

3. Миркин, Н.Г. Разработка основ технологии переработки жиросодержащих отходов мясоперерабатывающей промышленности/ Н.Г.Миркин, А.В.Кошелева, И.Б.Горнова, Н.Б.Градова, А.В.Цапина //Химическая промышленность сегодня. - Москва, 2000. С. 28-31.
4. Суясов, Н.А. Биоконверсия твердой фазы сточных вод мясокомбинатов/ Н.А.Суясов, И.В.Шакир, В.И. Панфилов // Мясная индустрия, 2005.- № 10.- С. 65-67.
5. Патент 2004121603 РФ, МПК А23К1/00, А23К1/165. Способ получения белковой кормовой добавки/ И.В.Шакир, Н.А.Суясов, Б.А.Кареткин, И.А.Крылов, В.И.Панфилов, А.В.Ва-силев. Заявлен 15.07.2004, опубликован 10.01.2006. Бюл. № 01.

УДК 577.152.277*16:663.15

Е. А. Дудникова, Е. А. Питтель

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

РАЗРАБОТКА СТАДИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ РИБОНУКЛЕАЗЫ ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКЕ БЫЧЬЕЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.

The possibility of use of stages ultrafiltration, diafiltration and precipitation from water and water-alcohol solutions for isolation ribonuclease from extracts was investigated.

Исследована возможность применения стадии ультрафильтрации, диафильтрации и осаждение из водно и водно-спиртовых растворов для выделения рибонуклеазы из экстракта.

Рибонуклеаза (РНК-аза) поджелудочной железы крупного рогатого скота (КРС), являющаяся наиболее изученной и нашедшей широкое применение нуклеазой, относится к рибонуклеазам (I) (рибонуклеинат - 3'- пиримидино-олигонуклеотидгидролазам) – эндонуклеазам, ускоряющим реакцию гидролиза по пиримидиновым нуклеотидным остаткам.

Терапевтическое применение РНК-азы включает лечение заболеваний дыхательных органов, таких как бронхит, астма; в оториноларингологии, при лечении отитов и трахеобронхита; в одонтологии, например при лечении пародонтоза и в хирургии, при обработке заражённых ран и ожогов [1]. Также РНК-азу используют для получения панкреатического гидролизата дрожжевой РНК, известного под названием Энкад [2]. Характерной особенностью этого фермента является то, что он устойчив в широком интервале значений рН и термостабилен в слабокислых растворах, а в щелочи инактивируется очень легко [3]. Существуют технологии выделения фермента из ПЖ в жёстких условиях, которые позволяют инактивировать другие ферменты, но с другой препарат РНК-азы оказывается загрязнённым большим количеством балластных белков, что осложняет его очистку.

Комплексная переработка биомассы поджелудочной железы (ПЖ) предполагает одновременное получение нескольких ферментов. Поэтому, прежде всего, необходимо подобрать условия наиболее полного извлечения одного фермента при минимальных потерях активности других. Из литературных данных известно [4], что помимо РНК-азы протеазы также обладают достаточной устойчивостью в кислых растворах, что нельзя сказать об амилазе и липазе. Поэтому эти ферменты извлекают на первой стадии обработки ПЖ, рибонуклеазу выделяют в последнюю очередь.

Целью данной работы была разработка технологии и подбор оптимальных условий для извлечения РНК-азы из поджелудочной железы крупного рогатого скота, прошедшей выделение других ферментов.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использовали поджелудочную железу крупного рогатого скота (ПЖ КРС), которая являлась твёрдым отходом

после извлечения амилазы, липазы и комплекса протеаз. Поджелудочная железа после выделения всех ферментов характеризовалась следующими параметрами: содержание сухих веществ (СВ) 20% и белка 15% от СВ и активностями Арнк-зы = 950 ед./мг белка, Апротеазы = 6 ед./мг белка и Аамилазы = 1,25 ед./мг белка. Процесс экстракции фермента из биомассы поджелудочной железы проводили в стеклянном аппарате ёмкостью до 1 л, снабжённый мешалкой и штуцерами для установки термометра и отбора. При проведении опытов в прогретый до требуемой температуры реактор вносили заранее приготовленную суспензию биомассы измельчённой поджелудочной железы и устанавливали рН среды, момент окончания прогрева суспензии (время прогрева не превышало 5 мин) принимали за начало процесса экстракции.

Активность ферментов измеряли по методикам [5], содержание белка измеряли модифицированным методом Лоури [6]. Для отделения шлама ПЖ КРС после проведения экстракции проводили центрифугирование при 6000 об/мин в течение 10 минут. Для изучения процесса ультраконцентрирования использовали лабораторную ячейку с рабочим давлением 0,2 МПа. Использовали мембрану марки УПМ-10 отечественного производства ЗАО НТЦ «Владипор». При проведении процесса осаждения использовали мерные стеклянные или пластиковые сосуды с крышками. Осаждение проводили, используя растворы соляной кислоты и гидроксида натрия. Для полноты осаждения растворы охлаждали до 4-6 °С. После установления необходимого значения рН отбирали пробы для анализа с определённой высоты столба жидкости в определённые промежутки времени. Все использованные в работе реагенты были отечественного производства и имели квалификацию не ниже «чда».

Достоверность полученных экспериментальных данных оценивали по результатам трех параллельных опытов, используя критерий Стьюдента для уровня значимости 0,05. Величина доверительного интервала в определении активности ферментов составила не более $\pm 5\%$. Обработку экспериментальных данных осуществляли, используя стандартные программы численного интегрирования по методу Рунге-Куты четвёртого порядка и оптимизации параметров дифференциальных уравнений. В качестве критерия оптимизации использовали минимум суммы квадратов отклонений между расчетными и экспериментальными значениями концентраций (активности) ферментов. Проверку разработанной математической модели на адекватность проводили по критерию Фишера ($F_{\text{оп.}} < F_{\text{табл.}}$)

Результаты и обсуждение. Экстракцию рибонуклеазы проводили в ранее подобранных оптимальных условиях: температура 6 °С, концентрация H_2SO_4 0,25н, время экстракции 8 часов. В полученном экстракте содержались следующие ферменты: амилаза - АС 0,1024 ед./мл; РНК-азы 15815 ед./мл и белок 0,44 г/л. ДНК-азу, липазу и протеолитические ферменты полученный экстракт не содержал.

Так как экстракты имеют достаточно низкую ферментативную активность, ультрафильтрация позволяет повысить эту активность и тем самым снизить потери ферментов при осаждении в изоэлектрической точке (ИЭТ). Для используемой мембраны были определены удельная производительность G [л/м² · ч] (рис. 1) и дифференциальная селективность $f_{\text{диф}}$ (рис. 2) [7]. По полученным данным рассчитали концентрацию (активность) гелеобразования Агел. = 66171,16 ед./мл, что соответствует степени концентрирования в 4,2 раз, при интегральной селективности 0,66. Таким образом, в ходе ультрафильтрации активность рибонуклеазы повысилась в 3,6 раза. Однако, в связи с тем, что селективность по белковым веществам была выше, чем по РНК-азе, удельная активность (ед./мгбелка) понизилась. Поэтому на следующем этапе исследования провели очистку ретанта диафильтрацией.

При проведении стадии диафильтрации концентрат разбавляли вдвое водой и концентрировали до прежнего объёма. При выполнении эксперимента оценили кратность диа-

фльтрации, обеспечивающую максимальную очистку рибонуклеазы. В диафильтратах контролировали активность рибонуклеазы и содержание белковых веществ.

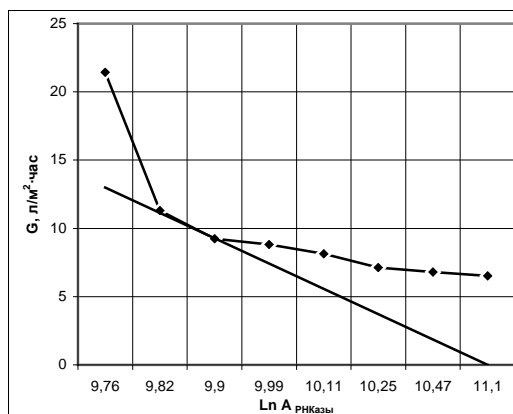


Рис. 1. Зависимость удельной производительности мембраны УПМ 10 от концентрации РНК-азы в концентрате (в полулогарифмических координатах).

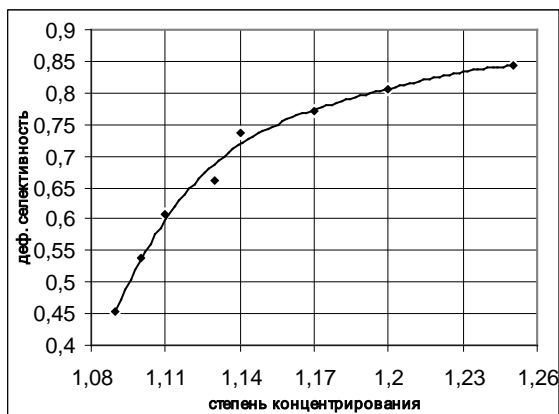


Рис. 2. Зависимость дифференциальной селективности мембраны УПМ 10 от степени концентрирования РНК-азы.

Полученные данные представлены на рис. 3. Из данных следует, что при кратности диафильтрации 4 и 5 не наблюдается рост удельной активности, поэтому целесообразно ограничиться тремя циклами. На следующем этапе исследований перешли к изучению стадии осаждения. Для осаждения ферментов, как известно из литературных данных, используется осаждение из водных или водно-спиртовых растворов. Причём, в целях экономии органического растворителя, как правило, первое осаждение проводят из водного раствора, а второе – из водно-спиртового. Поэтому, на первом этапе исследований мы изучили процесс осаждения рибонуклеазы из водного раствора. Прежде всего, мы определили значение pH среды, отвечающее максимальному осаждению рибонуклеазы и минимальному осаждению балластных белков. Соответствующие зависимости представлены на рис. 4.

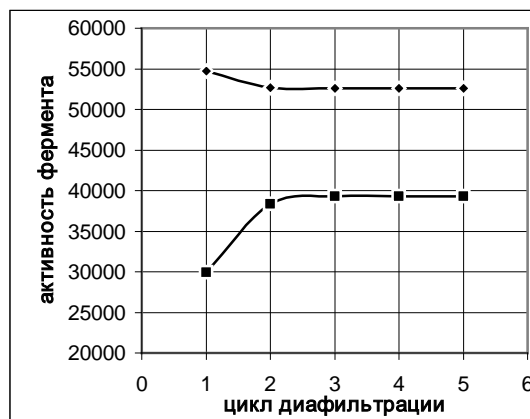


Рис. 3. Зависимости активностей РНК-азы от цикла диафильтрации. ■ ед./г (уд. акт); ◆ ед./мл

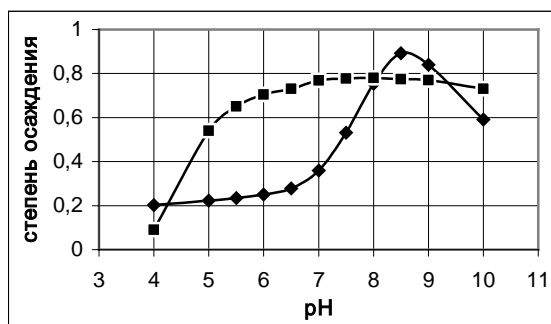


Рис. 4. Кривые зависимости степени осаждения белковых веществ и РНК-азы от pH. ■ белок; ◆ РНК-аза

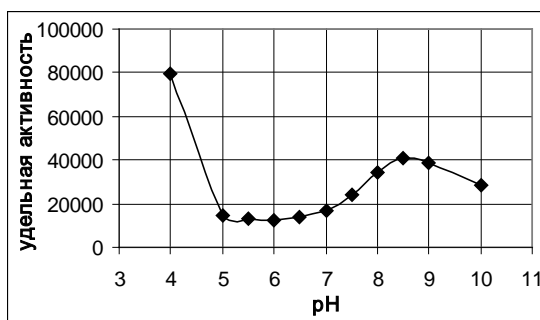


Рис. 5 Зависимость активности РНК - азы (удельной) в осадках от значения pH.

Из представленных данных видно, что оптимальным значением рН для осаждения РНК-азы является рН 8,5. Обращают на себя внимание данные по удельной активности полученных при различных рН осадков (рис. 5). При рН 4 удельная активность осадка составляет 80000 ед/мг, что даже выше, чем при оптимальном рН 8,5. Наблюдаемый факт можно объяснить тем, что при рН 4 степень осаждения РНК-азы не превышает 20%, а балластных белков 10%. Всё это и приводит к получению осадка с такой высокой удельной активностью. Однако данное значение рН нельзя считать оптимальным для выделения РНК-азы, так как выход продукта очень невысок.

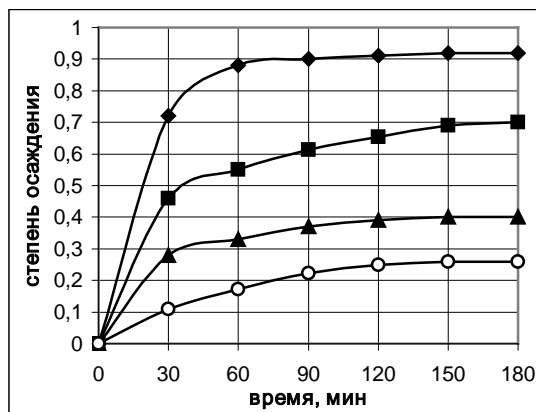


Рис. 6. Зависимости степени осаждения рибонуклеазы из концентрата с различным содержанием фермента в ИЭТ. ♦ 52687 ед./мл; ■ 26343 ед./мл; ▲ 10737 ед./мл; ○ 5269 ед./мл.

В результате получили осадок с удельной активностью 45218 ед./мг. Таким образом, осаждение позволяет повысить удельную активность препарата в 1,2 раза. Однако полученный осадок был окрашен в желтоватый цвет, поэтому на следующем этапе для его очистки от сопутствующих примесей мы применили осаждение из водно-спиртового раствора.

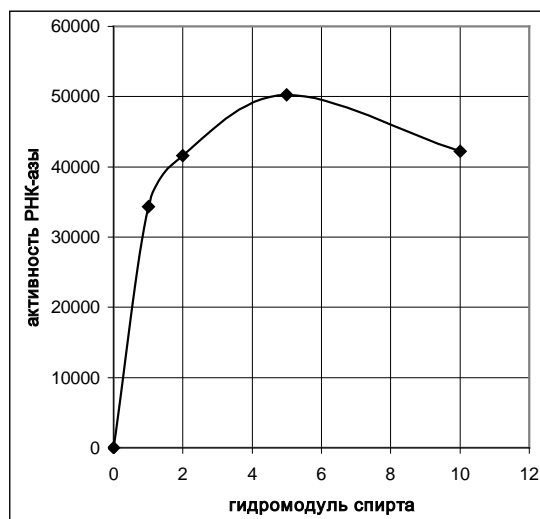


Рис. 7. Зависимость удельной активности РНК-азы от гидро модуля спирта.

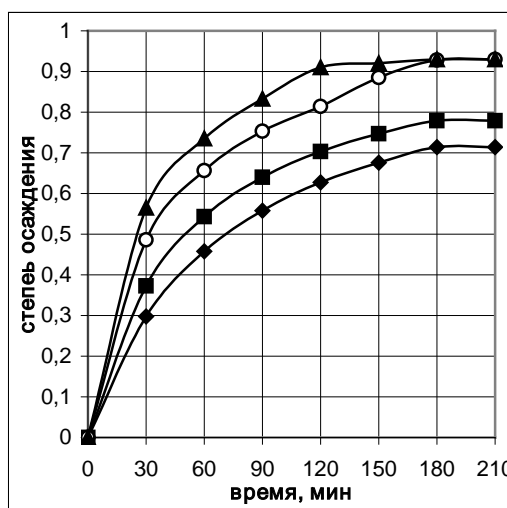


Рис. 8. Кривые осаждения РНК-азы в зависимости от гидро модуля этанола. Объемное отношение раствора РНК-азы: этанол: ♦1:1; ■ 1:2; ○ 1:5; ▲ 1:10

Мы исследовали влияние объемного соотношения спирт : раствор РНК-азы, на степень осаждения. Полученные данные представлены на рис.7. При этом была получена

серия кинетических кривых, представленных на рис. 8. Из представленных данных видно, что оптимальным соотношением является 1:5. При этом чистота препарата по сравнению с исходной повысилась в 1,28 раза. Полученный в ходе пересадки препарат имел удельную активность 57879 ед./мг, что соответствует качеству медицинского препарата.

Список литературы

1. Ryshka F.J., Polonskaya L.B., Belenky N.G., Tsygankova V.N., Chamin N.N., Khokhlov A.S. A process for Preparing Pure Ribonuclease. Patent 1,173,558, publ. 10.12.69.
2. Фукс, Б.Б. Способ получения рибонуклеотидов. – А.с. СССР 1575359. Оpubл. 01.03.90/ Б.Б.Фукс, М.Е.Шабанова, С.Н.Федоров, Ю.М. Краснопольский и др.
3. Справочник по биохимии. Под ред. Ф.Л. Калинина, В.П. Лобова, В.А. Жукова. – Киев: Наукова Думка, 1971. – 800 с.
4. Грачёва, И.И. Технология ферментных препаратов.-3-е издание./ И.И.Грачёва, А.Ю.Кривова.- М.: Издательство «Элевар», 2000.-512с.
5. Methods in Enzymology Worthington Biochemical Corporation Freehold, New Jersey, 1965
6. Практикум по биохимии: Учеб. Пособие/ Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьёвой. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1989.-509с.
7. Мулдер, М. Введение в мембранную технологию/ М.Мулдер.- М.: Мир, 1999. -513 с.

УДК 658.382.1:338.45

А.Н. Кочетов, В.М. Панарин

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
Тульский государственный университет, Тула, Россия

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ В СЛУЧАЕ ВЫБРОСОВ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В АТМОСФЕРЕ

Для оценки вероятности поражения индивидуума использован аппарат пробит–функции через токсонагрузку.

Вопросы обеспечения техногенной, и как следствие экологической безопасности территории и объектов экономики, являются приоритетными в выборе стратегии дальнейшего их развития.

Количественно индивидуальный риск заключается в определении вероятности возникновения события, имеющего поражающие факторы и в определении вероятности (степени) поражения человека.

Первая вероятность определяется на базе статистических данных. Крупные аварии, как правило, характеризуются комбинацией случайных событий возникающих с различной частотой на разных стадиях формирования и развития аварий (отказы оборудования, ошибки человека, нерасчетные внешние воздействия, разрушение, выброс, пролив вещества, рассеяние веществ, воспламенение, взрыв, интоксикация и т.д.). При расчете вероятности токсического поражения широкое распространение получил аппарат пробит–функций. Сущность данного подхода базируется на том, что одна и та же мера воздействия (количество поглощенного вещества, доза радиации, импульс давления и т.п.) может вызвать последствия разной тяжести у различных людей, т.е. «эффект поражения» носит вероятностный характер. Величина вероятности поражения $P_{i\bar{i}0}$ (измеряется в долях