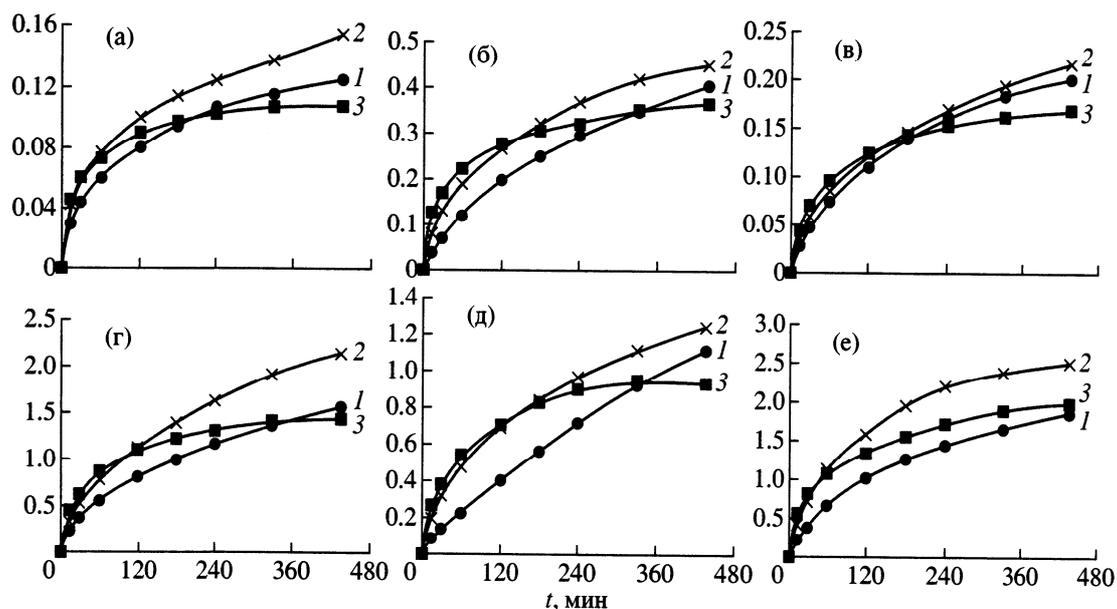


Рис. 11.13. Зависимость накопления аминокислот (с, г/100 г белка): аспарагиновая (а), треонин (б), глицин (в), лизин (г), валин (д), аргинин (е) в процессе ферментативного гидролиза при различных температурах. 1 – 40, 2 – 45, 3 – 50⁰

Таблица 11.15

Макрокинетические константы, энергия активации и выход аминокислот в процессе ферментативного гидролиза при 45 °С на «быстрой» стадии

Аминокислота	$V_{\max} \times 10^4$, г/100 г белка, с ⁻¹	$K_i \cdot 10^4$, с ⁻¹	K_m , г/100г белка	E_a , кДж/моль	Выход, %
Незаменимые аминокислоты:					
ИЛЕ	1,39 ± 0,02	1,62 ± 0,02	0,86 ± 0,07	63,43 ± 0,33	21,9
ЛЕЙ	4,63 ± 0,15	1,40 ± 0,05	3,31 ± 0,27	61,25 ± 0,23	35,7
ЛИЗ	4,05 ± 0,11	1,88 ± 0,02	2,15 ± 0,18	54,58 ± 0,01	34,9
МЕТ	1,06 ± 0,12	3,00 ± 0,33	0,35 ± 0,03	62,21 ± 3,51	—
ФЕН	2,74 ± 0,01	0,98 ± 0,02	2,79 ± 0,21	69,68 ± 0,50	37,9
ТИР+ФЕН	3,61 ± 0,17	1,22 ± 0,07	2,97 ± 0,22	83,78 ± 7,73	77,4
ТРЕ	0,95 ± 0,02	1,83 ± 0,02	0,52 ± 0,04	106,12 ± 1,46	25,0
ВАЛ	2,30 ± 0,02	1,67 ± 0,02	1,38 ± 0,11	106,72 ± 6,25	24,2
Заменимые аминокислоты:					
АЛА	1,76 ± 0,09	2,60 ± 0,03	0,68 ± 0,05	52,88 ± 0,04	6,6
АРГ	5,01 ± 0,06	1,37 ± 0,02	3,66 ± 0,29	81,19 ± 2,31	62,0
АСП	0,49 ± 0,02	2,67 ± 0,03	0,19 ± 0,01	38,84 ± 2,47	1,8
ГИС	2,82 ± 0,09	1,28 ± 0,05	2,20 ± 0,18	78,55 ± 2,35	47,9
ГЛИ	0,41 ± 0,02	1,60 ± 0,02	0,26 ± 0,02	38,69 ± 0,02	1,4
ГЛУ	1,50 ± 0,01	1,75 ± 0,02	0,86 ± 0,06	67,60 ± 3,47	5,8
СЕР	1,21 ± 0,03	2,38 ± 0,02	0,51 ± 0,04	50,06 ± 0,06	14,6

Таблица 11.16

Физико-химические показатели опытно-промышленных серий
ферментативных гидролизатов

Наименование показателя	Серия № Кс-1	Серия № Кс-2	Серия № КсМ-1	Серия № КсМ-2	Серия № КсМКр-1	Серия № КсМКр-2	Пептон по ГОСТ 13805-76
Внешний вид и цвет	Порошок однородный, светло-желтого цвета, гигроскопичный		Порошок однородный, светло-желтого цвета, гигроскопичный		Порошок однородный, светло-желтого цвета, гигроскопичный		Порошок аморфный однородный
Запах	Характерный без гнилостного						характерный
Массовая доля влаги, %	7,0	6,8	6,7	6,9	7,5	7,2	Не более 7
Массовая доля белка, %	77,4	77,6	82,4	82,1	81,3	82,0	Не нормируется
Массовая доля жира, %	11,6	11,5	7,6	7,8	8,5	8,3	Не нормируется
Массовая доля золы, %	4,0	4,1	3,3	3,2	2,7	2,5	Не более 5
Водородный показатель, рН 1 % раствора	5,72	5,75	5,68	5,71	5,83	5,81	6,5...7,0
Массовая доля азота аминокрупп, %	2,9	2,9	4,3	4,3	5,5	5,4	Не менее 3
Массовая доля общего азота, %	12,4	12,4	13,2	13,1	13,0	13,1	14...15
Степень конверсии белка, %	23,4	23,4	32,6	32,8	42,3	41,2	Не нормируется

Таблица 11.17

Содержание свободных аминокислот (св.) и полный аминокислотный состав (полн.) опытно-промышленных образцов гидролизатов, г/100 г белка*¹

Аминокислота	Серия Кс-2		Серия КсМ-1		Серия КсМКр-2	
	полн.	св.	полн.	св.	Полн.	св.
Незаменимые, в т.ч.	8,46	7,62	21,4	9,33	36,38	13,82
ИЛЕ	0,6	0,4	1,9	0,8	1,5	0,5
ЛЕЙ	1,4	1,4	4,3	2,1	8,3	2,8
ЛИЗ	2,1	2,1	4,3	2,1	7,7	2,4
МЕТ	0,2	0,2	0,4	0,3	1,7	1,7
ЦИС**	0,06	0,02	0,2	0,03	0,10	0,07
ФЕН	1,0	1,0	2,6	0,8	4,9	1,7
ТИР*	0,4	0,4	13	0,5	2,7	0,9
ТРЕ	1,0	0,6	2,8	0,9	3,2	1,0
ТРП	0	0	0	0	0,28	0,05
ВАЛ	1,7	1,5	3,6	1,8	6,0	2,7
Заменимые, в т.ч.	84,8	10,2	70,2	15,5	55,3	18,6
АЛА	9,6	1,1	7,8	1,6	6,8	2,3
АРГ	2,0	1,8	6,4	2,5	4,0	1,3
АСП	4,4	0,5	6,5	2,1	9,6	3,4
ГИС	1,0	1,0	2,5	1,3	4,9	1,8
ГЛИ	42,3	1,4	23,8	2,4	8,4	3,1
ГЛУ	11,8	3,3	10,5	3,5	14,6	4,5
ПРО	12,2	0,5	9,5	0,5	3,3	0,8
СЕР	1,5	0,6	3,2	1,6	3,7	1,4
Итого	93,2	17,9	91,6	24,8	91,7	32,5
Е/Н	0,10	0,75	0,30	0,60	0,66	0,74

** – Цистин, являясь полунезаменимой аминокислотой, обычно учитывается в сумме с метионином.

* – Тирозин, являясь полунезаменимой аминокислотой, обычно учитывается в сумме с фенилаланином.

При сравнении энергий активации освобождения аминокислот в ходе «быстрой» стадии процесса с интегральной энергией активации всего процесса в целом (табл. 11.14 и 11.15) можно видеть, что энергия активации для свободных аминокислот в 2...3 раза выше, чем энергия активации для всего процесса в целом.

Это вполне объяснимо, так как в полученных гидролизатах содержалось 15...20 % свободных аминокислот, тогда как остальная часть приходилась на олигопептиды различной молекулярной массы, для получения кото-

рых, вероятно, должно тратиться меньшее количество энергии, чем для получения свободных аминокислот.



Рис. 11.14. Технологическая схема производства ферментативных гидролизатов [77]

На основании описанных выше закономерностей установлено, что эффективное время гидролиза составляло 2,5...3 ч при температуре проведения процесса 40...45 °С.

Физико-химические характеристики и аминокислотный состав различных гидролизатов приведены в табл. 11.16 и 11.17.

При вышеназванных показателях: глубина гидролиза мясокостного фарша составляла 35...40 %; содержание свободных аминокислот в высушенном гидролизате было не менее 25...30 %; содержание общего азота не менее 14 %; азота аминокислот и низших пептидов 4...6 %; жира не более 3 %; золы не более 2...3 %; влаги не более 7 %.

Как показали биологические испытания на ряде микроорганизмов, полученный гидролизат аналогичен лучшим образцам пептона, выпускаемого в нашей стране и за рубежом [77, 78].

На основании проведенных исследований была разработана технологическая схема получения ферментативных гидролизатов из мясокостного фарша, приведенная на рис. 11.14.

Мясокостное сырье (МКС) измельчали на силовом измельчителе И-1 и обезжиривали в виброэкстракторе Э-1, промывая циркулирующей водой при 100 °С. Полученную суспензию направляли на проточную центрифугу Ц-1, где происходило разделение смеси на жидкую и твердую фракции. Жидкую фракцию с помощью центробежных насосных установок последовательно обезжиривали в шнековой центрифуге Ц-2 и сепараторе С-1. Обезжиренное МКС направляли в горизонтальный вакуумный котел К-1, где смешивали с жидкой фракцией. Смесь нагревали при 130 °С в течение 2 ч. Суспензию обезжиренного МКС охлаждали до 45 °С, вно-

сили ферментный препарат из реактора Р-1 и проводили гидролиз в котле К-1 в течение 4 ч при 45 °С и перемешивании. По окончании гидролиза реакцию смесь инактивировали нагреванием до 120 °С, центрифугировали на проточно-разделительной центрифуге Ц-3 и шнековой центрифуге Ц-4 и отфильтровывали реакцию массу на рамном фильтр-прессе Ф-1 через пористый картон. Фильтрат направляли на сепаратор С-2 для удаления остатков жира, а после этого высушивали на распылительной сушильной установке РС-1 при следующих параметрах: температура на входе 140 °С, на выходе 90 °С.

По предлагаемой схеме были получены опытно-промышленные партии гидролизатов из следующего сырья:

Серии Кс-1 и Кс-2, включающие кость 1-й и 2-й категории.

Серии КсМ-1 и КсМ-2, включающие кость и субпродукты.

Серии КсМКр-1 и КсМКр-2, включающие мясокостное сырье и боенскую кровь [77, 78].

Основные свойства полученных гидролизатов приведены в табл. 11.16 и 11.17. Наиболее эффективные образцы, существенно превосходящие образцы пептона, были получены из последних двух серий, так как белки крови существенно обогащали аминокислотный состав гидролизатов, в частности такой незаменимой аминокислотой как триптофан [71].

Переработка вторичного животного белка представляет собой важную проблему, связанную с потенциальной возможностью его трансформации в аминокислоты, используемые в качестве питательных добавок. Процесс трансформации белкового сырья может быть выполнен химико-ферментативным путем в присутствии ферментов [49] или методом кислотного гидролиза. Такой гидролиз протекает в достаточно жестких условиях и, несмотря на возможность деградации некоторых аминокислот при низких значениях рН, является практически единственным способом полного расщепления жестких белков с коллагеновой структурой. Процесс деградации животных белков в условиях активного воздействия минеральных кислот и высвобождения индивидуальных аминокислот может быть оценен кинетически.

В качестве объектов исследования применяли белковое сырье, являющееся отходами переработки мяса: смесь 30...50 % дробленой животной кости с остатками мяса, предварительно подвергнутой ферментализу в присутствии протеаз поджелудочной железы, следующего состава: белок – 15,4 %; жир – 13 %; зола – 26,4 %; влажность – 45,0 % . Для обогащения получаемого гидролизата серосодержащими аминокислотами в обрабатываемую смесь вносили измельченные копыта крупного рогатого скота с содержанием белка 91,5 %. До химической обработки проводили обезжиривание сырья [9]. В качестве гидролизующего агента применяли растворы серной кислоты с концентрацией от 10 до 60 %.

Для проведения кислотного гидролиза использовали поликомпонентный субстрат в виде сухого белкового остатка после ферментативного гидролиза мясокостной смеси. Субстрат содержал белки с различной молекулярной массой и химической структурой, преимущественно коллаген, миозин и актомиозин. Важнейшей характеристикой такой сложной смеси белков является суммарный аминокислотный состав, который для мясокостного сырья составил, г/100 г белка: Ала – 8,17; Арг – 6,78; Асп – 6,77; Вал – 3,18; Гис – 2,85; Гли – 19,50; Глу – 10,63; Иле – 1,65; Лей – 3,52; Лиз – 4,21; Мет – 0,85; Про – 13,37; Сер – 2,76; Тир – 0,98; Тре – 1,78; Фен – 2,45; Цис – 0,26; итого 89,71; для копыт крупного рогатого скота: Ала – 3,63; Арг – 8,72; Асп – 7,26; Вал – 6,08; Гис – 1,90; Гли – 3,51; Глу – 14,36; Иле – 4,70; Лей – 10,02; Лиз – 4,26; Мет – 2,20; Про – 6,84; Сер – 6,89; Тир – 5,53; Тре – 4,57; Фен – 1,95; Цис – 6,49; итого 98,91. Из данных по аминокислотному составу видно, что в сырье содержится значительное количество глицина, пролина, глутаминовой кислоты и аланина, что обусловлено преимущественным содержанием коллагена в мясокостном сырье.

В то же время использованный субстрат обеднен многими аминокислотами, в первую очередь серосодержащими, а также тирозином, фенилаланином и изолейцином. Поэтому для улучшения состава конечного гидролизата использовали в качестве добавок к мясокостному субстрату кератинсодержащее сырье, в частности, копыта КРС [70, 72].

Скорость процесса высвобождения свободных аминокислот из белковых молекул существенно возрастает при увеличении концентрации минеральной кислоты. На рис. 11.15 представлены кинетические кривые накопления суммы аминокислот и некоторых лабильных аминокислот при различном содержании кислоты. Видно, что наибольшее суммарное содержание аминокислот в гидролизате наблюдалось при концентрации серной кислоты 50 % и составляло около 60 г/л, что соответствует степени конверсии белка 96...97 %. Увеличение концентрации гидролизующего агента не приводило к увеличению суммарного выхода аминокислот. При использовании для гидролиза мясокостного сырья серной кислоты с концентрацией 50 % наблюдался наибольший для кислотного гидролиза выход глицина, аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Следует особо отметить, что при гидролизе мясокостного сырья серной кислотой с концентрацией более 50 % происходило разрушение ряда аминокислот: гистидина, метионина и цистина, причем гистидин начал разрушаться при концентрациях гидролизующего агента выше 20 %, серин и цистин – при концентрациях выше 50 %, метионин – при концентрациях выше 40 %. Несмотря на то, что ряд аминокислот разрушался при концентрации серной кислоты 50 %, при этой концентрации наблюдался наибольший суммарный выход аминокислот.

Таким образом, при концентрациях серной кислоты выше 50 % разрушение аминокислот происходило интенсивнее, чем их накопление, по-

этому в качестве гидролизующего агента была выбрана серная кислота с оптимальной концентрацией 50 %.

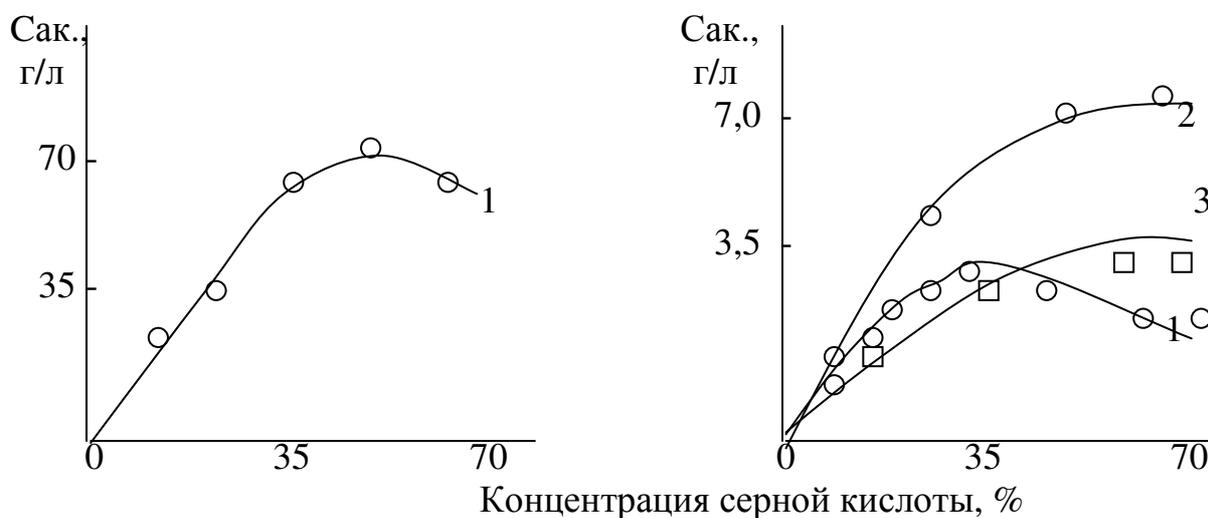


Рис. 11.15. Зависимость суммарного выхода аминокислот (Сак.) от концентрации серной кислоты: 1 – лизина; 2 – аргинина; 3 – гистидина

Таблица 11.18

Кинетические характеристики гидролиза мясокостного сырья 50 %-ной серной кислотой

Температура процесса, °С	Эффективная константа скорости, $k_{\text{эфф}} \times 10^3, \text{мин}^{-1}$
100	$7,30 \pm 0,01$
110	$9,30 \pm 0,02$
120	$10,90 \pm 0,04$

Характер зависимости накопления азота свободных аминогрупп от времени при различных температурах позволил предположить, что реакция гидролитического расщепления белка мясокостных отходов H_2SO_4 протекает по псевдопервому порядку.

Для кинетической кривой реакции первого порядка, начальный период которой не был зафиксирован, макроконстанту скорости реакции можно найти графически из следующих выражений [73]:

$$\ln (P_{\infty} - P) = \ln P_{\infty} - kt, \quad (11.4)$$

$$\ln [P_{\infty} / (P_{\infty} - P)] = kt, \quad (11.5)$$

где P – концентрация продукта реакции в момент времени t , P_{∞} – концентрация продукта реакции после завершения реакции.

Из выражения (11.5) видно, что в случае реакции первого порядка абсолютная величина эффективной константы скорости не зависит от того, в каких единицах выражаются концентрации продуктов реакции. Поэтому для расчета эффективной константы скорости можно использовать любые физические величины, пропорциональные концентрациям.

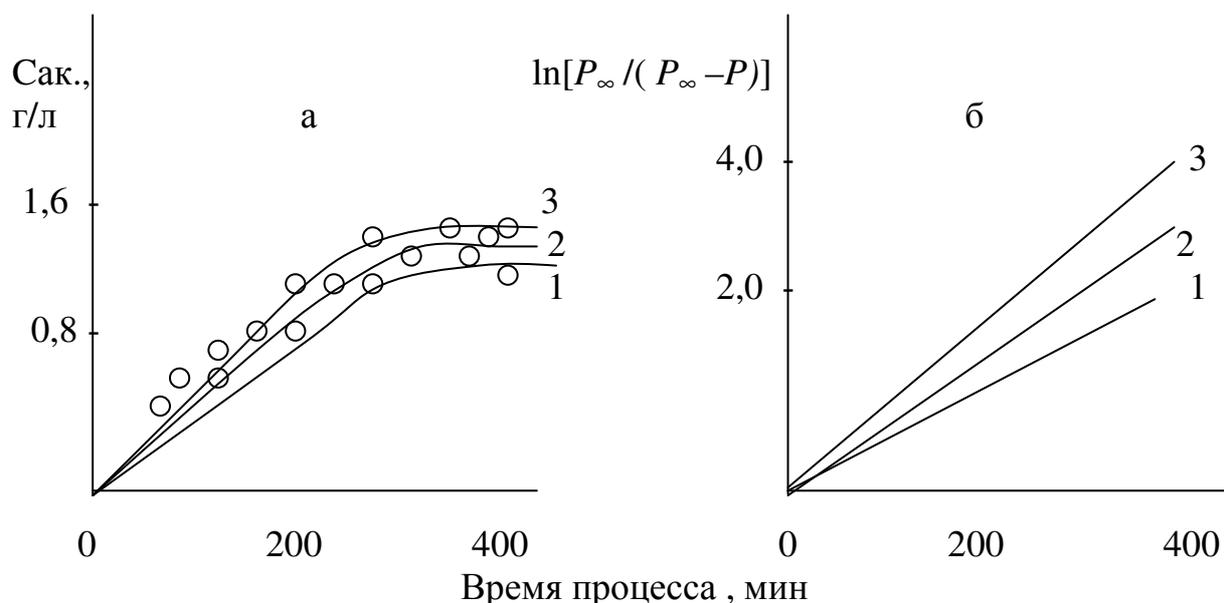


Рис. 11.16 Зависимость выхода лейцина от длительности гидролиза (а) и анаморфозы в полулогарифмических координатах (б) при различных температурах: 1 – 100 °С; 2 – 110 °С; 3 – 120 °С

Такой величиной в данном случае является содержание азота свободных аминокрупп – аминного азота в гидролизате, определенное методом формольного титрования. За P_{∞} был принят аминный азот, измеренный после 24 ч гидролиза 50 %-ной серной кислотой.

Графики зависимостей $\ln [P_{\infty} / (P_{\infty} - P)] = f (t)$, представленные, в частности, для лейцина на рис. 11.16 (б) имеют вид прямой линии, что доказывает правильность сделанного ранее предположения о протекании реакции гидролиза по псевдопервому порядку.

Эффективные константы скорости реакции находили из тангенса угла наклона прямой в координатах $\{ \ln [P_{\infty} / (P_{\infty} - P)], T \}$ по методу наименьших квадратов.

Зависимость эффективной константы скорости реакции от температуры определяется классически по уравнению Аррениуса. Значения эффективных констант скоростей реакции и эффективной энергии активации процесса представлены в табл. 11.18. Энергия активации процесса серно-кислотного гидролиза оказалась равной $24,0 \pm 0,7$ кДж/моль.

Для более детального исследования механизма гидролиза изучали кинетику накопления каждой из определяемых аминокислот, поскольку, несмотря на достаточно широкое применение интегральных формализованных кинетических моделей для описания процесса гидролиза биополимеров, кинетика накопления отдельных аминокислот мало изучена и почти не встречается в литературе [73–75].

Линеаризация кинетических кривых освобождения 20 изученных аминокислот в координатах $\{\ln [P_{\infty} / (P_{\infty} - P)], T\}$ позволяет утверждать, что накопление практически всех неразрушающихся аминокислот в процессе гидролиза в интервале от 1 до 6 ч можно описать уравнениями реакций псевдопервого порядка. Следует отметить, что вышеуказанная закономерность не наблюдается для накопления аспарагиновой кислоты, аргинина, глицина и треонина. Кинетика накопления вышеперечисленных аминокислот подчинялась уравнению реакции первого порядка только на начальной стадии кислотного гидролиза в пределах первых четырех часов. На более поздних стадиях порядок реакции имел смешанный характер и не поддавался интерпретации.

В процессе сернокислотного гидролиза происходило разрушение гистидина. Наиболее полное разрушение его наблюдалось при длительности процесса более двух часов и температурах выше 100 °С. Деструкция серина наблюдалась после четырех часов гидролиза при температуре 120 °С, а также после пяти часов гидролиза при температуре 110 °С; разрушение метионина и цистина наблюдалось при длительности процесса более трех часов. Поскольку процесс накопления вышеперечисленных аминокислот протекал параллельно процессу их окислительной деструкции, он имел смешанный порядок и также не поддавался интерпретации.

Эффективные константы скоростей и эффективные энергии активации процесса накопления отдельных аминокислот в ходе гидролиза приведены в табл. 11.19, 11.20.

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что в процессе гидролиза мясокостного сырья 50 %-ной серной кислотой выход термоустойчивых аминокислот на уровне 50...80 % наблюдался через 6 ч реакции. При этом скорости высвобождения отдельных аминокислот несколько отличались друг от друга. Наиболее быстро происходило накопление аспарагиновой и глутаминовой кислот, треонина, тирозина, фенилаланина, глицина, лизина, лейцина, валина ($k_{эфф} = 0,0092...0,013 \text{ мин}^{-1}$ при 120 °С). Выход этих аминокислот за 6 ч гидролиза при температуре 120 °С достигал 45... 82 %.

Труднее освобождались из полипептидных цепей аргинин, аланин, пролин, изолейцин ($k_{эфф} = 0,0069...0,0089 \text{ мин}^{-1}$ при 120 °С). Выход этих аминокислот за 6 ч гидролиза при температуре 120 °С достигал 36... 67 %.

Некоторые аминокислоты в процессе гидролиза подвергались окислительной деструкции. Так, гистидин начинал разрушаться через 2 ч, и за

6 ч гидролиза его концентрация уменьшалась на 57 % при 120 °С, на 31 % при 110 °С, на 10 % при 100 °С.

Серосодержащие аминокислоты также подвержены разрушению. Особенно ярко это видно на примере метионина, содержание которого за период гидролиза с 3 до 6 ч уменьшилось на 72 % при 120 °С, на 70 % при 110 °С, а за период гидролиза с 4 до 6 ч – на 58 % при 100 °С. Разрушение цистина протекало менее интенсивно: содержание его за период гидролиза с 3 до 6 ч при 120 °С уменьшилось на 22 %, а за период с 4 до 6 ч при 100 °С – на 4 %, при 110 °С – на 19 %.

Таблица 11.19

Эффективные значения энергии активации процесса гидролиза 50 %-ой серной кислотой мясокостного остатка после ферментативного гидролиза по отдельным аминокислотам

Аминокислота	Эффективная энергия активации E_a , кДж/моль
Аланин	18,9 ± 0,5
Аргинин	21,5 ± 0,3
Аспарагиновая кислота	21,2 ± 0,2
Валин	31,4 ± 0,2
Глицин	10,2 ± 0,5
Глутаминовая кислота	23,4 ± 0,1
Изолейцин	18,0 ± 0,3
Лейцин	30,7 ± 0,2
Лизин	32,5 ± 0,1
Пролин	17,1 ± 0,2
Тирозин	33,5 ± 0,2
Треонин	22,0 ± 0,1
Фенилаланин	32,6 ± 0,5

Заметить тенденцию к деструкции можно и у серина. На его кинетических кривых гидролиза при 110 °С и 100 °С наблюдался максимум через 5 и 6 часов процесса соответственно. Во всех случаях эффект разрушения выражен тем сильнее, чем жестче условия гидролиза.

Величина эффективной энергии активации процесса гидролиза в целом, рассчитанная по аминному азоту, совпадала со значением средней эффективной энергии активации, рассчитанной по формуле:

$$E_{cp} = \frac{\sum_{i=1}^n E_i}{n}, \quad (11.6)$$

где E_i – эффективная энергия активации i -й аминокислоты, n – число аминокислот; всего $24,0 \pm 0,5$ кДж/моль.

В табл. 11.21, 11.22 даны эффективные константы скоростей и эффективные энергии активации процесса накопления отдельных аминокислот в процессе гидролиза копыт крупного рогатого скота.

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что в процессе гидролиза копыт крупного рогатого скота 50 %-ной серной кислотой выход на уровне 50...85 % термостабильных аминокислот наблюдался через 6 ч реакции. При этом скорости высвобождения отдельных аминокислот различались между собой.

Таблица 11.20

Эффективные значения констант скоростей накопления отдельных аминокислот ($k_{эфф}$) и их выход (X) в процессе гидролиза 50 %-ной серной кислотой мясокостного сырья (остатка после ферментативного гидролиза)

Аминокислота	$k_{эфф} \times 10^3$, мин ⁻¹ , при 100 °С	X^* , %, при 100 °С	$k_{эфф} \times 10^3$, мин ⁻¹ , при 110 °С	X^* , %, при 110 °С	$k_{эфф} \times 10^3$, мин ⁻¹ , при 120 °С	X^* , %, при 120 °С
Аланин	6,1 ± 0,1	48,66	6,8 ± 0,2	51,57	8,4 ± 0,2	55,21
Аргинин	6,2 ± 0,1	60,05	7,7 ± 0,2	62,36	8,9 ± 0,2	66,76
Аспарагиновая кислота	9,1 ± 0,1	62,03	11,0 ± 0,1	65,60	13,0 ± 0,1	68,54
Валин	5,6 ± 0,1	38,54	7,0 ± 0,1	41,94	9,4 ± 0,1	46,55
Глицин	10,2 ± 0,1	45,99	11,2 ± 0,2	46,72	12,1 ± 0,2	47,45
Глутаминовая кислота	6,2 ± 0,1	75,02	7,9 ± 0,1	78,47	9,2 ± 0,1	82,36
Изолейцин	5,1 ± 0,1	50,99	6,2 ± 0,1	53,92	6,9 ± 0,1	60,93
Лейцин	5,6 ± 0,1	51,92	7,0 ± 0,1	56,01	9,4 ± 0,1	59,49
Лизин	5,5 ± 0,1	55,11	6,5 ± 0,1	59,85	9,5 ± 0,1	63,90
Пролин	5,7 ± 0,1	32,26	6,5 ± 0,1	35,13	7,6 ± 0,1	36,20
Тирозин	6,6 ± 0,1	72,63	8,0 ± 0,1	76,85	11,6 ± 0,2	81,05
Треонин	8,7 ± 0,1	61,42	10,4 ± 0,1	63,92	12,6 ± 0,1	68,19
Фенилаланин	7,1 ± 0,1	41,83	8,6 ± 0,1	43,23	12,3 ± 0,2	45,14

* Выход определяли по истечении 6 ч гидролиза 50 %-ной серной кислотой.

В отличие от процесса гидролиза мясокостного остатка, при гидролизе копыт крупного рогатого скота наиболее быстро происходило накопление тирозина, фенилаланина, аланина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, лейцина, глицина ($k_{эфф} = 0,0084...0,0119$ мин⁻¹ при 120 °С). Выход этих аминокислот за 6 ч гидролиза при температуре 120 °С достигал 48...89 %.

Таблица 11.21

Эффективные значения энергии активации процесса гидролиза 50 %-ной серной кислотой копыт крупного рогатого скота по аминокислотам

Аминокислота	Эффективная энергия активации, кДж/моль
Аланин	18,6 ± 0,1
Аргинин	15,5 ± 0,1
Аспарагиновая кислота	11,6 ± 0,2
Валин	15,2 ± 0,2
Глицин	13,1 ± 0,1
Глутаминовая кислота	12,8 ± 0,2
Изолейцин	19,5 ± 0,3
Лейцин	19,8 ± 0,2
Лизин	17,0 ± 0,2
Пролин	16,0 ± 0,4
Тирозин	16,6 ± 0,3
Треонин	15,1 ± 0,1
Фенилаланин	15,0 ± 0,1
Цистин	15,0 ± 0,2

Таблица 11.22

Эффективные значения констант скоростей накопления отдельных аминокислот ($k_{эфф}$) и их выход (X) в процессе гидролиза 50 %-ой серной кислотой копыт крупного рогатого скота

Аминокислота	$k_{эфф} \times 10^3$, мин ⁻¹ , при 100 °С	X^* , %, при 100 °С	$k_{эфф} \times 10^3$, мин ⁻¹ , при 110 °С	X^* , %, при 110 °С	$k_{эфф} \times 10^3$, мин ⁻¹ , при 120 °С	X^* , %, при 120 °С
Аланин	6,4 ± 0,1	50,62	7,4 ± 0,2	54,73	8,8 ± 0,2	58,12
Аргинин	6,7 ± 0,1	50,41	7,7 ± 0,1	51,92	8,7 ± 0,1	53,48
Аспарагиновая кислота	6,9 ± 0,1	58,12	7,8 ± 0,2	60,24	8,4 ± 0,2	62,36
Валин	4,8 ± 0,1	26,75	5,5 ± 0,1	29,64	6,2 ± 0,1	32,53
Глицин	9,3 ± 0,1	80,15	10,6 ± 0,2	81,40	11,6 ± 0,2	87,66
Глутаминовая кислота	7,1 ± 0,1	68,57	8,0 ± 0,2	72,54	8,8 ± 0,2	76,53
Изолейцин	3,6 ± 0,1	23,94	4,2 ± 0,1	26,84	5,0 ± 0,1	30,86
Лейцин	6,3 ± 0,1	35,31	7,5 ± 0,2	36,85	8,8 ± 0,2	42,11
Лизин	5,7 ± 0,2	50,35	6,7 ± 0,2	52,62	7,6 ± 0,2	55,31
Пролин	4,2 ± 0,1	22,17	5,0 ± 0,1	23,78	5,5 ± 0,2	26,35
Тирозин	9,0 ± 0,1	43,56	9,9 ± 0,1	45,78	11,9 ± 0,1	47,69
Треонин	5,2 ± 0,2	37,70	6,1 ± 0,2	40,40	6,7 ± 0,1	41,94
Фенилаланин	8,4 ± 0,1	83,40	9,7 ± 0,1	84,98	10,8 ± 0,1	87,91
Цистин	5,2 ± 0,2	31,97	6,0 ± 0,2	33,19	6,7 ± 0,2	34,54

* Выход определяли по истечении 6 ч гидролиза 50 %-ной серной кислотой.

В случае гидролиза копыт крупного рогатого скота труднее всего освобождались из полипептидных цепей валин, изолейцин, лизин, пролин, цистин, треонин ($k_{эфф} = 0,005...0,0076 \text{ мин}^{-1}$ при $120 \text{ }^\circ\text{C}$). Выход этих аминокислот за 6 ч гидролиза при температуре $120 \text{ }^\circ\text{C}$ достигал 26...55 %.

Так же как и в случае гидролиза мясокостного сырья, при гидролизе копыт крупного рогатого скота некоторые аминокислоты подвергались окислительной деструкции. Так, гистидин начинал разрушаться через 2 ч, за 6 ч гидролиза его концентрация уменьшалась на 53 % при $120 \text{ }^\circ\text{C}$, на 38 % при $110 \text{ }^\circ\text{C}$ и на 28 % при $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

Разрушению подвергается также метионин, содержание которого за период гидролиза с 3 до 6 ч уменьшилось на 40 % при $120 \text{ }^\circ\text{C}$, на 26 % при $110 \text{ }^\circ\text{C}$, а за период гидролиза с 4 до 6 ч при $100 \text{ }^\circ\text{C}$ – на 9 %. Аналогичная тенденция наблюдалась через 5 ч гидролиза и у серина. Заметного разрушения цистина не наблюдалось, так как его содержание в коллаген- и кератинсодержащем сырье достаточно велико и его распад происходил менее интенсивно, чем накопление. Во всех случаях эффект разрушения аминокислот был выражен тем сильнее, чем жестче условия гидролиза.

Таблица 11.23

Аминокислотный состав гидролизатов копыт и мясокостного остатка (МКО), полученных в результате гидролиза 50 %-ной серной кислотой в течение 5 ч

Аминокислота	Гидролизат МКО, г/л гидр.	Гидролизат МКО, г/100г белка	Гидролизат копыт, г/л гидр.	Гидролизат Копыт, г/100г белка
Аланин	3,12	4,44	4,70	2,07
Аргинин	3,09	4,40	10,24	4,50
Аспарагиновая кислота	3,25	4,63	10,25	4,51
Валин	1,01	1,40	4,30	1,89
Гистидин	1,10	1,57	3,40	1,49
Глицин	6,42	9,14	6,96	3,06
Глутаминовая кислота	5,86	8,34	24,41	10,73
Изолейцин	0,68	0,97	3,06	1,35
Лейцин	1,43	2,04	9,40	4,13
Лизин	1,80	2,56	5,20	2,29
Метионин	0,32	0,46	2,06	0,90
Пролин	3,26	4,64	3,89	1,71
Серин	1,2	1,71	8,67	3,81
Тирозин	0,55	0,78	5,92	2,60
Треонин	0,85	1,20	4,28	1,88
Фенилаланин	0,76	1,08	3,84	1,69
Цистин	0,13	0,19	4,99	2,19
Итого	34,83	49,59	115,56	50,79

Величина средней эффективной энергии активации процесса гидролиза копыт крупного рогатого скота, рассчитанная по уравнению (11.6), составляла $15,8 \pm 0,5$ кДж/моль. Поскольку энергия активации показывает зависимость скорости реакции от температуры, то, исходя из полученных величин E_a двух процессов гидролиза, можно заметить, что гидролиз копыт крупного рогатого скота в меньшей степени зависит от температуры, чем гидролиз мясокостного остатка после ферментативного гидролиза при прочих равных условиях ведения процесса, а общий вид полученных закономерностей практически не зависит от вида гидролизующего сырья.

Таблица 11.24

Свойства кислотных гидролизатов отходов мясной промышленности

Внешний вид и цвет	Однородный порошок от желтого до светло-коричневого цвета
Запах и вкус	Специфический
Содержание общего азота	Не менее 5 %
Содержание азота аминокрупп, аминокислот и низших пептидов	Не менее 4 %
Содержание растворимых белковых веществ, в пересчете на сухое белковое вещество	Не менее 60 %
pH 1%-ного водного раствора	5,0 ... 6,0
Содержание золы	Не более 18 %
Содержание влаги	Не более 10 %
Содержание солей тяжелых металлов	Не допускается
Бактериологические показатели гидролизатов: количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов в 1 г продукта; патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, в 25 г продукта	Не более $3,0 \times 10^5$ Отсутствуют

По результатам изучения кинетики было предложено проводить процесс гидролиза мясокостного остатка после ферментативного гидролиза 50 %-ной серной кислотой при следующих параметрах: температура – 120 °С, продолжительность процесса около 5 ч, поскольку в этом случае степень конверсии белка достигала 96,5 % (за сутки степень конверсии увеличится всего лишь на 1,1 %), выход свободных аминокислот – 50 г/100 г белка (35 г/л гидролизата), процесс гидролиза копыт крупного рогатого скота 50 %-ной серной кислотой – в течение 5 ч при температуре

120 °С при степени конверсии белка 98,2 %, выход свободных аминокислот составлял 51 г/100 г белка (116 г/л гидролизата). Также следует особо отметить, что при данных условиях наблюдался и достаточный выход серосодержащих аминокислот: 2 г/л (0,9 г/100 г белка) метионина и 5 г/л (2,2 г/100г белка) цистина (см. табл. 11.23).

Полученные кинетические данные были использованы для получения опытных образцов сернокислотных гидролизатов из отходов мясной промышленности. Гидролиз проводили в течение 5 ч 50 %-ной серной кислотой при температуре 120 °С с последующей нейтрализацией известковым молоком. Выпавший осадок сульфата кальция отделяли центрифугированием. Фильтрат упаривали на роторном испарителе и лиофильно высушивали. Аминокислотный состав полученных гидролизатов приведен в табл. 11.23, а их основные физико-химические свойства как готовых технических продуктов – в табл. 11.24.

Кислотный гидролизат мясокостного остатка имел несбалансированный аминокислотный состав: в нем содержалось значительное количество глицина, пролина, глутаминовой и аспарагиновой кислот – 54 % от суммы всех аминокислот. Поэтому в целях улучшения аминокислотного состава кислотного гидролизата мясокостного сырья его можно обогатить гидролизатом кератина, что позволяет получить композиции гидролизатов с разным аминокислотным составом в зависимости от требований потребителя [68, 70].

Таким образом, изучение кинетики процесса высвобождения аминокислот при гидролизе мясокостного сырья позволяет определять оптимальные параметры получения аминокислотных смесей пищевого назначения с заданным составом. В состав полученных мясокостных гидролизатов входят необходимые незаменимые аминокислоты, что дает возможность использовать их в кормовой, пищевой и микробиологической отраслях [71, 72].

Список литературы

1. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. Пер. с англ. В 2-х частях. – Ч. 1. – М.: Мир, 1989 – 692 с.
2. Mandl J.D. // J. Clin. Invest. – 1953. – V. 32. – P. 1323–1329.
3. <http://www.expasy.ch/cgi-bin/enzyme-search-de>.
4. Коллализин. // Фармакопейная статья N 42-3375-97.
5. Коллагеназа КК. // Временная фармакопейная статья N 42-2693-96.
6. <http://www.worthington-biochem.com>.
7. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/SearchResultsPage/Expand>.
8. Worthington. Enzymes and related biochemicals. – N.Y.: Biochemical products division, 1982. – 200 p.
9. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: ВНИИМП, 2002. – 408 с.

10. Временная фармакопейная статья N 42–2483–96.
11. Баер Н.А., Леонов А.Ю., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. // Экологические системы и приборы. – 2005. – N 3. – С. 18–22.
12. Neklyudov A.D., Berdutina A.V., Ivankin A.N. // Appl. Biochem. Microbiol. – 2003. – V. 39. – N 4. – P. 426 – 430.
13. Ledward D. // Food Sci. and Technol. – 1999. – V. 6. – N 4. – P. 236 – 241.
14. Marggrander K. // Fleischerei. – 1987. – N 1. – S. 55 – 58.
15. De Clero M. // Chim. nouv. – 1994. – V. 12. – N 46. – P. 1360 – 1363.
16. Гальперин Ю. М., Лазарев П.И. Пищеварение и гомеостаз. – М.: Наука, 1986. – 304 с.
17. Антипова В.А., Глотова И.А. Основы рационального использования коллагенсодержащего сырья мясной промышленности. – Воронеж: Изд-во Воронежской гос. технол. академии, 1997. – 227 с.
18. Prabhu D. // Meat and Poultry. – 2000. – V. 46. – N4. – P. 65 – 69.
19. Титов Е.И., Апраксина С.А. Коллагенсодержащее сырье и пути его переработки. – М.: АгроНИИТЭИПП, 1995. – 35 с.
20. Мухин В.А., Новиков В.Ю., Константинова Л.Л., Иванкин А.Н., Бердудина А.В. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2002. – N 8. – С. 41– 44.
21. Chen Y.L., Lu P.J., Tsai I. // Comp. Biochem. Physiol. – 1991. – V.100b. – N 4. – P.763 – 768.
22. Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Исаев В.А. Степанов В.М. Дунаевский Я.Е. // Биоорг. химия. – 1995. – Т. 21. – N 4. – С. 249–255.
23. Руденская Г.Н., Исаев В.А, Степанов В.М. Мальцев К.В., Швец С.В. Лукьянова Н.А., Кислицин Ю.А., Мирошников А.И. // Биоорг. химия. – 1998. – Т. 24. – N 2. – С. 112 – 118.
24. Мухин В.А., Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Кяйвярайнен Е.И. // Прикл. биохим. и микробиол. – 1999 – Т. 35. – N 4.– С. 409 – 412.
25. Антипова Л.В., Глотова И.А., Кузнецов А.Н // Мясная индустрия. – 2001. – N 6. – С. 23-26.
26. Антипова Л.В., Глотова И.А. и др. Способ подготовки коллагенсодержащего сырья для производства колбасной оболочки. // Пат. РФ. – N 02096966. // БИ. – 1997. – N 33.
27. Антипова Л.В., Глотова И.А. и др. Способ приготовления мясного фарша для производства лечебно-профилактических продуктов. // Заявка N 2000120096 от 27.07.2000.
28. Антипова Л.В., Глотова И.А. // Биотехнология. – 1999. – N 5.
29. Баер Н.А., Неклюдов А.Д., Алешин А.А., Бердудина А.В. Пат. РФ. N 2166858. // Б.И. – 2001. – N 20.
30. Баер Н.А., Неклюдов А.Д., Алешин А.А. // Пат. РФ. N 2166854. // Б.И. – 2001. – N 20.
31. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. – М.: Аграрная наука, 2000. – 290 с.
32. Слуцкая Т.Н. Биохимические аспекты регулирования протеолиза. – Владивосток: ТИНРО-центр, 1997. – 170 с.
33. Мухин В.А., Новиков М.Ю. Ферментативные белковые гидролизаты тканей морских гидробионтов: получение, свойства и практическое использование. – Мурманск: ПИНРО, 2002. – 97 с.
34. Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. Методы исследования мяса и мясных продуктов. – М: Колос, 2001. – 572 с.
35. Гель-электрофоретические приборы и реактивы. – Будапешт: Реанал, 1992. – 67 с.
36. Гааль Э., Медьеш Г., Верецкей Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 447 с.

37. Маркович Н.А. // Вопросы косметологии. – 2001. – N2. – С. 44.
38. Соловьев В. И. Созревание мяса. – М: Пищевая промышленность, 1966. – 266 с.
39. Уайт А. А., Хендлер Ф., Смит Э. Основы биохимии. Т. 3. – М: Мир, 1981.
40. Салаватулина Р.М., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. // Мясная промышленность. – 1996. – N 6. – С. 25 – 26.
41. Батаева Д.С. // Все о мясе. – 1999. – N 3. – С. 39 – 42.
42. Кремер Ю. Н. // Вопросы питания. – 1980. – N 4. – С. 5 – 56.
43. Суровцев В.И., Федоров Т.В., Байдусь А.Н., Бороздина М.А., Гусев В.В., Чупрунов В.П. // Биохимия. – 2001. – Т. 66. – N5. – С. 658 – 662.
44. Барнард Е. Сравнительная биохимия и физиология пищеварения. Сравнительная физиология животных в 3-х т. – Т. 1./ Под ред. Л. Проссера: – М.: Мир, 1977. – С. 285 – 348.
45. Мухин В. А., Новиков В. Ю. Рекомендации по рациональному использованию отходов переработки акклиматизированного камчатского краба *Paralithodes camtschatica*. Камчатский краб в Баренцевом море. – Мурманск: Изд-во ПИНРО, 2001. – С. 160 – 170.
46. Неклюдов А.Д., Бердугина А.В., Иванкин А.Н., Миталева С.И., Евстафьева Е.А. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39. – N 4. – С. 426 – 430.
47. Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д., Кудряшов В.С., Калинова Ю.Е., Тележкин В.В., Герман А.Б. // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2001. – N 1. – С. 28 – 32.
48. Evstafieva E.A., Baburina M.I., Ivankin A.N. A method of production of venuable proteins produced from meat industry // Blacksea and Central Asian Symposium on food Technology. October 12-16, 2000 Ankara .Turkey. – Book of Abstracts. – P. 21.
49. Неклюдов А.Д., Бердугина А.В., Иванкин А.Н., Карпо Б.С. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – N 4. – С. 328 – 335.
50. Ivankin A.N., Nekludov A.D., Mosina G.I. // In: Congr. proceedings 43rd ICOMST, 1997. – 27 July – 1 Aug 1997 Auckland. New Zeland. P. 500 – 501.
51. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. // Прикл. биохим. и микробиол. – 2000. – Т. 36. – N 4. – С. 373 – 381.
52. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. // Прикл. биохим. и микробиол. – 2000. – Т. 36. – N 5. – С. 525 – 534.
53. Слуцкая Т. Н. Биохимические аспекты регулирования протеолиза. – Владивосток: ТИНРО-центр. – 1997. – 148 с.
54. Константинова Л.Л. Исследование активности протеолитических ферментов традиционных и новых для промысла рыб северного бассейна, разработка способов регулирования процесса созревания соленой рыбы: Автореф. дисс... канд. техн. наук. – Мурманск: ПИНРО, 2001. – 29 с.
55. Мухин В.А., Новиков В.Ю. Протеолиз и протеолитические ферменты в тканях морских беспозвоночных. Монография. – Мурманск: ПИНРО, 2002. – 100 с.
56. Мухин В.А., Немова Н.Н., Крупнова М.Ю., Кяйвярайнен Е.И. // Прикл. биохим. и микробиол. – 1999. – Т. 35. – № 4. – С. 409 – 412.
57. Леонова А.И., Плоринь А.П. // Труды БалтНИИРХ. – 1968. – Сб. 4. – С. 262 – 278.
58. Константинова Л.Л., Пахомова К.И. // Труды ПИНРО. – 1970. – Вып. 30. – С. 102 – 105.
59. Лобасова Т.Н., Лисовая В.П. В сб.: Технол. рыб. продуктов. – Калининград: АтлантНИРО, 1966. – Вып. 16. – С. 94 – 103.
60. Gora A., Wawereka A., Salmonowicz J., Kochanowski J. // Пат. ПНР. – N 103371. – МКИ А 23 В 4/02.
61. Orshaug K. // Пат. Норвегия. – N148207. – МКИ А 23 4/02, А 23 В 4/14.

62. Липатов Н.Н., Боресков В.Г., Мамаева Л.М. // Изв. вузов СССР. Пищ. технол. – 1981. – № 5. – С. 64 – 67.
63. Соловьев В. И. Созревание мяса. – М.: Пищ. пром-сть, 1966. – 337 с.
64. Соловьев В.И., Кракова В.З. // Прикл. биохим. и микробиол. – 1971. – Т. 7. – № 2. – С. 567 –588.
65. Мухин В. А., Новиков В. Ю. Рекомендации по рациональному использованию отходов переработки акклиматизированного камчатского краба *Paralithodes camtschatica*. Камчатский краб в Баренцевом море. – Мурманск: Изд-во ПИНРО, 2001. – С. 160 –170 .
66. Мухин В.А., Новиков В.Ю., Рижикова Л.С. // Прикл. биохим. и микробиол. –2001. – Т. 37. – № 3. – С. 338 –343.
67. Мухин В.А., Новиков В.Ю. // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – Т. 37. – № 5 – С. 633 – 638.
68. Иванкин А.Н. Кузнецова Т.Г. В Кн. «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК / Под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – М: ВНИИПБТ, 2006. – С. 269 – 275.
69. Ivankin A.N., Kuznetsova T.G., Mitaleva S.I. In: New integral approach to meat and meat products safety. Book of abstracts. Int. 53-rd Meat Industry Conf. – Yrnjacka Banja, 2005. – P.15 – 16.
70. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Основы биохимической переработки животного и комбинированного сырья. – М.: ВНИИМП, 2003. – 116 с.
71. Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Экологические основы биотехнологических процессов. – М.: МГУЛ, 2002. – 404 с.
72. Бердугина А.В., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Миталева С.И. Сб. научн.трудов ВНИИМП. –М.: Изд-во ВНИИМП, 2001. – С .175 – 190.
73. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. – М.: Наука, 1979. – С. 102 – 175.
74. Alder-Nisson J. // Dan. Kemi. – 1986. – V. 67. – P. 19 – 25, 36 – 43.
75. Крылов И. А., Красноштанова А. А., Манаков М.Н. // Биотехнология. 1996. – № 3. – С. 39 – 44.
76. Бердугина А.В. Разработка технологии белковых гидролизатов из вторичного сырья мясной промышленности: Автореф. дисс...канд. техн. наук. – М.:ВНИИМП, 2000.
77. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Коллаген: получение, свойства и применение: монография – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2007. – 336 с.

Часть II

ГИДРОЛИЗ ЛИПИДОВ

Глава 12

Химические основы гидролиза липидов природного происхождения

Липиды образуют обширную группу поликомпонентных органических соединений этерифицированного глицерина, которые содержатся во всех живых объектах животного, растительного и микробного происхождения.

Липиды – биологически активные вещества, являющиеся производными высших жирных кислот, спиртов и альдегидов и вместе с белками и углеводами составляют основную массу органических веществ живой клетки.

Липиды являются составной частью многих видов пищевого сырья и готовых продуктов. Широко применяются в виде жировых композиций для получения высококалорийных продуктов питания. Липиды содержатся в мясе сельскохозяйственных животных в количестве от 3 % (молодняк) до 33 % (свинина), молоке от 3–4 % (молоко коровье) до 18 % (молоко оленя), рыбе от 10 % до 25 % (осетровые), в растительных объектах от 3–5 % (пшеница, кукуруза) до 30–70 % (семена подсолнечника – кокосовая пальма), в микроорганизмах – до 60 % биомассы [1 – 4].

Некоторые свойства животных жиров представлены в табл. 12.1.

Таблица 12.1

Свойства некоторых жиров [1, 4]

Наименование показателя	Топленый говяжий жир	Топленый бараний жир	Топленый свиной жир	Костный жир говяжий	Подсолнечное масло	Оливковое масло
Плотность, г/см ³	0,93–0,95	0,93–0,96	0,91–0,92	0,92–0,93	0,92–0,93	0,91–0,92
T _{пл.} , °C	42–53	44–55	28–48	16–44	–	–
T _{заст.} , °C	34–38	34–45	22–32	4–38	18	6
Число омыления	193–200	191–206	193–200	193–198	186–194	185–200
Йодное число	32–47	35–46	46–66	43–71	119–145	72–89
Родановое число	29–40	30–39	44–52	55–62	–	–

Ценность пищевых жиров зависит от их усвояемости. Считается, что говяжий жир усваивается на 80–94 %, бараний на 80–90 %, свиной 96 – 98 %, сливочное масло на 93–99 %, степень усвоения растительных жиров как правило превосходит указанный уровень. Наилучшей усвояемостью обладают жиры, состоящие из смешаннокислотных триглицеридов, которые обладают лучшей растворимостью, эмульгируемостью и способностью расщепляться. Высокое содержание триглицеридов с двойными связями снижает их эмульгируемость и биодegradацию в живом организме. Жиры с содержанием высоконепредельных кислот в количестве более 15 % не усваиваются, оптимальное содержание таких кислот в жире составляет около 4 % [3].

Химический состав жиров в питании имеет весьма существенное значение. Особое внимание уделяется полиненасыщенным кислотам с оп-

ределенным положением двойных связей и цис-конфигурацией, в первую очередь линолевой, линоленовой, олеиновой, арахидоновой и полиненасыщенных кислот семейства $\omega 3$. Линолевая и линоленовая кислоты не синтезируются в организме человека, арахидоновая синтезируется из линоленовой, поэтому линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты относят к незаменимым жирным кислотам.

Среди продуктов питания полиненасыщенные жирные кислоты больше всего содержатся в растительных маслах: 50–60 % линолевой кислоты в соевом, кукурузном, подсолнечном масле, в животных жирах содержание линолевой кислоты составляет 0,5–0,6 %. Суточная потребность человека в линолевой кислоте составляет 6–10 г (минимальная – 2 г). Арахидоновая кислота содержится в яйце – 0,5 %, субпродуктах животного происхождения 0,3–0,5 %.

Биологическая активность жирных кислот существенно различается. Наибольшей активностью обладает арахидоновая кислота, высокой – линолевая, активность линоленовой кислоты в 10 раз ниже, чем у линолевой. Полезные функции липидов, связанные с построением клеточных мембран, агрегацией тромбоцитов, выведением избытка холестерина из организма, повышением эластичности стенок кровеносных сосудов, реализуются только при наличии цис-изомеров ненасыщенных жирных кислот.

По современным представлениям науки о питании представляется, что молодой здоровый организм человека должен потреблять в составе липидов 10 – 20 % полиненасыщенных, 50–60 % мононенасыщенных и 30 % насыщенных C_{10-18} жирных кислот. Такое сбалансированное питание реализуется в рационе, содержащем 1/3 растительных и 2/3 животных жиров. Для людей пожилого возраста содержание линолевой кислоты должно составлять около 40 % и линоленовой – 4 %, соотношение полиненасыщенных и насыщенных кислот – 2:1 [2].

Под термином «сырой жир» обычно понимают извлекаемую из сырья смесь, в состав которой, входят жирорастворимые пигменты (каротиноиды, хлорофиллы, госсипол), жирорастворимые компоненты (витамины и кофакторы), стерины (холестерин, содержание которого составляет от 0,56 % в яйце, 0,06–0,1 % в мясе до 0,2–1,6 % в сливочном масле и сырах), воски и собственно липиды, которые обычно подразделяют на ацилированные глицерины формулы $R_1COOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OCOR$ (жиры, масла; R, R_1 , R_2 – остатки жирных кислот) и фосфолипиды (фосфати́ды) формулы $R_1COOCH_2-CH(OCOR_2)-CH_2OP(O)O-OX$, где: X = H, $CH_2CH_2N+(CH_3)_3$, $CH_2CH_2N+H_3$, $CH_2CH(COOH)NH_2$.

Различают триглицериды, у которых все гидроксилы глицерина замещены остатками жирных кислот, диглицериды, у которых вместо R_1CO содержится OH и моноглицериды, у которых вместо R_1CO и $OCOR_2$ имеются OH. Аналогично моно-, ди- и трифосфати́ды для производных глицерина, этерифицированных остатками фосфорной кислоты (вместо OH в

формуле содержится звено OPO(OH)(OV) , где V = азотсодержащий радикал или остаток аминокислоты).

Биохимическая роль жиров заключается в том, что они являются источником энергетического и пластического материала для живых клеток, т.е. являются незаменимыми факторами питания.

Рекомендуемое по калорийности содержание жиров в рационе человека составляет до 30 % для населения юга и до 40 % для населения северных регионов. Недостаток жиров приводит к отклонениям в деятельности центральной нервной системы, снижению иммунитета и сокращению продолжительности жизни. Избыток жирной пищи приводит к ожирению, сердечно-сосудистым заболеваниям и преждевременному старению.

В процессе хранения жиросодержащих композиций липиды подвергаются деструктивным изменениям, связанным с окислительным гидролизом полиглицеридов («прогоркание» жиров). Скорость таких процессов определяется температурой хранения, которая в оптимуме составляет для растительных жиров 4 – 6 °С, для животных < – 20 °С, герметичностью упаковки (кислород существенно ускоряет старение и порчу жиров), отсутствием света, активностью микрофлоры (биохимическое прогоркание), а также содержанием искусственно привносимых стабилизаторов-антиокислителей, в качестве которых применяют различные природные и синтетические органические вещества.

В последнее время учеными из развитых стран с большой продолжительностью жизни проводятся достаточно интенсивные исследования, которые показывают, что кроме вышеупомянутых критериев использования жиров, существует так называемое благоприятное соотношение $\omega 6/\omega 3$ ненасыщенных жирных кислот. По современной классификации количество С-атомов от конца жирной кислоты до ближайшей двойной связи позволяет относить данную кислоту к семействам $\omega 3$, $\omega 6$, $\omega 7$, $\omega 9$ и т.д., а высокая доля $\omega 3$ -кислот в продукте способствует профилактике ряда заболеваний, в частности онкологических. Жители Японии, потребляющие много морепродуктов с высоким содержанием $\omega 3$ жирных кислот, отличаются не только долголетием, но и меньшей подверженности заболеваниям в пожилом возрасте.

Химическое строение пищевых жиров представлено смесью триглицеридов $\text{ROCH}_2\text{CH(OR)CH}_2\text{OR}$, где R – остаток жирной кислоты. Хроматографический анализ состава R -жирных кислот позволяет оценивать происхождение и качество жиров. Для этого образец подвергают обработке смесью 1:1 хлороформа с метанолом по Фолчу в присутствии 1% раствора KCl для растворения липидных компонентов, смесь фильтруют через бумагу и после удаления избытка растворителей упариванием экстракт подвергают щелочному или кислотному гидролизу с целью получе-

ния смеси метиловых эфиров кислот, которую анализируют на газовом хроматографе. Хорошие результаты дает двухчасовая обработка 0,01 г липидов 3 мл 15% раствора ацетилхлорида в метаноле при 100 °С с последующей нейтрализацией смеси добавлением 1,25 мл насыщенного КОН в СН₃ОН до рН 5,0–6,0. Смесь экстрагируют 3 мл насыщенного водного раствора NaCl и 3 мл гексана, отбирая на анализ 0,2 мкл из прозрачного гексанового слоя, содержащего метиловые эфиры жирных кислот [4], которые анализируют методом газовой хроматографии (методика 12.1).

Методика 12.1. Определение жирно-кислотного состава липидов различного происхождения методом газовой хроматографии.

Метод основан на получении метиловых эфиров жирных кислот, содержащихся в анализируемых жирах, и их количественном определении с помощью газожидкостной хроматографии на хроматографе с пламенно-ионизационным детектором [4, 5].

Метод предназначен для определения «жирнокислотного спектра» пищевых продуктов животного и другого происхождения.

Оборудование. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Испаритель ротационный ИР–1М или другой аналогичного класса. Аппарат для встряхивания типа АБУ–6с. Микроизмельчитель ткани. Термостатируемая баня с регулируемым нагреванием 20–100 °С.

Колбы перегонные К–1–250–29/32. Колбы Гр–25–14/23. Колбы мерные 2–50–2; 2–100–2; 2–500–2. Воронка В–56–80 ХС. Колба коническая Кн–1–250–29/32. Цилиндры мерные 1–50, 1–100. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 мл. Стеклянные банки с притертыми крышками. Воронки делительные ВД–100–29/32, ВД–250–29/32. Стакан химический на 50 и 100 мл. Пипетки автоматические на 1–10 мл. Палочка из химико-лабораторного стекла. Бумага фильтровальная лабораторная. Обратный холодильник Либиха на шлифах.

Газовый хроматограф Газохром 1109, Цвет 104 или аналогичный, например типа Varian, с пламенно-ионизационным детектором.

Микрошприц МШ 10 или аналогичный для ввода 0,1–20 мкл пробы заколом через мембрану инжектора хроматографа.

Колонки хроматографические стеклянные для газового хроматографа длиной 2,0 м и диаметром 3 мм или капиллярная колонка длиной 30–50 м и внутренним диаметром 0,3–0,5 мм.

Баллон стальной для сжатого газа, номинальное давление 150 ат.

Азот газообразный, марки «особой чистоты» или азот с содержанием кислорода не более 0,004 % или гелий. Водород газообразный (99,9 % чистоты) без органических примесей или генератор водорода. Сжатый воздух без органических примесей или компрессор.

Насадки для колонки (наполнение набивных колонок): 3–5 % OV–275 на хроматоне N–AW–DMCS (0,16–0,20 мм) или другие, дающие необходимое хроматографическое разделение, или капиллярная колонка в соответствии с документацией к газовому хроматографу.

Реактивы. Калия гидроксид, хч, экстрагированный очищенным гексаном. Дистиллированная вода. Индикаторная бумага рН. Хлороформ, хч. Метанол, хч, абсолютный. Гексан, ч, очищенный концентрированной серной кислотой, отмытый дистиллированной водой, высушенный кристаллическим гидроксидом калия и перегнанный с дефлегматором, или хч. Кислота серная, хч, плотностью 1,84 г/см³. Кислота соляная, хч, концентрированная. Натрий металлический или метилат натрия, чда.

Эталоны метиловых эфиров определяемых жирных C_{4–22} жирных кислот гарантированной степени чистоты с содержанием основного вещества не менее 95 %, рабочий раствор 1 мкг/мл.

Допускается применение других средств измерений, аппаратуры и реактивов, характеристики которых не уступают характеристикам указанных выше средств измерений, аппаратуры и реактивов.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРА ДЛЯ МЕТАНОЛИЗА. 2 М раствор метилата натрия в метаноле получают растворением 10,8 г метилата натрия или 4,6 г металлического натрия в 100 мл абсолютного метанола или растворяют 11,2 г КОН в 100 мл абсолютного метанола.

ПОДГОТОВКА ГАЗОВОГО ХРОМАТОГРАФА. Подготовка хроматографической колонки.

Сухую стеклянную колонку, предварительно промытую хромовой смесью, этиловым спиртом, затем диэтиловым эфиром, заполняют носителем с помощью вакуумного или водоструйного насоса. При этом набивку колонки периодически уплотняют, постукивая по колонке деревянной палочкой. Установленную в термостате хроматографическую колонку перед работой кондиционируют в следующем режиме: 2 ч при 100 °С; 2 ч при 150 °С; 4 ч при 200 °С; 4 ч при 250 °С. При кондиционировании колонка должна быть отключена от детектора. Кондиционирование следует проводить при смене колонки, а также после длительных перерывов в работе. При использовании капиллярной колонки проводят ее подготовку в соответствии с технической документацией к прибору.

ПОДГОТОВКА ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА. 50 мг липидов (жиры или масла) растворяют в 1 мл хлороформа или гексана при комнатной температуре. Добавляют 10 мл метанола и 3 гранулы твердого КОН. Гидролиз проводят при комнатной температуре в течение суток, затем корректируют рН смеси до 4,0 добавлением концентрированной HCl. Смесь перемешивают, отстаивают в течение 5 мин, добавляют 6 мл воды.

Полученный гексановый раствор метиловых эфиров жирных кислот анализируют на приборе методом ГЖХ или подвергают дополнительной очистке.

Смесь подвергают отмыванию водой 2–3 раза, каждый раз оставляя органический слой, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, жидкость декантируют с осадка, переливают в чистую делительную воронку, добавляют 10 мл гексана, перемешивают, нижний слой удаляют, а гексановый слой упаривают на роторном испарителе досуха, перераспределяют в 1 мл гексана и используют для анализа.

Раствор метиловых эфиров жирных кислот в гексане хранят в холодильнике не более суток.

ПРОБОПОДГОТОВКА ПРИ АНАЛИЗЕ СВЯЗАННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (метаноллиз нейтральных жиров с кислотным числом <2).

Смешивают 50 мг образца с 1 мл гексана, 0,5 мл 2 М раствора метилата натрия или гидрата окиси калия и встряхивают в течение 1 мин. Смесь отстаивают для отделения метанольно-глицеринового слоя, верхний гексановый слой используют для ГЖХ.

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ. 0,2 мкл гексанового экстракта, содержащего экстрагированные из пробы по методике метиловые эфиры жирных кислот, вводят в испаритель газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором и анализируют при программируемом изменении температуры колонки с 120 до 240 °С (6 °/мин), температуре испарителя 250 °С, температуре детектора 300 °С, расход инертного газа на набивную колонку 75 мл/мин.

При тех же условиях анализируют гексановый раствор 1 мкг/мл эталонов метиловых эфиров жирных C_{4-22} кислот. Времена удержания для 30 м x 0,3 мм капиллярной колонки с химически сшитой неподвижной фазой Carbowax составляет от 2,5 до 48 мин для $C(4:0)$ и $C(22:1)$ соответственно.

Для проведения количественного анализа строят калибровочные графики зависимости логарифмов времени удержания от числа углеродных атомов в цепи. Идентифицируют полученные пики по градуировочному графику или временам удержания соответствующих стандартов с использованием автоматической компьютерной программы обработки хроматографических данных.

Содержание метиловых эфиров жирных C_{4-22} кислот X (мг/кг) в анализируемом сырье вычисляют автоматически или в соответствии с градуировочными графиками по формуле: $X = m_1 \cdot V_1 / m_2 \cdot V_2$, где m_1 – масса метиловых эфиров жирных C_{4-22} кислот, найденная по градуировочному графику, мкг; V_1 – общий объем раствора, из которого взята аликвота для хроматографирования, мл; m_2 – масса анализируемой пробы, г; V_2 – объем аликвоты, вводимой в хроматограф, мкл. Вычисления проводят

до третьего десятичного знака. Окончательный результат округляют до второго десятичного знака.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое значение результатов (X) двух параллельных измерений, расхождение между которыми по абсолютной величине не должно превышать 30 % по отношению к среднему арифметическому при $P = 0,95$.

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания определяемых веществ в любой пробе при допускаемых методикой изменениях влияющих факторов $\pm 0,15X$.

В табл. 12.2 приведены составы жирных кислот основных видов жиров животного происхождения. В табл. 12.3 представлен состав основных жирных кислот растительных масел.

Рассмотрение представленных данных позволяет сделать несколько весьма интересных выводов.

Все известные пищевые жирные кислоты содержатся во всех известных жирах и маслах, однако их содержание варьируется в широких пределах (разница может составлять десять и более раз) в зависимости от происхождения жира, месторасположения взятой пробы по органам и тканям животного и, как показывают исследования, наблюдается зависимость от породы животного и способа кормления.

В табл. 12.2 и 12.3 для некоторых природных субстанций приведены интервалы значений содержания наиболее часто встречающихся жирных кислот. Абсолютные значения величин, указанные в этих интервалах, зависят от упомянутых выше причин. Кроме того, добавляется «фактор эксперимента». Обычно хорошо налаженный газо-хроматографический анализ с капиллярной 30-метровой колонкой и пламенно-ионизационным детектором позволяет установить наличие 15–25 основных пиков жирных кислот, сумма которых составляет 100 %. Для животных жиров характерно высокое содержание (15–30 %) C16:0 пальмитиновой, 10–25 % C18:0 стеариновой и 25–35 % C16:1 ω 9 олеиновой кислот. Сумма указанных кислот может составлять более трех четвертей от общей суммы жирных кислот, входящих в состав жира. Массовая доля некоторых кислот, в частности некоторых из групп ω 3 и ω 6, может составлять доли процента. Это означает, что если приводимый жирно-кислотный состав включает всего несколько жирных кислот, то их указываемая доля будет значительно выше, чем в том же самом анализе с идентифицированными десятками жирных кислот. Т.е. в анализе, позволившем идентифицировать 20–30 компонентов, массовая доля даже самого значимого компонента будет меньше. В состав молочного жира по литературным данным входит более 500 жирных кислот. Аналогичная ситуация по-видимому характерна и для других жиров, однако аналитические возможности реального определения огра-

ничены. Указанные здесь причины необходимо учитывать при сравнении данных, выполненных разными исследователями, в разных условиях.

При расшифровке результатов анализа необходимо учитывать известную проблему хроматографического определения, связанную с затруднениями количественной идентификации двух близко стоящих пиков, которые существенно (в 100 и более раз) различаются по площадям. Эта проблема анализа весьма затрудняет хроматографическую идентификацию *транс*-изомеров, например *транс*-элаидиновая кислота обычно проявляется рядом с большим пиком олеиновой кислоты, разделение которых затруднено.

Анализ данных табл. 12.2 и 12.3 показывает наличие существенных различий в жирно-кислотных составах липидов животного и растительного происхождения. Так, для животных жиров (говяжий, свиной, бараний) характерно высокое содержание С16:0 пальмитиновой (25–30%) и С18:0 стеариновой (15–30%) кислот. Для растительных масел это показатель составляет 1–10%. Для животных жиров характерно наличие важнейшего предшественника простагландинов – С20:4ω6 арахидоновой кислоты (1–4 %), в то время как для растительных продуктов этот показатель в 5–10 раз меньше. Во всех жирах характерным является высокое содержание олеиновой кислоты.

Сопоставление составов жиров диких и домашних животных (кабан – свинья, марал – олень) показывает, что для диких животных более характерно относительно повышенное содержание предельных жирных кислот, что очевидно связано с высокой подвижностью животных в природе. Эта же тенденция проявляется при сопоставлении составов липидов мышц по туше животного – в липидном составе «жестких» мышц, связанных с сухожилиями, обеспечивающими движение, наблюдается аналогичная картина.

Интересным является сравнение состава жиров с жирно-кислотным составом молочного жира (табл. 12.2). В молочном жире после расщепления можно идентифицировать большую долю низших и средних С₄₋₈ жирных кислот (до 5–7 % от суммы кислот), тогда как для животных или растительных жиров, она обычно меньше и не превышает 1–2 %. Молочный жир, как наиболее сбалансированный природой продукт, пригодный для человека, может использоваться в качестве эталона сравнения, к которому следует приближать липидный состав новых пищевых композиций, включающих жиры различного происхождения.

Из табл. 12.2 и 12.3 видно, что в жирах соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот существенно варьирует. Однако важным является соотношение отдельных групп ненасыщенных жирных кислот.

В связи с интенсивными работами по изучению наиболее значимых отдельных полиненасыщенных жирных кислот для продолжительной здоровой жизни человека, многие ученые проводят исследования, связанные с

оценкой соотношения $\omega 6:\omega 3$ жирных кислот. К группе семейства $\omega 6$ относятся прежде всего линолевая C18:2, γ – линоленовая (*цис*-6,9,12-октадекатриеновая) C18:3, арахидоновая (*цис*-5,8,14-эйкозатетраеновая) C20:4. К $\omega 3$ относятся альфа-линоленовая (*цис*-9,12,15-октадекатриеновая) C18:3, *цис*-5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая C20:5, а также достаточно трудно анализируемые химическим путем *цис*-4,8,12,15,21-докозапентаеновая C22:5 и *цис*-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая C22:6 кислоты. Поскольку многие диеты, связанные с основными болезнями века, прежде всего, сердечно-сосудистыми, онкологическими и диабетом, требуют строгой корректировки липидных составляющих пищи, считается, что рост доли $\omega 3$ жирных кислот в составе пищевых и специальных биологически активных композиций может рассматриваться как благоприятный и даже лечебный фактор.

Особое внимание обычно уделяется полиненасыщенным кислотам с определенным положением двойных связей и *цис*-конфигурацией, в первую очередь линолевой, линоленовой, олеиновой, арахидоновой и полиненасыщенных кислот семейства $\omega 3$. Линолевая и линоленовая кислоты не синтезируются в организме человека, арахидоновая синтезируется из линоленовой, поэтому линолевая, линоленовая и арахидоновая кислоты относятся к незаменимым жирным кислотам. Считается, что *омега*-3 полиненасыщенные жирные кислоты способствуют профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, артритов, и даже раковых образований и увеличение содержания этой группы веществ в мясных продуктах позволяет производить мясные изделия, обладающие выраженным лечебно-профилактическим действием.

Соотношение $\omega 6/\omega 3$ является достаточно важным показателем. Считается, что соотношение – должно быть равным 4:1 и даже лучше – 2,5:1, хотя реально для животных жиров $\omega 6/\omega 3$ превышает соотношение (6–14):1.

То есть высокая доля «полезных для предотвращения возрастных болезней жирных кислот группы $\omega 3$ » на фоне остальных непредельных жирных кислот должна быть как можно больше. Отличия в соотношении $\omega 6/\omega 3$ позволяют разрабатывать различные диеты с использованием жиров животного, растительного или морского происхождения. Из табл. 12.2 следует, что введение в пищевые рецептуры мяса морских животных с высоким содержанием $\omega 3$ кислот, по-видимому, будет способствовать получению новых видов продукции лечебно-профилактического действия.

Исследования показывают, что различия в жирно-кислотном составе определяются породами скота, и очевидно существенно зависят от состава и характера применяемых кормов, а также варьируют в зависимости от способа хроматографической идентификации. В литературе обычно приводятся экспериментальные данные, которые являются правомерными для конкретных образцов, однако необходимо также иметь в виду следующее.

При отборе образцов жира даже по объему анализируемого образца, например по туше животного, получаемый состав жирных кислот различается весьма существенно и для достоверного сравнения данных обязательным условием является отбор одинаковых проб.

В последние годы серьезной проблемой становится показатель содержания *цис*- и *транс*- изомеров жирных кислот. Большинство входящих в состав жиров природных жирных кислот является *цис*-формами, в которых заместители расположены в одну сторону по отношению к двойной связи кислоты. В связи с масштабным гидрированием жидких растительных масел с целью придания им твердой консистенции, в качестве сырья поступает большое количество маргаринов и «спредов» с существенно повышенной долей насыщенных жирных кислот и вредных для организма человека *транс*-изомеров.

Считается, что *транс*-жирные кислоты представляют искусственный элемент, содержащийся в наших пищевых продуктах, и следует избегать их активного потребления, поскольку до конца не понятен механизм их воздействия на процесс обмена веществ. Фактически, люди, потребляли *транс*-жирные кислоты всегда, поскольку они являются естественными составляющими в говядине, баранине, сливочном масле, молоке и молочных и др. продуктах. В литературе приводятся данные, что, например, в говяжьем жире и сливочном масле разных производителей содержится до 3–10 % *транс*-жирных кислот.

Как видно из табл. 12.2, содержание основного *транс*-изомера – элаидиновой кислоты в животных жирах составляет 1–2 %. В литературе нет достоверных систематических данных о реальном содержании *транс*-изомеров жирных кислот в животных жирах. Это связано с затруднениями их идентификации, а также высокой стоимостью стандартов сравнения. По имеющейся информации, естественное содержание элаидиновой кислоты в подкожном жире человека равно 2–2,5 % и аналогичный уровень является реальным для животных жиров. По-видимому, предельный суммарный уровень содержания *транс*-изомеров в животных жирах составляет в зависимости от породы животного, его возраста и места отбора пробы по туше до 3–4 % от суммы всех жирных кислот. Это не является проблемой, поскольку животная пища за долгие годы эволюции стала естественной для человека. Указываемая в литературе величина в 7–10 % является, по-видимому, несколько завышенной и объясняется количеством *транс*-жирных кислот, которые удалось идентифицировать в конкретном анализе. Чем больше кислот удастся установить, тем меньше доля конкретной кислоты по отношению к сумме всех жирных кислот.

Проблема с *транс*-изомерами обострилась в последние годы, когда серьезные исследования показали, что в результате массового гидрирования жиров, введения в практику несвойственных северным жителям масел тропического происхождения, потребления маргаринов, а также примене-

ния фритюров с очень высокими температурами масел, содержание *транс*-изомеров в жирах может достигать 50 % и более. Установлено, что длительная термическая обработка жиров приводит к повышению содержания вредных *транс*-изомеров. Проблему *транс*-изомеров сегодня называют одной из существенных причин развития «заболеваний века» у населения, поэтому в странах Евросоюза законодательно требуют указывать на этикетках их содержание. В нашей стране установлен предельный уровень содержания *транс*-изомеров в комбинированных маслах – не более 8 % [11].

Суммируя массовые доли содержащихся жирных кислот можно условно сформулировать показатели биологической ценности жиров (табл. 12.4). Из данных табл. 12.4 видно, что ни один из традиционно применяемых липидных компонентов не является «идеальным», для которого соотношение мононенасыщенных (МНЖК), полиненасыщенных (ПНЖК) и насыщенных (НЖК) обычно принимается равным 1:1:1, или для животных жиров – НЖК:МНЖК:ПНЖК = 3:6:1. Комбинируя жиры, например, обогащая мясные продукты жирами морского происхождения, а также растительными компонентами, можно приблизить характеристики жиров к оптимальным.

Применение различных жиров и масел в составе пищевой продукции делает важной задачу контроля за их составом на предмет возможной фальсификации. Это особенно актуально из-за многочисленных фактов замены более дорогостоящих растительных масел или молочного жира на дешевое растительное сырье. Так для молочного жира границы соотношений массовых долей (W) жирных кислот составляют соответственно: $C_{16:0}:C_{12:0} = 5,8 \dots 14,5$; $C_{18:0}:C_{12:0} = 1,9 \dots 5,9$; $C_{18:1}:C_{14:0} = 1,6 \dots 3,6$; $C_{18:2}:C_{14:0} = 0,2 \dots 0,5$; $\sum C_{18:1} + C_{18:2} / \sum C_{12:0} + C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0} = 0,4 \dots 0,7$. При этом есть корреляции: $WC_{12:0} = (0,47 \pm 0,13) + (0,97 \pm 0,06)WC_{10:0}$; $WC_{14:0} = (4,55 \pm 0,58) + (1,86 \pm 0,22)WC_{12:0}$ [6].

Такие соотношения достаточно условны, но их применение позволяет делать определенные выводы о качестве пищевой продукции. Например, в соответствии с нормативными требованиями (ГОСТ Р 52253-2004) для молочных продуктов на основе молочных жиров установлено, что соотношение $C_{16:0} / C_{12:0}$ должно быть равно 5,8–14,5; $C_{18:0} / C_{12:0} = 1,9 – 5,9$; $C_{18:1} / C_{14:0} = 1,6–3,6$; $C_{18:2} / C_{14:0} = 0,2–0,5$; $C_{18:1} + C_{18:2} / C_{12:0} + C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0} = 0,4–0,7$. При выполнении этих условий делается заключение о том, что продукт выпущен из масла или молочного жира коровьего молока (табл. 12.5). Учитывая высокую долю содержания этих компонентов в животных жирах, установление точных границ соотношений основных жирных кислот представляется достаточно затрудненным.

Таблица 12.2

Содержание основных жирных кислот в жирах, % от суммы жирных кислот

Показатели	Говяжий	Свиной	Кабана	Куриный	Жир молока коровьего	Мара-ла	Анчосов (рыбий)	Тюлений
1	2	3	4	5	6	7	8	9
∑ жирных кислот	94,5	96,3	94,3	95,8	97,2	94,9	98,2	91,8
Насыщенные (НЖК), в т.ч.:	46,7	42,8	48,0	36,9	61,0 (50-70)	38,7	27,7	26,7
C _{4:0} (масляная, бутановая)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	2,9 (2,0–4,3)	<0,1	<0,1	<0,1
C _{6:0} (капроновая, гексановая)	<0,1	<0,1	0,04	<0,1	2,3 (1,5–3,5)	<0,1	<0,1	<0,1
C _{8:0} (каприловая, октановая)	<0,1	<0,2	0,1	<0,02	1,1(1,0–2,5)	0,02	<0,1	<0,1
C _{10:0} (каприновая, декановая)	0,1	0,14	0,27	0,1	2,4 (2,0–3,8)	0,06	<0,1	<0,1
C _{12:0} (лауриновая, додекановая)	0,9	0,2 (0,2–2,0)	0,4	0,3	2,7 (2,0–4,0)	0,05	0,02	0,04
C _{14:0} (миристиновая, тетрадекановая)	3,2 (3,0–3,4)	1,5 (0,8–1,4)	5,6	1,3 (0,8–1,7)	12,4 (8,0–12,0)	1,4 (1,5–4,0)	5,1 (2–7)	7,3 (5–8)
C _{15:0} (пентадекановая, пентадециловая)	0,1	0,06	0,3	0,3	4,7 (4,0–6,5)	0,25	2,38	1,4
C _{16:0} (пальмитиновая, гексадекановая)	25,5 (24–29)	25,1 (27–30)	18,5	22,1 (20–26)	15,3 (15,0–31,0)	13,7 (13–22)	12,5 (9–17)	12,8 (7–13)
C _{17:0} (маргариновая, гептадекановая)	0,5	0,25	1,0	<0,5	4,4 (3,5–6,5)	0,4	2,6	1,06
C _{18:0} (стеариновая, октадекановая)	15,5 (20–24)	13,3 (13–18)	20,9	8,5 (4–9)	6,0 (6,0–13,0)	22,3	4,1 (1–6)	3,0
C _{19:0} (нондекановая)	0,8	1,0	0,2	0,1	4,0 (2,0–6,0)	0,1	0,4	0,2
C _{20:0} (арахиновая, эйкозановая)	0,2	0,3(0,1–0,4)	0,3	3,2	1,1(0,3–1,5)	0,1	0,05	0,2
C _{22:0} (бегеновая, доэйкозановая)	0,3	0,55	0,4	0,3	1,7(0,1–2,0)	0,4	0,15	0,3
Мононенасыщенные (МНЖК), в т.ч.:	41,1	41,9	35,6	46,4	26,9 (25-45)	38,8	55,3	50,9
C _{14:1} (миристолеиновая, цис-9-тетрадеценная)	0,3	0,08	0,08	0,7	1,5 (0,5–1,5)	0,4	<0,1	0,1

Продолжение таблицы 12.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
C ₁₅ :1 цис-10-пентадеценовая	0,1	0,3	0,3	0,7	0,7 (0,1–1,0)	8,2	<0,1	0,1
C ₁₆ :1 (пальмитолеиновая, цис-9-гексадеценовая)	3,0 (2,1–3,0)	2,32 (1,7–2,5)	0,4	5,1 (3–9)	2,6 (0,5–3,5)	1,2(2-6)	9,5 (3-10)	13,5 (12-14)
C ₁₇ :1 цис-10-гептадеценовая	1,1	1,2	0,05	1,2	0,5 (0,1–1,5)	2,9	<0,1	0,8
C ₁₈ :1 n9c (олеиновая, цис-9-октадеценовая)	32,7 (30-42)	34 (30-44)	33,3	36,9 (30-45)	21,1 (20,0 – 32,5)	24,8	28,3 (17-29)	26,0 (25-30)
C ₁₈ :1n9t элаидиновая (транс-9-октадеценновая)	3,2	2,7	0,4	1,4	0,2	0,9	0,2	0,3
C ₂₀ :1 цис-11-эйкозеновая	0,4	0,5 (0,5-1,5)	0,8	0,3	0,2	0,2	12,5 (4-18)	9,8 (9-15)
C ₂₂ :1 n9 (эруковая, цис-13-докозеновая)	0,3	0,8	0,3	0,1	0,1	0,2	4,5 (3-7)	0,3 (0,2-3)
Полиненасыщенные (ПНЖ), в т.ч.:	6,7	11,6	10,7	12,5	9,3	17,4	15,2	14,2
C ₁₈ :2 n6c (линолевая, цис-9,12-октадекадиеновая) w6	3,8 (2-5)	7,8 (7-9)	6,3	9,3 (9-20)	3,4 (3,0–5,5)	14,5	1,6 (1-2)	3,1 (3-9)
C ₁₈ :3 n6 (γ-линоленовая, цис-6,9,12-октадекатриеновая) w6	0,4	0,8 (0,5–2,0)	1,1	0,6	1,4 (0,1–2,0)	0,2	0,35	0,2
C ₁₈ :3 n3 (α-линоленовая, цис-9,12,15-октадекатриеновая) w3	0,3	0,6 (0,5–1,5)	1,4	0,5	0,8(0,1–1,5)	0,2	0,55	1,8 (0,5-2)
C ₂₀ :2 цис-11,14-эйкозодиеновая	0,1	0,2	0,55	0,1	0,3	0,5	0,5 (0,1-0,7)	0,6
C ₂₀ :3 n6 цис-8,11,14-эйкозатриеновая, w6	0,2	0,4	0,3	0,1	0,2	0,1	<0,1	0,1
C ₂₀ :4 (арахидоновая, цис-9,12,15-октадекатриеновая) w6	1,6	1,2 (0,5–2,0)	0,1	0,4	2,5(0,1–4,0)	1,4	1,2 (0,5-1,5)	0,1 (0,01-1)
C ₂₂ :2 цис-13,16,17-докозодиеновая	0,2	0,4	0,6	0,3	0,5	0,3	0,6	0,1
C ₂₂ :6 (цервоновая, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая) w3	0,1	0,2	0,4	1,2	0,2 (0,1–1,5)	0,2	10,6 (5-20)	8,2 (6-10)

Таблица 12.3

Содержание основных жирных кислот в маслах растительного происхождения, % от суммы жирных кислот

Показатели	Низко-олеиновое подсолнечное	Льняное	Соевое	Рапсовое пищевое	Оливковое	Кокосовое	Пальмовое
1	2	3	4	5	6	7	8
∑ жирных кислот	98,0	92,6	93,4	94,2	93,7	97,4	98,0
Насыщенные (НЖК), в т.ч.:	11,3	16,7	12,4	8,5	25,9	87,3	48,9
C _{4:0} (масляная, бутановая)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,1	0,3	<0,1
C _{6:0} (капроновая, гексановая)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,1	0,9 (0,4–0,6)	<0,1
C _{8:0} (каприловая, октановая)	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	6,1(5,0–10,5)	<0,1
C _{10:0} (каприновая, декановая)	<0,1	<0,1	<0,1	<0,01	<0,1	4,4 (4,5–7,8)	<0,1
C _{12:0} (лауриновая, додекановая)	0,1	0,1	0,05	0,2	<0,2	41,7 (41–52)	0,2 (0,1–0,4)
C _{14:0} (миристиновая, тетрадекановая)	0,3	0,4	0,3	0,2	<0,1	16,4 (16–22)	0,6 (0,5–2)
C _{15:0} (пентадекановая, пентадециловая)	0,2	0,3	0,7	0,4	0,5	3,7 (2,0–4,5)	1,1 (0,5–2)
C _{16:0} (пальмитиновая, гексадекановая)	5,9 (5,5–7,5)	6,9 (5–11)	12,2 (9–13)	5,2 (1–7)	16,6(7–21)	7,3 (7–10)	40,6 (38–48)
C _{17:0} (маргариновая, гептадекановая)	0,4	0,3	0,8	0,7	0,1	2,4 (1,5–5)	0,5 (0,1–2)
C _{18:0} (стеариновая, октадекановая)	2,9 (2,7–6,3)	7,4 (2,5–8)	3,5 (2,5–5,6)	1,5 (0,01–3)	1,5 (1,5–4,5)	2,0 (2-5)	4,4 (3-7)
C _{19:0} (нондекановая)	0,2	0,2	0,5	0,1	0,1	1,6 (1,0–3,0)	0,5 (0,1–2)
C _{20:0} (арахиновая, эйкозановая)	0,6 (0,2–0,4)	0,7 (0,4–1)	0,2 (0,1–0,6)	0,1	3,2 (0,2–6)	0,3(0,1–0,5)	0,5 (0,1–1)
C _{22:0} (бегеновая, доэйкозановая)	0,3 (0,5–1,5)	0,3	0,3	0,4	3,3 (2-5)	0,2(0,1–0,5)	0,1 (0,1–1)
Мононенасыщенные, в т.ч.:	36,1	25,55	22,1	63,3	60,87	7,7	40,7
C _{14:1} (миристолеиновая, цис-9-тетрадеценная)	0,2	0,1	0,05	0,2	0,07	0,1 (0,01–0,5)	0,1 (0,1–1)
C _{15:1} цис-10-пентадеценная	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1 (0,01–0,5)	0,1 (0,05–1)
C _{16:1} (пальмитолеиновая, цис-9-гексадеценная)	0,2 (0,1–0,4)	0,05	0,2	0,2	2,4 (0,3–4)	0,3 (0,01–1,5)	0,2 (0,1–0,6)
C _{17:1} цис-10-гептадеценная	0,1	0,05	0,1	0,3	0,2	0,5 (0,1–1,5)	0,1 (0,05–1)

Продолжение таблицы 12.3

1	2	3	4	5	6	7	8
C _{18:1} n9c (олеиновая, цис-9-октадеценовая)	35,1 (14-42, до 70)	24,8 (13-36)	21 (17-27)	56,9 (40-66)	56,8 (55-81)	6,1 (5-10)	39,1 (35-44)
C _{18:1} n9t элаидиновая (транс-9-октадеценная)	<0,1	0,01	<0,1	<0,1	0,1	0,2	0,1 (0,5-2)
C _{20:1} цис-11-эйкозеновая	0,26	0,05	0,2	2,8 (0,1-6)	0,5 (0,5-2)	0,1 (0,01-0,5)	0,9 (0,05-5)
C _{22:1} n9 (эруковая, цис-13-докозеновая)	0,04	0,4	0,3	2,4 (0,01-5)	0,3	0,3 (0,01-0,5)	0,1 (0,05-2)
Полиненасыщенные, в т.ч.:	50,65	50,35	58,9	22,41	6,9	2,4	8,4
C _{18:2} n6c (линолевая, цис-9,12-октадекадиеновая) w6	50,3 (50-75)	18,8 (8-30)	50,1 (49-59)	11,9 (10-25)	4,5 (3-20)	1,4 (1-2,5)	7,5 (6-12)
C _{18:3} n6 (γ-линоленовая, цис-6,9,12-октадекатриеновая) w6	0,2	30,5	6,8 (5-10)	8,2 (7-15)	0,9 (0,3-1,5)	0,2 (0,01-0,5)	0,2 (0,1-0,4)
C _{18:3} n3 (α-линоленовая, цис-9,12,15-октадекатриеновая) w3	0,1	0,5	1,6 (1-5)	1,9 (1-6)	0,4	0,1 (0,01-0,5)	0,1 (0,1-0,4)
C _{20:2} цис-11,14-эйкозадиеновая	0,4	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1 (0,05-2)
C _{20:3} n6 цис-8,11,14-эйкозатриеновая, w6	0,01	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1 (0,01-0,5)	0,2 (0,05-2)
C _{20:4} (арахидиновая, цис-9,12,15-октадекатриеновая) w6	0,01	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1 (0,01-0,5)	0,1 (0,05-2)
C _{22:2} цис-13,16,17-докозадиеновая	0,02	0,05	0,05	0,01	0,3	0,1	0,1 (0,1-2)
C _{22:6} (цервоновая, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновая) w3	0,01	0,1	0,01	0,1	0,2	0,1	0,1 (0,05-2)

Таблица 12.4

Показатели биологической эффективности жиров и масел

Название жиров и масел	Соотношение				
	МНЖК:ПНЖК:НЖК	ПНЖК:НЖК	C _{18:2} :C _{18:1}	C _{18:2} :C _{18:3}	w6: w3
1	2	3	4	5	6
Идеальный жир	1:1:1	0,2—0,4	>0,25	>0,7	4:1
Говяжий	1:0,15:1,1	0,15	0,12	9,5	15:1
Свиной	1:0,28:1,02	0,27	0,2	9,7	12:1
Жир кабана	1:0,3:1,3	0,2	0,18	5,7	4,5:1
Бараний	1:0,16:1,1	0,15	0,12	9,75	7:1
Свиной	1:0,28:1,02	0,27	0,2	9,7	12:1

Продолжение таблицы 12.4

1	2	3	4	5	6
Бараний	1:0,16:1,1	0,15	0,12	9,75	7:1
Куриный	1:0,27:0,8	0,3	0,25	15,5	6:1
Жир кабана	1:0,3:1,3	0,2	0,18	5,7	4,5:1
Жир молока ко- ровьего	1:0,35:2,25	0,15	0,16	2,4	7:1
Тюлений	1:0,28:0,5	0,5	0,12	1,7	1:3
Жир оленя	1:0,18:1,3	0,1	0,15	14	7:1
Жир марала	1:0,4:1	0,4	0,6	65	40:1
Анчоуса (рыбий)	1:0,3:0,5	0,57	0,05	1,5	1:3
Подсолнечное	1:1,4:0,3	4,5	1,4	250	500:1
Соевое	1:2,7 :0,6	4,7	2,4	7,3	35:1
Какао	1:0,3:7	0,05	0,03	8	5:1
Рапсовое	1:0,05:0,1	2,6	0,2	1,5	10:1
Льняное	1:2,0 :0,6	3,0	0,75	0,6	85:1
Оливковое	1:0,1:0,4	0,26	0,08	5	9:1
Пальмовое	1:0,2:1,2	0,17	0,2	37	40:1

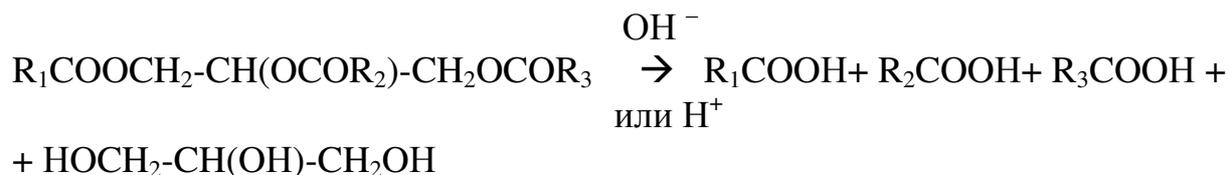
Таблица 12.5

Соотношения жирных кислот в составе важнейших жиров
животного происхождения

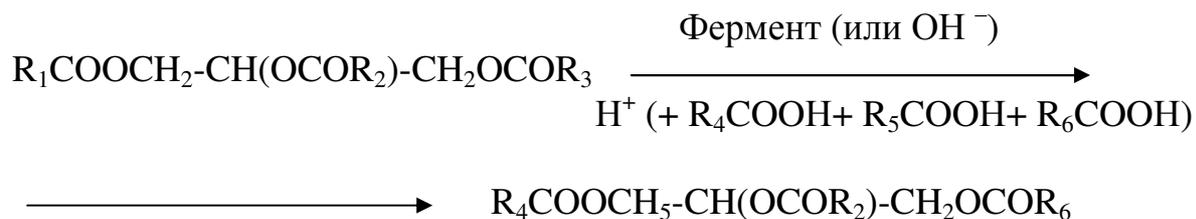
Наименование	Говяжий	Свиной	Бараний	Куриный	Молочный
Соотношение C16:0 / C12:0	25-30	15-150	50-150	60-120	5,8–14,5
Соотношение C18:0 / C12:0	20-30	10-65	15-150	13-30	1,9–5,9
Соотношение C18:1 / C14:0	8-15	20-55	10-18	15-38	1,6–3,6
Соотношение C18:2 / C14:0	0,5-1,6	5,0-11,5	0,9-3,1	5-25	0,2–0,5

Таким образом, можно констатировать, что основным показателем биологической и, соответственно пищевой, ценности жиров является содержание жирных кислот. Их соотношение, поступающее с пищей, влияет на последующее состояние человека. Использование различных видов животного и растительного сырья для производства современных мясных продуктов, позволяет не только варьировать питательную ценность, но и регулировать жирно-кислотную сбалансированность, придавая обычным продуктам функциональные свойства.

Химической основой деградации липидов является процесс расщепления триглицерида (жира) под воздействием кислоты или щелочи с высвобождением трех остатков жирной кислоты и образованием глицерина:



В ряде случаев представляет определенный интерес процесс химической или ферментативной переэтерификации, то есть замены части (или всех) жирных кислот на остатки других биологически более ценных жирных кислот:



Такой процесс повышает биологическую ценность жиров и представляет интерес для разработчиков новых форм пищевых продуктов, косметических и лекарственных средств [1].

Процесс гидролиза липидов различного происхождения можно контролировать кислотно-основным титрованием (методика 12.2).

Методика 12.2. Определение глубины гидролиза жиров. Метод основан на титровании пробы гидролизованного жира раствором щелочи [3].

Аппаратура, реактивы и материалы. Весы лабораторные аналитические с пределом допустимой погрешности взвешивания 0,2 мг. Термостат на 20 – 120 °С. Конические колбы Эрленмейера вместимостью 100 мл. Бюретка на штативе. Нейтрализованная смесь диэтилового эфира и 96 % этанола (2:1). 0,5 М или 1 М спиртовой раствор NaOH. Фенолфталеин, 10 % спиртовой раствор.

Ход определения. Навеску жира в количестве 2 г подсушивают в течение 5 мин при температуре 105 °С, растворяют ее в 50 мл нейтральной смеси диэтилового эфира и 96 %- этанола (2:1). К раствору добавляют 3 – 4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 М раствором NaOH до исчезающей в течение 1 мин слабо-розовой окраски раствора.

Глубину расщепления X (% свободных жирных кислот) в пересчете на олеиновую кислоту рассчитывают по формулам при титровании 0,5 М раствором NaOH: $X = 14,1 \cdot V \cdot K / g$, при титровании 1 М раствором NaOH: $X = 28,2 \cdot V \cdot K / g$, где V – количество раствора NaOH, пошедшее на титрование навески, мл; K – поправка к титру растворов; g – навеска жира, г. Коэффициент 14,1 уточняют экспериментально для конкретного образца жира в зависимости от реального содержания в нем олеиновой кислоты.

Конечным результатом берут среднее арифметическое двух параллельных определений отдельных проб, вычисления проводят до первого десятичного знака. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно при $P = 0,95$ превышать $\pm 0,5\%$.

Стабилизация ферментных систем иммобилизацией БАВ в микронаноэмульсии. Микронаноинкапсулирование – это включение ферментов или биологически активных веществ (БАВ) в частицы с полиэлектролитными оболочками, номинальный размер которых может составлять несколько мкм (микроуровень) или нм (наноуровень).

Микронаноинкапсулирование может рассматриваться как возможный подход к изменению лабильности органических БАВ пищевого и фармацевтического назначения. Включение неустойчивых при нагревании веществ, к каковым относится большинство свободных amino- и жирных кислот, нуклеотидов, сахаридов и др. природных БАВ, в защитные микро- и нанокапсулы может изменить температурную устойчивость этих веществ [2 – 4].

Использование в качестве объектов исследования систем вода/масло (в/м), составленных из растительного (подсолнечное), древесного (талловое), животного (жир говяжий) масла и воды с включением поверхностно-активных стабилизаторов (ПАВ) – смеси карбоксиметилцеллюлозы, альгината натрия и гуаровой камеди, с включением или без 0,1...1,0 % БАВ, позволяет оценить изменение полидисперсности систем.

Для диспергации систем использовали микроизмельчитель РТ2, обеспечивающий перемешивание со скоростью вращения мешалки 2000 и 5000 об/мин, ультразвуковую (УЗ) баню с вводом мощности УЗ 400 Вт/л в течение 1...2 ч и механический дезинтегратор с коаксиальными вращающимися со скоростью 160 об/с дисками с прорезями, обеспечивающими гомогенизацию твердых и жидких сред, а также механохимическую деструкцию крупных БАВ.

Размер частиц оценивали при помощи оптического микроскопа «Jenaval» Carl Zeiss (Германия) – объектив Х40, с использованием видеокомпьютерной системы анализа изображения «ВидеоТест Морфология 4,0», позволяющего наблюдать объекты с минимальным размером частиц >100 нм (0,1 мкм), а также оптическим методом светорассеивания по Рэлею. Для этого полученную по технологии 20 %-ную в/м микроэмульсию разбавляли водой, приготавливая при интенсивном УЗ, 1 ч перемешивании четыре разбавления: аликвота 10 мкл + 20 мл воды (1:2000), + 50 мкл воды (1:5000), + 100 мл воды (1:10000) и далее измеряли экстинкцию приготовленных разбавленных эмульсий при 546 нм на фотометре ЕСОМ (Erpen-dorf, Германия) в кювете с толщиной оптического слоя в 1 см. Расчет по формуле Рэлея.

Теоретическая модель формирования микронанокапсулы состоит из липидной части – талового или растительного масла с инкапсулирован-

ными в нем растворимыми или солюбилизированными БАВ (ферменты, аминокислоты, НЖК) в окружении водного слоя ПАВ. Стабилизация такой системы происходит по классическим законам коллоидной химии – формирование микроэмульсии типа в/м в присутствии ПАВ. При условии образования стабилизирующего слоя ПАВ с последующим химическим сшиванием, по-видимому, возможно формирование температуроустойчивых частиц БАВ. Размер частиц в данном случае обеспечивается типом используемого диспергирующего устройства, а также солюбилизующими свойствами использованных ПАВ.

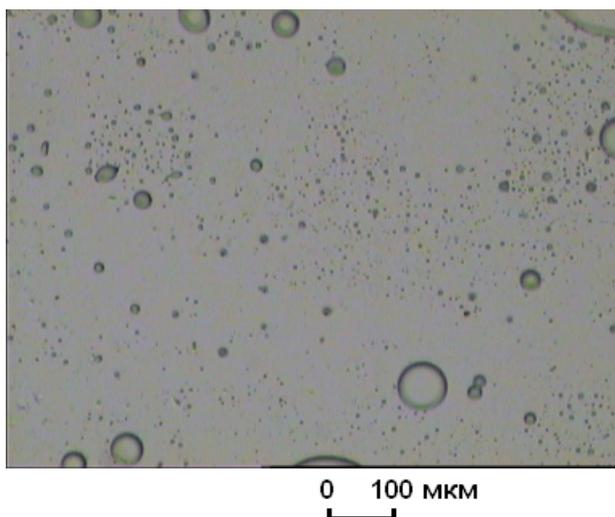


Рис. 12.1. Распределение частиц по размерам в стабилизированной в/м эмульсии таллового масла 25% , 0,5% КМЦ, 0,5% альгината натрия и 0,5% гуаровой камеди после хранения в течение 1 мес при 20 °С

На рис. 12.1 представлена фотография микронаноэмульсии таллового масла, стабилизированного смесью КМЦ с альгинатом натрия и гуаровой камедью. На рисунке видно реальное распределение по размерам микрочастиц. Наночастицы системы на рис. 12.1 не показаны, поскольку световой микроскоп позволяет наблюдать самые мелкие частицы размером >100 нм (затемненный фон рисунка).

В табл. 12.6 представлено распределение частиц по размерам для микроэмульсий разного состава, оцененных по данным обычной световой микроскопии.

Стабилизированные эмульсии, описанные в табл. 12.6, отличаются распределением частиц, имеющих размеры от 0,1 до 200 мкм, которое в свою очередь, зависит от эффективности применяемого диспергирующего устройства. Стабилизация системы использованной синергетической комбинацией ПАВ позволило получить реологически устойчивые системы, сохраняющие более 95 % первоначального распределения размеров частиц в течение 3...6 мес.

Для оценки среднего диаметра частиц микронаноэмульсии, находящихся в нанобласти можно использовать способ Рэлея [9].

По Рэлею при условии достаточно разбавленных систем размер частиц можно определять двумя методами: нефелометрическим и турбидиметрическим. По первому методу измеряют непосредственно интенсивность света, рассеянного под некоторым углом к падающему лучу света. По второму методу измеряют ослабление интенсивности света при прохождении его через дисперсную систему.

Таблица 12.6

Полидисперсность видимой части 20 %-ной микронаноэмульсии
в воде в смеси со стабилизаторами
(1 % альгината натрия, 1 % КМЦ и 1 % гуаровой камеди)

Наименование	Средний диаметр, мкм (% от суммы частиц)				
	0,1...1,0	1,0...2,0	2,0...10,0	10,0...40,0	40... ...200
Масло подсолнечное, миксер 5000 об/мин, 1 ч	(22 %)	(22 %)	(40 %)	(13 %)	(3 %)
Масло подсолнечное, ультразвук, 200 Вт/л, 2 ч	(37 %)	(30 %)	(20 %)	(12 %)	(1 %)
Масло талловое, миксер, 5000 об/мин, 1 ч	(25 %)	(25 %)	(31 %)	(14 %)	(5 %)
Масло талловое, ультразвук 400 Вт/л, 2 ч	(47 %)	(23 %)	(15 %)	(15 %)	(5 %)
Масло талловое, дезинтегратор, 1 ч	(41 %)	(35 %)	(20 %)	(3 %)	(1 %)
Жир говяжий, миксер, 2000 об/мин, 2 ч	(22 %)	(22 %)	(40 %)	(13 %)	(3 %)
Жир говяжий, Ультразвук 200 Вт/л, 2 ч	(45 %)	(26 %)	(21 %)	(7 %)	(1 %)
Жир говяжий, дезинтегратор, 1 ч	(50 %)	(20 %)	(24 %)	(5 %)	(1 %)

Последний метод, называемый турбидиметрическим, использован в данной работе. Он основан на том, что при прохождении света через коллоидный раствор, содержащий малые прозрачные частицы, поглощение практически отсутствует и ослабление интенсивности падающего света равно полной интенсивности света, рассеянного коллоидным раствором во всех направлениях (полное светорассеяние). Для систем, содержащих час-

тицы с размерами значительно меньше длины световой волны, величина полного светорассеяния подчиняется уравнению Рэля. В этом случае, измерив с помощью фотометра ослабление интенсивности падающего света и воспользовавшись «уравнением Рэля», можно определить средний размер частиц золя.

Соотношение между способностью системы рассеивать свет и измеряемой с помощью фотометра или колориметра оптической плотностью раствора равно:

$$D = \lg (I_0 / I_{\Pi}) \quad (12.1)$$

где I_0 и I_{Π} – интенсивности падающего и прошедшего света.

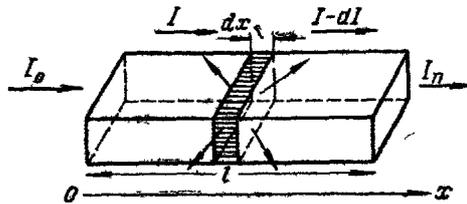


Рис. 12.2. Схема, поясняющая ослабление интенсивности света вследствие светорассеяния слоем коллоидного раствора с наночастицами

Рассмотрим изображенную на рис.12.2 схему, поясняющую ослабление интенсивности света в результате рассеяния его слоем коллоидного раствора толщиной l при сечении в 1 см^2 .

Для элементарного слоя раствора (на рис. 12.2 он заштрихован) толщиной dx ослабление интенсивности света dI , происходящее в результате его рассеяния, будет равно:

$$-dI = \tau I dx \quad (12.2)$$

где I – интенсивность света, падающего на элементарный слой; τ – коэффициент, характеризующий способность системы рассеивать свет; он называется мутностью.

Интегрирование уравнения (12.2) от $x = 0$ до $x = l$ дает:

$$\ln (I_0 / I_{\Pi}) = 2,3 = \lg (I_0 / I_{\Pi}) = \tau l \quad (12.3)$$

Как видно из этого уравнения, мутность измеряется в см^{-1} . Эта величина, обратная расстоянию, которое должен пройти поток света, чтобы его интенсивность уменьшилась в e раз.

Исходя из уравнений (12.1) и (12.3) можно установить связь между мутностью и оптической плотностью:

$$\tau = 2,3 D / l \quad (12.4)$$

Мутность системы τ можно выразить через интенсивность рассеянного света I_p . Очевидно, что для 1 см³ дисперсной системы справедливо равенство $I_n = I_o - I_p$ основанное на законе сохранения энергии. Тогда из уравнения (12.3) при $l = 1$ см следует:

$$\tau = \ln (I_o / I_n) = \ln [I_o / (I_o - I_p)]$$

Учитывая, что $I_p \ll I_o$ и пользуясь разложением в ряд, отбросив при этом бесконечно малые величины второго порядка малости, можно получить:

$$\ln [I_o / (I_o - I_p)] \approx \ln [1 + I_p / I_o] \approx I_p / I_o$$

Следовательно:

$$\tau = I_p / I_o \quad (12.5)$$

Исходя из уравнения (12.5) мутность численно равна световой энергии, рассеиваемой 1 см³ раствора во всех направлениях, при интенсивности падающего света, равной единице. Для суспензии со сферическими частицами уравнение Рэлея можно написать в виде:

$$I_p / I_o = 24\pi^3 / \lambda^4 \cdot [(n_1^2 - n_2^2) / (n_1^2 + n_2^2)]^2 \cdot c_{об} \cdot v \quad (12.6)$$

где I_p – полная интенсивность света, рассеянного 1 см³ системы в секунду; λ – длина волны света, см; n_1 – показатель преломления дисперсной фазы; n_2 – показатель преломления дисперсионной фазы; $c_{об}$ – объемная доля дисперсной фазы; v – объем частицы, см³.

Пользуясь уравнениями (12.5) и (12.6), размер частиц можно вычислить по уравнению

$$v = (\tau / c_{об}) \cdot 1 / k, \quad (12.7)$$

$$\text{где } k = 24\pi^3 / \lambda^4 \cdot [(n_1^2 - n_2^2) / (n_1^2 + n_2^2)]^2 \quad (12.8)$$

Уравнение Рэлея справедливо лишь для разбавленных систем ($C \ll 0,01$ мг/л), так как оно не учитывает вторичного рассеяния света и взаимодействия между частицами. Поэтому для определения размера частиц следует найти τ для ряда растворов с разной кратностью разбавления и экстраполировать величину $\tau / c_{об}$ до $c_{об} = 0$.

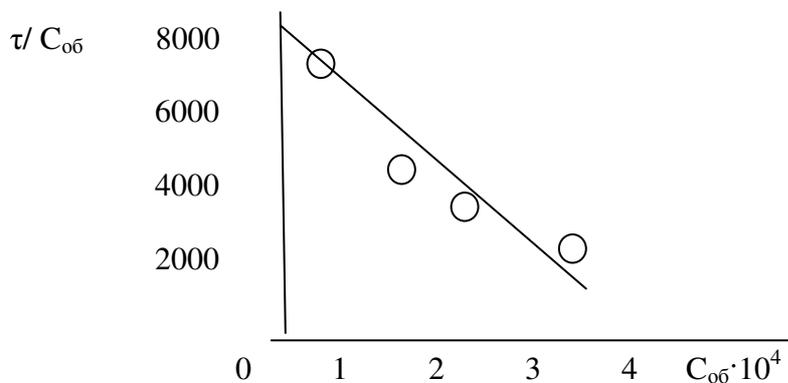
$$[\tau] = \lim (\tau / c_{об}) c_{об} \rightarrow 0 \quad (12.9)$$

При анализе полидисперсных систем, подчиняющихся уравнению Рэлея, вычисляется средневесовой объем частиц, а достаточно надежные результаты измерения светорассеяния турбидиметрическим методом могут быть получены для систем со сравнительно большими значениями мутности порядка 10^{-2} см^{-1} . В табл. 12.7 показаны расчетные соотношения, по которым построена зависимость $\tau/C_{об}$ от $C_{об}$ (рис. 12.3). Из данных рис. 12.3 видно, что наблюдается некоторая нелинейность данных, т.е. система подчиняется уравнению Рэлея условно и $\tau/C_{об} = 8000 \dots 12000$ при $C_{об} \rightarrow 0$.

Таблица 12.7

Разбавления микроэмульсий модельной системы подсолнечное масло/вода для оценки дисперсности микронаноэмульсий

Разбавление	D_{546}	$C_{вес}, \text{ г/см}^3$	$C_{об}, \text{ см}^3 \text{ полимера} / \text{ см}^3 \text{ системы}$	$\tau, \text{ см}^{-1}$ $\tau=2,3 D_{546}l$	$\tau/C_{об}$
Вода	0,137				
1:10000	0,160	0,0000428	0,0000476	0,368	7731
1:5000	0,174	0,000086	0,0000952	0,400	4202
1:3000	0,190	0,000145	0,000159	0,434	3018
1:2000	0,259	0,000251	0,000238	0,596	2504

Рис. 12.3. Зависимость $\tau/C_{об}$ от $C_{об}$

Экстраполяционное значение $\tau/C_{об}$ при $C_{об} \rightarrow 0$ может быть принято равным 10000, очевидно оно составляет $(10 \pm 2) \cdot 10^3$.

Подставляя полученные значения в уравнение 12.8, находим величину k : $k = 24\pi^3 / \lambda^4 \cdot [(n_1^2 - n_2^2) / (n_1^2 + n_2^2)]^2$, где λ – длина волны света, $\lambda = \lambda_{вак} / n_2 = 546 \text{ нм} / 1,5 = 365 \cdot 10^{-9} \text{ м}$; n_1 – показатель преломления дисперсной фазы, равный 1,333; n_2 – показатель преломления дисперсионной фазы, принимаем равным 1,5 (поскольку обычно величина $n_D^{20} = 1,3 \dots 1,7$); $c_{об}$ – объемная доля дисперсной фазы; v – объем частицы, см^3 .

$K = 24\pi^3 / \lambda^4 \cdot [(n_1^2 - n_2^2) / (n_1^2 + n_2^2)]^2 = 24 \times 3,14^3 / (365 \cdot 10^{-9})^4 \times [(1,333^2 - 1,5^2) / (1,333^2 + 1,5^2)]^2 = (24 \times 31) / 1,77 \cdot 10^{-26} \times [(-0,48) / (4,02)]^2 = (24 \times 31) / 1,77 \cdot 10^{-26} \times 0,01 = 4,2 \cdot 10^{26} \text{ м}^{-4}$.

Рассчитываем объем глобулы v по уравнению 1.7, подставив в него значение $\tau / C_{об}$ (10000) при $C_{об} \rightarrow 0$:

$$v = (\tau / c_{об}) \cdot 1 / k = (10000 \text{ см}^{-1}) \cdot 1 / 42 \cdot 10^{18} (\text{м}^{-4}) = 0,023 \cdot 10^{-18} \text{ м}^3.$$

Рассчитываем радиус глобулы в эмульсии $r = \sqrt[3]{3v/4\pi}$:
 $r = \sqrt[3]{3 \cdot 0,023 \cdot 10^{-18} / 4 \cdot 3,14} = \sqrt[3]{3,8 \cdot 10^{-7}} = 1,5 \cdot 10^{-7} = 0,12 \cdot 10^{-6}$, т.е. по расчету средний диаметр частицы в модельной эмульсии, полученной в условиях опыта из растительного масла в присутствии стабилизаторов (альгинат, камедь) и воды, составляет в среднем тоже около 0,1 мкм (100 нм).

По данным световой микроскопии основная масса частиц в полученных эмульсиях имеет размер от 0,1 до 10 мкм (табл. 12.6). Однако, суммарная доля частиц меньших размеров 0,1...2 мкм также весьма значительна.

Оценка размеров наночастиц в полученных микронаноэмульсиях показывает, что их средний размер по данным светорассеивания, находится в пределах от 45 до 120 нм.

Введение в систему 0,1 % водорастворимых аминокислот, ферментов и 1 % жирных кислот НЖК позволило получить иммобилизованные формы этих БАВ. По данным высокоэффективной жидкостной хроматографии, использованной для количественного определения содержания БАВ [9 – 10], в липидной фазе находится практически 100 % липидных компонентов и более 90 % водорастворимых веществ, что, по-видимому, обусловлено высокой эффективностью солубилизации БАВ выбранной системой стабилизации.

Таким образом, полученные микронаноэмульсии содержат достаточно широкий спектр частиц размером от 45 нм до 200 мкм, а распределение по размерам в системе зависит от способа гомогенизации и типа ПАВ.

Список литературы

1. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Биохимическая переработка жиров и масел в липидные композиции с улучшенными биологическими и физико-химическими свойствами // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38. – № 5.
2. Иванкин А.Н., Илюхина Р.В. О биотехнологической переработке низкоценных животных жиров // Мясная индустрия. – 2001. – № 5.
3. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Бердугина А.В. Основы биохимической переработки животного и комбинированного сырья. – М.: ВНИИМП, 2003. – 114 с.
4. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: Изд-во ВНИИМП, 2002. – 402 с.
5. Макаручук Т.Л., Подрушняк А.Е., Коваль А.В. Проблемы качества и безопасности новых масло-жировых продуктов // http://medved.kiev.ua/arh_nutr/art_2003/n03_1_7.htm
6. Рудаков О.Б., Пономарев А.Н., Полянский К.К., Любарь А.В. Жиры. Химический состав и экспертиза качества. – М.: ДеЛи принт, 2005. – 360 с.
7. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Переработка органических отходов. – М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2006. – 378 с.
8. Сергеев, Г.Б. Нанохимия. – М.: КДУ, 2007. – 336 с.

9. Хвыля С.И., Иванкин А.Н., Евдокимов Ю.М., Прошина О.П. Наномикроэмульсии как объекты инкапсулирования природных биологически активных веществ// Практик. – 2009. – № 3. – С.16–22.
10. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Горбунова Н.А. Методы оценки размера частиц пищевых микронаноэмульсий// В Сб. материалов Всероссийской науч.-практ. конф. «Современные биотехнологии переработки с/х сырья и вторичных ресурсов». – Углич: ГНУ ВНИИМПС Россельхозакадемии, 2009. – С. 119–123.

Глава 13

Технические жиры. Практическое значение гидролизатов липидной природы. Панкреатические липазы

Жиры – это глицериновые эфиры высокомолекулярных жирных кислот. Однако, помимо собственно глицеридов, природные жиры содержат некоторое количество примесей. В растительных жирах их содержание не превышает нескольких процентов, тогда как в животных жирах содержание примесей часто составляет более 10 %. Количественный и качественный состав примесей довольно разнообразен и зависит от свойств жира, сырья из которого его получают, и метода извлечения. Нормальными примесями считают: свободные жирные кислоты, воду, липоиды, липохромы, хромогенные, слизистые, белковые вещества, смолы, углеводороды, эфирные масла, ферменты, витамины и высокомолекулярные спирты жирного ряда [1]. Кроме нормальных примесей в жирах могут находиться и случайные вещества, получающиеся при разложении жира или жировой ткани, при добывании жира или при хранении жирового сырья.

Природные жиры имеют окраску от светло-желтой до темно-коричневой, характерный запах и вкус в каждом отдельном случае. Удельный вес большинства жиров изменяется от 0,912 до 0,940. Жидкие жиры отличаются разной вязкостью, при повышении температуры резко уменьшается. Твердые жиры плавятся при температуре ниже 60 °С. Теплоемкость жиров непостоянна и увеличивается при повышении температуры. В открытых емкостях жиры сгорают с образованием большого количества копоти. В воде жиры не растворяются, при активном перемешивании могут образовывать с ней эмульсии, чему способствуют некоторые находящиеся в них примеси. Жиры легко растворяются в различных органических растворителях: хлороформе, серном и петролейном эфире, сероуглероде, ацетоне и четыреххлористом углероде. В спиртах жиры растворяются мало. Растворенный в жирах воздух с течением времени обедняется кислородом, что вызвано окислением ненасыщенных кислот жира. Характерной особенностью жиров является их способность растворять, поглощая из воздуха, и удерживать различные вещества, обуславливающие запах. Коэффициент рефракции жиров в значительной степени зависит от состава и температуры жира. Он существенно изменяется при окислении и

полимеризации жиров. Электропроводность жиров крайне мала. Она растет с повышением температуры и у окисленных жиров больше, чем у природных.

Мясоперерабатывающая промышленность как любое крупнотоннажное производство не может обходиться без образования значительных количеств техногенных отходов. Необходимо отметить, что отходы данного направления пищевой промышленности представляют угрозу не только с точки зрения экологической обстановки, но и могут являться возможным источником возникновения инфекционных заболеваний различной природы [2].

Вследствие увеличения потребности населения в мясной продукции, мясоперерабатывающие комбинаты наращивают объемы выработки говядины, свинины, баранины, мяса птицы, что неизбежно приводит к увеличению количества отходов.

Прежде всего, к ним относятся такие органические отходы, как навоз, обрезь мяса и крошка, содержимое желудков и кишок, кровь, кишечный шлам и др. Среди перечисленного особо можно выделить жиросодержащие отходы [4, 5].

Они создают ряд трудностей не только с экологической точки зрения, но и мешают нормальному функционированию очистных сооружений мясокомбинатов, поскольку способствуют образованию плотных отложений на стенках труб и резервуаров. Биомасса, собираемая в отстойниках очистных сооружений мясокомбинатов, состоит на 40–45% из жира-сырца, на 30–32% белоксодержащих тканей и на 20–25% из примесей иного состава. Выход белково-жировой массы при убое 1000 голов крупного рогатого скота и 1000 голов свиней разной упитанности в среднем составляет 9,3 т на каждую партию животных [6, 7].

Составляющими жира-сырца являются природные органические соединения. Нерастворимым в воде компонентами в основном являются сложные эфиры высших карбоновых кислот и глицерина, к жирорастворимым относят витамины, кофакторы, стерины, воска, а также пигменты, состоящие из каротиноидов, хлорофиллов, витаминов и кофакторов. Природные жиры содержат смешанные триглицериды, в состав которых входят различные остатки карбоновых кислот. В формировании триацилглицеридов может участвовать до 400 остатков кислот различного строения. Высшие карбоновые кислоты, обнаруженные в липидах, часто содержат кратные связи и оксигруппы в углеводородном радикале. Поэтому состав жировых отходов мясоперерабатывающей промышленности может быть неоднороден и очень сложен, что является одной из неразрешимых проблем, встающих при использовании подобных отходов в качестве сырья для различных отраслей [8, 9].

Основным потребителем жиров и жироподобных веществ является пищевая промышленность, поскольку жиры являются незаменимыми фак-

торами питания [10].

Одним из наиболее перспективных видов сырья в биотехнологии являются сточные воды предприятий масложировой промышленности. Такие стоки различаются большим разнообразием, как по составу компонентов, так и по их концентрации. Основными загрязняющими компонентами, кроме механических примесей, являются нейтральный жир, жирные кислоты в виде солей, углеводороды, глицерин, минеральные соли, красящие вещества.

Таблица 13.1

Содержание эфирорастворимой фракции в жировых отходах масложировой промышленности

Вид производства	Содержание эфирорастворимой фракции, мг/л	Норма сброса, мг/л
Маслоэкстракционное	200	50
Гидрогенизационное	100 – 200	25
Рафинационное	До 20000	50
Маргаринное	7000	50
Майонезное	16000–20000	50
Мыловаренное	5000–10000	500
Глицерина и жирных кислот	150	25

Содержание веществ жирового характера в сточных водах характеризуется общим содержанием веществ, растворимых в диэтиловом эфире. В табл. 13.1 приведены данные о содержании эфирорастворимой фракции в жировых отходах предприятий масложировой промышленности [10].

Из табл. 13.1 видно, что концентрация жировой фракции в сточных водах предприятий масложировой промышленности во много раз превышает норму сброса.

Сточные воды мясокомбинатов в процессе производства загрязняются жиром, кровью, навозом, кусочками тканей животных, волосом, осколками костей и др. органическими веществами животного происхождения. Жировые примеси в сточной воде находятся в виде отдельных сравнительно крупных твердых частиц, в эмульгированном и растворенном состоянии. В общем стоке мясокомбинатов с учетом работы локальных очистных сооружений концентрация эфирорастворимой жировой фазы составляет 200 мг/л, что превышает норму сброса в четыре раза.

Поэтому необходимо очищать сточные воды перед их сбросом в канализацию, а извлеченные жировые и другие отходы рационально использовать с целью создания полезных продуктов. Из жировых отходов возможно получение свободных жирных кислот, служащих для производства различных видов мыл, высших жирных спиртов, алкидных и глифталевых смол, замасливателей для шелковых, шерстяных и хлопчатобумажных тканей; получение глицерина, необходимого для производства пластиче-

ских масс, специальных лаков и красок, пищевых, парфюмерно-косметических и фармацевтических продуктов [11]; возможно получение жиросодержащих добавок с повышенной биологической ценностью для пищевых композиций и микробиологических сред [12–15]. К тому же, жировые отходы могут служить дешевым субстратом для культивирования микроорганизмов, что дает возможность получить конкурентноспособную высокобелковую кормовую добавку [15].

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что гидролизаты липидной природы, полученные на основе сырья различного происхождения, могут найти применение в различных сферах деятельности. Однако способы переработки микробного, животного и растительного сырья в гидролизаты, естественно, имеют свои особенности.

Технологические приемы переработки жиросодержащих отходов. В настоящее время существует несколько методов, позволяющих утилизировать или перерабатывать жировые отходы. Они могут быть разделены на шесть основных типов: механические, физико-химические, электрохимические и электрофизические, биохимические и микробиологические.

Механические способы предшествуют другим способам и предусматривают очистку сточных вод путем отстаивания, процеживания, центрифугирования и фильтрования. Эффективность удаления жира в жироловушках, обеспечивающих скопление жиров на поверхности, не более 50 %.

К физико-химическим методам относят: экстракцию, различные виды флотации, сорбцию, коагуляцию, аэрацию, ионный обмен. Они применяются как самостоятельно, так и в сочетании с другими методами.

Примером физико-химической переработки жировых отходов с последующим получением целевого продукта может служить фракционирование. Фракционирование расплавленного жира при медленном охлаждении основано на кристаллизации жира в условиях контролируемой температуры, обеспечивающей выделение высокоплавкой фракции в виде кристаллического осадка, отделяемого от жидкой фазы прессованием, центрифугированием, вакуум-фильтрацией или декантацией [16]. Однако применение данного способа весьма ограничено, поскольку он требует больших производственных площадей и длительного времени.

Более быстрым является способ кристаллизации высокоплавких компонентов смеси жирных кислот из летучих растворителей. Такое разделение основывается на том, что по мере снижения насыщенности или молекулярной массы повышается растворимость глицеридов в органических растворителях, таких как ацетон, метанол, пропанол, фурфурол, гексан. Глицериды и жирные кислоты разделяются на фракции различной степени насыщенности и с различной длиной цепи углеродных атомов. Та-

ким образом, возможно получение фракций, обладающих высокой биологической ценностью вследствие повышенного содержания ненасыщенных компонентов и жирных кислот. Однако необходимость значительных капитальных затрат для внедрения, а также использование больших объемов органических растворителей ограничивает применение рассмотренного способа [17, 18].

Отмеченных недостатков лишен способ фракционирования жиров путем диспергирования их в воде или в водном растворе эмульгирующего агента. При диспергировании жиров в воде жидкая фаза удаляется с поверхности кристаллов или затвердевших компонентов и заменяется водой. Образующаяся при этом дисперсионная среда состоит из сольватированных компонентов, а продукты, оставшиеся жидкими, составляют дисперсную фазу. Эту смесь можно разделить осаждением, фильтрацией, центрифугированием. Более легкую фракцию, содержащую компоненты с низкой температурой плавления, освобождают от воды и подвергают обычной обработке. Водную эмульсию разрушают, нагревая до температуры плавления твердых компонентов, таким образом, получают фракцию с самой высокой температурой плавления [16, 19].

Существует много способов ведения гидролиза жиров. Это и щелочное омыление жиров, и кислотный гидролиз с использованием гетерогенных катализаторов – оксидов металлов и безреактивный гидролиз с использованием жирорасщепляющих ферментов, в частности липазы. Но широкого применения в промышленных масштабах для получения целевых продуктов – глицерина и жирных кислот, многие методы не получили в силу их неэкономичности, плохого качества образующихся веществ, затруднения разделения и утилизации полученной смеси. Так, глицерин и жирные кислоты, полученные сернокислым гидролизом, характеризуются низким выходом и плохим качеством, метод с использованием гетерогенных катализаторов, таких как оксиды кальция, магния и цинка, является слишком громоздким и не обеспечивает хорошего качества глицерина и жирных кислот. Ферментативный гидролиз требует больших расходных норм препарата фермента высокой стоимости, большой длительности процесса, к тому же он неприменим для гидролиза высокоплавких жиров.

Наиболее прогрессивным методом на сегодняшний день является безреактивный метод гидролиза жиров, осуществляемый при температуре 200 – 225 °С и давлении 2,0 – 2,5 МПа без применения катализаторов. Способ обеспечивает получение высококачественных продуктов гидролиза с высоким выходом. На зарубежных предприятиях работают установки под давлением 4 МПа и температуре до 250 °С [20]. Безреактивный гидролиз проводят непрерывно и периодически. В случае периодического процесса мощность автоклавов используется на 60 %, в то время как 40 % времени уходит на выполнение различных операций: загрузка автоклава, нагрев до температуры реакции, отстаивание, удаление из аппарата продуктов гид-

ролиза. Удаление или полное исключение этих операций с целью повышения производительности оборудования для гидролиза жиров возможно лишь при непрерывном ведении гидролиза. Степень гидролиза в обоих процессах достигает 96 %.

Предлагается еще один способ переработки жировых отходов, основанный на проведении стадии щелочного гидролиза и окисления. В рамках данной технологии предусматривается предварительное увлажнение жира до общей влажности 85–95%. Затем предполагается проведение щелочного гидролиза путем защелачивания до рН 12,0–14,0. Подщелоченную массу нагревают до температуры 160–200 °С с целью интенсификации процесса гидролиза и проводят окисление путем пропускания кислорода при давлении 1,4–2,4 МПа в течение 0,5–3 ч. Данный способ обеспечивает безотходную переработку отходов и получение нетоксичного продукта. Однако данный способ не позволяет повысить биологическую ценность жиров, а лишь осуществляет их частичную деструкцию [21].

Необходимо отметить, что при наличии указанных технологий физико-химических путей переработки жиросодержащих отходов ни одно производство до сих пор не налажено в промышленных масштабах, что позволяет сделать вывод о низкой рентабельности данных технологий, а также неостребованности предложенных продуктов [19].

На современном этапе развития биотехнологии предлагаются методы, позволяющие осуществлять биологическую деструкцию жировых отходов, как в аэробных условиях, так и путем их анаэробного сбраживания.

Одним из биотехнологических путей переработки жиросодержащих отходов является сбраживание молочнокислыми бактериями. Данный способ включает в себя термическую обработку сырья, ферментативный гидролиз, при необходимости предлагается дополнительно осуществлять фильтрацию [22]. Недостатком этого способа является необходимость осуществления нескольких стадий, а также использование ферментного препарата, что существенно повышает себестоимость конечного продукта.

Также предлагается анаэробное сбраживание отходов с целью получения смеси газов – биогаза. Остаток, образующийся при такой переработке отходов, может быть использован в качестве удобрения. Его состав зависит от состава исходного сырья, загружаемого в реактор. В благоприятных для анаэробного сбраживания условиях обычно разлагается около 70% органических веществ. Главным сдерживающим фактором для внедрения данной технологии на предприятиях, несмотря на все плюсы, являются значительные капитальные затраты [20–22].

В настоящее время при очистке сточных вод от жировых отходов и взвесей осадок, составляющий 1,7 % от расхода воды, предприятия сбраживают в осветлителях-перегнивателях и в дальнейшем направляют на иловые площадки.

В основе микробиологического пути биodeградации жиров лежит

способность ряда культур микроорганизмов секретировать в окружающую среду фермент липазу, который осуществляет катализ гидролиза липидов. Биодegradация жира и его ассимиляция микроорганизмами начинается с воздействия этого фермента, выделяемого клетками в среду [21 – 22].

В настоящее время предлагается ряд методов очистки техногенных стоков от жиродержащих отходов путем комбинирования физико-химического и микробиологического окисления. В одном из способов предлагается использовать в качестве промежуточного этапа биологическое окисление с помощью биопрепаратов, которые включают в себя живые культуры микроорганизмов, а также комплекс ферментов. Подобное воздействие позволяет сократить время очистки, а также существенно снизить экономические затраты. Данная технология предусматривает последующее окисление биомассы перманганатом калия и перекисью водорода. Необходимо отметить, что в настоящее время предлагаются технологии, позволяющие осуществлять биологическую деструкцию, как в аэробных условиях, так и в анаэробных [23].

Перспективным направлением переработки жиродержащих отходов является использование технических препаратов липаз.

Липазы – это ферменты класса гидролаз, катализирующих расщепление триглицеридов до глицерина и свободных жирных кислот. У человека и животных липазы содержатся в тканях, а также в соке поджелудочной железы.

Липаза, по мнению многих ученых, является гетерогенным белком, имеющим небелковый компонент. Существует несколько точек зрения на химическую природу небелковой составляющей фермента. Согласно одной из версий небелковый компонент имеет липидную природу, при удалении которого липаза может потерять активность [24]. Липидный компонент необходим для того, чтобы фермент мог функционировать в гетерогенной среде. Участок узнавания может конструироваться у некоторых липаз путем объединения белковой части фермента с небелковыми фрагментами или полипептидами. Специфичность же липолитических ферментов к физическому состоянию субстрата в ряде случаев связана с их надмолекулярной структурой. По мнению Джагера липазы, как правило, являются гликопротеинами и имеют относительно небольшую молекулярную массу в интервале 22 – 60 кД.

Отсутствие симметрии в пике липазы свиньи, выявляемое при хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, свидетельствует о существовании более чем одной разновидности фермента. По данным диск-электрофореза в самых чистых препаратах липазы, полученных гелефильтрацией через сефадекс, также имеются два компонента. Эти две формы можно четко разделить хроматографией на анионообменнике КМ-целлюлозе [25]. Они появляются последовательно при увеличении градиента рН от 5,0 до 5,2. Первая молекулярная форма названа L_a , т.к. она бо-

лее кислая, вторая – более щелочная форма – L_b. Обе формы обладают одинаковой удельной активностью, равной примерно 4500 ед. (по оливковому маслу). После лиофилизации они стабильны в течение длительного времени при хранении в холодильнике. Поскольку обе формы получены из одной выделенной на сефадексе фракции, то они, очевидно, должны иметь почти одинаковый молекулярный вес; по данным гель-фильтрации через сефадекс G-200 он составляет около 45000, а по данным ультрацентрифугирования 50000.

Липолитическую активность ферментного препарата можно оценить по методике 13.1.

Методика 13.1. Определение липолитической (липазной) активности фермента.

Реактивы и материалы. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания до 200 г не ниже 1-го класса точности и пределом допустимой погрешности 0,2 мг. Пробирки с притертыми пробками вместимостью 10 см³. Колбы со шлифом вместимостью 50 – 1000 мл. Гомогенизатор типа микроразмельчителя тканей РТ-2. стакан или колба вместимостью 1 дм³ с мешалкой и баней для подогрева. рН-метр. Мерная колба вместимостью 1 дм³. Устройство для фильтрования растворов через бумажный фильтр. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 20–100 °С. Колба Эрленмейера вместимостью 200 мл. Бюретка на 50 – 100 мл.

Соляная кислота, хч, 0,1 М раствор. Поливиниловый спирт. Натрия гидроксид, чда, 0,05 М и 0,1 М раствор. (Трисгидроксиметил)аминометан. Натрия хлорид хч. Фенолфталеин чда, 1 % спиртовой раствор. Масло оливковое. Этанол 95 % ректифицированный.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА. 20 г поливинилового спирта смешивают с 800 мл воды в течение 30 мин, добавляют 0,5 мл 0,1 М раствора HCl, термостатируют смесь при перемешивании в течение 1 ч при 90 °С, охлаждают до комнатной температуры и устанавливают рН раствора 7,0 добавлением 0,1 М раствора NaOH. Раствор количественно переносят в мерную колбу, доводят объем до 1 дм³ и фильтруют через бумажный фильтр. Срок хранения раствора 1 месяц.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА СУБСТРАТА. Смесь из 16 мл оливкового масла и 24 мл раствора поливинилового спирта перемешивают в стакане размельчителя тканей при 5000 об/мин в течение 15 мин. Субстрат готовят непосредственно перед использованием и не хранят.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ТРИС-HCl БУФЕРНОГО РАСТВОРА (рН 9,0). 0,6060 г трис(гидроксиметил)аминометана и 2,34 г натрия хлорида растворяют в 800 мл дистиллированной воды, доводят рН раствора до 9,0 добавлением 0,1 М раствора HCl и доводят объем раствора до 1 л.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ 0,01 % РАСТВОРА ЛИПАЗЫ. 0,01 г ферментного препарата растворяют в 90 мл дистиллированной воды, доводят объем раствора до 100 мл добавлением буферного раствора и фильтруют через бумажный фильтр. Используют свежеприготовленный раствор.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ. В исследуемую колбу вносят 5 мл субстрата, 25 мл трис-буферного раствора рН 9, перемешивают, закрывают пробкой и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 10 мин, прибавляют 1 мл раствора испытуемого фермента, перемешивают и титруют при температуре 37 °С в течение 1 ч.

К смеси добавляют 20 мл этанола и количественно переносят с помощью 50 мл этанола, используемого для смыва, в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 0,5 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,05 М раствором NaOH до появления розовой окраски. В отдельную колбу вместимостью 50 мл (контроль) вносят 5 мл субстрата, 25 мл трис-буферного раствора рН 9, перемешивают, закрывают пробкой и выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 1 ч. К смеси добавляют 20 мл этанола и количественно переносят с помощью 50 мл этанола, используемого для смыва, в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 1 мл раствора ферментного препарата, 0,5 мл раствора фенолфталеина и титруют 0,05 М раствором NaOH до появления розовой окраски.

Липолитическую активность (X, ЕД/мг) рассчитывают по формуле: $X = (\Delta V \cdot 50 \cdot 100) / g \cdot 60 \cdot 1$, где ΔV – разность объемов раствора NaOH, пошедшего на титрование опытной и контрольной пробы, мл; 50 – количество микромолей NaOH, содержащихся в 1 мл 0,05 М раствора NaOH; 100 – объем испытуемого раствора ферментного препарата первого разведения, мл; 1 – объем испытуемого раствора ферментного препарата взятого из первого разведения, мл; g – навеска ферментного препарата, мг; 60 – время гидролиза 40 % эмульсии оливкового масла, мин.

Липолитическая активность 1 мг ферментного препарата липазы, получаемого из поджелудочной железы свиней составляет не менее 4000 ЕД/мг [34, 35].

Неожиданной особенностью аминокислотного состава липазы оказалось присутствие в липазах только «нормального количества» неполярных аминокислот. Согласно Хатчу [26] остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, лизина, аргинина, серина и треонина принято считать полярными, а валина, лейцина, изолейцина, метионина, пролина и фенилаланина неполярными. Было обнаружено, что отношение неполярных остатков к полярным не очень высокое. Оно составляет 0,74 для липазы L_a, и 0,72 для липазы L_b крысы [27]. Хотя в целом состав молекулы липазы не является исключительно гидрофобным, ее вторичная и третичная структуры, возможно, таковы, что значительное число неполярных аминокислот находится на поверхности молекулы, а не спрятано внутри и что они образуют гидро-

фобную «головку», обладающую сродством к поверхности раздела [26]. Липазы свиньи L_a и L_b содержат также углеводный фрагмент. Вергер [27] нашел в них соответственно 3,1 и 2,7 остатка глюкозамина; Плюшер [28] обнаружил, кроме того, 2,2 остатка маннозы; эти данные нигде не публиковались, кроме как в тезисах Вергера [27]. Гарнер и Смит нашли в обоих липазах 3,8 моль маннозы и 2,9 моль N-ацетилглюкозамина [29].

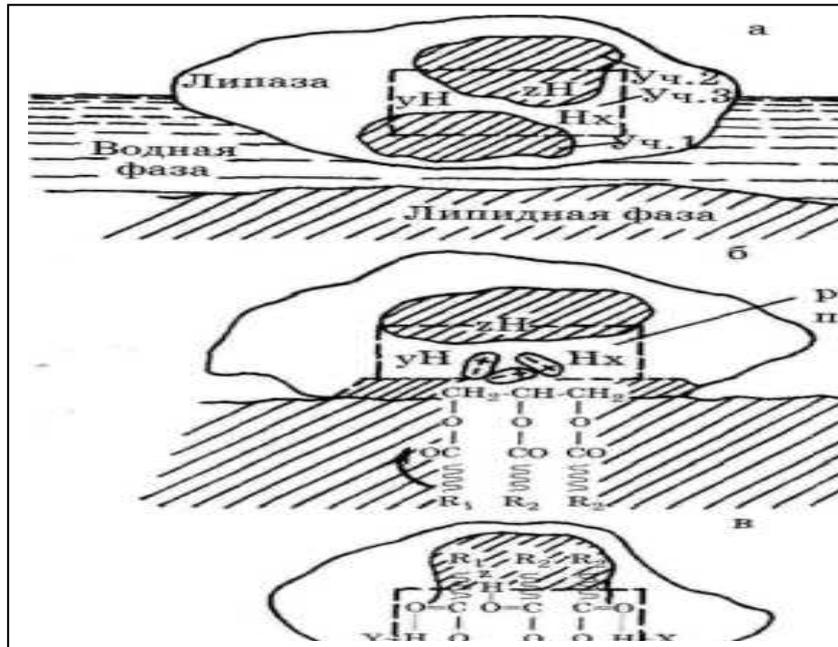


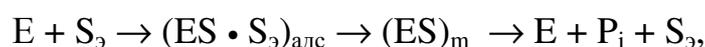
Рис.13.1. Схематическое представление об организации активного центра липаз [33]

Было высказано предположение, что в липазе углеводная часть расположена далеко от активного центра, подобно тому, как и в рибонуклеазе [31], и что она образует гидрофильный хвост, расположенный напротив гидрофобной головки фермента, и таким образом способствует правильной ориентации липазы относительно поверхности раздела фаз [32].

По номенклатуре ферментов липаза имеет название триацилглицеролацилгидролаза (КФ 3.1.1.3), ее рекомендуемое рабочее название триацилглицероллипаза. Этот фермент имеет еще несколько названий: стеапин, трибутираза, липаза триглицеридов, липаза [30]. Данный фермент расщепляет сложноэфирные связи глицерина и жирных кислот в молекуле триацилглицеридов [31] с последующим отщеплением остатков жирных кислот до образования глицерина. Установлено, что липазы быстрее отщепляют остатки высокомолекулярных жирных кислот, чем низшие карбоновые кислоты, т.е. нерастворимые в воде субстраты.

Ферментативный гидролиз липидов обладает существенным отличием от ряда других ферментативных реакций. Данный процесс является гетерогенным, поскольку подавляющее большинство липаз растворимо в во-

де, а субстратные молекулы нерастворимы и объединены в малоподвижные крупные ассоциаты (мицеллы, эмульгированные жирные капли). Следовательно, фермент-субстратное взаимодействие должно протекать на поверхности раздела фаз. В настоящее время установлено, что конформация фермента изменяется при связывании с субстратом, и полипептидный участок, сдвигаясь в сторону, открывает доступ молекулам субстрата к активному центру. Из литературных источников известно, что, чем выше степень диспергирования субстрата, тем быстрее идет липолиз. Вероятно, это связано с явлением сорбции фермента на поверхности субстрата. Именно этот процесс и является первым актом ферментативного липолиза, который можно записать следующим образом:



где: E – фермент, S_3 – эмульгированный субстрат, S – единичная молекула субстрата, $(ES \cdot S_3)_{\text{адс}}$ – фермент, адсорбированный на поверхности эмульгированного субстрата, $(ES)_m$ – комплекс Михаэлиса, P_i – продукты реакции.

Но для того, чтобы адсорбция фермента была продуктивной, необходимо внедрение фермента в поверхностный слой субстратной молекулы, и только после этого у фермента появляется возможность контакта активного центра с молекулой субстрата. Активный центр липаз можно расчленить на три участка, различающихся между собой функционально: 1) контактный, ответственный за узнавание поверхности субстратной фазы (мицеллы, эмульсии, монослоя и др.); 2) гидрофобный связывающий участок, осуществляющий извлечение одной молекулы субстрата из субстратной фазы в глобулу фермента; 2) участок, образованный группами, осуществляющими каталитический акт гидролиза сложноэфирной связи. Схематически этот процесс представлен на рис. 13.1.

Такое расчленение групп позволяет объяснить процесс катализа, осуществляемый липазами. Вероятно, ферменты, катализирующие превращения липидов, молекулы которых имеют полярные части, вступают в контакт с поверхностью субстрата путем электростатических взаимодействий.

Предполагают, что липидный компонент в составе липазы ответственен за формирование участка узнавания субстрата.

Все липазы можно разделить на две группы согласно позиционной специфичности. Ферменты первой группы не обладают позиционной специфичностью и высвобождают жирные кислоты из всех трех положений глицерина. Они катализируют полное расщепление триацилглицеридов до жирных кислот и глицерина. Характерным для позиционно неспецифических липаз является появление глицерина уже на начальном этапе гидролиза, тогда как при гидролизе позиционно-специфическими липазами гли-

церин начинает появляться только после достижения 20–50 %-ной глубины расщепления триацилглицеридов. Вторая группа липаз освобождает жирные кислоты позиционно специфически. Так, используемая в работе панкреатическая липаза отщепляет жирную кислоту во втором положении глицерина, причем гидролиз идет с максимальной скоростью, если в этом положении находится остаток олеиновой кислоты.

Анализ литературных данных показывает, что ферменты стабильны только в узком диапазоне значений температуры и рН среды. Кроме того, как правило, для достижения высокой степени конверсии субстрата необходимы высокие нормы расхода фермента и длительность процесса. Поскольку стоимость продуктов ферментативного гидролиза в значительной степени определяется стоимостью ферментного препарата, то задача поиска активного и стабильного фермента является весьма актуальной. Продолжительность ферментативного гидролиза более 6 – 8 часов требует поддержания стерильности, чтобы воспрепятствовать развитию посторонней микрофлоры. Этот фактор также приводит к удорожанию процесса. В связи с этим ключевой задачей при проведении ферментативного гидролиза является сохранение стабильности ферментов.

Список литературы

2. Арутюнян Н.С. Технология переработки жиров. –М.: Пищепромиздат, 1999.
3. Мартынов А.Я., Никаноров Л.Л. Переработка органических отходов мясокомбинатов методом анаэробного сбраживания. // Мясная индустрия. – 2003. – № 8. – С. 44 – 48.
4. Иванкин А.Н., Илюхина Р.В. О биотехнологической переработке низкоценных животных жиров.// Мясная индустрия. – 2001. – № 5. – С. 39–44.
5. Кобрин В.С., Кузубова Л.И. Опасные органические отходы (технология управления). // Аналитический обзор. – Новосибирск, 1995. – С. 23– 28.
6. Очистка сточных вод предприятий мясной промышленности. Пищевая и перерабатывающая промышленность. //Сер. «Мясная и холодильная индустрия». – Вып. 7. – М.: Обзорная информация, 1996.
7. Миркин М.Г., Кошелева А.В., Горнова И.Б., Градова Н.Б., Цапина А.В. Разработка основ технологии переработки жиросодержащих отходов мясоперерабатывающей промышленности. – М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, ГосНИИсинтезбелок. – 2000. – с. 286 – 290.
8. Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д., Бердугина А.В., Горбатова В.М. Биотрансформация малоценных жировых отходов в продукты повышенной биологической ценности. //Мясная индустрия. – 2002. – № 6. – С. 43–44.
9. Файвишевский М.Л. Производство природных жиров. –М.: Мир,1995. – 347 с.
10. Рабилизов М.Н., Лисенкова Л.Я. Физико-химические методы очистки сточных вод предприятий мясной и молочной промышленности. //Обзорная информация. – М.: ЦНИИТЭИмяспром, 2002.
11. Сухарев Ю.И., Гофман В.Р., Николаенко Е.В., Матвейчук Ю.В. Очистка сточных вод предприятий масложировой промышленности. – Челябинск, 1998.
12. Методические указания по разработке индивидуальных балансовых норм водопотребления и водоотведения для предприятий масложировой промышленности. –Л.: ВНИИЖ., 1992 г. – 160 с.

13. Darnako D., Cherman M. // J. Amer. Oil. Chem. Soc. – 2000.
14. Отчет о НИР по проекту 003.05.03.009. «Создать систему биотрансформации малоисследуемых жировых отходов в продукты повышенной биологической ценности» – М., 2002.
15. Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д., Герман А.Б., Бердутина А.В., Горбатова В.М. Биотрансформация малоценных жировых отходов в продукты повышенной биологической ценности. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 40. – № 2. – С. 38 – 42.
16. Вторичные сырьевые ресурсы пищевой и мясоперерабатывающей промышленности АПК России и охрана окружающей среды. Справочник, 1998.
17. Jackson R.L., Hirs C.H. The Primary Structure of Porcine Pancreatic Ribonuclease. I. The Description and Sites of Carbohydrate Attachment // J. Biol. Chem. – 1967. – 1970. – V. 245. – P. 624.
18. Брокерхов Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. – М: Мир, 1978.
19. Капранчиков В.С. Липаза зародышей семян пшеницы: препаративное получение, свойства, регуляция активности. Автореф... канд. биол. наук. – Воронеж, 2003.
20. Mozhaev V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. // Trends. Biotechnol. – 1993. – V. 11. – P. 305–314.
21. Katchalsky-Katzir E. Immobilized enzymes – learning from past successes and failures. // Trends Biotechnol. – 1993. – V. 11. – P. 214 – 220.
22. Guissan J., Fernandes-Lafuentre R., Rodrigues V., Bastida A. and Alvaro G. Enzyme stabilization by multipoint covalent attachment to activated pre-existing supports. // in: Stability and stabilization of enzymes. – Amsterdam: Elsevier. – 1993. – P. 55 – 62.
23. Goodenough P. W. Food enzymes and the new technology. // Enzymes in Food Proceeding. 2nd ed. – Glasgow: Academic and Professional. – 1995.
24. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Переработка органических отходов. – М. : ГОУ ВПО МГУЛ, 2006. – 378 с.
25. Mandel G., L. Pasantes-Moroles. // J. Anim. Sci. – 1989. – V. 69. – P. 609–612.
26. Verger R., de Haas G.N., Sardra L., Desnuelle P. // Biochim. Biophys. Acta. – 1969. – V. 188. – P. 272.
27. Hatch F.T. Correlation of Amino-Acid Composition with Certain Characteristics of Proteins // Nature. – 1965. – V. 206. – P. 777.
28. Verger R. Faculte des Scienses de Marseille // Thesis.. – 1970.
29. Brockerhoff H. // Chem. Phys. Lipids. – 1973. – V. 10. – P. 215.
30. Garner G.W., Smith L.C. Porcine Pancreatic Lipase. A GLYCOPROTEIN // J. Biol.chem. – 1972. – V. 247. – P. 561-565.
31. Jackson R.L., Hirs C.H. The Primary Structure of Porcine Pancreatic Ribonuclease. I. The Description and Sites of Carbohydrate Attachment // J. Biol. Chem. – 1967. – 1970. – V. 245. – P. 624.
32. Брокерхов Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты. – М: Мир, 1978.
33. Капранчиков В.С. Липаза зародышей семян пшеницы: препаративное получение, свойства, регуляция активности. Автореф. дисс...канд. биол. наук. – Воронеж, 2003.
34. Красноштанова А.А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности. Дисс...докт.хим.наук. – М.: РХТУ, 2009. – 40 с.
35. ВФС 42-2817-96. Липазин.
36. Enzymes and related biochemicals. – Freehold: Wort-hington Biochem. Div. – 1990. – 212 p.

Глава 14

Количественные закономерности гидролиза оливкового масла панкреатической липазой

Для работы использовали оливковое масло, характеризующееся эфирным числом 0,36 мг КОН/г, и панкреатическую липазу с активностью 16 ед/г.

Было изучено влияние на процесс: начальной концентрации субстрата в интервале 100–400 г/л; соотношения фермент: субстрат в интервале 1:100 – 1:25 (интервал изменения активности 64 – 256 ед./л); температуры в интервале 30–60 °С; влияния рН среды в интервале 4,0 – 7,0.

На рис. 14.1 представлены типичные кривые гидролиза оливкового масла панкреатической липазой, в оптимальных условиях, из которого следует, что степень гидролиза субстрата не превышает 28 % за 2ч. Поскольку катализ в данном случае является гетерогенным, то в качестве возможного пути интенсификации процесса было исследовано применение предварительной ультразвуковой обработки субстрата при частоте 25 кГц в течение 1 – 10 мин. Из рис. 14.2 следует, что при проведении ультразвуковой обработки оливкового масла в течение 5 мин достигается повышение степени гидролиза до 51 %. В табл. 14.1 представлены данные по влиянию времени ультразвуковой обработки оливкового масла на размер его капель в составе водной эмульсии. Из нее следует, что после 5 мин обработки размер капель оливкового масла снижается с 15,6 до 2,1 мкм и в дальнейшем не изменяется. Таким образом, эффективность работы фермента липазы напрямую связана с гетерогенностью системы, т.е. с размерами частиц субстрата.

Таким образом, при проведении дальнейших исследований проводили предварительную обработку субстрата ультразвуком при частоте 25 кГц в течение 5 мин. Результаты исследований процесса ферментативного гидролиза оливкового масла панкреатической липазой представлены на рис. 14.3 – 14.5 и в табл. 14.2.

Из полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Процесс ферментативного гидролиза оливкового масла панкреатической липазой осложнен инактивацией свободного фермента и ингибированием последнего продуктами гидролиза (свободными жирными кислотами – СЖК);

2. Температурная и рН зависимости имеют типичный для ферментативных реакций экстремальный характер с оптимумом по температуре 40 °С и рН 6,0;

3. Процесс ферментативного гидролиза для исследуемой системы может быть описан схемой последовательных превращений, значения параметров которой приведены в табл. 14.2.

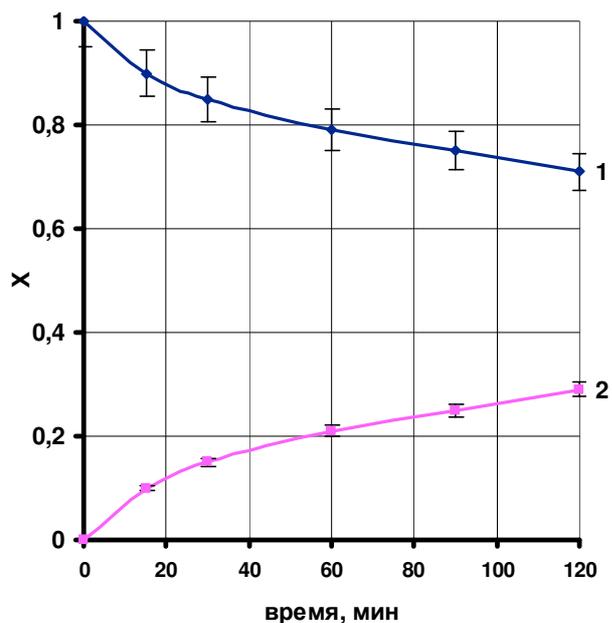


Рис. 14.1. Кинетические кривые гидролиза оливкового масла панкреатической липазой. Условия: температура 40 °С, рН 6,0, начальная концентрация оливкового масла – 400 г/л, активность ФП – 128 ед./л (2 % от массы субстрата). Обозначения: 1 – расход ВМФ, 2 – накопление НМФ

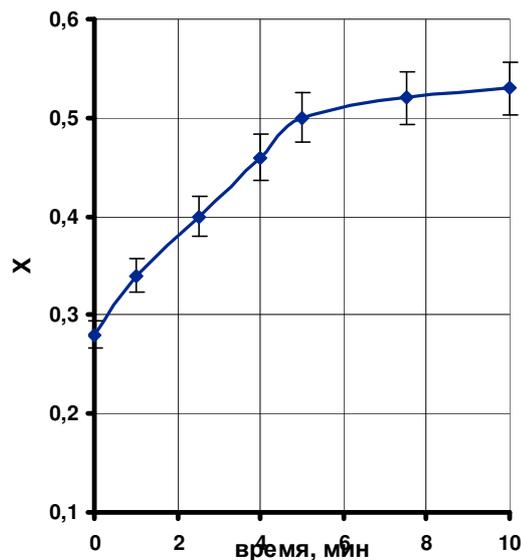


Рис. 14.2. Влияние времени обработки оливкового масла ультразвуком при частоте 20 кГц на выход продуктов гидролиза панкреатической липазой. Условия ферментализации: температура 40°С, рН 6,0; начальная концентрация оливкового масла – 400 г/л, активность ФП – 128 ед./л (2 % от массы субстрата)

Таблица 14.1

Влияние времени ультразвуковой обработки оливкового масла при частоте 25 кГц на размер капель оливкового масла

Время, мин	Размер частиц, мкм
1	15,6 ± 0,7
3	4,2 ± 0,3
5	2,2 ± 0,2
7	2,0 ± 0,2
10	2,1 ± 0,2

Для достижения 90–95 %-ной степени гидролиза оливкового масла необходимо в режиме дробной загрузки добавлять ФП в количестве 2 % от массы субстрата 8 раз через каждые 2 ч.

Таким образом, анализируя экспериментальные данные, полученные для гидролиза оливкового масла панкреатической липазой, можно сделать вывод о том, что для обеспечения технологически приемлемой степени конверсии субстрата требуется ФП в количестве 16 % от массы субстрата,

что неприемлемо для промышленных условий. Поэтому необходимо подобрать условия, обеспечивающие более высокую эффективность процесса. Как и в ранее рассмотренных процессах, в качестве интенсифицирующего фактора были использованы АОБ.

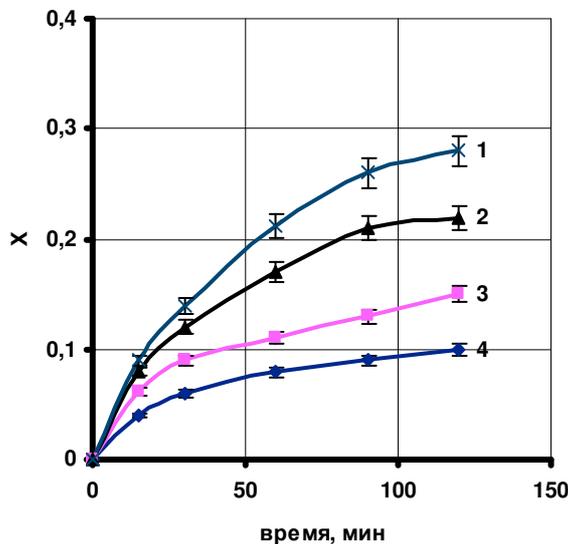


Рис. 14.3. Влияние начальной концентрации продуктов гидролиза (СЖК) на кинетику гидролиза оливкового масла панкреатической липазой. Условия: температура 40 °С, рН 6,0; начальная концентрация оливкового масла – 400 г/л, активность ФП 128 ед./л (2 % от массы субстрата). Обозначения кинетических кривых, отвечающих различной начальной концентрации СЖК: 1 – 5 г/л, 2 – 20 г/л, 3 – 40 г/л, 4 – 80 г/л

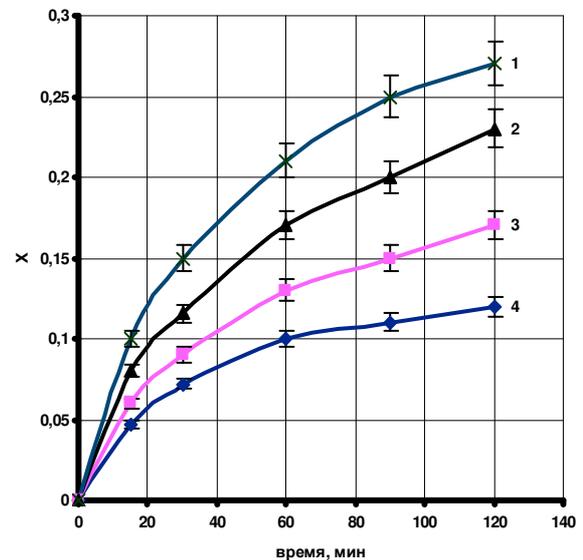


Рис. 14.4. Влияние времени предварительной термоинактивации панкреатической липазы при температуре 90 °С на кинетику гидролиза оливкового масла. Условия: температура 40 °С, рН 6,0; начальная концентрация оливкового масла – 400 г/л, активность ФП 128 ед./л (2 % от массы субстрата). Обозначения кинетических кривых, отвечающих различному времени термоинактивации ФП 1 – 5 мин, 2 – 10 мин, 3 – 15 мин, 4 – 20 мин

Исследования процесса гидролиза оливкового масла панкреатической липазой в присутствии АОБ проводили по традиционной схеме при ранее подобранных оптимальных соотношениях фермент: субстрат. В ходе экспериментов варьировали следующие параметры процесса: температура – 30 – 60°С; рН среды – 4,0 – 7,0; начальная концентрация АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ – $5,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л (молярное соотношение фермент: АОБ 1:1 – 50:1); время прединкубации АОБ с ферментом – 0 – 20 мин; время прединкубации АОБ с субстратом – 0 – 20 мин.

Полученные экспериментальные данные приведены на рис. 14.6 – 14.10, из которых следует, что и в данном случае соблюдаются закономерности, ранее установленные для других ферментов и субстратов.

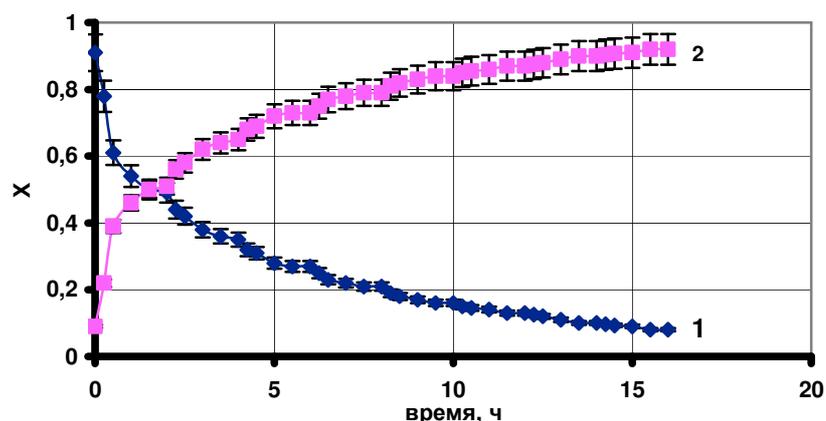


Рис. 14.5. Кривые гидролиза оливкового масла панкреатической липазой при дробной загрузке ФП. Условия гидролиза: температура 40°C , pH 6,0; начальная концентрация оливкового масла – 400 г/л, активность ФП – 128 ед./л (2% от массы субстрата). Обозначения: 1 – ВМФ, 2 – НМФ, момент времени внесения ФП – 2 ч

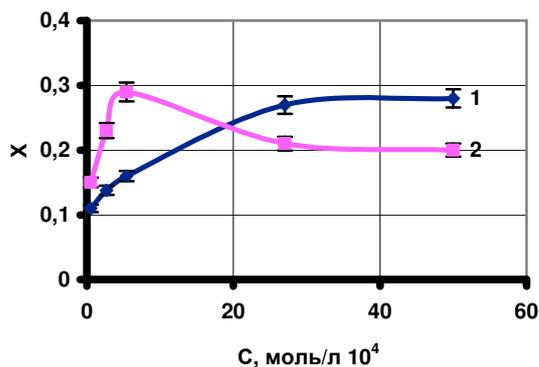


Рис. 14.6. Влияние концентрации C_7 -АОБ (1) и C_{12} -АОБ (2) на выход продуктов гидролиза оливкового масла панкреатической липазой.

Условия: температура – 40°C , pH 6,0 начальная концентрация оливкового масла – 400 г/л, начальная активность ФП – 128 ед./л

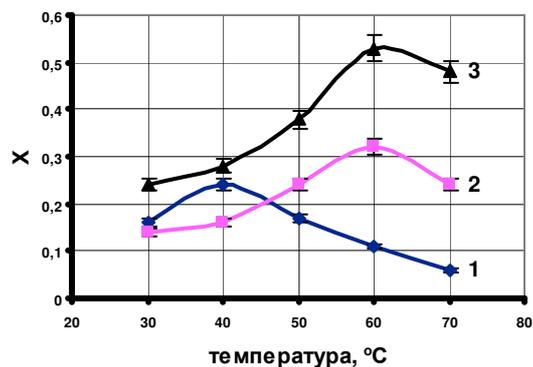


Рис. 14.7. Влияние температуры на выход продуктов гидролиза оливкового масла панкреатической липазой в отсутствии (1) и в присутствии АОБ C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: pH 6,0, начальная концентрация АОБ – $3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л, начальная концентрация субстрата – 400 г/л, начальная активность ФП – 128 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Наличие ингибирования липазы конечными продуктами гидролиза делает необходимым использовать для математического описания данного процесса схему превращений, описанную выше. Обработка эксперимен-

тальных данных с использованием вышеуказанных уравнений позволила достичь адекватного описания всех серий кинетических кривых и рассчитать параметры соответствующих уравнений, которые представлены в табл. 14.3.

Анализ экспериментальных данных показывает, что влияние АОБ на панкреатическую липазу сводится к следующему:

1) в присутствии C_{12} -АОБ и C_7 -АОБ наблюдается снижение начальной скорости ферментативного гидролиза в 3 раза при концентрациях ниже $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. При более высоких концентрациях наблюдается снижение начальной скорости гидролиза, однако, уровня контроля она не достигает и составляет 60 и 80 % от контроля соответственно для C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ при концентрации последних $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, которая в дальнейшем и была принята за оптимальную;

2) прединкубация АОБ с липазой, как и ранее, приводила сначала к снижению скорости гидролиза, а затем к ее увеличению.

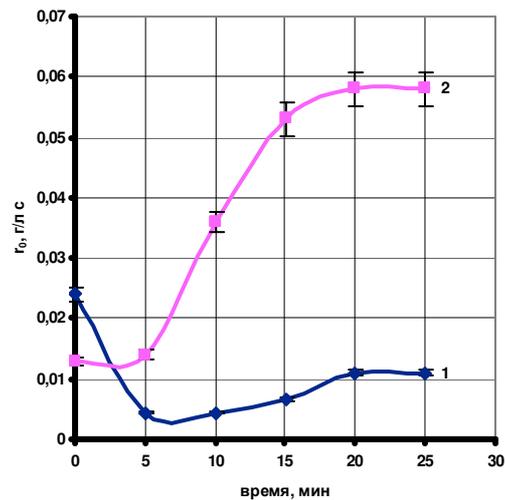
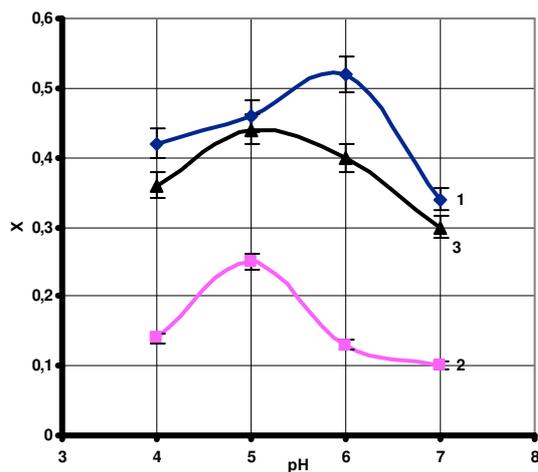


Рис. 14.8. Влияние pH среды на выход продуктов гидролиза оливкового масла панкреатической липазой в отсутствие (1) и в присутствии АОБ C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3).

Условия: температура – 40°C , начальная концентрация субстрата – 400 г/л, начальная активность ФП – 128 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, начальная концентрация C_{12} -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л, начальная концентрация субстрата – 400 г/л, начальная активность ФП – 128 ед./л

Рис. 14.9. Зависимость начальной скорости гидролиза оливкового масла панкреатической липазой от времени прединкубации (1) и в присутствии АОБ C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3).

Условия: начальная концентрация субстрата – 400 г/л, начальная активность ФП – 128 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, температура – 40°C , pH $6,0$. Обозначения: 1 – C_7 -АОБ, 2 – C_{12} -АОБ.

3) как следует из рис. 14.6, использование АОБ C_{12} -АОБ в случае прединкубации с липазой в течение 20 мин позволяет увеличить скорость

гидролиза и, соответственно, выход продуктов гидролиза в 1,1 раза, тогда как применение C_7 -АОБ позволяет получить максимальный выход жирных кислот на уровне 28 – 30 %, что составляет 54 % от контроля;

4) прединкубация субстрата с исследуемыми АОБ в течение 20 мин приводит в случае C_7 -АОБ к снижению скорости гидролиза в 1,7 раза, а в случае C_{12} -АОБ происходит ее увеличение в 1,4 раза;

5) анализ влияния температуры на процесс гидролиза оливкового масла в присутствии АОБ панкреатической липазой показал, что оба АОБ смещают температурный оптимум действия фермента в сторону более высоких температур (60 °С). При этом в случае C_7 -АОБ выход продуктов гидролиза увеличивается в 1,3, а C_{12} -АОБ – в 1,7 раза по сравнению с оптимумом в отсутствие АОБ (40 °С);

6) анализ влияния рН среды на процесс гидролиза оливкового масла в присутствии АОБ (рис. 14.7) показал, что для обоих АОБ наблюдается смещение рН оптимума в сторону кислых значений рН среды (5,0). Однако в отличие от температурной зависимости происходит снижение выхода продуктов гидролиза в 2,0 раза в случае обоих АОБ.

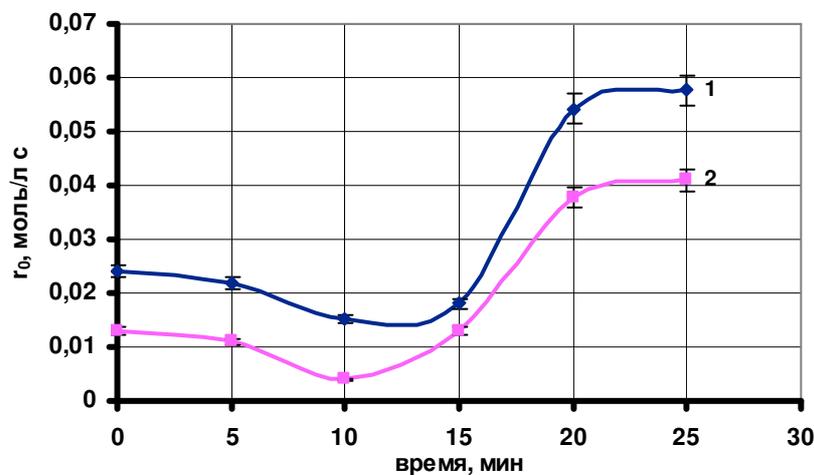


Рис. 14.10. Зависимость начальной скорости гидролиза оливкового масла панкреатической липазой от времени прединкубации АОБ с субстратом. Условия: начальная концентрация субстрата – 400 г/л, начальная активность ФП – 128 ед./л, начальная концентрация d_1-C_7 – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, d_1-C_{12} – $3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л, температура – 40°С, рН 6,0. Обозначения: 1 – d_1-C_7 , 2 – d_1-C_{12}

Таблица 14.2

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза оливкового масла панкреатической липазой

Путь	Е, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹
k_1	66,5 ± 4,7	694 ± 49	0,020 ± 0,001
$k_{ин}$	72,8 ± 6,5	57,8 ± 4,0	0,0059 ± 0,0004
$K_1 = 140 \pm 38$ л/моль, $K_{ин} = 536 \pm 51$ л/моль			

Таблица 14.3

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза оливкового масла панкреатической липазой в присутствии C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ

Путь	Е, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹
Фактор d_1-C_7/d_1-C_{12}			
k_d	20±2/18±1	$(2,50 \pm 0,21) \cdot 10^{-6} / (6,41 \pm 0,52) \cdot 10^{-4}$	22,52±1,82/25,80±2,06
k_a	25±2/25±2	$(7,84 \pm 0,63) \cdot 10^{-6} / (3,74 \pm 0,31) \cdot 10^{-6}$	$(3,81 \pm 0,32) \cdot 10^{-4} / (4,21 \pm 0,41) \cdot 10^{-4}$
k_s	28±2/25±2	$(1,56 \pm 0,12) \cdot 10^{-5} / (1,05 \pm 0,16) \cdot 10^{-5}$	$(3,72 \pm 0,41) \cdot 10^{-3} / (4,02 \pm 0,43) \cdot 10^{-3}$
k_{1d}	18±1/25±2	$(2,50 \pm 0,20) \cdot 10^{-5} / (1,28 \pm 0,10) \cdot 10^{-5}$	$(0,10 \pm 0,01) \cdot 10^{-4} / 0,23 \pm 0,02$
$k_{инд}$	49±4/52±4	$(2,80 \pm 0,30) \cdot 10^{-5} / (2,81 \pm 0,32) \cdot 10^{-5}$	$(9,80 \pm 0,10) \cdot 10^{-5} / (9,23 \pm 1,01) \cdot 10^{-5}$
k_{2d}	19±2/19±2	$(2,60 \pm 0,20) \cdot 10^{-5} / (1,28 \pm 0,13) \cdot 10^{-5}$	$(0,12 \pm 0,01) \cdot 10^{-3} / 0,26 \pm 0,03$
$K_{1d} = 99 \pm 10$ л/моль/140 ± 12 л/моль, $K_{2d} = 48 \pm 5$ л/моль/67 ± 6 л/моль, $K_{инд} = 420 \pm 40$ л/моль/280 ± 28 л/моль			

На заключительном этапе исследований с использованием предложенной кинетической схемы была проведена оптимизация процесса гидролиза оливкового масла панкреатической липазой в присутствии АОБ, на основе чего был сделан выбор типа АОБ и условий проведения гидролиза, обеспечивающих 95 %-ный выход продукта.

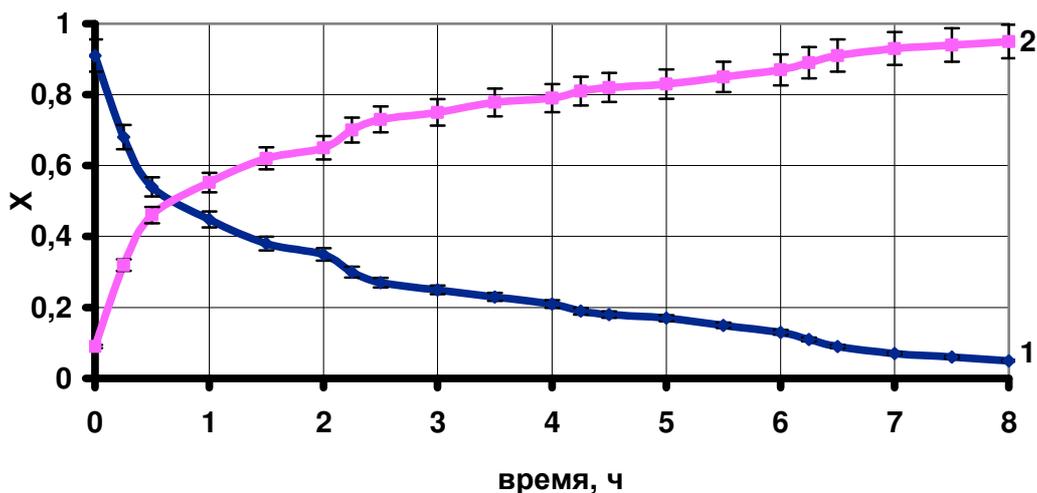


Рис. 14.11. Кинетика расходования субстрата (1) и накопления продуктов гидролиза (2) оливкового масла панкреатической липазой в присутствии C_{12} -АОБ. Условия: температура – $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5,0, начальная концентрация субстрата – 400 г/л, начальная активность ФП – 128 ед./л, концентрация C_{12} -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л, прединкубация АОБ с ферментом – 20 мин.

Соответствующие расчеты, подтвержденные экспериментом, позволили установить, что гидролиз оливкового масла следует вести при концентрации субстрата 400 г/л, активности ФП 128 ед./л, концентрации АОБ d_1 - C_{12} – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, прединкубации фермента с АОБ в течение 20 мин. При этом, как следует из рис. 14.11, применение АОБ d_1 - C_{12} приводит к снижению нормы расхода ферментного препарата в 2 раза и к соответствующему сокращению времени гидролиза.

Глава 15

Разработка технологии гидролиза жировых отходов мясоперерабатывающей промышленности панкреатической липазой

В качестве объекта исследования использовали жировые отходы, образующиеся на Можайском мясокомбинате, характеристики которых приведены в табл. 15.1.

В предыдущих главах было показано, что условия ферментативного гидролиза, подобранные для высокоочищенных субстратов, оказывались оптимальными и для гидролиза тех же субстратов в составе комплексных природных субстанций. Можно предположить, что и в данном случае будут наблюдаться те же закономерности. Однако анализ состава жировых отходов, приведенный в табл. 15.1, показывает, что они отличаются высокой плотностью и вязкостью. Это обусловлено значительным содержанием в них предельных жирных кислот.

Таблица 15.1

Состав жировых отходов, образующихся на Можайском
мясокомбинате

Показатель	Нормативное значение
Плотность при 18 °С, г/см ³	0,939
Показатель преломления при 60 °С,	1,4556
Вязкость при 60 °С, мПа·с	16
Температура плавления, °С	47
Йодное число, % I ₂	41
Число омыления, мг КОН/г	207
Насыщенные жирные кислоты, % от суммы	59
Ненасыщенные жирные кислоты, % от суммы	41
Неомыляемые липиды, %	0,5
Маргариновая кислота, % от суммы	2,3
Пальмитиновая кислота, % от суммы	36
Стеариновая кислота, % от суммы	21
Олеиновая кислота, % от суммы	29
Линолевая кислота, % от суммы	12

Поскольку важнейшим технологическим приемом, обеспечивающим эффективность гидролиза жира липазой, является поддержание устойчивой эмульсии в течение всего процесса, можно предположить, что для жировых отходов требуются более жесткие условия ультразвуковой предобработки по сравнению с оливковым маслом. В табл. 15.2 приведены данные по влиянию времени обработки ультразвуком с частотой 25 кГц на размер частиц эмульсии, а на рис. 15.1 – зависимость степени гидролиза 40 %-ной водной эмульсии жировых отходов от времени обработки ультразвуком. Сопоставив приведенные данные соответственно с данными табл. 15.1 и рис. 15.2, можно сделать вывод о том, что сделанное выше предположение необходимости более жесткой предобработки жировых отходов справедливо. Таким образом, жировые отходы перед гидролизом липазой следует обрабатывать ультразвуком с частотой 25 кГц в течение 15 мин.

Полученную в результате такой обработки 40 %-ную эмульсию жировых отходов далее подвергали гидролизу панкреатической липазой в ранее установленных оптимальных условиях: концентрации субстрата 400 г/л, активность ФП 128 ед./л, концентрации С₁₂-АОБ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, температуре 60 °С, прединкубации фермента с АОБ в течение 20 мин. Результаты исследований приведены на рис. 15.2.

Таблица 15.2

Влияние времени ультразвуковой обработки жировых отходов при частоте 25 кГц на размер частиц эмульсии

Время, мин	Размер частиц, мкм
0	$25,6 \pm 1,2$
5	$16,8 \pm 0,8$
7	$9,7 \pm 0,3$
10	$4,2 \pm 0,2$
15	$2,0 \pm 0,2$
20	$2,1 \pm 0,2$

Видно, что выбранные условия гидролиза обеспечивают степень конверсии жировых отходов не менее 95%. В табл. 15.3 приведены физико-химические показатели полученного гидролизата. Видно, что гидролизат отличается высоким содержанием жирных кислот, а именно: линолевой, пальмитиновой, стеариновой и олеиновой, и может быть направлен на их выделение.

Полученный гидролизат был исследован на острую токсичность с применением тест-культуры инфузорий *Tetrachylena pyriformis*. Результаты исследования подтверждают, что полученный образец острой токсичностью не обладает.

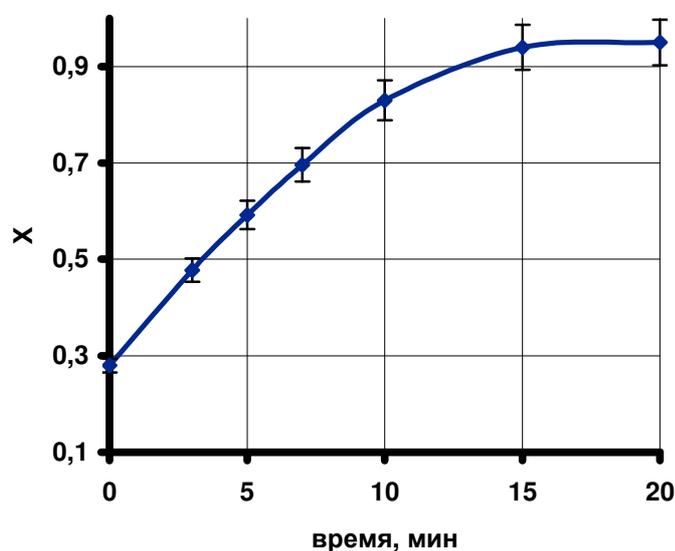


Рис. 15.1. Влияние времени обработки жировых отходов ультразвуком при частоте 25 кГц на выход продуктов его гидролиза панкреатической липазой. Условия ферментализа: температура 40 °С, рН 6,0; начальная концентрация жировых отходов – 400 г/л, активность ФП – 128 ед./л (2 % от массы субстрата)

По результатам исследований была предложена схема переработки жировых отходов, представленная на рис. 15.3.

Таблица 15.3

Физико-химические показатели панкреатического гидролизата жировых отходов Можайского мяскомбината

Наименование показателя, размерность	Значение
рН	4,5
Сухие вещества (СВ), %	38
Вязкость при 60 °С, мПа·с	8
маргариновая кислота, % от СВ	2,0
пальмитиновая кислота, % от СВ	31,9
стеариновая кислота, % от СВ	18,6
олеиновая кислота, % от СВ	25,7
линолевая кислота, % от СВ	10,6
Глицерин, % к СВ	11,0

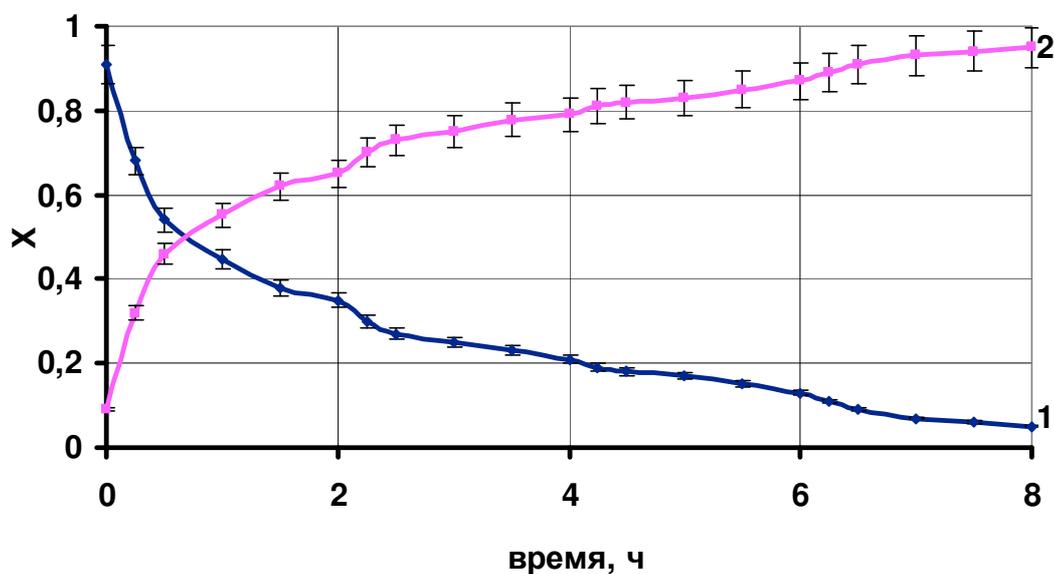


Рис. 15.2. Кинетика расходования субстрата (1) и накопления продуктов гидролиза (2) жировых отходов панкреатической липазой в присутствии АОБ d₁-C₁₂. Условия: температура – 60 °С, рН 5,0, начальная концентрация субстрата – 400 г/л, начальная активность ФП – 512 ед./л, концентрация C₁₂-АОБ – 3,0·10⁻³ моль/л, прединкубация АОБ с ферментом – 20 мин



Рис. 15.3. Принципиальная схема получения панкреатического гидролизата на основе жировых отходов

Глава 16

Гидролиз липидсодержащих отходов сельскохозяйственного производства с целью получения биотоплива

Энергетические проблемы, возникающие в различных странах, постоянно требуют поиска альтернативных решений существующим сегодня возможностям энергопотребления минеральных видов топлива. Масштабная сельскохозяйственная деятельность приводит к образованию значительных количеств органических отходов, которые оказывают существенную экологическую нагрузку на окружающую среду, и которые могут быть переработаны в различные виды биотоплива на базе возобновляемого сырья.

Растительные ресурсы рассматриваются сегодня как реальная альтернатива минеральным видам топлива, а самый дешевый вид растительных масел – рапсовое масло сегодня все в больших масштабах перерабатывается в смесь метиловых эфиров жирных кислот для использования в двигателях внутреннего сгорания. Интенсивное животноводство и последующая мясопереработка приводят к накоплению значительных коли-

честв жиросодержащих отходов, которые рационально не используются. Этот ресурс может быть задействован с целью дополнительного решения энергетических проблем.

Ежегодно на мясоперерабатывающих предприятиях скапливается около 150 тыс. т жировых отходов, которые представляют собой смеси веществ, основным компонентом которых являются жиры животного происхождения.

Считается, что биотопливом из возобновляемых источников, наиболее близким по своим физико-химическим свойствам к обычному углеродородному (дизельному) топливу, является смесь метиловых эфиров жирных кислот, полученных из рапсового масла (МЭРМ). Для этого из семян рапса (технические сорта с высоким содержанием эруковой кислоты 40 – 60 %) с 1 га посевов (в среднем 3 т), извлекают около 1 т масла. Затем масло подвергают этерификации, в результате чего получают около 600 кг МЭРМ. По данным немецких специалистов этот процесс не требует больших затрат, а МЭРМ стоят в европейских ценах практически столько же, сколько и обычное дизельное топливо. Поэтому, во многих странах Европы уже приняты и действуют программы по специальному расширению посевов рапса и его соответствующей переработке в жидкое биотопливо.

Для потенциальной оценки энергетики биотоплива применяют разные показатели. Важнейшим является теплота сгорания, под которой понимается количество выделившейся теплоты при сгорании 1 моль вещества до образования полных окислов (CO_2 и H_2O). Теоретически, теплота сгорания может быть рассчитана по формуле [1]: $\Delta H_{\text{сгор}} = -(204,2n + 44,4m + \sum x)$, кДж/моль, где n – число атомов кислорода, необходимых для полного сгорания вещества, m – число моль образовавшейся воды, x – поправка, учитывающая наличие в молекуле вещества различных химических связей и функциональных групп. Расчеты, выполненные для основной жирной кислоты – стеариновой, входящей в состав жиров и масел по реакции $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH} + 26\text{O}_2 = 17\text{CO}_2 + 18\text{H}_2\text{O}$, $n = 52$, $m = 18$, $x = 0$ [R–COOH, для одинарной связи $x = 0$] дают: $\Delta H_{\text{сгор}} = -(204,2n + 44,4m + \sum x) = -(204,2 \cdot 52 + 44,4 \cdot 18) = -11417$ кДж/моль. По справочнику термодинамических величин [1] величина стандартной теплоты сгорания (энтальпия при 298 К) равна: $\Delta H_{298}^{\circ} \text{сгор.} (\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}) = -11274,6$ кДж/моль.

Аналогичные расчеты, выполненные для известных видов сырья, показывают: для метанола, используемого при этерификации жирных кислот: $\text{CH}_3\text{OH} + 1,5\text{O}_2 = \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$, $n = 3$, $m = 2$, $x = 50,2$ [R–CH₂OH] [1], $\Delta H_{\text{сгор}} = -(204,2n + 44,4m + \sum x) = -(204,2 \cdot 3 + 44,4 \cdot 2 + 50,2) = -751,6$ кДж/моль (по справочнику $\Delta H_{298}^{\circ} \text{сгор} (\text{CH}_3\text{OH}) = -726$ кДж/моль). Для также используемого этанола: $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} + 3\text{O}_2 = 2\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$, $n = 6$, $m = 3$, $x = 50,2$ [R–CH₂OH] для одинарной связи $x = 0$ $\Delta H_{\text{сгор}} = -(204,2n$

+ $44,4m + \sum x$) = $-(204,2 \cdot 6 + 44,4 \cdot 3 + 50,2) = -1408$ кДж/моль (по справочнику ΔH_{298}° сгор (C_2H_5OH) = -1366 кДж/моль).

В результате технической этерификации жирных кислот метанолом в жирах и маслах образуются метиловые эфиры этих кислот. Расчет теплоты сгорания для метилстеарата показывает: $C_{17}H_{35}COOCH_3 + 27,5O_2 = 19CO_2 + 19H_2O$, $n = 55$, $m = 19$, $x = 138,1$ (для одинарной связи $x = 0$) +(для кето-группы $-C(O)-$ $x = 50,2$)+(для простого эфира $O-CH_3$ $x = 87,9$). ΔH сгор = $-(204,2n + 44,4m + \sum x) = -(204,2 \cdot 55 + 44,4 \cdot 19 + 138,1) = -12212,7$ Дж/моль. Такая высокая теплота сгорания делает виды биотоплива на основе метиловых эфиров жирных кислот достаточно привлекательными, тем более, что для, например, традиционно применяемого природного газа, энтальпия сгорания равна ΔH_{298}° сгор. (CH_4) = -890 кДж/моль.

Учитывая значительные накопления бросовых жировых отходов на мясоперерабатывающих предприятиях и весьма существенные затраты на их вывоз с целью утилизации, представляется целесообразной разработка минитехнологии получения жидкого биотоплива из таких отходов для переработки по месту сбора.

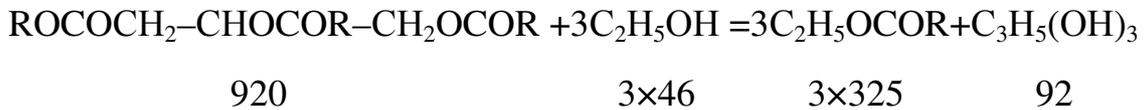
Для переработки использовали животные жиры различного происхождения, хроматографический анализ их жирно-кислотного состава осуществляли с использованием газового хроматографа HP 6890 фирмы «Hewlett Packard», США. Для этого образец подвергали обработке смесью 1:1 хлороформа с метанолом по Фолчу в присутствии 10 % 1%-ного раствора KCl для растворения липидных компонентов, экстракт фильтровали через бумажный фильтр и, после удаления избытка растворителей упариванием, выделенные липиды в количестве 0,01 г в смеси с 3 мл 15 % раствора ацетилхлорида в метаноле подвергали 2 ч гидролизу при $100^{\circ}C$ с последующей нейтрализацией смеси добавлением 1,25 мл насыщенного Раствора KOH в CH_3OH до pH 5,0–6,0. К гидролизату добавляли по 3 мл насыщенного водного раствора NaCl и гексана, отбирая на анализ после отстаивания 0,2 мл прозрачного гексанового слоя, содержащего метиловые эфиры жирных кислот [2–3].

Этерификацию жиросодержащих отходов для получения жидкого биодизеля проводили аналогично, используя для обработки 1 кг сырья 0,5 кг этанола и 0,1 кг щелочного катализатора [4].

В табл. 16.1 и 16.2 приведен основной жирно-кислотный состав компонентов жирового сырья в сравнении с некоторыми растительными продуктами. Основными компонентами животных, как и большинства других жиров и масел, являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты, на долю которых приходится более $\frac{3}{4}$ всех кислот.

Из анализа данных жирно-кислотного состава можно вывести усредненную формулу жира животного происхождения $C_{60}H_{100}O_6$ со средней молекулярной массой 920 г/моль. Исходя из того, что жиры и масла

представляют собой смесь моно-, ди- и триацилглицеринов, а в предельном варианте полностью этерифицированный жирными кислотами глицерин, процесс переработки жировых отходов в жидкий биодизель каталитической этерификацией этанолом сводится к следующей химической реакции:



Из приведенной реакции видно, что теоретический выход этиловых эфиров жирных кислот (R – остаток кислоты) составляет примерно 900 кг с 1 т жирового сырья. Использование этанола для этерификации оправдано удобством применения менее токсичного по сравнению с метанолом спирта, тем более, что теплоты сгорания метиловых и этиловых эфиров близки. Так по литературным данным, теплота сгорания МЭРМ формулы $\text{C}_{20,2}\text{H}_{37,6}\text{O}_2$ составляет 37,8 мДж/кг, а для этиловых производных общей формулы $\text{C}_{21,2}\text{H}_{39,6}\text{O}_2$ 38,1 мДж/кг [4]. Анализ данных таблицы показывает, что использование, как растительных масел, так и жиров животного происхождения, позволяет получать в зависимости от типа использованного спирта с выходом более 60 % смесь эфиров жирных кислот, представляющую собой жидкий биодизель – смесь, которая может использоваться либо в виде 10 – 30 % добавки к обычному топливу для повышения его октанового числа, либо напрямую в перерегулированных двигателях внутреннего сгорания.

В качестве объектов исследования использовали жиры животные (говяжий, свиной) с кислотным числом >2 мг КОН/г, а также жиромассу жироловок мясоперерабатывающих предприятий.

Биодизель может быть изготовлен как из пищевого животного жира, так и из жиров более низкого качества (технического). Содержание свободных жирных кислот в жировом сырье составляло до 2 % . Переработка жиромассы из жироловок решает серьезную проблему утилизации данного отхода и выработки экологически чистого топлива (рис. 16.1).

Общепринятой и традиционной технологией получения эфиров жирных кислот является реакция трансэтерификации при нагревании и при непрерывном перемешивании в течение 30...60 мин при нормальном давлении.

Для выработки метиловых/этиловых эфиров предварительно подготавливали смесь спирта и катализатора для последующего добавления в нагретый жир при постоянном перемешивании. Подготовка смеси спирта и катализатора осуществлялась путем нагрева спирта до 60 °С, добавления в спирт катализатора и его перемешивания до полного растворения. В случае применения этилового спирта образовывался этоксид, а метилового метоксид.

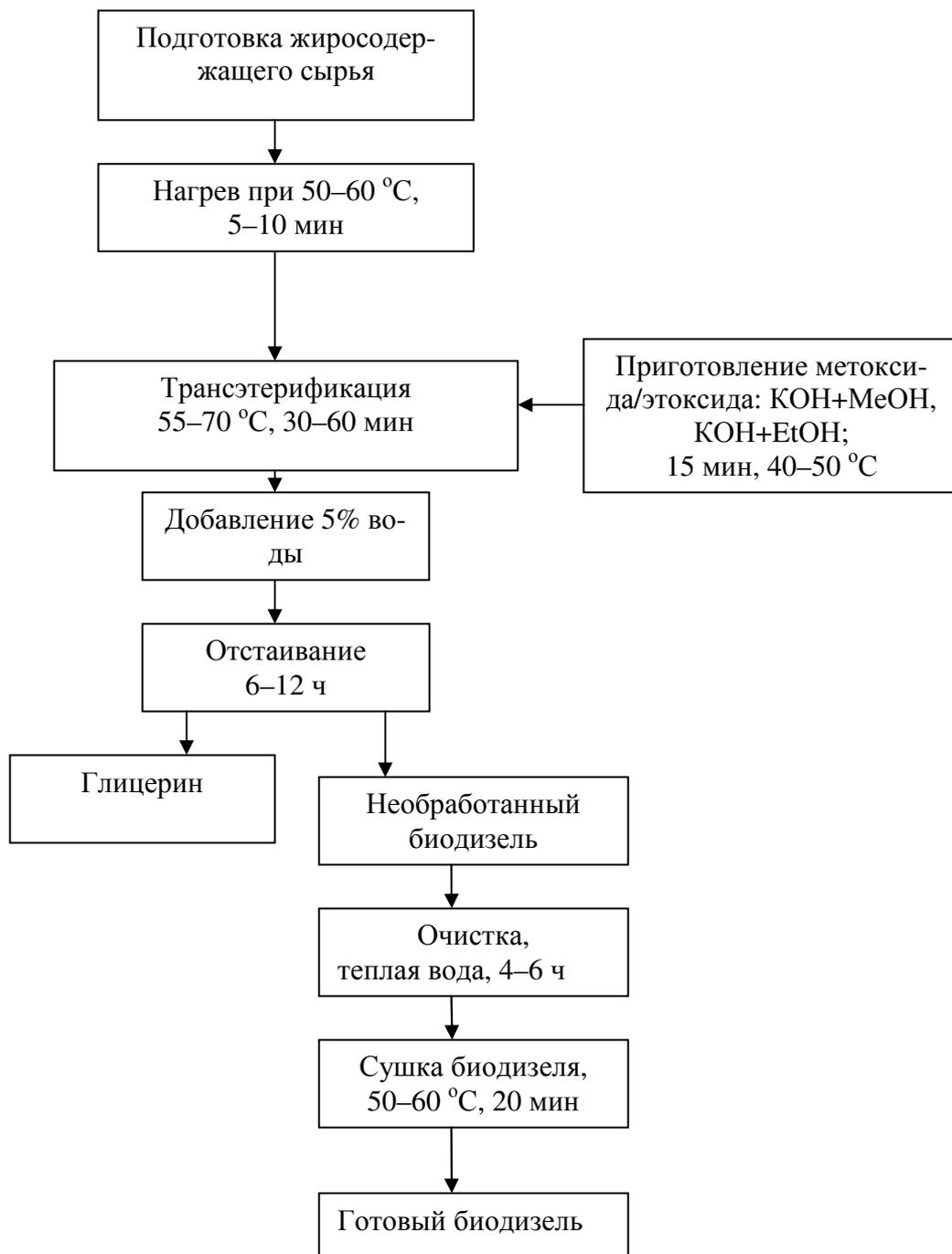


Рис. 16.1. Принципиальная схема получения биодизеля из животного жира

Перед реакцией трансэтерификации животный жир подогревался до температуры 40–50 °С. Реакцию трансэтерификации (рис. 16.2) проводили при непрерывном перемешивании нагревании с использованием метанола и этанола в присутствии щелочного катализатора – 1,5 % КОН. Использование в качестве щелочного катализатора NaOH было неэффективным из-за его неполного растворения в спирте, в связи с чем во время алкоголиза триглицеридов образовывалась устойчивая эмульсия, останавливающая

реакцию трансэтерификации раньше полной конверсии животных триглицеридов в сложные эфиры.

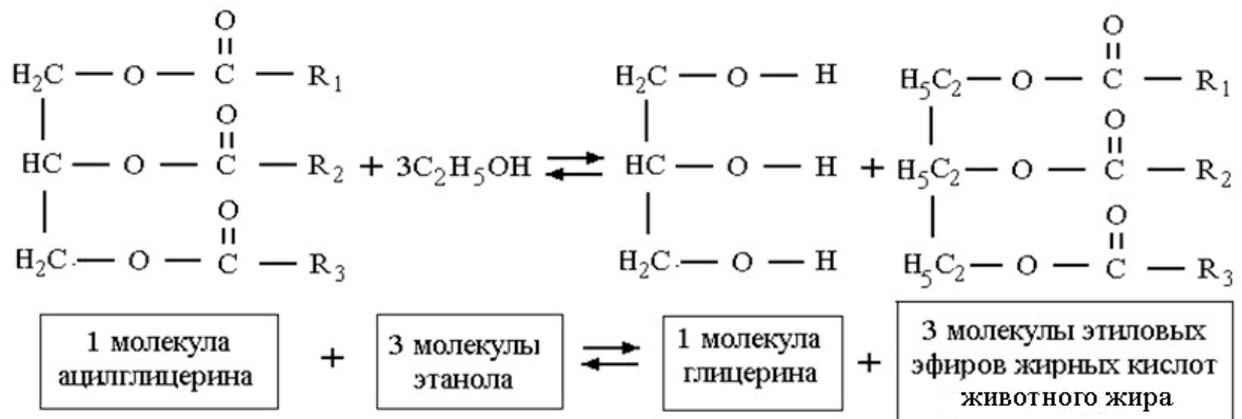


Рис. 16.2. Реакция трансэтерификации

Количество свободных жирных кислот в используемом жировом сырье не превышало 2 %, а при большем их количестве образовывалось мыло, мешающее проведению реакции трансэтерификации (рис. 16.3).

Наличие в жировом сырье воды может привести к нецелевому гидролизу жира (рис. 16.4).

После реакции трансэтерификации, длившейся 30–60 мин, добавляли в смесь 5 % дистиллированной воды и продолжали процесс 15–20 мин. Этот прием останавливает реакцию трансэтерификации и позволяет ускорить дальнейшую очистку полученных эфиров. Затем полученную смесь глицерина и метиловых/этиловых эфиров подвергали отстаиванию при комнатной температуре в течение 1 ч, в результате чего глицерин отделялся от алкиловых эфиров. В дальнейшем глицерин отделяли и проводили очистку полученных эфиров водой от примесей.

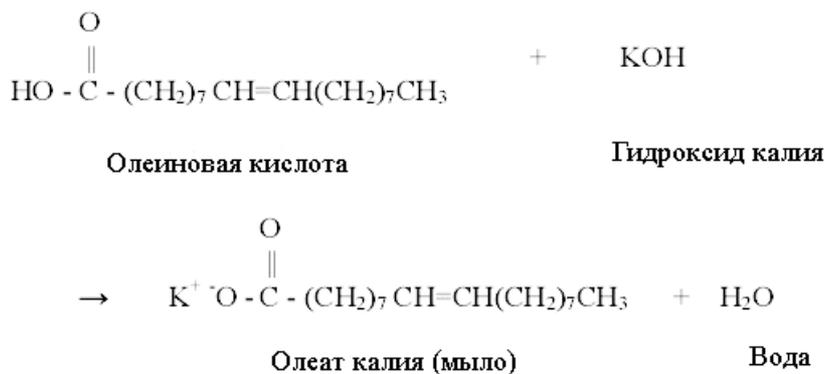


Рис. 16.3. Образование мыла на примере свободной олеиновой кислоты

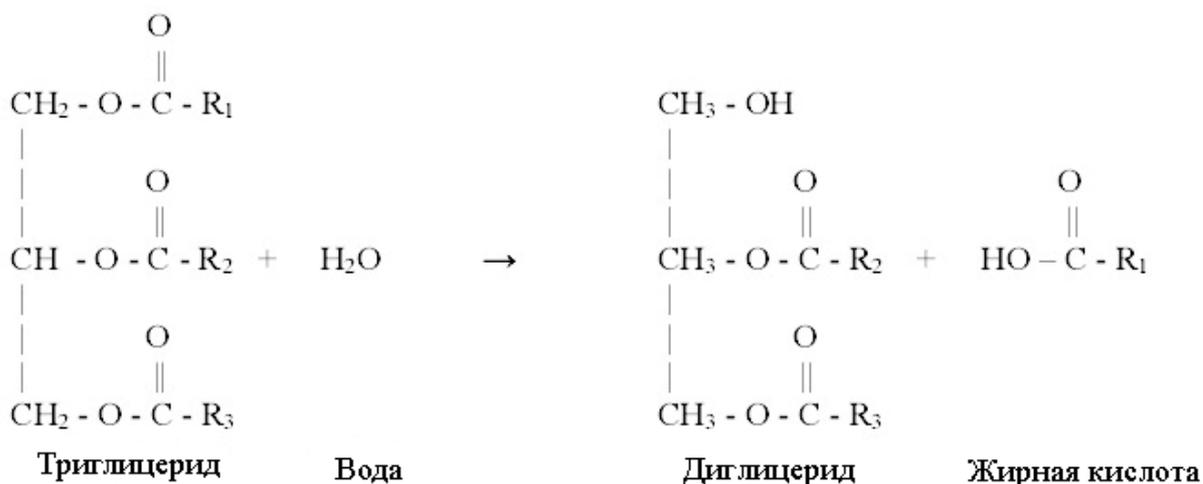


Рис. 16.4. Гидролиз животных триглицеридов с образованием свободных жирных кислот в присутствии воды

При очистке эфиров в воде растворяются примеси: оставшийся глицерин, щелочь, избыток спирта, который в дальнейшем может быть выпарен. Эфиры в воде нерастворимы. Для очистки использовали теплую воду, подкисленную уксусной кислотой. Очистку осуществляли в несколько этапов до полной чистоты эфиров с добавлением воды в соотношении 1:2. Полноту очистки определяли визуально по прозрачности водного слоя и контролем pH, которое должно быть равно 7,0. В конце операции очистки эфиры выдерживали при 40–50 °С в течение 15 мин. Выход эфиров от теоретического в зависимости от типа применяемого спирта составлял 80 % для 95 %-ного этанола и около 96 % для обезвоженных метанола и этанола [8 – 10].

Для реакции трансэтерификации стехиометрическое соотношение составляет 3 моль спирта и 1 моль триглицерида для образования на выходе 3 моль алкиловых эфиров жирных кислот и 1 моль глицерина. Реакция трансэтерификации обратима и для того чтобы она шла в сторону целевого продукта требуется избыток спирта.

Как следует из полученных данных [9] для максимальной конверсии эфиров требуется молярное соотношение метанол : жир равное 6:1. Более высокая концентрация спирта может вызвать затруднения в отделении глицерина из-за увеличения его растворимости. В свою очередь оставшийся глицерин в растворе может сместить направление реакции в левую сторону, что снижает выход эфиров.

Оптимальными параметрами получения эфиров жирных кислот животного происхождения являются: температура, близкая к температуре кипения спирта, уровень перемешивания максимально возможный, молярное соотношение метанола и жира 6:1, этилового спирта 3:1, время 1 ч.

Полноту проведения реакции трансэтерификации рассчитывали по площадям пиков основных жирных кислот определяемых с помощью газо-

вой хроматографии, позволяющей определить эфиры жирных кислот и примеси [2, 5].

Таблица 16.1

Состав основных жирных кислот в жировом сырье и продукте его гидролитической трансформации (биодизель)

Углеродная цепь	Говяжий жир, %	Метилловые эфиры говяжьего жира, %
C _{14:0}	4,8	3,6
C _{16:0}	28,4	26,8
C _{16:1}	4,7	3,5
C _{18:0}	14,8	14,1
C _{18:1}	44,6	44,2
C _{18:2}	2,7	1,8
Общие насыщенные ЖК	48,0	47,5
Общие ненасыщенные НЖК	52,0	51,5

Основными компонентами отходов животных жиров (табл. 16.1) также являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая кислоты, на долю которых приходится более $\frac{3}{4}$ всех кислот. Изученные липидсодержащие объекты содержали жировую фракцию в количестве от 10 до 99 %, состав жирных кислот в которой соответствует усредненному биологическому жиру.

Полученный биодизель предприятия могут использовать для собственных нужд или на продажу. В летнее время биодизель может использоваться в виде 100 % в двигателях автотранспорта. В холодное время года в виде смесей с дизельным минеральным топливом до 20 %, что не требует внесения изменений в конструкцию двигателя, но в то же время понижает уровень выхлопов, увеличивает срок эксплуатации двигателя.

Из проведенных исследований можно сделать выводы, что производство биодизеля на предприятиях мясной отрасли из животного жирового сырья является экономически эффективным, а его качество соответствует европейским стандартам на биодизельное топливо, полученное из растительных масел, что имеет перспективу в дальнейшем развитии и применении на отечественных предприятиях [8, 9].

Список литературы

1. Краткий справочник физико-химических величин / Под ред. К.П.Мищенко, А.Л.Равделя. Л.: Химия, 1974. – С. 84.
2. Лисицын А.Б., Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д. Методы практической биотехнологии. Анализ компонентов и микропримесей в мясных и других пищевых продуктах. – М.: Изд-во ВНИИМП, 2002. – 402 с.
3. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Биологически активные соединения из природных объектов. Свойства и структурно-функциональные взаимосвязи. – М.: Изд-во МГУЛ, 2003. – 480 с.

4. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Переработка органических отходов. – М.: Изд-во МГУЛ, 2006. – 420 с.
5. Иванкин А.Н. Жиры в составе современных мясных продуктов// Мясная индустрия. –2007. –№ 6. – С. 8 – 13.
6. Иванкин А.Н., Неклюдов А.Д., Горбунова Н.А., Бабурина М.И., Горохов Д.Г. Биотопливо из возобновляемого сырья: перспективы производства и потребления// Лесной Вестник. – 2008. – №6. – С. 91–96.
7. Горохов Д.Г., Бабурина М.И., Иванкин А.Н. Перспективы производства и потребления биодизельного топлива из жиров животного происхождения // Мясная индустрия. – 2009. – № 7. – С. 62–64.
8. Иванкин А.Н., Бабурина М.И., Горбунова Н.А., Неклюдов А.Д. Экологическая система получения биотоплива из липидсодержащих отходов сельскохозяйственного производства// Экологические системы и приборы. – 2008. – № 6.
9. Бабурина М.И., Горохов Д.Г., Иванкин А.Н., Небурчилова Н.Ф. Переработка липидов животного происхождения в биотопливо// Мясные технологии. – 2009. – №2. – С. 50–62.

Часть III

ГИДРОЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ. РАСПАД И ФРАГМЕНТАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ

Глава 17

Теоретические основы получения гидролизатов углеводной природы

Углеводы вместе с белками и жирами образуют основную группу веществ клеток, являясь главным источником энергии для живого организма. Эта энергия высвобождается за счет биохимического окисления углеводов. Разделяют моносахариды, ди- и олигосахариды и полисахариды, состоящие из циклических гликозидных звеньев общей формулы $C_x(H_2O)_x$. Углеводы составляют более 75 % органических веществ в мире и до 80 % калорийности пищевого рациона человека. Некоторые важнейшие сахараиды и их содержание в различных пищевых продуктах приведены в табл. 17.1 – 17.2.

Количественное содержание углеводов можно определить по методике 17.1 и 17.2.

Методика 17.1. Количественное определение содержания углеводов. Метод основан на способности углеводов образовывать с органическими реагентами окрашенные комплексы, поглощающие в видимой части спектра при заданной длине волны.

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами или фотоэлектродориметр. Термостат или водяная баня на 100 °С. Пробирки, мерные колбы, пипетки. Микроизмельчитель тканей. Колба вместимостью 250 мл с обратным холодильником и устройством для подогрева 20–100 °С. Установка для фильтрования через бумагу. Роторный испаритель. Мерные колбы вместимостью 100–250 мл.

Реактивы. Раствор углевода, содержащий 50–100 мг /мл основного вещества. Вода дистиллированная. Стандартные растворы глюкозы в воде, содержащие в 1 мл: 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества. Антроновый реактив. Готовят непосредственно перед определением путем растворения 0,25 г антрона в 25 мл дистиллированной воды, с последующим прибавлением к раствору 100 мл концентрированной серной кислоты. Спирт этиловый ректификованный, 80 %-ый раствор в воде. Соляная кислота хч, разбавленный (1:1) водный раствор. Гидроксид натрия хч, 1 М раствор. Ацетат свинца чда, 30 %-ый раствор. Индикаторная бумага. Сульфат натрия хч, 1 М раствор. Дистиллированная вода.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ. 10 г измельченного образца заливают 50 мл 80 % этанола, нагревают смесь при 80 °С в течение 15 мин, спиртовую вытяжку отфильтровывают, остаток подвергают экстрагированию 80 % спиртом еще 2 раза. Объединенный экстракт упаривают до объема 30 мл при температуре 40 °С для отделения этанола. Упаренный экстракт количественно переносят в круглодонную колбу, добавляют 2 мл разбавленной (1:1) соляной кислоты, греют смесь при температуре 70 °С в течение 3 мин и получают гидролизат, содержащий экстрагированные моносахариды и моносахариды, образованные при легком гидролизе из сахарозы, который количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и добавляют 100 мл дистиллированной воды.

К гидролизату добавляют по капле 1 М раствор гидроксида натрия до нейтральной реакции, прибавляют 2 мл 30 % раствора ацетата свинца, перемешивают и отстаивают смесь в течение 1 ч, добавляют по капле раствор сульфата натрия до прекращения выпадения осадка для связывания избытка ацетата свинца и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор отстаивают и фильтруют.

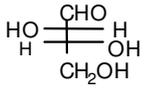
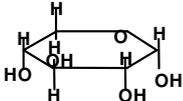
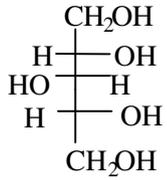
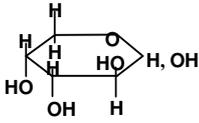
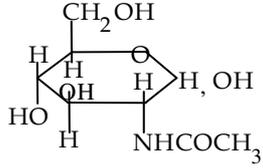
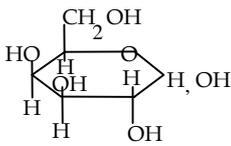
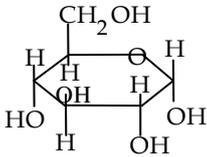
ХОД РАБОТЫ. В колбу заливают 4 мл раствора препарата, содержащего около 0,3 г сухого определяемого вещества или экстракта из измельченного пищевого продукта и доводят объем раствора до 100 мл.

В 2 пробирки заливают по 5 мл антронового реактива и осторожно по стенке приливают: в 1-ю – 1 мл раствора углевода (проба), во 2-ю – 1 мл воды (контроль).

Пробирки помещают в кипящую водяную баню и выдерживают при температуре 100 °С в течение 15 мин, охлаждают до комнатной температуры и проводят измерение поглощения при 540 нм против контроля.

Построение калибровочной кривой. Предварительно проводят определение содержания углеводов в растворах глюкозы с известной концентрацией, содержащих в 1 мл 10, 20, 40, 60, 80 и 100 мкг вещества. Стандартные растворы можно готовить соответствующим разбавлением (1 г на 100 мл) раствора глюкозы.

Важнейшие углеводы

Наименование	Структурная формула	Молекулярная масса	Растворимость, г/100 г	
			В воде	В этаноле
1	2	3	4	5
Моносахариды				
D-треоза D-Triose		120,1	P	MP
D-ксилоза (древесный сахар) D-Xylose		150,1	120	6,2
Ксилит Xylitol		152,1	P	MP
D-арабиноза D-Arabinose		150,1	59	0,5
N-ацетил-D-глюкозамин N-Acetyl-D-glucosamin		221,2	P	MP
D-галактоза (цереброза) D-Galactose		180,1	68	0,6
D-глюкоза (декстроза) D-Glucose		180,2	154	4,9

1	2	3	4	5
Сорбит (D- сорбитол) D-Sorbitol		180,2	55	MP
D-фруктоза (фруктовый сахар) D-Fructose		180,2	375	6,5
Олигосахариды				
Лактоза (молочный сахар) D(+)-Lactose		342,3	17	0,09
Мальтоза D(+)-Maltose		342,3	108	MP
Целлобиоза D(+)-Cellobiose		342,3	P	HP
Полисахариды				
Гепарин (из мукозы свиней, антикоагулянт крови) Heparin	<p style="text-align: center;">$n = 10-12, H = Na$</p>	8 – 18 кДа (120-170 ЕД/мг)	5	HP
Хондроитинсульфат-А хрящей Chondroitin-6-sulfate	<p style="text-align: center;">$n = 10-12, H = Na$</p>	8-14 кДа	1	HP

Окончание таблицы 17.1

1	2	3	4	5
Крахмал (амилоза) Starch (amylose)		200 кДа	НР	НР
Амилопектин (из картофеля) Amylopectin		1000 кДа	НР	НР
Гиалауроновая кислота (из глазного стекловидного тела)		1000 кДа	Р	НР
Гликоген (мышц, сердца, печени) Glycogen		25 – 8000 кДа	0,5	НР
Целлюлоза (из растений) Cellulose		n = 10 – 14000 кДа	НР	НР

Определение содержания углеводов в анализируемой пробе раствора в мкг/мл осуществляют по калибровочному графику.

Процентное содержание углеводов в пробе, в пересчете на глюкозу, вычисляют по формуле: $X = a / 100 b$, где X – содержание углеводов в препарате, в г на 100 мл препарата; a – количество микрограммов глюкозы в 1 мл исследуемого раствора, найденное по калибровочной кривой; b – количество мл препарата, взятое для приготовления 100 мл раствора (или навеска).

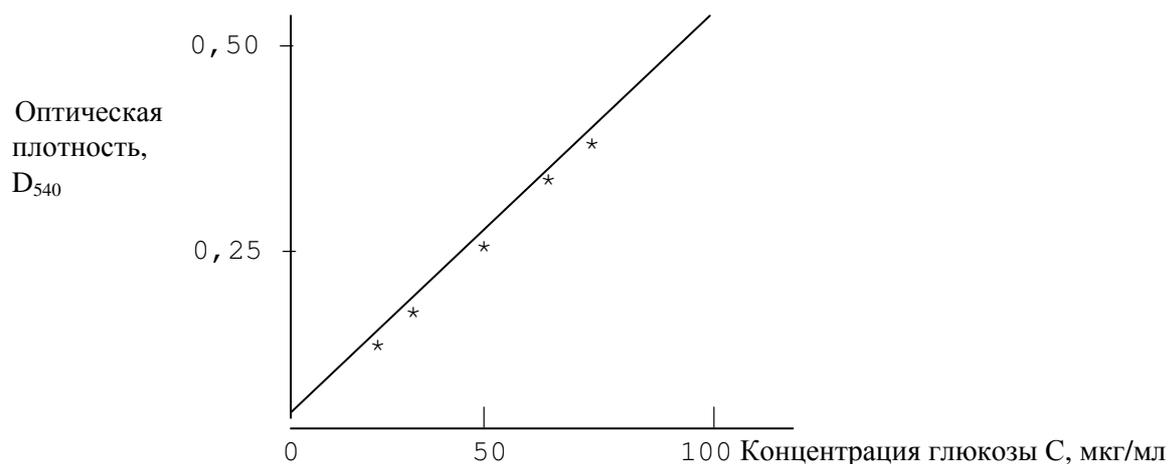


Рис. 17.1. Градуировочный график определения содержания углеводов с антроновым реактивом при 540 нм

Таблица 17.2

Содержание углеводов в некоторых пищевых продуктах

Наименование	Моно- и дисахариды, г/100 г	Крахмал, г/100 г
Сахар	99,8	0
Желатин	–	0,7
Крахмал	следы	80
Хлеб	0	50
Крупа кукурузная	2	70
Крупа рисовая	0,8	74
Молоко коровье	4,7	–
Капуста	4	0,5
Картофель	1,3	16
Лук	9	0,1
Апельсин	8	0
Яблоки	9	0,8
Говядина	–	–
Птица	0,5	–
Яйцо	0,7	–
Рыба	–	–

Методика 17.2. Определение содержания гликогена и редуцирующего сахара. Метод основан на разрушении животных белков щелочью, осаждении гликогена этанолом, кислотном гидролизе гликогена и количественном определении глюкозы в присутствии периодата.

ОБОРУДОВАНИЕ. Термостат или водяная баня на 100 °С. Пробирки, мерные колбы, пипетки. Микроизмельчитель тканей. Колба вместимостью 50 мл с обратным холодильником и устройством для подогрева

20–100 °С. Установка для фильтрования через бумагу. Роторный испаритель. Мерные колбы вместимостью 100–500 мл. Центрифуга 7000 G. Микробюретка вместимостью 10 мл. Колбы конические Эрленмейера вместимостью 10–250 мл.

РЕАКТИВЫ. Гидроксид натрия хч, 60 % водный раствор. Дистиллированная вода. Спирт этиловый ректификованный, 60, 70, 80, 90 и 96 % водный раствор. Эфир диэтиловый чда. Соляная кислота хч, концентрированная и 2 % раствор. Серная кислота хч, концентрированная, 4 н. раствор, 10 % раствор. Гидроксид натрия хч, 60 % раствор. Ацетат свинца чда, 30 % раствор. Индикаторная бумага рН. Сульфат натрия хч, 1 М раствор. Периодат 0,01 н. раствор, готовят растворением 0,17 г периода натрия $\text{Na}_2\text{H}_3\text{IO}_6$ (ММ 272) в мерной колбе вместимостью 500 мл, приливают 200 мл дистиллированной воды и 5 мл 4 н. серной кислоты, встряхивают до полного растворения, фильтруют. Калия йодид хч, 5 % раствор. Натрия тиосульфат $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ хч, 0,01 н. раствор. Крахмал чда, готовят смешением 0,5 г крахмала с 10 мл воды и, при перемешивании, с 90 мл кипящей воды.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ. 3 г измельченного образца мяса смешивают в колбе с 5 мл 60 % раствора NaOH и нагревают при 100 °С в течение 45 мин, добавляют 5 мл воды и при перемешивании осаждают гликоген добавлением 40 мл этилового спирта. Для ускорения осаждения в смесь добавляют несколько капель серной кислоты, образующийся сульфат натрия способствует осаждению гликогена. Смесь отстаивают в течение 24 ч, центрифугируют, отделяют надосадочную жидкость с помощью пипетки. Осадок последовательно промывают по 15 мл 60, 70, 80, 90 и 96 %-ым этанолом и эфиром, отделяя жидкость центрифугированием. Остатки эфира удаляют испарением на водяной бане.

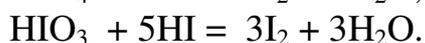
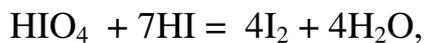
К осадку гликогена, добавляют 5 мл горячей дистиллированной воды, нейтрализуют смесь добавлением концентрированной и 2 % соляной кислоты, добавляют 30 мл 2 % соляной кислоты и гидролизуют гликоген нагреванием смеси при 100 °С в течение 3 ч.

Полученный гидролизат количественно переносят в мерную колбу на 250 мл и доводят объем раствора до метки.

Глюкоза окисляется в кислом растворе периодатом по уравнению:



Избыток периодата и образовавшийся иодат определяются после добавления йодида калия в виде эквивалентного количества йода титрованием раствором тиосульфата.



В колбы вносят 8 мл 0,01 н. раствора периодата, 2 мл исследуемого раствора, содержащего глюкозу и 2 мл 10 % раствора серной кислоты. Параллельно ставят холостой опыт с 2 мл воды. Смеси прогревают в течение 15 мин при 100 °С, охлаждают проточной водой, добавляют в каждую колбу по 3 мл 5 % раствора KI, титруют выделившийся иод 0,01 н. раствором тиосульфата натрия, добавляя к концу титрования 5 капель 0,5 % раствора крахмала в качестве индикатора.

Содержание редуцирующего сахара (глюкозы) X (мг/100 г образца, мг %) рассчитывают по формуле: $X = 0,927 \cdot 0,18 \cdot (V_1 - V_2) \cdot 250 \cdot 100 / g \cdot V$, где 0,927 – коэффициент пересчета глюкозы в гликоген; 0,18 – количество мг глюкозы, соответствующее 1 мл 0,01 н. раствора тиосульфата; 0,927 – коэффициент пересчета глюкозы в гликоген; $(V_1 - V_2)$ – разность количества 0,01 н. раствора тиосульфата, пошедшего на титрование испытуемой и контрольной пробы, мл; g – навеска образца; V – количество раствора глюкозы, взятое для определения, мл.

Углеводы входят в состав пищевых продуктов (табл. 17.1) в связанном состоянии с другими биополимерами, образуя химические комплексы различной прочности, поэтому количественное определение сахаров связано с разрушением этих комплексов в условиях, когда возможно разрушение и самих сахаридов, что приводит к неоднозначности результатов количественного анализа (методика 17.1).

Практическое значение гидролизатов углеводсодержащего сырья. Проблема гидролиза углеводов целлюлозы и целлюлозосодержащих материалов с давних пор привлекает внимание исследователей.

В связи с ростом народонаселения Земли и активным поиском источников пищевых ресурсов на основе непищевого сырья и новых источников энергии возрос интерес к целлюлозосодержащему сырью, возобновляемые запасы которого практически безграничны. Гидролиз целлюлозы позволяет получать глюкозу, которую можно использовать для производства кормовых и пищевых углеводных препаратов, получать из нее спирт для энергетических целей, а также она может стать исходным продуктом для производства глюкозо-фруктозных сиропов [1].

Известны промышленные способы гидролиза древесины до глюкозы, но они приводят к частичной деградации последней и образованию нежелательных примесей, от которых необходимо освободиться. Для проведения кислотного гидролиза требуется дорогое, стойкое к коррозии оборудование. Поэтому наиболее перспективным является использование целлюлаз для гидролиза целлюлозосодержащего сырья. Целлюлитические ферменты с успехом применяют в самых разных производствах [1] (спиртовая, пивоваренная, пищевоконцентратная промышленность, хлебопечение, кормопроизводство и др.), где сырьем являются растительные материалы или отходы переработки растений. Использование целлюлаз повышает вы-

ходы целевого продукта и позволяет подойти к созданию безотходных технологий [2].

Целлюлитическим ферментам принадлежит будущее, так же как и амилолитическим. Однако крахмал и целлюлоза – очень сложные субстраты для действия ферментов, и еще нет ферментов и микробных продуцентов, которые бы в полной мере были экономически рентабельными и удовлетворяли потребности отраслей, применяющих амилазы и целлюлазы [3].

Поэтому необходимо проводить дальнейшие работы в данной сфере для дальнейших исследований субстратов целлюлозы и крахмала и способах увеличения выхода конечных продуктов [4].

Технологические приемы получения гидролизатов на основе растительного сырья. Среди многочисленных субстратов для обработки целлюлитическими ферментами одним из наиболее значимых является пивная дробина.

Пивная дробина представляет собой отход пивоваренного производства, это нерастворенная при затирании часть зернопродуктов, которая остается после фильтрования сусла и промывания горячей водой. Образуется в процессе фильтрования затора в виде осадка после отделения жидкой части пивного сусла, когда максимально возможное количество экстрактивных веществ перешло в пивное сусло [5].

Свежая дробина представляет собой гущу светло-коричневого цвета со специфическим ароматом и вкусом. В ней содержатся оболочки зерна, неосахаренный крахмал, белковые вещества, танины. Их используют в качестве субстрата для получения водорастворимой углеводной фракции. Следует также отметить, что целлюлоза в пивной дробине относится к так называемой модифицированной, частично обработанной целлюлозе, в которой нарушены водородные связи и фибриллярная структура. Несомненно, состояние субстрата будет существенно влиять на процесс деградации и выход конечных продуктов.

Количество образующейся пивной дробины зависит от многих факторов – качества и ассортимента затираемых зернопродуктов, используемой техники и технологии фильтрования затора, способов выгрузки дробины в сборники.

Обычно из 100 кг стандартного солода влажностью 4–5 % и экстрактивностью 74–75 % образуется 110–120 кг дробины влажностью 75–80 %. Хранят дробину с влажностью 85–80 % в стальных сборниках, бетонных или стальных бункерах.

Химический состав дробины колеблется в зависимости от качества и ассортимента перерабатываемых продуктов и сорта выпускаемого пива. В среднем в пивной дробине содержится (в %): воды – 75, сухих веществ – 25, в том числе: сырого протеина – 5,3...7,1; сырой клетчатки – 3,5...4,0; жира – 1,5...1,8; БЭВ – 8,7...11,6; золы – 0,5...0,7.

Зола дробины богата солями кальция и фосфора. Пивная дробина со-

держит (% к АСВ): сырой жир – 8,0...9,0; сырая клетчатка – 17,5...20,0; гемицеллюлоза – 33,5...42,0; зола – 5,5; лигнин – 10,0; крахмал – 2,8.

Жидкая пивная дробина влажностью 89,6% имеет плотность 641,2 кг/м³ и вязкость 5,12 10⁻⁶ м²/с. Спиртовая дробина содержит 5–7 % сырого протеина, 0,5–2,0 % золы, 1–2 % сырого жира, 10–20 % безазотистых экстрактивных веществ (БЭВ).

По питательной ценности 1 кг пивной дробины соответствует 1 кг ячменя, а калорийность сырой пивной дробины составляет 115 ккал/г, а сухой – 440 ккал/г. Сухая пивная дробина содержит 27,1 % сырого протеина.

Протеин дробины по составу аминокислот можно считать полноценным, т.к. в нем содержится все незаменимые аминокислоты. Однако углеводный состав дробины представлен соединениями, которые не гидролизуются в организме свиней и домашней птицы. Это ограничивает кормовую ценность пивной дробины и позволяет использовать ее в нативном виде только для откорма КРС. Во всех остальных случаях дробина должна быть подвергнута предварительной переработке.

Во многих странах широко практикуются всевозможные способы переработки пивной дробины, такие как: сушка дробины, ее консервация, силосование, утилизация на твердую и жидкую фазу с использованием консервирующих веществ [5]. В ряде работ [6–13] предлагается на основе сухой пивной дробины получать муку, которую используют при получении ценных продуктов питания, например, колбасных изделий, мясных полуфабрикатов, а также в качестве добавки при изготовлении диетического хлеба, отрубей, мюсли, кондитерской выпечки.

Однако в России сушка пивной дробины не производится. В последние годы появились публикации об использовании пивной в качестве субстрата для получения биотехнологическими методами различных веществ и кормовых добавок. Так, в работах [14–16] предлагается использовать пивную дробину в качестве источника питательной среды для культивирования продуцентов лимонной кислоты, а также комплекса целлюлаз. Для этого предлагается свежую пивную дробину со сроком хранения не более 2-х суток добавлять в количестве 15 – 20 % к массе субстрата, содержащего солому и лузгу. В результате продуктивность штаммов-продуцентов увеличивается на 70 %, а сама биомасса обогащается белком и жиром.

В работе [17] предлагается использовать пивную дробину для получения ксилита. Показано, что из 1 т дробины можно получить 30 кг ксилита и 50 кг белкового концентрата. Эти продукты можно использовать в хлебопекарной промышленности, поскольку они не содержат холестерина и жиров. В работе [17] также описана возможность получения из дробины активированного угля, уголекислоты в виде сухого льда, энтеросорбентов, волокнистых плит, фурановых смол.

Для увеличения питательной ценности пивной дробины необходимо

провести гидролиз входящих в ее состав углеводов. Наиболее целесообразно использовать для этой цели ферменты (целлюлазы).

В патенте [18] описан способ получения глюкозы из пивной дробины, основанный на предварительной обработке сырья путем экструзии для разрушения ее кристаллической структуры и увеличения его удельной поверхности. Полученный экструдат далее подвергают ферментативному гидролизу ферментными препаратами *Asp. mix B 2000* или *B1 mix* или целловиридином Г20х.

Для биodeградации углеводов пивной дробины используют также микроорганизмы. Среди грибов ведущая роль в расщеплении целлюлозы принадлежит грибам *Trichoderma*, которые способны также к частичному расщеплению лигнина, что повышает степень конверсии субстрата.

В результате направленного поиска был выделен штамм *Bacillus subtilis 8130* из слепой кишки моногастричных растительноядных животных и птиц с естественной высокой степенью перевариваемости клетчатки (различных видов полевок, кроликов, ленивца, глухаря и др.), обладающий высокой целлюлитической активностью [19].

В последние годы многие исследователи при гидролизе растительного сырья отдают предпочтение мультиферментным композициям, содержащим оптимально сбалансированный уровень и соотношение отдельных целевых ферментов, участвующих в биологической деградации сырья. Такие композиции обычно стандартизуют по 3–4 ферментам. Использование мультиэнзимных композиций позволяет в промышленных условиях осуществлять гидролиз высокобелкового растительного сырья, например, ржи, ячменя, овса, отрубей, отходов сельского хозяйства [20]. На Российском рынке основными поставщиками мультиэнзимных композиций являются ОАО «Восток», ПО «Сиббиофарм», ОАО «Биосинтез». За рубежом мультиэнзимные препараты выпускаются фирмами «Хехст-Руссель-Вет» (Германия), «Кемен» (США), «Финнфидс» (Финляндия) и др.

В работе [21] исследован ферментативный гидролиз пивной дробины под действием целлюлитического комплекса ферментов грибов *Trichoderma viride*, бактерий *Bacillus cereus* БП-46 и технических мультиэнзимных композиций, включающих целлюлитические и протеолитические ферменты. Показано, что гидролиз с помощью мультиэнзимных композиций оказывается более эффективным при более низких нормах расхода ферментного препарата (до 0,1 % от массы субстрата).

Что касается получения белковых продуктов на основе пивной дробины, то такие данные в литературе отсутствуют. Выделение белков из растительного сырья подробно описано на примере сои и основывается на методах щелочной и кислотной экстракции. Поскольку пивная дробина также как и соя может быть отнесена к высокобелковым субстратам, то целесообразно разработать технологические приемы получения на ее основе и белковых фракций.

Ключевой стадией получения ферментативных гидролизатов является выбор ферментного препарата, обладающего небольшой стоимостью и высокой эффективностью. Поэтому далее рассмотрим наиболее перспективные для применения в промышленных условиях препараты целлюлаз и амилаз.

Характеристика целлюлитических ферментов. Субстратом для действия целлюлаз является целлюлоза или продукты ее частичной дегградации.

Целлюлоза является главной составной частью всякого растительного материала. Целлюлоза содержится в древесине, однолетних растениях, траве, льне, конопле, хлопке, оболочках семян, в морских и пресноводных водорослях. Очень редко встречается целлюлоза в клетках бактерий и животных клетках. Среди животных организмов некоторое количество целлюлозы содержат ракообразные и улитки.

Целлюлоза по молекулярному строению является высокополимерным полисахаридом растений, состоящим из остатков глюкозы, соединенных между собой β -1,4-гликозидными связями. Целлюлоза – линейный полимер. Большинство остатков глюкозы в целлюлозе содержат три свободных гидроксильных – у 2-го, 3-го, 6-го углеродных атомов, которые являются основой для образования водородных связей и формирования прочных волокон. В среднем одна нить целлюлозы состоит из 6–12 тыс. глюкозидных остатков с молекулярной массой около $1,0 \cdot 10^6 - 2,0 \cdot 10^6$ Да. Количество звеньев макроцепи в молекулах нативной целлюлозы может составлять более 1 тыс. глюкозидных единиц. Степень полимеризации (СП) глюкозы может меняться. Как показано на рис. 17.2, элементарные звенья макромолекулы целлюлозы находятся в форме «кресла», гидроксильные группы находятся в горизонтальном положении, а атомы водорода – в вертикальном. Каждое второе звено цепи повернуто на 180° по отношению к оси молекулы. Молекулярное строение целлюлозы определяет ее надмолекулярную структуру и физико-химические свойства. Линейные гидрофильные молекулы целлюлозы объединяются в виде параллельных нитей в характерное образование, называемое фибриллами. В них группы параллельно расположенных цепей молекулы связаны между собой большим количеством водородных связей. Первичная фибрилла представляет собой наименьшее надмолекулярное звено волокна целлюлозы.

В первичных фибриллах однородные высокоупорядоченные кристаллические зоны чередуются с неоднородными и менее упорядоченными аморфными зонами. В кристаллических зонах существует трехмерный дальний порядок в расположении цепей. В аморфных участках дальний порядок отсутствует и сохраняется лишь общая продольная направленность цепей.

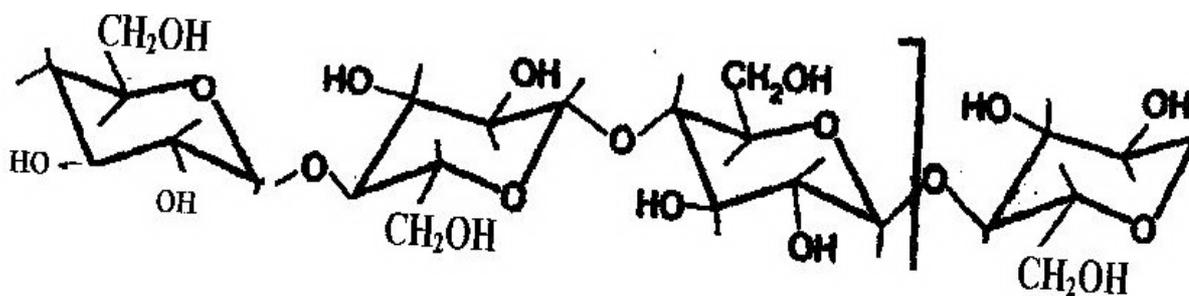


Рис. 17.2. Строение молекулы целлюлозы

Первичные фибриллы целлюлозы соединяются между собой с помощью водородных связей в микрофибриллы, которые и являются основой волокон целлюлозы [22–36].

Микрофибриллы состоят из нескольких фибрилл и в сечении имеют примерно постоянные размеры. Как видно из рис. 17.3, между первичными фибриллами в микрофибрилле находятся аморфные цепи целлюлозы, а также гемицеллюлоза и лигнин. Количество цепей целлюлозы в микрофибриллах может достигать нескольких сотен.

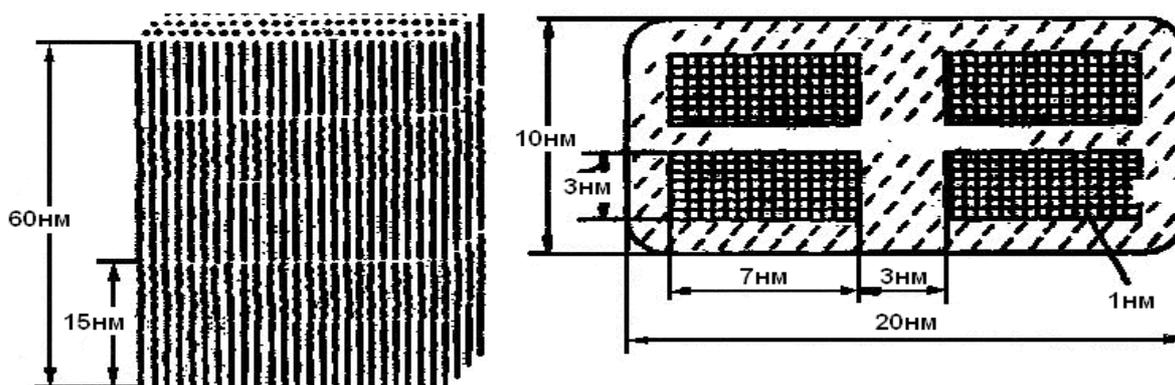


Рис. 17.3. Строение микрофибрилл целлюлозы

Целлюлозное волокно может быть различной степени прочности. Это зависит от степени кристалличности структур микрофибрилл. Этот показатель отражает плотность упаковки целлюлозы и соотношение аморфных и кристаллических участков в ее структуре.

Гетерогенная фибриллярная структура целлюлозных волокон способствует возникновению межфибриллярных пор и капилляров. Они есть в живых растениях, капилляры остаются в волокнах целлюлозы и после удаления из нее сопутствующих веществ химической обработкой.

В волокне целлюлозы могут быть макро- и микропоры. Макропоры существуют как тончайшие пространства среди фибриллярных пучков целлюлозы. Имеют округлую или удлиненную форму и не образуют пустот непрерывной длины. Однако в целом макро- и микропористая система пространств в целлюлозных волокнах организована так, что она протяги-

вается через всю длину как сложная сеть каналов различного происхождения.

Целлюлоза в растениях очень редко находится в свободном состоянии, ей, как правило, сопутствуют гемицеллюлоза и лигнин. Если гемицеллюлозы достаточно быстро гидролизуются, и от них легко освободить целлюлозу, то лигнин очень трудно удаляется и отрицательно действует на ферменты. Кроме того, лигнин резко снижает удельную поверхность целлюлозы. Высококристаллическая целлюлоза медленно и плохо атакуется ферментами. Практически нативную целлюлозу, содержащую лигнин, ферментами гидролизовать невозможно.

Поэтому нативную целлюлозу необходимо предобрабатывать, и только тогда ее можно будет использовать в качестве субстрата для целлюлитических ферментов. Природную древесину можно разделить на два типа: лигноцеллюлоза (древесина, кустарники, листья, трава, морские и речные макро- и микроводоросли) и чистую целлюлозу (хлопок, отходы его переработки и лен). Эти типы древесины содержат в своем составе целлюлозу с достаточно упорядоченной структурой, поэтому биodeградация такой целлюлозы сильно затруднена [37–40].

Гидролиз лигноцеллюлоз еще более сложен, т.к. лигнин, будучи включенным в структуру целлюлозных фибрилл, является физическим барьером, затрудняющим их доступность для молекул ферментов.

Целлюлазы почти исключительно синтезируются микроорганизмами, а именно анаэробными бактериями *p. Clostridium* и микроскопически грибами. Целлюлаза также разрушается представителями многих родов микроорганизмов – *Alternaria tennis*, *Aspergillus amsterodamy*, *A. orysae*, *A. tereus*, *Fusarium culmorum*, *Thrychoderma lignorum*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *Cytophaga* и многими другими.

При характеристике целлюлитических ферментов следует обязательно учитывать состояние субстрата – целлюлозы.

Необходимо помнить, что различают два вида целлюлозы: нативная – ничем не обработанная целлюлоза, которая сохранила исходное строение и структуру микрофибрилл (хлопок, древесина, фильтровальная бумага), и так называемая модифицированная, частично обработанная целлюлоза, в которой нарушены водородные связи и фибриллярная структура волокна.

Учитывая фактор нерастворимости субстрата (целлюлозы), главное свойство ферментов при гидролизе – это их способность адсорбироваться на нерастворимом субстрате (целлюлозе). Способность фермента адсорбироваться даже более важна, чем его каталитическая активность, т.к. если этой сорбции не будет, то и гидролиза субстрата может не быть.

Экспериментальная проверка показала, что целлюлазные ферменты из различных микроорганизмов в сотни и тысячи раз различаются по способности адсорбироваться на целлюлозе, и, что эта способность коррелируется с глубиной гидролиза кристаллической целлюлозы [41].

Таким образом, была выявлена некоторая зависимость – чем выше адсорбционная способность фермента, тем интенсивнее на всех стадиях он гидролизует нативную целлюлозу. Наряду с высокой каталитической активностью ферментов, это свойство является решающим для последующего применения ферментных препаратов для деградации целлюлозы.

Наиболее доступным промышленным целлюлитическим ферментным препаратом являются комбинированные препараты целловиридин Г3х и Г20х, которые различаются по своей активности, соответственно, 500 и 2000 ед/г. Они содержат комплекс целлюлаз: экзоглюкозидазу, эндоглюканазу, пектиназу и целлобиогидролазу. Рассмотрим каталитические особенности каждого из этих ферментов.

Эндоглюканаза. Используется для расщепления ксилоглюкана. Ксилоглюкан – это основной гемицеллюлозный полисахарид, обнаруженный в клеточной стенке растений. Он состоит из целлюлозоподобной боковой цепи с β -1,4-связанными β -D-глюкозными остатками, которые часто соединяются по C⁶ углеродному атому с боковыми цепями α -D-ксилозы- PO_4^{3-} , (1 \rightarrow 6)- β -D-галактозы- PO_4^{3-} , (1 \rightarrow 2)- α -D-ксилозы- PO_4^{3-} (1 \rightarrow 6) или α -фруктозы (1 \rightarrow 2)- PO_4^{3-} , β -D-галактоза- PO_4^{3-} , (1 \rightarrow 2)- α -D-ксилоза- PO_4^{3-} (1 \rightarrow 6) остатков. Ксилоглюкан отвечает за образование целлюлозо-глюкановой сетки [42, 43]. Частичное ее разрушение требуется для клеточного роста и размножения. Считают, что метаболизм ксилоглюкана играет важную роль в дифференциации клеток, их делении, процессах регуляции роста и развития растений [44–48]. Недавно сообщалось, что введение ксилоглюкана с помощью ксилоглюкан-эндотрансгликозидазы в клеточную стенку замедляет рост клеток, тогда как ксилоглюкановый олигосахарид (ксилозан)₃-глюкоза ускоряет рост клеток [49]. Было показано, что метаболизм ксилоглюкана контролирует и регулирует рост растительных клеток. В клеточных стенках растущего растения ксилоглюкановые олигосахариды могут регулировать рост клеток путем положительной или отрицательной обратной связи.

Недавно была выделена уникальная олигоксилоглюканспецифичная β -глюкозидаза: олигоксилоглюканвосстанавливающая концевая целлобиогидролаза (OXG-RCBH) из грибов *Geotrichum sp M128* [174]. OXG-RCBH является экзоглюканазой, которая узнает структуру восстанавливающего конца олигоксилоглюкана и отщепляет два гликозидных остатка от главной цепи. В ходе дальнейших исследований было установлено, что *Geotrichum sp M128* также продуцирует ксилоглюканспецифичную глюкозидазу с эндоглюканазной активностью, а именно ксилоглюканспецифичную эндо- β -1,4-глюканазу [50]. При изучении субстратной специфичности данного фермента было установлено, что он гидролизует заметные количества ксилоглюкана, а не других β -глюканов. Это позволяет предположить, что для активности ксилоглюканспецифичной эндо- β -1,4-глюканазы требуется ксилозная связь. Для дальнейшего изучения суб-

стратной специфичности использовали различные олигосахариды. Было установлено, что для обеспечения активности фермента на невосстанавливаемом конце субстрата должны располагаться, по крайней мере, два глюкозидных остатка. На восстанавливаемом конце также требуется наличие двух гликозидных остатков. Предполагают, что ксилоглюканспецифичная эндо- β -1,4-глюканаза имеет, по крайней мере, четыре таких остатка. Интересно, что данный фермент проявляет минорную активность по отношению к субстрату (ксилоглюкан)₃-глюкоза-ксилоглюкан, расщепляя его на (ксилоглюкан)₃ и глюкоза-ксилоглюкан. Следовательно, свободный глюкозидный остаток должен ингибировать ее активность, что и приводит к снижению степени гидролиза субстрата по второму пути. Обобщая полученные данные, исследователи [51] сделали вывод, что целлюбиаза имеет четыре активных центра, которые узнают ксилозную связь. В очищенном ферменте были определены аминокислотные последовательности N-аминокислотного конца, а также внутренние аминокислотные последовательности, входящие в состав активного центра. Ими оказались соответственно: Val-Thr-Ala-Glu-Leu-Lys; Leu-Ile-Tyr-Ala-Arg-Thr-Asp-Ile-Gly-Gly-Thr-Tyr; Ser-Ile-Val-Ala-Ala-Ser-Gly-Thr-Ala-Ile-Gln-Ser.

Целлюбиазы [52] (β -гликозидазы) – это экзоферменты, которые отщепляют моносахариды от невосстанавливающего конца ди- или олигосахаридов. В зависимости от удаляемого моносахарида β -гликозидазы называют β -глюкозидазами (глюкоза), β -галактозидазами (галактоза), β -ксилозидазами (ксилоза) и т.д. Часто одна и та же гликозидаза способна гидролизовать несколько различных моносахаридных остатков гликозидов. В этом случае термин β -глюкозидаза используется для наименования всех ферментов, которые отщепляют глюкозу [53].

У насекомых β -гликозидазы играют важную роль в переваривании целлюлозы и гемицеллюлоз, в отщеплении углеводных остатков от гликопротеинов [54], и могут также гидролизовать гликолипиды как предложили авторы [54]. Однако полностью функция многих β -гликозидаз не ясна, т.к. некоторые из них гидролизуют только синтетические субстраты.

Различия в специфичности β -гликозидаз были обнаружены даже у насекомых одного отряда. Для понимания молекулярных основ и физиологического значения этих различий необходимо охарактеризовать β -гликозидазы из различных источников, описать их специфичность, количество активных центров и аминокислотных остатков, отвечающих за катализ и связывание субстрата [53].

Две β -гликозидазы были выделены из *S. frugiperda*. Эти ферменты находятся в связанном или свободном состоянии в зависимости от ионной силы среды. Характеристика β -гликозидазы с молекулярной массой 50000 описана в работе [54]. Однако больший практический интерес представляет β -гликозидаза с молекулярной массой 47000 Да.

β -глюкозидаза с молекулярной массой 47000 Да представляет собой

мономерный фермент с двумя активными центрами. Это подтверждается следующими данными. Во-первых, по результатам анализа в очищенном препарате фермента присутствует только один пептид. Во-вторых, целлобиоза и амигдалин не способны ингибировать гидролиз β -галактозных связей, хотя они являются субстратами этого фермента. В-третьих, при pH 6,0 происходит уменьшение целлобиазной активности, но лактозная и галактозная активности не меняются. Для удобства активный центр, гидролизующий целлобиозу и амигдалин, назвали целлобиазным центром, а другой центр, гидролизующий по β -галактозным и лактозным связям – галактозидазным.

При использовании целлобиозы в качестве ингибитора гидролиза по β -глюкозным остаткам, оказалось, что наблюдаемое значение константы ингибирования K_i отличается от значения K_M , установленного для данного фермента. Это можно объяснить тем, что гидролиз по остаткам β -глюкозы происходит в обоих активных центрах β -гликозидазы. Было установлено, что активность по β -глюкозе остается после 100 % инактивации целлобиазы при pH 6,0. Это показывает, что галактозидазный активный центр также обладает некоторой активностью по β -глюкозным остаткам [54].

β -галактозидазные активные центры могут иметь несколько связывающих моносахаридные остатки участков. Эти участки, которые связывают остатки, находящиеся на невозстанавливаемом конце молекулы, назвали «1». Другие участки соответственно назвали «+1», «+2», «+3» и т.д. Гликозидная связь разрушается между «1» и «+1» участками [55].

Целлобиазный активный центр рассматриваемой β -гликозидазы связывает только субстраты, имеющие глюкозидные остатки, связанные β -1,4- или β -1,6-гликозидными связями на «1» и «+1» участках, что необходимо для гидролиза целлобиозы (глюкоза- β -1,4-глюкоза), гентиобиозы (глюкоза- β -1,6-глюкоза) и амигдалина (глюкоза- β -1,6-глюкоза- β -манделонитрил) и имеет небольшую активность по β -галактозным связям, что необходимо для гидролиза лактозы (галактоза- β -1,4-глюкоза) и ламинарибозы (глюкоза- β -1,3-глюкоза). Следует заметить, что β -1,6-связи гидролизуются преимущественно по сравнению с β -1,4-гликозидными связями, тогда как их гидролиз полностью подавляется гидролизом β -1,3-гликозидных связей. Однако не ясно, почему целлобиазный активный центр гидролизует β -глюкозные связи с такой высокой эффективностью.

Значения K_M уменьшаются в ряду субстратов целлобиоза – целлотетроза – целлопентоза. Это позволяет предположить, что целлобиазный активный центр имеет четыре участка, которые связывают остатки глюкозы. Неизменная способность к связыванию пятого глюкозного остатка целлопентозы и более низкое значение $k_{кат}$, наблюдаемое в случае целлотетрозы, также позволяет предположить наличие четырех активных участков. Гидролиз с невозстанавливаемого конца по остатку глюкозы от целлотетрозы приводит к образованию целлотриозы, которая предположи-

тельно является более прочно связанным субстратом для действия β -гликозидазы, что выражается в снижении константы $k_{\text{кат}}$.

Галактозидазный участок активного центра связывает остатки глюкозы и галактозы на участке «1» с практически одинаковыми энергиями связи (значения K_m) близки. Однако β -галактозидазные связи разрушаются в 27 раз быстрее, чем β -глюкозные. Связывание остатков глюкозы на участке «+1» галактозидазного центра практически невозможно, т.к. для лактозы наблюдается очень высокое значение K_m и его активность не ингибируется целлобиозой и амигдалином. С учетом этого, целлотриоза, целлотетроза и целлопентоза гидролизуются на целлобиазном центре. Лактоза же, как предполагают, гидролизуется на галактозидажном участке.

Установлено, что лактаза-флоридзин гидролаза млекопитающих также имеет два активных центра, локализованных в двух сходных пептидах с молекулярными массами 46000 Да и 53000 Да данного фермента. Один активный центр способен к гидролизу большинства дисахаридов (целлобиозы, ламинарибиозы и гектиобиозы), а другой гидролизует растительный гликозид флоридзин, лактозу и гликозилкерамиды [56 – 57].

В клетках *S. frugiperda* β -гликозидаза имеет два активных центра, которые находятся в белке с молекулярной массой 47000 Да [188]. Похожий результат был получен для β -гликозидазы, выделенной из *Abracris flavolineata*, которая также имеет два активных центра (один из них гидролизует целлобиозу и ламинарибозу, а другой – арил- β -гликозиды), расположенных в полипептиде с молекулярной массой 82000 Да [58].

Функцией целлобиазного активного центра β -галактозидазы *S. frugiperda* является гидролиз ди- и олигосахаридов, полученных при частичном расщеплении гемицеллюлозы. Полимер гемицеллюлозы имеет гликозидные остатки, связанные β -1,4; β -1,6 и β -1,3-гликозидными связями. Таким образом, за исключением β -1,3-гликозидных связей, образующиеся из гемицеллюлозы олигосахариды способны к дальнейшему расщеплению в целлобиазном активном центре [59].

Гентиобиоза (глюкоза-1,6-глюкоза) и амигдалин (глюкозо- β -1,6-глюкоза- β -1-манделонитрил) гидролизуются с одинаковой скоростью (одинаковое соотношение $k_{\text{кат}}/K_m$), тогда как приназин (глюкозо- β -1-манделонитрил) гидролизуется β -гликозидазой гораздо медленнее.

Пектиназа (полигалактоураназа) способна отщеплять остатки галактоуроносовой кислоты от конца полимерной цепи (экзо-атака), так и расщеплять гликозидные связи внутри полимерной цепи (эндо-атака) [57].

Характеристика амилолитических ферментов. К амилолитическим ферментам относятся α - и β -амилазы, глюкоамилаза, пуллуназа, изоамилаза и некоторые другие ферменты.

Амилазы бывают 2-х типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выраженной эндоамилазой является α -амилаза, способная к разрыву внутримолекулярных связей в высокополимерных цепях субстрата. Глюкоамилаза и β -

амилазы являются экзоамилазами, т.е. ферментами, атакующими субстрат с нередуцирующего конца.

Для гидролиза углеводных субстратов широко используются панкреатическая α -амилаза и грибная глюкоамилаза (*Aspergillus awamori*) [75]. Поэтому мы подробно остановимся на механизме действия именно этих ферментов.

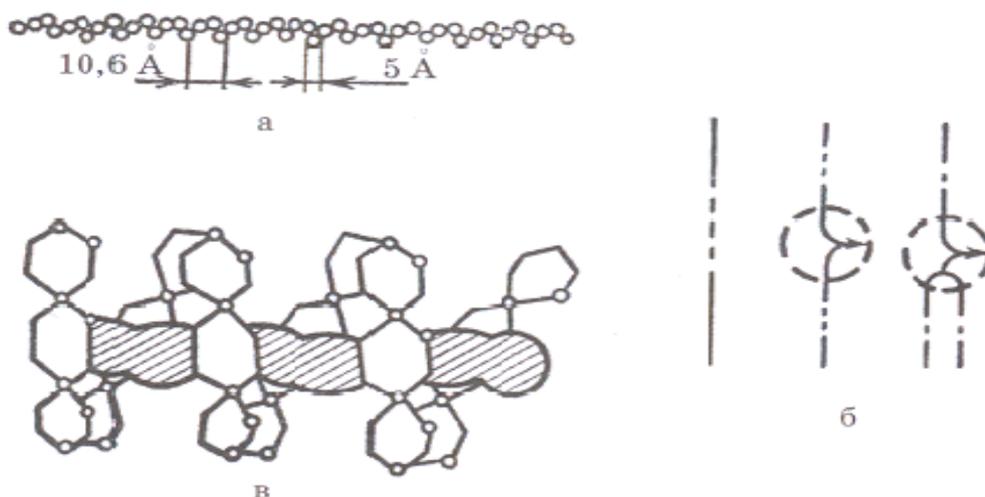


Рис.17.4. Строение амилозы. а – амилоза без аномальных отклонений; б – схема возможных ветвлений амилозы; в – спираль амилозы в растворе с заключенными в ее полость молекулами йода

При изучении механизма действия амилаз имеются определенные сложности, связанные, прежде всего, с однородностью используемого субстрата, поэтому необходимо остановиться подробнее на характеристике используемых субстратов [60].

Крахмал – растительный полисахарид с очень сложным строением. Это двухкомпонентное соединение, состоящее из 13–30 % амилазы и 70–85 % амилопектина. Оба компонента неоднородны, их молекулярная масса колеблется в широких пределах и зависит от природы крахмала. Амилоза – это неветвящийся полимер, в котором остатки глюкозы соединены α -1,4-гликозидной связью, степень полимеризации около 2000. В аномальных амилозах с одной – двумя α -1,6-связями полимеризация может возрасти до 6000 (рис.17.4).

Амилоза практически не обладает восстанавливающей способностью, т.к. в каждой ее молекуле имеется только одна свободная альдегидная группа.



Рис.17.5 Амилопектин, схема дихотомического деления амилопектина (по К. Мейеру): а – в плоскости; б – в пространстве

Молекула амилозы представляет собой растянутую спираль, шаг которой составляет $10,6 \cdot 10^{-10}$ м, и в каждый виток входит три остатка глюкозы. Максимальная длина молекулы амилозы достигает $7000 \cdot 10^{-10}$ м. В растворе спираль сжимается за счет увеличения витка, в котором уже участвует шесть остатков глюкозы. Строго говорить о величине молекулы амилозы нельзя, т.к. даже из одного образца крахмала извлекается амилаза с величиной молекулы 500–2000 остатков глюкозы [60].

Амилопектин имеет большую молекулярную массу, чем амилаза и более сложное строение. Это ветвящийся полисахарид. Предполагают, что амилопектин ветвится дихотомически, т.е. число звеньев, дающих ветвление, всегда на единицу больше числа звеньев, не дающих ветвления, а сумма этих чисел дает общее число звеньев по всей цепи (рис. 17.5). Но такое строение затрудняет объяснение упаковки молекулы амилопектина в крахмальном зерне и участие ее в образовании кристаллической структуры крахмального зерна. Существует также мнение [61], что цепи амилопектина не раздваиваются, а образуют симметричные тройные и более сложные ветвления.

Тогда молекула амилопектина приобретает продолговато-кустистую форму, обладающую большей компактностью в пространстве. Исследования [62] в этом направлении были проделаны Ч. Мертье. Результаты частичного кислотного гидролиза крахмала, дифракция рентгеновских лучей, ферментативный гидролиз с последующим разделением продуктов на сефадексе G50 позволили выдвинуть новую модель строения амилопектина, представленную на рис. 17.6.

Как видно из рисунка, молекула построена как бы в виде сочетания кистей винограда. В этой модели чередуются компактные области с упорядоченной структурой: обладающие кристаллическостью, медленно гидроли-

зубые, и менее упорядоченные участки, богатые точками ветвления. Отсутствие кристалличности приводит к быстрой гидролизуемости. «Кристаллические» участки имеют размер примерно $60 \cdot 10^{-10}$ м, что соответствует степени полимеризации (СП) равной 15. Некоторые цепи типа В принимают участие в построении 2-х гроздей (СП-45), проходя через две упорядоченные и две неупорядоченные зоны. Предполагаемая Ч.Мерсье схема амилопектина несколько отличается от схемы К. Мейера [190]. Главное отличие состоит в том, что цепи А (СП=15) и В (СП=45) не полностью совпадают с наружными ветвями В Мейеровской модели.

Исследования в этой области продолжаются и в настоящее время. Поскольку амилопектин очень сложно извлечь из крахмального зерна в нативном виде, поэтому обе эти модели до сих пор упоминаются в литературе. Молекулы амилопектина – одни из самых крупных молекул (молекулярная масса = $5 \cdot 10^8$ Да). Ветвление гликозидной цепи осуществляется с помощью α -1,6-связей, количество которых составляет 4–5 % от суммы α -1,4 и α -1,6- связей в амилопектине. В состав амилопектина входит от 0,012 до 0,111 % фосфора, который, по-видимому, присоединяется к 6-ому углеродному атому в глюкозном остатке [63].

Амилазная активность полиферментных препаратов, например панкреатина, может быть определена по методике 17.6.

Методика 17.6. Определение амилазной активности панкреатина. Панкреатин представляет собой полиферментный препарат, применяемый в качестве лекарственного вещества в медицинской практике и получаемый из поджелудочной железы убойного скота. В панкреатине в качестве основных компонентов содержится комплекс протеиназ и амилаз, поэтому панкреатин проявляет протеолитическую (протеазную) и амилолитическую (амилазную) активности. Протеазная активность панкреатина обуславливает способность расщеплять белки и пептиды, а амилазная активность проявляется в способности гидролизовать крахмал.

За единицу амилолитической активности принимается такое количество фермента, которое в данных условиях эксперимента гидролизует крахмал со скоростью образования одного микроэквивалента декстринов в одну минуту.

Реактивы и материалы. 1. 1 % -ный раствор крахмала. Раствор готовят суспензированием 1 г растворимого крахмала (ГОСТ 10163–76) в 25 мл дистиллированной воды при температуре 30–40 °С с последующим добавлением 75 мл кипящей воды. Раствор кипятят, перемешивая, в течение 3 мин. Срок хранения раствора не более 2 сут. 2. Фосфатный буфер рН 6,8. Готовят раствор 1 растворением 27,2 г монофосфата калия KH_2PO_4 (ГОСТ 4198–75) в 1 л дистиллированной воды. Раствор 2 получают растворением 71,5 натрия фосфорнокислого двузамещенного

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (ГОСТ 4172–76) в 1 л дистиллированной воды. Смешивают 1:1 растворы 1 и 2. 3. 0,2 М раствор хлорида натрия. Раствор готовят растворением 0,58 г NaCl в 50 мл воды. 4. Раствор препарата, свежеприготовленный. Навеску 0,06 г фермента (панкреатина) растворяют в мерной колбе в 50 мл фосфатного буфера рН 6,8 и доводят объем раствора до 100 мл добавлением фосфатного буфера рН 6,8. 5. 2 М раствор HCl . 6. 0,1 М раствор йода. Раствор готовят растворением 13 г йода кристаллического I_2 и 36 г калия иодида KI в 50 мл воды с последующим доведением объема раствора водой до объема 1 л. 7. Раствор серной кислоты (3,5 М). Разбавленный раствор готовят смешением четырех объемов воды и одного объема концентрированной H_2SO_4 . 8. 0,1 М раствор тиосульфата натрия. Раствор готовят растворением 24,8 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды. Перед использованием проводят контрольное титрование 0,1 М раствором йода (готовят из фиксанала) с крахмалом для определения поправочного коэффициента (K). 9. Вода дистиллированная. 10. Термостат, обеспечивающий поддержание температуры в интервале 30–40 °С. Секундомер. Мерные колбы вместимостью 50, 100, 1000 мл.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ. 1. В две конические колбы Эрленмейера со шлифами вместимостью 250 мл вносят по 25 мл 1 %-ного раствора крахмала, 10 мл фосфатного буфера рН 6,8, 1 мл 0,2 М раствора хлорида натрия, закрывают пробками, помещают в термостат с температурой $(37,0 \pm 0,5)$ °С и выдерживают в течение 10 мин.

2. Затем в колбу № 1 (опытная проба) прибавляют 1 мл раствора препарата, быстро перемешивают, возвращают колбу в термостат и включают секундомер. В колбу № 2 (контроль) прибавляют по 1 мл 2 М раствора HCl и раствора препарата, перемешивают и возвращают в баню. Через 10 мин после прибавления раствора препарата в колбу № 1 вносят 1 мл 2 М раствора HCl (останавливают процесс работы фермента), колбы вынимают и охлаждают до комнатной температуры (можно под струей холодной воды).

3. В каждую колбу вносят по 20 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,1 М раствора йода и сразу же 45 мл 0,1 М раствора NaOH . Колбы помещают в шкаф, в темное место и выдерживают в течение 15 мин.

4. После выдержки в колбы, содержащие избыток непрореагировавшего йода, прибавляют по 4 мл раствора серной кислоты, 2 капли раствора крахмала и титруют 0,1 М раствором тиосульфата натрия.

Активность (A) препарата в амиллитических единицах на грамм определяют по формуле: $A, \text{ЕД/г} = 100 / [1/5(v - a) - 0,006]t$, где v – количество мл 0,1 М раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование контрольной пробы; a – количество мл 0,1 М раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование опытной пробы; t –

навеска препарата, г. Активность 1 г качественного фермента не должна быть меньше 10000 ЕД.

Гликоген – это полисахарид животного происхождения, он найден в тканях животных и у некоторых микроорганизмов. По строению он подобен аминоклетчатке, но расстояние между точками ветвления почти в два раза меньше (10–14 остатков глюкозы), поэтому его молекулярная масса меньше и составляет $(2–30) \cdot 10^6$ Да (рис. 17.7) [64].

Структура гликогена основана на строгой регулярности ветвления, чем определяется большая уплотненность и компактность молекулы. Т.к. длина цепи небольшая, то быстро наступает предел ветвления из-за недостатка пространства. Это было доказано методом негативного контраста. Гликоген, выделенный из печени крысы, представлял собой крупные агрегаты диаметром $(600–2000) \cdot 10^{-10}$ м, названные α -частицами. Эти частицы при $pH < 4,5$ могут распадаться на более мелкие, так называемые β -частицы, имеющие диаметр $300 \cdot 10^{-10}$ м, которые в свою очередь распадаются на γ -частицы с диаметром $200 \cdot 10^{-10}$ м.

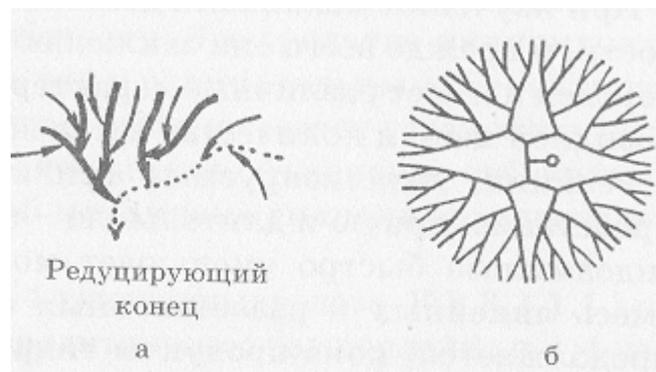


Рис. 17.6. Схема строения разветвленной молекулы гликогена: а – схема строения гликогена: 1 – цепи, соединенные связью α -1, 6; 2 – цепь, к которой присоединена одна или несколько цепей 1, а сама она связана с остальной частью молекулой гликогена α -1,6-связью (толстые линии); 3 – цепь, которая имеет одну редуцирующую группу P ; б – схема регулярного ветвления молекулы гликогена (-о-редуцирующий конец)

Зная размеры этих частиц и объем глюкозного остатка ($169 \cdot 10^{-10}$ м) гликогена, для α -частиц площадь поверхности составит (предел ветвления) $3 \cdot 10^6$, для β -частиц $2 \cdot 10^4$, для γ -частиц – $2 \cdot 10^2$. Подобные частицы были обнаружены и в цитоплазме дрожжей.

Реакции, контролируемые амилазами, имеют две стадии: короткую – предстационарную и длительную – стационарную. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя

смесь линейных и разветвленных олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться иодом; он протекает значительно медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы. Поэтому конечные продукты гидролиза α -амилазами могут быть различными [65]. Первая стадия воздействия фермента на субстрат, хотя и носит неупорядоченный характер, имеет для всех видов α -амилаз сложный механизм (рис. 17.8).

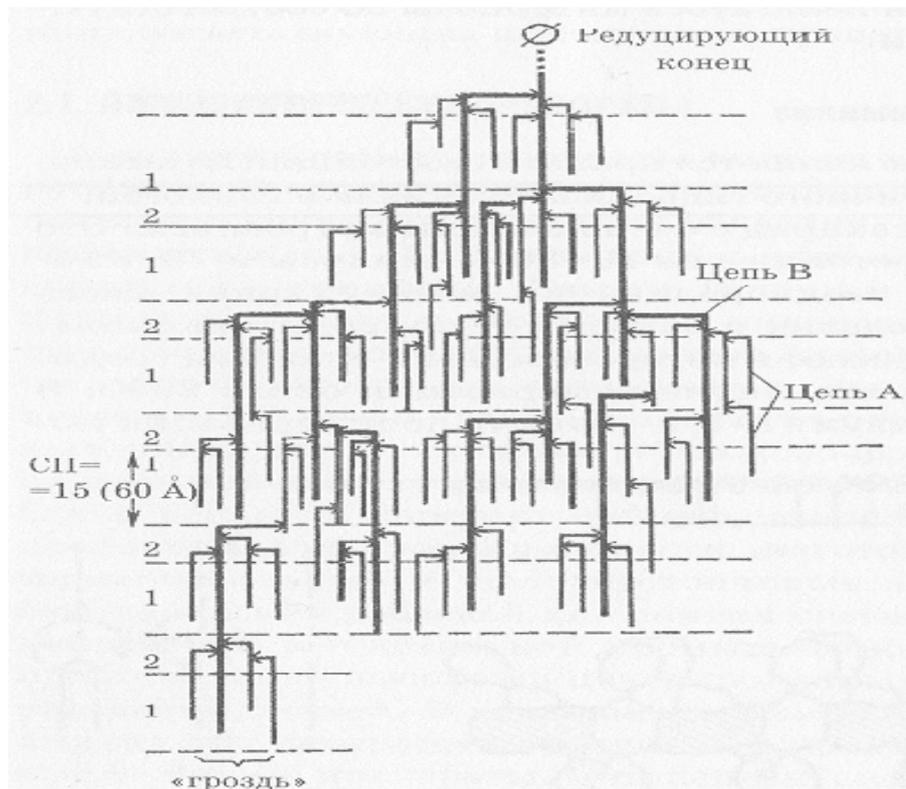


Рис. 17.7. Строение амилопектина по Ч. Мерсье: 1 – компактная область; 2 – менее компактная область

Существуют две гипотезы о механизме действия α -амилаз на субстрат [66]. Первая из них предполагает, что, воздействуя на субстрат по одноцепочечному или молниеносному механизму, экзоамилаза образует фермент-субстратный комплекс с захватом нередуцирующего конца цепи. Дальнейшее продвижение фермента по этой цепи происходит до полного гидролиза субстрата. По второй гипотезе, β -амилаза и глюкоамилаза действуют на субстрат путем механизма множественной атаки, т.е. фермент образует комплекс с молекулой субстрата, затем через несколько этапов этот комплекс распадается и фермент связывается с новой молекулой субстрата. Для полного гидролиза субстрата по этому механизму одна молекула субстрата должна образовывать много раз фермент-субстратные ком-

плексы. При этом возможен гидролиз нескольких связей в одном каталитическом акте.

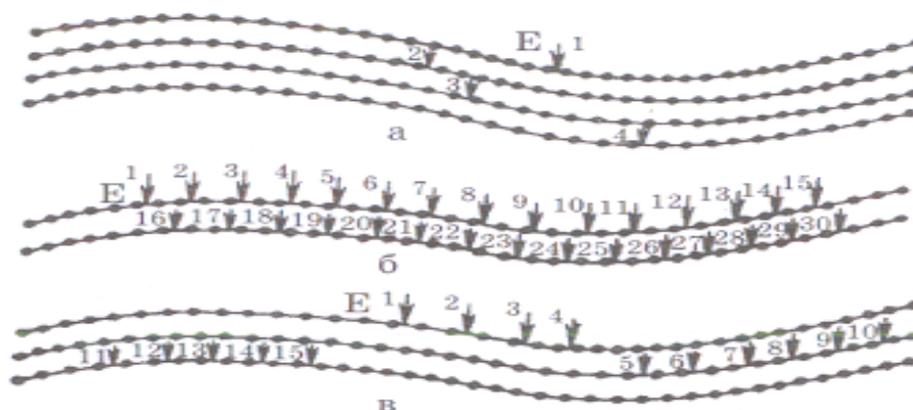


Рис.17.8. Гипотетическая модель механизма действия амилаз на линейные полисахариды: а – неупорядоченная атака; б – одноцепочная или «молниеобразная» атака; в – множественная атака

Механизм воздействия амилаз на субстрат может быть рассмотрен с нескольких позиций:

- 1) вид разрываемой связи (α -1,4 или α -1,6);
- 2) тип воздействия на субстрат (экзо- или эндо-)
- 3) влияние на скорость гидролиза степени полимеризации субстрата;
- 4) возможность гидролиза олигосахаридов;
- 5) способность фермента к множественной атаке субстрата.

Наличие признаков амилаз, отраженных в 3) и 4), при действии на линейные субстраты может свидетельствовать о существовании у этих ферментов подцентральной структуры. Вероятно, активный центр амилазы может состоять из нескольких подцентров, каждый из которых может вступать во взаимодействие с глюкозным остатком. Вероятность существования подцентральных структур амилаз позволяет установить строение их активного центра и дает более четкое представление и объяснение их субстратной специфичности, но не дает объяснения механизма гидролиза разветвленных субстратов [67, 68].

α -Амилаза – (α -1,4-глюкан-4-глюконогидролаза, КФ 3.2.1.1) является эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей внутри высокополимеризованного субстрата. Фермент назван α -амилазой, т.к. он приводит к образованию глюкозы в α -мутамерной форме [69, 70]. α -Амилаза – водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий молекулярную массу 45000–60000. Своего рода исключением является амилаза *Vac. macerans*, которая имеет молекулярную массу 130000. Есть сведения, что некоторые термостабильные α -амилазы имеют молекулярную массу 14000–15000, но в их мо-

лекулах содержится в два – три раза больше остатков α -D-глюкозы с нередуцирующих концов субстрата. Это фермент с экзогенным механизмом воздействия на субстрат.

Глюкоамилаза из *Aspergillus awamori* имеет четвертичную структуру, представленную димером из двух субъединиц (молекулярная масса 53,6 кД). Поверхность O-гликозилированного домена характеризуется наличием маннозы, связанной с Ser-453, Ser-455, Ser-459 и Thr-457. Углеводные фрагменты участвуют в связывании молекул субстрата и его аналогов и локализации молекул воды, которые определяют взаимодействие одиночных звеньев углевода между собой и способствуют повышению стабильности фермента. O-гликозилированный домен имеет остатки глицина перед и после C-конца, которые представляют собой изгибы, определяющие взаимодействие крахмалсвязывающего домена с каталитическим и соответствующую ориентацию молекулы субстрата [71].

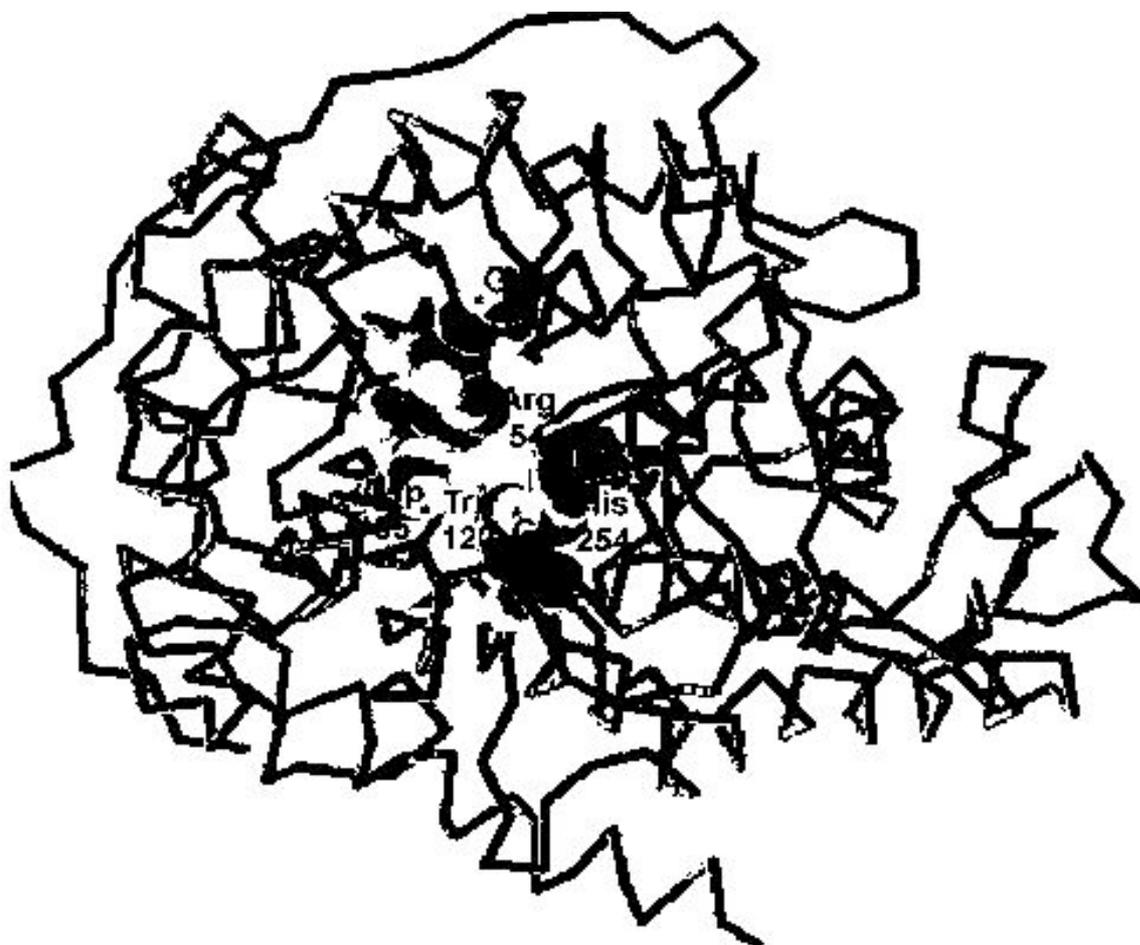


Рис. 17.9. Строение активного центра глюкоамилазы

Используя данные рентгеноструктурного анализа Алешина А.Е. (1994) и программу MOLSCRIPT [72] удалось показать, что глюкоамилаза имеет сквозную полость, в которой формируется активный центр за счет α -

α -баррелей, ограниченную следующими аминокислотными остатками: Leu-58, Leu-130, Leu-177, Leu-319, Trp-417, Trp-178, Phe-187.

На обоих концах щели располагаются два кластера молекул воды, причем один из них содержит 12 молекул воды (в области Leu-58), другой – 7 молекул, расположенных упорядоченно. Кроме того, вблизи активного центра имеются еще три кластера молекул воды, один из которых представляет собой раздвоенную цепь, начинающуюся в двух локусах активного центра (Asp-155 и Asp-54) и сливающуюся в одиночную цепь у Thr-53. Конец данного кластера находится на поверхности молекулы (Gly-190). Два других кластера молекул воды отделены от раствора субстрата О-гликозильной цепью Asp-171. В состав микроокружения полости активного центра входят следующие аминокислотные остатки: карбонильная группа Asn-47, ОН-группа Tyr-48, Trp-52, Arg-54, Lys-108, Gln-124, Glu-180, Arg-305, Tyr-311 (рис.17.9).

В состав каталитических групп активного центра глюкоамилазы не входят имидазольная группа гистидина и SH-группы, и в гидролизе крахмала принимают участие карбоксильные группы Asp-55, Glu-179, Glu-400, причем с одной стороны щели активного центра сосредоточены Asp-55 и Glu-179, а с противоположной – Glu-400 и Trp-120. Путем обработки данных рентгеноструктурного анализа методом молекулярной графики показано, что через полость активного центра фермента проходит кластер молекул воды, разделяющий ее на две половины при изменении конформации это соотношение сдвигается. Предполагается, что глюкоамилаза имеет достаточно протяженный участок сорбции субстрата, состоящий из шести подцентров связывания мономерных глюкозных звеньев и включающий в себя три каталитических карбоксильные группы. Для мальтоолигосахаридов повышение сродства по мере возрастания степени их полимеризации объясняется увеличением возможных мест взаимодействия с ферментом.

Стаффер Б. с соавторами выделили каталитический домен глюкоамилазы *Aspergillus niger* путем лимитированного протеолиза пептидной связи Val-471 – Arg-616. Авторы считают, что *in vitro* существует активная и стабильная форма фермента с С-концом Thr-482. При локализации терминального участка в области Ser-460 фермент неустойчив, что свидетельствует о том, что структура активного центра в домене разрушается между Ser-443 и Ser-444, причем участок Ser-444 – Val-470 имеет дисульфидный мостик и взаимодействует с кластером молекул воды (7 молекул) в каталитическом домене. Крахмалсвязывающий домен (Thr-513 – Arg-616) не образует тесного контакта с каталитическим доменом, поэтому обладает значительной подвижностью [73].

Хайашида с соавторами показал, что О-гликозилированная область участвует в разрыве водородных связей между соседними цепями в гранулярном крахмале. Крахмалсвязывающий домен определяет связывание растворимых лигандов (β -циклодекстринов) [70]. Каталитический и крах-

малсвязывающий домены глюкоамилазы авторы [74] рассматривают как глобулярные белки, имеющие диаметр 6 нм и 2,5 нм, причем в нативном ферменте они разделены расстоянием 10 нм. О-гликозилированный участок обкславливает взаимодействие глобул и значительную мобильность третичной структуры, а также способствует включению фермента в мембраны [74].

По мнению ряда авторов [70, 74], в связывании молекул субстрата участвует прежде всего Tgr-120, входящий в состав первого подцентра. Взаимодействие с Tgr-120, участвующим в формировании щели активного центра, приводит к втягиванию молекулы субстрата в щель активного центра и сопровождается искривлением гликозидной связи. Роль функциональных каталитических групп играют Glu-179, Glu-400 и Asp-55. Щель активного центра имеет нескомпенсированный отрицательный заряд, эти группы занимают определенное положение и сольватированы. Молекула субстрата, внедряясь в полость активного центра в менее полярную среду, что препятствует ионизации Glu-179. Выведение молекул воды, располагающихся в активном центре, освобождает полость активного центра для молекул субстрата [75].

Многие глюкоамилазы обладают способностью также быстро, как и α -1,4-связь гидролизовать α -1,6-гликозидные связи. Но это происходит только в том случае, когда за α -1,6-связью следует α -1,4-связь, поэтому декстран ими не гидролизуется. Отличительной способностью глюкоамилаз является способность в десятки раз быстрее гидролизовать высокополимеризованный субстрат, чем олиго- и дисахариды [76].

В литературе [77] имеется мнение, что механизм атаки субстрата глюкоамилазой может быть либо одноцепочечным, либо множественным, и что активный центр имеет подцентровую структуру.

Почти все глюкоамилазы являются гликопротеидами, содержащими 5–35 % углеводов в виде олиго-, ди- и моносахаридов. Углеводный компонент может быть целостным фрагментом или же разбитым на индивидуальные соединения, которые прикрепляются к белку через треонин и серин [208]. Большинство глюкоамилаз имеет оптимум pH 4,5–5,2, реже 5,7–6,0.

pH стабильность лежит в интервале 2,5–9,0, а термостабильность – в интервале 30–45 °C и редко повышается до 55–60°C. Глюкоамилазы различного происхождения отличаются по молекулярным массам (от 48000 до 210000). Далеко не все глюкоамилазы способны гидролизовать крахмал до глюкозы.

Еще в 60-е гг XX века И.Фукумото предложил все микробные глюкоамилазы разделить на два типа:

- 1) полностью гидролизующие крахмал до глюкозы;
- 2) гидролизующие крахмал до глюкозы на 80–85 %.

В то время предполагалось, что степень гидролиза зависит только от свойств глюкоамилаз и их происхождения. Позже было показано, что при

росте культуры параллельно накапливаются и другие амилолитические ферменты, обладающие не только гидролитическим, но и трансферазным действием. В результате в реакционной среде могут накапливаться изо-мальтоза, паноза, нигероза и др. сахара. В результате процесс не может дойти до полного превращения крахмала в глюкозу и возникает ошибочное представление о том, что глюкоамилаза не полностью гидролизует крахмал.

Основы технологии получения ферментативных углеводных гидролизатов на основе растительного сырья – пивной дробины. Пивная дробина является ценным углеводным сырьем, содержащим до 70 % углеводов, которые представлены, главным образом, клетчаткой (до 60 % от общего содержания углеводов) и крахмалом (до 20 % от общего содержания углеводов). Кроме того, пивная дробина содержит до 30 % сырого протеина. Такой состав позволяет использовать пивную дробину в качестве субстрата для культивирования промышленных штаммов микроорганизмов, например, дрожжей. Однако эффективность ее применения значительно возрастает, если предварительно провести гидролиз клетчатки и крахмала дробины до растворимых моно- и дисахаридов.

На этапе предварительных исследований пивную дробину обрабатывали комплексным целлюлитическим ферментным препаратом целловиридином ГЗх, поскольку значительная часть углеводов дробины является клетчаткой. Однако было установлено, что степень гидролиза клетчатки достигает 85–90 % лишь при норме расхода целловиридина 16 % от массы СВ дробины, а продолжительность гидролиза составляет не менее 16 ч. Поэтому, задача повышения эффективности данного процесса гидролиза является чрезвычайно актуальной. Ее решение проводили в несколько этапов.

Во-первых, согласно литературным данным, эффективность действия целлюлитических ферментов существенно зависит от поверхности взаимодействия с субстратом, поэтому с целью ее увеличения были проведены опыты по предварительной обработке пивной дробины водно-щелочными растворами. Такой подход позволил бы также получать в качестве побочного продукта изолят ВМФ белковых веществ, что обеспечило бы комплексную переработку сырья [78].

Список литературы

1. В.К. Мамыкин, Н.С. Мазур, Т.М. Бершова и др. Использование ферментных систем препарата целлюлазы для биоконверсии растительного сырья. // Хранение и переработка сельскохозяйственного сырья. – 1998. – № 5. – С. 46.
2. Селиванов А.С. Малоотходная технология биоконверсии растительного сырья. // Автореф. дисс...канд. техн. наук. – М. – 1992. – 27 с.

3. Селиванов А.С. Комплексная переработка целлюлозосодержащих отходов лесоперерабатывающих и сельскохозяйственных предприятий на основе биоконверсии. // Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы. – Киров, 2001. – С. 89–91.
4. Sudguist J. The role of biotechnology in the wood-processing industry of the future. // Kemia-Kemi. – 1987. – V. 14. – № 100. – P.184.
5. Мурзаков Б.Г., Литвинов В.Ф., Листов Е.Л. и др. Способ очистки сточных вод, образующихся на свалках пищевых и бытовых отходов. // Патент РФ № 200132315. Оpubл. 10.09.2003.
6. Малахов И.А., Тарзанов А.Л., Усов А.В. Реагентная флотационная очистка вод мясоперерабатывающих предприятий. // Мясная индустрия. – 2003. – №1. – С. 14 – 17.
7. Смирнова Т.А.. Микробиология зерна и продуктов его переработки. – М.: Пищевая промышленность, 1989. – 340 С.
8. Антипов С.Т., Шахов С.В., Фараджева Е.Д., Прибытков А.В., Кораблин Р.В., Моисеева И.С. Способ получения пищевой биодобавки и сушилка для его осуществления. // Патент РФ № 2204263. Оpubл. 20.05.2002.
9. Тарханов О.В., Тарханова Л.С., Тарханов А.О. Способ приготовления теста. // Патент РФ № 2202891. Оpubл. 27.04.2003.
10. Калимулов М. Ю., Дрягин С. В. Способ производства хлеба. // Патент РФ № 2159549. Оpubл. 27.11.2000.
11. Андреенков В.А., Сницарь А.И., Рыжов С.А., Ващук Е.А., Сницарь А.А. Способ производства мучных кондитерских изделий. //Патент РФ № 2191513. Оpubл. 27.10.2002.
12. Новикова Е. П., Азин Д. Л., Богомоллова Н. В., Медведева Л. Л. Состав для приготовления хлеба мариинского обогащенного, обладающего высокими пищевыми и органолептическими свойствами. // Заявка на Патент РФ № 2002101208. Оpubл. 10.08.2003.
13. Новикова Е. П., Азин Д. Л., Богомоллова Н. В., Медведева Л. Л. Николаева М. А. Способ производства пряников "Московские обогащенные", обладающих высокими пищевыми и органолептическими свойствами. //Заявка на Патент РФ № 2002101209. Оpubл. 20.08.2003.
14. Андреенков В.А., Сницарь А.И., Алехина Л.В., Ващук Е.А. Способ приготовления мясных или мясорастительных рубленых полуфабрикатов или фаршей. // Патент РФ № 2175207. Оpubл. 27.10.2001.
15. Андреенков В.А., Сницарь А.И., Алехина Л.В., Ващук Е.А., Сницарь А.А. Композиция пищевой добавки для производства мясных колбасных изделий. //Патент РФ № 2170522. Оpubл. 20.07.2001.
16. Бочкарева Н.Г., Белогорцев Ю.А., Удалова Э.В., Козлова Р.Г., Федотова Л.М. Штамм бактерий *Vacillus subtilis* – Продуцент комплекса гидролитических ферментов, обогащенных β-глюкоканазой. // Патент РФ №2046141. Оpubл. 20.10.1995.
17. Мушинский А.С., Быкова И.А. Субстрат для выращивания съедобного гриба вешенки обыкновенной.// Патент РФ № 2204236. Оpubл. 20.05.2003.
18. Блинков С.Д., Букин Ю.Б., Немойтин М.М., Федоров А.Л. Способ переработки растительного сырья для получения пентозных гидролизатов, содержащих, преимущественно ксилозу. //Патент РФ № 2109059. Оpubл. 20.04.1998.
19. Ушинский А.С., Быкова И.А. Субстрат для выращивания съедобного гриба вешенки обыкновенной. //Патент РФ № 2222179. Оpubл. 27.01.2004.
20. Блинков С.Д., Букин Ю.Б., Немойтин М.М., Федоров А.Л. Способ переработки растительного сырья для получения пентозных гидролизатов, содержащих, преимущественно ксилозу. //Патент РФ № 2109059. Оpubл. 20.04.1998.

21. Орлова В.С., Кодитувакку П. А. Д. Э., Филатов Н.Н., Шаимов Р.Г., Тычинин В.Н., Джафаров Ш.А. Способ получения глюкозы из целлюлозосодержащего сырья, преимущественно отходов пивного производства. //Патент РФ № 2223327. Оpubл. 10.02.2004.
22. Ушакова Н.А. Изучение мутуалистических взаимодействий микроорганизмов и животных и использование микросимбионтов в биотехнологических целях. Автореф. дисс...докт. биол. наук. – М. – 2006.
23. Ленкова Т.Н. Мультиэнзимные композиции в комбикормах, содержащих нетрадиционные компоненты. //Птицеводство. – 2007. – №2. – С.46-49.
24. Касаткина А.Н. Зерновая дробина как основа для получения биологически активных добавок с пробиотическими свойствами. Автореф. дисс...канд. биол. наук. – М. – 2008.
25. Кочетов Т.А. Практическое руководство по энзимологии – М.: Химия, 1989. Березин И.В., Мартинек К. Введение в прикладную энзимологию. – М.: МГУ, 1982. – С. 382.
26. Cheryan M., Deeslic W.D. Production of protein hydrolysate in ultrafiltration enzyme reactors. // Polym. Sci Technol. – 1980. – V.13. – P. 591–601.
27. Неклюдов А.Д., Илюхин В.П., Мосина Г.И. Свойства и получение белковых гидролизатов. // Прикладная биохимия и микробиол. – 1996. – Т.32. – N 2. – С. 231–236.
28. Васильев П.С., Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н., Карпо Б.С., Осока А.В. Определение макрокинетических констант кислотного гидролиза кератинсодержащего сырья. // В сб. Тез. докл. Международной конф. Лечебно-профилактическое и детское питание. – С. Петербург, 1996. – С.83.
29. Калашникова Н.А., Гребешкова Р.Н., Виноградова И.Н. Получение белковых гидролизатов с использованием микробных протеолитических ферментов. // В кн. Новое в получении и приготовлении ферментов. – М.: Наука, 1978. – 412 С.
30. Jursh Louis B., Mikelvy Jeffrey F. An aminopeptidase from bovin brain wich catalized the hydrolysis of enkefalin. // J. Naturochem. – 1981. – V. 36. – №1. – P. 171 – 178.
31. Zamost Bruce L., Brantlay Ountin J., Elm Dana D., Reck Carol M. Production and characterisation of a thermostable protease produced by an asparagenous mutant of Bac. Stearothermophilus. // J. Ind. Microbion. – 1990. – V.5. – №5. – P. 303 – 312.
32. Ronwin E.. The active center of thrombin and trypsin. // Biochimica et Biophysica acta. – 1959. – V. 33. – № 2. – P. 326 –332.
33. Weller N., Zundel G.. Proton tranfer processes in the hydrogen – bonded structure of the active centre of serine proteses – ann FT – IR study. // J. of Molecular structure. – V. 317. – № 3. – 1994. – P. 249 – 259.
34. Johnson A., Gautham N., Pathabhi V. Crystall structure at 1,63 Å resolution of the native form of porcine β-trypsin; revealling an acetate ion binding site and functional water network. // J. Protein Structure and Molecular Enzymology. – V. 1435. – № 1 – 2. – 1999. – P. 7 – 21.
35. Kawatta Shuji, Takayama Shuli, Nimoniga Kazuto, Sotoru. Purification and some properties of porcine liver aminopeptidase B. // J. Biochem. Tokio. – 1990. – V.88. – №4. – С. 1025 – 1032.
36. Галактионов С.В. Биологические активные соединения. – М.: Химия, 1988. – С. 210.
37. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Элевар. – 2000. – С. 512.
38. Hashi. Annu.// Rev. Plant. Physiol. Plant. // Mol. Biol. – 1989. –V. 40. – P. 139 – 168.

39. Hayashi T., Ogawa K., Mitsuishi Y. Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose. // *Plant cell Physiol.* – 1994. – № 35. – P. 893–1205.
40. York W.S., Darvill A.G., Albersheim P. Inhibition of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Stimulated Elongation of Pea Stem Segments by a Xyloglucan Oligosaccharide. // *Plant Physiol.* – 1984. – № 75. – P. 295 – 297.
41. Fry S.C. Structure-Activity Relationships for Xyloglucan Oligosaccharides with Anti-auxin Activity. // *J. Exp. Bot.* – 1989. – V. 40. – P. 1 – 11.
42. Dougall G.J., Fry S.C. Xyloglucan Oligosaccharides Promote Growth and Activate Cellulase: Evidence for a Role of Cellulase in Cell Expansion. // *Plant Physiol.* – 1990. – № 93. – P. 1042 – 1048.
43. Augur C., Yu L., Sokai K., Ogawa T., Sinai P., Darwell A. G., Albersheim P. Further Studies of the Ability of Xyloglucan Oligosaccharides to Inhibit Auxin-Stimulated Growth. // *Plant Physiol.* – № 99. – 1992. – P. 180 – 185.
44. Takeda T., Furuta Y., Awano T. Suppression and acceleration of cell elongation by integration of xyloglucans in pea stem segments. // *Proc. Natr. Acad. Sci. USA.* – 2002. – № 99. – P. 9055 – 9060.
45. Yaoi K., Mitsuishi Y. Purification, characterization, cloning, and expression of a novel xyloglucan-specific glycosidase, oligoxyloglucan reducing end-specific cellobiohydrolase. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – № 277. – P. 48276 – 48281.
46. Katsuro Yaoi, Jasushi Mitsushi. Purification, characterization, CDNA cloning and expression of axylaglugan endoglucanase from geotrichum sp. M 128. // *FEBS letters.* – 2004. – № 1 – 3. – P. 45–50.
47. Ferreira C., Tarres B.B., Terra W. R. Substrate specificities of midgut β -glycosidases from insects orders. // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1998. – № 119B. – P. 219–225.
48. Sandro R. Marana, Walter R. Terra, Clelia Fereira. Purification and properties of a β -glycosidase purified from midgut cells of *Spodoptera frugipedra* larvae. // *Insect. Biochemistry and molecular biology.* – 2000. – V. 30. – № 12. – P. 1139 – 1146.
49. Pradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Analyt. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248 – 254.
50. Dahegvis A., Assay of intentional disaccharides. // *Analyt. Biochem.* – V. 96. – № 22. – 2003. – P. 99–107.
51. Davies G. J., Wilson K.S., Henrisat B., Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl. // *Analyt. Biochem.* – 2004. – V. 97. – № 21. – P. 110–115.
52. Fereira C., Capella A.N., Sitnik R., Terra W.R. Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents and peritrophic membranes of *Spodoptera frugipedra* larvae. // *Arch. Insect Biochem. Physiol.* – 2004. – № 26. – P. 299–313.
53. Ferreria C., Terra W.R. The effect of dietary plant glycosides in larval midgut β -glycosidases from *Spodoptera frugipedra* and *Diatraca saccharolis*. // *Insect. Biochem. Molec. Biol.* – 1997. – № 27. – P. 55–59.
54. Michelle Ricard, Jan D. Reid. Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. // *Enzyme and Microbial Technology.* – 2004. – V.5. – P. 499–504.
55. Калунянц К.А., Яровенко В.Л., Домарецкий В.А., Колчева Р.А. Технология солода, пива и безалкогольных напитков. – М.: Колос, 1992. – С. 446.
56. Калунянц К.А. Химия солода и пива. / М.: Агропромиздат, 1990. – С. 176.
57. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Элевар. – 2000. – 512 с.
58. Квеситадзе Г.И. Грибные и бактериальные амилазы. – Тбилиси: Медниереба, 1984. – С. 156.

59. Хорунжина С.И. Биохимические и физико-химические технологии солода и пива. – М.: Колос, 1999. – С.312.
60. Цыперович А.С. Ферменты. – Киев: Техника, 1971. – С. 360.
61. Главачек Ф., Лхотский А., Пивоварение. – М.: Пищевая промышленность. – 1977. – С. 625.
62. Рухлядева А.П., Польшалина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. – М.: Легкая и пищевая промышленность. – 1981. – С.82 – 86.
63. Нарцисс Л. Технология солода. –М.: Пищевая промышленность, 1980. – 504 с.
64. Кретович В.Л. Введение в энзимологию. –М.: Наука, 1986. – 336 с.
65. Яковлев А.Н. Биосинтез и физико-химические свойства термо- и рН-стабильных амилаз термотолерантного микромицета *A. awamori* ВУД-Т2. Автореф. дисс.... канд. техн. наук. – Воронеж. – 1992. – 25 с.
66. Шевелькова А.Н. Кинетика и механизм действия ферментов амилазного комплекса. Автореф. дисс...канд. хим. наук. – Москва. – 1993. – 22 с.
67. Григорьев В.С. Исследование биосинтеза и физико-химических свойств амилаз термотолерантных микромицетов. Автореф. дисс. докт. техн. наук. – Воронеж. – 1994 – 42 с.
68. Hayachida S., Nakamura K., Kanlayakrit W. et al. Role of the carbohydrate moiety of a glucoamylase from *Aspergillus awamori* var. *kawachi* in the digestion of raw starch. //Agr. Biol. Chem. – 1989. – V. 53. – P. 143 – 149.
69. Kraulis I. Modulation by adrenal steroids of limbic function. // J. Appl. Crystallogr. – 1991. – V. 24. – P. 946 – 950.
70. Stoffer B., Frandsen T.R., Busk P.K. Production, purification and characterization of the catalytic domain of glucoamylase from *Aspergillus niger*. // Biochem J. – 1993. – V. 292. – P. 197 – 202.
71. Williamson G., Belshaw N.J., Williamson M.P. O-glycosylation in *Aspergillus glucoamylase*. Conformation and role in binding. //Biochem. J. – 1992. – V. 282. – Part 2. – P. 423 – 428.
72. Ковалева Т.А. О механизме действия и строении активного центра глюкоамилазы. //Вестник ВГУ. Серия химия, биология. – 2000. – С. 104 – 107.
73. Ковалева Т.А., Артюзов В.Г., Кожокина О.М. Исследование функциональных свойств глюкоамилазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. //Успехи современного естествознания. – 2003. – № 5. – С. 49.
74. Ashikari T., Nakamura N., Tahaka Y. et al. //Arg. Biol. Chem. – 1986. – V. 50. –4. – P. 957–964.
75. Yould G.W., Bell G.I. //Trends Biochem Sci. – 1990. – V. 15. – P. 18–23.
76. Дикман М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 1–3. – М.: Мир, 1982. – С.1120.
77. Красноштанова А.А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности. Дисс...докт. хим.наук. – М.: РХТУ, 2009. – 400 с.

Глава 18

Исследование количественных закономерностей ферментативного гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой

Предварительные исследования гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой показали, что степень гидролиза субстрата в значитель-

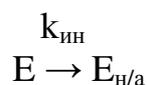
ной степени зависит от его растворимости, т.е. для повышения эффективности гидролиза необходимо уменьшить гетерогенность системы. Поэтому, было изучено влияние времени предобработки крахмала на степень гидролиза последнего. Предобработку проводили путем выдерживания 5 %-ной суспензии крахмала при температуре 90 °С в течение 20 – 60 мин, после чего, предварительно охладив суспензию до температуры 40 °С, подвергали гидролизу α -амилазой при температуре 40 °С, рН среды 7,0 и соотношении субстрат: фермент 25:1 (активность α -амилазы 4000 ед./л). Полученные данные представлены на рис. 18.1. Из представленных данных видно, что при предварительной обработке крахмала в течение 30 мин степень его последующего гидролиза α -амилазой составляет 45 % и с увеличением времени обработки практически не изменяется. Это время и было выбрано в качестве оптимального.

Дальнейшее изучение кинетики ферментативного гидролиза строилось по традиционной схеме и включало в себя исследования влияния начальной концентрации субстрата, активности ФП, температуры и рН среды на процесс гидролиза крахмала α -амилазой. Данные параметры варьировали соответственно в интервалах 10 – 50 г/л, 1000 ед./л – 5000 ед./л, 30 – 60 °С, 4,0 – 8,0.

На рис. 18.2 представлены типичные кривые гидролиза крахмала α -амилазой. Из данного рисунка следует, что за 2 ч процесса степень расщепления крахмала достигает квазистационарного значения на уровне 45 %. Как и в предыдущих случаях, мы предположили, что наблюдаемый факт связан с инактивацией фермента и его ингибированием продуктами гидролиза. Для проверки данного предположения были поставлены серии экспериментов, аналогичные вышеприведенных для других ФП и субстратов. Анализ полученных экспериментальных данных показал, что введение в среду ферментализации продуктов гидролиза крахмала не оказывает влияния на скорость процесса.

Однако последняя существенно зависит от времени предварительной инактивации ФП при температуре 90 °С, что иллюстрирует рис. 18.3.

Таким образом, для описания процесса гидролиза крахмала α -амилазой может быть использована схема превращений:



Все обозначения в данной схеме соответствуют аналогичным обозначениям схем, приведенных в предыдущих разделах.

Обработка экспериментальных данных проводилась вышеописанным способом и позволила найти значения эффективных констант K_1 , k_1 , $k_{ин}$, которые адекватно описывают все серии экспериментальных данных, отвечающих различным начальным концентрациям фермента и субстрата.

Влияние температуры и pH среды на данный процесс изучалось с использованием тех же уравнений связи эффективных констант с указанными параметрами. Результаты расчетов приведены в табл. 3.5.2.1. Также было установлено, что зависимость скорости гидролиза крахмала α -амилазой от температуры и pH среды имеет экстремальный характер при оптимуме температуры $40\text{ }^\circ\text{C}$ и pH среды 7,0, а время гидролиза не должно превышать 2 ч, т.к. к этому моменту времени 98% фермента инактивировано.

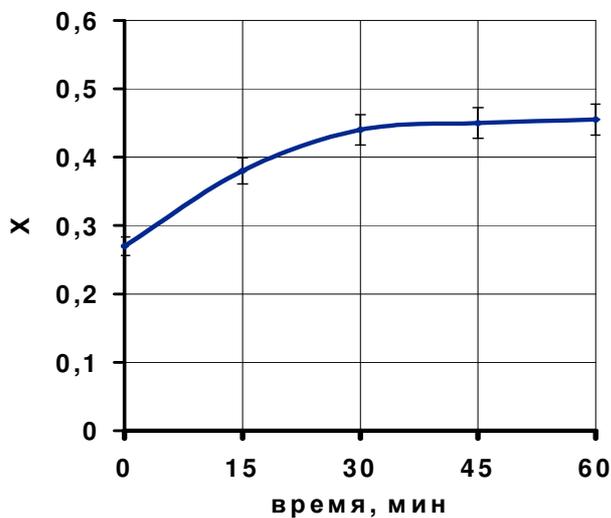


Рис. 18.1. Влияние времени предварительного прогрева крахмала при температуре $90\text{ }^\circ\text{C}$ на степень его последующего гидролиза α -амилазой. Условия: температура – $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7,0; начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л (4 % от массы субстрата). Обозначения кинетических кривых, отвечающих времени прогрева ФП: 1 – 0 мин, 2 – 10 мин, 3 – 15 мин, 4 – 25 мин

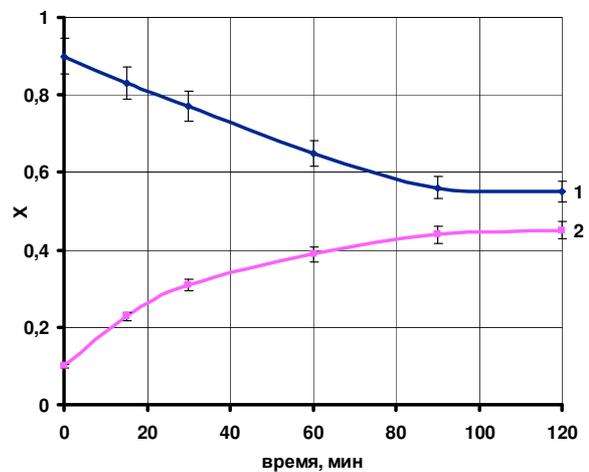


Рис. 18.2. Кинетические кривые гидролиза крахмала α -амилазой. Условия: температура – $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH – 7,0, начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л (4 % от массы субстрата). Обозначения: 1 – расход ВМФ, 2 – накопление НМФ

Полученную кинетическую схему использовали для подбора условий, обеспечивающих 90 %-ную степень гидролиза крахмала. Соответствующие расчеты, подтвержденные в дальнейшем экспериментально, представлены на рис. 18.4, из которого следует, что вышеуказанная степень гидролиза обеспечивается 8-ми кратной дробной загрузкой ФП через каждые 2 ч гидролиза, причем общий расход ферментного препарата составля-

ет 16 % от массы субстрата. Как видно из рис. 18.4, достижение высокой степени гидролиза крахмала требует значительного расхода ФП, поэтому поиск путей повышения эффективности данного процесса очень важен.

В качестве факторов интенсификации были выбраны АОБ, а также соли натрия и кальция. Схема исследований была сохранена прежней. Диапазоны изменения параметров были следующими: температура 40... 70 °С; рН 4,0... 8,0; начальная концентрация АОБ $1,0 \cdot 10^{-5} \dots 5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л (мольное соотношение фермент: АОБ 1:4,4 – 11,4:1); время прединкубации фермента с АОБ 0...20 мин; время прединкубации субстрата с АОБ 0...20 мин.

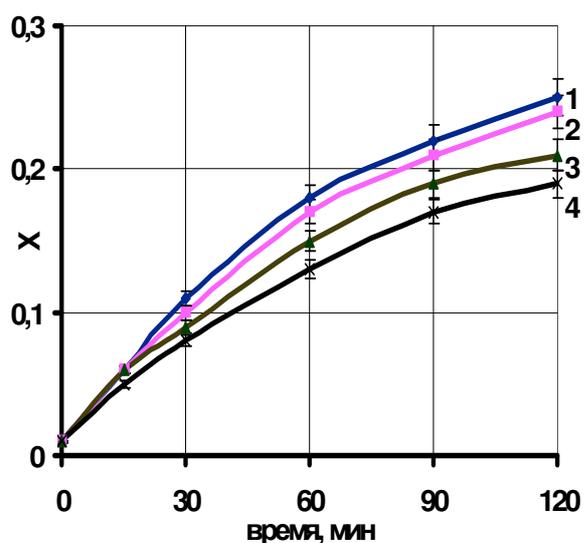


Рис. 18.3. Влияние времени предварительного прогрева α -амилазы при температуре 90 °С на кинетику гидролиза крахмала. Условия: температура 40 °С, рН 7,0, начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л (4 % от массы субстрата). Обозначения кинетических кривых, отвечающих времени прогрева ФП – 1 – 0 мин, 2 – 10 мин, 3 – 15 мин, 4 – 25 мин

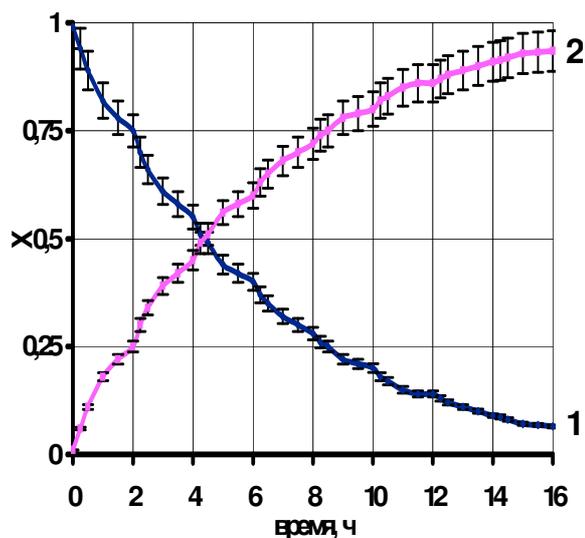


Рис.18.4. Кривые гидролиза крахмала α -амилазой при дробной загрузке ФП.

Условия: температура 40 °С, рН 7,0, начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л (4% от массы субстрата). Обозначения: 1 – расход ВМФ, 2 – накопление НМФ

Таблица 18.1

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза крахмала α -амилазой

Путь	Е, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹
k_1	20±2	$(9,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-6}$	2,08 ± 0,21
$k_{ин}$	42±4	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	0,052 ± 0,005
$K_1 = 1,59 \pm 0,16$ л/моль			

Полученные экспериментальные данные представлены на рис. 18.5 – 18.9.

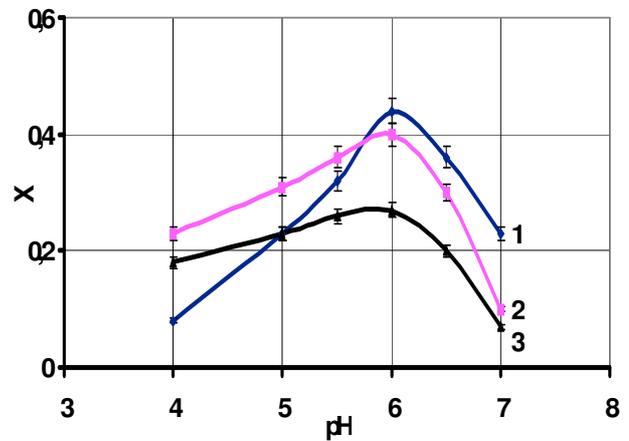
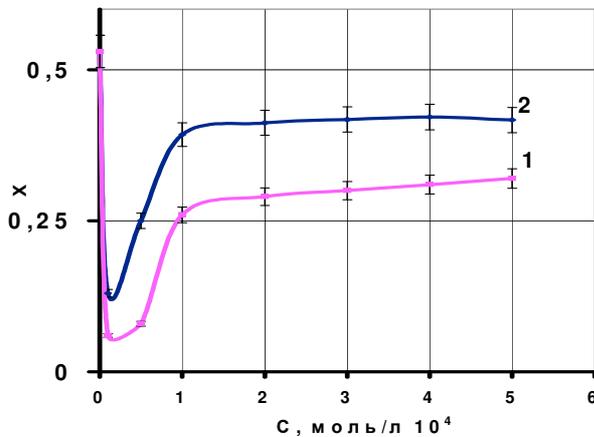


Рис. 18.5. Влияние концентрации АОБ d_1-C_7 (1) и d_1-C_{12} (2) на выход продуктов ферментативного гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой. Условия: температура – 45°C , pH 7,0; начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л

Рис. 18.6. Влияние pH среды на выход продуктов гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой в отсутствии (1) и в присутствии АОБ d_1-C_7 (2) и d_1-C_{12} (3). Условия: pH – 7,0; начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

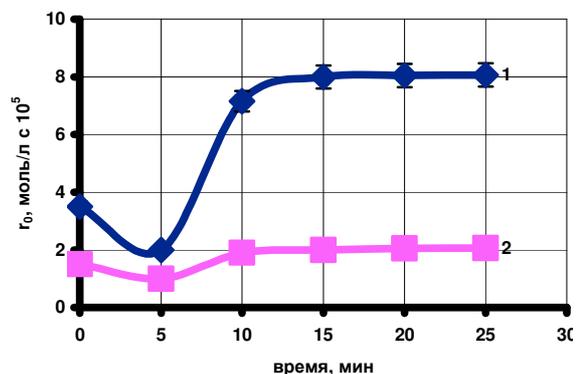
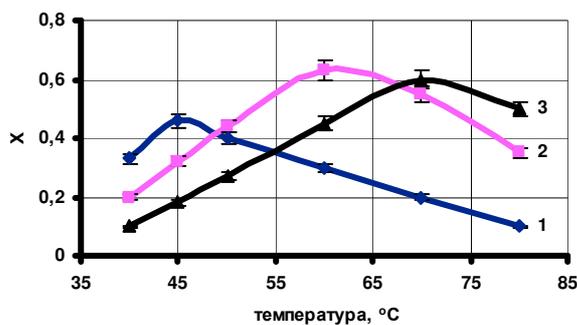


Рис. 18.7. Влияние температуры на выход продуктов гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой в отсутствии (1) и в присутствии АОБ d_1-C_7 (2) и d_1-C_{12} (3). Условия: pH – 7,0; начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Рис. 18.8. Зависимость скорости гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой от времени. Условия: температура – 45°C , pH – 7,0; начальная концентрация субстрата – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1 – d_1-C_7 , 2 – d_1-C_{12}

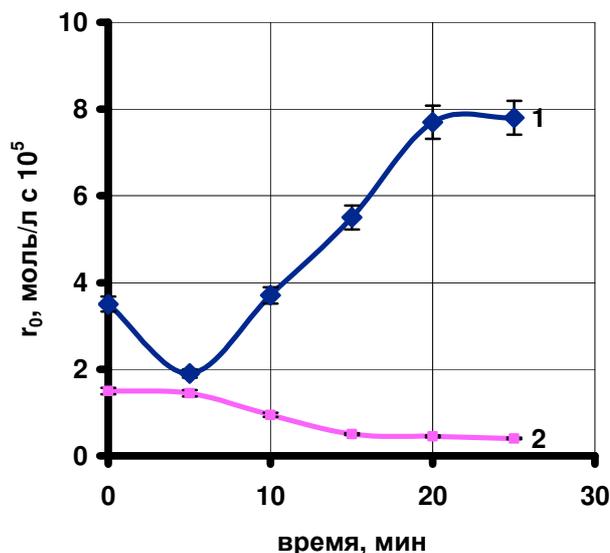


Рис. 18.9. Зависимость начальной скорости гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой от времени предынкубации крахмала с АОБ. Температура – 45 °С, pH – 7,0; начальная концентрация субстрата – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1 – d_1-C_7 , 2 – d_1-C_{12}

Аналогичный предыдущим случаям вид зависимостей позволил нам использовать ранее предложенную схему превращений. Обработка экспериментальных данных, выполненная ранее описанным способом, показала, что для всех серий кинетических кривых достигается их адекватное описание, а рассчитанные значения эффективных констант и энергий активации представлены в табл. 18.2.

Как и в ранее рассмотренных случаях, проанализируем влияние факторов d_1-C_7 и d_1-C_{12} на скорость ферментативного гидролиза крахмала α -амилазой.

Проведенный анализ экспериментальных данных рис. 18.5 – 18.9 позволил установить следующее:

1) оба фактора d_1-C_7 и d_1-C_{12} в диапазоне концентраций $(1,0 - 5,0) \cdot 10^{-4}$ моль/л снижают скорость ферментативного гидролиза в 1,2–4,0 раза. При этом наименьший эффект снижения скорости гидролиза наблюдается для обоих факторов при концентрации $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, соответственно в 1,2 раза для d_1-C_7 и в 2 раза для d_1-C_{12} ;

2) предынкубация фактора d_1-C_7 с ферментом в течение 10 мин позволяет увеличить скорость ферментативного гидролиза в 1,9 раза, а пре-

дынкубация амилазы с фактором d_1-C_{12} во всем исследованном интервале времени снижает скорость гидролиза в 1,3 – 1,6 раза;

3) прединкубация крахмала с фактором d_1-C_7 в течение 20 мин позволяет увеличить скорость гидролиза в 2,0 раза, фактор же d_1-C_{12} в аналогичных условиях вызывает снижение скорости гидролиза в 1,5–4,0 раза;

4) оба АОБ смещают температурный оптимум действия фермента в область более высоких температур (60°C для d_1-C_7 и 70°C для d_1-C_{12}). При этом происходит и увеличение скорости гидролиза в 2,7 и в 3,0 раза соответственно для фактора d_1-C_7 и d_1-C_{12} ;

5) фактор d_1-C_7 практически не влияет на рН оптимум действия α -амилазы, тогда как фактор d_1-C_{12} снижает выход продуктов гидролиза в 1,6 раза при оптимальном значении рН 7,0. При этом оба фактора незначительно расширяют оптимальный интервал действия фермента в кислой области значений рН. Однако вследствие снижения выхода продуктов гидролиза в 1,5 – 2,0 раза, проведение процесса при значениях рН среды ниже 6,0 нецелесообразно.

Таблица 18.2

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой в присутствии факторов d_1-C_7 и d_1-C_{12}

Путь	E , кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с^{-1}
Фактор d_1-C_7/d_1-C_{12}			
k_d	$44 \pm 3/18 \pm 1$	$(1,01 \pm 0,13) \cdot 10^{-6}/(5,37 \pm 0,70) \cdot 10^{-5}$	$183,9 \pm 20,2/119,3 \pm 13,1$
k_a	$87 \pm 6/31 \pm 2$	$(1,45 \pm 0,19) \cdot 10^{-6}/(7,56 \pm 0,98) \cdot 10^{-5}$	$(1,04 \pm 0,11) \cdot 10^{-4} /$ $(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
k_s	$15 \pm 1/13 \pm 1$	$(1,66 \pm 0,22) \cdot 10^{-4}/(1,77 \pm 0,23) \cdot 10^{-4}$	$106,8 \pm 11,8/72,5 \pm 8,0$
k_{1d}	$32 \pm 2/53 \pm 4$	$(1,37 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}/(1,47 \pm 0,19) \cdot 10^{-4}$	$0,45 \pm 0,05/0,67 \pm 0,07$
k_{2d}	$28 \pm 2/50 \pm 4$	$(1,37 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}/(1,47 \pm 0,19) \cdot 10^{-4}$	$0,52 \pm 0,05/0,30 \pm 0,03$
$k_{\text{инд}}$	$34 \pm 3/37 \pm 4$	$(1,50 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}/(1,50 \pm 0,20) \cdot 10^{-6}$	$0,063 \pm 0,006/0,059 \pm 0,006$
$K_{1d} = 0,80 \pm 0,07$ л/моль/ $0,70 \pm 0,06$ л/моль, $K_{2d} = 1,05 \pm 0,09$ л/моль/ $0,87 \pm 0,08$ л/моль			

Используя разработанную кинетическую модель, на заключительном этапе исследований были подобраны оптимальные условия гидролиза крахмала в присутствии АОБ d_1-C_7 и d_1-C_{12} . Результаты расчетов, подтвержденные экспериментом, позволили установить следующее. Гидролиз необходимо проводить в присутствии фактора d_1-C_7 при температуре 60°C , рН 7,0, прединкубации d_1-C_7 с ферментом в течение 10 мин или с субстратом в течение 20 мин. При этом выход продуктов гидролиза увеличивается в 7,5 раз. Оптимальными условиями гидролиза крахмала α -амилазой в присутствии фактора d_1-C_{12} являются: температура 70°C , прединкубация d_1-C_{12} с ферментом в течение 15 мин. При этом выход продуктов гидролиза

снижается в 1,8 раза, что свидетельствует о необходимости использования фактора d_1-C_7 для повышения эффективности данного процесса.

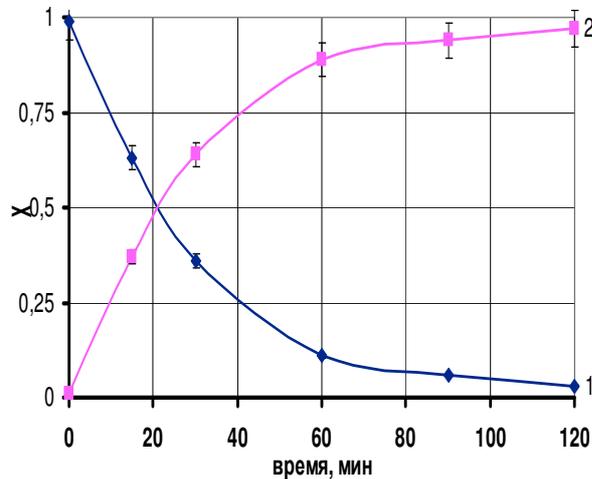


Рис. 18.10. Кинетика расходования субстрата (1) и накопления продуктов гидролиза (2) крахмала α -амилазой в присутствии АОБ d_1-C_7 . Условия: температура – 60°C , pH 7,0; предынкубация d_1-C_7 с ферментом – 10 мин, начальная концентрация субстрата – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация d_1-C_7 – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

На рис. 18.10 приведены кривые гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой в присутствии фактора d_1-C_7 в оптимальных условиях. Из представленных данных следует, что введение в среду гидролиза АОБ d_1-C_7 позволяет достичь степени гидролиза 95% при сокращении нормы расхода ФП в 8 раз или времени ферментативного гидролиза также в 8 раз. Поскольку α -амилаза относится к числу наиболее лабильных ферментов, то для нее согласно литературным данным предложены различные способы стабилизации с повышения степени конверсии субстрата при минимальных нормах расхода ФП. Одним из таких способов является стабилизация растворами солей. Чаще всего для этой цели используются хлориды кальция и натрия. Поэтому было проведено сравнение предложенного способа стабилизации ФП с помощью АОБ со стабилизацией растворами хлоридов кальция и натрия. Полученные данные для температуры 60°C , pH 7,0 и различных концентрациях стабилизаторов приведены в табл. 18.3.

Таблица 18.3

Стабилизация панкреатической α -амилазы АОБ и растворами хлоридов натрия и кальция

Стабилизирующий агент	Активность фермента, ед./л	Прирост активности по сравнению с контролем, раз
Контроль (раствор α -амилазы)	4000	—
АОБ d ₁ -C ₇ , $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л	30000	7,5
АОБ d ₁ -C ₁₂ , $2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л	2700	0,7
Хлорид натрия, 0,85 моль/л	5800	1,5
Хлорид кальция, 0,55 моль/л	6500	1,6

Из приведенных данных видно, что растворы хлоридов кальция и натрия также как и АОБ, способны повышать активность α -амилазы. Однако при оптимальных условиях в растворах солей активность ФП повышается не более, чем в 1,6 раза, в то время как АОБ d₁-C₇ повышает активность данного ФП в 7,5 раз.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать однозначный вывод о целесообразности применения АОБ для повышения эффективности α -амилазы.

α -Амилаза является эндоамилазой, расщепляющей внутримолекулярные связи в высокомолекулярных цепях молекул субстрата. Для гидролиза крахмала можно использовать также экзоамилазы, расщепляющие помимо 1,4-гликозидных связей еще и 1,6-связи. Чтобы сравнить эффективность гидролиза крахмала экзо- и эндоамилазами на следующем этапе исследований изучили влияние экзоамилаз на гидролиз крахмала. В качестве последней была выбрана глюкоамилаза, выделенная из *Aspergillus awamori*.

Глава 19

Количественные закономерности ферментативного гидролиза крахмала глюкоамилазой *Asp. Awamori*

При исследовании гидролиза крахмала глюкоамилазой был сохранен тот же порядок проведения эксперимента, что и при изучении гидролиза данного субстрата α -амилазой. Исследования проводились в диапазоне концентраций субстрата 5 – 50 г/л, соотношения фермент: субстрат 1:20 – 1:100 (интервал изменения активности 1000 – 5000 ед./л), при температуре 30–60 °С, рН среды 4,0 – 8,0. Соответствующие экспериментальные данные представлены на рис. 19.1 – 19.4.

Из полученных данных можно сделать следующие выводы:

1) для повышения степени гидролиза крахмала необходимо проводить его

- предварительную обработку при температуре 90 °С в течение 30 мин;
- 2) процесс ферментативного гидролиза осложнен инактивацией свободного фермента при отсутствии ингибирования конечным продуктом;
 - 3) температурная и рН зависимости имеют типичный для ферментативных реакций экстремальный характер с оптимумом по температуре 40 °С и рН 7,0;
 - 4) процесс ферментативного гидролиза может быть описан схемой последовательно-параллельных превращений (19.1), соответствующие значения эффективных констант и энергий активации приведены в табл. 19.1;

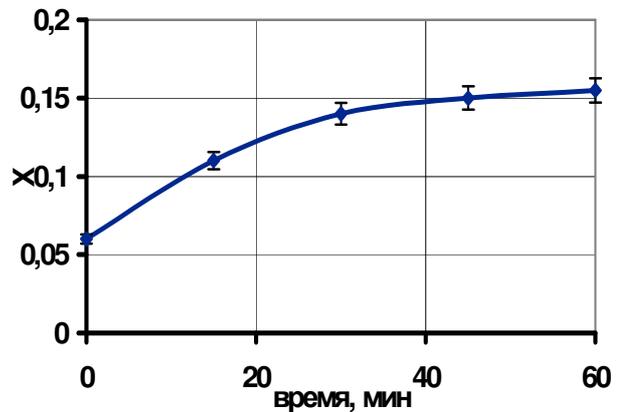
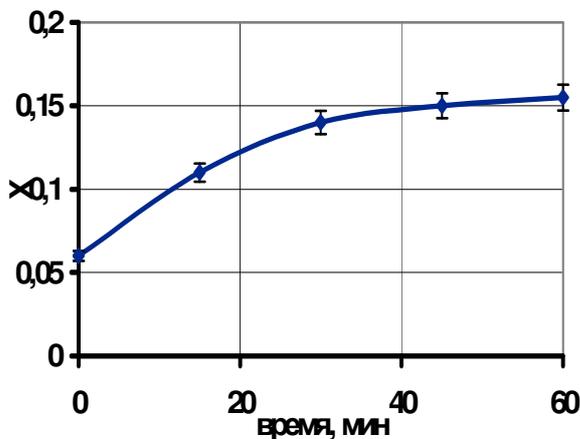


Рис. 19.1. Влияние времени предварительного прогрева крахмала при температуре 90 °С на степень его гидролиза глюкоамилазой. Условия: температура ферментации – 40 °С, рН 7,0; начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л (4 % от массы субстрата)

Рис. 19.2. Кинетические кривые гидролиза крахмала глюкоамилазой. Условия: температура – 40 °С, рН 7,0, начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л (4 % от массы субстрата). Обозначения: 1 – расход ВМФ, 2 – накопление НМФ

- 5) для достижения 90–95 %-ной степени гидролиза крахмала необходимо проводить в режиме 9-ти кратной дробной загрузки с добавлением ФП в количестве 4 % от массы субстрата при каждой загрузке.

Таблица 19.1

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза крахмала глюкоамилазой

Путь	Е, кДж/моль	k^* , c^{-1}	K_a , л/моль
k_1	33 ± 3	$0,70 \pm 0,08$	$(1,26 \pm 0,16) \cdot 10^{-4}$
$k_{ин}$	40 ± 4	$(3,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(9,5 \pm 1,2) \cdot 10^{-6}$
$K_1 = 3,71 \pm 0,38$ л/моль			

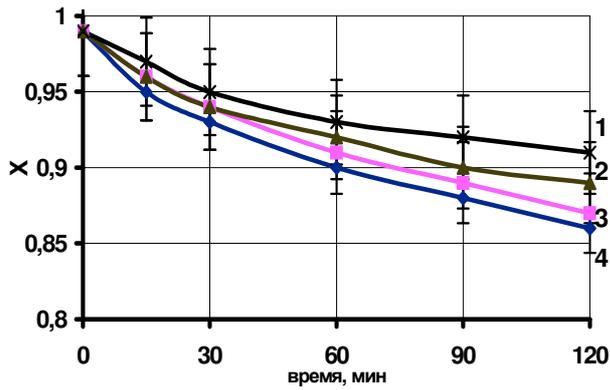


Рис. 19.3. Влияние времени инактивации глюкоамилазы при температуре 90 °С на степень гидролиза крахмала. Условия: температура – 40 °С, рН 7,0, начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л. Обозначения кинетических кривых, отвечающих различному времени прогрева ФП: 1 – 0 мин, 2 – 5 мин, 3 – 15 мин, 4 – 25 мин

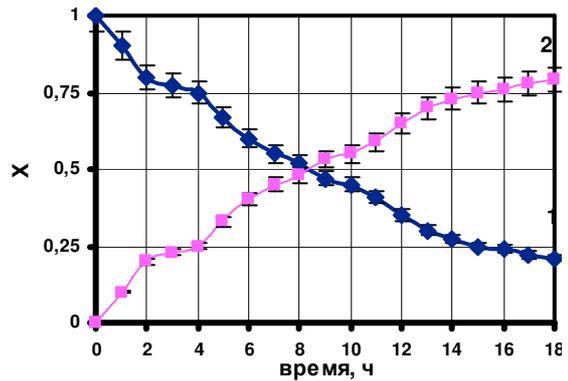


Рис. 19.4. Кривые гидролиза крахмала глюкоамилазой при дробной загрузке ФП. Условия: температура – 40 °С, рН 7,0, начальная концентрация крахмала – 50 г/л, активность ФП – 4000 ед./л (4 % от массы субстрата). Момент времени внесения ФП – 4 ч

Из приведенных данных видно, что полный гидролиз крахмала глюкоамилазой возможен при норме расхода ФП 18 % от массы субстрата, что не позволяет организовать данный процесс в промышленных условиях без разработки приемов по повышению его эффективности. Рассмотрим влияние АОБ на процесс гидролиза крахмала под действием глюкоамилазы *Asp. awamori*.

Аналогично предыдущим случаям схема проведения эксперимента по гидролизу крахмала глюкоамилазой в присутствии АОБ предполагала исследование влияния на процесс следующих параметров:

- 1) температуры 30 – 60 °С;
- 2) рН среды 4,0 – 8,0;
- 3) начальной концентрации АОБ – $(1,0 – 5,0) \cdot 10^{-4}$ моль/л (мольное соотношение фермент: АОБ 1:5 – 1:25);
- 4) времени прединкубации АОБ с ферментом – 0 ... 20 мин;
- 5) времени прединкубации АОБ с субстратом – 0 ... 20 мин.

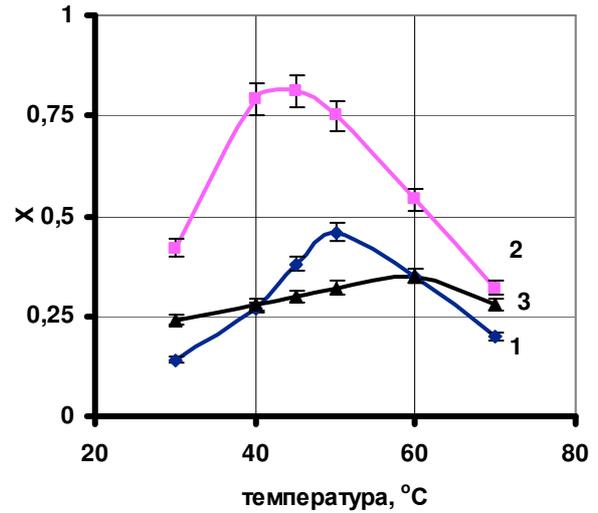
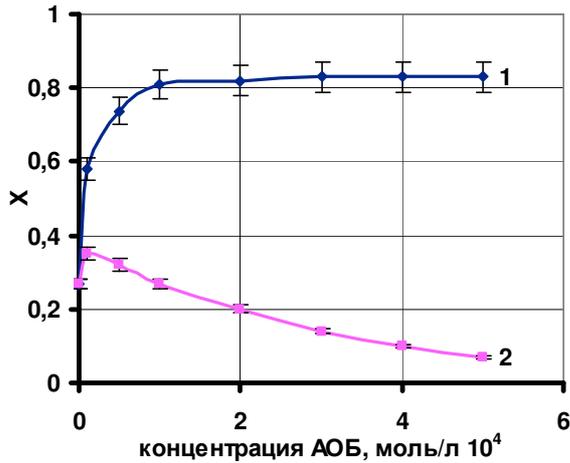


Рис. 19.5. Влияние концентрации АОБ d_1 - C_7 (1) и d_1 - C_{12} (2) на выход продуктов гидролиза крахмала глюкоамилазой. Условия: температура – 40 °С, рН 6,0; начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л

Рис. 19.6. Влияние температуры на выход продуктов гидролиза крахмала глюкоамилазой в отсутствии (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: рН 6,0; начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

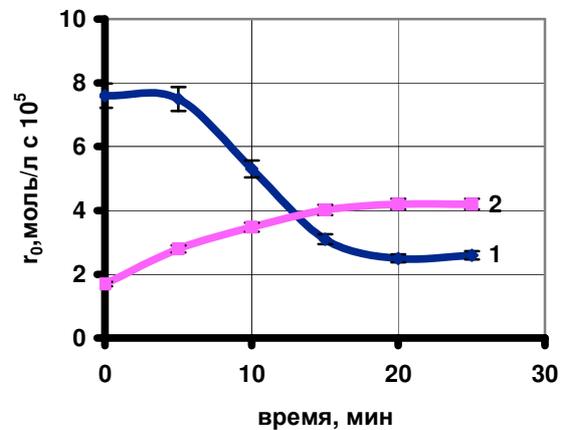
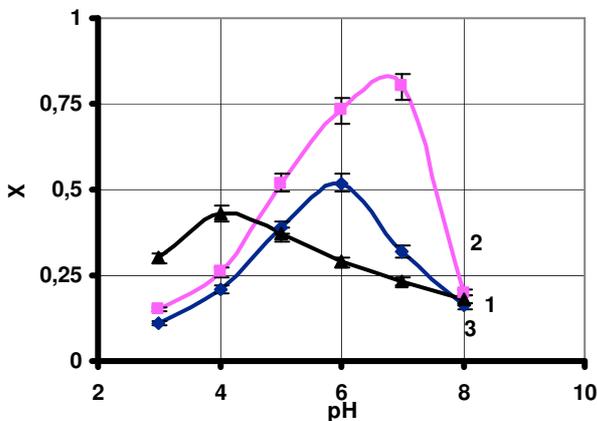


Рис. 19.7. Влияние рН среды на выход продуктов гидролиза крахмала глюкоамилазой в отсутствии (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: температура – 40 °С, начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л

Рис. 19.8. Зависимость начальной скорости гидролиза крахмала глюкоамилазой от времени предынкубации фермента с АОБ. Условия: начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Обозначения: 1 – C_7 -АОБ, 2 – C_{12} -АОБ

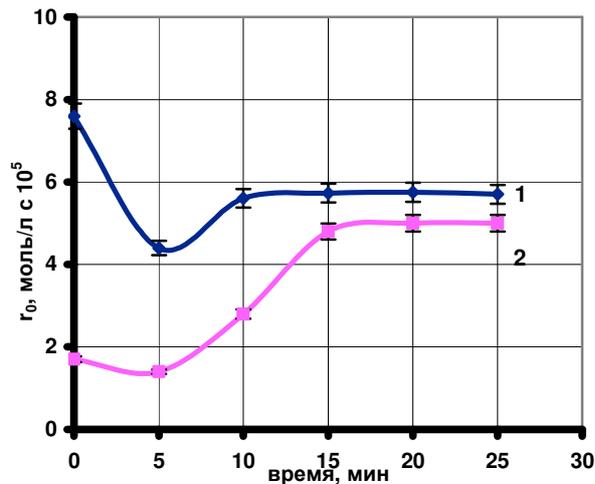


Рис. 19.9. Зависимость начальной скорости гидролиза крахмала глюкоамилазой от времени предынкубации субстрата с АОБ. Условия: начальная концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, начальная концентрация С₇-АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, С₁₂-АОБ – $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Обозначения: 1 – С₇-АОБ, 2 – С₁₂-АОБ

Таблица 19.2

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза крахмала глюкоамилазой в присутствии АОБ С₇-АОБ и С₁₂-АОБ

Путь	Е, кДж/моль	К _а , л/моль	к*, с ⁻¹
Фактор С ₇ -АОБ/С ₁₂ -АОБ			
k _d	21±1/13±1	$(9,23 \pm 1,20) \cdot 10^{-5} / (1,64 \pm 0,21) \cdot 10^{-4}$	69,5±7,6/92,6±10,2
k _a	44±3/29±2	$(7,12 \pm 0,93) \cdot 10^{-5} / (1,00 \pm 0,13) \cdot 10^{-4}$	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} / (2,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
k _s	15±1/17±1	$(7,44 \pm 0,96) \cdot 10^{-5} / (1,67 \pm 0,22) \cdot 10^{-4}$	106,7±11,7/66,7±7,3
k _{1d}	45±3/33±2	$(1,49 \pm 0,19) \cdot 10^{-4} / (5,06 \pm 0,66) \cdot 10^{-5}$	9,1±0,1/0,35±0,04
k _{2d}	35±4/19±1	$(1,49 \pm 0,16) \cdot 10^{-5} / (5,06 \pm 0,66) \cdot 10^{-5}$	12,0 ± 1,2/0,60±0,06
k _{инд}	16±1/35±3	$(1,26 \pm 0,16) \cdot 10^{-4} / (9,50 \pm 1,24) \cdot 10^{-6}$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} / (4,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$
K _{1d} = 1,5 ± 0,2 л/моль/1,2 ± 0,1 л/моль, K _{1d} = 2,30 ± 0,23 л/моль/2,73 ± 0,27 л/моль			

Полученные экспериментальные данные приведены на рис. 19.5 – 19.9. Из них следует, что зависимости по гидролизу крахмала глюкоамилазой в присутствии АОБ аналогичны ранее полученным для других гидролитических ферментов. Это позволило использовать ту же схему превращений для обработки результатов. Справедливость ее применения была доказана адекватным описанием всех серий экспериментальных данных. В результате были рассчитаны параметры уравнения Аррениуса и специфици-

ческого кислотно-основного катализа для исследуемого ферментативного процесса, которые представлены в табл. 19.2.

Анализ экспериментальных данных позволил установить, что АОБ следующим образом изменяют оптимальные условия гидролиза крахмала глюкоамилазой:

- введение АОБ C_7 -АОБ в среду гидролиза в диапазоне концентраций $(1,0 - 5,0) \cdot 10^{-4}$ моль/л повышает скорость гидролиза крахмала в 3 раза, а АОБ C_{12} -АОБ при концентрации $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л – в 1,4 раза, а при более высоких концентрациях наблюдается снижение скорости в 3,0 – 3,5 раза;

- оба исследуемых АОБ изменяют температурный оптимум действия глюкоамилазы. Так, АОБ C_7 -АОБ расширяет температурный оптимум в интервале температур 40 – 50 °С, при этом максимальный выход продуктов гидролиза возрастает в 1,7 раза по сравнению с выходом, наблюдаемым в оптимальных условиях в отсутствие АОБ. АОБ C_{12} -АОБ смещает температурный оптимум глюкоамилазы в сторону более высоких температур с оптимумом при 60 °С, однако, максимальный выход продукта при этом снижается в 1,3 раза по сравнению с контролем.

- C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ смещают рН оптимум действия глюкоамилазы в сторону нейтральных значений рН среды (6,0 для C_{12} -АОБ и для 7,0 C_7 -АОБ). При этом в обоих случаях наблюдается увеличение выхода продуктов гидролиза соответственно для C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ в 1,8 и в 1,2 раза;

- исследование влияния преинкубации C_7 -АОБ с ферментом и субстратом показало, что в этих случаях во всем исследованном диапазоне концентраций наблюдается снижение скорости гидролиза в 2 – 4 раза. Наблюдаемый факт можно объяснить образованием интермедиата АОБ с глюкоамилазой, обладающего меньшей ферментативной активностью, чем свободный фермент; и АОБ с крахмалом, который способен гидролизироваться ФП с меньшей скоростью, чем свободный субстрат.

- исследование влияния преинкубации C_{12} -АОБ с ферментом и субстратом показало, что ее проведение в течение 20 и более минут позволяет увеличить выход продуктов гидролиза в 1,4 и 2,7 раза соответственно.

Таким образом, анализ полученных данных показал, что оба исследуемых АОБ способны повышать выход продуктов гидролиза крахмала глюкоамилазой при определенных условиях ведения процесса. Для окончательного выбора типа АОБ, обеспечивающего максимальный выход продуктов гидролиза крахмала, с использованием разработанной кинетической модели были определены оптимальные для каждого из АОБ условия. Полученные кривые гидролиза были в дальнейшем подтверждены экспериментом и представлены на рис. 19.10.

Из данного рисунка следует, что гидролиз крахмала глюкоамилазой в присутствии АОБ C_7 -АОБ следует проводить при температуре 40 °С, рН 7,0, концентрации фактора $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л без преинкубации последнего с ферментом и субстратом в течение 2 ч. Гидролиз же крахмала с приме-

нением фактора C_{12} -АОБ необходимо проводить при температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН 6,0 концентрации $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л в отсутствие прединкубации АОБ с ферментом и субстратом в течение 2 ч. Сопоставляя рис. 19.10 и рис. 19.4, можно сделать вывод о том, что применение C_7 -АОБ позволяет сократить время гидролиза и норму расхода ФП (что составляет 4 % от массы субстрата) в 7 раз, применение же C_{12} -АОБ позволяет снизить вышеуказанные параметры гидролиза только в 3 раза.

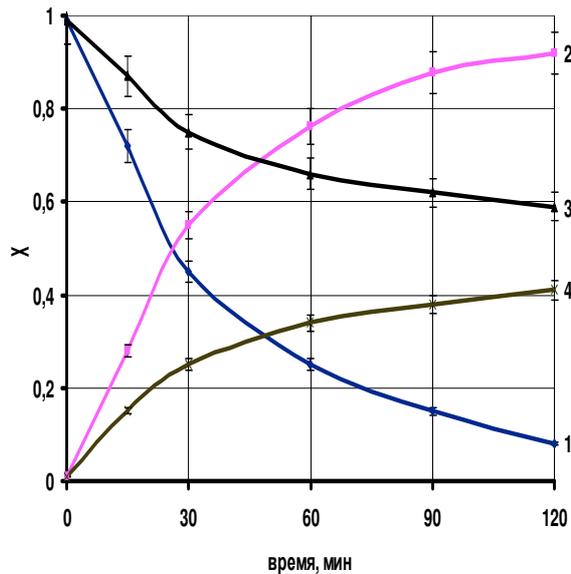


Рис. 19.10. Кинетика расходования субстрата (1,3) и накопления продуктов (2,4) гидролиза крахмала глюкоамилазой в присутствии C_7 -АОБ (1,2) и C_{12} -АОБ (3,4). Условия: температура – $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, рН 7,0; концентрация крахмала – 50 г/л, начальная активность ФП – 4000 ед./л, концентрация d_1 - C_7 – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Таким образом, из всего вышеизложенного очевидна эффективность применения C_7 -АОБ для интенсификации процесса гидролиза крахмала глюкоамилазой *Asp. awamori*.

Поскольку, как отмечалось выше, большая часть углеводов пивной дробины представлена клетчаткой, а результаты исследований показали, что гидролиз клетчатки ФП целловиридином ГЗх требует высоких расходных норм ФП, представлялось целесообразным изучить возможность его интенсификации. Предварительное изучение кинетических закономерностей данного процесса и выбор оптимальных условий возможно проводить на модельном субстрате – целлюлозе.

Глава 20

Гидролиз целлюлозы комплексным ферментным препаратом целловиридином ГЗх

Схема проведения исследований была сохранена той же, что и в предыдущих случаях. Изучалось влияние концентрации субстрата, ФП, температуры и рН среды на процесс гидролиза клетчатки целловиридином ГЗх. Эти параметры варьировали соответственно в интервале 10 – 100 г/л, 1,0 – 8,0 г/л; 40 – 70 °С; 4,5 – 7,5. Полученные зависимости представлены на рис. 20.1 – 20.4, из которых следует, что процесс гидролиза в данном случае подчиняется основным закономерностям ферментативных процессов.

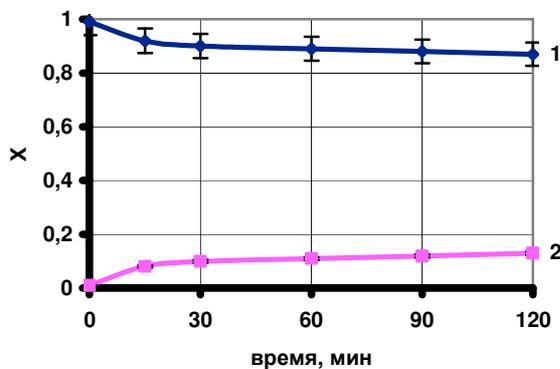


Рис. 20.1. Кинетические кривые гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх. Условия: температура – 50 °С, рН 6,5; начальная концентрация клетчатки – 75 г/л, начальная активность ФП – 500 ед./л. Обозначения: 1 – ВМФ, 2 – НМФ

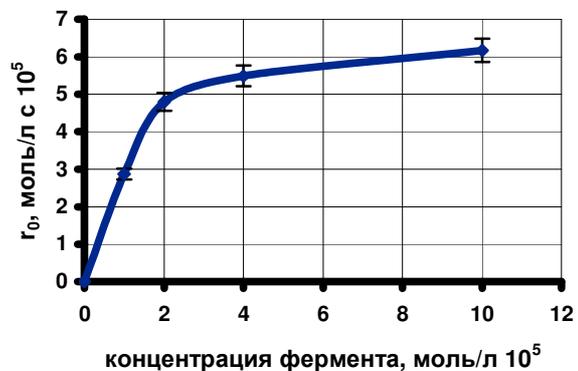


Рис. 20.2. Зависимость начальной скорости гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх от начальной концентрации ФП. Условия: температура – 50 °С, рН 6,5; начальная концентрация клетчатки – 75 г/л

Линейная зависимость скорости гидролиза от концентрации ФП наблюдается в интервале 0...2·10⁵ моль/л (0 – 500 ед./л), температурный оптимум действия фермента лежит вблизи 50 °С, а рН – 6,5. Стандартная обработка экспериментальных данных показала, что процесс может быть описан обычной схемой Михаэлиса-Ментен, осложненной ингибированием фермента конечным продуктом и инактивацией свободного фермента.

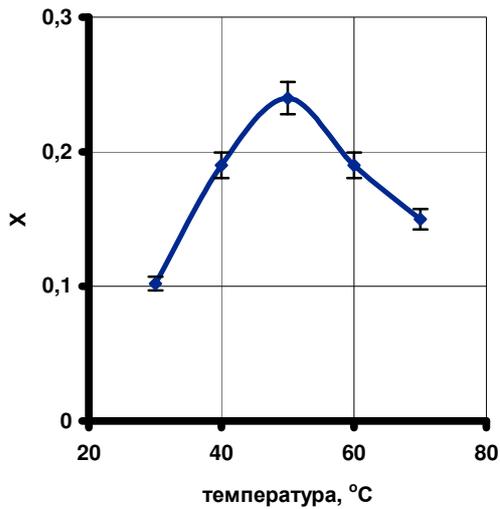


Рис. 20.3. Влияние температуры на выход продуктов гидролиза клетчатки пивной дробины целловиридином ГЗх. Условия: рН 6,5; начальная концентрация клетчатки – 75 г/л, начальная активность ФП – 500 ед./л

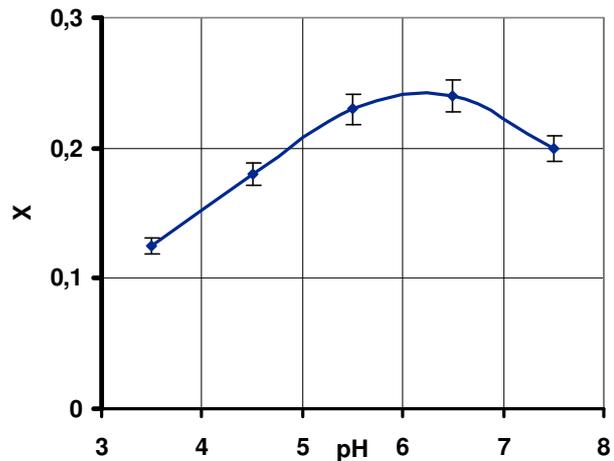


Рис. 20.4. Влияние рН среды на выход продуктов гидролиза клетчатки пивной дробины целловиридином ГЗх. Условия: температура – 40 °С; начальная концентрация клетчатки – 75 г/л, активность внесенного ФП – 500 ед/л

Зависимости, подтверждающие наличие данных типов ингибирования приведены на рис. 20.5 – 20.6, а в табл. 20.1 приведены основные параметры кинетической схемы для данного ФП.

Таблица 20.1

Значения эффективных констант и энергий активации при гидролизе целлюлозы целловиридином ГЗх

Путь	Е, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹
k_1	12 ± 1	$(5,79 \pm 0,75) \cdot 10^{-6}$	$8,13 \pm 0,72$
$k_{ин}$	57 ± 4	$(7,13 \pm 0,43) \cdot 10^{-6}$	$(4,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$
$K_1 = 6,0 \pm 0,5$ л/моль, $K_{и} = 18,1 \pm 1,7$ л/моль			

Полученная кинетическая схема была использована нами для подбора оптимальных условий гидролиза целлюлозы, обеспечивающих степень ее расщепления не менее 90 % (рис. 20.7).

Вследствие ингибирования фермента такая степень гидролиза может быть достигнута только при дробной загрузке ферментного препарата. Было установлено, что гидролиз необходимо проводить при начальной концентрации субстрата – 100 г/л, фермента – 500 ед./л, температуре

50 °С, рН среды – 6,5. Степень гидролиза 90 % достигается при 8-кратной загрузке ФП через каждые 2 ч гидролиза.

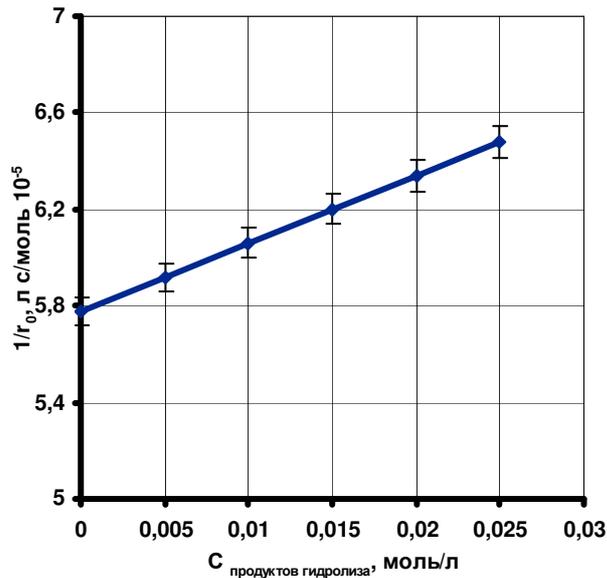


Рис. 20.5. Зависимость обратной величины начальной скорости гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх от начального содержания продуктов гидролиза в исходной среде. Условия: температура – 40°С, рН 6,5; начальная концентрация ФП – 500 ед./л

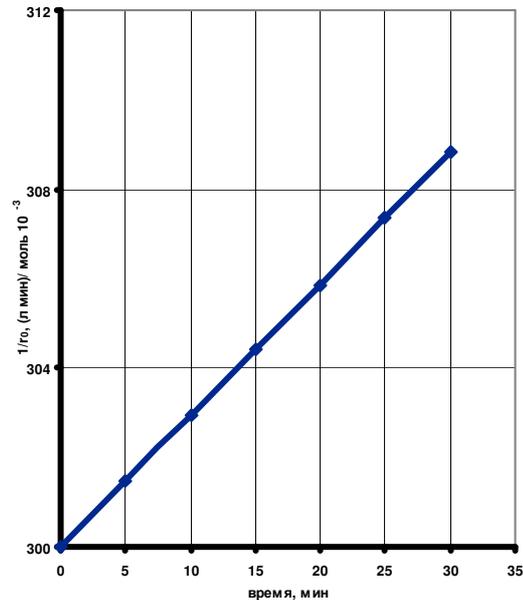


Рис. 20.6. Зависимость обратной величины начальной скорости гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх от времени прогрева ФП. Условия: температура – 40 °С, рН 6,5; начальная активность ФП – 500 ед./л

Таким образом, общее время гидролиза составляет 16 ч, а расход ферментного препарата – 16 % от массы субстрата. С целью снижения столь высокой нормы расхода целловиридина и сокращения длительности ферментализации на следующем этапе исследований была изучена возможность применения С₇-АОБ и С₁₂-АОБ для интенсификации данного процесса.

Исследования проводились по схеме варьирования параметров в следующих интервалах: температура – 30...70 °С, рН среды 4,5 – 7,5; концентрация АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$... $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, время прединкубации АОБ с субстратом и ферментом – 0... 20 мин. Зависимости, аналогичные ранее полученным для других ферментативных процессов, приведены на рис. 20.7 – 20.10. Аналогичный вид зависимостей позволил сделать предположение, что взаимодействие целловиридина с АОБ подчиняется тем же закономерностям, что и для ранее изученных ферментов.

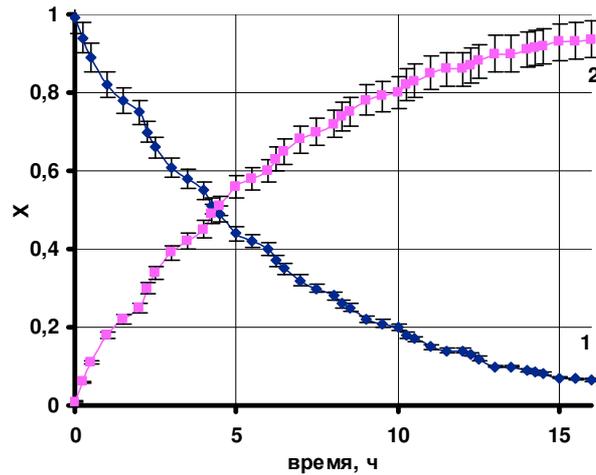


Рис. 20.6. Кинетика гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх в оптимальных условиях. Условия: температура – 40 °С, рН 6,5; начальная активность ФП – 500 ед./л, начальная концентрация – клетчатки – 75 г/л. Обозначения: 1 – кривая расходования клетчатки, 2 – кривая накопления продуктов гидролиза. Внесение ФП – 2 ч

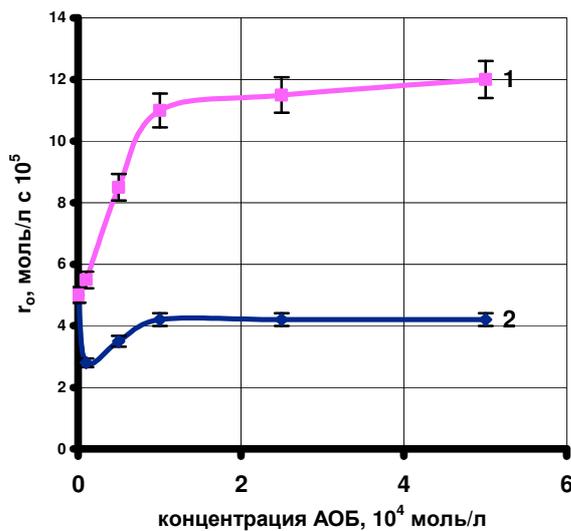


Рис. 20.7. Влияние концентрации C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ на выход продуктов гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх. Условия: температура – 50 °С, рН 6,5; начальная активность ФП – 500 ед./л. Обозначения: 1 – C_7 -АОБ, 2 – C_{12} -АОБ

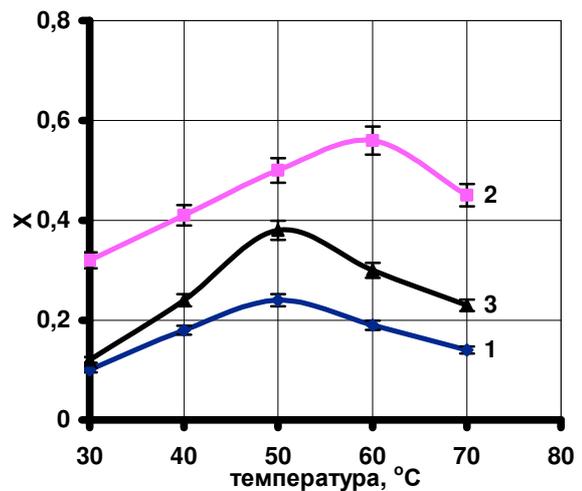


Рис. 20.8. Влияние температуры на выход продуктов гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх в отсутствии (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: рН 6,5; начальная активность ФП – 500 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

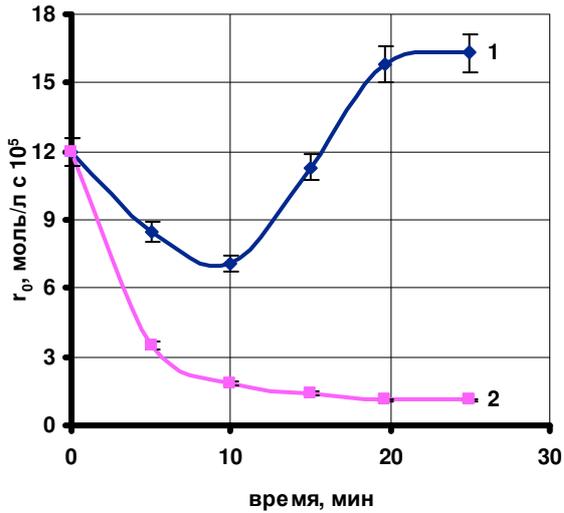


Рис. 20.9. Зависимость начальной скорости гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх в присутствии C_7 -АОБ (1) и C_{12} -АОБ (2) от времени предынкубации АОБ с ФП. Условия: pH 6,5, начальная активность ФП – 500 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

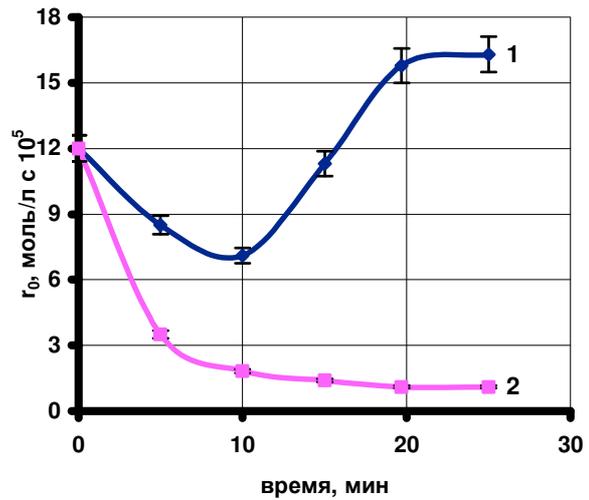


Рис. 20.10. Зависимость начальной скорости гидролиза целлюлозы целловиридином и в присутствии АОБ d_1-C_7 (1) и d_1-C_{12} (2) от времени предынкубации АОБ с субстратом. Условия: pH 6,5, начальная активность ФП – 500 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

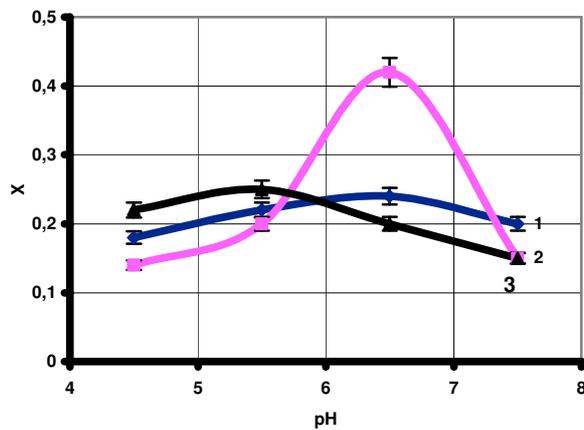


Рис. 20.9. Влияние pH на выход продуктов гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх в отсутствии (1) и в присутствии C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: температура – 50°C ; начальная активность ФП – 500 ед./л, начальная концентрация C_7 -АОБ – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Поэтому их описание должно подчиняться той же схеме превращений с учетом ингибирования фермента конечным продуктом и его термоинактивации. Проведение расчетов, аналогичных вышеописанным, полностью подтвердило сделанное предположение и позволило установить кинетические параметры процесса гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх в присутствии АОБ, представленные в табл. 20.2.

Таблица 20.2

Значения параметров процесса гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх в присутствии АОБ

Путь	E, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹
Фактор C_7 -АОБ/ C_{12} -АОБ			
k_d	11±1/13±1	$(2,32±0,30) \cdot 10^{-6} / (1,74±0,18) \cdot 10^{-4}$	2740± 245/625±44
k_a	26±2/40±3	$(1,97±0,26) \cdot 10^{-4} / (3,74±0,49) \cdot 10^{-4}$	0,0013±0,0001 / 0,0024±0,0002
k_s	15±1/15±1	$(3,25±0,42) \cdot 10^{-4} / (3,07±0,40) \cdot 10^{-4}$	592±56/294±21
k_{1d}	55±4/37±3	$(2,91±0,38) \cdot 10^{-4} / (2,31±0,30) \cdot 10^{-4}$	8,33±0,58/5,26±0,36
k_{2d}	47±4/54±5	$(2,75±0,34) \cdot 10^{-4} / (7,14±0,38) \cdot 10^{-6}$	10,67±0,75/0,0031±0,0002
$k_{инд}$	52±5/56±5	$(7,23±0,43) \cdot 10^{-6} / (2,45±0,21) \cdot 10^{-4}$	0,0025±0,0002/9,59±0,58
$K_{1d} = 2,5 \pm 0,2$ л/моль/ $3,2 \pm 0,2$ л/моль, $K_{инд} = 0,85 \pm 0,06$ л/моль/ $0,82 \pm 0,06$ л/моль			

Как и в ранее рассмотренных случаях, важно было оценить возможности АОБ в части интенсификации гидролиза целлюлозы ФП целловиридином ГЗх. Анализ экспериментальных данных выявил следующие закономерности влияния АОБ на исследуемый ферментативный гидролиз:

1) использование C_7 -АОБ в концентрации выше $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л приводит к повышению скорости ферментативного гидролиза в 2,3 раза по сравнению с контролем; применение C_{12} -АОБ в концентрации ниже $1,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л приводит к снижению скорости гидролиза в 1,7 раза. При более высоких его концентрациях скорость гидролиза возрастает, однако, ее максимальное значение не превышает 0,8 от контроля;

2) применение C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ приводит к повышению выхода продуктов гидролиза клетчатки во всем диапазоне исследованных температур в 2,9 раза для C_7 -АОБ и в 1,5 раза для C_{12} -АОБ. При этом использование C_7 -АОБ смещает температурный оптимум действия фермента в сторону более высоких температур, его величина составляет 60°C;

3) в присутствии C_{12} -АОБ происходит смещение рН оптимума действия целловиридина в сторону более кислых значений рН среды (5,5), при этом выход продуктов гидролиза при кислых значениях рН (до 6,0) повышается в 1,2 раза, а при щелочных во столько же раз снижается. Использование C_{12} -АОБ не приводит к изменению оптимума рН, но увеличивает скорость гидролиза в 1,8 раза по сравнению с контролем;

4) прединкубация АОБ с ФП в случае как C_7 -АОБ, так и C_{12} -АОБ приводит к снижению начальной скорости ферментализа соответственно в 1,7 и 12,0 раз. Причем, в случае C_{12} -АОБ при времени прединкубации свыше 20 мин наблюдается возрастание начальной скорости гидролиза в 1,3 раза по сравнению с контролем, в случае АОБ C_{12} -АОБ повышения скорости гидролиза не происходит;

5) при прединкубации АОБ с субстратом наблюдается аналогичная п.4 зависимость: в случае C_7 -АОБ при прединкубации в течение 7 мин происходит снижение скорости гидролиза в 4,0 раза, а в случае C_{12} -АОБ – в 12,0. При этом выход продуктов гидролиза на уровень контроля не достигается: в случае C_7 -АОБ максимальный выход составляет 0,67 от контроля и наблюдается при прединкубации в течение 20 мин. Таким образом, прединкубация обоих АОБ с ФП и субстратом для данной системы не приводит к повышению эффективности ферментативного гидролиза.

Подбор оптимальных условий гидролиза целлюлозы целловиридином ГЗх в присутствии АОБ показал, что данный ферментативный процесс необходимо проводить в присутствии C_7 -АОБ в концентрации $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л при температуре 60°C , рН 6,5 при прединкубации ФП с АОБ в течение 5 мин. При этом степень гидролиза клетчатки достигает 95 %, норма расхода ФП за счет использования АОБ снижается в 2,7 раза и во столько же раз снижается время ферментализа. Соответствующая зависимость представлена на рис. 20.12.

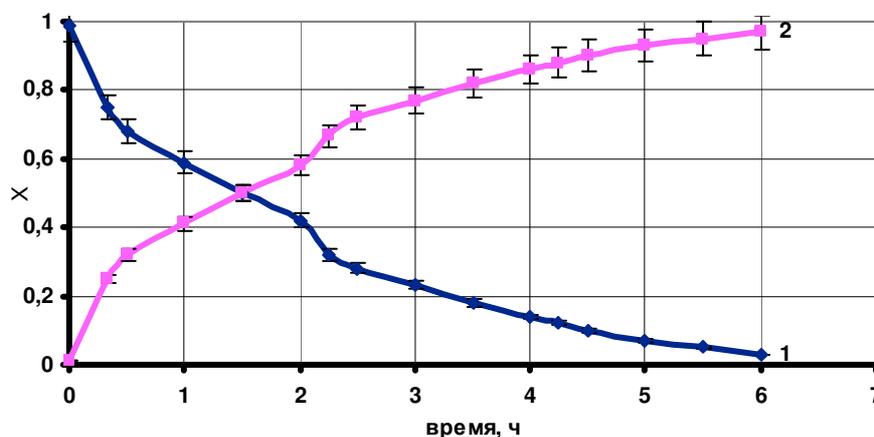


Рис. 20.12. Кинетика гидролиза целловиридином целловиридином ГЗх в присутствии C_7 -АОБ в оптимальных условиях. Условия: температура – 60°C , рН 6,5; начальная активность ФП – 500 ед./л, начальная концентрация d_1 - C_7 – $3,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1 – кривая расходования субстрата, 2 – кривая накопления продуктов гидролиза, ↓ – момент внесения ФП

Глава 21

Технология получения водорастворимой углеводной фракции из пивной дробины

В качестве субстрата использовали депротеинизированную пивную дробину. Предварительные эксперименты показали, что ранее подобранные оптимальные условия гидролиза крахмала и целлюлозы в полной мере применимы для гидролиза данных соединений в составе пивной дробины. Также было установлено, что степень конверсии углеводов пивной дробины на уровне 90 – 95 % может быть достигнута только в результате обработки последней α -амилазой, глюкоамилазой и целлюлазой. Причем норма расхода каждого из ФП в этом случае составляет не менее 8 % от массы, а ее снижение до 2 % достигается только за счет ведения гидролиза в присутствии АОБ d₁-C₇ также в ранее подобранных для каждого ФП условиях.

Таким образом, для оптимизации процесса гидролиза углеводов пивной дробины необходимо было изучить влияние на данный процесс следующих факторов: последовательность обработки дробины ФП; возможность параллельной обработки несколькими ФП; способ последовательной обработки: внесение каждого следующего ФП непосредственно в гидролизат, либо предварительное отделение гидролизата, полученного на предыдущем этапе, фильтрованием; необходимость ультразвуковой предобработки.

Результаты исследований приведены на рис. 21.1 – 21.3.

Необходимо отметить, что в данных экспериментах степень гидролиза субстрата оценивалась по содержанию в гидролизате суммарных углеводов. Поэтому степень конверсии субстрата под действием амилолитических ферментов не превышала 20 – 25 %, что обусловлено относительным содержанием крахмала в пивной дробине от массы общих углеводов. Проведенные эксперименты показали, что при последовательной обработке пивной дробины ФП на первом этапе необходимо вносить в среду гидролиза амилазы. При этом степень конверсии субстрата при последующем гидролизе его целловиридином повышается на 15 – 20 %.

Это связано, вероятно, с тем, что гидролиз крахмала приводит к «разрыхлению» пивной дробины и за счет этого увеличивается поверхность взаимодействия целловиридина с клетчаткой. Последовательность внесения амилаз принципиального значения не имеет. Что касается отделения гидролизата от биомассы пивной дробины, то, как показали эксперименты, суммарная степень гидролиза субстрата практически не меняется. Однако конечная концентрация глюкозы в гидролизате не превышает 8 – 10 г/л, тогда как в первом варианте она составляет 30 – 35 г/л.

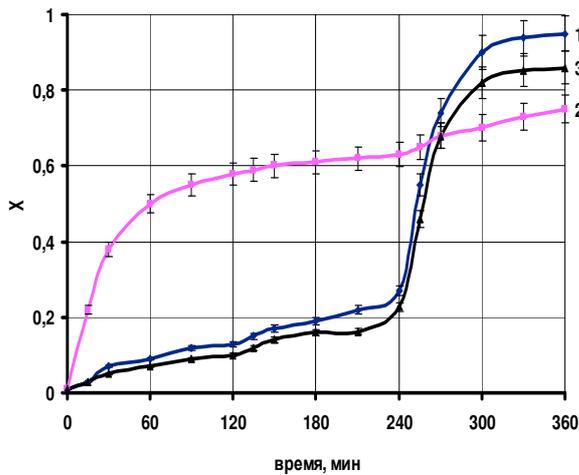


Рис. 21.1. Накопление НМФ углеводов при гидролизе депротенизированной пивной дробины в оптимальных для каждого ФП условиях в присутствии S_7 -АОБ при последовательном добавлении ФП к субстрату: 1 – амилаза, глюкоамилаза, целловиридин, 2 – целловиридин, амилаза, глюкоамилаза, 3 – глюкоамилаза, амилаза, целловиридин

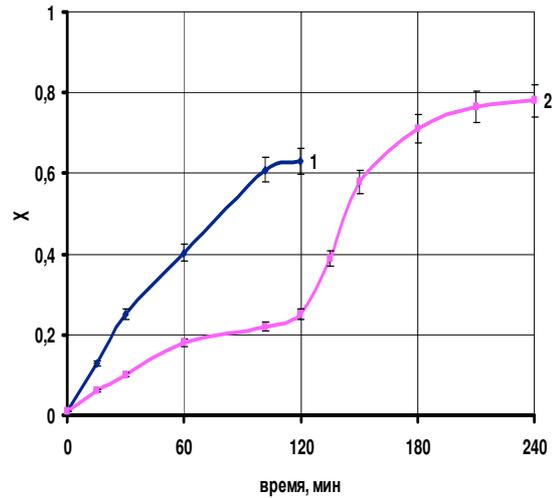


Рис. 21.2. Накопление НМФ углеводов при гидролизе депротенизированной пивной дробины в оптимальных для каждого ФП условиях в присутствии S_7 -АОБ при параллельном внесении ФП в субстрат: 1 – амилаза, глюкоамилаза, целловиридин, 2 – амилаза, глюкоамилаза, затем через 2 ч гидролиза – целловиридин

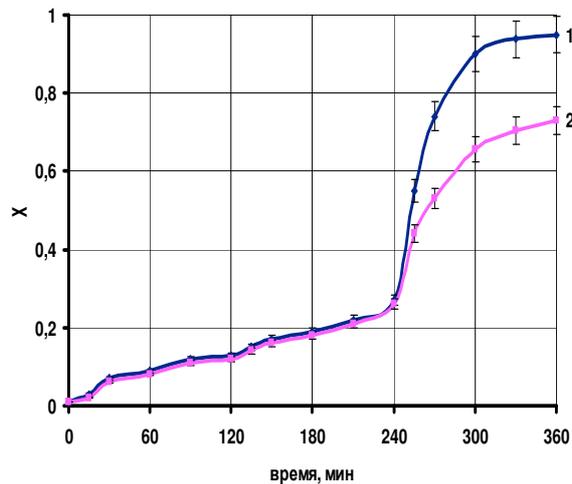


Рис. 21.3. Накопление НМФ углеводов при гидролизе депротенизированной пивной дробины в оптимальных для каждого ФП условиях в присутствии S_7 -АОБ при последовательном добавлении к субстрату амилазы, глюкоамилазы, целловиридина: 1 – при предварительной ультразвуковой обработке пивной дробины, 2 – без предварительной ультразвуковой обработки пивной дробины

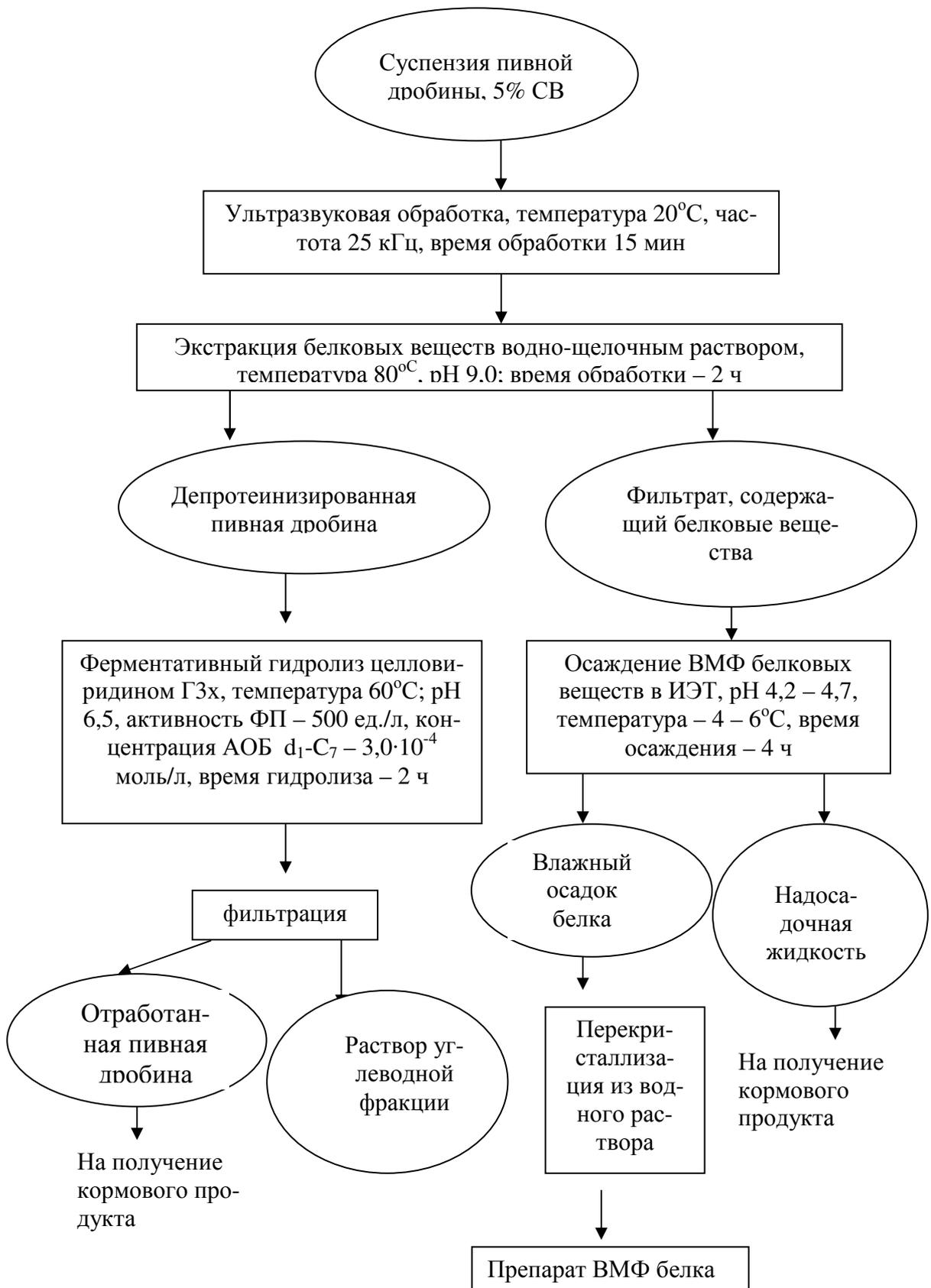


Рис. 20.4 Принципиальная схема переработки пивной дробины

В этом случае не требуется предварительного концентрирования гидролизата перед его использованием для культивирования микроорганизмов. Это исключает дополнительные энергозатраты и деструкцию углеводов при повышенных температурах. Таким образом, вариант последовательного внесения ФП без отделения гидролизата на каждом этапе, безусловно, является предпочтительным.

Рис. 21.3 показывает, что предварительная ультразвуковая обработка также увеличивает степень конверсии углеводов пивной дробины. Кроме того, как было показано выше, она повышает выход белковой фракции. Таким образом, на основании проведенных исследований была предложена принципиальная схема переработки пивной дробины, представленная на рис. 21.4.

Часть IV

ГИДРОЛИЗ ПОЛИ- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

Глава 22

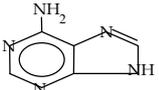
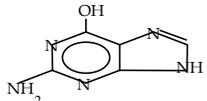
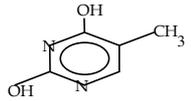
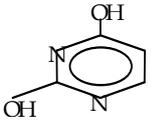
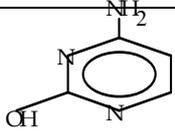
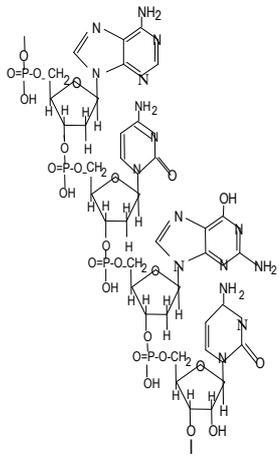
Нуклеиновые кислоты

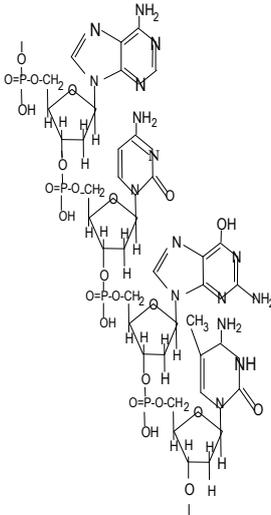
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) в количестве до 1 % входит в состав всех живых клеток и обеспечивает передачу наследственности (генетический код), осуществляя синтез клеточных белков. ДНК обладает структурой двухцепочечного биополимера, состоящего из связанных нуклеотидов и имеет молекулярную массу около 1 млн. Да (табл. 22.1). Считается, что в составе некоторых клеток, например прокариот, вся наследственная информация хранится в одной большой молекуле ДНК с молекулярной массой порядка $2 \cdot 10^9$. В микробных и животных клетках может содержаться несколько больших молекул ДНК. Кольцевые ДНК клеток, называемые плазмидами, используются в качестве "векторов" – трансформируемых биохимических веществ, применяемых в генной инженерии.

Комбинация трех нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты называется кодоном. В соответствии с расшифрованным генетическим кодом такой кодон определяет в живой клетке синтез конкретной аминокислоты. Например UUG (–УУГ–) кодирует образование аминокислоты Leu (табл. 22.2).

Увеличение содержания нуклеиновых компонентов более 1,5–2 % в объектах пищевого назначения, считается небезопасным, поэтому, например, микробный белок, содержащий до 6–8 % нуклеиновых компонентов, подвергают до использования в составе животных кормов денуклеинизации.

Строение нуклеотидов, ДНК, РНК

Русское наименование	Английское наименование	Символ		Структурная формула	ММ	Растворимость, г/100 г		
		рус	англ			В воде при 20 °С	В воде при 100 °С	В этаноле при 20 °С
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Аденин	Adenine	А	А		131,5	0,09	2,5	НР
Гуанин	Guanine	Г	G		151,1	0,004	3	НР
Тимин	Thymine	Т	Т		126,1	0,4	Р	МР
Урацил	Uracil	У	U		121,1	0,36	Р	МР
Цитозин	Cytosine	Ц	С		111,1	0,77	Р	МР
РНК	RNA	—	—		1000 кДа	НР	НР	НР

1	2	3	4	5	6	7	8	9
ДНК	DNA	—	—		1000 кДа	НР	НР	НР

Количественное содержание нуклеиновых компонентов в образце (методика 22.1) можно определить по методу Спирина (методика 22.2).

Методика 22.1. Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса.

ОБОРУДОВАНИЕ. Аналитические весы. Конические колбы с пробками на 50 мл. Центрифуга 8000 G. Термометры 0–100 °С. Ультратермостат 0–100 °С. Холодильник со льдом. Размельчитель тканей или микрогомогенизатор.

РЕАКТИВЫ. 1. Лизирующий раствор 1: 25 мМ Трис-НСl, рН 8 / 50 мМ глюкозы / 20 мМ ЭДТА / 2 мг/мл лизоцима. Готовят растворением 3 г трис(гидроксиметил)аминометана $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, 9 г глюкозы и 7,45 г этилендиамина тетраацетата динатриевой соли $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ЭДТА) в 0,5 л воды, устанавливают рН раствора равным 8, добавляя концентрированный раствор НСl, растворяют 2 г лизоцима и доводят общий объем раствора до 1 л. Срок хранения в холодильнике не более 7 суток. 2. Лизирующий раствор 2. Растворяют 1 г натрия додецилсульфата $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ (SDS) в 99 мл 0,2 М (8 г/л) раствора NaOH.

3. 3 М раствор натрия ацетата. Растворяют 408 г/л ацетата натрия $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде и устанавливают рН раствора 4,5–5,0, добавлением ледяной CH_3COOH .

4. Этанол 96 %-й.

5. Трис-ацетатный буфер. 0,04 М Трис-ацетат / 0,002 М ЭДТА рН 8,0. Готовят растворением 242 г/л Триса, 57,1 мл/л ледяной CH_3COOH до рН 8.

6. 5 М (246 г/л) раствор хлорида лития LiCl, содержащий 0,75 г/л ЭДТА.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ. 1. Получают суспензию животной ткани клеток, гомогенизируя 1 г мяса с 15 мл воды, центрифугируют при 5000 об/мин, надосадочную жидкость отбрасывают.

2. К осадку добавляют 1 мл лизирующего раствора 1, перемешивают, сразу добавляют 2 мл раствора 2. Смесь центрифугируют, надосадочную жидкость отделяют.

3. К полученной жидкости добавляют 1,5 мл 3 М раствора натрия ацетата, перемешивают до формирования осадка, который отделяют центрифугированием при 5000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают.

4. К осадку добавляют 1 мл этанола, перемешивают в течение 10 мин, повторно центрифугируют. Надосадочную жидкость отбрасывают.

5. Осадок растворяют в 2 мл Трис-ацетатного буфера.

6. К раствору добавляют 2 мл 5 М раствора хлорида лития, перемешивают и выдерживают при температуре льда в течение 15 мин. Осадок отделяют центрифугированием.

7. П.п. 4–6 повторяют, к осадку ДНК добавляют 2 мл Трис-ацетатного буфера и используют для количественного определения содержания ДНК в растворе.

Методика 22.2. Количественное определение ДНК, РНК и их компонентов в гидролизатах спектрофотометрическим методом Спирина..

Метод основан на способности ДНК, РНК и продуктов их расщепления (нуклеотидов) поглощать в ультрафиолетовой части спектра при 200–300 нм.

При кислотном гидролизе ДНК и РНК отщепляются фосфаты. Неорганическое содержание фосфора можно рассчитать по разнице поглощения при 270 и 290 нм.

Оборудование. Спектрофотометр с кюветами, пробирки.

РЕАКТИВЫ. Раствор ДНК. Раствор, содержащий 1 мг чистой ДНК в 1 мл, характеризуется поглощением $D_{260} = 20,0$.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ. В соответствии с инструкцией по эксплуатации подготавливают к работе спектрофотометр. В кювету заливают раствор экстрагированной ДНК и проводят измерение поглощения раствора при 270 и 290 нм против контроля, в качестве которого (2-я кювета сравнения) используют смесь 2 мл 5 М раствора хлорида лития и 2 мл Трис-ацетатного буфера.

Содержание нуклеинового фосфора (С, мг/мл) ДНК рассчитывают по формуле: $C, \text{ мг/мл} = (D_{270} - D_{290}) / 0,19$, где D_{270} и D_{290} – поглощение раствора при 270 и 290 нм.

Для того, чтобы перейти от количества фосфора к количеству ДНК, полученное значение содержания фосфора C умножают на 10,1, а для расчета содержания РНК значение C умножают на 10,5, поскольку содержание фосфатов в РНК в среднем 9,5 %, а в ДНК – 9,9 %.

Таблица 22.2

Генетический код

	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	СТОП	СТОП	А
	Лей	Сер	СТОП	Тре	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асп	Сер	У
	Иле	Тре	Асп	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

Глава 23

Практическое значение панкреатического гидролизата РНК

Панкреатический гидролизат РНК, известный под названием ЭНКАД, – отечественный препарат, производимый из природного сырья – дрожжевой РНК. Препарат является смесью продуктов ферментативного гидролиза дрожжевой РНК, содержит олигорибонуклеотиды и пиримидиновые нуклеозид-3'-фосфаты.

Панкреатический гидролизат РНК был создан группой авторов в конце 70-х гг. [1] и начал с успехом применяться для лечения наследственных тапеторетинальных абiotрофий – заболеваний, приводящих к слабо-видению и слепоте [2, 3]. Распространенность этих заболеваний достаточно велика и составляет от 0,2 до 5 чел на 1000 человек населения. Однако до настоящего времени не существует эффективных методов и средств лечения этой группы болезней в мире.

По данным Одесского медицинского института им. И.П. Пирогова при применении препарата ЭНКАД у 98 % больных с различными форма-

ми тапеторетинальных абиотрофий (пигментная дегенерация сетчатки, макулодистрофия и др.) был достигнут значительный терапевтический эффект, заключающийся в повышении остроты зрения и расширения поля зрения, способствующий улучшению зрительных функций в большом числе случаев. В основе действия ЭНКАДа обнаружена способность усиливать формирование наружных мембранных дисков сегментов палочек сетчатки глаза.

Наследственная дистрофия сетчатки глаза описана у животных разных видов (собак, овец, крыс и мышей). Был проведен биохимический анализ обмена в сетчатке у крыс в норме и на двух экспериментальных моделях (дистрофия, вызываемая моноиодацетатом и модель светового повреждения фоторецепторов). Поскольку распад и ресинтез родопсина являются наиболее важными процессами в сетчатке и, вместе с тем, они отражают состояние целого ряда «обслуживающих» их метаболических систем, особое внимание в работе Института морфологии человека АМН РФ в г. Москве было уделено исследованию способности сетчатки глаза к восстановлению зрительного пигмента в ранние сроки после его поражения. Были проведены исследования активности фермента ретинолдегидрогеназы после поражения сетчатки моноиодацетатом или холодным интенсивным светом. Было показано, что в обоих случаях уже через несколько часов после начала действия поражающего фактора активность фермента снижалась, в то время как применение некоторых комбинаций рибонуклеотидов оказывало положительное действие на ресинтез родопсина в поврежденной сетчатке крыс.

Показано действие некоторых нуклеотидов на электрофизиологическую активность сетчатки и прямое их связывание с родопсином [4–8].

По данным Института морфологии человека возникло предположение, что в основе нарушений обмена при некоторых формах наследственной дистрофии у человека лежит изменение метаболизма нуклеотидов в сетчатке. Обмен нуклеотидов характеризуется многообразием форм взаимодействия метаболитов. Нуклеотиды могут взаимопревращаться друг в друга, играть роль кофакторов и доноров фосфатных групп при биосинтезе и т.п. Баланс этих реакций и соотношения концентраций разных нуклеотидов являются, по-видимому, специфическими для различных тканей. Так, например, сетчатка характеризуется высоким содержанием производных гуаниловой кислоты.

Известно, что избыток ц-GMP в фоторецепторах мутантных мышей – основная причина дегенерации сетчатки. Экстраполируя этот взгляд на тапеторетинальные дистрофии человека, было сделано предположение, что нарушения расщепления ц-GMP ведут к изменению соотношения ц-GMP/5'-GMP в фоторецепторной клетке и что результатом этого является нарушение в ней ряда важных обменных процессов. При наследственной дистрофии сетчатки у мышей и крыс в фоторецепторах падает содержание

фосфодиэстеразы и в 4–5 раз повышается содержание ц-GMP. Эти изменения предшествуют развитию ультраструктурных нарушений в наружных члениках. Компенсация этого дефицита может быть одним из элементов лечебного действия препарата ЭНКАД.

Все вышеописанное является основанием для того, чтобы в дальнейших поисках ответа на вопрос о роли метаболического дефекта, лежащего в основе развития тапеторетинальных дистрофий у человека, а, возможно, и некоторых других амиотрофий нервной системы, рассматривать эти заболевания как «диснуклеотидозы». В случае некоторых форм наследственной дистрофии сетчатки такие заболевания можно рассматривать как ретинальные диснуклеотидозы.

Среди ряда наследственных заболеваний, сопровождающихся нарушением обмена нуклеотидов, в широком смысле можно говорить о двух группах. Первая – в которой нарушения обмена нуклеотидов затрагивают сравнительно узкоспециализированные области метаболизма. Вторая – в которой нарушения обмена нуклеотидов влияют на универсальные обменные процессы (биосинтез белка и нуклеиновых кислот). При дальнейшем анализе механизма действия ЭНКАДа в клинике и на животных в первую очередь предстоит решить вопрос о характере действия нуклеотидов (прямым или опосредованным) и о том, какой или какие нуклеотиды являются действующим началом.

Препарат ЭНКАД регулирует обмен нуклеотидов в тканях, обладает иммуномодулирующими свойствами, способствует улучшению функций клеточных мембран, биоэнергетике мышц, уменьшению миодистрофических процессов, проведению импульса по двигательным нервам. Область применения препарата ЭНКАД существенно расширена, и в настоящее время препарат разрешен для медицинского применения для лечения иммунодефицита, болезни Шегрена, а также при дегенеративных заболеваниях нервно-мышечной системы: наследственных формах миопатий (ранние стадии), врожденном и приобретенном миопатическом синдроме, различных формах невральных амиотрофий, последствиях нейроинфекций, спинальных амиотрофиях. Применение препарата при этих заболеваниях защищено авторскими патентами и свидетельствами [9, 10].

Хороший эффект от применения препарата отмечен также при лечении таких заболеваний с неблагоприятным прогнозом, как миодистрофия Дюшена, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз. Кроме того, выявленный репаративный эффект препарата дает возможность использовать его при лечении ран, язвенных процессах, ожоговой болезни.

В настоящее время в Центральном научно-исследовательском кожно-венерологическом институте Минздрава РФ проведены клинические исследования действия препарата ЭНКАД в сочетании с фитохимиотерапией в дерматологии при распространенном псориазе. Показано, что применение препарата нуклеиновой природы в комплексной терапии больших

распространенным псориазом сопровождается нормализацией активности ферментов нуклеинового обмена – аденозиндезаминазы и пурииннуклеозидфосфорилазы в эритроцитах и снижением концентрации противовоспалительных цитокинов: фактора некроза опухоли α и интерлейкина-2 у 50 % больных, что свидетельствует также о противовоспалительном эффекте данного метода лечения [11].

В дальнейшем предполагается расширить область применения препарата на иммунодефициты различного происхождения (в том числе СПИД), а также на инфаркты сердца и перегрузки сердца различного происхождения.

Потребность в панкреатическом гидролизате РНК как лекарственном препарате увеличивается, однако, промышленный выпуск субстанции препарата, налаженный на НПО «Биолар» (г. Олайне, Латвия), прекращен, а Харьковское предприятие бактериальных препаратов на Украине в настоящее время продолжает выпуск препарата в виде лекарственной формы (в виде 3,5 %-ного раствора в ампулах), но поставляет его в Россию в ограниченных количествах.

Существующая потребность в препарате ЭНКАД составляет около 100 кг в год, а при условии поставки препарата на экспорт она может быть и еще больше.

Технологические приемы получения гидролизатов нуклеотидной природы. В качестве сырья для производства гидролизатов нуклеотидной природы используется дрожжевая РНК, полученная по различным технологиям, например [12].

Гидролиз РНК в промышленности осуществляется с применением химических агентов или технических ферментов. При получении очищенных кристаллических препаратов олигонуклеотидов гидролизом полинуклеотидов могут использоваться РНК разной степени очистки, что предполагает различные схемы переработки гидролизатов. Эффективность производства олигонуклеотидов определяется себестоимостью полинуклеотидов, получение и переработку которых целесообразно проводить на крупнотоннажных предприятиях, отходом которых является биомасса дрожжей, например, пивоваренные заводы. Такие заводы используют технологии, основанные на переработке больших объемов водных суспензий микробных клеток, и не применяют органических растворителей, поэтому для них наиболее приемлемым должен быть один из возможных вариантов гидролиза РНК в водном растворе [13].

Чаще всего в промышленности используется щелочной и ферментативный гидролиз. До недавнего времени ведущая роль принадлежала щелочному гидролизу. Механизм расщепления РНК в щелочной среде объяснили Тодд и сотр., которые пришли к заключению, что щелочной гидролиз приводит к образованию двух изомерных форм каждого из нуклеотидов. Кон и Картер, выявившие присутствие этих двух форм, назвали их а- и &-

нуклеотидами, но впоследствии выяснилось, что они представляют собой нуклеозид-2'- и нуклеозид-3'-фосфаты. Если какой-либо один из изомеров перевести в кислую среду, то очень быстро образуется смесь обеих форм; в щелочном растворе обе формы устойчивы и одна в другую не превращаются. Взаимное превращение изомеров идет через образование циклического промежуточного соединения, нуклеозид-2',3'-циклофосфата, гидролиз которого дает смесь нуклеозид 2'- и нуклеозид-3'-фосфатов [14].

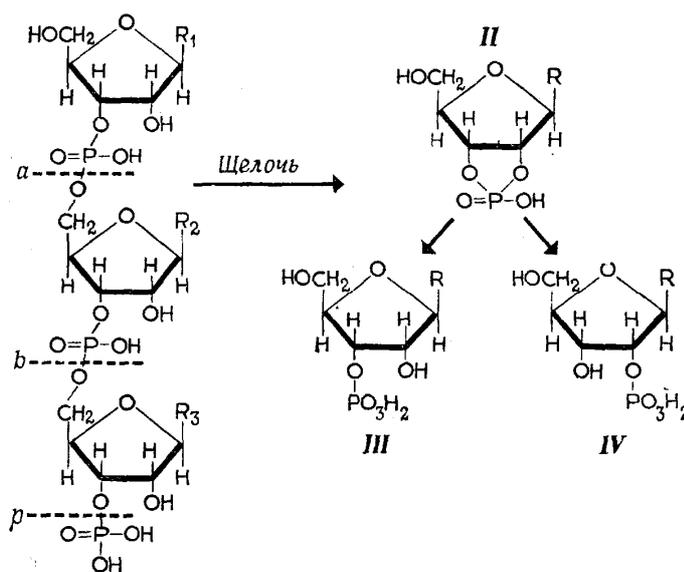


Рис. 23.1. Химический гидролиз нуклеиновых компонентов

Механизм ферментативного гидролиза несколько отличается от протекающего по той же схеме щелочного гидролиза (рис. 23.1). Эти отличия сводятся к следующему: во-первых, процесс, катализируемый ферментом, протекает с большой скоростью при нейтральных и слабощелочных значениях рН, при которых скорость щелочного гидролиза неизмеримо мала. В нейтральной среде среднее время превращения цитидин-2',3'-циклофосфата в составе комплекса с ферментом на три порядка меньше, чем время химического превращения того же субстрата в 1М растворе щелочи. Во-вторых, нуклеозид, примыкающий к атому Р со стороны 3'-кислородного атома, в случае ферментативного гидролиза должен быть пиримидиновым нуклеозидом, причем в случае аналогов уридина или цитидина они должны быть по структуре таковы, чтобы резко предпочтительной была анти-конформация гликозидной связи; в-третьих, фермент катализирует только гидролиз фосфодиэфирных связей, образованных 3'- и 5'-гидроксилами соседних нуклеозидных фрагментов, в то время как щелочному гидролизу в равной степени подвержены и связи, образованные 2'- и 5'-оксигруппами; в-четвертых, при гидролизе циклического фосфата

фермент дает исключительно 3'-концевой фосфат, в то время как при щелочном гидролизе в близких количествах образуются 2'- и 3'-изомеры [15].

Для получения панкреатического гидролизата РНК используется рибонуклеаза, выделяемая из бычьей поджелудочной железы – отхода мясоперерабатывающей промышленности. Технологический процесс ее получения изложен в [16].

Гидролиз раствора дрожжевой рибонуклеиновой кислоты панкреатической рибонуклеазой осуществляется при температуре 65 °С, рН 5,5 в течение 5 ч, после чего смесь олигонуклеотидов отделяют от негидролизованной РНК сначала осаждением при добавлении 25 % по объему этилового спирта, а затем ультрафильтрацией смеси под давлением 0,15 – 0,4 МПа на мембране УАМ-100. Очищенную таким образом смесь олигонуклеотидов осаждают 8 – 10-кратным объемом спирта, высушивают, сухую смесь растворяют в 0,55 – 0,65 %-ым растворе NaCl, дополнительно фильтруют через мембраны с диаметром пор 2000 – 2200 нм при давлении от 0,8 до 1 атм и стерилизуют при температуре 119 – 122 °С в течение 32 – 34 мин.

Проведение всех указанных операций обеспечивает получение нетоксичного, стерильного, апирогенного препарата с выходом 51%. Препарат характеризуется следующими показателями: удельная экстинкция: $E^1 = 240 \%$ при длине волны 260 нм и рН = 2 ; соотношения поглощений при рН = 7: $A^0_{260/230} = 3,15$, $A^0_{260/280} = 1,60$.

Однако в данной технологии около 50 % сырья в виде дрожжевой РНК не перерабатывается и является отходом производства. Кроме того, в настоящее время отсутствуют алгоритмы управления данным процессом, которые позволили бы получать гидролизат, соответствующий требованиям ВФС. Поэтому данная перспективная и актуальная технология, безусловно, нуждается в доработке и совершенствовании.

Характеристика панкреатической рибонуклеазы. Рибонуклеаза (РНК-аза) поджелудочной железы КРС, являющаяся наиболее изученной и нашедшей широкое применение нуклеазой, относится к рибонуклеазам (I) (рибонуклеинат-3'-пиримидиноолигонуклеотидгидролазам) – эндонуклеазам, ускоряющим реакцию по пиримидиновым нуклеотидным остаткам.

Ранее рибонуклеазы относили к рибонуклеинат-пиримидиннуклеотида-2'-трансферазам (циклизующим), но поскольку 2',3'-циклофосфаты в процессе их действия образуются как промежуточные продукты, гидролиз которых до 3'-фосфатов ускоряется тем же ферментом, в настоящее время рибонуклеазы (I) включены в класс гидролаз (КФ 3.1.2.7.5) [17]. Этот термостабильный фермент, способный расщеплять дрожжевую РНК, обнаружил Джонс в поджелудочной железе КРС в 1920 г. Фермент, образуясь в зимогенных гранулах железы, затем секретруется в поджелудочный сок. Дюбо и Томсон впервые получили этот фермент в очищенном виде [18].

Панкреатические РНК-азы могут быть однокомпонентными (рибо-

нуклеаза А) и двухкомпонентными (рибонуклеаза В), содержащими углеводный остаток с молекулярной массой – 1350 Да [19]. Обычные коммерческие препараты кристаллической РНК-азы, даже многократно перекристаллизованные, представляют собой смесь двух основных компонентов с очень близкой структурой и свойствами, хотя и различаются по своей специфичности, а именно соотношением фракций А и В, которое может варьировать от 1 : 0,1 до 1 : 0,2. Эти компоненты в том же соотношении обнаруживаются в экстрактах 8 %-ной трихлоруксусной кислотой бычьей поджелудочной железы сразу же после забоя животного. Фракции А и В можно разделить путем ионообменной хроматографии на амберлите IRC 50 (XEG 4) карбоксиметилцеллюлозе [20].

Четыре дисульфидные связи, скрепляющие витки полипептидной цепи, являются существенным фактором, обеспечивающим своеобразную упаковку макромолекулы, а также устойчивость всей структуры в целом и создание такого пространственного расположения определенных аминокислотных остатков, которое позволяет им функционировать в качестве активного центра. На это указывает факт полной инактивации фермента после разрушения всех дисульфидных связей тиогликолевой кислотой или меркаптоэтанолом [21] в 8М мочеvine при рН 8,6 и комнатной температуре. Спонтанное реокисление кислородом воздуха в 0,2 % растворе фермента при рН 8,2 в течение 24 ч возвращает ферменту 80–100 % его исходной активности при условии добавления большого избытка 2-меркаптоэтанола. Возможность спонтанного образования дисульфидных мостиков в участках полипептидной цепи, обеспечивающих активную конформацию молекулы РНК-азы, указывает на то, что именно дисульфидные мостики обеспечивают термодинамически наиболее устойчивую конформацию.

В настоящее время установлена первичная структура панкреатической рибонуклеазы КРС и других млекопитающих: оленя, марала, косули, жирафа, одногорбого верблюда, мыши, крысы, морской свинки, лани, шиншиллы, нутрии. Практически во всех случаях фермент состоит из 124 аминокислотных остатков, что иллюстрирует рис.23.1. [22].

Панкреатическая рибонуклеаза представляет собой белок относительно небольшой молекулярной массы (13700 Да).

Характерной особенностью этого фермента является то, что он устойчив в широком интервале значений рН и термостабилен в слабокислых растворах, в щелочи инактивируется очень легко. Максимум ферментативной активности наблюдается при рН 7,0–8,2 с оптимумом рН 7,7. Тепловая денатурация фермента начинается с 65 °С.

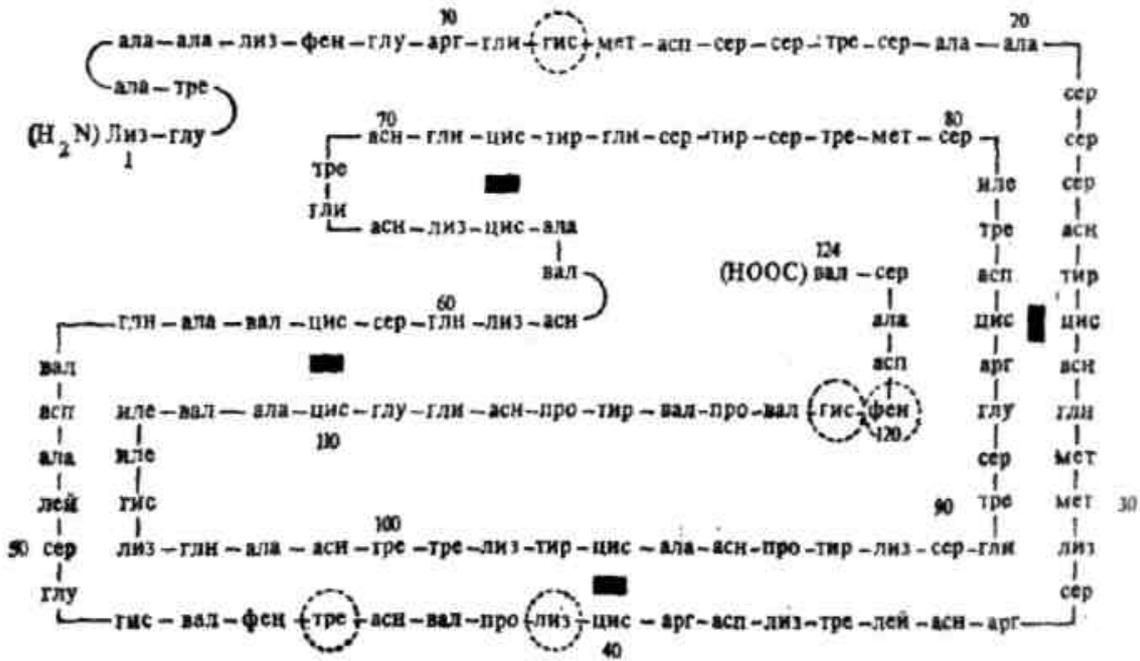


Рис. 23.1. Первичная структура панкреатической РНК-азы

Механизм взаимодействия панкреатической РНК-азы с РНК детально исследован [23]. Полипептидная цепь РНК-азы, замкнутая 4-мя дисульфидными мостиками принимает вследствие этого пространственную конфигурацию, в определенной мере предопределяющую третичную структуру этого фермента (рис.23.2).

Понять механизм действия панкреатической РНК-азы помогли данные о структуре ее активного центра (рис.23.3). В нем связываются участки молекулы РНК, содержащие в своем составе пиримидиновые (цитидиновые и уридиновые) нуклеотидные остатки, причем парные сочетания ЦА, ЦГ, ЦЦ, и ЦУ атакуются в соотношении 3000 : 50...240 : 27.

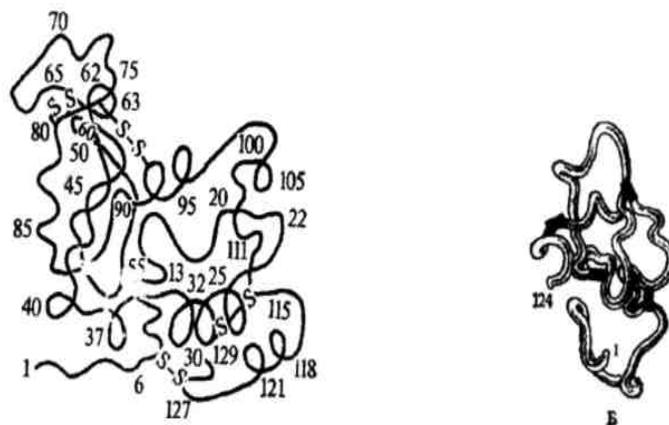


Рис. 23.2. Третичная структура панкреатической РНК-азы

В активном центре фермента остаток пиримидинового нуклеотида

РНК размещается таким образом, что пиримидиновое основание закрепляется в активном (субстратном) центре за счет водородных связей с радикалами треонина и серина, занимающими 45-е и 123-е положения в полипептидной цепи, и за счет гидрофобного взаимодействия с радикалами фенилаланина (120-е положение). Вследствие этого остаток фосфата, расположенный между 3'-углеродным атомом рибозы пиримидинового нуклеотида и 5'-углеродным атомом соседнего в цепи РНК нуклеотида, фиксируется между 12-м и 119-м остатками гистидина каталитического центра.

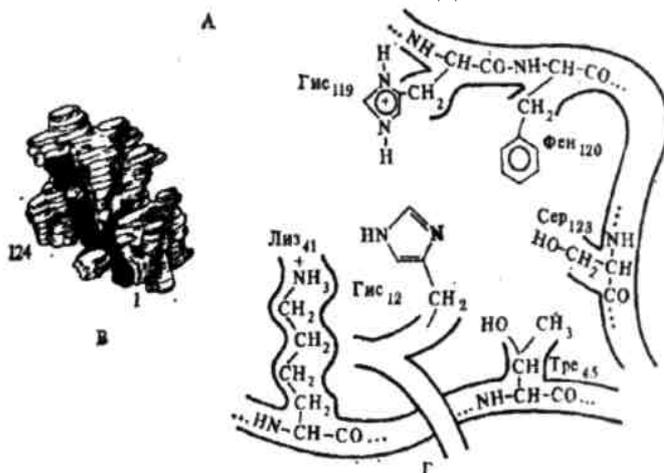


Рис. 23.3. Строение активного центра панкреатической РНК-азы

Фиксации межнуклеозидного фосфата в этом положении способствует также радикал лизина, занимающий в молекуле РНК-азы 41-ое положение, но расположенный в ее активном центре на расстоянии 0,5 нм от вышеупомянутых остатков гистидина. Вслед за этим наступает непосредственно каталитический процесс (рис.23.4), осуществляемый в результате согласованной передачи протонов и сводящийся к разрыву межнуклеотидной фосфатной связи, образованию 2',3'-циклофосфата рибозы пиримидинового нуклеотида и последующему гидролизу 2',3'-циклофосфатной связи с восстановлением исходной структуры активного центра [24].

Важно отметить, что именно остатки гистидина, находящиеся в 12-м и 119-м положениях в полипептидной цепи и сближенные в каталитическом центре фермента, обеспечивают перенос протонов. Эта функция имидазольных радикалов гистидина свойственна механизму действия многих ферментов, особенно гидролаз.

Следует отметить, что большая часть пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов расположена в молекулах нуклеиновых кислот не в виде отдельных остатков, чередующихся по типу пурин-пиримидин, а в виде фрагментов из 2-х, 3-х и более остатков по типу – пир-пур-пур-пир-пир-пир-пур-пур-пур. При этом около 80% полинуклеотидной цепи составлено из полипуриновых и полипиримидиновых участков, а примерно 1/4 часть ее – из участков, имеющих по 6 и более пуриновых и пиримидиновых нуклеотидных остатков подряд [25].

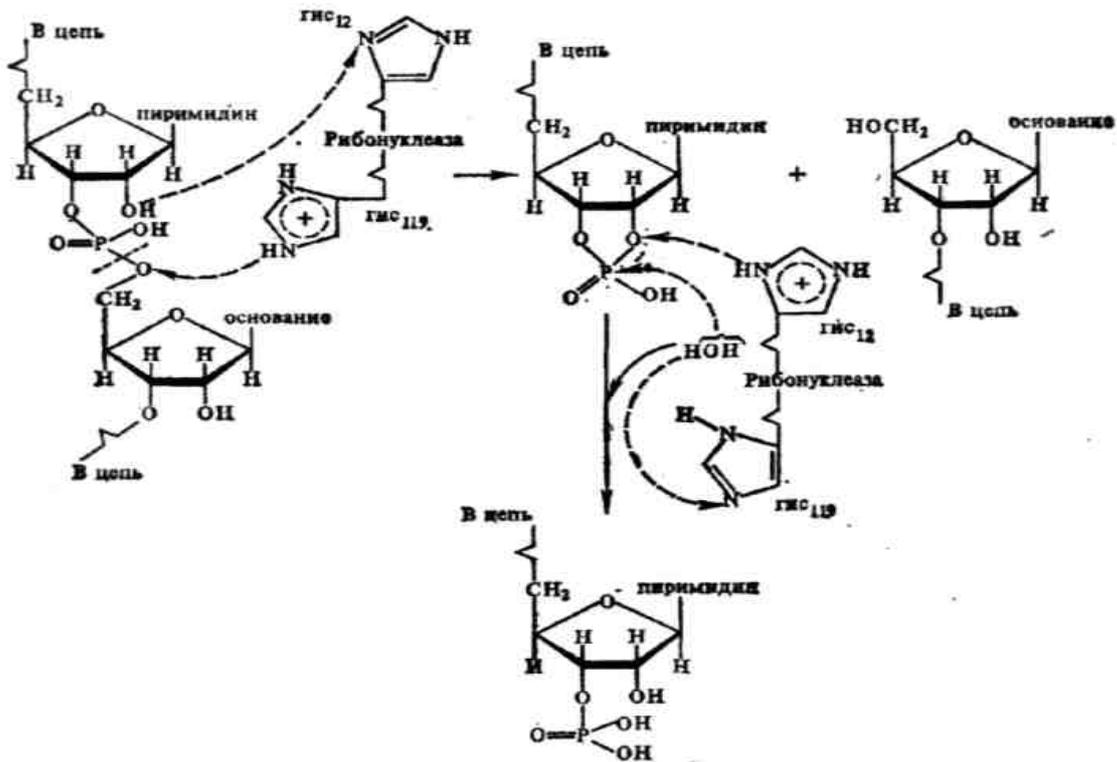


Рис. 23.4. Механизм действия панкреатической РНК-азы

Действие панкреатической РНК-азы можно проиллюстрировать следующим образом. В качестве примера возьмем полинуклеотид А-Ц-Ц-Ц-А-Г-Г-Г-У-У-У-А-Г-У-Цф. РНК-аза расщепит его таким образом, что образуется смесь А-Цф+А-Г-Г-Г-Уф+А-Г-Уф+4Цф+Уф, т.е. 6 пиримидиновых нуклеотидов, а также динуклеотид, тринуклеотид и пентануклеотид – все они оканчиваются пиримидиновым нуклеотидом, связанным с атомом предыдущего пуринового нуклеотида, и, если не считать конечного нуклеотида, содержат только пуриновые нуклеотидные остатки.

Список литературы

1. Баурина М.М. Разработка основ технологии получения панкреатического гидролизата дрожжевой РНК. Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. – М. – 2007.
2. Фукс Б.Б., Шабанова М.Е., Федоров С.Н., Краснопольский Ю.М. и др. Способ получения рибонуклеотидов. // А.с. СССР N1575359. Оpubл. 01.03.90.
3. Akin cavit, Chao Kweic. Ammonia extraction of unicellular organisms. // Патент США № 3775393. Оpubл. 15.03.80.
4. Fux B.V., Shabanova M.E. Method of preparing a mixture of ribonucleotides. // Патент США № 5064758. Оpubл. 12.11.1991.
5. Шабанова М.Е. Регенерация родопсина при наследственной дистрофии сетчатки. // Автореф. дисс... канд. биол. наук. – Москва. – 1980. – 22 с.
6. Шабанова М.Е., Гринио Л.П., Корбальников Н.И., Фукс Б.Б. Лекарственный препарат для лечения дегенеративных заболеваний нервно-мышечной системы. // Материалы симпозиума ИБХ РАН. – М.: Изд-во РУДН, 2005. – С.108.

7. Авцын А.П., Фукс Б.Б., Шабанова М.Е., Терещенко О.Д. Наследственные дистрофии сетчатки у человека и животных в связи с результатами их патогенетической терапии. // Вестник АМН СССР. – № 1. – 1977. – С. 34–39.
8. Васильева Е.Ф., Кушнер С.Г., Каледа В.Г., Шабанова М.Е. Система естественной цитотоксичности и иммуномодулирующее действие ЭНКАДа при шизофрении // Материалы 10-ой научно-практической конференции неврологов «Нейроиммунология». – С.-Петербург. – 2001. – С. 38 – 40.
9. Васильева Е.Ф., Кушнер С.Г., Коляскина Г.И., Секирина Т.П., Селезнева Н.Д., Шабанова М.Е. Количество и функциональная активность лимфоцитов натуральных киллеров у больных деменцией Альцгеймерного типа. // Тез. докл. 1-ой научно-практической конференции «Болезнь Альцгеймера: достижения в нейробиологии, диагностике и терапии». – М., 1996, 26-27 сентября. – С. 48.
10. Васильева Е.Ф., Владимиров Т.В., Каледа В.Г., Шабанова М.Е. Влияние иммуномодулятора ЭНКАД на функциональную активность лимфоцитов у больных шизофренией и шизоаффективным психозом. // Тез. докл. 1-ой научно-практической конференции «Болезнь Альцгеймера: достижения в нейробиологии, диагностике и терапии». – М., 1996, 26-27 сентября. – С. 27–28.
11. Борисова Э.А., Мармур Р.К., Плавинский В.П., Фукс Б.Б., Шабанова М.Е. Влияние фонофореза препарата ЭНКАД на цитохимию роговицы животных разного возраста. // Вестник офтальмологии. – 1985. – № 5. – С. 48.
12. Попова В.А., Езерская Н.Ф., Петрейнова М.Н., Шилова С.А. Получение смеси аминокислот из дрожжей. // в сб. Труды ВНИИ гидр. растительных материалов. – 1981. – № 31. – С. 97 – 104.
13. Ву Тхи Фьонг Ань Разработка основ технологии РНК из дрожжей. Автореф. дисс... канд. хим. наук. – М. – 1997.
14. Рубенис О.С., Бринкманис Р.А., Ирген А. М., Лиепеня В.А., Тенисон Р.А. Получение дрожжевой РНК. // Прикладная биохимия и микробиология. – 1976. – Т.12. – N 3. – С. 403 – 407.
15. Тимиров Ю.Г., Швец В.И., Краснопольский Ю.М. Способ получения рибонуклеотидов. // Патент UA 66706A. Оpubл.17.05.2004.
16. Фукс Б. Б., Шабанова М. Е., Федоров С. Н., Краснопольский М. Ю., Микстайс У. Я., Ермолаев Е.Г. и Гаймула М.А. Способ получения рибонуклеотидов. // А.с. СССР № 1575359. Оpubл. 14.06.1988.
17. Ashikari T., Nakamura N., Tahaka Y. et al. // Arg. Biol. Chem. – 1986. – V. 50. – 4. – P. 957–964.
18. Yould G.W., Bell G.I. // Trends Biochem Sci. – 1990. – V. 15. – P. 18–23.
19. Дикман М., Уэбб Э. Ферменты. Т. 1 – 3. – М.: Мир, 1982. – С. 1120.
20. Dubos R.J and Thomson R.S. The Decomposition of Yeast Nucleic Acid by a Heat-Resistant Enzyme // J. Biol. Chem. – 1938. – V. 124. – P.501.
21. Moore S., Stein W.H. Chemical structure of Pancretic ribonuclease. // Science. – 1973. – V. 180. – P. 458–464.
22. Cantor C.R., Shimmel P.R. // Biophysical Chemistry. – 1980. – P.100.
23. Шапот В.С. и др. Методы выделения и определения активности нуклеаз. /Современные методы в биохимии. – М. Мир, 1964. – 450 с.
24. Хомов В.В., Сизов А.А. Масычева В.И., Загребальный С.Н. Способ получения рибонуклеазы панкреатической. // А.с. РФ № 0291195. Оpubл. 20.09.97.
25. Scheit K.H., Reddy E.S.P., Pondit M.W. Seminalplasmari bonuclease, ihre Gewinnung und Verwendung // Offen DE P2911867. 16.10.80.

Глава 24

Получение панкреатического гидролизата дрожжевой РНК

Ценность биомассы дрожжей, помимо высокого содержания белка, состоит также в относительно высоком (6 – 11 %) содержании РНК. На кафедре биотехнологии была разработана технология ее выделения из биомассы дрожжей р. *Candida* и р. *Saccharomyces*. Однако практическую ценность представляет не сама дрожжевая РНК, а продукты ее переработки – нуклеотиды, нуклеозиды, азотистые основания. В данной работе рассматриваются вопросы интенсификации технологии получения панкреатического гидролизата РНК, находящего широкое применение в медицине (см. главу 23).

Исследование количественных закономерностей гидролиза дрожжевой РНК панкреатической рибонуклеазой. Наиболее важной стадией технологического процесса получения панкреатического гидролизата дрожжевой РНК является стадия ее ферментативного гидролиза. Поэтому представляется целесообразным изучить количественные закономерности этой стадии.

На первом этапе исследований в качестве субстрата использовали модельный субстрат – дрожжевую РНК из биомассы хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* производства фирмы ICN, содержащей не менее 74 % основного вещества. В ходе исследований были изучены зависимости выхода олигонуклеотидов во времени от температуры (35 – 85 °С), рН среды (3,5– 7,5), соотношения масс фермента и субстрата (1 : 100 – 1 : 600, что соответствует интервалу изменения активности 48 – 288 тыс. ед./л) и концентрации дрожжевой РНК (10 – 100 г/л).

На рис. 24.1 приведены типичные зависимости выхода олигонуклеотидов при ферментативном гидролизе дрожжевой РНК от времени при температуре 65 °С, рН 5,5 — условиях, известных из литературы, которые обеспечивают получение препарата панкреатического гидролизата РНК в соответствии с требованиями ВФС. Из представленных зависимостей следует, что ведение гидролиза в течение 2 ч позволяет достичь выхода олигонуклеотидов 66 %, а при более длительном гидролизе выход олигонуклеотидов практически не изменяется.

Как показали предварительные опыты, увеличение выхода олигонуклеотидов возможно, если в среду внести дополнительное количество фермента. Результатом его повторной загрузки через два часа гидролиза явилось увеличение выхода олигонуклеотидов до 93 % в течение 2-х последующих часов гидролиза.

Полученные данные свидетельствуют о наличии ингибирования фермента. По аналогии с вышеописанными процессами ферментативного гидролиза исследовали возможные пути ингибирования пан-

креатической РНК-азы. Для этого были поставлены две серии экспериментов:

- по влиянию на скорость гидролиза различных концентраций олигонуклеотидов (продуктов гидролиза);

- по влиянию времени предварительной инактивации ФП при температуре 90 °С на скорость гидролиза.

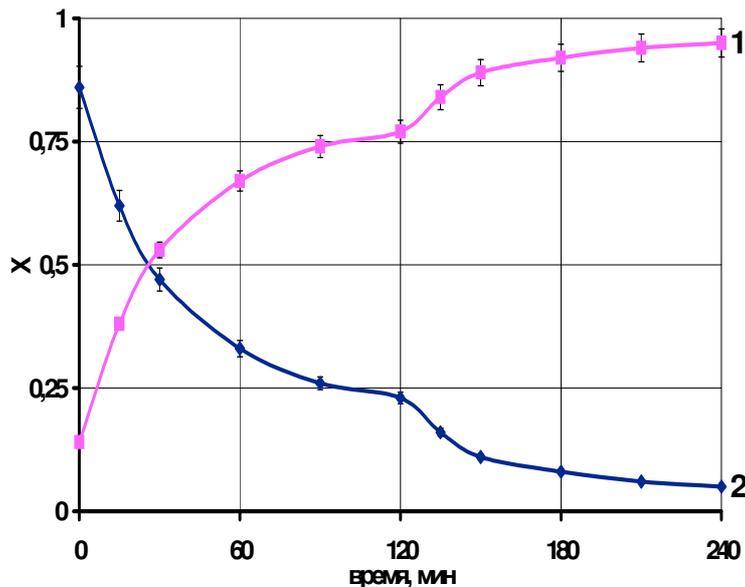


Рис. 24.1. Кинетические кривые расходования полинуклеотидов (НК) (1) и накопления олигонуклеотидов (2) при гидролизе дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой. Условия: температура – 65 °С, рН 5,5; начальная концентрация полинуклеотидов – 100 г/л, активность ферментного препарата – 240 тыс. ед./л (0,2 % от массы субстрата). Момент времени внесения ФП – 2 ч

Соответствующие зависимости представлены на рис. 24.2 и 24.3. Из приведенных данных видно, что на исследуемый процесс оказывают влияние оба вышеуказанных фактора.

Таким образом, в данном случае имеет место, как ингибирование фермента продуктами гидролиза, так и его инактивация под действием высоких температур. Причем, как следует из экспериментальных данных, первый фактор оказывает существенно большее влияние на ферментативный процесс. Незначительное влияние фактора термоинактивации фермента связано, вероятнее всего, с относительно высокой по сравнению с другими ферментами термостабильностью панкреатической РНК-азы.

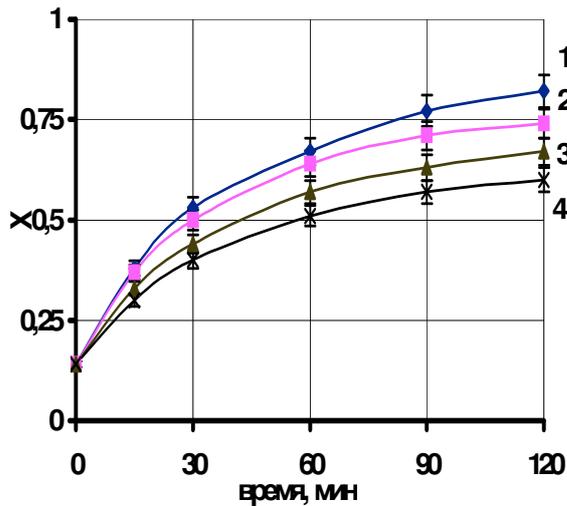


Рис. 24.2. Влияние времени инактивации панкреатической РНК-азы при температуре 90 °С на выход продуктов гидролиза дрожжевой РНК. Условия: температура – 65 °С, рН 5,5; начальная концентрация РНК – 100 г/л, активность внесенного ФП 240 тыс. ед./л (0,2% от массы субстрата). Обозначения кинетических кривых, отвечающих различному времени инактивации ФП: 1 – 0 мин, 2 – 5 мин, 3 – 15 мин, 4 – 25 мин

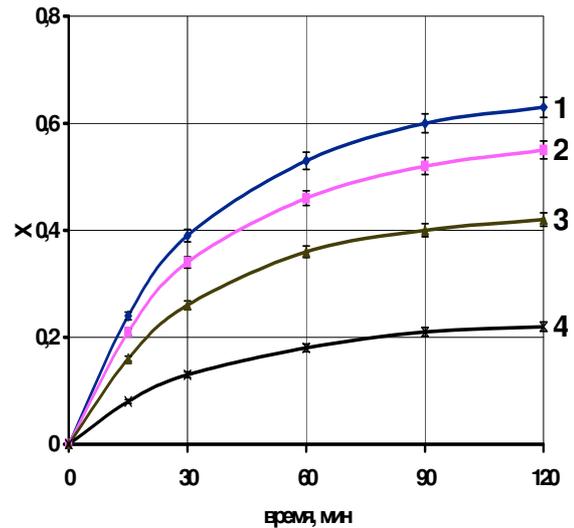


Рис.24.3. Влияние начальной концентрации олигонуклеотидов на выход продуктов гидролиза НК панкреатической РНК-азой. Условия: температура – 65 °С, рН 5,5; начальная концентрация НК – 100 г/л, активность внесенного ФП 240 тыс. ед./л (0,2% от массы субстрата). Обозначения кинетических кривых, отвечающих различным начальным концентрациям олигонуклеотидов: 1 – 13,8 г/л, 2 – 27,6 г/л, 3 – 55,2 г/л, 4 – 172 г/л

Таким образом, кинетическую схему гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой можно представить в виде:



где: $K_{ин}$ – константа ингибирования фермента продуктами гидролиза, $[EP]$ – концентрация неактивного комплекса фермента с продуктами гидролиза. Остальные обозначения соответствуют аналогичным обозначениям в схемах (24.1) и (24.2).

Сохраняя принятый выше порядок исследования ферментативного процесса, мы последовательно проводили дифференциальную обработку кинетических кривых по начальным скоростям для оценки значений эффективных констант k_1 и K_1 , а затем интегральную по экспериментальным данным с изменяющимися начальными концентрациями фермента и субстрата. Было установлено, что схема (24.1) адекватно описывает процесс ферментативного гидролиза.

Исследование влияния температуры и рН среды на скорость процесса показало, что их оптимальные значения находятся соответственно в интервалах 62 – 65 °С, 5,2 – 5,6. Рассчитанные значения параметров данной кинетической схемы представлены в табл. 24.1.

Таблица 24.1

Значения эффективных констант и энергий активации отдельных стадий процесса ферментативного гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой

Путь	E, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , с ⁻¹	$K_1=0,85 \pm 0,08$ л/моль; $K_n=0,40 \pm 0,03$ л/моль
k_1	$40,6 \pm 2,8$	$(8,20 \pm 1,07) \cdot 10^{-5}$	$0,51 \pm 0,06$	
$k_{ин}$	$46,2 \pm 3,2$	$(3,07 \pm 0,40) \cdot 10^{-5}$	$(5,7 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	

Принятая схема превращений в совокупности со значениями констант и энергий активации была использована для подбора условий гидролиза дрожжевой РНК, обеспечивающих выход продуктов гидролиза не ниже 90–95 %. Было установлено расчетами, что для достижения заданной степени гидролиза необходимо проводить процесс при температуре 65 °С, рН 5,5 с 2-х кратной загрузкой ФП до достижения активности 240 тыс. ед./л при загрузке через каждые 2 ч гидролиза (рис. 24.4).

Время повторного внесения фермента в среду гидролиза – 2 ч также было установлено с использованием рассчитанных параметров кинетической схемы. Результаты расчетов показали, что через 2 ч гидролиза 97 % фермента находится в неактивном состоянии (73 % ингибировано продуктами гидролиза и 24 % инактивировано), поэтому дальнейшее ведение гидролиза без дополнительной загрузки фермента нецелесообразно.

При реализации процесса гидролиза дрожжевой РНК в промышленных условиях с целью снижения затрат на сырье целесообразно не закупать готовую субстанцию дрожжевой РНК, а получать ее непосредственно на данном предприятии из биомассы хлебопекарных дрожжей, которые являются отходами, например, пивоваренных и спиртовых заводов.

Поэтому на заключительном этапе этой части исследований установленные на модельном субстрате закономерности были проверены на дрожжевой РНК, получаемой в соответствии с ранее разработанными основами технологии.

Дрожжевую РНК в этом случае получали в соответствии с нижеследующей принципиальной схемой:

- 1) Экстракция нуклеопротеидов растворами щелочей (гидроксидом аммония или натрия) из 8–12 %-ной суспензии хлебопекарных дрожжей при температуре 80–90 °С и рН 8,5–9,0; время экстракции – 1 ч.
- 2) Разбавление суспензии дрожжевых клеток водой до содержания СВ 5 – 6 % и получение бесклеточного экстракта сепарацией.
- 3) Концентрирование нуклеопротеидов ультрафильтрацией на полуволо-

конном мембранном аппарате ВПУ-15ПА. Степень концентрирования составляет 6–7 раз.

- 4) Осаждение нуклеопротеидов в изоэлектрической точке (ИЭТ) при рН 2,0 при температуре 4–6°C.
- 5) Растворение нуклеопротеидов в среде моноаммонийфосфата с концентрацией 2,0 – 2,2 моль/л при температуре 55–60 °С в течение 1 ч.
- 6) Концентрирование и очистка полинуклеотидов от солей ультрафильтрацией.
- 7) Осаждение полинуклеотидов из обессоленного раствора в ИЭТ (рН 2,0–2,2).

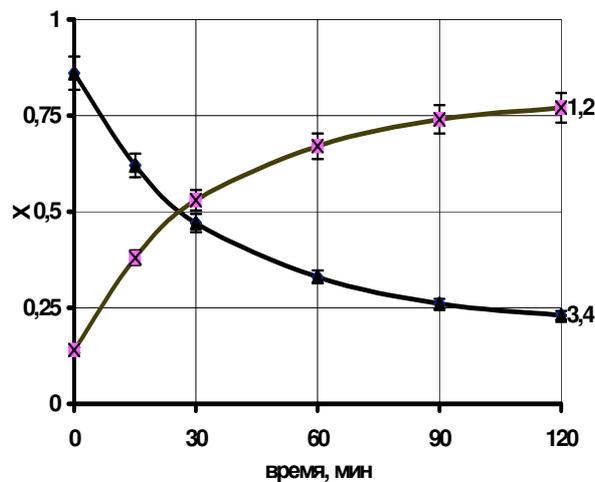


Рис. 24.4. Кривые расходования НК и накопления олигонуклеотидов при гидролизе панкреатической РНК-азой РНК фирмы ICN (1,3) и РНК, полученной по технологии [415] (2,4). Условия: температура – 65 °С, рН 5,5; начальная концентрация НК – 100 г/л, активность внесенного ФП 2400 тыс. ед./мл (0,2 % от массы субстрата)

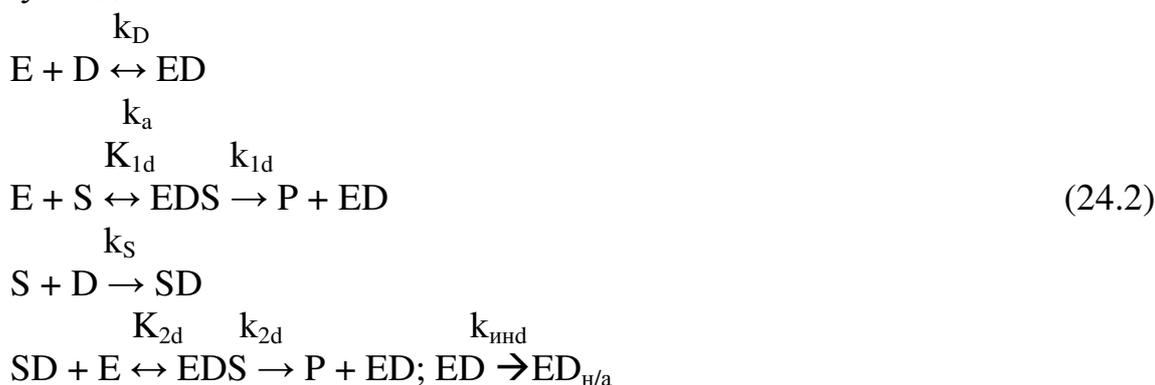
В результате был получен осадок дрожжевой РНК, содержащий 30 % СВ и 74 % нуклеиновых кислот в расчете на СВ. Такой полупродукт в свежеприготовленном виде использовали в качестве субстрата при проведении ферментативного гидролиза.

На рис. 24.4 для сравнения представлена кривая гидролиза дрожжевой РНК, полученной по вышеуказанной технологии. Из него следует, что в пределах доверительного интервала кривые гидролиза обоих субстратов совпадают между собой. Это свидетельствует о том, что все ранее найденные кинетические закономерности в полной мере справедливы и для дрожжевой РНК, полученной по разработанной ранее технологии. Дальнейшие исследования процесса получения панкреатического гидролизата РНК показали, что если увеличить время гидролиза РНК до 3-х и более часов, то получить гидролизат, удовлетворяющий требованиям ВФС, не уда-

ется. Это связано, вероятнее всего, с накоплением в гидролизате спирторастворимой фракции олигонуклеотидов, что, к тому же, снижает выход готового продукта на стадии осаждения из водно-спиртового раствора. Однако при гидролизе РНК в течение 2 ч максимально достигаемая степень гидролиза не превышает 66 %. Таким образом, потери целевого продукта только на стадии гидролиза составляют 33 %, что требует поиска путей повышения эффективности данного процесса. В качестве интенсифицирующего фактора были выбраны C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ.

Схема экспериментальных исследований была аналогичной системе БСА – трипсин. Диапазоны изменения параметров были следующими: температура – 35...85 °С; рН среды – 3,5...7,5; время прединкубации фермента с АОБ – 0 ... 20 мин; время прединкубации субстрата с АОБ – 0...20 мин; начальная концентрация АОБ 0 – $1,0 \cdot 10^{-5}$... $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л (мольное соотношение фермент : АОБ 0,67:1 – 33:1);

Соответствующие экспериментальные данные представлены на рис. 24.5 – 24.9. Из них следует, что в данном случае полученные зависимости имеют вид, аналогичный представленным в главе 3.1, что позволяет использовать для их обработки схему превращений (24.4) и (24.5) с той лишь разницей, что ферментативный гидролиз в данном случае происходит в одну стадию:



Все обозначения в данной схеме аналогичны вышеприведенным для схемы (24.1).

Интегральная обработка всех серий кинетических кривых не позволила достичь адекватного описания экспериментальных данных, поскольку расчетные значения концентраций продуктов гидролиза существенно превышали экспериментальные. Наблюдаемый факт может быть связан с тем, что ферментативный процесс осложнен в данном случае, помимо инактивации фермента, его обратимым ингибированием продуктами гидролиза. Было сделано предположение, что интермедиат ED, как и свободный фермент, может подвергаться обратимому ингибированию продуктами гидролиза. Это можно учесть, дополнив схему (24.2) уравнением:



где: EDP – неактивный интермедиат, а $K_{ид}$ – константа равновесия его образования.

Обработка экспериментальных данных по уравнениям (24.2) и (24.3) позволила достичь адекватного описания всех серий кинетических кривых, что подтверждает справедливость ее использования для описания системы дрожжевая РНК – панкреатическая рибонуклеаза – АОБ. Соответствующие значения эффективных констант и энергий активации для всех стадий исследуемого процесса приведены в табл. 24.2.

Таблица 24.2

Значения эффективных констант и энергий активации процесса гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой в присутствии C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ

Путь	E, кДж/моль	K_a , л/моль	k^* , c^{-1}
Фактор C_7 -АОБ/ C_{12} -АОБ			
k_d	30±2/10±1	$(1,58±0,21)·10^7/(6,83±0,89)·10^{-5}$	450±50/751,1±82,6
k_a	22±2/20±2	$(7,90±1,03)·10^{-5}/(1,77±0,23)·10^{-4}$	$(6,67±0,67)·10^{-4}/(6,5±0,7)·10^{-5}$
k_s	20±1/13±1	$(1,58±0,21)·10^{-4}/(4,42±0,57)·10^{-4}$	100±11/50,1±5,5
k_{1d}	25±2/23±2	$(4,51±0,59)·10^{-5}/(2,74±0,36)·10^{-4}$	0,67±0,07/0,64±0,07
k_{2d}	35±3/45±5	$(8,20±1,07)·10^{-5}/(3,07±0,40)·10^{-5}$	$(0,43±0,05)/(8,0±1,0)·10^{-4}$
$k_{инд}$	46±4/42±4	$(3,07±0,40)·10^{-5}/(2,75±0,32)·10^{-4}$	$(8,3±1,0)·10^{-4}/0,25±0,03$
$K_{1d} = 0,50 ± 0,04$ л/моль/ $0,36 ± 0,03$ л/моль, $K_{2d} = 0,42 ± 0,03$ л/моль/ $0,29 ± 0,02$ л/моль, $K_{инд} = 0,47 ± 0,04$ л/моль/ $0,47 ± 0,05$ л/моль			

Анализируя зависимости, представленные на рис. 24.5 – 24.9, можно сделать выводы о влиянии АОБ на скорость гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой, которое сводится к следующему:

1) применение факторов C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ позволяет повысить скорость гидролиза в 1,25 раза при начальной концентрации соответственно $1,0·10^{-4}$ моль/л и $5,0·10^{-4}$ моль/л. Более высокие концентрации C_7 -АОБ значительно снижают скорость гидролиза;

2) прединкубация обоих АОБ с ферментом в течение 10 мин повышает скорость гидролиза для фактора C_7 -АОБ в 2,0 раза, а для фактора C_{12} -АОБ в 1,2 раза. Причем, при меньшем времени прединкубации в случае фактора C_7 -АОБ скорость гидролиза снижается по сравнению с контролем в 1,3 раза, а в случае C_{12} -АОБ – в 1,1 раза;

3) прединкубация АОБ с субстратом в течение 20 мин приводит в обоих случаях к увеличению начальной скорости гидролиза в 1,23 раза;

4) введение фактора C_{12} -АОБ приводит к снижению скорости гидролиза при температуре 65 °С в 1,19 раза при незначительном расширении температурного оптимума в область более высоких и более низких температур;

5) введение АОБ не приводит к смещению температурного оптимума действия фермента, однако, применение C_7 -АОБ увеличивает скорость ферментативного гидролиза при оптимальной температуре в 1,13 раза. При более высоких температурах наблюдается расширение температурного оптимума и более значительное увеличение скорости гидролиза (в 1,76 раза) при температуре 85 °С.

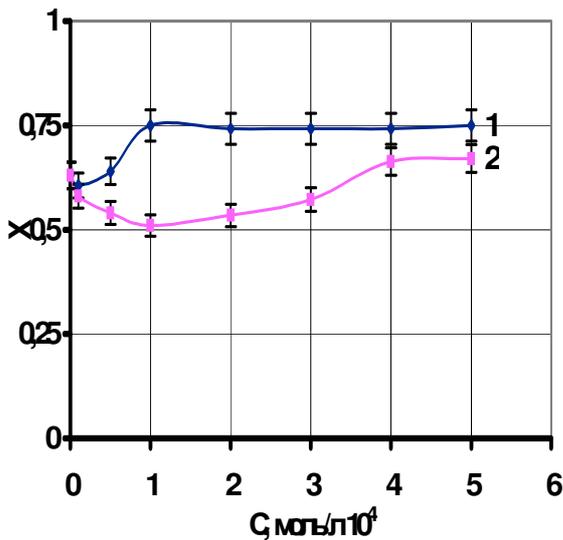


Рис. 24.5. Влияние концентрации химических аналогов C_7 -АОБ (1) и C_{12} -АОБ (2) на выход продуктов гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой. Условия: температура – 65°C; pH 5,5; начальная концентрация РНК – 100 г/л, начальная активность ФП – 240 тыс. ед./л

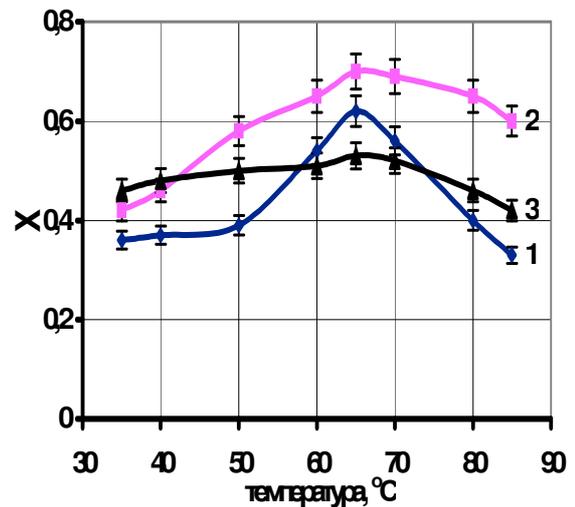


Рис. 24.6. Влияние температуры на выход продуктов гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой в отсутствии (1) и в присутствии химических аналогов C_7 -АОБ (2) и C_{12} -АОБ (3). Условия: pH – 5,5; начальная концентрация субстрата – 100 г/л, активность ФП – 240 тыс. ед./л, начальная концентрация фактора C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, C_{12} -АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л

На основе разработанной кинетической схемы гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой в присутствии АОБ были проведены расчеты кинетических кривых гидролиза в оптимальных условиях: температура 65 °С, pH 5,5; начальная концентрация субстрата – 100 г/л, начальная активности ФП 240 тыс. ед./л, концентрация C_7 -АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, предынкубации фермента с C_7 -АОБ – 5 мин. В этих условиях степень гидролиза РНК составляет 93 %.

Результаты экспериментов по гидролизу РНК представлены на рис. 3.2.1.10, из которого следует, что применение C_7 -АОБ позволяет снизить

норму расхода ферментного препарата с 0,4 до 0,2 % от массы субстрата (т.е. в 2 раза) и сократить время гидролиза вдвое.

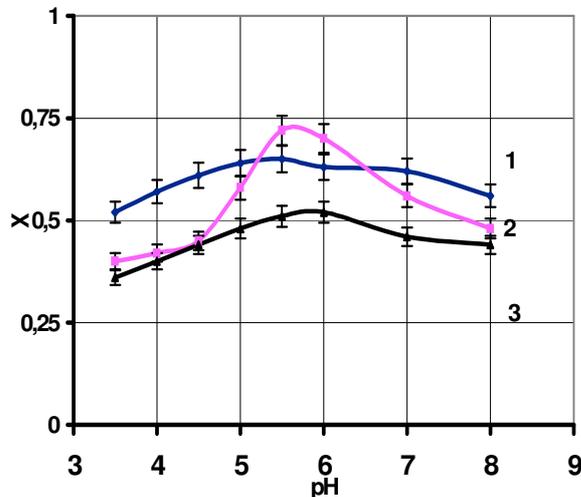


Рис. 24.7. Влияние pH среды на выход продуктов гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой в отсутствие (1) и в присутствии С₇-АОБ (2) и С₁₂-АОБ (3). Условия: pH – 5,5; начальная концентрация субстрата – 100 г/л, активность ФП – 240 тыс. ед./л, начальная концентрация С₇-АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, С₁₂-АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

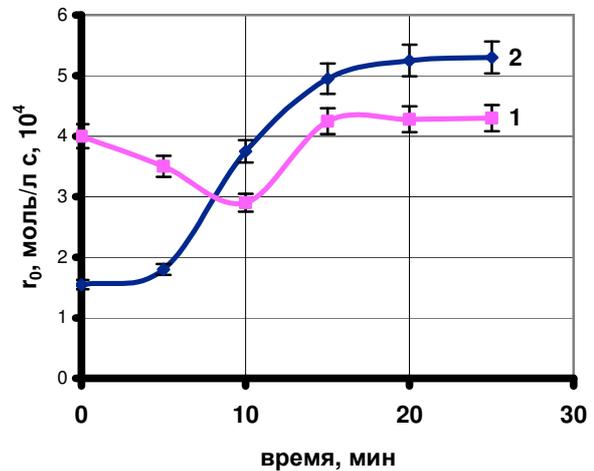


Рис. 24.8. Зависимость начальной скорости гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой от времени прединкубации АОБ с ФП. Условия: температура – 65°C, pH 5,5; начальная концентрация субстрата – 100 г/л, начальная активность ФП – 240 тыс. ед./л, начальная концентрация С₇-АОБ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, С₁₂-АОБ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1 – С₇-АОБ, 2 – С₁₂-АОБ.

Однако подобранный режим гидролиза является оптимальным только с точки зрения максимального выхода олигонуклеотидов.

Для практических целей необходимо проводить его оптимизацию с целью получения панкреатического гидролизата, качество которого нормируется в соответствии с требованиями ВФС 42-1678 по целому ряду показателей.

Известно, что препарат панкреатического гидролизата должен удовлетворять определенным показателям качества. Во-первых, соотношения поглощений при длинах волн $A_{260/230}$, A_{260}/A_{280} должны составлять соответственно 1,5–1,74 и 2,5–4,5.

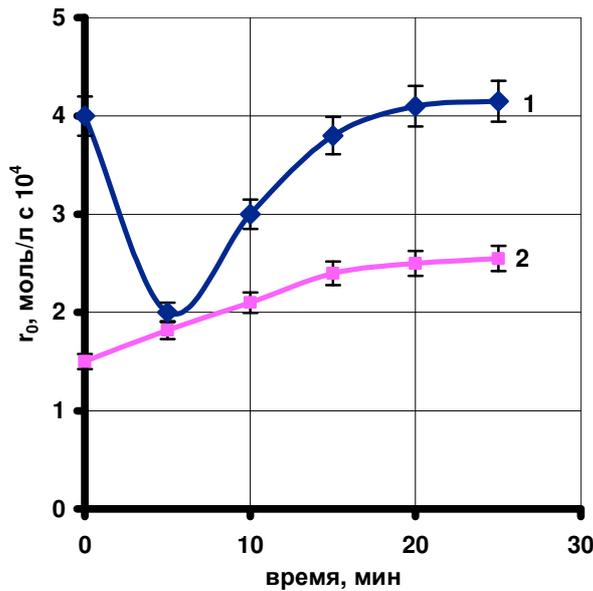


Рис. 24.9. Зависимость начальной скорости гидролиза дрожжевой РНК панкреатической РНК-азой от времени предынкубации АОБ с субстратом. Условия: температура – 65 °С, рН 5,5; начальная концентрация субстрата – 100 г/л, начальная активность ФП – 240 тыс. ед./л, начальная концентрация фактора d₁-C₇ – $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, начальная концентрация фактора d₁-C₁₂ – $5,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Обозначения: 1 – C₇-АОБ, 2 – фактор C₁₂-АОБ.

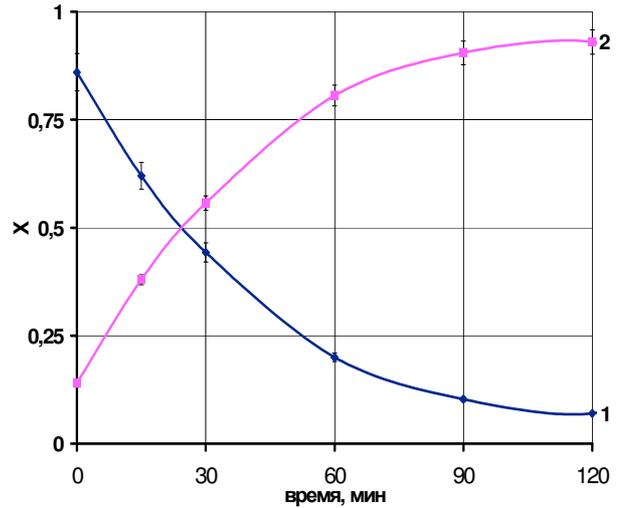


Рис. 24.10. Кривые расходования НК (1) и накопления олигонуклеотидов (2) при гидролизе панкреатической РНК-азой дрожжевой РНК. Условия: температура – 65 °С, рН 5,5; начальная концентрация НК – 100 г/л, активность внесенного ФП – 240 тыс. ед./л (0,2 % от массы субстрата)

Эти показатели определяют степень чистоты препарата с точки зрения содержания низкомолекулярных продуктов гидролиза (производных аденина и урацила). Во-вторых, значение поглощения при длине волны 400 нм не должно превышать 0,5, а при длине волны 520 нм – 0,1 при концентрации нуклеиновых компонентов 35 г/л. Эти показатели характеризуют наличие примесей, которые могут оказать токсическое действие.

Поэтому было важным изучение влияния условий гидролиза на соотношения поглощений при длинах волн $A_{260/230}$, A_{260}/A_{280} .

Из данных, представленных в таблице 24.3, видно, что доля низкомолекулярных компонентов (НМК) в препарате составляет 16 % масс., из них 93,2 % представлено компонентами НК, полученными в результате гидролиза урацил-, гуанинсодержащих, а 6,8 % – цитозин- и аденинсодержащих фрагментов НК, т.е. их соотношение составляет 13,7:1,0.

Таблица 24.3

Состав НМК препарата ЭНКАД, выполненный методом ВЭЖХ

Название соединения	% масс. в смеси НМК	% масс. в препарате панкреатического гидролизата
Цитидин	0,57	0,091
СМР	5,80	0,926
Уридин	47,80	6,629
Аденин	0,07	0,011
УМР	16,85	2,689
ГМР	27,74	4,426
Аденозин	0,63	0,100
АМР	0,43	0,069
Цитозин	0,11	0,017
Итого	100	15,96

Для изучения влияния НМК на качество препарата был приготовлен модельный раствор НМК в том же соотношении, в котором они находятся в препарате панкреатического гидролизата.

Такой раствор добавляли к препарату панкреатического гидролизата и в полученных растворах измеряли вышеуказанные соотношения длин волн. В результате было установлено, что для удовлетворения требований ВФС 42-1678 по соотношениям длин волн A_{260}/A_{230} и A_{260}/A_{280} содержание НМК в препарате не должно превышать 20% (рис. 24.11). Таким образом, процентное содержание НМК в гидролизате можно использовать в качестве критерия оценки качества панкреатического гидролизата.

Как показали исследования, отклонения от допустимых значений показателей соотношения длин волн связаны с условиями проведения гидролиза, а именно, температурой, рН среды и временем процесса. Было установлено, что во всех случаях именно с прекращением расходования ВМФ в гидролизате происходит накопление НМК свыше оптимальных 20% (рис. 24.12). Таким образом, критерием окончания процесса гидролиза является выход на стационар кривой расходования ВМФ. Анализ влияния температуры и рН среды на процесс гидролиза показал, что для получения гидролизата требуемого качества необходимо вести гидролиз при температуре 64 ± 2 и рН $5,3 \pm 0,2$ (рис. 24.13 и 24.14).

Другими показателями качества гидролизата являются значения поглощений при длинах волн 520 нм и 400 нм (D_{520} и D_{400}), которые определяют содержание окрашенных соединений в препарате.

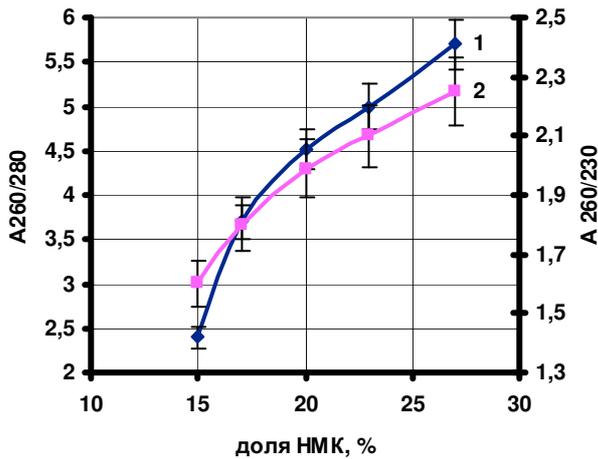


Рис. 24.11. Влияние доли НМК в препарате панкреатического гидролизата на соотношение оптических плотностей. Обозначения: 1 – $A_{260/280}$, 2 – $A_{260/230}$

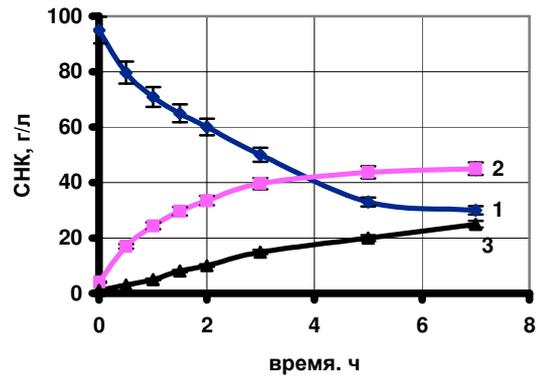


Рис. 24.12. Изменение концентрации ВМФ (1), НМФ (2) и НМК (3) в ходе гидролиза дрожжевой РНК. Условия: концентрация субстрата – 100 г/л, температура – 65 °С, рН 5,5; концентрация фермента – 2400 тыс. ед/мл

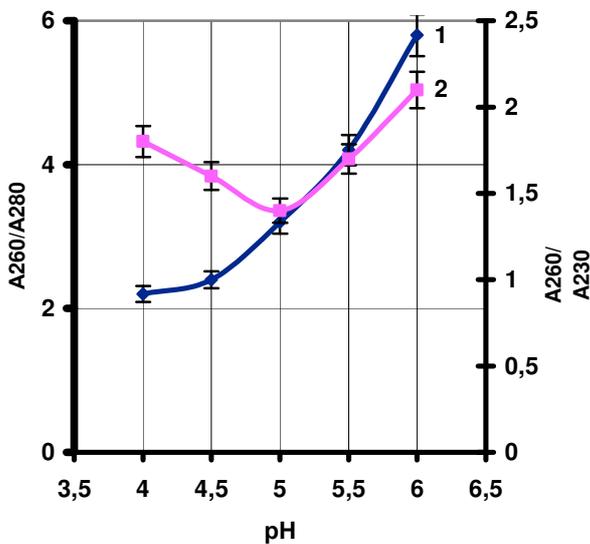


Рис. 24.13. Влияние рН среды на показатели соотношений длин волн. Условия: концентрация субстрата – 100 г/л, температура – 65 °С, рН 5,5; концентрация фермента – 2,0 тыс. ед/мл, время гидролиза – 2 ч. Обозначения: 1 – A_{260}/A_{230} , 2 – A_{260}/A_{280}

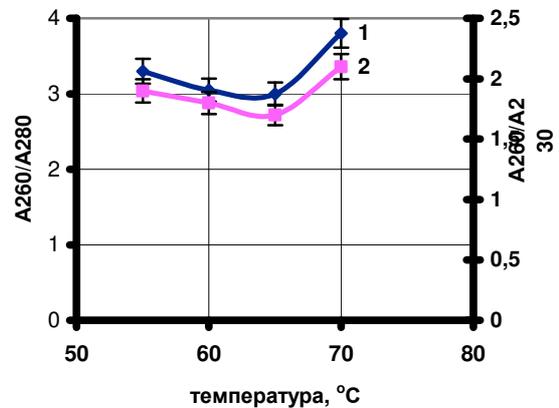


Рис. 24.14. Влияние рН среды на показатели соотношений длин волн. Условия: концентрация субстрата – 100 г/л, температура – 65 °С, рН 5,5; концентрация фермента – 2,0 тыс. ед/мл, время гидролиза – 2 ч. Обозначения: 1 – A_{260}/A_{230} , 2 – A_{260}/A_{280}

Поэтому на следующем этапе исследований была изучена кинетика накопления окрашенных соединений в ходе процесса гидролиза РНК. В результате обработки экспериментальных данных было установлено, что кинетика их накопления подчиняется уравнению первого порядка. Найденные значения эффективных констант скорости накопления окрашенных соединений для оптимальных условий гидролиза РНК составили:

$$k_{\text{эфф.}}^{520} = (11,0 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}, k_{\text{эфф.}}^{400} = (7,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-1} \text{ с}^{-1}.$$

На основе полученных данных было установлено, что показатели цветности раствора олигонуклеотидов после 2-х часового гидролиза не превышают $D_{400} = 1,45$ и $D_{520} = 0,35$ при проведении процесса в ранее установленные оптимальные условия.

Данные показатели превышают требуемые для фармакопейного препарата в 3 – 4 раза. Поэтому при разработке стадий выделения и очистки конечного продукта необходимо добиться их снижения.

Разработка стадий выделения и очистки панкреатического гидролизата дрожжевой РНК. Следующей после подбора оптимальных условий процесса гидролиза РНК задачей являлась оптимизация процесса выделения компонентов гидролизата из растворов и их очистки. На первом этапе негидролизованную РНК отделяли путем осаждения 25 % (об.) этилового спирта с последующим фильтрованием осадка. При этом относительное содержание олигонуклеотидов в гидролизате увеличилось с 53 до 62 %. Для более глубокой очистки гидролизата от высокомолекулярных примесей оценили возможности применения метода ультрафильтрации с использованием полуволоконной мембраны УАМ-100, удерживающей вещества с молекулярными массами свыше 5-7 кДа. Для данной мембраны были определены ее основные характеристики: удельная производительность и дифференциальная селективность по НК. Соответствующие зависимости представлены на рис. 24.1 и 24.2.

Наличие линейных участков на кривых $G=f(\ln C_{\text{НК, пер}})$ позволило провести обработку экспериментальных данных по уравнению для мембраны с идеальной селективностью:

$$G = \beta_S \ln(C_{z, \text{НК}}/C_{\text{НК, пер}}) \quad (24.1)$$

и найти величину концентраций гелеобразования ($C_{\text{г, НК}}$) ВМФ НК и соответствующий им коэффициент массоотдачи (β_S). Их значения составили соответственно $(166 \pm 0,19)$ г/л и $(6,3 \pm 0,2)$ л/(м² · атм · ч). Поскольку концентрация гелеобразования $C_{\text{г}}$ достаточно близка к концентрации НК в исходных экстрактах, степень концентрирования последних не может превышать 3-х раз.

Значение дифференциальной селективности составило 30 %. В этом случае потери олигонуклеотидов с ретантом составляют 35 %.

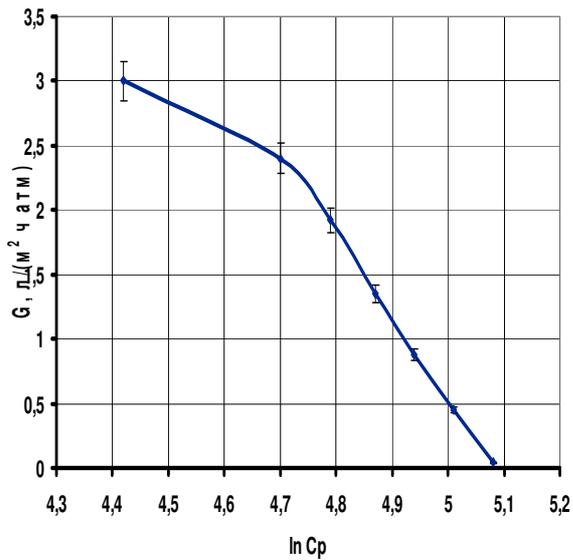


Рис. 24.1. Зависимость удельной производительности ультрафильтрационной мембраны УАМ-100 от логарифма концентрации ВМФ РНК в ретанте

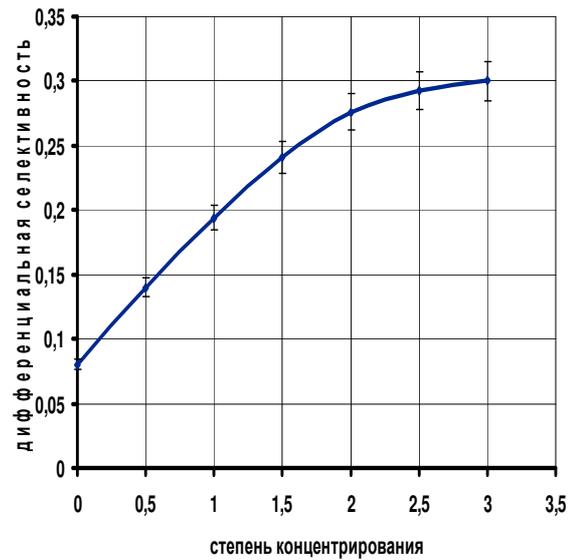


Рис. 24.2. Зависимость дифференциальной селективности ультрафильтрационной мембраны УАМ-100 от степени концентрирования гидролизата дрожжевой РНК

Однако результаты эксперимента показали, что при проведении ультрафильтрации панкреатического гидролизата РНК содержание спирторастворимой фракции олигонуклеотидов возрастает в 1,3 раза по сравнению с ожидаемым по материальному балансу, что приводит к снижению выхода конечного продукта. Причиной наблюдаемого явления может быть наличие посторонней ферментативной активности, т.к. процесс происходит в нестерильных условиях. Т.е. полностью управлять процессом ультрафильтрации из-за наличия посторонней ферментативной активности невозможно. Проведение же процесса в стерильных условиях требует высоких энергозатрат на стерилизацию и сложную обработку оборудования с целью удаления посторонней ферментативной активности.

Поэтому представлялось целесообразным разработать способ снижения содержания спирторастворимой фракции в пермеате. Был изучен процесс ультрафильтрации панкреатического гидролизата при добавлении к раствору L-миндальной (α -гидроксифенилуксусной) кислоты, ингибитора нуклеаз микроорганизмов, широко известного и применяемого в промышленности при производстве РНК. Преимуществом миндальной кислоты является то, что она не ухудшает качества готового продукта, т.к. является лекарственным препаратом. Результаты экспериментов по использованию

в процессе ультрафильтрации миндальной кислоты в количестве 0,05 – 0,30 мг/л гидролизата представлены в табл. 24.1 и 24.2.

Таблица 24.1

Влияние концентрации миндальной кислоты в процессе ультрафильтрации на выход панкреатического гидролизата дрожжевой РНК

Концентрация миндальной кислоты в гидролизате, мг/л	Концентрация спирторастворимой фракции в пермеате, г/л	Выход готового продукта, %
0,00	27,5 ± 0,6	51,2 ± 2,3
0,03	24,8 ± 0,6	58,3 ± 2,5
0,10	25,0 ± 0,6	60,7 ± 2,8
0,15	25,5 ± 0,6	63,3 ± 3,1
0,20	21,7 ± 0,5	63,2 ± 3,1

Таблица 24.2

Влияние концентрации миндальной кислоты на состав панкреатического гидролизата

Состав панкреатического гидролизата, % масс.	Концентрация миндальной кислоты, мг/л	
	0,00	0,15
Нуклеозиды и основания	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Мононуклеотиды	27,4 ± 1,2	19,1 ± 1,4
Ди- и другие олигонуклеотиды, составляющие общее количество до 100%	70,9 ± 3,5	79,6 ± 3,4

Из приведенных в табл. 24.1 и табл. 24.2 данных следует, что применение в процессе ультрафильтрации миндальной кислоты в количестве 0,15 мг/л приводит к снижению ферментативной активности посторонних рибонуклеаз, что обеспечивает увеличение выхода продукта в 1,2 раза за счет снижения содержания спирторастворимой фракции в пермеате. Применение миндальной кислоты также приводит к повышению стабильности состава целевого продукта. Концентрация миндальной кислоты равная 0,15 мг/л была принята в качестве оптимальной.

Чтобы оценить эффективность стадии ультрафильтрации в части очистки гидролизата от окрашенных соединений, были изучены количественные закономерности данной стадии с точки зрения накопления последних в ретанте и пермеате. В ходе проведенных исследований было установлено, что окрашенные соединения с максимумом поглощения 400 нм и 520 нм являются высокомолекулярными, т.к. дифференциальная селективность мембраны УАМ-100 по ним составляет соответственно 87 % и 93 %.

Таким образом, после ультрафильтрации показатели цветности пермеата снижаются в 1,5 – 2,0 раза.

Полученные данные по динамике накопления окрашенных соединений в ходе гидролиза и очистки гидролизата ультрафильтрацией позволяют сделать вывод о максимально допустимом их содержании в исходной РНК, которое позволяет получить препарат в соответствии с требованиями ВФС (см. табл. 24.3).

Полученный ретант дважды промывали водой в режиме диафильтрации. Полученные пермеаты объединяли.

Из объединенного пермеата панкреатический гидролизат осаждали этиловым спиртом с гидромодулем 1:10 при температуре 4 – 8 °С в течение 4 ч. Выход продукта на стадии осаждения составил 95 ± 2 %, Осадок отделяли фильтрованием, промывали этиловым спиртом и высушивали в вакуум-сушильном шкафу. Сухую смесь олигорибонуклеотидов растворяли в 0,55 – 0,65 %-ном растворе хлорида натрия до концентрации 3,3 – 3,7 %, отфильтровывали на микрофилт্রে с диаметром пор 200 – 220 нм при давлении 87 ± 8 кПа. Раствор стерилизовали при температуре 119 – 122 °С в течение 34 мин и ампулировали.

Таблица 24.3

Значения оптических плотностей при 400 нм и 520 нм растворов, образующихся на различных стадиях получения препарата панкреатического гидролизата дрожжевой РНК

Наименование препарата	D_{400}	D_{520}
Исходный раствор РНК (35 г/л)	0,945	0,323
Раствор, поступающий на ультрафильтрацию	3,07	1,14
Пермеат	0,43	0,08

В соответствии с разработанной технологией были получены панкреатические гидролизаты из дрожжей р. *Candida* и *Saccharomyces cerevisiae*. Проведенные испытания показали, что оба препарата соответствуют требованиям, предъявляемым к субстанции для лекарственной формы. По результатам исследований была предложена принципиальная схема получения панкреатического гидролизата РНК, приведенная на рис. 24.3.

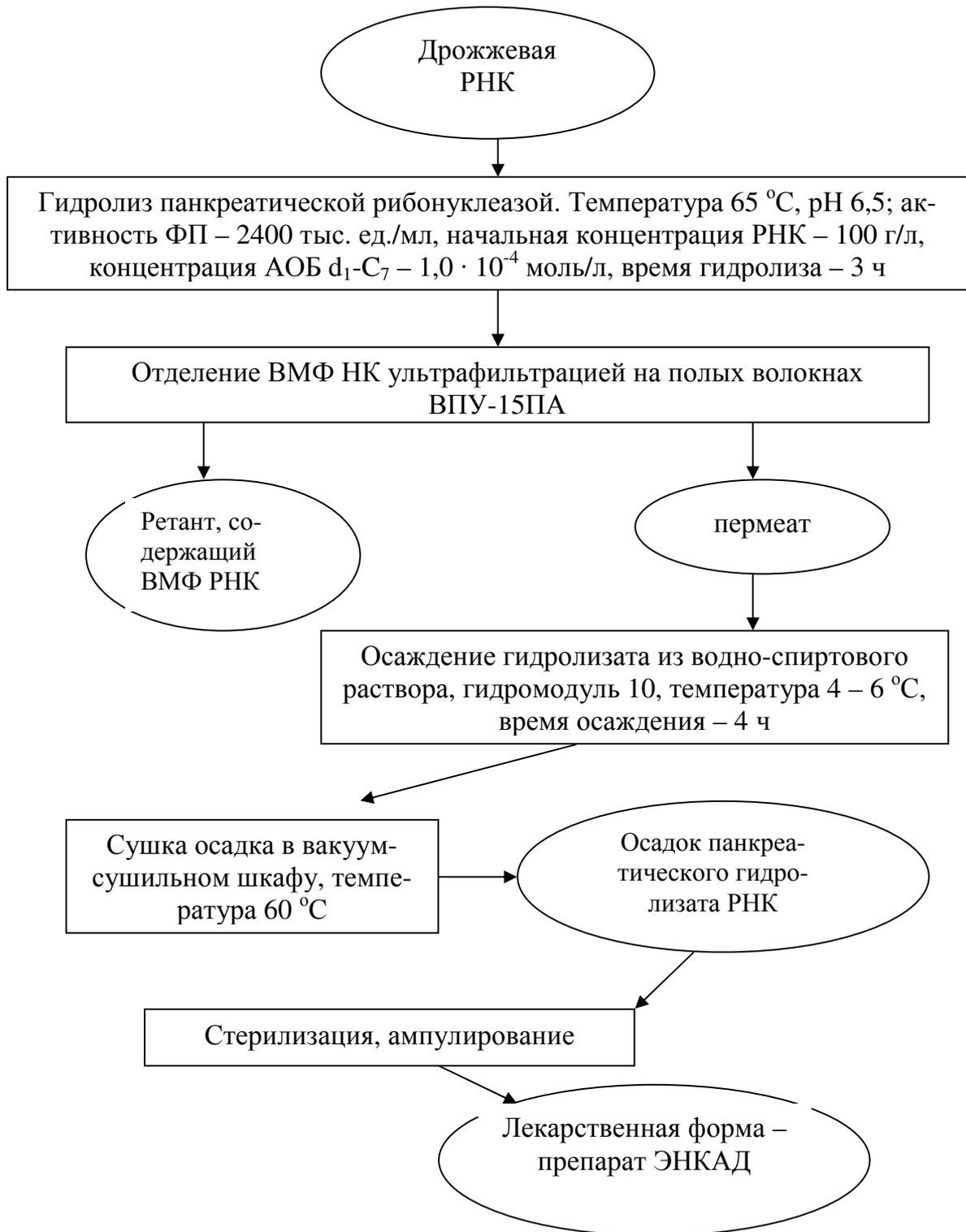


Рис. 24.3. Принципиальная схема получения панкреатического гидролизата РНК

Часть V
ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТАБИЛИЗАЦИИ И
ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСПАДА БИОМАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СИСТЕМ

Глава 25
Молекулярные шапероны

Сворачивание каждого вновь синтезированного белка в трехмерную структуру, которая определяет его биологическую активность, происходит в клетке при участии механизмов, ускоряющих этот процесс и делающих его высокоэффективным. Они также обеспечивают образование трехмерной структуры белков непосредственно в местах постоянной локализации и функционирования [1].

Синтезированные в клетке полипептидные цепи, образованные в результате последовательного соединения аминокислотных остатков, представляют собой полностью развернутые белковые молекулы. Для того чтобы белок приобрел присущие ему функциональные свойства, цепь должна определенным образом свернуться в пространстве, сформировав функционально активную («нативную») структуру. Несмотря на громадное число теоретически возможных для отдельной аминокислотной последовательности пространственных структур, сворачивание каждого белка приводит к образованию единственной нативной конформации.

Согласно современным представлениям, процесс сворачивания имеет иерархическую природу: вначале очень быстро формируются элементы вторичной структуры, служащие «затравками» для образования более сложных структур. Второй стадией является специфическая ассоциация некоторых элементов вторичной структуры с образованием супервторичной структуры (это может быть сочетание нескольких α -спиралей, нескольких β -цепей, либо смешанные ассоциаты данных элементов). Следующим этапом является образование специфических контактов между участками, значительно удаленными один от другого в аминокислотной последовательности, но оказывающимися сближенными в третичной структуре. Это, главным образом, гидрофобные взаимодействия, обусловленные сближением неполярных групп и вытеснением молекул воды, расположенных между ними. Для формирования уникальной пространственной структуры каждого белка необходимо, чтобы образовалось определенное (оптимальное) в каждом случае число таких специфических контактов. На пути к достижению оптимального варианта возможны «ошибки», в этом случае происходит отбор разных вариантов структуры до тех пор, пока не будет достигнут тот единственный вариант, который соответствует функционально активному состоянию данного белка [2].

На пути, ведущем от образования элементов супервторичной структуры к окончательному сворачиванию цепи в компактную глобулу, имеется промежуточная стадия, связанная с формированием основных элементов третичной структуры (специфического сочетания α -спиралей, β -тяжей – соединяющих петель) и образованием гидрофобного ядра молекулы. Молекула приобретает пространственную структуру, близкую к структуре нативного белка. Вместе с тем, она еще не обладает присущей данному белку функциональной активностью. Эта структура, получившая название «расплавленная глобула», отличается от нативной меньшей степенью упорядоченности: неполярные группы, формирующие ядро молекулы, упакованы недостаточно плотно. Отсутствие ряда специфических взаимодействий приводит к изменению ориентации подвижных петель, в целом молекула более лабильна и склонна к «слипанию» с другими такими же молекулами с образованием агрегатов. Таким образом, неспецифическая агрегация может уменьшать число молекул белка, находящихся на правильном пути сворачивания, т.е. снижать эффективность этого процесса. Как показали модельные эксперименты, проведенные *in vitro*, образование «расплавленной глобулы» происходит значительно быстрее, чем ее переход в нативную структуру.

Вероятность агрегации сильно возрастает при повышении температуры и концентрации белка, поэтому эффективное спонтанное сворачивание полипептидной цепи происходит в разбавленных растворах и при низких температурах. В физиологических условиях вновь синтезируемые полипептидные цепи сворачиваются достаточно быстро и эффективно. Следовательно, в клетке должны существовать специальные механизмы регуляции сворачивания.

Было обнаружено, что в клетке существует особая категория белков, основной функцией которых является обеспечение правильного характера сворачивания полипептидных цепей в нативную структуру. Эти белки, связываясь с развернутой или частично развернутой конформацией полипептидной цепи, не дают ей «запутаться» и образовать неправильные структуры. Они удерживают частично развернутый белок, способствуют его переносу в разные субклеточные образования, а также создают условия для его эффективного сворачивания. Эти белки получили название «молекулярные шапероны», образно отражающее их функцию (shaperon – англ. «гувернантка»).

К настоящему времени описано несколько классов молекулярных шаперонов (МШ), различающихся по структуре и специфическим функциям. Все они являются так называемыми «белками теплового шока», синтез которых резко увеличивается в стрессовых для клетки ситуациях. Поэтому сокращенное название этих белков – hsp (heat shock proteins). Однако и в нормальных условиях каждая клетка содержит определенный набор шаперонов, необходимых для ее жизнедеятельности. Классификация шаперонов

основана на величине молекулярной массы составляющих ее полипептидных цепей (субъединиц), которая варьирует от 10 кДа (hsp 10) до 90 кДа (hsp 90) и выше. По характеру выполняемых этими белками функций их можно разделить на два больших семейства – шапероны Hsp 70 и шаперонины – hsp 60 и hsp 10 [3].

Молекулярные шапероны участвуют в разнообразных внутриклеточных процессах, включая такие процессы, как котрансляционный фолдинг белков, сборка и распад надмолекулярных белковых структур и транспорт белков через мембраны [4 – 24].

МШ обладают общими свойствами, характеризующими способность этих белков оказывать влияние на конформацию белковых субстратов. Они избирательно взаимодействуют с определенными интермедиатами процесса фолдинга белков, оказывая, таким образом, влияние на переход белка в нативное состояние. Одни шапероны, такие как белки теплового шока hsp-70и hsp-60, благоприятствуют сворачиванию полипептидной цепи в нативную глобулу и обеспечивают защиту клеток от теплового повреждения и нормализацию ее функций после прекращения теплового воздействия. Другие шапероны, такие как альфа-кристаллины, маленькие белки теплового шока, иммунофиллины hsp-90, способны предотвращать агрегацию белковых субстратов, но не могут обеспечить полный переход белка в нативное состояние [17, 25–32]. В работе [9] дано следующее определение шаперонов. Это белки, которые, взаимодействуя со сворачивающимися полипептидными цепями или с собирающимися надмолекулярными структурами, обеспечивают переход спонтанно протекающего процесса в процесс, который регулируется клеточными факторами.

Взаимодействие шаперонов с исследуемым белком начинается еще до схождения полипептидной цепи с рибосомы. Связываясь с отдельными участками «опекаемой» ими полипептидной цепи, молекулы hsp 70 образуют прочные комплексы, удерживающие цепь в развернутом состоянии. Взаимодействие не является специфическим (шапероны не различают белки по их аминокислотной последовательности) и в основном реализуется благодаря силам гидрофобного характера. Прочно фиксированная на шаперонах полипептидная цепь не способна к сворачиванию в нативную структуру, т.к. не обладает необходимой для этого подвижностью. Главная функция hsp 70 состоит в удержании вновь синтезируемых белков от неспецифической агрегации и в их передаче другому «белку – помощнику», шаперонину, роль которого – обеспечить оптимальные условия для эффективного сворачивания.

Детальные исследования механизма распада связи развернутого белка с hsp 70 и образования связи с шаперонином hsp 60, проведенные на белках, выделенных из клеток бактерий, показали, что главным фактором является способность шаперона связывать АТФ, в определенных условиях осуществлять его гидролиз и изменять прочность взаимодействия с поли-

пептидной цепью в зависимости от природы связанного нуклеотида (АТФ или АДФ). Согласно предложенной схеме (которая, вероятно, применима и для описания действия шаперонов в цитоплазме эукариот, а также в матриксе митохондрий), происходит следующее. Шаперон, содержащий связанную АТФ, присоединяет (в присутствии специального белка-помощника) развернутую полипептидную цепь. Это сопровождается гидролизом АТФ и образованием прочного комплекса шаперона (связанного с АТФ), полипептидной цепи и белка-помощника.

Для того чтобы произошло освобождение развернутой цепи, необходимо участие еще одного белка-помощника, который вызывает отщепление АДФ. Место АДФ занимает АТФ, и полипептидная цепь освобождается. Таким образом, фактором, обеспечивающим сопряженное функционирование шаперона hsp 70 и шаперонина, является обмен аденозиннуклеотидов, зависящий от системы специфических взаимодействий между hsp 70 и белками шаперонинами.

В отличие от довольно просто построенных шаперонов (состоящих из одной – двух полипептидных цепей-субъединиц), шаперонины представляют собой сложные олигомерные структуры. Наиболее изученные hsp 60 митохондрий, а также клеток *E. coli* построены из 14 субъединиц, организованных в два семичленных кольца, лежащих одно под другим. В центре построенного таким образом цилиндра имеется полость – канал диаметром 4,5 нм, в котором и происходит сворачивание полипептидной цепи, перешедшей на шаперонин с шаперона hsp 70 [33].

Наиболее подробно механизм действия белков hsp изучен на примере лизосомального транспорта [34–35].

Лизосомы являются «кислыми» органеллами с интервалом рН 5,5–5,7 [36]. Они содержат гидролитические ферменты с кислыми оптимумами рН, которые способны расщеплять большинство встречающихся в природе макромолекул [37–38]. Микроавтофагоцитоз приводит к объединению в лизосоме цитозоля, целых органелл, таких как пероксисомы, и даже частиц ядра [39]. Некоторые формы микроавтофагоцитоза усиливаются при лимите источников питания [278]. Области микроавтофагоцитоза в цитоплазме, включающие органеллы в структурах с двойной мембраной, были названы автофагосомами. Содержание автофагов снижается после того, как органеллы разрушаются лизосомами [41–45].

В клетках дрожжей определенные белки могут попадать в лизосомы путем, требующим многих продуктов, необходимых для автофагоцитоза. Этот путь используется для таких белков как аминопептидаза 1 и α -маннозидаза. Используемые переносчики являются автофагосомами во время лимитированного питания, но их же можно считать органеллами с двойным мембранным слоем при отсутствии лимита по источникам питания. Другой путь расщепления белков в дрожжах используется при расщеплении ключевого фермента глюконеогенеза – фруктозо-1,6-дифосфатазы.

Он поступает в лизосому для расщепления в тех случаях, когда дрожжи переключаются с бедного источника углерода на глюкозу. Этот путь называется вакуолярным импортом и расщеплением. Транспорт фруктозо-1,6-дифосфатазы в вакуолю требует присутствия белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (hsp 70).

Шаперонзависимый микроавтофагоцитоз отличается от других путей лизосомального расщепления, в которых активный транспорт не происходит [46]. Вместо этого особые белки цитозоля попадают в лизосомы путем взаимодействия «молекула-молекула», основанным на узнавании комплексом молекулярного шаперона, присутствующим в цитозоле и на цитоплазматической стороне лизосомальной мембраны.

Шаперонзависимый автофагоцитоз был впервые описан для культуры фибропластов человека, из которых были удалены факторы роста [47, 48]. Было показано, что белки, которые разрушались быстрее в отсутствие факторов роста, являются субстратами для шаперонзависимого автофагоцитоза, а остальные – нет.

Известно, что шаперонзависимый автофагоцитоз активен в желудке, печени, сердце крыс и других тканях [49], а также, что он активируется при длительном физиологическом стрессе. Короткий физиологический стресс активирует микроавтофагоцитоз, но этот процесс быстро затухает. Механизмы взаимодействия путей лизосомального распада белков неизвестны.

Лизосомы, выделенные из культур клеток или из печени и желудка крыс, способны осуществлять шаперонзависимый автофагоцитоз [50, 51]. При исследовании механизма этого процесса было установлено, что белки-субстраты, необходимые для активности *in vitro* шаперонзависимого автофагоцитоза, должны иметь внешнюю аминокислотную последовательность, относящуюся к lys-Phe-Glu-Arg-Gln. Кроме того, комплекс молекулярного шаперона, содержащий связанную форму белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа (hsp 70), белка теплового шока с молекулярной массой 40 кД (hsp 40), белка теплового шока с молекулярной массой 90 кДа (hsp 90), hsc-70 - интерактивного белка (hip), hsc-70-hsc-90 связывающего белка и белка Вc-12 – связанного антагоина 1, связывается с белок-субстратом [51]. Белок-субстрат и комплекс молекулярного шаперона связаны с мембраной лизосомы, субстрат взаимодействует со связанным с лизосомой мембраной белком типа 2a (lamp 2a). Этот белок не способен проникать через мембрану лизосомы даже с помощью комплекса молекулярного шаперона, и белок проникает внутрь лизосомы с помощью лизосомального hsc-70 (ly-hsc-70) [52].

В табл. 25.1 представлены белки, для которых известно, что они являются субстратами шаперонзависимого автофагоцитоза. Т.к. шаперонзависимый автофагоцитоз активируется во время ограничения питания, белки-субстраты будут селективно расщепляться при этих условиях. Расщеп-

ление гликолитических ферментов, таких как альдолаза В, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа и пируваткиназа, как оказалось, происходит при длительной термической обработке. Расщепление ферментов, ответственных за распад аминокислот, таких как аспартаминотрансфераза, помогает клеткам поддерживать уровень аспартата при отсутствии его в питательной среде. В табл. 25.1 также представлены белки, которые, как известно, не являются субстратами для шаперонзависимого автофагоцитоза.

Таблица 25.1

Белки, являющиеся и не являющиеся субстратами для шаперонзависимого автофагоцитоза

Белковые вещества	Характерная аминокислотная последовательность
Субстраты: Рибонуклеаза А Аспартаминотрансфераза Пируваткиназа Гемоглобин Дегидрогеназа Альдолаза В Hsc-70 Глутатионтрансфераза	Lys-Phe-Glu-Arg-Gln Arg-Lys-Val-Glu-Gln Gln-Asp-Leu-Lys-Phe Gln-Arg-Phe-Phe-Glu Gln-Arg-Asp-Lys-Val Gln-Phe-Arg-Glu-Leu Ile-Lys-Leu-Asp-Gln Asn-Lys-Lys-Phe-Glu
Белки, не являющиеся субстратами: РНК-аза, овальбумин, лизосомы, убихинон, гексокиназа, β -галактозидаза, аннексин V, аннексин XI, А-цепь инсулина и др.	

Было установлено, что все известные субстраты шаперонзависимого автофагоцитоза содержат аминокислотную последовательность, впервые обнаруженную у РНК-азы А [53].

Эта последовательность состоит из аминокислоты Gln в начале или в конце, за которой следуют четыре аминокислоты, содержащие основную (Lys или Arg), кислую (Asp или Glu), гидрофобные (Phe, Ile, Leu, Val) аминокислоты и повторяющуюся основную или гидрофобную аминокислоту. Предполагают, что малое количество этих аминокислот будет также снижать содержание глутамин по отношению к аспарагину. Эта аминокислотная последовательность обнаружена у 13 независимых белков, которые являются субстратами шаперонзависимого автофагоцитоза и не обнаружена в 10 белках, которые не являются его субстратами. Белки hsc-70 включаются во многие клеточные процессы, в том числе, диссоциацию связанных белков из поверхностных мышц [54], взаимодействие антигенных пептидов с гистоновыми комплексами типа II и транспорт вновь синтезируемых белков через эндоплазматический ретикулум, митохондриальную и хлоропластовую мембраны [55, 56]. Связывание белка hsc-70 с белками-

субстратами регулируется связыванием с АТФ и гидролизом. АДФ-связанная форма hsc-70 имеет наивысшее сродство к белкам-субстратам [57].

Цитозольный белок hsc-70 узнает последовательность, включающую участок пептидной цепи в белках-субстратах для шаперонзависимого автофагоцитоза и помогает их транспорту на лизосому. Hsc-70 связывает любые 20 белковых аминокислот, входящих в состав пептидов со специфической последовательностью, с сефарозой и элюирует с этих носителей специфичные пептиды. Цитозольный белок hsc-70 или те молекулы этого белка, которые расположены на цитозольной стороне лизосомальной мембраны помогают проникать внутрь лизосомы преимущественно белкам-субстратам [58].

Условия, необходимые для проникновения белков-субстратов, были установлены с использованием так называемого «объединенного» белка, связанного с дигидрофолатредуктазой. Когда такой комплексный белок удерживается в своем связанном состоянии с помощью метатрексата, он может связываться с лизосомой, но не может быть транспортирован через мембрану. Когда метатрексат удаляют и добавляют hsc-70, дигидрофолатредуктазный комплекс белка меняет конформацию и транспортируется внутрь лизосомы [59].

Кошапероны, которые взаимодействуют с hsc-70, действуют либо сами как шапероны, либо регулируют активность hsc-70. Связанный с hsc-70 белок стимулирует связывание белка hsc-70 с белком hsc-40 и с белковым субстратом. Hsc-40 стимулирует АТФ-азную активность hsc-70, приводящую к увеличению скорости связывания и расщеплению белка-субстрата. Hsp-90 узнает «развернутые» участки внутри белков и препятствует агрегации белков-субстратов [60]; «объединяющий» белок hsc-70 – hsp-90 действует как связующее звено для белков hsc-70 и hsp-90 и может также участвовать в обмене нуклеотидов. Белок bag-1 разрушает связь белков-субстратов с АТФ-азой и hsc-70 [61]. Существует несколько изоформ bag-1, некоторые из них являются положительными регуляторами, а другие – отрицательными регуляторами hsc-70- активности [62].

В вышеуказанном комплексе существуют похожие на дополнительные шапероны и кошапероны соединения, их идентификация и роль в шаперонсвязанном автофагоцитозе является предметом дополнительных исследований. Недавно было описано, что кошапероном для hsc-70 является карбоксильная группа hsc-взаимодействующего белка (run) [63]. В клетках «run» увеличивает активность hsc-70 при измерении его способности к обратному «сворачиванию» термически денатурированных белков. Влияние этого кошаперона на hsc-связывание с субстратами шаперонсвязанного автофагоцитоза остается неизвестным.

Другим недавно установленным кошапероном для hsc-70 является белок цикла клеточного деления [64]. Он может сам действовать как шапе-

рон, но может и увеличивать активность hsc-70 – hsc-90 комплексов. Существуют также недавно открытые кошапероны hsc-90, которые могут входить в состав молекулярного комплекса шаперонов. Активатором hsc-90 АТФ-азы является белок из семейства белков теплового шока, которые активируют АТФ-азную активность hsp-90 и стимулируют связывание белка и его распад. Их потенциальная роль в шаперонсвязанном автофагоцитозе остается неизученной.

Лизосомальный белок (ly-hsc-70) присутствует в лизосомальном пуле без каких-либо кошаперонов, связанных с цитозольным или лизосомальным мембранным комплексом [65]. Он необходим для эффективного транспорта белковых субстратов через митохондриальную мембрану и внутрь пула лизосомы, где они разрушаются. В печени крысы имеются два вида лизосом со слегка различными плотностями, которые сильно различаются по способности осуществлять шаперонзависимый автофагоцитоз [66]. Более активный тип содержит белок с высокой молекулярной массой ly-hsc-70, тогда как менее активный тип содержит небольшой белок hsc-70. Менее активный тип лизосом мог бы стать более активным для шаперонзависимого автофагоцитоза, если бы был способен при изменении активности присоединять преимущественно hsc-70. Механизмы, по которым эти лизосомы присоединяют hsc-70, могут включать микроавтофагоцитоз, макроавтофагоцитоз и даже шаперонсвязанный микроавтофагоцитоз, хотя этот тип лизосом менее активен для шаперонзависимого микроавтофагоцитоза. Hsc-70 содержит две специфические последовательности и является субстратом для шаперонсвязанного микроавтофагоцитоза [67].

Роль ly-hsc-70 в вышеуказанных белковых субстратах для шаперонзависимого микроавтофагоцитоза была также показана для слившихся фибропластов человека в культуре клеток. Эти клетки активируют шаперонзависимый микроавтофагоцитоз в соответствии с механизмом действия ростовых факторов. Если ly-hsc-70 был сначала нейтрализован с помощью нейтрализующего антитела, шаперонзависимый автофагоцитоз полностью блокировался. Если антитело было связано в комплекс с hsc-70 перед эндоцитозом, то это не оказывало влияния на шаперонсвязанный микроавтофагоцитоз. Предполагают, что ly-hsc-70 требовался для перемещения белков в пул лизосомы подобно аналогичной роли белков hsc-70 в переносе белков в эндоплазматический ретикулум, митохондрии и хлоропласты [68, 69]. Однако в эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях hsp-70 в органеллах требуется АТФ для обеспечения повторяющихся циклов связывания пептидов и реализации необходимого переноса белков через мембрану [70].

Последующие исследования показали, что ly-hsc-70 играет важную роль в переносе белка lamp-2a из лизосомального пула в лизосомальную мембрану, т.е. роль ly-hsc-70 в шаперонсвязанном микроавтофагоцитозе более сложная, чем предполагалось ранее. Объяснение этих механизмов,

требующих участия Iy-hsc-70, требует дополнительных экспериментов.

Когда из фибробластов человека удаляют факторы роста, содержание Iy-hsc-70 возрастает примерно вдвое [70]. Содержание Iy-hsc-70 также возрастает в печени крысы с соответствующей скоростью. На основе данных по увеличению количества hsc-70 после удаления факторов роста предполагают, что Iy-hsc-70 может вносить вклад в активацию шаперонзависимого микроавтофагоцитоза.

Было показано, что лизосомы, выделенные из фибропластов человека и из печени крысы, способны связывать до насыщения белки-субстраты с мембраной лизосомы [70]. Более того, связывание одного субстрата может происходить при добавлении различных соединений, но не белков, которые не являются субстратами [71]. Связывание может частично ингибироваться путем предварительной обработки лизосом нейтральной протеазой. Эти факты предполагают наличие рецептора в лизосомальной мембране.

Дальнейшие эксперименты показали, что для связывания белков-субстратов требуются четыре аминокислоты (Lys-Arg-His-His). Когда эти аминокислоты направлены в сторону аланина, белок Iamp 2a больше не способен связывать белковые субстраты [72–74]. Определение аминокислот в белках-субстратах, которые взаимодействуют с белком Iamp 2a, является важным вопросом дальнейших исследований.

Существуют две изоформы Iamp 2a в клетках человека и три различные изоформы в клетках других организмов, которые образуются при альтернативном сплайсинге матричной РНК [75]. Различия между Iamp 2a, Iamp 2b и Iamp 2c касаются трансмембранной области и цитозольного «хвоста». Но только белок Iamp 2a способен действовать как рецептор для шаперонсвязанного микроавтофагоцитоза. Опыты на мышах при отсутствии любых изоформ Iamp 2 показали уменьшение скорости расщепления белков и накопления автофаговых вакуолей в сердце, скелетных мышцах и других тканях [76]. Это связано с тем, что одна из изоформ белка Iamp 2 требуется для снятия автофаговых вакуолей с лизосомами.

Количество Iamp 2a в лизосомальной мембране регулируется путем изменения скорости его расщепления. Например, во время голодания уровень Iamp 2a возрастает благодаря уменьшению скорости его распада. Механизмы распада Iamp 2a включают исходное расщепление лизосомальной протеазой А (катепсином А) [77]. Клетки тканей мышей с удаленным катепсином А имели высокий уровень Iamp 2a в лизосомальной мембране и показывали высокие скорости шаперонзависимого микроавтофагоцитоза. Металлопротеаза, которая еще не идентифицирована, также вносит вклад в распад белка Iamp 2a и действует совместно с катепсином А.

Более быстрое регулирование содержания белка Iamp 2a в лизосомальной мембране связано с изменением соотношения последовательностей Iamp 2a в лизосомальном матриксе [78]. Некоторые из этих молекул

могут возвращаться в лизосомальную мембрану в процессе, который требует наличия мембранного потенциала и других белков в лизосомальной мембране.

Последовательность аминокислот в белках-субстратах для шаперонзависимого микроавтофагоцитоза нуждается в дальнейшем изучении. Например, аспарагин может замещать глутамин в составе определенных последовательностей аналогичных описанным выше, а в других последовательностях – нет. Например, аспарагинсодержащие последовательности в белках-субстратах могут требовать наличия трех гидрофобных аминокислот, не содержащих аспарагин. Такие возможности были изучены с использованием направленного мутагенеза пептида, в составе белка, называемого зеленым флуоресцентным белком β -галактозидазы.

Белок hsc-70 является как стимулятором, так и субстратом для шаперонзависимого микроавтофагоцитоза. Нерешенным остается вопрос о том, сколько циклов по переносу других белковых субстратов hsc-70 выполняет перед тем, как он попадает в лизосому в качестве субстрата для шаперонсвязанного микроавтофагоцитоза. Знание их количества помогло бы предположить механизм данного процесса. Например, если hsc-70 поступает в лизосомы вместе с каждой молекулой субстрата, hsc-70 может являться частью блокирующего механизма, похожего на циклы, описанные для поступления белков в пероксисомы [79].

Неизвестно, как hsc-70 образует комплекс со всеми кошаперонами на лизосомальной мембране и становится белком Iy-hsc-70 в лизосомальном пуле. Hsc-70 может быть единственным шапероном, который транспортируется в лизосомный пул, либо кошапероны могут также транспортироваться, но затем быстро разрушаться. Hsc-70, как известно, очень стабилен внутри лизосом [80].

Также неизвестно, требуется ли мембранный потенциал или закисление среды для транспорта белковых субстратов шаперонзависимого микроавтофагоцитоза через лизосомальную мембрану. Эти исследования планируется проводить в перспективе с использованием специфических ингибиторов, слабых оснований и реагентов, разрушающих мембранный потенциал. Мембранный потенциал, как известно, является компонентом движущей силы для транспорта белков через внутреннюю мембрану митохондрий и через хлоропластовую тиллакоидную мембрану [81–83].

Изучены механизмы действия шаперонов на прионы. Прионная форма белка отличается от клеточной только по вторичной структуре, она имеет β -складчатую структуру, а клеточная форма – α -спиральную [84]. Это справедливо для белка млекопитающих PrP и для всех остальных исследованных прионов, в том числе и бактериального Sup 35. Существуют две основные модели, которые объясняют превращение клеточного белка в его прионную изоформу. Согласно «гетеродимерной» модели прионное состояние присуще мономеру белка, а превращение происходит, когда мо-

лекула клеточного белка связывается с мономером приона [85]. После того как белок приобрел прионную конформацию, пара диссоциирует и две освободившиеся молекулы могут снова участвовать в инициации конформационных переходов. Агрегация при этом рассматривается как вторичное явление. Существует вторая, «полимеризационная модель», которая предполагает, что агрегация прионного белка неразрывно связана с изменением конформации, и превращение происходит непосредственно при присоединении клеточной формы к агрегату [86]. Полимеризационная модель подтверждается опытами *in vitro*, которые показывают, что прионообразующими свойствами обладают не мономерные формы, а высокомолекулярные агрегаты [87]. Недавно была сформулирована и подтверждена еще одна модель, получившая название «конформационной конверсии с помощью нуклеации» [88]. Она заключается в том, что существуют две формы белка: растворенная S-форма и агрегированная A-форма (прионная конформация). Конформационные изменения происходят за счет присоединения S-формы к A-форме. При этом белок в S-форме может находиться как в мономерной, так и в олигомерной форме. Особое свойство мономерного белка заключается в том, что он конформационно нестабилен, поэтому только с очень малой вероятностью может превращаться в более стабильную A-форму. Число возможных конформаций столь велико, что одна из них, пусть даже более стабильная, может быть найдена только за очень большое время и спонтанный S/A переход на уровне мономеров не происходит. Однако он может происходить достаточно быстро при присоединении мономеров к готовым «семенам» – агрегатам. В отсутствие «семян» S/A переход может быть облегчен, если он происходит в олигомерных комплексах. Такие олигомеры все еще представляют собой S-форму, но их субъединицы имеют значительно меньший набор возможных конформаций.

Олигомеры и мономеры находятся в равновесии и могут переходить друг в друга. В принципе, могут существовать три формы олигомеров. Только что образованный олигомер все еще достаточно лабилен и может совершить конформационное превращение в A-форму только за очень большое время. Далее наступает его «созревание», при котором происходит дальнейшее ограничение подвижности мономеров. Зрелый олигомер полностью готов к превращению, и оно может происходить очень быстро. Третья форма представляет собой уже агрегат, где мономеры находятся в A-форме. Такой олигомер является минимальным «зерном». Таким образом, имеется три скорости S/A перехода, характерных для разных форм белка: мономер < олигомер < зрелый полимер. Во всех трех случаях скорость перехода значительно возрастает при присоединении молекул к готовому агрегату, а переход мономерной формы без этого вообще не происходит [89]. Эксперименты, проведенные *in vitro* с очищенным NH-фрагментом Sup 35, подтверждают эту модель. Однако точный механизм

этого процесса *in vivo* не выявлен.

Одним из наиболее удивительных свойств дрожжевых прионов является обратимость их распада: они могут возникать *de novo* у штаммов, которые их утратили или никогда не имели. Клетка, лишившаяся прионного детерминанта, может снова приобрести его с некоторой вероятностью, если только не произошла мутация в гене, кодирующем прионный белок [90]. При этом образование *de novo* детерминанта [Psi+] регулируется другим прионным детерминантом [Pin]. [Pin] определяет, будет ли образовываться [Psi+] *de novo*. Если клетки имеют детерминант [Pin], то [Psi+] *de novo* не образуется. Однако, если белок Sup 35 укорочен с С-конца, то [Pin] на [Psi] никак не влияет [91].

Укороченный с С-конца белок Sup 35 сильно увеличивал частоту конверсии *de novo* [92]. То же самое происходило и с Ure 2 [91]. Было показано, что чем меньше фрагмент, несущий принообразующий домен, тем выше частота конверсии [93].

Также было показано, что при увеличении в клетке концентрации белка Sup 35 в нормальной конформации повышается вероятность конверсии *de novo* [94]. Такие же свойства проявляет белок Ure 2. При нормальной экспрессии и длине белка не редко происходит образование прионной конформации *de novo*. Однако при сверхэкспрессии эта частота резко увеличивается. Для этого были предложены следующие объяснения:

1. Более частая конверсия обусловлена просто увеличением концентрации белка.
2. На правильную укладку всего сверхпродуцированного белка может не хватать шаперонов, в результате чего образуется неправильно уложенная форма белка, что повышает вероятность появления прионной конформации.
3. Если шаперон не успевает укладывать весь белок правильно, то протеазы могут частично расщеплять его, оставляя укороченные домены, которые с большей вероятностью образуют прионную конформацию *de novo*. Два последних предположения сводятся к тому, что прион как бы титрует шаперон.

Возможно, все эти три объяснения правильны и взаимосвязаны. В дополнение можно сказать, что связь шаперонов с конверсией *de novo* косвенно подтверждается тем, что при делении шаперона Ssb1 частота формирования спонтанного образования [Psi+] возрастает [95].

Интересной особенностью дрожжевых прионов является обратная конверсия, т.е. возможность исчезновения прионного детерминанта и приобретение нормальной, функционирующей формы белка, не образующей агрегаты.

Поддержание детерминанта [Psi+] клетками дрожжей зависит от концентрации шаперона Hsp 104, причем эта зависимость на фенотипическом уровне носит удивительный характер: как полное отсутствие шапе-

рона, так и его сверхэкспрессия приводит к элиминации [Psi+] [96]. Видимо, для существования детерминанта нужен некоторый оптимальный уровень концентрации Hsp 104 [90]. Однако сверхэкспрессия Hsp 104 не элиминирует детерминанты [Ure 3] [211] и [Pin] [88].

Рассмотрим действие Hsp 104 на молекулярном уровне. Одной из функций этого шаперона является разрушение частично денатурированных белков, образующих агрегаты. Анализ последствий сверхэкспрессии показывает, что увеличение внутриклеточной концентрации Hsp 104 приводит к разрушению агрегатов и накоплению растворимой формы Sup 35. Видимо, при элиминировании [Psi+] происходит полное разрушение агрегатов Sup 35 [92]. Делеция гена Hsp 104 элиминирует детерминант. Для объяснения этого факта существуют две гипотезы. Агрегаты прионных белков представляют собой фибриллы. Тер-Аванесян с сотрудниками предположили, что Hsp 104 действует на прионные фибриллы Sup 35 так же, как и на другие белковые агрегаты. При этом происходит фрагментация фибрилл, сопровождающаяся увеличением количества концов, по которым происходит полимеризация (конверсия). Следовательно, частичное разрушение фибрилл увеличивает общую скорость полимеризации. Кроме этого, фрагментация необходима для стабильного наследования детерминанта, когда отрезки фибрилл переходят в дочерние клетки. При отсутствии шаперона фрагментация происходить не будет, поэтому белок sup 35 будет находиться в клетке в виде одного агрегата – единственного центра полимеризации; он будет медленно осуществлять конверсию, и, возможно, не будет разделен между дочерними клетками. В таких условиях наследование [Psi+] будет затруднено и через некоторое время прионный фенотип исчезнет [83].

Существует и другое объяснение, предложенное Линдквист с сотрудниками, согласно которому шаперон Hsp 104 участвует в самом S/A переходе. Соответственно, когда его нет, то [Psi+], не образуется. Здесь можно выделить две возможности:

1) Hsp 104 необходим для предварительной укладки белка в «компетентную» S-форму, способную к S/A переходу.

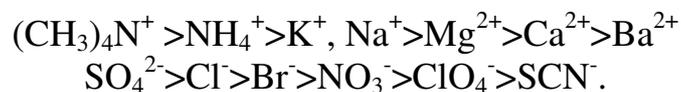
2) Hsp 104 прямо катализирует и прямой, и обратный S/A переходы, сборку и разборку агрегатов соответственно. Уровень, на котором устанавливается равновесие, зависит от концентрации Hsp 104. Например, сверхэкспрессия сдвигает равновесие в сторону разборки агрегатов.

Также существуют некоторые мутации в белке Sup 35, которые «вылечивают» клетки от детерминанта [Psi+]. Была исследована мутация PNM2, которая меняет Gly 58 на Asp и элиминирует детерминант [Psi+]. Такой мутантный белок Sup 35 имеет прионные свойства и также эффективно встраивается в агрегат, как и дикий тип. Однако было показано, что такой агрегат медленнее осуществляет конверсию белка как мутантного, так и нормального. Таким образом, мутантные молекулы Sup 35 могут эф-

фактивно конкурировать с нормальным за встраивание в агрегат, и уже в включившись, замедлять замедлять его конверсию. Это может быть связано с тем, что мутантный белок имеет в целом другую конфигурацию или/и с тем, что у мутанта конец, которым он присоединяется к агрегату никак не изменен, а конец, по которому происходит дальнейшая полимеризация, изменен и присоединение последующей молекулы Sup 35 может быть затруднено [88]. Вероятно, эта мутация является элиминирующей, из-за того, что скорость роста агрегатов не успевает за делением клеток дрожжей и, следовательно, в ряду поколений клеток с некоторой частотой прионные агрегаты теряются. Похожие случаи были выявлены и у млекопитающих. Одновременное присутствие различных вариантов белка PrP нарушало конверсию PrP^c в его прионную изоформу (PrP^{Sc}) [89].

Химические шапероны. В последние годы появились публикации о стабилизации ферментов с помощью низкомолекулярных веществ как органической, так и неорганической природы: специфические лиганды, соли, хелатирующие и редуцирующие вещества, полимеры, полиолы, сахара, метиламины, ПАВ, аминокислоты и др. [97]. Механизм действия таких соединений сходен с действием молекулярных шаперонов, поэтому они получили название химических шаперонов (XIII).

Отдельные соли стабилизируют или дестабилизируют белки в зависимости от позиции, которую занимают образующие их ионы в лиотропных рядах Хофмейстера, отражающих действие солей на растворимость белка [98]:



В этих рядах катионы и анионы расположены в порядке уменьшения стабилизирующей силы. Происходит «высаливание» гидрофобных остатков в белке стабилизирующими ионами, что приводит к образованию более компактной структуры белковой молекулы. Данный эффект может быть обусловлен повышением ионной силы раствора и увеличением количества водных кластеров вокруг белка.

Хелатирующие вещества образуют комплексы с ионами металлов, входящих в структуру белковых макромолекул, предотвращая, таким образом, автоокисление активными формами кислорода. Они также могут предотвращать агрегирование молекул белка, индуцированное ионами металлов. Однако хелатирующие вещества способны удалять каталитически важные ионы металлов, как из активного центра, так и стабилизирующие конформацию белка, что приводит к потере активности [99]. Примером такого стабилизатора является полиэтиленимин [100].

Редуцирующие вещества предотвращают деструктивное окисление важных структурных или функциональных групп, но они имеют и недостатки. Обычно используемый 2-меркаптоэтанол способствует восстановлению дисульфидных связей в белке, но также может каталитизировать ти-

ол-дисульфидный обмен, что будет способствовать агрегации макромолекул [101].

Известно о существовании ряда низкомолекулярных соединений органической природы, обладающих защитной функцией по отношению к клеточным белкам. Было установлено, что эти вещества проявляют шапероноподобную активность, стабилизируя нативную конформацию белков и защищая их от стресса.

Известно, что Gu-HCl-белок денатурирующий агент, элиминирует природный детерминант. Возможно, он нарушает стабильную конформацию прионного агрегата и приобретает свойства растворимого олигомера с плохо заторможенной конформацией и разрушается. Существует и другая возможность. Было показано, что рост клеток на Gu-HCl индуцировал экспрессию Hsp 104, что может служить причиной элиминации [Psi+]. Однако это не согласуется с тем, что Gu-HCl также элиминирует детерминанты [URE 3] [102] и [Pin 31], которые, как уже говорилось, не «излечиваются» шапероном Hsp 104. Было показано, что химические шапероны уменьшают скорость конверсии белка PrPc в PrPSc, но не оказывают никакого эффекта на предшествовавший PrPc.

Предполагается, что химические шапероны стабилизируют спиральные участки PrPc. Диметилсульфоксид в средних концентрациях (1–3 %) увеличивают конверсию нормального белка в инфекционный в 2–3 раза, при добавлении к нормальному белку «зерен» PrPSc (дополнительно обработанных денатурирующими агентами в малых количествах), однако, он полностью ингибирует ее при больших концентрациях (до 30 %). Возможно, в первом случае диметилсульфоксид слегка ограничивает конформационную подвижность, а его большие концентрации просто денатурируют белок. На сегодняшний день непонятно, почему предварительная слабая денатурация семян помогает конверсии. Сахароза и трегалоза ингибировали конверсию только в больших концентрациях (1000 мМ). Такие концентрации в норме в клетке не наблюдаются, но могут достигаться локально при стрессовых условиях [103].

Показано, что осмолиты – низкомолекулярные органические вещества (полиолы, сахара, амины и аминокислоты) – защищают ферменты от воздействия высокой температуры, дегидратации, денатурирующего окружения [104].

Многоатомные спирты, сахара и полиэтилен гликоль способны образовывать множественные водородные связи и способствовать образованию сольватной оболочки вокруг молекулы белка, которая отличается от объемной водной фазы. Они также могут вызывать увеличение поверхностного натяжения и вязкости раствора [105] и оказывать стабилизирующее действие путем восстановительного протеолиза. Трегалоза способна подавлять агрегацию денатурированных белков [106].

К осмолитам природного происхождения также относятся аминокис-

лоты и метиламин. Они выполняют в клетке роль защиты от денатурирующих факторов. Их действие было подробно изучено на примере бычьей РНК-азы А [107].

В литературе также описаны примеры других веществ, действующих как химические шапероны. Так, в работе [108] описана роль α -кристаллина как химического шаперона. Это позволило объяснить, почему хрусталик остается прозрачным столь долгое время. α -Кристаллин препятствует агрегации других белков хрусталика, которые должны стать развернутыми путем образования белками комплексов с высокой молекулярной массой. Он также защищает ферментативную активность. α -Кристаллин специфично связывается с белками на ранних стадиях денатурации. Амфипатическая природа α -кристаллина, полярный С-конец и гидрофобный N-конец являются необходимыми для функции шаперона. Полярный С-конец обеспечивает растворимость и может связываться с противоположно заряженными остатками развернутых белков. Специфические области, важные для связывания и функционирования шаперона были идентифицированы как N-содержащий конец, связанный с пептидом и С-конец. α -Кристаллин был выделен из ядер клеток хрусталика, которые проявляли уменьшение функции шаперона в зависимости от возраста. Было обнаружено, что высокомолекулярные комплексы и α -кристаллин внутри ядер из здоровых и катарактных глазных клеток имели пониженную функцию шаперона. Посттрансляционные модификации, которые, как известно, происходят во время старения, вызывают снижение функций шаперона.

Однако все вышеперечисленные соединения либо действуют на фермент *in vivo*, либо способствуют только увеличению сроков его хранения, не меняя каталитической активности. Использование многих из данных соединений в промышленных условиях потребовало бы сложной очистки гидролизата вследствие их токсичности. Поэтому для промышленных ферментативных процессов представляется актуальным подобрать природный нетоксичный стабилизатор, способный повышать ферментативную активность.

Из литературных данных известно, что многие микроорганизмы в состоянии анабиоза выделяют особые вещества, которые способствуют сохранению активности и стабильности ферментов [109]. Кроме того, они позволяют при переходе клетки от анабиоза к активной жизнедеятельности быстро восстановить первоначальную активность ферментов. Эти вещества называют естественными индукторами анабиоза.

Подобные метаболиты были также обнаружены в спорах бактерий и микроскопических грибов. Причем, было показано, что именно эти соединения способствуют поддержанию минимальной активности споры в состоянии анабиоза, позволяют переносить неблагоприятные условия влажности, кислотности среды, температуры.

Поэтому представляет интерес идентифицировать данные соедине-

ния, выделить их из клетки или подобрать их химические аналоги, которые можно было бы использовать для регулирования ферментативных процессов *in vitro*.

Многие соединения, играющие роль естественных индукторов анабиоза, могут быть по механизму своего действия отнесены к химическим шаперонам.

В Институте Микробиологии РАН при изучении ауторегуляции роста и развития микроорганизмов было обнаружено, что микроорганизмы различных таксономических групп в процессе своей жизнедеятельности синтезируют и аккумулируют в культуральной жидкости аутогенные метаболиты, влияющие на структурную организацию и функциональную активность мембран клеток, и, таким образом, влияющие на физиологическое состояние микроорганизмов [110]. Они получили название ауторегуляторных факторов *d* микроорганизмов.

Дальнейшие исследования выявили химическую и физиологическую неоднородность фактора *d*. В его составе были определены: фактор d_1 – ауторегулятор анабиоза, вызывающий обезвоживание микробной клетки, ингибирование метаболических процессов, что сопровождается переходом клетки в анабиотическое состояние; и фактор d_2 – активирующий комплекс гидролитических ферментов клетки и в экстремальных концентрациях приводящий к автолизу. В настоящее время разработаны схемы препаративного выделения и очистки ауторегуляторных факторов d_1 и d_2 из культуральной жидкости микроорганизмов различных таксономических групп.

Так, например, выделение ауторегуляторного фактора d_2 можно проводить по схеме, включающей следующие стадии [111]:

- 1) обработка бесклеточной культуральной жидкости бутанолом в соотношении 3:1 (об.);
- 2) декантация бутанольной фракции после отстаивания;
- 3) удаления бутанола под вакуумом при температуре 40 °С;
- 4) растворение остатка в экстракционной смеси хлороформ: метанол: вода 2:2:18 (об.);
- 5) разделение смеси отстаиванием;
- 6) декантация хлороформенной фракции;
- 7) удаление хлороформа под вакуумом при температуре 40 °С;
- 8) повторное растворение в смеси хлороформ, метанол, вода;
- 9) разделение смеси отстаиванием;
- 10) раздельное упаривание хлороформенной и метанольной фракций при 40 ° – 60 °С до полного удаления растворителей;
- 11) перекристаллизация из 96%-ного этанола.

Для разделения и очистки фракций препарата d_2 его растворяли в смеси метанол : хлороформ (1 : 2) до концентрации 40 г/л, пропускали через хроматографическую колонку с последующей элюцией хлороформом и выпариванием. Упаренную фракцию растворяли в 96 %-ном этаноле.

Что касается химического строения факторов d_1 и d_2 , то было установлено, что вне зависимости от родовой принадлежности активным началом факторов d_2 являются свободные жирные кислоты (СЖК). В малых концентрациях (менее 5 г/л) СЖК стимулируют эндогенное дыхание клеток продуцента и экзогенно стимулируемое малатом дыхание изолированных мембран *Micrococcus lisodeikticus*, больших – ингибируют его и индуцируют автолиз клеток [111–113].

Фактор d_1 является амфифильным соединением и его ближайшим структурным аналогом является 4-*n*-гексилрезорцин [114].

Способность синтезировать ауторегуляторы d_1 свойственна микроорганизмам различных таксономических групп. Факторы d_1 бацилл, псевдомонад, микрококков, метилококков, дрожжей относятся к одному классу соединений – алкилоксибензолам и присутствуют в клетках в виде смеси гомологов и изомеров [115–118]. В работе [119] было обнаружено, что ауторегуляторные факторы d_1 микроорганизмов – аутоиндукторы анабиоза обладают функцией структурных модификаторов белковых макромолекул. Химический аналог ауторегуляторных факторов, d_1 – 4-*n*-гексилрезорцин, в опытах *in vitro* ингибировал каталитическую активность инвертазы, химотрипсина и глюкозооксидазы при концентрациях 10^{-2} – 10^{-4} моль/л, когда он присутствовал в среде как в виде раствора, так и в виде мицелл. На модели химотрипсина показано, что ингибирующее действие аналога фактора d_1 увеличивается при снижении рН и сопряжено с повышением термостабильности фермента. Полученные результаты позволяют заключить, что факторы d_1 могут играть роль естественных химических шаперонов, обеспечивая в процессе развития анабиотического состояния метаболический блок в клетке, путем образования каталитически неактивных и термостабильных комплексов с ферментами.

Кроме того, показано [119], что алкилоксибензолы способны образовывать межмолекулярные водородные связи между гидроксилами их ароматического ядра и мембранными фосфолипидами. Это приводит к поликонденсации липидной стромы мембран, изменению их проницаемости для моновалентных ионов, дегидратации клеточного протопласта и ингибированию функциональной активности мембранных ферментов.

При биологическом тестировании коммерческих препаратов индивидуальных жирных кислот, входящих в состав фактора d_2 *R. Aurantraca*, было установлено, в основном за физиологическое действие – ингибирование дыхания и индукцию автолиза клеток ответственны ненасыщенные жирные кислоты в концентрациях менее 300 ммоль/л, хотя те же кислоты в концентрациях выше указанного предела вызывали ингибирование эндогенного дыхания клеток *R. Aurantraca* [120].

В биологических тестах было установлено, что факторы d_2 исследуемых продуцентов различной степени очистки, фракции СЖК аутоиндукторов и коммерческие препараты ненасыщенных жирных кислот

(НЖК), входящих в их состав в доминирующих количествах, действовали аналогично. Во всех случаях степень ингибирования дыхания клеток повышалась: при увеличении концентрации вносимых липидов, снижении рН инкубационной среды, уменьшения количества биологического материала в ячейке, а также развивалась во времени и зависела от физиологического возраста клеток [120, 121].

Было показано, что за физиологическое действие фактора d_2 исследуемых дрожжей ответственны ненасыщенные жирные кислоты, повышение уровня которых в клеточной суспензии влияет на активность дыхания и фазовое состояние мембран вплоть до их дестабилизации, что является причиной автолиза клеток, как было показано в работах [113, 114, 120].

В последнее время были получены данные о стабилизации белков и, в частности ферментов, алкилоксибензолами (АОБ), которыми по своей химической природе и являются факторы d_1 .

Полная картина о функциях аутоиндукторов анабиоза фактора d_1 (АОБ), механизмах его действия до сих пор не ясна. По своей химической природе факторы d_1 ряда дрожжей и бактерий относятся к АОБ, биологическое действие которого на культуру состоит в ингибировании роста клеток и индукции образования анабиотических цистоподобных форм микроорганизмов [121].

АОБ синтезируются в фазе роста развивающейся микробной культуры и присутствуют в ней в виде смеси изомеров и гомологов. Они различаются положением заместителей (ОН-групп) в ароматическом кольце и длиной алкильного радикала, что определяет их амфифильные свойства и степень гидрфобности молекул [121, 122].

В зависимости от этого, факторы d_1 преимущественно растворяются или в липофильной фазе – мембранных липидах клеток при $pH < 7.0$, или переходят в водную фазу – среду при $pH \geq 7$. Как правило, эти факторы обладают способностью легко выходить из клеток и наоборот проникать внутрь них из окружающей среды. Благодаря этому их свойству, факторы d_1 либо аккумулируются в клетках, индуцируя развитие гипометаболического, а в высоких концентрациях и анабиотического состояния, либо высвобождаются в среду, что приводит к снижению метаболического обмена, и запускаются процессы прорастания покоящихся форм [123].

Реакционная способность факторов d_1 образовывать межмолекулярные водородные связи, вступать в гидрофобные и ионные взаимодействия определяет механизм их действия при развитии метаболического блока в клетке [124].

Механизмы действия факторов d_1 (АОБ) включают изменения структуры клеточных мембран, увеличивая микровязкость мембранных липидов, вследствие образования межмолекулярных водородных связей между функциональными группами АОБ (ОН) и фосфолипидами. Изменение фазового состояния (поликристаллизация) мембран приводит к повышению

их проницаемости для моновалентных ионов (Na^+ , K^+), несущих на себе гидратационные рубашки. Их энергозависимый выход из клетки в среду (градиентная диффузия) является причиной дегидратации клетки. Другой механизм обезвоживания протопласта обусловлен образованием микроспор при поликристаллизации липидной стромы мембран, обеспечивающих диффузию воды. Поликристаллизация мембран вызывает изменение активности мембранных ферментов [125, 126].

За счет снижения жидкостности мембран ингибируются их энергодающие, транспортные и другие функции, с этим сопряжены синтетические процессы в клетке, а также активность в мембранах деполимераз и автолизиннов, что обеспечивает структурную сохранность клеточных оболочек анабиотических форм.

Ингибирование каталитической активности цитоплазматических ферментов изначально обусловлено дегидратацией клеток и изменением ионного гомеостаза протопласта покоящихся форм (снижение концентрации Na^+ , K^+ , повышение концентрации Ca^{2+} , Mg^{2+}). Однако существует другая, не менее важная причина метаболической инактивации клетки [126, 127].

Факторы d_1 представляют собой смесь гомологов и изомеров. В экспериментальных исследованиях, проведенных в ИнМи РАН, в качестве химического аналога фактора d_1 использовались C_7 -АОБ и C_{12} -АОБ.

В результате проведенной работы были сделаны выводы, что АОБ являются структурными модификаторами не только липидной стромы мембран, но и макромолекул ферментов, т.е. обладают функциями естественных химических шаперонов. Предполагают, что комплексообразование АОБ с молекулами ферментов может происходить за счет образования межмолекулярных водородных связей, гидрофобных и ионных взаимодействий, однако, вышеуказанные механизмы требуют физико-химического подтверждения.

Следствием взаимодействия ферментов с АОБ является модификация пространственной структуры организации ферментов, которая приводит к изменению каталитической активности и стабилизации макромолекул – повышению их устойчивости к неблагоприятным или повреждающим внешним воздействиям (температура, pH, облучение и т.п.) [128].

Следует отметить, что на характер комплексообразования факторов d_1 с макромолекулами будут оказывать влияние физико-химические параметры среды, а также степень гидрофобности молекул АОБ, различающихся по этому признаку.

Эффект стабилизации был продемонстрирован в опытах *in vitro* с рибонуклеазой *Bacillus intermedius* и химотрипсином. Было установлено, что стабилизация ферментов, определяемая по степени их устойчивости к физическим (фотоокисление, температура) и химическим (pH) воздействиям зависит от концентрации АОБ и времени предъинкубации до воздействия,

требуемого для «созревания» модифицированной структуры белка в комплекс АОБ. Факторы d_1 могут играть роль естественных химических шаперонов, принимая в блокировании метаболизма в анабиотической (гипометаболической) клетке путем образования каталитически неактивных и термостабильных комплексов с ферментами [130].

Факторы d_1 , будучи производными фенольных соединений, обладают выраженной антиоксидантной активностью. В условиях анабиоза, когда ферментативная антирадикальная защита клеток не работает, АОБ являются единственным фактором, препятствующим окислительному разрушению липидов мембраны (образование гидроперекисей) [121, 123, 127, 129].

Фармакологические шапероны. Фармакологические шапероны по своим функциям и механизму действия близки к химическим и даже молекулярным, поскольку также содействуют сворачиванию белковых молекул, повышению их активности, возобновлению функционирования мутантных белков [130]. Однако в случае использования, например, химических шаперонов для достижения требуемого эффекта требуются высокие концентрации шаперона, которые могут оказаться токсичными как в случае применения их *in vivo*, так и при использовании полученных с их помощью БАВ. Фармакологические шапероны активно работают при концентрациях в 100 – 1000 раз ниже, что позволяет снизить эффект токсичности [131]. Примером фармакологических шаперонов может служить изофагомин (IFG) – иминосахарид, который способен связываться с соответствующими сайтами мутантной формы кислой β -галактозидазы (N370S), увеличивая фолдинг, транспорт и активность данного фермента. [132]. Другим примером является β -N-ацетилгексозоаминидаза, которая связывается с мутантной формой β -гексозоаминазой А, облегчая тем самым транспорт мутантного белка из эндоплазматического ретикулума, в результате уровень и концентрация его в лизосомах повышаются в 3 – 6 раз [133].

Влияния стабилизирующих факторов на белковые молекулы на количественном и качественном уровне. Большинство сведений, приводимых в литературе по количественной оценке взаимодействия белков со стабилизаторами, связаны с количественной оценкой процесса денатурации белков.

Известно, что тепловая денатурация белков часто сопровождается агрегацией денатурированных молекул [134, 135], что осложняет изучение денатурации с использованием спектральных, гидродинамических и калориметрических методов. Разворачивание белковой молекулы приводит к экспонированию гидрофобных остатков и движущей силой агрегации являются гидрофобные взаимодействия между развернутыми белковыми молекулами [136–138]. Известно также, что скорость тепловой агрегации белков (v_{agg}) сильно зависит от ионной силы раствора (μ), причем величина

v_{agg} растет с увеличением μ [139–143]. Эти данные указывают на важную роль электростатических взаимодействий в агрегации денатурированных белковых молекул.

Под агрегацией понимают взаимодействие развернутых белковых молекул, которое приводит к образованию агломератов произвольной формы вследствие «ошибочных» межбелковых взаимодействий [144].

Форма кинетической кривой может быть охарактеризована порядком реакции по веществу, изменение концентрации которого регистрируется во времени. Поскольку белковые агрегаты обладают повышенной способностью рассеивать падающий свет по сравнению с исходными белковыми молекулами, за кинетикой агрегации было предложено следить по величине кажущегося поглощения $A = \lg(I/I_0)$ или интенсивности светорассеяния раствора белка в видимой области спектра. Такой метод исследования кинетики агрегации белков основан на том, что кажущееся поглощение (или интенсивность светорассеяния) пропорциональна количеству белка в агрегированной форме. Можно ожидать, что строгая пропорциональность между величиной поглощения и количеством агрегированного белка существует во временной области, где протекает рост уже сформировавшихся агрегатов белка. Косвенным подтверждением такого предположения могут служить результаты взаимодействия гликогенфосфоорилазы В из скелетных мышц кролика с гликогеном с использованием турбидиметрического метода [145].

Проведенный анализ кинетических кривых тепловой агрегации белков показал, что в большинстве случаев завершающая фаза агрегации (т.е. участок кинетической кривой после прохождения точки перегиба) следует кинетике первого порядка, что может быть выражено уравнением:

$$A = A_0 + (A_{lim} - A_0) [1 - e^{-k_1\tau}] \quad (25.1)$$

где: A – величина кажущегося поглощения, A_{lim} , A_0 – предельное значение кажущегося поглощения и его начальное значение соответственно, k_1 – константа скорости агрегации, τ – время агрегации.

Первое упоминание о применимости этого уравнения для описания кинетики агрегации белков содержится в работе Кнаппика и Плуктхуна [144].

В дальнейшем данная гипотеза была проверена на многих белках. В обзоре [147–149] показано, что во многих случаях агрегация белков, вызываемая воздействием тепла, денатурирующих агентов (Gu HCl, мочевины, органических растворителей), подкислением раствора или сопровождающая рефолдинг белка, предварительно денатурированного Gu HCl или мочевиной, следует на завершающем этапе кинетике первого порядка. Исследования кинетики тепловой агрегации белков в широком интервале концентраций белка с одновременным контролем скорости денатурации бел-

ковой молекулы позволили сформулировать механизм агрегации белков, основными стадиями которого являются стадия науклеации и стадия роста агрегата. Сопоставление процесса агрегации белков с химическими цепными реакциями показало, что агрегация (на стадии роста агрегата) может рассматриваться как неразветвленная цепная реакция. Для каждой кинетической кривой агрегации на завершающем этапе процесса могут быть рассчитаны предельное значение кажущегося поглощения A_{lim} (или интенсивности светорассеяния I_{lim}) и константа скорости реакции первого порядка k_1 .

В тех случаях, когда агрегация белкового субстрата следует кинетике реакции первого порядка, параметры A_{lim} или I_{lim} , k_1 и τ_0 могут быть использованы для количественной оценки эффективности действия шаперона в тест-системах, основанных на подавлении агрегации белка. Наиболее подробно изучена шаперонная активность С-концевого домена регулируемого глюкозой белка (glucose – regulated protein, grp-94) – гликопротеина с молекулярной массой 94 кД, обладающего множественными центрами связывания Ca^{2+} . Молекулярная масса С-концевого домена grp-94 (grp-94-СТ), измеренная в присутствии 1 мМ дитиотреитола, составляет 36 кД. В отсутствие восстановительных агентов grp-94-СТ существует как димер. Шаперонная активность grp-94-СТ была изучена Итатре с соавторами [150] в тест-системе, основанной на подавлении агрегации каталитической субъединицы протеинкиназы СК2 (СК2 α) при 40°C. Для всех кинетических кривых, полученных в присутствии grp-94-СТ, завершающая фаза процесса следовала кинетике первого порядка. Экспериментальная кривая, полученная в отсутствие grp-94-СТ, описана уравнением:

$$I = I_{lim} (1 - e^{-k_1(\tau - \tau_0)}) \quad (25.2)$$

при следующих значениях параметров: $I_{lim} = 8,3 \pm 0,1$; $k_1 = 0,100 \pm 0,005 \text{ мин}^{-1}$ и $\tau_0 = 4,0 \pm 0,4 \text{ мин}$.

Итатре было установлено, что шаперон grp-94-СТ не влияет на скорость инактивации СК2 α . Проведенный анализ кривой инактивации показал, что экспериментальные данные удовлетворительно описываются экспоненциальным уравнением вида:

$$v/v_0 = (v/v_0)_{lim} + (1 - (v/v_0)_{lim})e^{-k_1\tau} \quad (25.3)$$

где: v – скорость ферментативной реакции, v_0 – значение v при $\tau \rightarrow \infty$. Значения параметров были найдены равными: $(v/v_0)_{lim} = 0,144 \pm 0,014$, $k_1 = 0,080 \pm 0,005 \text{ мин}^{-1}$.

Тот факт, что величина $(v/v_0)_{lim}$ отличается от нуля, может означать наличие в препарате фермента фракции, обладающей относительно высокой термостабильностью.

Полученное значение константы скорости инактивации близко к значению константы скорости первого порядка, рассчитанной для завершающей фазы агрегации СК2 α ($k_1 = 0,100 \text{ мин}^{-1}$). Ситуация, когда денатурация белка, прослеженная по потере ферментативной активности, и агрегация белка в завершающей фазе следуют кинетике реакции первого порядка и соответствующие константы скорости совпадают, означает, что стадией, лимитирующей скорость агрегации, является стадия разворачивания белковой молекулы. Иначе говоря, в этих условиях скорость стадии агрегации намного превышает скорость стадии денатурации белковой молекулы.

Снижение величины I_{lim} в присутствии шаперона обусловлено связыванием денатурированного белка шапероном. Денатурированный белок в связанном состоянии исключается из процессов агрегации. Таким образом, величина I_{lim} пропорциональна количеству белка, участвующего в агрегации.

Если принять, что связывание денатурированного белка шапероном является достаточно прочным, то из зависимости I_{lim} от концентрации шаперона можно оценить стехиометрию комплексообразования шаперона с денатурированным белком. Было установлено, что полное подавление агрегации наблюдается при отношении grp-94-СТ/ СК2 α , равном $4,3 \pm 0,2$. Это означает, что комплекс шаперона с денатурированной каталитической субъединицей протеинкиназы содержит одну молекулу денатурированного белка и 4 молекулы grp-94-СТ.

Определение стехиометрии комплекса шаперона с денатурированным белком вышеуказанным способом можно считать надежным, если зависимости I_{lim} от концентрации шаперона, построенные для различных фиксированных концентраций белкового субстрата, дают одну и ту же величину для стехиометрии комплекса.

Было установлено, что величина константы k_1 при увеличении соотношения grp-94-СТ/ СК2 α до 2:1 меняется незначительно. Дальнейшее увеличение соотношения grp-94-СТ/ СК2 α приводит к снижению константы скорости k_1 . Подобный характер зависимости авторами [149] был интерпретирован следующим образом. Начальная концентрация белкового субстрата соответствовала кинетическому режиму, при котором скорость – лимитирующей стадией агрегации является стадия разворачивания белковой молекулы. Поскольку в этом кинетическом режиме варьирование концентрации белка в определенном интервале не сопровождается изменением константы скорости первого порядка, рассчитываемой из кинетической кривой агрегации, снижение концентрации белка, участвующего в агрегации, в результате связывания денатурированного белка шапероном не должно приводить к изменению величины k_1 . Подобная картина наблюдается при действии шаперона grp-94-СТ на агрегацию каталитической субъединицы протеиназы СК2 при малых соотношениях grp-94-СТ/ СК2 α .

Снижение величины k_1 , обнаруживаемое при $[\text{grp-94-CT/СК}2\alpha] = 4$, связано, скорее всего, с убылью концентрации белка, участвующего в процессе агрегации.

Понижение концентрации белка приводит к переходу процесса агрегации в кинетический режим, при котором константа k_1 линейно снижается по мере снижения начальной концентрации белка.

Что касается параметра τ_0 , при варьировании концентрации grp-94-CT, то при соотношениях $[\text{grp-94-CT/СК}2\alpha]$ равных 1:1, 2:1 и 4:1, величина τ_0 составляет 3,1; 6,4 и 6,0 мин. Таким образом, наблюдается рост величины τ_0 по мере повышения концентрации шаперона.

Влияние шаперона на агрегацию белкового субстрата выражается в изменении параметров A_{lim} (или I_{lim}) и k_1 , каждый из которых не является прямой характеристикой скорости агрегации. Для того, чтобы описать влияние шаперона на скорость агрегации необходимо построить график в координатах $k_1 A_{lim} - [\text{шаперон}]$ или, соответственно, $k_1 I_{lim} - [\text{шаперон}]$, поскольку, как отмечалось выше, именно произведение параметров $k_1 A_{lim}$ или $k_1 I_{lim}$ пригодно для характеристики скорости агрегации.

Представляют интерес экспериментальные данные по действию шаперонов на агрегацию белков такого рода, когда уже малые добавки шаперона вызывают снижение константы скорости первого порядка k_1 . Анализ результатов работы [150], в которой изучалось воздействие белка теплового шока Hsp 18.1 из гороха *Pisum sativum* на тепловую агрегацию малатдегидрогеназы из митохондрий сердца свиньи, свидетельствует о том, что в данном случае реализуется именно такая ситуация. Все кинетические кривые в завершающей стадии процесса следуют кинетике первого порядка. Для контрольной кривой, полученной в отсутствие Hsp 18.1, получены следующие значения кинетических параметров: $\Delta A_{lim} = 0,53 \pm 0,01$; $k_1 = 0,091 \pm 0,087 \text{ мин}^{-1}$ и $\tau_0 = 12,8 \pm 0,3 \text{ мин}$. Независимыми опытами с использованием метода гель-проникающей хроматографии было показано, что додекамер Hsp 18.1 связывает 12 мономеров денатурированной малатдегидрогеназы. В экспериментах по агрегации авторы [151] использовали малатдегидрогеназу в концентрации 600 нМ в расчете на мономер. Исходя из установленной стехиометрии комплекса, можно рассчитать концентрацию Hsp 18.1, при которой происходит полное связывание денатурированной малатдегидрогеназы. Эта концентрация составляет 50 нМ.

Другим примером тест-системы, в которой добавление шаперона уже в минимальных количествах приводит к снижению параметра k_1 , является цитратсинтетаза из митохондрий сердца свиньи. Такая картина наблюдается при испытании шаперонной активности Hsp 16.3 из *Mycobacterium tuberculosis* [152], иммунофилина FKBP532 [153] и Hsp 26 из *Saccharomyces cerevisiae* [154]. Подобный характер зависимости параметра k_1 от концентрации шаперона в области малых концентраций не удивителен, если учесть, что для цитратсинтетазы в подавляющем числе случаев выполняет-

ся соотношение $k_1^{\text{agg}} < k_1^{\text{inact}}$, можно ожидать, что параметр k_1 будет оставаться неизменным при добавлении малых количеств шаперона.

Что касается АОБ, которые как отмечалось выше, обладают функциями химических шаперонов, в литературе практически отсутствуют данные по исследованию кинетики их взаимодействия с ферментами. Имеющиеся сведения касаются, главным образом, исследования результатов взаимодействия АОБ с высокомолекулярными соединениями, а также некоторых физико-химических показателей таких взаимодействий.

Так, в работе [155] исследовано влияние C_7 – АОБ и парагидроксиэтилфенола (тирозола) – химических аналогов микробных ауторегуляторов анабиоза – на сохранение жизнеспособности дрожжевыми клетками в условиях окислительного стресса разной природы. Стресс вызывали воздействием активных форм кислорода (АФК), образующихся при γ -облучении клеточных суспензий дозами 10 – 150 кРад, интенсивностью 194 Рад/с, или синглентного кислорода, который генерировался в клетках, фотосенсибилизированных хлорином I_6 (10 мкг/л). Обнаружено, что C_7 -АОБ оказывает протекторный эффект, защищая дрожжевые клетки от γ -радиации (50 кРад) в вариантах с превентивным его внесением в клеточные суспензии за 30 мин до облучения в диапазоне концентраций 0,05 – 0,16 %. Защитное действие C_7 -АОБ выражалось как в поддержании жизнеспособности клеток при облучении, так и в восстановлении их пролиферативной способности после облучения. В экспериментах с фотодинамической инактивацией клеток впервые обнаружено защитное действие антиоксиданта фенольной природы C_7 - АОБ от интегрируемого в клетках синглентного кислорода. Анализ разностных спектров поглощения окисленных производных C_7 – АОБ показывает, что защитный механизм действия C_7 – АОБ заключается в перехвате генерируемых при окислительном стрессе АФК. Отсутствие фотозащитных функций у тирозола свидетельствует о том, что антиоксидантные свойства микробных АОБ и их шаперонные функции не связаны. Полученные в работе результаты позволяют расширить спектр антиоксидантных и стрессопротекторных свойств фенольных соединений.

Авторами [156] исследовано взаимодействие ионов и стабильных наноразмерных кластеров серебра, синтезированных радиационно-химическим методом в обратных мицеллах, в широком диапазоне концентраций с дрожжевыми клетками *Candida utilis* и *Saccharomyces cerevisiae* – продуцентами микробных ауторегуляторов АОБ. Установлено, что биоцидный эффект кластеров серебра превосходит действие ионов серебра. Показано, что ионы серебра не влияют на рост дрожжевых клеток, в то время как наночастицы угнетают процесс ферментации.

С использованием методов импульсивного радиолиза и ВЭЖХ в работе [157] исследованы водные аэрированные растворы 3,5-дигидрокситолуола (C_7), облученные импульсами ускоренных электронов

в темноте или при действии светового потока. Проведено сравнение действий двух источников частиц высоких энергий: γ -квантов и ускоренных электронов. Экспериментально доказан сложный механизм инициированных ионизирующим излучением окислительно-восстановительных реакций, протекающих в водных растворах S_7 и приводящих к образованию низкомолекулярных и длинноцепочечных продуктов окисления. Зарегистрированы промежуточные продукты радиоактивного окисления S_7 , поглощающие в спектральном диапазоне 250 – 420 нм со временем жизни более одной миллисекунды.

Было установлено, что молекулярные механизмы взаимодействия АОБ связаны с их способностью образовывать межмолекулярные водородные связи и вступать в гидрофобные взаимодействия с мембранными фосфолипидами и макромолекулами белков [158].

В работах [159] и [160] исследовано взаимодействие ДНК с синтетическими аналогами микробных ауторегуляторных d_1 -факторов, различающихся химическим строением и биологической активностью, а также анализ возможных последствий подобного взаимодействия. Основные экспериментальные результаты в данных работах получены при изучении свойств растворов и пленок высокомолекулярной ДНК из молок лосося, *Hind* III-рестриктов ДНК фага λ и плазмидной ДНК рис 19 в присутствии химических аналогов микробных ауторегуляторов: метилрезорцина (МР), гексилрезорцина (ГР) и тирозола (Т).

Исследование спектров поглощения ДНК в присутствии АОБ и сравнение их с математической суммой спектров ДНК и АОБ показало уменьшение интенсивности полосы поглощения, возрастающее по мере увеличения концентрации АОБ, длины алкильного радикала и времени предынкубации с ДНК и свидетельствующее об образовании между молекулами водородных связей. Изучение флуоресцентных характеристик АОБ в присутствии ДНК с увеличением времени их предынкубации позволило установить изменения, которые сводились к постепенному сдвигу максимума флуоресценции АОБ в коротковолновую область спектра с одновременным увеличением интенсивности люминесценции. Такие изменения в спектрах люминесценции традиционно связываются с уменьшением полярности «ячейки», в которой находится флуорофор, и были интерпретированы как свидетельство ориентации АОБ вокруг молекул ДНК с изоляцией их гидрофобных алкильных радикалов от водного окружения как это имеет место при мицеллообразовании.

Методом контактной атомно-силовой микроскопии были установлены последовательные этапы формирования мицеллоподобных надмолекулярных структур на обособленных нитях ДНК, а в дальнейшем «слипание» макромолекул ДНК в местах образования данных структур и объединение в кабельные структуры, окруженные единым «гексилрезорциновым» чехлом [161]. Эти данные объяснили известный факт, что в отличие от актив-

но растущих клеток экспоненциальной фазы роста, в цитоплазме которых нуклеотид распределен равномерно, в стационарных клетках он более компактен, и в нем обнаружены утолщенные фибриллы ДНК, окруженные неэлектронноплотным веществом [159].

С использованием метода ген-спектроскопии было проанализировано конформационное состояние ДНК при комплексообразовании с АОБ. При этом в условиях уменьшения относительной влажности МР замедлял, а ГР и ТР – ускоряли В → А переход, что согласуется с представлениями о том, что в вегетативных клетках ДНК находится в В-форме, а в покоящихся клетках имеет А – форму [160].

При спектрофотометрическом исследовании процессов термической денатурации ДНК в присутствии АОБ общей тенденцией являлся сдвиг кривых плавления в сторону высоких температур, что хорошо согласуется с ранее полученными данными о высокой резистентности цистоподобных покоящихся форм микроорганизмов, образование которых инициируется возрастанием уровня АОБ.

При изучении воздействия УФ-облучения длиной волны 254 нм на линейные и кольцевые молекулы ДНК в присутствии d₁-факторов, регистрируемого по изменению картины электрофоретической подвижности, показан защитный эффект АОБ, зависящий как от их химической структуры (меньший у МР и больший у ТР), так и от использования концентрации. Возможным механизмом данного эффекта может быть переход ДНК в более устойчивую А-форму в присутствии АОБ.

Установлен факт длительного сохранения физико-химических свойств полимерных молекул ДНК (относительной вязкости, электрофоретической подвижности), находящихся в водных растворах в присутствии АОБ и в наибольшей степени выраженный в присутствии ГР. Возможный механизм защитного действия АОБ в отношении ДНК заключается в предупреждении ее гидролиза путем изоляции от водного окружения [161].

В работах [162–165] для С₇-АОБ и С₁₂-АОБ, отличающихся длиной углеводородного радикала установлена способность изменять конформацию ферментов, обуславливая сопряженные изменения каталитической активности и стабильности белков, что выражается в повышении их термо- и рН-устойчивости и расширении рН и температурного оптимумов. Данный эффект от применения АОБ был успешно апробирован для гидролиза таких промышленных субстратов, как крахмал, казеин, углеводные полимеры солода. В той же работе методами физической химии и молекулярно-динамического компьютерного моделирования на примере лизоцима установлены изменения внутримолекулярной динамики ферментов, модифицированных АОБ и предложена предварительная модель взаимодействия АОБ с ферментами.

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что в настоящее время в литературе практически отсутствуют данные по кинети-

ческому описанию процессов ферментолиза с участием АОБ, а также данные по характеристике химических связей между АОБ и ферментами. Кроме того, недостаточно изучены вопросы повышения эффективности процессов гидролиза промышленных субстратов техническими ФП путем использования природных интенсификаторов, в частности АОБ.

Следует также отметить, что для получения ферментативных гидролизатов на основе сырья микробного, животного и растительного происхождения большинство исследователей предлагает уникальные подходы, применимые только для конкретного вида сырья. Поэтому представляется актуальным выработать единую концепцию получения ферментативных гидролизатов из различных видов сырья, предложить единые пути повышения эффективности данных процессов и разработать единые кинетические схемы, которые могли бы послужить основой для разработки алгоритмов управления такими процессами.

Список литературы

1. Hirokawa K., Kajiyama N., Murakami S. Improved practical usefulness of firefly luciferase by gene chimerization and random mutagenesis. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2002. – V. 1597. – P. 271 – 279.
2. Kabshima T., Li Y., Kanada N., Ito K., Yoshimoto T. Enhancement of the thermal stability of pyroglutamyl peptidase I by introduction of an intersubunit disulfide bond. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – V. 1547. – P. 214 – 220.
3. Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. / М.: Мир. – 1982. – 354 с.
4. Наградова Н.Г.К., Муронец В.И. Мультидоменная организация ферментов. // *Итоги науки и техники. – Серия Биологическая химия.* – 1991. – Т.38. – С.162.
5. Ptytsin O.V. In protein folding. // *Creighton.* – 1992. – P. 243 – 300.
6. Котова Н.В., Семисотнов Г.В. // *Успехи биол. химии.* – 1998. – Т.38. – С. 199 – 223.
7. Курочкина Л.П., Месянжинов В.В. // *Успехи биол. химии.* – 1996. – С. 49 -86.
8. Akiyoshi K., Sasaki Y., Sunamoto J. // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – V. 10. – P. 321 – 324.
9. Bukau B., Deuerling E., Pfund C., Craig E.A. // *Cell.* – 2000. – V. 101. – P.119 – 122.
10. Csermely P. // *News Physiol. Sci.* – 2001. – V. 16. – P. 123 – 126.
11. Demchenko A.P. // *Comments mol. Cel. Biophys.* – 1999. – V. 9 – P. 219 – 260.
12. Demchenko A.P. // *J. Mol. Recognition.* – 2001. – V. 14. – P. 42 – 61.
13. Ellis R.I. // *Folding Des.* – 1996. – V. 1 – P. R9 – R16.
14. Ellis R.I., Hartl F.U. Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function // *FASEB J.* – 1996. – V. 10. – P. 20 – 26.
15. Fink A.L. Chaperone-Mediated Protein Folding // *Physiol. Reviews.* – 1999. – V. 79. – P. 425 – 449.
16. Fink A.L., Goto Y., eds. *Molecular Chaperones in the Life Cycle of proteins.* – N.Y.: Marcel Dekker. Inc., 1998.
17. Frydman J. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2001. – V. 70. – P. 603 – 647.
18. Hardstey B., Kramer G. / *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – V. 66. – P. 41 – 66.
19. Hartl F.U. // *Nature.* – 1996. – V. 381. – P. 571 – 579.
20. Lund P.A. // *Adv. Mycrob. Physiol.* – 2001. – V. 44. – P. 93 – 140.

21. Martin I., Hartl F.U. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1997. – V. 7. – P. 41 – 52.
22. Morimoto R.J., Tissieres A., Georgopoulos C., eds. *Progress Perspectives on the Biology of Heat shock Proteins Molecular Chaperones.* –N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1994.
23. Muller M., Koch H. G., Beck K., Schafer U. // *Prog. Nucleic Acid res. / Mol. Biol.* – 2001. – V. 66. – P. 107 – 157.
24. Ruddon R.W., Bedows E. Assisted Protein Folding // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 3125 – 3128.
25. Freeman B.C., Morimoto R.I. // *EMBO J.* – 1996. – V. 15. – P. 2969 – Santhoshkumar P., Sharma K.K. Phe71 Is Essential for Chaperone-like Function in α A-crystallin // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 47094 – 47099.
26. Thirumalai D., Lorimer G.N. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2001. – V. 30. – P. 245 – 269.
27. Buchner J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones // *FASEB J.* – 1996. – V. 10. – P. 10 – 19.
28. Freeman B.C., Toft D.O., Morimoto R.I. Molecular Chaperone Machines: Chaperone Activities of the Cyclophilin Cyp-40 and the Steroid Aporeceptor-Associated Protein p23 // *Science.* – 1996. – Vol. 274. – P. 1718 – 1720.
29. Hwang D.S., Crooke E., Kornberg A. Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein // *J. Biol. Chem.* – 1990. – V. 265. – P. 1244 – 19248.
30. Jakob U., Buchner J. // *Trends Biochem. Sci.* – 1994. – V. 19. – P. 205 – 211.
31. Jaenicke R. // *Current Topics in cellular Regulation.* – N.Y.: Academic Press., 1997. – V. 34. – P. 209 – 314.
32. Skowrya D., Georgopoulos C., Zylicz M. // *Cell.* – 1990. – V. 62. – P. 939 – 944.
33. Zuemienowicz A., Skowrsa D., Zeilstra-Ryalls I., Fayet O., Georgopoulos C., Zylicz M. // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 25425 – 25431.
34. Иванкин А.Н. Кузнецова Т.Г. В Кн. «Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК / Под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – М: ВНИИПБТ, 2006. – С. 269 – 275.
35. Hartl F.- U. Hlodan R., Langer T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situation. // *Trends in Bioch. Sci.* – 1994. – V.19. – P. 20 – 25.
36. Aggaraberes F., Dice J. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. // *Journal of Cell science.* – 2001. – V. 114. – P. 2491–2499.
37. Aggaraberes F., Dice J. Protein translocation across membranes. // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2001. – V. 1513. – P. 1 – 24.
38. Aggaraberes F., Terlecky S., Dice J. Requirement for an introlsosomal hsc 73 for a selective pathway of lysosomal proteolysis. // *Journal of Cell Biology.* – 1997. – V. 137. – P. 825 – 834.
39. Alberti S., Esser C., Hohfeld J. BAG-1: A nucleotide exchange factor of hsc 70 with multiple cellular functions. // *Cell stress and chaperones.* – 2003. – P. 225–231.
40. Backer J., Dice J. Covalent linkage of ribonuclease-S-peptide to microinjected proteins causes theirs intracellular degradation to be enhanced by serum with drawal. // *Proceeding of the Natural Academy of the USA.* – 1986. – V.83. – P. 5830–5834.
41. Backer J., Bourret C., Dice J. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino terminal twenty aminoacids. // *Proceeding of the national Academy of Sciences of the USA.* – 1983. – V. 80. – P. 2160–2170.
42. Ballinger C., Connell P., Wu Y., Hu Z., Thomson L., Yin L., Patterson C. Identification o CHIP. // *Molecular and cellular Biology.* – 2002. – V.19. – P. 4535 –4545.

43. Brown C., Mccann J., Chiang H. The heat shock protein SSA 2p is required for import of fructose-1,6-biphosphate into VZD vesicles. // *Journal of Cell biology.* – 2000. – V. 150. – P. 65 – 76.
44. Chen X., Schnell D. Protein import into chloroplasts. // *Trends in Cell biology.* – V. 9. – 1999. – P. 222–227.
45. Chiang H., Dice J. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. // *Journal of Biological chemistry.* – 1988. - V. 262. – P. 6797-6805.
46. Chirico W., Waters M. and Blobel G. 70 K heat shock related ptoeins stimulate protein translocation into microsomes. // *Nature.* –1988. – V. 332. – P. 805–810.
47. Ciehanover A., Schwarts A. Ubiquintion-meduated degradation of cellular protein in health and disease. // *Hepathology.* – 2002. – P. 3 – 6.
48. Coux O. The 26 S proteasome. // *Progress in molecular and submolecular Biology.* – 2002. – V. 29. – P. 85–107.
49. Cuervo A., Dice J. A receptor for selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. – 1996. – V. 273. – P. 501–503.
50. Cuervo A., Dice J. Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, proteases. // *Journal of Molecular Medicine.* – 1998. – V. 76. – P. 6–12.
51. Cuervo A., Dice J. Age-related decline in chaperone – mediated autophagy.// *Journal of biological chemistry.* – 2000. – V. 275. –P. 31505–31513.
52. Cuervo A., Dice J. Regulation of lamp 2a levels in the lysosomal membrane.// *Traffic.* – 2000. – V. 1. – P. 570–583.
53. Cuervo A., Dice J. Unique properties of lamp2 compared to other lamp2 isoforms. // *Journal of Cell Science.* – 2000. – V.113. – P. 4441–4450.
54. Cuervo A., Dice J., Knecht E. A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of isotonic proteins. // *Journal of Biological Chemistry.* – 1997. – V. 272. – P. 5606–5615.
55. Cuervo A., Dice J., Knecht E. Selective degradation of annexins by chaperone-mediated autophagy. // *Journal of Biological chemistry.* – 2000. – V. 275. – P. 33329–33335.
56. Cuervo A., Hildebrand H., Bomhard E., Dice J. Direct-lysosomal uptake of alpha-2-microglobulin contributes the chemicallyinduced nephropathy. // *Kidney International.* – 1999. – V.55. – P. 529–545.
57. Cuervo A., Hu W., Lim B., Dice J. IKB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. // *Molecular Biology of the Cell.* – 1998. – V. 9. – P. 1995–2010.
58. Cuervo A., Knecht E., Terlecky S., Dice J. Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. // *American Journal of Physiology.* – 1995. – V. 269. – P. – C1200 – C 1208.
59. Cuervo A., Mann L., Bontenn E., d’Azzo A., Dice J. Cathepsin A regulated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. // *EMBO Journal.* – 2003. – V. 22. – P. 47–59.
60. Cuervo A., Terlecky S., Dice J., Knecht E. Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. // *Journal of Biological chemistry.* – 1994. – V. 269. – P. 26374–26380.
61. Deshails R., Koch B., Werner-Washbucne m., Craig E., Senekman R., 70 kDa stress protein homologues facilitate translocation of secretory and mitochondrial precursor polipeptides. // *Nature.* – 1988. – V. 332. – P. 800–805.
62. Dice J. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal protolysis. // *Trends in biochemical Sciences.* – 1990. – V.15. – P. 305–309.
63. Dice J., Lysosomal pathways of protein degradation. // *Austin: Landes Bioscience.* – 2000. – P.108.

64. Dice J., Chiang H-L, Spenser E., Bacer J. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A: identification of residues 7-11 as essential pentapeptide. // *Journal of biological chemistry*. – 1986. – V.262. – P. 6853–6859.
65. Franch H., Soopart S., Du J., Brown N. A mechanism regulating proteolysis of specific proteins during renal tubular cell growth. // *Journal of Biological chemistry*. – 2001. – 276. – P. 19126–19131.
66. Gough N., Hotem C., Fambrough D. The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of mammalian homologs of avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2 b and LAMP-2 c. // *DNA Cell Biology*. – 1995. – V. 14. – P. 863–867.
67. Hightower I., Leung S. Mammalian Hsc 70 and Hsp 70. In M.J. Gething *Handbook to molecular chaperones and protein-folding catalysis*. – London: Oxford University Press, 2007. – P. 53–58.
68. Holttzman E. *Lysosomes*. – N. Y.: Plenum Press, 2003. – P. 439.
69. Kim J., Klionsky D. J. Autophagy, cytoplasm – to-vacuole targeting pathway in yeast and mammalian cells. // *Annual Rev. of Biochemistry*. – 2000. – V. 69. – P. 303–342.
70. Klionsky D., Emr. S. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. // *Science*. – 2000. – V. 290. – P. 1717–1721.
71. Lill R., Newport W. Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. // *Trends in Cell Biology*. – 1996. – № 6. – P.56–61.
72. Milani V., Noessner E., Glose S., Kuppner M., Ahrens B., Scharner A., Gasspar R., Isseles R. Heat shock protein 70: Role in antigen presentation and immune stimulation. // *International Journal of Hyperthermia*. – 2002. – V.18. – P. 563–575.
73. Mizushima N., Noda T., Yoshimori T., Tanaka Y., Ishii T., George M., Klionsky D., Ohsumi Y. A protein conjugation system essential for autophagy. // *Nature*. – 1998. – V. 395. – P. 395–398.
74. Mizushima N., Ohsumi Y. and Yoshimori T. Auto phagosome formation in mammalian cells. // *Cell Structure Function*. – 2002. – P. 421–429.
75. Mortimone G., Poso A., Lardeux B. Mechanism and regulation of protein degradation in liver. // *Diabetes Metabolism Review*. – 2006. – № 5. – P. 49–70.
76. Neff N., Bourret L., Miao P., Dice J. Degradation of proteins microinjected into JMR-90 human diploid fibroblasts. // *J. of cell Biology*. – 1981. – V. 91. – P. 184–194.
77. Newmyer S., Christensen A., Sever S. Auxilin-dynamain interactions link the uncoating ATPase chaperone machinery with vesicle formation. // *Developmental Cell*. – 2003. – V.4. – P. 929–940.
78. Noda T., Suzuki K., Ohsumi Y. Yeast autophagosomes: De novo formation of a membrane structure. // *Trends Cell Biology*. – 2002. – № 12. – P. 231–235.
79. Ohsumi Y. Molecular digestion of autophagy: Two ubiquitinlike systems. // *Natural Review of Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – № 2. – P. 211–216.
80. // *Natural Review of Molecular and Cellular Biology*. – 2001. – № 2. – P. 211–216.
81. Panaretou B., Siligarioli G., Meyer P., Maloney A., Silivan J., Singh S., Millson J. et. al. Activation of the ATPase activity of hsp 90 by stress-regulated cochaperone hsc 70. // *Molecular Cell*. – 2002. – № 10. – P. 1307 – 1318.
82. Roberts P., Moshitch S., Kvam E., O'Toolro, Winey M., Goldfarb D.S. Piecemeal microautophagy of the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Molecular Biology of the Cell*. – 2003. – V. 14. – P. 129–141.
83. М.Д. Тер-Аванесян, В.В. Кушниров. Прионы: инфекционные белки с генетическими свойствами. // *Биохимия*. – 1999. – Т. 64. – N 12. – С. 1638–1647.
84. Kohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M., Fletterick RJ, Prusiner SB. Structural clues to prion replication. // *Science*. – 1994. - Apr. 22. – V. 264 (5158). – P. 530–531.

85. Jarret J. T., Lansbury Pt. Seeding “one dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie. // *Cell*. – 1993. – V. 73. – N6. – P. 1055–10588.
86. Caughey B., Kocisko D.A, Raymond GJ, Lansbury Pt. Agregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-resistant state. // *Chem. Biol.* – 1995. – V. 2. – N12. – P. 807–817.
87. Serio T.R., Cashikar A.G., Kowal A.S., Savicki G.J, Moslehi J.J., Seprell L., Arnsdorf M. F., Lindquist S.L. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by prion determinant. // *Science*. – 2000. – V. 289 (5483). – P. 1317–1321.
88. Dercatch I.L., Bradey M.E., Zhou P., Chernoff YO, Liebman SW. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [Psi⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Genetics*. – 1997. – V. 147. N 2. – P. 507–519.
89. Kochneva-Pervukhova N.V., Poznyakovsky A.I., Smirnov V. N., Ter-Avanesyan M.D. C-terminal truncation of a prion-based [Psi⁺] determinant in *Saccharomyces cerevisiae*. // *Curr. Genet.* – 1998. – V. 34. – N 2. – P. 146–151.
90. Massion D.C., Wikner R.B. Prion-inducing domain of yeast URE 2p and protease resistance of URE 2p in prion-containing cells. // *Science*. – 1995. – V. 270 (5233). – P. 93–95.
91. Chernoff Y.O., Derkach I.L., Inge-Vechtomov S.G. Multicopy SUP 35 gene induced de novo appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. // *Curr. Genet.* – 1993. – V. 24. – N 3. – P. 268–270.
92. М.Д. Тер-Аванесян, С.В. Паушкин, В.В. Кушниров, Н.В. Кочнева-Первухова. Молекулярные механизмы «белковой» наследственности: прионы дрожжей. // *Молекулярная биология*. – 1998. – Т. 32. – № 1. – С. 32–42.
93. Chernoff YO, Newman GP, Kumar J, Allen K., Zink AD. Evidence for a protein mutator in yeast: role of the HSP 70-related shaperone *ssb* in formation, stability and toxicity of the [Psi⁺] prion. // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – Dec. 19. – V. 12. – P. 8103–8112.
94. Chernoff YO, Linqvist SL, Ono B., Inge-Vechtomov SG. Role of the chaperone protein Hsp 104 in propagation of the yeast prion-like factor [Psi⁺]. // *Science*. – 1995. – V. 268 (5212). – P. 880–884.
95. Wickner RB [URE3] is an altered URE 2 protein for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Science*. – 1994. – V. 264. – P. 566–569.
96. Kochneva-Pervukhova NV, Paushkin SV, Kushnirov VV, Cox BS, Tuite MF, Ter-Avanesyan MD. Mechsnism of inhibition of [Psi⁺] prion determinant propagation by a mutation of the N-terminus of the yeast SUP 35 protein. // *EMBO J.* – 1998. – V. 17. – N19. – P. 5805–5810.
97. Wickner R.B., Chernoff YO. Prions of fungi: [URE3], [Psi⁺], [Het-s] discovered as heritable traits. // In S.B. Prusiner. *Prion biology and diseases*. – N.Y.: Cold spring Harbor laboratory Press, 1999. – P. 229–272.
98. Tzanov T., Andreus J., Guebitz G., Cavac-Paulo A. Protein interaction in enzymatic processes in textiles. // *Electron J. Biotechnol.* – 2003. – V. 36. – P. 1002 – 1005.
99. Volkin D.V., Klibanov A.M., A practical approach. In *Protein function* // Ed. Creighton T.E. – Oxford: IRL Press., 1989. – P. 1 – 24.
100. Klibanov A.M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? // *Trends Biotechnol.* – 1997. – V. 15. – P.97 – 101.
101. Andersson M.M., Hatti-Kaul R. Protein stabillizing effect of polyethyleneimine.// *J. Biotechnol.* – 1999. – V.72. – P.21 – 31.
102. Tombs M.P. Stability of enzymes. // *J. Apl. Biochem.* – 1985. – V. 11. – P. 306 – 312.

103. Barry K. Derham, John J. Hardling. α -Crystallin as molecular chaperone. // *Progress in Retinal and Eye Research*. – V. 18. – № 4. – 1999. – P. 463–509.
104. Matsumura T., Nafnamishi T., Jizya N., Janamoto T. Hydrolysis of protein by successive incubation with proteinase and aminopeptidase mixture. // *Agric. Biol. Chem.* – 1975. – V. 39. – № 2. – P. 379–386.
105. Yancey P.N., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D., Somego G.N. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems // *Science*. – 1982. – V. 217. – P. 1214 – 1222.
106. Walker J.E., Wonacott A. J., Harris J.I. Heat stability of tetrameric enzyme, D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. // *Eur. J. Biochem* – 1980. – V. 108. – P. 581–586.
107. Singer M.A., Lindquist S. Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. // *Mol. Cell*. – 198. – V.1. – P. 639 – 648.
108. Knapp S., Ladenstein R., Galinski E.A. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes β -hydroxyectoine and betain. // *Extremophiles*. – 1999. – V.3. – P. 191 – 198.
109. Cherain M., Deeslic W.D. Production of hydrolysate in ultrafiltration - enzyme reactors. // *Polym. Sci. Technol.* – 1980. – V. 3. – P. 591– 601.
110. Roosen J.P., Pilnic W. Enzymic protein hydrolysis on membrane reactors related to toyte properties. // *Enzyme Microb. Technol.* – 1979. – V.1. – № 2. – P. 122–124.
111. Fernandez-Vinas A., Arios J.M., Montoya E. Autolysis in *Mycococcus coraloides* O. // *FEMS microbial. Let.* – 1983. – V. 20. – № 1. – P. 97–101.
112. Wretling K.A. // *Patent fur bermanien*, – 1953. – N 875992. K30h 2/30.
113. Nelson D. Фармацевтическая композиция для лечения судорог. // *Пат. Великобритании*. – № 2175804. Оpubл. 10.12.86.
114. Scoirf U., Schlingmann M., Rymon L.W. Функциональный белковый гидролизат, способ его получения и получения продуктов питания, содержащих этот белковый гидролизат. // *Акц. заявка ФРГ*. – № 3143947. Оpubл. 11.05.83.
115. Kanegae Y., Sugiyama Y., Minami K. Дрожжевой экстракт, полученный нагреванием водной суспензии автолизом при щелочных рН. // *Пат. Японии № 258417*. Оpubл. 25.01.94.
116. Kollar R., Sturdik e., Sajbiolor Y., Sanolula Y., Hrmар S., Forshenoffer y. Fractionacia a vyzitie komponentov ptarskeho drosolia – *Bull. Potravin Wysk*. – 1989. – V. 28. – N 1-2. – P. 45–56.
117. Heijnoork J., Ledue M., Heijenoort Y., Kosra K., Frehel C. Autolysis of *E. coli*: induction and ontrol. Target penicillin: Murein Soc. culus Bact. Cell walls Archit. Grown. *Proc.Int. FEMS Symp.* – Berlin: New York, 1983. – P. 191–196.
118. Alvares R., Enroques A. Nucleic acid reduction in yeast – *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1989. – V. 29. – N 2–3. – P. 208–210.
119. Riemay K.-H., Wiese. Velanf unl been fusung der autolyse von *Hypovyces ochzaceus* m. 359, *Z. Allg. Microbiol.* – 1979. – B. 19. – N 4. – S. 269–278.
120. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Шмидт М.А., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Эль-Регистан Г.И. Роль бактериальных ауторегуляторов роста группы алкилоксибензолов в ответе стафилококков на стрессовые воздействия. // *Микробиология*. – 2002. – Т.71. – № 1. – С. 23–29.
121. Беспалов М.М., Колпаков А.И., Лойко Н.Г. Функции аутоиндукторов анабиоза микроорганизмов при создании метаболического блока в клетке. // *Микробиология*. – 2000. – Т. 69. – № 2. – С.217–223.
122. Эль-Регистан Г.И. Роль мембранных ауторегуляторных факторов в процессах роста и развития микроорганизмов. *Дисс... докт. биол. наук*. – М. – 1988.

123. Колпаков А.И. Стабилизация ферментов аутоиндукторами анабиоза как один из механизмов устойчивости покоящихся форм микроорганизмов. // Микробиология. – 2000. – № 1. – С. 224–230.
124. Степаненко И.Ю. Изучение роли алкилоксибензолов в стрессовом ответе микроорганизмов. // Автореф. дисс...канд. биол. наук. – М. – 2005.
125. Капрельянц А.С., Сулейменова М.К., Сорокина А.Д., Деборин Г.А., Эль-Регистан Г.И., Стоянович Ф.М., Лилле Ю.А. Структурно-функциональные изменения в бактериальных и модельных мембранах под действием фенольных липидов. // Биол. мембраны. – 1987. – Т.4. – С. 254–261.
126. Капрельянц А.С., Скрыпин В.И., Эль-Регистан Г.И., Островский Д.Н., Дуда В.И. Изменение структурного состояния мембран *A. lysodecticus* под влиянием препаратов ауторегуляторных факторов d₁. // Прикл. биохимия и микробиология. – 1985. – Т.21. – № 31. – С. 378–381.
127. Бабусенко Е.С., Эль-Регистан Г.И., Градова Н.Б. и др. Исследование мембранотропных ауторегуляторных факторов метанооксиляющих бактерий. // Успехи химии. – 1991. – Т.60. – N. 11. – С. 2362 – 2373.
128. Эль-Регистан Г.И., Дуда В.И., Капрельянц А.С., Козлова А.Н., Вавер В.А., Хохлова Ю.Н., Хохлова Ю.Н., Пронин С.В., Дужа М.В. Регуляция роста и развития микроорганизмов специфическими аутогенными факторами. //Регуляция биохимических процессов у микроорганизмов. – Пушкино ОНТИ НЦПИ АН СССР. – 1979. – С. 280 – 290.
129. Жоли М. Физическая химия денатурации. // М.: Мир, 1968. – С. 153 – 170.
130. De Young L.R., Fink A.L., Dill K.A. // Accounts Chem. Res. – 1993. – V. 26. – P. 614 – 620.
131. Morello J. -P., Bouvier M., Petaja-Repo U.E., Bichet D. G. Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. //Trends Pharmacol.Sci. – 2000. – V. 21. – P. 466 –469.
132. Arakawa T., Ejima D., Kita Y. Tsumoto K. Small molecule pharmacological chaperones: from thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. //Biochim. Biophys. Acta – Protein & Proteomics. – 2006. – V. 1764. – P. 1677 – 187.
133. Steet R., Chung S., Lee W.-S., Pine C. W., Do H., Kornfeld S. Selective action of iminosugar isofagomine, pharmacological chaperone for mutant forms of acid- β -glucosidase.// Biochem. Pharmacol. – 2007. – V. 73. – P. 1376 – 1383.
134. Tropak M.B., BlanChard J.E., Withers S.G., Brown E.D., Mahuran D. High-throughput screening for human lysosomal β -N-Acetyl Hexosaminidase inhibitors as pharmacological chaperones. //Chem. Biol. – 2007. – V. 14. – P. 153 – 164.
135. Fields G.B., Alonso D.O.V., Stringer D., Dill K.A. // J. Phys. Chem. – 1992. – V. 96. – P. 3974 – 3981.
136. Jaenicke R. //J. Polym Sci. – 1967. – V. 16. – P. 2143 – 2160.
137. Mitraki A., King J. // J. Biotechnology. – 1989. – V. 7. – P. 690 – 697.
138. Орлов В.Н., Арутюнян А.М., Куст С.В., Литманович Е.А., Драчев В.А., Добров Е.Н. //Биохимия. – 2001. – Т. 66. – С. 195 – 204.
139. Linker R.A., Treweek T.M. > Garver J.A. //Biochem. J. – 2001. – V. 354. – P. 79 –87.
140. Pots A.M., den Grotenhuis E., Gruppen H., Voragen A.G.J, de Kruif K. G. //J. Agric. Chem. – 1999. – V. 47. – P. 4600 – 4605.
141. Schokker E.P., Singh H., Ringer D.N., Cresmer L. K. // Intern. Dairy J. – 2000. – V. 275. – P. 13349 – 13352.
142. Jaenicke R. //Current Topicsin Cellular Regulation. – N.Y.: Academic Press, 1997. – V. 34. – P. 209 – 314.

143. Klinov S. V., Chebotareva N.A., Lisovskaya N. P., Davidov D.R., Kurganov V.I. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – V. 709. – P. 91 – 98.
144. Knappik A., Pluckthun A. // *Protein Eng.* – 1995. – V. 8. – P. 81 – 89.
145. Б.И. Курганов. Оценка активности шаперонов в тест-системах, основанных на подавлении агрегации белков. // *Успехи биол. хим.* – 2002. – Т.42. – С. 89 – 138.
146. Roher N., Mire F., Boldyreff B., Leorens F., Plana M., Issinger O.G., Itarte E. // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – V. 268. – P. 429 – 436.
147. Lee G.R., Roseman A.M., Sailbien R., Vierling E. // *EMBO J.* – 1997 – V. 16. – P. 659 – 671.
148. Chan W., Heems L.R., Brooks I., Lee G., Ngola S., Mc Nutty D., Maluf B., Hensley P., Wetzel R. // *Folding Des.* – 1996. – V. 1. – P. 77 – 89.
149. Base S., Weike T., Bigl H., Buckner I. // *Science.* – 1996. – V. 274. – P. 1715 – 1717.
150. А.А. Ревина, Г.И. Эль-Регистан, В.И. Галактионов. // *Химия высоких энергий.* – 2004. – Т. 38. – № 3.
151. И.Ю. Степаненко А.А. Ревина, Г.И. Эль-Регистан и др. // *Биотехнология.* – 2004. – Т.73. – № 12. – С. 13–19.
152. Е.К. Баранова, А.Л. Мулюкин, А.А. Ревина. // *Научно-технические технологии.* – 2005. – №5. – С. 10.
153. Беспалов М.М., Колпаков А.И., Лойко Н.Г., Дорошенко Е.В., Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Варламова Е.А., Курганов Б.И., Эль-Регистан Г.И. Функции аутоиндукторов анабиоза микроорганизмов при создании анаболического блока в клетке. // *Микробиология.* – 2000. – Т. 69. – № 2. – С. 217 –223.
154. Давыдова О.К. Взаимодействие алкилоксибензолов – ауторегуляторных d₁-факторов микроорганизмов с ДНК. Автореф. дисс...канд. биол. наук. – Саратов. – 2006.
155. Давыдова О.К. Топология и физико-химические свойства ДНК при взаимодействии с ауторегуляторными факторами d₁ микроорганизмов. // Тез. Докл. Международной конф., посвященной памяти Б.Н. Алиханяна. – Пушкино, 2006. – С. 21 – 24.
156. Давыдова О.К., Никиян А.Н., Дерябин Д.Г. Формирование упорядоченных надмолекулярных структур ДНК в водных растворах в присутствии алкилрезорцинов. // *Вестник ОГУ.* – 2005. – № 1. – С. 174 – 177.
157. Мулюкин А.Л., Вахрушев М.А., Стражевская Н.Б., Шмырина А.С., Жданов Р.И., Сузина Н.Е., Дуда В.И., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И. Влияние микробных аутоиндукторов анабиоза – алкилоксибензолов – на структурную организацию ДНК *Pseudomonas aurantiaca* и индукцию фенотипической диссоциации. // *Микробиология.* – 2005. – Т. 74. – № 2. – С. 157 – 165.
158. Иванов В.И., Минченкова Л.Е. А-форма ДНК: в поисках биологической роли. // *Молекулярная биология.* – 1994. – Т. 28. – С. 1258 – 1271.
159. Давыдова О.К., Дерябин Д.Г., Никиян А.Н., Эль-Регистан Г.И. О механизмах взаимодействия ДНК с химическими аналогами микробных индукторов анабиоза // *Микробиология.* – 2005. – Т. 74. – № 5. – С. 615 – 625.
160. Мартиросова Е.И. Изучение роли алкилоксибензолов в стабилизации и модуляции активности ферментных белков. Автореф. дисс...канд. биол. наук – М. – 2007
161. Колпаков А.И., Ильинская О.Н., Беспалов М.М. и др. Стабилизация ферментов аутоиндукторами анабиоза как один из механизмов устойчивости покоящихся форм микроорганизмов. // *Микробиология.* – 2000. – Т. 69. – № 2. – С. 224 – 230.
162. Баурина М.М., Красноштанова А.А., Крылов И.А. Разработка ресурсосберегающей технологии получения рибонуклеазы из поджелудочной железы // *Химическая технология.* – 2007. – Т. 8. – N 4. – С. 185–190.

163. Волкова Н.В., Разработка технологии микробных ДНК и РНК из метанутилизирующих бактерий. Дис. ...канд. хим. наук. – М. – 1996. – 158 с.
164. Красноштанова А.А., Крылов И.А., Карпо Б.С., Манаков М.Н. Кислотный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности процесса. 2. Кинетика гидролиза белковых фракций дрожжей и бактерий. // Биотехнология. – 1996. – № 3. – С. 45 – 49.
165. Иванкин А.Н. Биологически активные вещества из животной ткани и микроорганизмов. Методы получения и структурно-функциональные взаимосвязи. Автореф. дис....докт. хим. наук. – М. – 1998. – 38 с.

Глава 26

Общие закономерности ферментативного гидролиза субстратов различного происхождения в присутствии алкилоксибензолов

Одним из важнейших направлений современной биотехнологии является разработка способов переработки отходов в конкурентоспособную товарную продукцию. Наиболее перспективными являются возобновляемые отходы растительного и животного происхождения пищевой промышленности и сельского хозяйства. Кроме того, важное практическое значение имеют отходы микробиологической промышленности, прежде всего микробная биомасса. Перечисленные отходы, как правило, являются многотоннажными, и их утилизация требует от предприятия значительных капитальных и текущих затрат и не приносит прибыли. Между тем, большая часть отходов растительного, животного и микробного происхождения может быть переработана в дорогостоящую конкурентоспособную продукцию. Наиболее перспективным способом переработки является получение ферментативных гидролизатов белковой, липидной, углеводной и нуклеотидной природы. Все они после соответствующей очистки могут найти применение в различных областях деятельности, включая медицину. При этом получение ферментативных гидролизатов должно быть организовано в виде дополнительного цеха на предприятии, производящем отходы. Это позволит минимизировать дополнительные капитальные затраты на организацию такого производства, а также создать дополнительные рабочие места.

В описанных выше исследованиях были исследованы субстраты различного происхождения: растительного (пивная дробина), животного (кератин- и жиросодержащие отходы мясоперерабатывающих производств), микробного (биомасса дрожжей и бактерий). Безусловно, все эти объекты существенно различаются по своему составу и свойствам. Поэтому и подходы каждого вида сырья могут быть различными. На предприятиях обычно образуется несколько видов возобновляемых отходов. Например, для мясокомбината, это кератины и жиросодержащие отходы. В современных условиях потребности рынка постоянно меняются, и если,

сегодня возрастает потребность, например, в продуктах ферментативного гидролиза кератинов, то уже завтра может повыситься спрос на гидролизаты липидной природы. В такой ситуации предприятию важно суметь быстро перестроить свою деятельность в соответствии с потребностями рынка. В связи с этим особую актуальность приобретает разработка более или менее универсальных способов переработки различных видов сырья.

На основе проведенных исследований по переработке отходов различного происхождения были выявлены общие закономерности ферментативного гидролиза биополимеров в составе сложных субстратов техническими ФП и пути повышения его эффективности:

1) кинетические закономерности ферментативного гидролиза биополимеров, как в индивидуальном виде, так и в составе природных субстанций могут быть описаны уравнением Михаэлиса-Ментен и отличаться лишь количеством лимитирующих стадий, а также наличием факторов, инактивирующих фермент. Очевидно, что численные значения параметров соответствующих кинетических схем также должны различаться;

2) повысить эффективность ферментативных процессов можно за счет введения в среду гидролиза АОБ: в гидрофильной среде – C_7 -АОБ, в гидрофобной – C_{12} -АОБ. Кинетическое описание процесса в этом случае также оказалось однотипным;

3) еще одним важным фактором, повышающим эффективность процесса гидролиза, является предобработка субстрата. Она может быть осуществлена путем обработки субстрата ультразвуком, либо, что более перспективно, путем химической обработки, что позволяет дополнительно получать конкурентоспособные побочные продукты;

4) стадии выделения и очистки гидролизата могут быть основаны на методах ультрафильтрации, ионного обмена и осаждения. Таким образом, предлагаемые схемы выделения не предусматривают применения дорогостоящих реагентов при минимальном использовании органических растворителей. Это позволяет получать очищенный препарат ферментативного гидролизата в одну – две стадии, что способствует снижению его себестоимости.

Представляется важным единый подход к математическому описанию процессов ферментативного гидролиза, экстракции биологически активных веществ из сырья различного происхождения, а также процессов выделения и очистки гидролизатов. Общие кинетические схемы могут служить основой для создания универсального алгоритма управления данными процессами.

Работа со столь сложными по составу субстратами и техническими ФП не позволяет решить проблему установления механизмов взаимодействия АОБ с ферментами и субстратами. Однако можно попытаться выявить некие общие закономерности взаимодействия АОБ с высокомолеку-

лярными соединениями, используя в качестве модельных высокоочищенные препараты субстратов и ферментов.

Физико-химические аспекты взаимодействия алкилоксибензолов с гидролитическими ферментами и субстратами. Для выявления возможных причин наблюдаемых общих закономерностей взаимодействия АОБ с гидролитическими ферментами на начальном этапе работы были выполнены квантово-химические расчеты в программе Hyperchem с использованием полуэмпирических методов, которые позволяют с достаточно высокой точностью предсказывать целый ряд свойств основных и возбужденных состояний молекулы.

Для того чтобы смоделировать процессы взаимодействия ферментов и субстратов с АОБ необходимо создать компьютерные модели взаимодействующих веществ.

Поскольку ферменты представляют собой сложные молекулы, состоящие из нескольких сотен аминокислотных остатков, то для построения в программе Hyperchem их наиболее устойчивой конформации пришлось бы проанализировать не менее 10000 различных вариантов. Поэтому модели кристаллической структуры ферментов были получены из RC SB PDB (Research Collaborator for Structural Bioinformatic Protein Data Bank) под управлением Rutgers, the State University of New Jersey and San Diego Super Computer Center (SDSC) and Shaggs School of Phormaly and Pharmaceutical Science, а более простые структуры АОБ были смоделированы самостоятельно с помощью пакета программ Hyperchem 7 [1].

В результате конформационного анализа C_7 -АОБ в программе MULTIGEN было получено 8 конформеров, а C_{12} -АОБ – 148. Каждый конформер далее был прооптимизирован полуэмпирическим методом AM1 путем Single Point. В результате для каждого АОБ была получена величина энергии связи, пропорциональная внутренней энергии соединения, минимальное значение которой отвечает наиболее устойчивой конформации. Величина внутренней энергии для наиболее устойчивой конформации составила, соответственно, для C_7 -АОБ (– 431 кДж/моль), C_{12} -АОБ – (– 787 кДж/моль).

С помощью метода молекулярных орбиталей (МО) по величине энергии низшей вакантной молекулярной орбитали (НВМО) была установлена нуклеофильно-электрофильная природа исследуемых АОБ. Для обоих АОБ величина энергии НВМО оказалась положительной, следовательно, они проявляют нуклеофильные свойства. В молекулах АОБ имеются области положительного и отрицательного распределения электростатического потенциала (рис. 26.1 и 26.2). Зеленым цветом показана область отрицательного, а красным – положительного потенциала. Это позволяет сделать предположение о возможных взаимодействиях АОБ с растворителем, ферментами и субстратами преимущественно электрофильной природы.

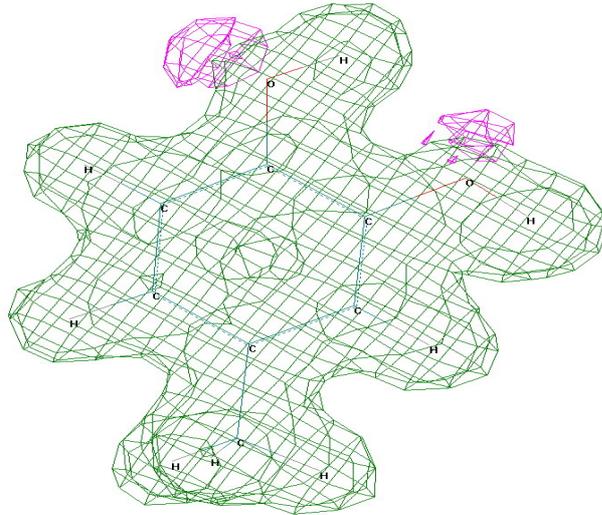


Рис. 26.1. Построение распределения положительного и отрицательного электронного потенциала C_7 -АОБ

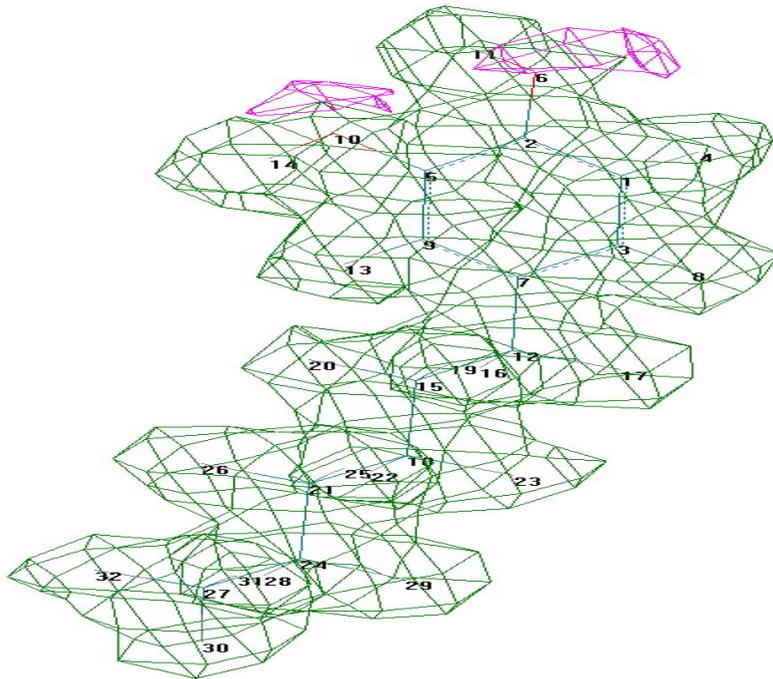


Рис. 26.2. Построение распределения положительного и отрицательного электронного потенциала C_{12} -АОБ.

Таблица 26.1

Наиболее вероятные взаимодействия С₇-АОБ с гидролитическими ферментами

Фермент/ растворитель	Образуемая связь	Энергия связи, кДж /моль	Длина связи, 10 ⁻¹⁰ м (Å)	Тип взаимодействия
1	2	3	4	5
Панкреатическая рибонуклеаза/ вода	Кислород ОН-группы АОБ - водород NH ₂ -группы аргинина ¹⁰	115,4	2,4227	Низкобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - сера метионина ³⁰	6,5	1,9567	высокобарьерная водородная связь
	Кислород ОН-группы АОБ - водород NH ₂ -группы лизина ³⁷	87,6	2,6760	Низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
	Водород ОН-группы АОБ - кислород аспарагина ¹²⁴	7,6	1,6941	высокобарьерная водородная связь
Трипсин /вода	Кислород ОН-группы АОБ - водород аспарагина ²⁰²	8,5	2,8152	Высокобарьерная водородная связь
	Кислород ОН-группы АОБ - водород NH-группы валина ¹⁹⁹	7,5	1,8754	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - кислород серина ⁵⁴	5,3	2,4227	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - кислород треонина ¹²⁰	6,8	1,8754	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - кислород тирозина ¹¹⁷	6,5	2,9503	Высокобарьерная водородная связь
Глюкоамилаза Asp. Awamori /вода	Водород ОН-группы АОБ - кислород валина ³⁰³	7,6	2,9503	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - азот NH ₂ -группы Phe ⁴⁰²	9,3	2,6760	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - NH ₂ -группа тирозина ¹⁷⁵	83,4	2,7320	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - кислород треонина ⁵³	7,3	1,8594	—
	Водород ОН-группы АОБ - кислород аспарагиновой кислоты ⁸³	7,7	2,0292	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - кислород глутаминовой кислоты ¹⁰⁶	8,9	2,8184	Высокобарьерная водородная связь
Амилаза панкреатическая/ вода	Водород ОН-группы АОБ - кислород аспарагиновой кислоты ¹⁸³	7,3	2,3899	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ - кислород глутаминовой кислоты ²⁰⁷	7,2	1,9567	Высокобарьерная водородная связь

Продолжение таблицы 26.1

1	2	3	4	5
Амилаза панкреатическая/ вода	Кислород ОН-группы АОБ – водород NH ₂ -группы аргинина ²⁶⁷	92,7	2,7824	Низкобарьерная водородная связь
	Кислород ОН-группы АОБ – водород ОН-группы фенилаланина ¹⁷³	9,3	2,1352	Высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ – кислород валина ¹⁷⁹	6,4	2,3845	Высокобарьерная водородная связь
Липаза панкреатическая	Водород ОН-группы АОБ – кислород серина ⁵⁹	4,8	2,1531	Высокобарьерная водородная связь
	Кислород ОН-группы АОБ – водород NH-группы гистидина ¹⁶⁸	83,4	2,7234	Низкобарьерная водородная связь

Для того чтобы осуществить компьютерное моделирование взаимодействия АОБ с ферментами и субстратами в программе Nucleochem был создан файл, так называемая рабочая область, в которую помещали молекулу высокомолекулярного соединения (фермента или субстрата). Затем в эту область вводили молекулу АОБ. На первом этапе для упрощения расчетов по выбору наиболее вероятных вариантов взаимодействия АОБ с ферментами было выбрано молярное соотношение АОБ : фермент 1:1. Также при выполнении расчетов учитывали гидрофильность (гидрофобность) системы путем расчета соответствующих дипольных моментов образующихся интермедиатов и их сравнением с дипольными моментами молекул растворителя. Позиции АОБ относительно фермента выбирались пятикратно, что необходимо для статистической достоверности расчетов.

Проанализировав данные по аминокислотному составу исследуемых ферментов и расположению аминокислот в пространстве, для каждого из ферментов были выбраны аминокислоты, расположенные вблизи активного центра, но не входящие в его состав, с которыми наиболее вероятно взаимодействие АОБ. На основе анализа химического строения АОБ было сделано предположение, что наиболее вероятными типами взаимодействий между ферментами и АОБ является образование водородных связей и гидрофобные взаимодействия. Критерием выбора наиболее вероятных взаимодействий явилась минимальная величина внутренней энергии молекулы и длина водородной связи не более 0,3 нм – известная из литературы максимально возможная длина водородных связей [2].

В табл. 26.1 и 26.2 приведены результаты соответствующих расчетов для исследованных в работе высокоочищенных гидролаз.

Таблица 26.2

Наиболее вероятные взаимодействия C₁₂-АОБ с гидролитическими ферментами

Фермент/ раствори- тель	Образуемая связь	Энергия связи, кДж/моль	Длина связи, 10 ⁻¹⁰ м (Å)	Тип взаимодействия
рибонук- леаза пан- креатиче- ская / во- да	Водород ОН-группы АОБ – азот NH ₂ -группы аргинина ¹⁰	8,7	2,544	Высокобарьерная во- дородная связь
Трип- син/вода	Водород ОН-группы АОБ – сера цистеина ⁵⁸	6,7	2,674	Высокобарьерная во- дородная связь
Глюкоа- милаза <i>Asp.</i> <i>Awamori</i> /вода	Водород ОН-группы АОБ – NH ₂ -группа тиро- зина ³⁰⁶	82,7	2,725	
	Водород ОН-группы АОБ – NH ₂ -группа фени- лаланина ⁴⁰²	7,5	2,187	Высокобарьерная во- дородная связь
Амилаза панкреа- тическая/ вода	Кислород ОН-группы АОБ – водород NH ₂ - группы аргинина ¹³¹	89,6	2,425	Низкобарьерная водо- родная связь, гидро- фобные взаимодейст- вия
	Кислород ОН-группы АОБ – водород NH ₂ - группы гистидина ⁸⁹	92,7	2,537	Низкобарьерная водо- родная связь, гидро- фобные взаимодейст- вия
Липаза панкреа- тическая	Кислород ОН-группы АОБ – водород NH ₂ - группы гистидина ¹⁶⁸	81,4	2,484	Низкобарьерная водо- родная связь, гидро- фобные взаимодейст- вия
	Водород ОН-группы АОБ – кислород треони- на ¹³²	5,8	2,145	Высокобарьерная во- дородная связь
	Водород ОН-группы АОБ – азот NH ₂ -группы аспарагиновой кисло- ты ²⁶²	6,7	2,244	Высокобарьерная во- дородная связь
	Водород ОН-группы АОБ – кислород сери- на ¹²¹	7,4	2,244	Высокобарьерная во- дородная связь

Анализ данных табл. 26.1 и 26.2 подтверждает, что взаимодействие АОБ с ферментами сводится к слабым взаимодействиям, прежде всего, об-

разованию водородных связей. За счет этого, вероятно, и происходит стабилизация пространственной структуры фермента вследствие снижения величины свободной энергии. В рассматриваемых случаях наблюдается преимущественное образование так называемых высокобарьерных водородных связей с энергией 2 – 15 кДж/моль. Их образование наиболее характерно для С₇-АОБ и ферментолизом, проводимых в гидрофильной среде, т.е. во всех рассматриваемых случаях за исключением системы оливковое масло – панкреатическая липаза. Что касается С₁₂-АОБ то, как видно из табл. 26.2, в гидрофильной среде он в меньшей степени склонен к образованию водородных связей и гораздо более активен в гидрофобной среде (оливковое масло). Помимо высокобарьерных водородных связей наблюдается образование и низкобарьерных с энергией более 80 кДж/моль. Такие же значения энергии связи характерны согласно литературным данным и для гидрофобных взаимодействий. Как следует из табл. 26.1 и 26.2, данный тип взаимодействий преимущественно имеет место в гидрофобной среде, а также между АОБ и аминокислотными остатками, содержащими ароматические, гетероциклические структуры, сопряженные двойные связи и т.п. (например, фенилаланином, тирозином, аргинином, гистидином).

Таблица 26.3

Изменение внутренней энергии интермедиата АОБ – трипсин в зависимости от их мольного соотношения

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ: трипсин	Начальная скорость гидролиза, моль/л·с · 10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ – фермент (растворитель – вода), D
С ₇	0:1	4,73	- 436	1,42
С ₇	1:8	6,83	- 493	1,48
С ₇	1:2	11,60	- 589	1,64
С ₇	2:1	16,20	- 613	1,76
С ₇	4:1	19,51	- 625	1,79
С ₇	6:1	21,2	- 630	1,82
С ₁₂	0:1	4,73	- 767	1,42
С ₁₂	1:8	2,91	- 521	0,24
С ₁₂	1:2	1,82	- 311	0,22
С ₁₂	2:1	1,00	- 253	0,20
С ₁₂	4:1	1,01	- 229	0,20
С ₁₂	6:1	1,02	- 218	0,20

Сопоставляя данные о возможных взаимодействиях АОБ с гидролазами с результатами по кинетики ферментативного гидролиза, приведенными в предыдущих главах, можно видеть, что более гидрофильный АОБ С₇-АОБ в гидрофильной среде во всех случаях в большей степени повыша-

ет скорость ферментативного гидролиза нежели гидрофобный C₁₂-АОБ. Эти данные коррелируют с количеством возможных эффективных взаимодействий АОБ с ферментами, которые способны стабилизировать последние.

Однако стабильность фермента зависит не только от энергии и длины образуемых связей между аминокислотами фермента и АОБ, но и, как было установлено проведенными исследованиями от их стехиометрического соотношения. Поэтому на следующем этапе исследований был проведен расчет внутренней энергии и величин дипольного момента образуемых интермедиатов АОБ – фермент при различных мольных соотношениях АОБ: фермент, которые выбирались для каждого фермента в тех же интервалах, что и при исследовании кинетических закономерностей. Полученные данные представлены в табл. 26.3.

Таблица 26.4

Изменение внутренней энергии интермедиата АОБ – панкреатическая рибонуклеаза в зависимости от их мольного соотношения

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : рибонуклеаза	Начальная скорость гидролиза, моль/л·с · 10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ – фермент (растворитель – вода), D
C ₇	0:1	10,0	- 436	1,42
C ₇	1:1	8,21	- 465	1,26
C ₇	3:1	8,54	- 503	1,53
C ₇	7:1	9,03	- 496	1,75
C ₇	16:1	9,10	- 389	1,80
C ₇	33:1	9,10	- 268	1,79
C ₁₂	0:1	7,14	- 767	1,42
C ₁₂	1:1	5,65	- 708	1,03
C ₁₂	3:1	6,00	- 614	0,61
C ₁₂	7:1	6,45	- 602	0,37
C ₁₂	16:1	6,68	- 840	0,27
C ₁₂	33:1	6,70	- 850	0,25

Анализ представленных в табл. 26.3 – 26.7 данных показывает, что независимо от мольного соотношения АОБ : фермент образование интермедиата приводит к изменению внутренней энергии системы. Если сравнить динамику изменения внутренней энергии системы с влиянием концентрации АОБ на скорость гидролиза, то видно, что для всех рассматриваемых модельных систем наблюдается общая закономерность: интермедиат АОБ с ферментом, образующийся при их мольном соотношении, отвечающем максимальной скорости ферментализации, имеет минимальную внутреннюю энергию и, следовательно, максимальную стабильность. Та-

ким образом, на основе проведенных исследований можно сделать вывод о том, что взаимодействие АОБ с ферментом приводит к образованию стабильной и устойчивой конформации с минимальной внутренней энергией.

Таблица 26.5

Изменение внутренней энергии интермедиата АОБ – панкреатическая α -амилаза в зависимости от их мольного соотношения

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : амилаза	Начальная скорость гидролиза, моль/л·с·10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ – фермент (растворитель – вода интермедиата), D
C ₇	0:1	1,51	- 436	1,43
C ₇	1:4	1,25	- 101	1,06
C ₇	1:1	2,01	- 377	1,72
C ₇	2:1	2,63	- 394	1,84
C ₇	6:1	2,63	- 268	1,86
C ₇	11:1	2,63	- 265	1,88
C ₁₂	0:1	1,51	- 767	1,44
C ₁₂	1:4	0,36	- 118	0,31
C ₁₂	1:1	0,34	- 384	0,28
C ₁₂	2:1	0,31	- 398	0,24
C ₁₂	6:1	0,33	- 412	0,23
C ₁₂	11:1	0,33	- 413	0,23

Таблица 26.6

Изменение внутренней энергии интермедиата АОБ – глюкоамилаза в зависимости от их мольного соотношения

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : глюкоамилаза	Начальная скорость гидролиза, моль/л·с·10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ – фермент (растворитель – вода), D
C ₇	0:1	7,12	- 436	1,42
C ₇	1:4	5,31	- 843	1,45
C ₇	1:1	6,06	- 1061	1,55
C ₇	2:1	7,71	- 1177	1,68
C ₇	6:1	7,81	- 1177	1,67
C ₇	11:1	7,84	- 1177	1,69
C ₁₂	0:1	7,12	- 767	1,42
C ₁₂	1:4	5,03	- 920	0,93
C ₁₂	1:1	2,36	- 793	0,84
C ₁₂	2:1	1,95	- 716	0,62
C ₁₂	6:1	1,97	- 511	0,23

C ₁₂	11:1	1,94	- 205	0,18
-----------------	------	------	-------	------

Таблица 26.7

Изменение внутренней энергии интермедиата АОБ – панкреатическая липаза в зависимости от их мольного соотношения

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : липаза	Начальная скорость гидролиза, моль/л·с · 10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ – фермент (растворитель – оливковое масло), D
C ₇	0:1	1,12	- 436	0,54
C ₇	1:1	0,91	- 654	0,58
C ₇	5:1	1,17	- 872	0,64
C ₇	10:1	1,28	- 981	0,62
C ₇	25:1	1,34	- 980	0,62
C ₇	50:1	1,33	- 981	0,62
C ₁₂	0:1	1,12	- 767	0,54
C ₁₂	1:1	1,23	- 1726	0,48
C ₁₂	5:1	1,78	- 1470	0,42
C ₁₂	10:1	2,22	- 1342	0,34
C ₁₂	25:1	2,53	- 1278	0,27
C ₁₂	50:1	2,52	- 1278	0,24

Анализ динамики изменения величины дипольных моментов с увеличением мольного соотношения АОБ: фермент показывает, что при введении в среду гидролиза C₇-АОБ происходит увеличение дипольного момента и его величина приближается к значению дипольного момента молекулы воды, равного 1,83 D. В случае C₁₂-АОБ наблюдается снижение величины дипольного момента, вследствие чего происходит снижение растворимости интермедиата в полярном растворителе (воде), но, с другой стороны, происходит увеличение его растворимости в неполярных растворителях, например, оливковом масле. Величина дипольного момента его молекулы составляет 0,29. Наблюдаемые факты могут служить объяснением большей активности C₁₂-АОБ в гидрофобных средах.

Как было показано в предыдущих разделах, существенное влияние на скорость ферментативного гидролиза оказывает также взаимодействие АОБ с субстратом. Поэтому представлялось актуальным провести аналогичные расчеты для интермедиатов «АОБ – субстрат». При проведении расчетов трехмерные структуры субстратов брали из того же банка данных, что и структуры ферментов. В табл. 26.8 и 26.9 приведены данные по характеристике возможных взаимодействий АОБ с субстратами.

Из представленных данных следует, что образование интермедиатов АОБ с БСА и дрожжевой РНК происходит за счет высокобарьерных водородных связей, а крахмала и оливкового масла – за счет гидрофобных

взаимодействий и низкобарьерных водородных связей. Также видно, что гидрофобные взаимодействия наиболее вероятны для АОБ С₁₂-АОБ.

Таблица 26.8

Наиболее вероятные взаимодействия С₇-АОБ с субстратами высокоочищенных гидролаз

Субстрат/растворитель	Образуемая связь	Энергия связи, кДж/моль	Длина связи, 10 ⁻¹⁰ м (Å)	Тип взаимодействия
БСА/вода	кислород ОН-группы АОБ – водород NH ₂ - группы валина ⁶⁵	8,7	2,426	высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ – кислород аспарагиновой кислоты ²²	9,4	2,584	высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы АОБ – кислород глутаминовой кислоты ⁴¹	6,5	1,985	высокобарьерная водородная связь
	Кислород ОН-группы АОБ – водород NH ₂ -группы аргинина ⁵⁴	7,8	2,187	высокобарьерная водородная связь
	Кислород ОН-группы АОБ – водород ОН-группы фенилаланина ²⁹	8,6	2,226	высокобарьерная водородная связь
РНК дрожжевая/вода	Водород аминогруппы аденина – кислород ОН-группы АОБ	10,2	2,358	высокобарьерная водородная связь
	Водород аминогруппы гуанина – кислород ОН-группы АОБ	7,8	2,489	высокобарьерная водородная связь
	Водород ОН-группы цитозин –кислород ОН-группы АОБ	88,4	2,683	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
	Водород ОН-группы урацила – кислород ОН-группы АОБ	92,6	2,185	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
крахмал / вода	Кислород ОН-группы АОБ – водород гидроксильных групп глюкозы	88,3	1,884	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
оливковое масло/ вода	Водород ОН-группы АОБ – кислород карбоксильной группы	7,5	2,926	высокобарьерная водородная связь

Таблица 26.9

Наиболее вероятные взаимодействия С₁₂-АОБ с субстратами высокоочищенных гидролаз

Субстрат/растворитель	Образуемая связь	Энергия связи, кДж/моль	Длина связи, Å	Тип взаимодействия
БСА/вода	Водород ОН-группы АОБ – азот NH ₂ -группы аргинина ¹⁹	78,3	2,923	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
	Водород ОН-группы АОБ – NH ₂ -группа фенилаланина ²⁹	84,6	2,785	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
РНК дрожжевая/вода	Водород гуанин – кислород ОН-группы АОБ	92,3	2,824	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
	Водород цитозин – кислород ОН-группы АОБ	90,7	1,996	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия
Крахмал / вода	Водород ОН-группы АОБ кислород гидроксильной группы глюкозы	10,4	2,186	высокобарьерная водородная связь
Оливковое масло/вода	Водород ОН-группы АОБ – кислород карбоксильной группы	116,2	2,946	низкобарьерная водородная связь, гидрофобные взаимодействия

В табл. 26.10 – 26.13 представлены результаты расчетов внутренней энергии интермедиатов АОБ с субстратами и их дипольных моментов, из которых видно, что наблюдается та же закономерность, что и при взаимодействии АОБ с ферментами: интермедиат, отвечающий максимальной скорости ферментативного гидролиза, обладает минимальной внутренней энергией.

Как следует из вышеприведенных данных, при взаимодействии АОБ с ферментами и субстратами значительная роль принадлежит гидрофобным взаимодействиям. Вблизи гидрофобных углеводных радикалов АОБ формируется слой структурированной воды. Молекулы воды, расположенные в непосредственной близости от молекул неполярных соединений, ограничиваются в своей возможной ориентации, что приводит к образованию оболочки или слоя из высокоупорядоченных молекул воды вокруг растворенного неполярного соединения.

Таблица 26.10

Изменение внутренней энергии интермедиата (АОБ + БСА) в зависимости от мольного соотношения компонентов

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : БСА	Начальная скорость гидролиза, моль/л·с · 10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ - субстрат, D растворитель – вода
C ₇	0:1	4,73	- 436	1,68
C ₇	1:1	6,83	- 394	1,57
C ₇	1:2	11,60	- 471	1,34
C ₇	1:3	16,20	- 490	1,21
C ₇	1:4	19,51	- 500	1,38
C ₇	1:5	21,2	- 504	1,41
C ₁₂	0:1	4,73	- 767	1,61
C ₁₂	1:1	2,91	- 625	0,97
C ₁₂	1:2	1,82	- 373	0,68
C ₁₂	1:3	1,00	- 304	0,26
C ₁₂	1:4	1,01	- 275	0,27
C ₁₂	1:5	1,02	-262	0,25

Таблица 26.11

Изменение внутренней энергии интермедиата (АОБ + РНК) в зависимости от мольного соотношения компонентов

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : РНК	Начальная скорость гидролиза, моль/л·с · 10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ - субстрат, D растворитель – вода
C ₇	0:1	10,0	- 436	1,79
C ₇	1:3	8,21	- 409	1,45
C ₇	1:5	8,54	- 480	1,42
C ₇	1:8	9,03	- 442	1,38
C ₇	1:14	9,10	- 342	1,65
C ₇	1:17	9,10	- 236	1,67
C ₁₂	0:1	7,14	- 767	1,79
C ₁₂	1:3	5,65	- 779	1,01
C ₁₂	1:5	6,00	- 675	0,87
C ₁₂	1:8	6,45	- 662	0,44
C ₁₂	1:14	6,68	- 924	0,39
C ₁₂	1:17	6,70	- 935	0,36

Таблица 26.12

Изменение внутренней энергии интермедиата (АОБ + крахмал) в зависимости от мольного соотношения компонентов

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : крахмал	Начальная скорость гидролиза, моль/л · с · 10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ - субстрат, D растворитель – вода
d ₁ -C ₇	0:1	1,51	- 436	1,65
d ₁ -C ₇	1:25	1,25	- 506	1,48
d ₁ -C ₇	1:50	2,01	- 637	1,31
d ₁ -C ₇	1:100	2,63	- 706	1,22
d ₁ -C ₇	1:200	2,63	- 765	1,34
d ₁ -C ₇	1:300	2,63	- 783	1,34
d ₁ -C ₁₂	0:1	1,51	- 767	1,65
d ₁ -C ₁₂	1:25	0,36	- 598	1,38
d ₁ -C ₁₂	1:50	0,34	- 515	0,97
d ₁ -C ₁₂	1:100	0,31	- 465	0,88
d ₁ -C ₁₂	1:200	0,33	- 332	0,84
d ₁ -C ₁₂	1:300	0,33	-133	0,76

Таблица 26.13

Изменение внутренней энергии интермедиата (АОБ + оливковое масло) в зависимости от мольного соотношения компонентов

Тип АОБ	Мольное соотношение АОБ : оливковое масло	Начальная скорость гидролиза, моль/л · с · 10 ⁵	Внутренняя энергия, кДж/моль	Дипольный момент интермедиата АОБ - субстрат, D растворитель – оливковое масло
C ₇	0:1	1,12	- 436	0,29
C ₇	1:10	0,91	- 510	0,34
C ₇	1:20	1,17	- 680	0,37
C ₇	1:30	1,28	- 756	0,42
C ₇	1:50	1,34	- 765	0,41
C ₇	1:90	1,33	- 765	0,40
C ₁₂	0:1	1,12	- 767	0,29
C ₁₂	1:10	1,23	- 1433	0,38
C ₁₂	1:20	1,78	- 1073	0,32
C ₁₂	1:30	2,22	- 980	0,28
C ₁₂	1:50	2,53	- 980	0,26
C ₁₂	1:90	2,52	- 980	0,24

Для дополнительного подтверждения наличия гидрофобных взаимодействий были проведены расчеты термодинамических функций состояния для исследованных модельных систем. С помощью программы Hyperchem 7, используя параметрическую модель 3 (PM 3) находили исходные и конечные теплоты образования АОБ. На основе полученных данных с использованием закона Гесса были рассчитаны энтальпии химических реакций взаимодействия АОБ с ферментами.

Таблица 26.14

Значения термодинамических функций состояния системы АОБ – трипсин при различных температурах

Температура, °С (К)	Значения термодинамических функций состояния					
	В отсутствии АОБ			В присутствии АОБ		
	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль	ΔH , кДж/ моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль
АОБ d ₁ -C ₇						
30 (303)	17,50	70	- 3,6	14,48	106	- 18,1
40 (313)	17,42	68	- 3,7	14,40	105	- 18,7
50 (323)	17,33	65	- 3,8	14,32	104	- 19,3
60 (333)	17,25	64	- 3,9	14,23	102	- 19,9
АОБ d ₁ -C ₁₂						
30 (303)	17,50	70	- 3,6	21,48	77	-1,7
40 (313)	17,42	68	- 3,7	21,40	74	-1,8
50 (323)	17,33	65	- 3,8	21,32	72	-1,8
60 (333)	17,25	64	- 3,9	21,23	69	-1,9

Таким же образом были рассчитаны энергия Гиббса и энтропия для этих реакций, отвечающих различным температурам гидролиза. Их результаты представлены в табл. 26.14 – 26.18. Для сравнения там же приведены термодинамические функции состояния для исследуемых ферментативных процессов в отсутствии АОБ. Из представленных данных следует, что в случае АОБ d₁-C₁, когда процесс происходит в гидрофильной среде, наблюдается повышение энтропии системы и снижение энергии Гиббса. Такая закономерность свидетельствует о повышении стабильности системы вследствие снижения ее гидрофобности. Последнее происходит за счет «слипания» гидрофобных углеводородных радикалов АОБ, что приводит к вытеснению структурированной воды и, как следствие, ее разупорядочен-

ности. В случае использования АОБ d_1-C_6 в гидрофобной среде, а также гидролиза оливкового масла панкреатической липазой в присутствии АОБ d_1-C_1 наблюдается противоположная закономерность. Гидрофобность системы выше в среде оливкового масла, поэтому там более эффективным оказывается использование гидрофобного d_1-C_6 гидрофобного d_1-C_6 , что подтверждается увеличением энтропии системы. Снижение величины энергии Гиббса при использовании d_1-C_1 в гидрофильной среде и d_1-C_6 – в гидрофобной свидетельствует о повышении самопроизвольности системы, что выражается в увеличении скорости последнего.

Таблица 26.15

Значения термодинамических функций состояния системы АОБ – рибонуклеаза при различных температурах

Температура, °С (К)	Значения термодинамических функций состояния					
	В отсутствии АОБ			В присутствии АОБ		
	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль	ΔH , кДж/моль	ΔS , кДж/моль·К	ΔG , кДж/моль
АОБ d_1-C_7						
45 (318)	43,56	170	- 10,4	43,06	211	- 24,1
55 (328)	43,47	165	- 10,8	42,97	207	- 24,8
65 (338)	43,39	161	- 11,1	42,89	203	- 25,6
75 (348)	43,31	157	- 11,4	42,81	199	- 26,4
85 (358)	43,22	154	- 11,8	42,72	195	- 27,1
АОБ d_1-C_{12}						
45 (318)	43,56	170	- 10,4	42,15	155	- 7,1
55 (328)	43,47	165	- 10,8	42,07	151	- 7,3
65 (338)	43,39	161	- 11,1	41,99	146	- 7,5
75 (348)	43,31	157	- 11,4	41,91	143	- 7,7
85 (358)	43,22	154	- 11,8	41,82	139	- 7,9

После выяснения возможных типов взаимодействия АОБ с субстратами и ферментами мы перешли к доказательству наличия данных взаимодействий. Из литературных данных известно, что при образовании водородных связей и гидрофобных взаимодействиях [3–4] наблюдается снижение величины поглощения в ультрафиолетовой области спектра, а также

смещение максимума поглощения в сторону больших длин волн. Поэтому мы провели спектрофотометрические исследования именно в ультрафиолетовой области спектра.

Таблица 26.16

Значения термодинамических функций состояния системы
АОБ – α -амилаза при различных температурах

Температура, °С (К)	Значения термодинамических функций состояния					
	В отсутствии АОБ			В присутствии АОБ		
	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль
АОБ d ₁ -C ₇						
40 (313)	39,0	146	- 5,3	31,60	244	- 42,4
50 (323)	38,92	142	- 5,5	31,52	241	- 43,8
60 (333)	38,83	138	- 5,7	31,43	237	- 45,2
70 (343)	38,75	134	- 5,9	31,35	234	- 46,6
АОБ d ₁ -C ₁₂						
40 (313)	39,0	146	- 5,3	47,88	158	- 1,6
50 (323)	38,92	142	- 5,5	47,80	153	- 1,7
60 (333)	38,83	138	- 5,7	47,72	149	- 1,8
70 (343)	38,75	134	- 5,9	47,63	144	- 1,8

Из представленных данных видно, что все ферменты как вещества белковой природы имеют максимум поглощения вблизи 260 нм. Среди субстратов максимумы поглощения в интервале длин волн 260 – 270 нм имеют БСА и дрожжевая РНК. Крахмал и оливковое масло не имеют максимумов поглощения в ультрафиолетовой области спектра. АОБ также имеют максимумы поглощения, соответственно, С₇-АОБ – 315 нм, С₁₂-АОБ – 300 нм. Таким образом, большинство рассматриваемых соединений имеют близкие значения максимумов поглощения, поэтому при смешивании их растворов в отсутствие взаимодействия следует ожидать аддитивного эффекта.

Из полученных данных следует, что во всех случаях наблюдается снижение величины поглощения на 20 – 40 %, а с увеличением времени предынкубации наблюдается батохромный эффект. Такой вид спектров поглощения подтверждает ранее установленные гидрофобные взаимодей-

ствия и образование водородных связей. Следует отметить, что при определенном времени предынкубации батохромного эффекта не наблюдается.

Таблица 26.17

Значения термодинамических функций состояния системы АОБ – глюкоамилаза при различных температурах

Температура, °С (К)	Значения термодинамических функций состояния					
	В отсутствии АОБ			В присутствии АОБ		
	ΔH , кДж/моль	ΔS , кДж/моль·К	ΔG , кДж/моль	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль
C₇-АОБ						
40 (303)	37,40	135	- 3,4	43,40	222	- 23,8
50 (313)	37,32	130	- 3,5	43,32	217	- 24,6
60 (323)	37,23	126	- 3,6	43,23	212	- 25,4
70 (333)	37,15	123	- 3,7	43,15	208	- 26,2
C₁₂-АОБ						
40 (303)	37,40	135	- 3,4	32,60	112	- 1,3
50 (313)	37,32	130	- 3,5	32,52	108	- 1,3
60 (323)	37,23	126	- 3,6	32,43	104	- 1,3
70 (333)	37,15	123	- 3,7	32,35	101	- 1,4

Если сопоставить момент исчезновения батохромного эффекта с данными по влиянию времени предынкубации АОБ с ферментами и субстратами на скорость ферментативного гидролиза, то можно заметить, что время «стабилизации» максимума поглощения во всех случаях совпадает с выходом на стационар зависимости скорости ферментативного гидролиза от времени предынкубации. Это свидетельствует о том, что к этому моменту завершается образование интермедиата.

Из литературных данных известно, что для изучения водородных связей чаще всего используется ИК-спектрофотометрия. Поэтому для доказательства образования водородных связей были получены ИК-спектры АОБ, ферментов и субстратов, являющихся объектами исследования в данной работе. В табл. 26.19 приведены результаты анализа ИК-спектров с указанием наиболее характерных групп атомов для изучаемых в работе соединений.

В табл. 26.20 обобщены литературные данные по аминокислотному составу используемых в работе гидролитических ферментов и БСА.

Таблица 26.18

Значения термодинамических функций состояния системы АОБ – панкреатическая липаза при различных температурах

Температура, °С (К)	Значения термодинамических функций состояния					
	В отсутствии АОБ			В присутствии АОБ		
	ΔH , кДж/моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль	ΔH , кДж/ моль	ΔS , Дж/моль·К	ΔG , кДж/моль
C₇-АОБ						
30 (303)	70,28	355	- 37,4	46,68	235	- 24,5
40 (313)	70,20	348	- 38,6	46,60	230	- 25,3
50 (323)	70,12	340	- 39,8	46,52	225	- 26,1
60 (333)	70,03	334	- 41,1	46,43	220	- 26,9
C₁₂-АОБ						
30 (303)	70,28	355	- 37,4	49,78	310	- 44,2
40 (313)	70,20	348	- 38,6	49,70	305	- 45,7
50 (323)	70,12	340	- 39,8	49,62	300	- 47,2
60 (333)	70,03	334	- 41,1	49,53	295	- 48,6

Сопоставляя данные табл. 26.19 и 26.20, можно сделать вывод о том, что ИК-спектры гидролаз отличаются друг от друга в зависимости от относительного содержания тех или иных аминокислот. При высоком содержании аминокислоты в соответствующем белке в ИК-спектре появляется пик, соответствующий радикалу данной аминокислоты. Радикалы тех аминокислот, содержание которых в белке невелико, в ИК-спектре практически не проявляются. Что касается водородных связей, то их образование в ИК-спектре проявляется в виде расширения и частичного смещения в сторону 3600 см^{-1} пика, соответствующего ОН-группе. АОБ. Поскольку в молекуле белка водородные связи образуются также за счет SH- и NH₂-групп, то может происходить также и расширение этих пиков.

Наиболее характерный пик ОН-группы характерен для спектра АОБ, то мы попытались проследить как он меняется при взаимодействии АОБ с ферментами и субстратами. Для этого были сняты ИК-спектры двухком-

понентных систем АОБ – фермент и АОБ – субстрат. Причем в первом случае ИК-спектр снимали непосредственно после смешивания компонентов, что соответствовало времени предынкубации 2 – 3 мин (столько времени занимал процесс непосредственного получения спектра). Во втором случае смесь АОБ с ферментом или субстратом перемешивали в течение 20 – 25 мин и после этого проводили спектрофотометрию. Как было показано выше, для исследованных ферментов и субстратов 20 – 25 мин было достаточно для образования устойчивого интермедиата. Сопоставление ИК-спектров, полученных для одной и той же смеси при разном времени взаимодействия, показывает, что во всех случаях в ходе взаимодействия происходит образование водородных связей. Об этом свидетельствует значительное расширение пика ОН-группы в молекуле АОБ.

Таблица 26.19

Аминокислотный состав гидролитических ферментов,
использованных в работе

Аминокислоты	Содержание аминокислот, масс. %				
	Трипсин	РНК-аза панкреатическая	Липаза панкреатическая	α -амилаза панкреатическая	Глюкоамилаза <i>Asp. awamori</i>
Аланин	0,0502	0,0857	0,0887	0,0903	0,1017
Аргинин	0,0365	0,0286	0,0319	0,0215	0,0318
Аспарагин	0,0685	0,0786	0,0479	0,0861	0,0487
Аспарагиновая кислота	0,0320	0,0357	0,0727	0,0646	0,0699
Валин	0,0685	0,0643	0,0585	0,0766	0,0614
Гистидин	0,0183	0,0286	0,0213	0,0239	0,0127
Глицин	0,0913	0,0429	0,0816	0,1053	0,0784
Глутамин	0,0411	0,1286	0,0390	0,0478	0,0318
Глутаминовая кислота	0,0228	0,0357	0,0390	0,0478	0,0403
Изолейцин	0,0502	0,0214	0,0496	0,0455	0,0424
Лейцин	0,0685	0,0143	0,0869	0,0478	0,0763
Лизин	0,0411	0,0714	0,0603	0,0287	0,0169
Метионин	0,0228	0,0286	0,0230	0,0167	0,0021
Пролин	0,0411	0,0286	0,0567	0,0263	0,0360
Серин	0,1735	0,1071	0,0603	0,0813	0,1378
Тирозин	0,0502	0,0429	0,0426	0,0407	0,0339
Треонин	0,0365	0,0786	0,0691	0,0598	0,0805
Триптофан	0,0137	0,0000	0,0213	0,0287	0,0339
Фенилаланин	0,0183	0,0214	0,0408	0,0467	0,0381
Цистеин	0,0548	0,0571	0,0089	0,0191	0,0148

Результаты анализа ИК-спектров использованных в работе ферментов,
субстратов и АОБ

Наименование объекта исследования	Характерные полосы поглощения, см ⁻¹ , тип колебаний (ν - валентные, δ - деформационные)	Функциональные группы, соответствующие полосам поглощения
1	2	3
α -амилаза панкреатическая	3130 – 3030 (ν)	NH ₃ ⁺
	1660 – 1610 (δ)	NH ₃ ⁺
	1550 – 1485 (δ)	NH ₃ ⁺
	3500 – 3300 (ν)	- NH -
	1650 – 1530 (ν)	- NH -
	2975 – 2860 (ν)	- C – C -
	1470 – 1430 (δ)	- C – C -
	1380 – 1370 (δ)	- C – C -
	3358 (ν)	-CONH ₂ (амид)
	1620 (ν)	-CONH ₂ (амид)
	1659 (δ)	-CONH ₂ (амид)
	1750 – 1700 (δ)	- COOH α -аминокислот
	2700 – 2500 (ν)	- COOH α -аминокислот
	3400 – 3200 (ν)	-OH (свободная)
Липаза панкреатическая	3130 – 3030 (ν)	NH ₃ ⁺
	1660 – 1610 (δ)	NH ₃ ⁺
	1550 – 1485 (δ)	NH ₃ ⁺
	3500 – 3300 (ν)	- NH -
	1650 – 1530 (ν)	- NH -
	2975 – 2860 (ν)	- C – C -
	1470 – 1430 (δ)	- C – C -
	1380 – 1370 (δ)	- C – C -
	3500 – 3300 (ν)	- NH ₂
	3650 – 3590 (ν)	- OH (свободная)
	1450 – 1250 (δ)	- OH (свободная)
	2700 – 2500 (ν)	- COOH α -аминокислот
	1750 – 1700 (δ)	- COOH α -аминокислот
	Глюкоамилаза <i>Asp. awamori</i>	2975 – 2860 (ν)
1470 – 1430 (δ)		- C – C -
1380 – 1370 (δ)		- C – C -
1755 – 1720 (ν)		- COOH α -аминокислот
1220 – 1020 (ν)		- COOH α -аминокислот
1410 (δ)		- COOH α -аминокислот
3500 – 3300 (ν)		-CONH ₂ (амид)
1650 – 1590 (δ)		-CONH ₂ (амид)
3650 – 3590 (ν)		- OH (свободная)
1450 – 1250 (δ)		- OH (свободная)
3030 (ν)		- C ₆ H ₅ -
900 – 690 (δ)		- C ₆ H ₅ -
1260 – 1180 (ν)		-OH (фенольный)

Продолжение таблицы 26.20

1	2	3
Рибонуклеаза панкреатическая	2975 – 2860 (v)	- C – C -
	1470 – 1430 (δ)	- C – C -
	1380 – 1370 (δ)	- C – C -
	1755 – 1720 (v)	- COOH α-аминокислот
	1220 – 1020 (v)	- COOH α-аминокислот
	1410 (δ)	- COOH α-аминокислот
	3500 – 3300 (v)	-CONH ₂ (амид)
	1650 – 1590 (δ)	-CONH ₂ (амид)
	2600 – 2550 (v)	- SH
	3130 – 3030 (v)	NH ₃ ⁺
	1660 – 1610 (δ)	NH ₃ ⁺
	1585 – 1485 (δ)	NH ₃ ⁺
	3650 – 3590 (v)	- OH (свободная)
	1450 – 1250 (δ)	- OH (свободная)
	3030 (v)	- C ₆ H ₅ -
	900 – 690 (δ)	- C ₆ H ₅ -
	1260 – 1180 (v)	-OH (фенольный)
Трипсин панкреатический	2975 – 2860 (v)	- C – C -
	1470 – 1430 (δ)	- C – C -
	1380 – 1370 (δ)	- C – C -
	1755 – 1720 (v)	- COOH α-аминокислот
	1220 – 1020 (v)	- COOH α-аминокислот
	1410 (δ)	- COOH α-аминокислот
	3500 – 3300 (v)	-CONH ₂ (амид)
	1650 – 1590 (δ)	-CONH ₂ (амид)
	2600 – 2550 (v)	- SH
	3650 – 3590 (v)	- OH (свободная)
	1450 – 1250 (δ)	- OH (свободная)
	3030 (v)	- C ₆ H ₅ -
	900 – 690 (δ)	- C ₆ H ₅ -
	1260 – 1180 (v)	-OH (фенольный)
3500 – 3300 (v)	-NH- циклический имин	
1650 – 1550 (δ)	-NH- циклический имин	
крахмал	3400 (v)	- OH (свободная)
	2900 (v)	- C - H
	1059 (v)	- C - O-
Оливковое масло	1750 – 1700 (v)	-COO-
	1310 – 1295 (δ)	-CH=CH-
	690 (δ)	
	1059 (v)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH-CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{O-} \quad \text{O-} \quad \text{O-} \end{array}$
РНК дрожжевая	1300 – 960 (v)	P=O
	1630 – 1575 (v)	N=C
	1705 – 1660 (v)	C=O
	3500 – 3300 (v)	- NH-
	1650 – 1550 (δ)	-NH-

1	2	3
РНК дрожжевая	1650 – 1590 (v)	- NH ₂
	1220 – 1020 (v)	- C – N -
	1150 – 1060 (v)	- C – O – C -
	3650 – 3590 (v)	- OH (свободная)
	1450 – 1250 (δ)	- OH (свободная)
	1250 – 1200 (v)	- C – C -
	1075 – 1000 (δ)	- C – O -
	2975 – 2860 (v)	C – H
	1470 – 1430 (δ)	C – H
	1380 – 1370 (δ)	C – H
	1250 – 1200 (v)	C – O
Бычий сывороточный альбумин	3130 – 3030 (v)	NH ₃ ⁺
	1660 – 1610 (δ)	NH ₃ ⁺
	1550 – 1485 (δ)	NH ₃ ⁺
	3500 – 3300 (v)	- NH-
	1650 – 1530 (v)	- NH -
	2975 – 2860 (v)	- C – C -
	1470 – 1430 (δ)	- C – C -
	1380 – 1370 (δ)	- C – C -
	2700 – 2500 (v)	- COOH
	1580 – 1450 (v)	- C ₆ H ₅ -
	900 – 690 (δ)	- C ₆ H ₅ -
	1690 – 1630 (v)	- C=N
	2820 – 2810 (v)	C-N
	3040 – 3010 (v)	-CH=CH-
АОБ d ₁ -C ₇	2975 – 2860 (v)	- CH ₃
	1470 – 1430 (δ)	- CH ₃
	1380 – 1370 (δ)	- CH ₃
	3030 (v)	- C _{аром.} – H
	900 – 690 (δ)	- C _{аром.} – H
	1580 (v)	- C ₆ H ₅ -
	1500 (v)	- C ₆ H ₅ -
	1450 (δ)	- C ₆ H ₅ -
	3650 – 3500 (v)	-OH (фенольный)
	1450 – 1250 (δ)	-OH (фенольный)
АОБ d ₁ -C ₁₂	2975 – 2860 (v)	- CH ₃
	1470 – 1430 (δ)	- CH ₃
	1380 – 1370 (δ)	- CH ₃
	3030 (v)	- C _{аром.} – H
	900 – 690 (δ)	- C _{аром.} – H
	1580 (v)	- C ₆ H ₅ -
	1500 (v)	- C ₆ H ₅ -
	1450 (δ)	- C ₆ H ₅ -
	3650 – 3590 (v)	-OH (фенольный)
	1450 – 1250 (δ)	-OH (фенольный)
1250 – 1200 (δ)	- C – C -	

Таким образом, на основе кинетического метода исследований показано, что в ходе ферментативного гидролиза происходит образование промежуточных интермедиатов АОБ с ферментами. С использованием квантово-химических и термодинамических исследований, а также ИК-спектроскопии установлена единая схема взаимодействия АОБ с ферментами, предполагающая образование водородных связей между гидроксильными группами АОБ и атомами азота, кислорода и серы, входящими в состав аминокислот молекул ферментов, а также гидрофобными взаимодействиями.

Список литературы

1. Красноштанова А.А. Разработка научных основ технологии получения ферментативных гидролизатов биополимеров на основе отходов пищевой и микробиологической промышленности. Дисс...докт. хим.наук. – М.: РХТУ, 2009. – 40 с.
2. Капрельянц А.С., Скрыпин В.И., Эль-Регистан Г.И., Островский Д.Н., Дуда В.И. Изменение структурного состояния мембран *A. lysodecticus* под влиянием препаратов ауторегуляторных факторов d₁. //Прикл. биохимия и микробиология. – 1985. – Т. 21. – № 31. – С. 378–381.
3. Красноштанова А.А., Крылов И.А., Карпо Б.С., Манаков М.Н. Кислотный гидролиз белковых веществ биомассы промышленных микроорганизмов. Количественные закономерности процесса. 2. Кинетика гидролиза белковых фракций дрожжей и бактерий. // Биотехнология. – 1996. – № 3. – С. 45 – 49.
4. Неклюдов А.Д., Иванкин А.Н. Биологически активные соединения из природных объектов. Свойства и структурно-функциональные взаимосвязи –М.: МГУЛ, 2003. – 480 с.

Содержание

Предисловие	4
Введение	5
Сокращения.....	7
Часть I. ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БЕЛКОВЫХ СИСТЕМ.....	9
Глава 1. Свойства и основы применения белковых гидролизатов.....	9
Список литературы.....	30
Глава 2. Химические основы гидролиза белковых макромолекул.....	35
Список литературы.....	55
Глава 3. Основы технологии получения и очистки белковых гидролизатов.....	57
Список литературы.....	70
Глава 4. Важнейшие протеолитические ферменты	77
Список литературы	88
Глава 5. Количественные закономерности ферментативного гидролиза белковых веществ на модельной системе альбумин (БСА) – трипсин.....	89
Список литературы	102
Глава 6. Ферментативная экстракция белковых веществ из биомассы дрожжей и бактерий в присутствии протосубтилина ГЗх.....	102
Список литературы	109
Глава 7. Количественные закономерности ферментативного гидролиза микробных белков ферментными системами поджелудочной железы (ПЖ) крупного рогатого скота (КРС).....	109
Глава 8. Методы очистки ферментативных гидролизатов из биомассы дрожжей и бактерий в присутствии протосубтилина ГЗх и протеаз поджелудочной железы животного происхождения.....	120
Список литературы	125
Глава 9. Разработка научных основ технологии получения белковой фракции из пивной дробины.....	140
Глава 10. Технологические приемы получения гидролизатов белковой природы на основе кератинсодержащего сырья.....	129
Список литературы	134
Глава 11. Биодegradация важнейшего структурного белка – коллагена животных и гидробионтов	135
Список литературы	183
Часть II. ГИДРОЛИЗ ЛИПИДОВ.....	186
Глава 12. Химические основы гидролиза липидов природного происхождения	186
Список литературы	210
Глава 13. Технические жиры. Практическое значение гидролизатов липидной природы. Панкреатические липазы.....	211
Список литературы	222
Глава 14. Количественные закономерности гидролиза оливкового масла панкреатической липазой	224

Глава 15. Разработка технологии гидролиза жировых отходов мясоперерабатывающей промышленности панкреатической липазой	231
Глава 16. Гидролиз липидсодержащих отходов сельскохозяйственного производства с целью получения биотоплива	235
Список литературы.....	242
Часть III . ГИДРОЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ. РАСПАД И ФРАГМЕНТАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ	243
Глава 17. Теоретические основы получения гидролизатов углеводной природы	243
Список литературы	271
Глава 18. Исследование количественных закономерностей ферментативного гидролиза крахмала панкреатической α -амилазой	275
Глава 19. Количественные закономерности ферментативного гидролиза крахмала глюколамилазой <i>Asp. Awamori</i> 310.....	283
Глава 20. Гидролиз целлюлозы комплексным ферментным препаратом целловиридином ГЗх	290
Глава 21. Технология получения водорастворимой углеводной фракции из пивной дробины	297
Часть IV. ГИДРОЛИЗ ПОЛИ- И ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ.....	300
Глава 22. Нуклеиновые кислоты.....	300
Глава 23. Практическое значение панкреатического гидролизата РНК.....	304
Список литературы	313
Глава 24. Получение панкреатического гидролизата дрожжевой РНК.....	315
Часть V. ОБЩИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ СТАБИЛИЗАЦИИ И ГИДРОЛИТИЧЕСКОГО РАСПАДА БИОМАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ.....	332
Глава 25. Молекулярные шапероны	332
Список литературы	360
Глава 26. Общие закономерности ферментативного гидролиза субстратов различного происхождения в присутствии алкилоксибензолов...	378
Список литературы.....	392
Содержание.....	393

Учебное издание

Иванкин Андрей Николаевич
Красноштанова Алла Альбертовна

БИОПОЛИМЕРЫ И ИХ ДЕГРАДАЦИЯ
В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

Под редакцией авторов

Компьютерный набор и верстка А.Н. Иванкина, А.А. Красноштановой

По тематическому плану внутривузовских изданий учебной литературы на 2016 год.

Подписано в печать 26.02.2016. Формат 60х90 1/16. Бумага 80 г/м²
Гарнитура "Таймс". Ризография. Усл. печ. л. 24,75.
Тираж 100 экз. Заказ N

Издательство Московского государственного университета леса.141005,
Мытищи –5, Московская обл., 1-я Институтская, 1, МГУЛ.
e-mail: izdat@mgul. ac.ru

Biopolymers and their degradation in the environment

Prof. Andrew N. Ivankin

Moscow Forest State University

Prof. Alla A. Krasnoshtanova

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

MFSU Publishers – Moscow – 2016