

Сопоставляя результаты экспериментов, можно сделать вывод, что основной вклад в процесс удаления фурфурола из раствора обеспечивает сорбция его носителем и достигнуть успеха можно без участия микрофлоры. В действительности носитель способен сорбировать ограниченное количество фурфурола (до полного насыщения), а микрофлора, закрепленная на носителе, обеспечивает его биологическую регенерацию, осуществляя деструкцию фурфурола, и, таким образом, делает возможным длительное непрерывное функционирование биосистемы без термической регенерации носителя или его замены.

Проведенные исследования показали, что для создания биосистемы с иммобилизованной микрофлорой, обеспечивающей эффективную деструкцию фурфурола, целесообразно использовать в качестве носителя углеродные волокна (У-6М, БТ-7), которые непосредственно участвуют в сорбционном извлечении фурфурола из водной фазы. Процесс может быть реализован в исключительно дешевой ферментационной среде – сточной воде гидролизного производства при участии спонтанно развивающейся микрофлоры (нет необходимости в накоплении чистых культур микроорганизмов). Указанные достоинства процесса обуславливают целесообразность разработки промышленной установки для биосорбционной очистки газовых выбросов или жидких фурфуролсодержащих отходов гидролизного производства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Холькин Ю.И. Технология гидролизных производств.– М.: Лесная промышленность, 1989.– 496 с.
2. Попов В.О., Безбородов А.М. Опыт создания промышленной технологии микробиологической очистки газовойоздушных выбросов // Прикл. биохимия и микробиол.– 1999.– Т. 35. – № 5.– С. 570–577.

УДК 663.53

В.Н. Леонтьев, доцент; Т.И. Ахрамович, ассистент; Н.И. Герасимчик, студентка;
Т.М. Кривенкова, мл. науч. сотрудник НТЦ РУП «МБИ»;
К.М. Белявский, директор НТЦ РУП «МБИ»;
А.М. Босенко, зав. лабораторией ОАО «Белмедпрепараты»

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

The application of method of gel-filtration for perfection technology of amylolytic enzymes preparations has done.

В последнее время амилолитические ферментные препараты находят все более широкое применение в народном хозяйстве Республики Беларусь. Амилазы используются почти во всех областях, где перерабатывается крахмалсодержащее сырье. Самыми большими потребителями амилолитических ферментов являются спиртовая и пивоваренная промышленности, где в настоящее время солод (проросшее зерно) успешно заменяют амилолитическими ферментными препаратами. Эти препараты также используются в хлебопечении, крахмалопаточном производстве для получения различных видов патоки, глюкозы, в текстильной промышленности как добавки, улучшающие качество тканей при окрашивании. В настоящее время уделяется внимание использованию

амилаз при переработке различных крахмалсодержащих отходов в кормовые белковые препараты.

В Республике Беларусь ферментные препараты, обладающие глюкоамилазной активностью, производятся на ОАО «Белмедпрепараты» (г. Минск) и РУП «Энзим» (г. Пинск). Ранее нами были исследованы и описаны свойства отечественного ферментного препарата амилоглюкаваморин Г20х (РУП «Энзим»). Установлено, что максимальная активность фермента наблюдалась при температуре 70°C, pH 4,5 и при концентрации белка 0,8 мг/мл (концентрация субстрата 2%), причем данный ферментный препарат обладал большей термостабильностью по сравнению с таким же импортным ферментным препаратом (время потери 50% активности фермента при температуре 70°C и pH 4,5 составляло 240 мин против 75 мин для импортного препарата). Кроме того, результаты исследования состава ферментного препарата и определения молекулярных масс его белков с помощью метода колоночной гель-хроматографии показали, что ферментный препарат состоит из 4-х различных полипептидов с молекулярными массами 74, 55, 38, 5 кДа, два из которых являются глюкоамилазой (молекулярная масса 74 кДа) и α -амилазой (молекулярная масса 38 кДа) (рис. 1) [1].

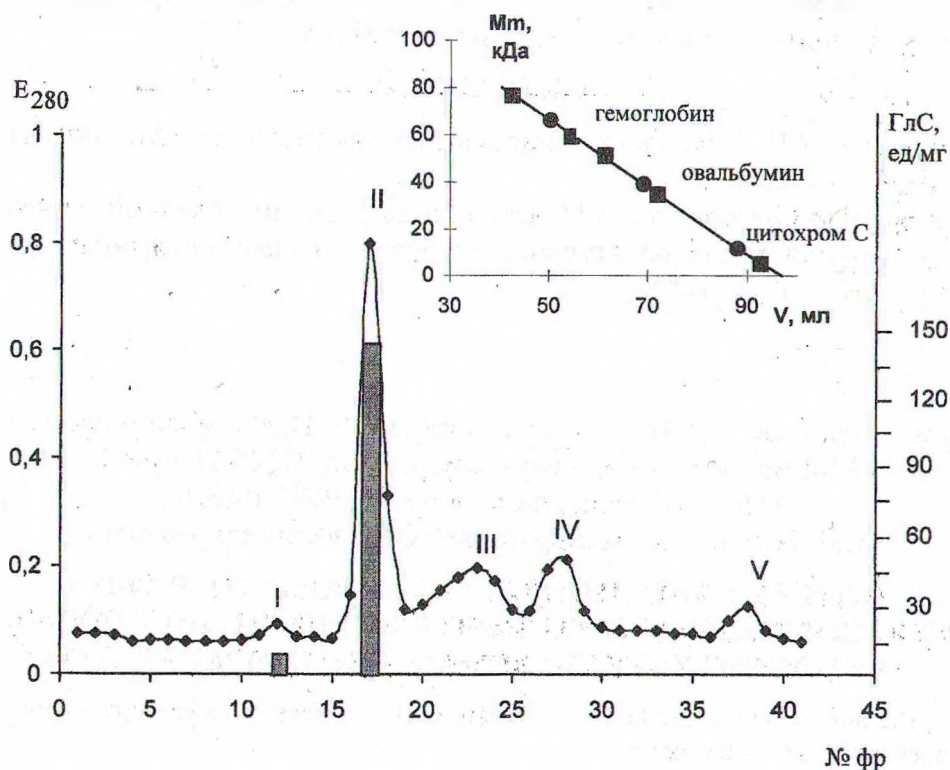


Рис. 1. Гель-хроматограмма ферментного препарата амилоглюкаваморин Г20х: колонка 1,2x75 см; носитель – Тоуорепарл HW-55; элюент – 0,1 М ацетатный буфер (pH 4,5); скорость элюирования 1 мл/мин·см²; объем фракции 2,3 мл

Ферментный препарат глюкаваморин Гх, выпускаемый ОАО «Белмедпрепараты», используется в спиртовой промышленности для осахаривания частично расщепленных α -амилазой полимерных молекул крахмала при температуре 55–62°C. Это позволяет

интенсифицировать процесс брожения и повысить выход спирта из единицы перерабатываемого сырья. В комплексе с амилосубтилином глюкаваморин Гх позволяет полностью исключить солод из спиртового производства.

При производстве ферментного препарата глюкаваморин Гх в качестве отхода производства образуется мицелий гриба-продуцента *Aspergillus awamori* 87. Этот мицелий частично используют в производстве лекарственного препарата «Биен» и ферментного препарата «Фекорд Б». В связи с этим нами была изучена возможность применения автолизата гриба *A. awamori* 87 в качестве компонента питательной среды при производстве ферментного препарата глюкаваморин Гх взамен закупаемого за рубежом кукурузного экстракта. Использование метода колоночной гель-хроматографии позволяет исследовать белковый спектр автолизатов, выявлять определенные ферменты и определять их молекулярные массы.

В качестве основных критериев оценки качества автолизата были использованы следующие параметры: содержание аминного азота, рН автолизата, количество оставшейся после автолиза биомассы, скорость фильтрования, время автолиза и белковый спектр автолизата. Процесс автолиза биомассы гриба *A. awamori* 87 проводили при температуре 20°C, 30°C и 40°C в присутствии и в отсутствие комплекса гидролитических ферментов [2].

Результаты исследования процесса автолиза биомассы гриба *A. awamori* 87 свидетельствуют о том, что для проведения процесса автолиза достаточно 6-ти суток. В течение этого времени более эффективно происходит процесс гидролиза белков с высвобождением низших пептидов и аминокислот (содержание аминного азота в автолизатах через 8 суток гидролиза увеличивается незначительно). Применение комплекса гидролитических ферментов несколько повышает содержание аминного азота в автолизатах и существенно уменьшает количество оставшейся после автолиза биомассы [2].

Наиболее выгодным является проведение автолиза при 30°C, т.к. при 20°C и 40°C наблюдается меньший выход аминного азота и остается большее количество биомассы.

В полученных автолизатах с использованием метода колоночной гель-хроматографии на Toyopearl HW-55 определяли наличие и молекулярные массы белков. В результате показано, что основным компонентом автолизата *A. awamori* 87, полученного без добавления комплекса гидролитических ферментов, является полипептид с молекулярной массой 22 кДа (рис. 2). Условия хроматографирования те же, что и на рис. 1. Гель-хроматограмма автолизата *A. awamori* 87, полученного с применением комплекса гидролитических ферментов, содержит 5 хроматографических пиков индивидуальных полипептидов с молекулярными массами от 22 до 64 кДа (рис. 3). Условия хроматографирования те же, что и на рис. 1.

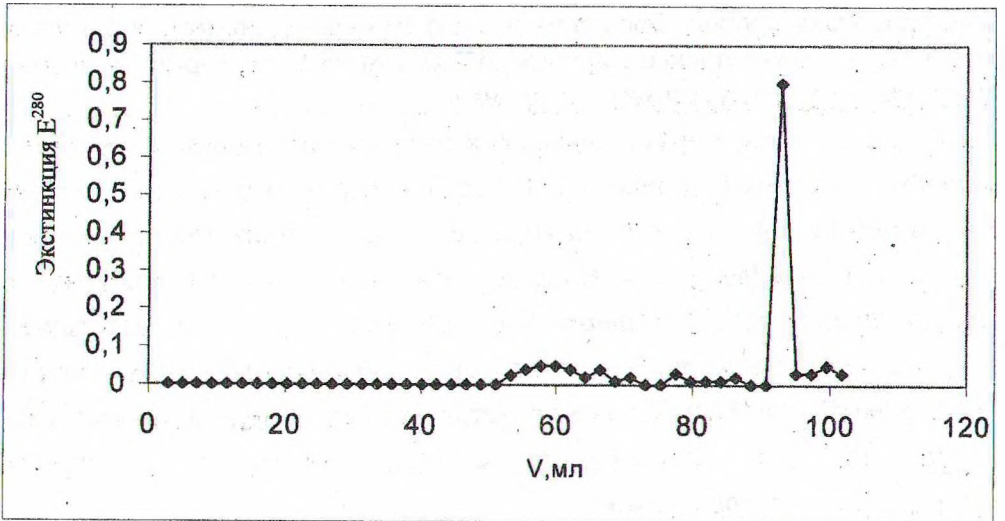


Рис. 2. Гель-хроматограмма автолизата *A. awamori* 87, полученного без применения комплекса гидролитических ферментов

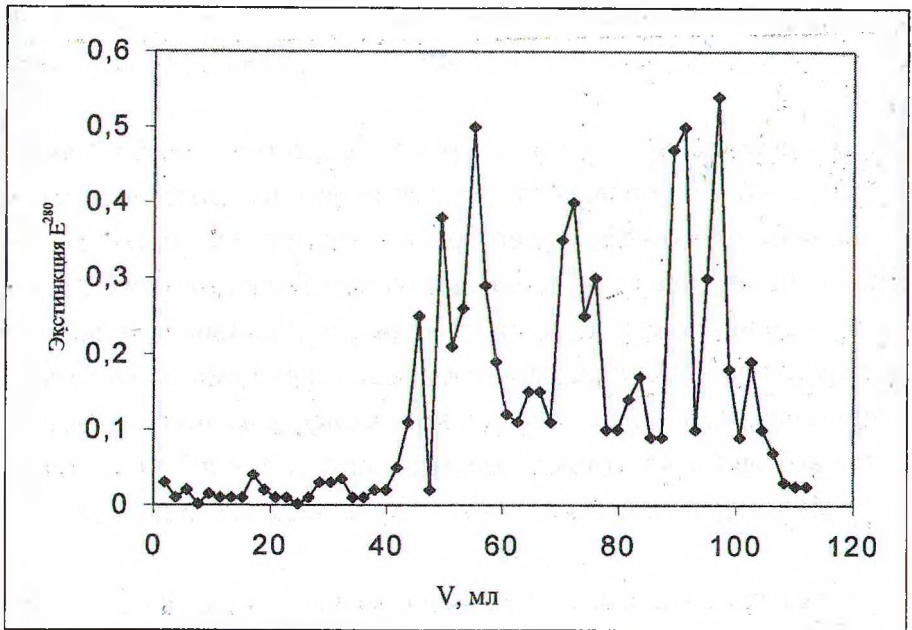


Рис. 3. Гель-хроматограмма автолизата *A. awamori* 87, полученного с применением комплекса гидролитических ферментов

Для того чтобы выделить из полученного белкового спектра (рис. 3) белки, вносимые с комплексом гидролитических ферментов, провели хроматографическое разделение ферментного комплекса при тех же хроматографических условиях и определили в полученных фракциях ксиланазную, целлюлазную и β -глюканазную активности. Результаты представлены на рис. 4–6. Условия хроматографирования те же, что и на рис. 1.

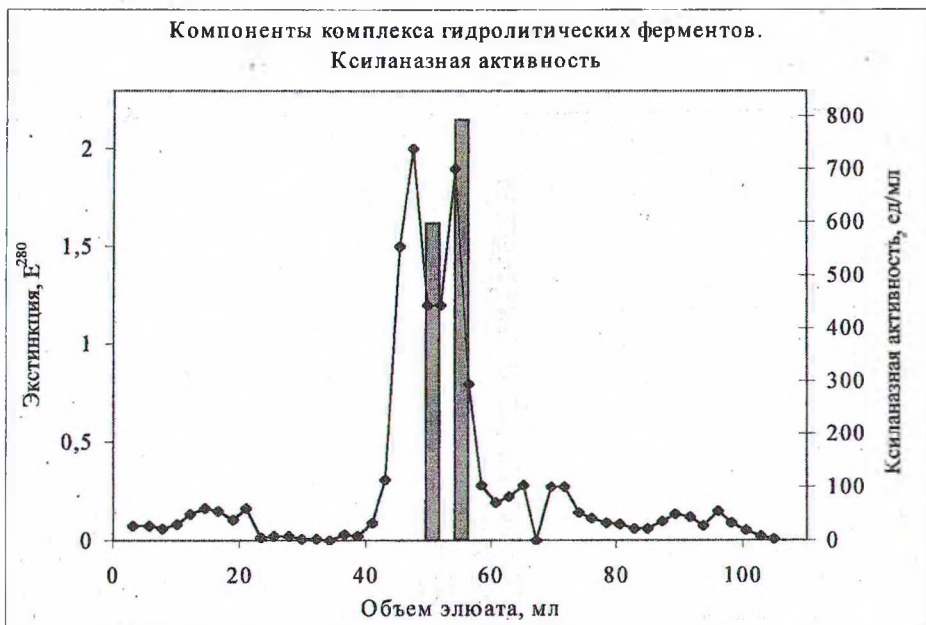


Рис. 4. Профиль элюирования комплекса гидролитических ферментов.
Ксиланазная активность

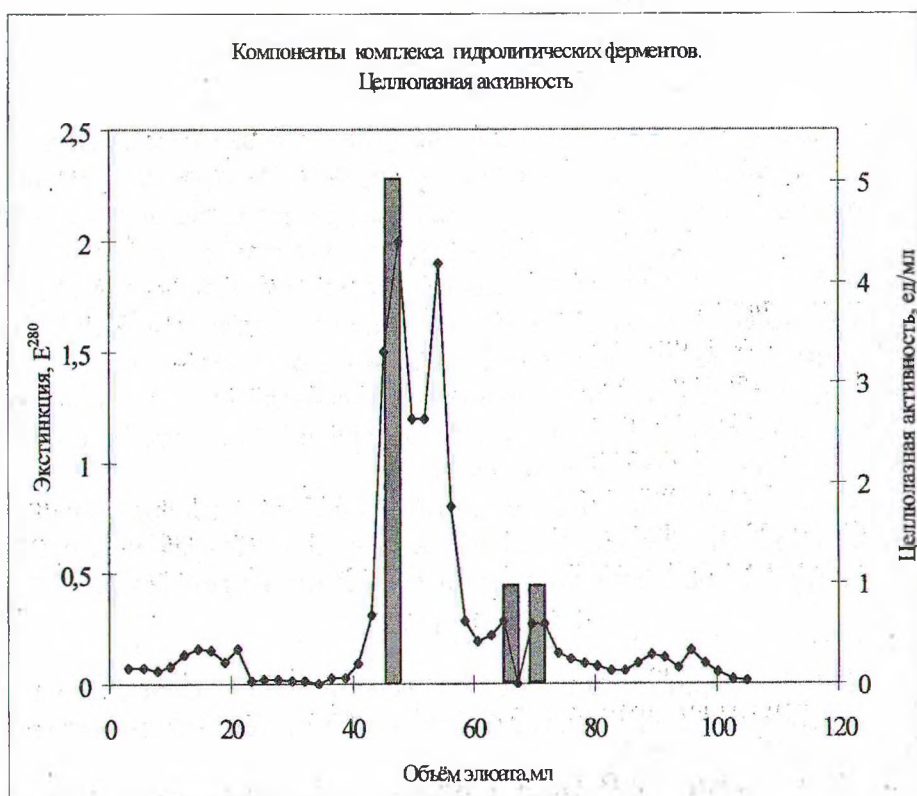


Рис. 5. Профиль элюирования комплекса гидролитических ферментов.
Целлюлазная активность

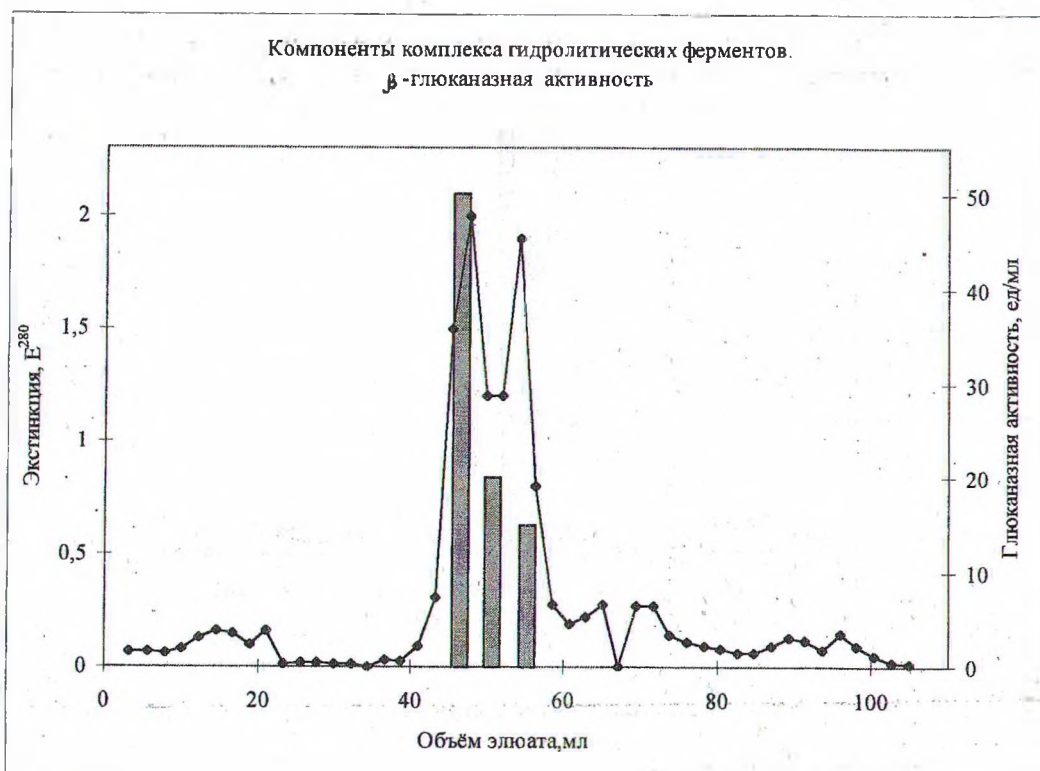


Рис. 6. Профиль элюирования комплекса гидролитических ферментов.
β-глюкоканазная активность

Дополнительный анализ содержания общего белка и аминного азота в автолизатах и сравнение этих данных с таковыми для кукурузного экстракта позволили сделать вывод о том, что автолизат *A. awamori* 87 (температура автолиза 30°C) с добавлением ферментного комплекса может быть использован в качестве компонента питательной среды вместо кукурузного экстракта при производстве глюкаваморина Гх. Однако наличие в автолизате существенного негидролизованного количества белка является потенциальным источником аминокислот и дает возможность предположить, что последующее применение гидролитических ферментов целлюлазного комплекса позволит ускорить процесс разрушения клеточных стенок *A. awamori* 87, сократить время автолиза и существенно улучшить качество автолизата.

Таким образом, представленные результаты подробно иллюстрируют широкие возможности использования метода колоночной гель-хроматографии для совершенствования технологических процессов получения ферментных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леонтьев В. Н., Кривенкова Т. М., Белявский К. М. Сравнительный анализ амилолитических ферментных препаратов // Труды БГТУ. Сер. химии и технологии орган. в-в. – 2002. – Вып. X. – С. 3–9.
2. Босенко А. М., Леонтьев В. Н., Ахрамович Т. И., Герасимчик Н. И. Совершенствование технологии получения ферментного препарата глюкаваморин Гх // Новые технологии в химической промышленности: Материалы Междунар. науч.-техн. конф. – Мн., 2002. – С. 137–139.