

На правах рукописи

Хабибулина Наталья Викторовна

**Использование соевого шрота для получения
биологически активных веществ и оценка их
функциональной активности**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2012

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

Научный руководитель: Доктор химических наук, доцент
Красноштанова Алла Альбертовна

Официальные оппоненты: Доктор технических наук, доцент
кафедры «Аналитическая химия»
Московского государственного
университета пищевых производств
Милорадова Елена Васильевна

Кандидат технических наук, доцент
отдела биосинтетических и
биокаталитических нанотехнологий
ферментов, дрожжей,
органических кислот и БАД
Всероссийского научно-исследовательского
института пищевой биотехнологии РАСХН
Курбатова Елена Ивановна

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский
институт лекарственных и ароматических
растений (ВИЛАР)

Защита состоится «22» мая 2012 г. в 15 ч. 00 мин. на заседании объединенного диссертационного совета ДМ 212.204.13 в Российском химико-технологическом университете им. Д. И. Менделеева по адресу: 125047, г. Москва, Миусская пл., д. 9, в аудитории 433 (конференц-зал).

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

Автореферат диссертации разослан «19» апреля 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ДМ 212.204.13

Шакир И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из наиболее перспективных видов растительного сырья, характеризующегося высоким содержанием биологически активных веществ, является соя. Площади посевов сои в мире постоянно растут, в 2010 году они составили 70 млн. га, а объем продукции, произведенной из соевых бобов, превысил 200 млн. т [Толоконников В.В., 2010].

Технологии переработки соевых бобов основаны на извлечении из них различных компонентов: масел, белков, различных биологически активных соединений. Традиционно, соя представлена на рынке такими продуктами, как соевое масло, соевые молоко и молочные продукты, концентраты, изоляты и гидролизаты белка, при этом ассортимент продуктов на основе сои постоянно расширяется. В последние годы сою стали использовать не только в пищевой промышленности (при производстве мясных и кондитерских продуктов, в хлебопечении), но и в лечебно-профилактическом питании; при создании БАД; медицине и фармацевтике для производства препаратов, подавляющих активность протеаз, антиканцерогенных препаратов, при осуществлении гормонозаместительной терапии и др. [Храмцов А.Г., 2003]. Расширение спектра отраслей, в которых используются соевые продукты, обуславливает актуальность исследовательских работ, направленных на ее глубокую переработку.

Особое внимание уделяют таким продуктам, как изолят белка, изофлавоноиды и ингибиторы протеаз. Общим недостатком существующих технологий их выделения из сои является узкая направленность на получение одного целевого продукта с образованием большого количества трудноутилизируемых отходов, характеризующихся наличием ценных соединений.

Разработка технологии переработки соевого шрота, предусматривающей получение в рамках одной технологической схемы ряда биологически активных веществ, обладающих высокой функциональной активностью (изолята белка, изофлавоноидов и ингибиторов протеаз) является актуальной с позиции снижения себестоимости отдельных продуктов (полупродуктов) и повышения рентабельности и экологичности производства.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы является разработка основ технологии переработки соевого шрота с получением изолята белка сои, изофлавоноидов, ингибиторов протеаз и оценка их функциональной активности.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- подобрать последовательность стадий переработки соевого шрота, позволяющую получить отдельные фракции, содержащие высокомолекулярную фракцию белковых веществ, изофлавоноиды и ингибиторы протеаз, в рамках технологии получения изолята белка сои;
- провести исследование и сравнительный анализ различных методов очистки фракции изофлавоноидов;
- подобрать условия фракционирования, выделения и очистки препаратов соевых ингибиторов протеаз из обогащенной ими фракции;
- разработать основы технологии получения ингибиторов протеаз и изофлавоноидов на основе полупродуктов, образующихся при выделении изолята белка, и провести технико-экономические расчеты эффективности разработанной технологии;
- оценить функциональную активность ингибиторов протеаз и изофлавоноидов с позиции повышения выживаемости микробных клеток при воздействии на них

жестким ультрафиолетом и пероксидом водорода на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*;

- оценить функциональную активность изофлавоноидов с точки зрения их влияния на каталитическую активность ферментов.

Научная новизна.

Разработан способ получения биологически активных веществ сои (изофлавоноидов и ингибиторов протеаз) на основе полупродуктов, образующихся в технологии производства изолята белка. Подтверждена экономическая целесообразность применения жидкость-жидкостной экстракции для достижения требуемой степени очистки концентрата изофлавоноидов.

Показано, что введение соевых ингибиторов протеаз и изофлавоноидов в культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* повышает выживаемость клеток при воздействии на них жестким ультрафиолетом и пероксидом водорода.

Установлено влияние соевых изофлавоноидов на каталитическую активность промышленных ферментных препаратов за счет образования водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

Практическая значимость.

Разработан способ выделения биологически активных веществ сои (ингибиторов протеаз, изофлавоноидов), предусматривающий введение в технологию переработки соевого шрота в изолят белка дополнительных технологических стадий, позволяющих получить фракцию изофлавоноидов с содержанием основного вещества не менее 70 %, ингибиторов Кунитца и Баумана-Бирк с содержанием сырого протеина 95 и 89 %, соответственно.

На основании полученных экспериментальных данных разработан лабораторный регламент и исходные данные для проектирования опытной установки переработки соевого шрота в рамках комплексной технологии. Проведена ориентировочная технико-экономическая оценка эффективности реализации предлагаемой технологии при расчетной мощности производства 5 000 тонн/год по соевому шроту.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы доложены на Международной конференции молодых ученых «Успехи в химии и химической технологии» (Москва, 2008, 2010); 6-ой Международной конференции «Сотрудничество для решения проблемы отходов» (Харьков, 2009); V и VI Московском Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009, 2011); 3-ей конференции молодых ученых и специалистов «Обеспечение качества и безопасности продукции агропромышленного комплекса в современных социально-экономических условиях» (Москва, 2009); конкурсе проектов молодых ученых в рамках 15-ой Международной выставки химической промышленности и науки «Химия-2009» (Москва, 2009); I-ой Международной конференции Российского Химического Общества им. Д.И.Менделеева «Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической и нефтехимической промышленности» (Москва, 2009); Международной конференции молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения» (Казань, 2009); VIII Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2009); Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 11 тезисов докладов, подана заявка на патент.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание объектов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 221 наименование, в том числе 133 иностранных авторов, 4 приложения. Основной текст работы изложен на 152 страницах машинописного текста, включает 27 таблиц, 53 рисунка.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы охарактеризована практическая значимость сои для народного хозяйства; рассмотрена общая характеристика и биохимический состав соевых бобов; описаны технологии переработки соевого сырья и получения основных соевых белковых продуктов. Описаны свойства и роль биологически активных компонентов сои – ингибиторов протеаз и изофлавоноидов, рассмотрены современные способы их выделения и области применения. На основе проведенного анализа научно-технической и патентной литературы сделан вывод о целесообразности проведения исследований по разработке способа получения биологически активных соевых компонентов – изофлавоноидов и ингибиторов протеаз – совместно с изолятом белка.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследования являлся соевый шрот с содержанием сырого протеина 52 %, индексом растворимости азота 43,2 % (от сухих веществ) и содержанием общих углеводов 29,7 %. Микробные объекты исследования: дрожжи *Candida tropicalis* и *Endomycopsis fibuligera* из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Содержание белковых веществ в растворах определяли методом Лоури, общее содержание углеводов – методом Дюбуа, общее содержание азотсодержащих веществ – методом Кьельдаля, содержание нуклеиновых кислот – методом Спирина, определение индекса растворимости азота – методом водной экстракции [Шакир И.В. и др., 2008]. Качественное и количественное определение изофлавоноидов проводили методами, основанными на образовании комплексов изофлавоноидов с хлоридами железа (III) и алюминия [Лобанова А.А. и др., 2004]. Активность протеолитических ферментов и рибонуклеазы определяли в соответствии с [Worthington Enzyme Manual, 1965]. Липолитическую активность оценивали титриметрическим методом [Tietz N.W., 1989]. Ферментативный гидролиз субстратов осуществляли в аппарате с мешалкой и рубашкой при рН-статировании и заданной температуре. Эффективность гидролиза казеината натрия и дрожжевой РНК оценивали по увеличению содержания низкомолекулярной фракции (молекулярная масса <2 кДа), не осаждаемой 50 %-ной трихлоруксусной кислотой. Молокосвертывающую активность определяли согласно ГОСТ Р 52688-2006, антиоксидантную активность – пат. РФ 2144674 С1.

Молекулярно-массовое распределение белковых веществ определяли методом гель-хроматографии с использованием колонки диаметром 1 см и высотой 20 см, заполненной полимерным гелем марки Сефадекс. Электрофоретическое определение белков проводили по методу Лэммли [Остерман Л.А., 1985].

Фракционирование белоксодержащих растворов проводили в лабораторной ячейке при рабочем давлении 0,2 МПа с использованием плоских (УПМ-100, УПМ-20) и половолоконных мембранных элементов (ВПУ-100ПА, ВПУ-20ПА).

Ионообменную хроматографию проводили в статических и динамических условиях, в качестве элюента использовали водные растворы хлорида натрия, соляной

кислоты, гидроксида натрия и этилового спирта.

Культивирование микроорганизмов проводили в глубоких условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем питательной среды 100 мл) при постоянном встряхивании и температуре 28-30 °С. Накопление микробной биомассы определяли прямым подсчетом клеток в камере Горяева и гравиметрическим методом. Определение острой токсичности препаратов проводили с тест-культурой *Tetrahymena pyriformis*.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием методов математической статистики, включенных в пакет программ «Excel» и «Statistica 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Разработка основ технологии совместного получения изолята белка, ингибиторов протеаз и изофлавоноидов сои

Выбор последовательности стадий извлечения белковой фракции и фракции изофлавоноидов из соевого шрота

Распространенной и успешно внедренной технологией глубокой переработки сои является получение изолята из соевых бобов, поэтому именно она была взята за основу разрабатываемой технологии совместного получения биологически активных веществ сои (изолята белка, изофлавоноидов и ингибиторов протеаз). Принципиальная схема получения изолята белка сои включает стадии обезжиривания соевых бобов органическими растворителями с получением соевого шрота, экстракции белковых веществ, ультрафильтрацию экстракта, осаждение высокомолекулярной фракции белка из концентрата и последующую очистку целевого продукта.

При разработке технологии получения ингибиторов протеаз и изофлавоноидов совместно с изолятом белка следует принимать во внимание специфические свойства ингибиторов протеаз (невысокую молекулярную массу) и изофлавоноидов (хорошую растворимость в этиловом спирте). В связи с этим, были предложены два варианта принципиальных схем совместного получения биологически активных веществ сои (рис.1), отличающиеся последовательностью стадий извлечения изофлавоноидов и белковых веществ. Согласно первой схеме, на первом этапе предусматривается экстракция белковых веществ из соевого шрота, затем этиловым спиртом из твердого остатка экстрагируются изофлавоноиды, согласно второй последовательность стадий обратная. Далее белковые экстракты, полученные по обеим схемам, обрабатываются согласно принципиальной схеме получения изолята белка.

Полученные результаты (табл. 1) свидетельствуют о том, что содержание белковых веществ в белковых экстрактах сопоставимо, при этом в случае второй схемы содержание сырого протеина в осадке белка, получаемом осаждением из концентрата, выше (62 и 72 % для схем 1 и 2, соответственно), что упрощает его очистку при получении изолята белка. Кроме того, при обработке согласно второй схеме содержание изофлавоноидов в спиртовом экстракте в 2,4 раза выше. Это позволяет рассматривать последовательность стадий получения фракций, обогащенных биологически активными веществами, согласно блок-схеме 2 более перспективной.

Поскольку ингибиторы типа Баумана-Бирк являются спирторастворимыми, при осуществлении технологических стадий согласно блок-схеме 2 они частично переходят в экстракт изофлавоноидов, что подтверждается результатами гель-хроматографии. При этом основная масса ингибиторов протеаз содержится в пермеате, образующемся после ультраконцентрирования белкового экстракта.

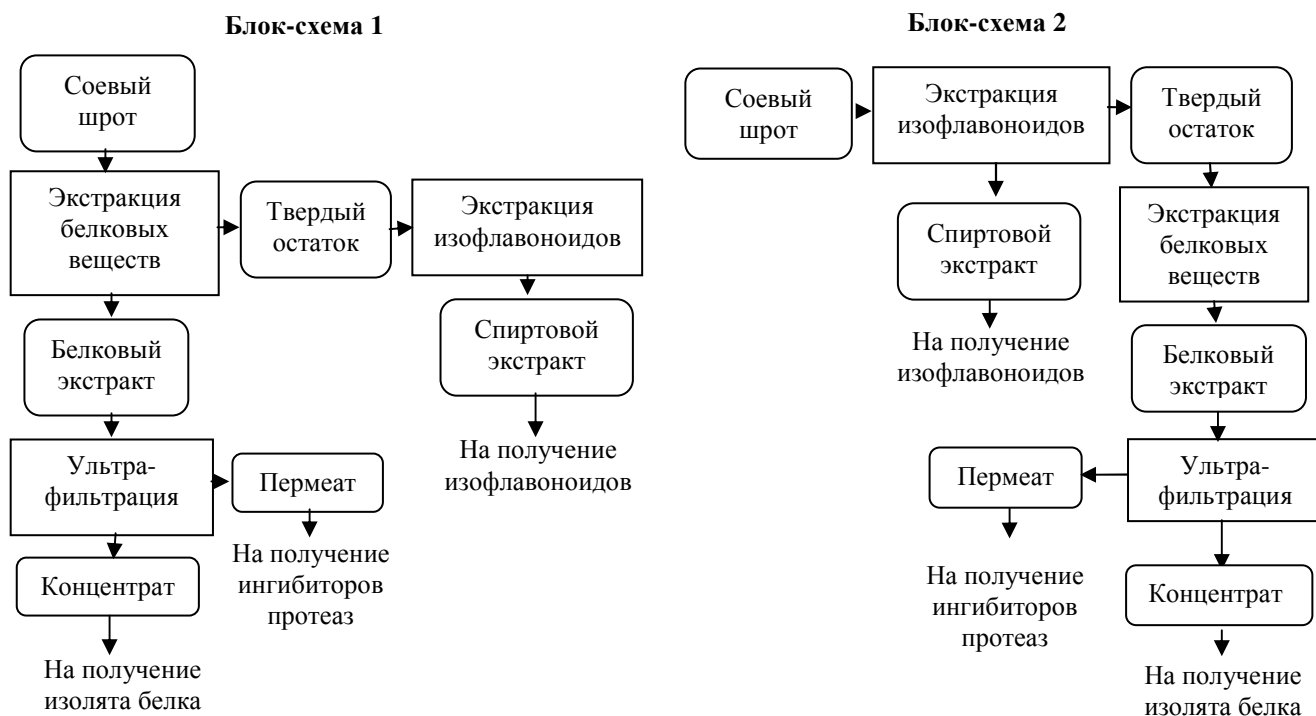


Рис.1. Подбор последовательности стадий переработки соевого шрота, позволяющих получить фракции высокомолекулярных белковых веществ, изофлавоноидов и ингибиторов протеаз

Таблица 1.

Состав полупродуктов, получаемых при подборе последовательности стадий переработки соевого шрота

Анализируемые полупродукты		Показатели	Белковые вещества, г/л	Снижение активности трипсина, %	Снижение активности химотрипсина, %	Изофлавоноиды, г/л	Общие углеводы, г/л
Блок-схема 1	белковый экстракт		16,3±0,74	51,3	36,1	0,13±0,01	18,0±0,86
	концентрат		35,4±0,81	43,8	25,7	0,09±0,01	22,1±0,81
	пермеат		3,5±0,09	64,8	43,8	0,15±0,01	15,3±0,58
	экстракт изофлавоноидов		1,2±0,07	7,1	6,9	0,11±0,02	6,8±0,32
Блок-схема 2	белковый экстракт		13,4±0,63	38,3	21,9	0,02±0,01	10,9±0,65
	концентрат		29,7±0,76	38,5	20,8	0,02±0,01	13,0±0,61
	пермеат		2,9±0,10	56,4	37,2	0,01±0,01	9,1±0,38
	экстракт изофлавоноидов		1,8±0,08	20,5	14,8	0,26±0,02	13,4±0,41

Получение очищенной фракции изофлавоноидов

Спиртовой экстракт изофлавоноидов, полученный в соответствии с выбранной последовательностью стадий, помимо целевого продукта содержит примеси ингибиторов Баумана-Бирк, низкомолекулярных пептидов и углеводов, для очистки от которых была предложена последовательность стадий (рис.3), предусматривающая регенерацию экстрагента (методом вакуум-выпаривания во избежание инактивации биологически активных веществ), отделение примеси ингибиторов Баумана-Бирк осаждением в изоэлектрической точке, последующую очистку осветленного концентрата изофлавоноидов от балластных веществ.

Проведение стадии вакуум-выпаривания и осаждения позволяет получить осадок ингибиторов Баумана-Бирк с содержанием сырого протеина 35 %, который далее направляют на стадию выделения ингибиторов.

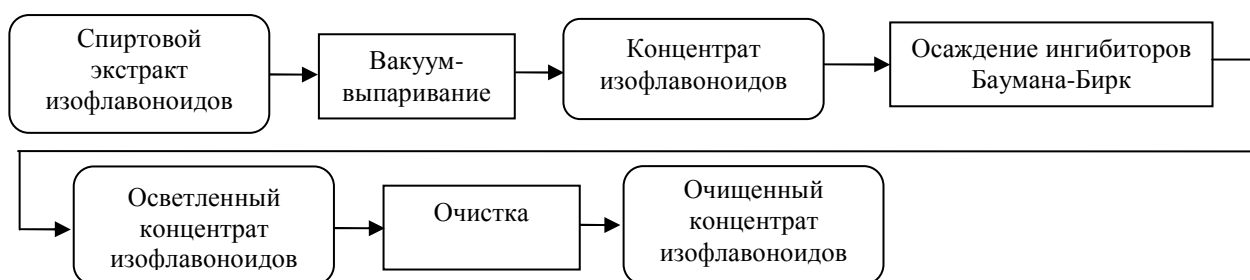


Рис.2. Блок-схема получения очищенного концентрата изофлавоноидов из экстракта изофлавоноидов

Таблица 2.

Состав полупродуктов, образующихся при получении очищенной фракции изофлавоноидов

Фракция	Содержание, г/л		
	Белковые вещества (из них низкомолекулярной фракции, % от общего)	Углеводы	Изофлавоноиды
Спиртовой экстракт изофлавоноидов	1,8±0,06 (38,9)	13,5±0,35	0,3±0,01
Концентрат изофлавоноидов	9,1±0,43 (38,9)	67,4±1,84	1,3±0,04
Осветленный концентрат изофлавоноидов	2,7±0,09 (78,8)	49,4±1,48	1,2±0,0,3

Полученный осветленный концентрат изофлавоноидов содержит 1,2 г/л основного вещества, что в 4 раза выше, чем в исходном спиртовом экстракте, однако характеризуется значительным количеством сопутствующих углеводов и белковых веществ (табл. 2), поэтому требуется его очистка от указанных соединений. Для получения очищенного концентрата изофлавоноидов в настоящей работе были опробованы методы ионного обмена и жидкость-жидкостной экстракции.

Для получения очищенного концентрата изофлавоноидов в настоящей работе были опробованы методы ионного обмена и жидкость-жидкостной экстракции.

Очистка осветленного концентрата изофлавоноидов методом ионного обмена

Для очистки осветленного концентрата изофлавоноидов методом ионного обмена были выбраны сорбенты полистирольной природы (катиониты: С-106, С-145, С-150, КУ-2х8; аниониты: А847С, А100S, АВ-17х8) и карбоксиметилцеллюлоза (волокнистая, Н⁺-форма, «РЕАХИМ»). При подборе оптимальных условий проведения ионного обмена для каждого сорбента варьировали такие параметры, как: режим (статический, динамический), соотношение сорбента и сорбируемой фракции, содержание компонентов в исходной фракции, рН исходного раствора, продолжительность процесса, природу элюентов и последовательность обработки ими.

Проведенные исследования показали, что для всех сорбентов степень сорбции изофлавоноидов в подобранных условиях составляет не менее 70 %. Десорбцию следует проводить ступенчато: на первом этапе десорбируют белковые вещества и углеводы (элюенты 1М НСl для катионитов и 1М NaCl для анионитов и карбоксиметилцеллюлозы), на втором – изофлавоноидов (элюент – 80 %-ый этиловый спирт). Наилучшие результаты были достигнуты в случае катионитов при использовании ионообменной смолы С-150, анионитов – А847С, однако наиболее перспективным является использование карбоксиметилцеллюлозы, с помощью которой удастся достичь практически полной очистки концентрата изофлавоноидов от примесных веществ (табл. 3).

Таблица 3.

Очистка осветленного концентрата изофлавоноидов от белковых веществ и углеводов в динамических условиях методом ионного обмена

Фракция	Сорбент								
	С-150			А847С			Карбоксиметилцеллюлоза		
	Содержание, % от исходного								
	Белковые вещества	Углеводы	Изофлавоноиды	Белковые вещества	Углеводы	Изофлавоноиды	Белковые вещества	Углеводы	Изофлавоноиды
Несорбированная фракция	38,6	68,4	4,6	22,3	64,8	9,1	76,2	91,2	28,7
Промывная вода	18,0	15,0	10,0	4,1	14,3	8,2	6,8	2,4	3,7
1ый элюат	36,2	16,6	1,2	36,2	20,9	7,5	17,0	6,4	6,7
2ой элюат	7,2	-	84,2	37,4	-	75,2	-	-	60,9

Очистка осветленного концентрата изофлавоноидов методом жидкость-жидкостной экстракции

Альтернативным способом очистки осветленного концентрата изофлавоноидов является жидкость-жидкостная экстракция, основанная на различной растворимости белков, углеводов и изофлавоноидов в воде и органических растворителях. При исследовании очистки осветленного концентрата изофлавоноидов варьировали такие параметры, как: соотношение органическая фаза (этилацетат) – водная фаза (осветленный концентрат изофлавоноидов), температура, продолжительность процесса, рН исходного концентрата и введение модифицирующих добавок к этилацетату (ко-растворители – н-бутанол и изоамиловый спирт).

Таблица 4.

Очистка концентрата изофлавоноидов методом жидкость-жидкостной экстракции

Объемное соотношение этилацетат/н-бутанол	Содержание в органической фазе, % от исходного			Объемное соотношение этилацетат/изоамиловый спирт	Содержание в органической фазе, % от исходного		
	Белковые вещества	Углеводы	Изофлавоноиды		Белковые вещества	Углеводы	Изофлавоноиды
10/0	39,9	17,8	89,4	10/0	39,9	17,8	89,4
8/2	25,7	3,4	95,8	9/1	22,7	7,4	89,7
6/4	17,2	0	97,9	7/3	19,1	0	96,2
5/5	21,2	0	96,8	5/5	23,9	0	91,4
4/6	20,4	1,3	97,1	3/7	28,8	2,5	91,5
2/8	27,4	2,5	97,5	1/9	42,5	3,7	88,6
0/10	49,8	1,4	93,0	0/10	45,3	1,6	90,7

Показано, что при проведении процесса в наилучших условиях (соотношение органической и водной фаз 3:1, экстракция смесью этилацетат/н-бутанол в соотношении 6:4 при комнатной температуре и рН исходного раствора 2,0) можно получить очищенный концентрат изофлавоноидов с содержанием основного вещества не менее 70 % (табл. 4).

Сравнение методов очистки осветленного концентрата изофлавоноидов

Сравнение методов очистки осветленного концентрата изофлавоноидов показал, что оба метода позволяют получить фракцию изофлавоноидов с содержанием основного вещества не менее 70 %, однако более высокой степени очистки можно достичь методом ионного обмена при использовании в качестве

сорбента карбоксиметилцеллюлозы. Тем не менее, с экономической точки зрения (затраты на сырье при проведении ионного обмена в 15 раз выше, а потери целевого продукта достигают 39 %) для промышленной реализации в данном случае более целесообразным является метод жидкость-жидкостной экстракции (табл. 5).

Таблица 5.

Очистка осветленного концентрата изофлавоноидов методами ионного обмена и жидкость-жидкостной экстракции

Способ очистки	Подобранные условия	Содержание основного вещества в очищенном концентрате, %	Выход, % от исходного	Затраты на сырье, руб./г изофлавоноидов
Ионный обмен	Разбавление исходного концентрата в 5 раз, динамический режим, 40 % карбоксиметилцеллюлозы по массе, pH 2,0, продолжительность сорбции – 1 час, первый элюент 1M NaCl (2 объема колонки), второй элюент 80 % этиловый спирт (2 объема колонки)	98	61	2840
Жидкость-жидкостная экстракция	Органическая фаза:водная фаза=3:1, комнатная температура, pH 2,0, продолжительность экстракции 30 мин, состав органической фазы – этилацетат/н-бутанол 6:4.	73	98	195

Выделение и очистка соевых ингибиторов протеаз

В соответствии с выбранной схемой обработки соевого шрота, ингибиторы протеаз вследствие невысоких молекулярных масс накапливаются главным образом в пермеате, образующемся на стадии ультрафильтрации белкового экстракта. Поскольку содержание ингибиторов в этом полупродукте невелико, что усложняет процедуру их выделения и очистки, необходимым этапом является повышение их содержания, что может быть достигнуто проведением рецикла по пермеату. Однако при осуществлении рециклов возможно накопление токсичных веществ в белковых экстрактах, и, как следствие, в изоляте, поэтому необходим подбор числа стадий возврата пермеата на стадию экстракции белковых веществ. В результате экспериментов было установлено, что максимально возможное количество рециклов без образования токсичных продуктов равно трем, при этом увеличение содержания ингибиторов в пермеатах подтверждается результатами гель-хроматографии (табл. 6).

Фракционирование ингибиторов протеаз ультрафильтрацией

Фракция, обогащенная ингибиторами протеаз, после стадии ультрафильтрации белкового экстракта, содержит смесь ингибиторов Кунитца и Баумана-Бирк (табл. 5). Основываясь на различии в молекулярных массах (для ингибиторов Кунитца 20-23 кДа, для ингибиторов Баумана-Бирк – 8-13 кДа) и различной растворимости ингибиторов в органических растворителях, для их фракционирования и очистки была предложена схема, предусматривающая: разделение ингибиторов ультрафильтрацией, очистку получаемых фракций диафильтрацией, осаждение ингибиторов органическими растворителями с их последующим переосаждением (рис. 3).

Ультрафильтрация при использовании мембраны с отсекаемой молекулярной массой 20 кДа не позволяет разделить ингибиторы полностью. Для достижения необходимой полноты разделения необходимо проведение двукратной диафильтрации, при этом содержание ингибитора Баумана-Бирк в концентрате снижается до незначительного количества (табл. 7).

Таблица 6.

Состав полупродуктов, получаемых при рециркуляции пермеата

Анализируемые полупродукты	Белковые вещества, г/л	Низкомолекулярная фракция, % от общего содержания белковых веществ	Общие углеводы, г/л	Снижение активности трипсина, %	Снижение активности химотрипсина, %	Острая токсичность изолята
Исходная экстракция						
Экстракт	14,0±0,43	8,91	10,6±0,36	27,0	34,9	не токсичен
Концентрат	30,1±0,91	8,63	13,0±0,42	17,3	24,4	
Пермеат	2,9±0,09	12,27	9,2±0,31	41,8	49,6	
Первый рецикл						
Экстракт	17,2±0,52	14,90	18,5±0,49	32,6	43,2	не токсичен
Концентрат	33,8±0,98	8,73	20,5±0,64	21,9	30,7	
Пермеат	4,1±0,10	16,09	15,5±0,46	52,8	59,5	
Второй рецикл						
Экстракт	21,1±0,62	19,56	29,8±0,78	39,8	52,3	не токсичен
Концентрат	37,3±1,20	9,07	28,4±0,77	25,5	36,2	
Пермеат	5,9±0,15	18,21	22,7±0,71	70,3	67,1	
Третий рецикл						
Экстракт	24,6±0,71	26,24	38,5±1,31	46,0	61,0	не токсичен
Концентрат	40,6±1,42	11,01	36,4±1,28	30,4	42,2	
Пермеат	7,0±0,19	20,70	28,2±0,81	78,6	74,8	
Четвертый рецикл						
Экстракт	28,2±0,82	34,62	48,7±1,42	52,4	69,8	токсичен
Концентрат	44,3±1,53	13,11	45,1±1,21	36,0	48,6	
Пермеат	8,4±0,23	23,04	35,7±1,11	85,1	81,3	

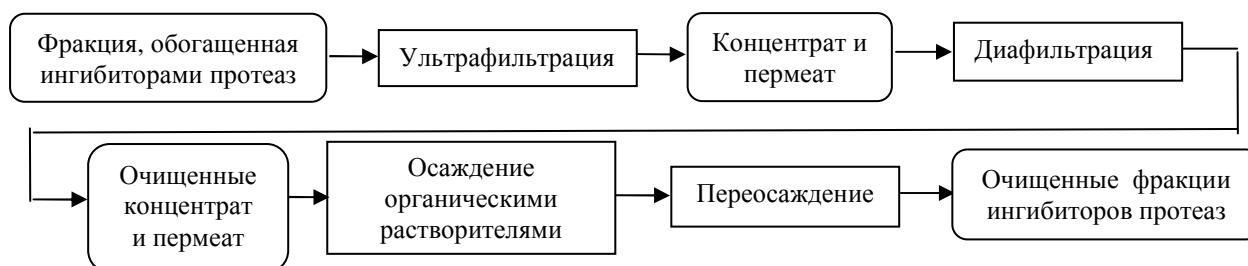


Рис.3. Блок-схема получения ингибиторов протеаз из обогащенной ими фракции

Получение очищенных препаратов ингибиторов протеаз

Выделение ингибиторов протеаз из соответствующих фракций может быть осуществлено осаждением органическими растворителями, причем в случае ингибитора Кунитца исследует использовать этиловый спирт, а ингибитора Баумана-Бирк – ацетон. Поскольку при очистке концентрата изофлавоноидов также получается фракция ингибиторов Баумана-Бирк, перед осаждением соответствующие фракции следует объединить.

При подборе оптимальных условий осаждения ингибиторов протеаз варьировали гидромодуль этанола и ацетона, а также изучали динамику осаждения. Удовлетворительная степень осаждения (85 %) достигается при продолжительности процесса 5 часов.

Полученные субстанции содержали примеси (доля сырого протеина не превышала 80 и 35 % в случае ингибиторов Кунитца и Баумана-Бирк, соответственно), для удаления которых были предложены дополнительные стадии диафильтрации и переосаждения.

Таблица 7.

Состав полупродуктов, получаемых при ультрафильтрации и диафильтрации (УПМ-20)

Анализируемые полупродукты	Общий белок по Лоури, г/л	Низкомолекулярная фракция, % от общего содержания белковых веществ	Общие углеводы, г/л	Снижение активности трипсина, %	Снижение активности химотрипсина, %
Исходный пермеат	7,04	20,70	28,23	75,6	88,8
Ультрафильтрация					
Концентрат	17,4±0,51	13,8±0,41	36,1±0,71	42,5	57,5
Пермеат	3,4±0,12	50,2±0,43	25,4±0,46	30,0	70,3
Диафильтрация - 1					
Концентрат	14,6±0,46	9,3±0,23	23,1±0,62	37,1	22,6
Диафильtrat	2,8±0,11	83,9±0,45	12,8±0,72	2,0	33,2
Диафильтрация - 2					
Концентрат	12,8±0,32	7,9±0,21	11,6±0,53	32,9	13,7
Диафильtrat	2,0±0,07	86,2±0,52	11,7±0,61	4,7	11,5
Диафильтрация - 3					
Концентрат	11,1±0,29	5,5±0,17	6,4±0,41	29,0	9,0
Диафильtrat	1,2±0,06	89,9±0,57	5,1±0,32	2,5	3,1

Таблица 8.

Осаждение и очистка ингибиторов протеаз

Условия стадии	Фракция	Содержание, % от исходного	
		Ингибиторы Кунитца	Ингибиторы Баумана-Бирк
Осаждение ингибиторов Кунитца			
Этанол 2:1, 5 часов	Осадок	88	15
	Надосадочная жидкость	12	85
Переосаждение ингибиторов Кунитца			
Этанол 2:1, 5 часов	Осадок	76	2
	Надосадочная жидкость	12	13
Диафильтрация объединенной фракции ингибиторов Баумана-Бирк			
Вода 1:1, мембрана УПМ-5	Очищенная фракция	-	100
	Диафильtrat	-	0
Осаждение ингибиторов Баумана-Бирк			
Ацетон 1:1, 5 часов	Осадок	-	90
	Надосадочная жидкость	-	10
Переосаждение ингибиторов Баумана-Бирк			
Ацетон 1:1, 5 часов	Осадок	-	81
	Надосадочная жидкость	-	9

В результате проведенных исследований установлено, что для очистки ингибиторов Кунитца достаточно переосаждения, в то время как для ингибиторов Баумана-Бирк необходимы предварительная диафильтрация объединенной фракции ингибиторов и последующее переосаждение (табл. 8). Полученные очищенные фракции с содержанием сырого протеина не менее 89 % для ингибиторов Баумана-Бирк и 95 % для ингибиторов Кунитца, не обладают острой токсичностью, а их ингибирующая активность соответствует известным аналогам.

Технико-экономическая оценка разработанной технологии получения биологически активных веществ из соевого шрота

На основании проведенных исследований разработана принципиальная схема комплексной переработки соевого шрота, включающая следующие основные стадии:

- экстракцию изофлавоноидов из соевого шрота этиловым спиртом;
- регенерацию этанола и последующую очистку концентрата изофлавоноидов жидкость-жидкостной экстракцией;
- экстракцию белковых веществ из твердого остатка, образовавшегося на стадии

спиртовой экстракции;

- получение очищенных фракций высокомолекулярных соевых белков, ингибиторов Кунитца и Баумана-Бирк ультрафильтрацией и диафильтрацией;
- выделение изолята белка и ингибиторов протеаз осаждением из соответствующих фракций (рис. 4).

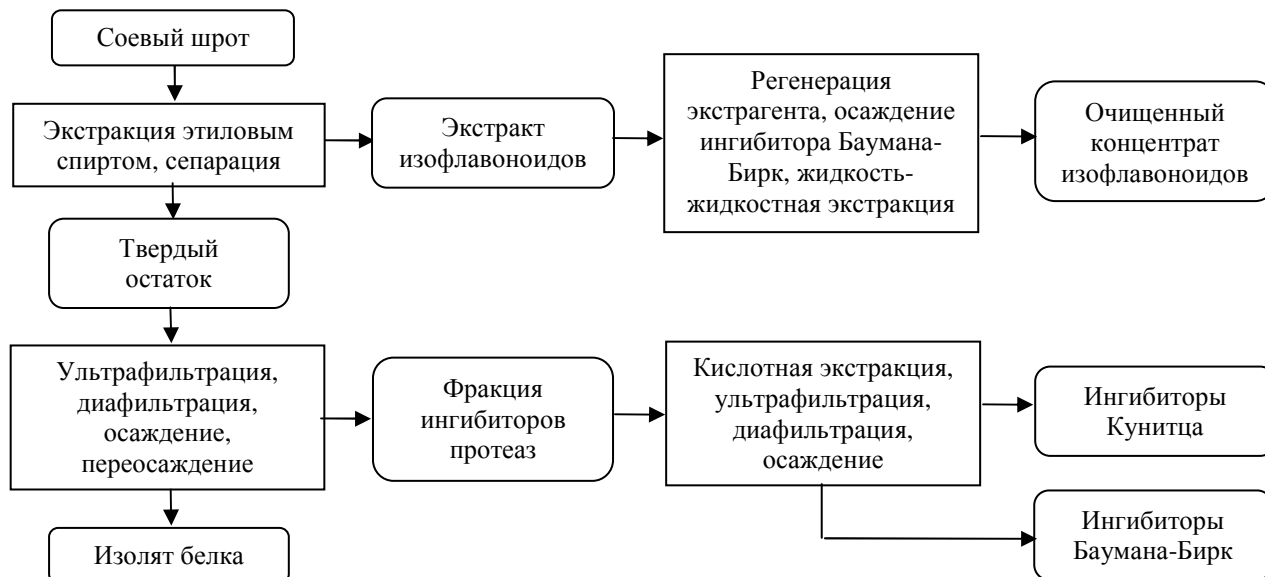


Рис. 4. Принципиальная блок-схема переработки соевого шрота с получением изолята белка, соевых изофлавоноидов и ингибиторов протеаз

Таблица 9.

Технико-экономические показатели комплексной переработки соевого шрота (5 000 тонн/год) с получением биологически активных веществ (изолята белка, концентрата изофлавоноидов и ингибиторов протеаз)

№ п/п	Наименование показателя	Единица измерения	Значение показателей
1	Капитальные затраты	тыс руб	150 137
2	Полная себестоимость годового выпуска	тыс руб	851 905
3	Себестоимость единицы продукции		
	- концентрат изофлавоноидов	тыс. руб/м ³	538,7
	- изолят белка	тыс. руб/т	43,8
	- ингибиторы Кунитца	тыс. руб/т	318,9
	- ингибиторы Баумана-Бирк	тыс. руб/т	574,0
4	Стоимость годового выпуска продукции	тыс. руб/т	1 335 117
5	Прибыль годовая	тыс руб	483 912
6	Рентабельность		
	а) производственных фондов	%	49,0
	б) продукции	%	36,2
7	Срок окупаемости капитальных вложений	год	1,86

В рамках разрабатываемой технологии образуются жидкие отходы, представляющие собой диафильтраты со стадий очистки целевых продуктов, а также кубовые остатки после отгонки этанола и ацетона. Для снижения нагрузки на очистные сооружения была исследована принципиальная возможность биodeградации данных стоков культурами микроорганизмов на примере *Candida tropicalis* и *Endomycopsis fibuligera*.

Полученные результаты (степень усвоения субстрата не менее 50 %, содержание сырого протеина в биомассе до 32 %) свидетельствуют о возможности переработки стоков микробиологическим путем, в том числе и в биомассу кормового назначения.

Технико-экономическая оценка разработанной технологии комплексной переработки соевого шрота мощностью 5 000 тонн/год по сырью (табл. 9) показала, что

внедрение разработанной технологии позволит получить до 480 млн. руб./год прибыли при сроке окупаемости, не превышающем 2 года.

II. Исследование функциональной активности соевых изофлавоноидов и ингибиторов протеаз

Анализ литературы показывает, что соевые изофлавоноиды и ингибиторы протеаз обладают антиканцерогенным, антиоксидантным, противовоспалительным, радиопротекторным и др. действием [Dittmann, К.Н., 1998; Messina, М., 2002]. Также анализ их строения позволяет предположить, что их функциональная активность может проявляться в повышении выживаемости клеток при действии на них жестким ультрафиолетом или пероксидом водорода, кроме того, изофлавоноиды могут выступать в роли модификаторов ферментов.

Влияние ингибиторов протеаз и изофлавоноидов на выживаемость клеток микроорганизмов

Исследование влияния соевых ингибиторов протеаз и изофлавоноидов на выживаемость дрожжей осуществляли на примере культуры *Saccharomyces cerevisiae* при воздействии на нее жестким ультрафиолетовым излучением ($\lambda = 250$ нм) и пероксидом водорода.

Таблица 10.

Влияние соевых изофлавоноидов и ингибиторов протеаз на выживаемость клеток дрожжей

Условия эксперимента		Выживаемость, %	Условия эксперимента		Выживаемость, %
Концентрация защитного агента, мг/л	Продолжительность облучения, с		Концентрация защитного агента, мг/л	Концентрация пероксида водорода, %	
Контроль					
0	0	100	0	0	100
0	1,0	63,7±2,11	0	0,5	43,5±1,56
0	2,5	27,0±1,08	0	1,5	12,0±1,14
Изофлавоноиды					
10	15	57,1±1,86	10	0,5	76,5±2,31
10	30	20,6±1,45	10	1,5	54,3±2,11
50	15	73,6±1,84	50	0,5	85,9±2,14
50	30	30,4±1,41	50	1,5	65,3±1,86
Ингибиторы Кунитца					
100	15	71,5±2,04	100	0,5	77,6±1,63
100	30	22,3±1,03	100	1,5	55,0±1,47
1000	15	80,1±1,63	1000	0,5	89,5±1,96
1000	30	34,6±1,14	1000	1,5	79,1±1,23
Ингибиторы Баумана-Бирк					
100	15	78,1±2,87	100	0,5	79,4±1,78
100	30	42,1±2,13	100	1,5	51,8±1,65
1000	15	85,6±1,69	1000	0,5	87,1±1,45
1000	30	57,2±1,74	1000	1,5	66,2±1,34

Эксперимент выполняли следующим образом: проводили предынкубацию ингибиторов протеаз или изофлавоноидов (в концентрациях 0,01-1 г/л и 5-50 мг/л, соответственно) с суточной культурой дрожжей (плотность популяции 10^7 - 10^8 млн.кл./мл), затем воздействовали или ультрафиолетовым излучением в течение 0-30 с, или пероксидом водорода в концентрации 0,1-2,5 %.

Результаты исследования (табл. 10) показали, что введение в культуру ингибиторов протеаз и изофлавоноидов во всем диапазоне параметров (концентрация ингибиторов протеаз 0,01-1,00 г/л, изофлавоноидов - 5-50 мг/л, пероксида водорода –

0,1-2,5 %, время облучения 0-30 с) повышает выживаемость дрожжей в 1,2-4,7 раз. Полученные результаты могут быть обусловлены антиоксидантным действием изофлавоноидов и ингибиторов протеаз (полученные соединения замедляют скорость аутоокисления адреналина на 10-25 %).

Влияние изофлавоноидов на каталитическую активность промышленных гидролитических ферментных препаратов

Таблица 11.

Влияние концентрации изофлавоноидов и продолжительности предынкубации на степень гидролиза субстратов

Фермент/ субстрат	Концентрация изофлавоноидов, моль/л*10 ⁵	Предынкубация с ферментным препаратом		Предынкубация с субстратом	
		мин.	Степень гидролиза, %	мин.	Степень гидролиза, %
Трипсин/ казеинат натрия	0	0	24,8±1,14	0	24,8±1,14
	2,4	0	19,8±1,23	0	19,8±1,23
	23,6	0	15,7±1,04	0	15,7±1,04
	23,6	10	8,1±0,45	10	16,4±0,74
	23,6	20	4,5±0,23	20	23,0±0,98
	23,6	30	2,6±0,25	30	23,9±1,11
РНК-аза/ дрожжевая РНК	0	0	28,9±1,35	0	28,9±1,35
	2,4	0	38,8±1,47	0	38,8±1,47
	23,6	0	51,7±1,63	0	51,7±1,63
	23,6	10	24,0±1,23	10	32,8±1,78
	23,6	20	11,4±1,01	20	60,0±1,63
	23,6	30	8,3±0,69	30	61,0±1,65
Панкреатин/ оливковое масло	0	0	10,6±0,86	0	10,6±0,45
	2,4	0	14,1±0,78	0	14,1±0,56
	23,6	0	25,9±0,74	0	25,9±0,74
	23,6	10	23,5±1,51	10	28,4±1,98
	23,6	20	24,7±1,78	20	42,4±2,11
	23,6	30	23,5±1,64	30	42,4±2,03

ного фермента – скорость створаживания молока.

В ходе эксперимента варьировали такие параметры, как: концентрация изофлавоноидов, продолжительность предынкубации изофлавоноидов с ферментным препаратом или субстратом, а также оценивали влияние изофлавоноидов на температурный и рН-оптимумы каталитической активности ферментных препаратов.

Влияние изофлавоноидов на каталитическую активность ферментных препаратов

В ходе проведенных экспериментов установлено, при добавлении в реакционную среду изофлавоноидов каталитическая активность РНК-азы, панкреатина, сычужного фермента и пепсина повышается, в то время как трипсина – снижается (табл. 11, 12).

Также показано, что предынкубация оказывает заметный эффект на степень гидролиза (скорость створаживания) соответствующих субстратов, причем максимальный эффект достигается для одних систем в случае предынкубации изофлавоноидов с субстратом (дрожжевая РНК, оливковое масло), для других – изофлавоноидов с ферментом (трипсин, пепсин, сычужный фермент).

Влияние изофлавоноидов на температурные и рН-зависимости каталитической активности ферментных препаратов

Помимо влияния на каталитическую активность, изофлавоноиды также оказывают действие на температурные и рН-зависимости каталитической активности

Анализ литературы и химической структуры изофлавоноидов показывает, что они могут выступать в роли модификаторов ферментов. Влияние изофлавоноидов на каталитическую активность ферментов оценивали на примере таких промышленных гидролитических ферментных препаратов, как: трипсин, рибонуклеаза, пепсин, сычужный фермент, панкреатин (рассматривался в качестве источника липазы). Критерием эффективности процесса для трипсина, РНКазы и панкреатина являлась степень гидролиза субстратов (казеината натрия, дрожжевой РНК, оливкового масла), для пепсина и сычуж-

промышленных ферментных препаратов. При этом установлено, что для РНК-азы и трипсина происходит смещение температурного оптимума в сторону более высоких температур, для РНК-азы также наблюдается смещение значения оптимума рН в нейтральную область. При этом для РНК-азы и панкреатина область оптимальных значений расширяется, для трипсина – сужается (табл. 13).

Таблица 12.

Влияние концентрации изофлавоноидов и продолжительности предынкубации на активность сычужного фермента и пепсина

Фермент/ субстрат	Концентрация изофлавоноидов, моль/л*10 ⁵	Предынкубация с ферментным препаратом		Предынкубация с субстратом	
		мин.	Активность, % от контроля	мин.	Активность, % от контроля
Пепсин/ молоко	0	0	100	0	100
	11,8	0	121,9±2,45	0	121,9±2,45
	23,6	0	111±3,02	0	111±3,02
	11,8	5	127,7±2,78	5	102,0±1,96
	11,8	15	95,5±2,11	15	95,8±2,74
	11,8	30	95,9±2,43	30	94,8±2,31
Сычужный фермент/ молоко	0	0	100	0	100
	11,8	0	110,2±1,78	0	110,2±1,78
	23,6	0	101,8±1,45	0	101,8±1,45
	11,8	10	114,6±1,63	10	100,6±2,11
	11,8	20	102,1±1,79	20	103,8±1,59
	11,8	30	98,0±2,04	30	98,2±1,74

механизмов действия обеих групп соединений. Эта гипотеза подтверждается результатами апробации кинетической модели взаимодействия [Красноштанова А.А., 2009], разработанной для алкилоксибензолов, применительно к изофлавоноидам. Показано, что модель, разработанная для алкилоксибензолов, адекватно описывает поведение системы в присутствии изофлавоноидов.

Таким образом, показано, что соевые изофлавоноиды и ингибиторы протеаз являются соединениями, обладающими высокой биологической активностью: повышают выживаемость клеток микроорганизмов при действии на них жесткого ультрафиолетового излучения и пероксида водорода (на примере культуры *Saccharomyces cerevisiae*). Кроме того, изофлавоноиды оказывают влияние на каталитическую активность промышленных ферментов (на примере РНКазы, трипсина, панкреатина, пепсина и сычужного фермента).

Полученные результаты могут быть обусловлены образованием водородных связей и гидрофобными взаимодействиями в системах изофлавоноиды/фермент или изофлавоноиды/субстрат, что подтверждено результатами УФ- и ИК-спектроскопии.

Сходство строения изофлавоноидов с другими модификаторами ферментов – алкилоксибензолами, также способными образовывать водородные связи и гидрофобные взаимодействия с ферментами и субстратами, позволяет предположить схожесть механизмов действия обеих групп соединений.

Таблица 13.

Влияние изофлавоноидов на температурный и рН-зависимости каталитической активности ферментных препаратов

Ферментативный процесс	Условия	Оптимальные условия	
		Т, °С	рН
Гидролиз дрожжевой РНК	без изофлавоноидов	65	7,5
	с изофлавоноидами	70*	7,0
Гидролиз казеината натрия	без изофлавоноидов	40	8
	с изофлавоноидами	45**	8**
Гидролиз оливкового масла	без изофлавоноидов	37	7
	с изофлавоноидами	37*	7*
Створаживание молока пепсином	без изофлавоноидов	35	5,5
	с изофлавоноидами	35	5,5
Створаживание молока сычужным ферментом	без изофлавоноидов	35	5,5
	с изофлавоноидами	35	5,5

* - расширение, ** - сужение

ВЫВОДЫ

1. Разработаны основы технологии переработки соевого шрота с получением изолята белка сои, изофлавоноидов и ингибиторов протеаз, включающей стадии экстракции, ультрафильтрации, диафильтрации, осаждения и переосаждения.
2. Проведен сравнительный анализ очистки фракции изофлавоноидов ионным обменом и жидкость-жидкостной экстракцией по технологическим и экономическим показателям. Показана предпочтительность жидкость-жидкостной экстракции (соотношение органической (этилацетат/н-бутанол 6:4) и водной фаз 3:1, рН 2,0, продолжительность 30 минут, температура 25 °С), позволяющей получить фракцию изофлавоноидов с содержанием основного вещества 73 % при затратах на сырье не более 195 руб./г изофлавоноидов.
3. Подобраны условия выделения ингибиторов протеаз из отходов производства изолята белка сои, включающего стадии мембранного разделения, диафильтрации, осаждения и переосаждения из водно-спиртовых и водно-ацетоновых растворов. Получены фракция ингибиторов Кунитца, содержащая 95 % сырого протеина (1 мг ингибирует 1,5 мг трипсина с активностью 300 ед. ТАМЕ/мг фермента); фракция ингибиторов Баумана-Бирк, содержащая 89 % сырого протеина (1 мг ингибирует 0,35 мг трипсина с активностью 300 ед. ТАМЕ/мг фермента и 0,7 мг химотрипсина с активностью 40 ед. ВТЕЕ/мг фермента).
4. Показано, что ингибиторы протеаз и изофлавоноиды повышают выживаемость клеток микроорганизмов (на примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*) при воздействии на них жестким ультрафиолетом ($\lambda = 250$ нм, 0-30 с) и пероксидом водорода (0,1-1,5 %) в 1,2-4,7 раза.
5. Исследовано влияние изофлавоноидов на каталитическую активность промышленных ферментных препаратов (на примере трипсина, РНКазы, панкреатина, пепсина и сычужного фермента). Подтверждено, что изофлавоноиды являются модификаторами ферментов, при этом степень гидролиза субстратов в случае РНКазы и панкреатина возрастает в 1,5-4 раза, в случае трипсина снижается в 2 раза, активность молокосвертывающих ферментов повышается на 15-30 %. Установлено, что влияние изофлавоноидов на каталитическую активность ферментов обусловлено образованием водородных связей и гидрофобными взаимодействиями.
6. Проведена ориентировочная технико-экономическая оценка реализации разработанной технологии. При расчетной мощности производства 5 000 тонн/год по соевому шроту прибыль составляет не менее 480 млн. руб./год при сроке окупаемости, не превышающем 2 года.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Хабибулина, Н.В. Зависимость биологических эффектов от химической структуры флавоноидов / Насибов Р.С., Хабибулина Н.В., Козлов К.Г. // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2010. №2/1. С. 260.
2. Хабибулина Н.В., Красноштанова А.А. Заявка на патент «Способ защиты дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* от стрессорных воздействий различной природы» №2012106867, приоритет от 27.02.12
3. Хабибулина, Н.В. Изучение кинетики накопления и инактивации ингибиторов трипсина и химотрипсина из белого лепестка. Разработка технологии получения соевых ингибиторов трипсина и химотрипсина / Н.В. Хабибулина // IV Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии. Москва. 2008. Том XXII, №13. С. 76-80.

4. Хабибулина, Н.В. Получение ингибиторов трипсина и химотрипсина из отходов производства соевого изолята / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // 6-я Международная конференция «Сотрудничество для решения проблемы отходов». Харьков. 2009. С. 149-151.
5. Хабибулина, Н.В. Разработка научных основ технологии получения соевых ингибиторов трипсина и химотрипсина / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // V Московский Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 2009 г. ч.1. С. 411 – 412.
6. Хабибулина, Н.В. Исследование процесса получения ингибиторов пищеварительных ферментов на основе отходов производства изолята белка сои / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // 3-я Конференция молодых ученых и специалистов «Обеспечение качества и безопасности продукции агропромышленного комплекса в современных социально-экономических условиях». Москва. 2009 г. С.236-238.
7. Хабибулина, Н.В. Разработка научных основ технологии получения соевых ингибиторов трипсина и химотрипсина из отходов производства изолята белка сои / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // 15-я международная выставка химической промышленности и науки «ХИМИЯ-2009», Конкурс проектов молодых ученых. Москва. 2009 г. С. 40-41.
8. Хабибулина, Н.В. Разработка научных основ технологии получения соевых ингибиторов трипсина и химотрипсина из отходов производства изолята белка сои / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // I-я Международная конференция Российского Химического Общества им. Д.И.Менделеева «Ресурсо- и энергосберегающие технологии в химической и нефтехимической промышленности». Москва. 2009 г. С. 71-72.
9. Хабибулина, Н.В. Исследование процесса очистки экстракта изофлавоноидов от белковых веществ / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова, В.И. Панфилов // Химическая промышленность сегодня. – 2012. – № 5. – с. 34-38.
10. Хабибулина, Н.В. Изучение процесса получения и очистки фракции соевых изофлавоноидов совместно с изолятом белка сои / Н.В. Хабибулина // VI Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии. Москва. 2010. Том XXIV, №11(116). С. 46-50.
11. Хабибулина, Н.В. Изучение эффективности применения соевых ингибиторов трипсина и химотрипсина в качестве антистрессовых агентов / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // XIII Международная конференция молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения». Казань. 2009. С. 365.
12. Хабибулина Н.В. Исследование процесса получения соевых изофлавоноидов из отходов производства изолята белка сои / Н.В. Хабибулина, О.Ю. Костина, К.С. Закиева, А.А. Красноштанова // Московская Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: экология крупных городов». Москва. 2010. С. 241-242.
13. Хабибулина, Н.В. Исследование эффективности применения соевых изофлавоноидов в качестве антистрессорных агентов / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // VIII Международная конференция «Биоантиоксидант». Москва. 2010. С. 486-487.
14. Хабибулина, Н.В. Разработка научных основ технологии совместного получения изофлавоноидов, изолята белка и ингибиторов протеолитических ферментов из белого лепестка / Н.В. Хабибулина, А.А. Красноштанова // VI Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. 2011. ч.1. С. 329-330.