

На правах рукописи

Рытченкова Ольга Владимировна

**Получение биологически активных продуктов
белковой природы при комплексной
переработке молочной сыворотки**

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, профессор
Семенихина Вера Филатовна
Всероссийский научно-исследовательский
институт молочной промышленности

Кандидат технических наук, доцент
Гучок Жанна Леонидовна
Московский государственный университет
пищевых производств

Ведущая организация:

Северо-Кавказский государственный
технический университет

Защита состоится «14» февраля 2012 г. в 12 ч. 30 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 « __ » января 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ДМ 212.204.13

Шакир И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В современных экономических условиях возрастает роль технологий, ориентированных на использование или переработку вторичного сырья различного происхождения. Такой подход обусловлен необходимостью решения экологических проблем и повышения экономических показателей основного производства за счет утилизации отходов и получения дополнительной конкурентоспособной продукции.

Одним из крупнотоннажных отходов пищевых производств является молочная сыворотка, образующаяся при переработке молока в белково-жировые продукты (сыр, творог, казеин). Ежегодно в мире образуется более 130 млн тонн молочной сыворотки, из них около 2 млн тонн приходится на долю России. Эколого-экономические расчеты показывают, что 1 тонна молочной сыворотки может нанести такой же экологический ущерб, как 100 м³ хозяйственно-бытовых стоков при совокупных затратах на ее переработку 0,5-1,2 млн рублей [Зобкова З.С., 2007].

В России перерабатывается менее 50 % молочной сыворотки, поэтому проблема ее рационального использования стоит особо остро. Использование нативной молочной сыворотки в натуральном виде ограничено сроками ее хранения. Наиболее простой способ переработки молочной сыворотки – сушка – приводит к образованию продукта, не сбалансированного по основным питательным веществам, обладающего низкими органолептическими показателями. Более перспективным подходом является фракционирование молочной сыворотки с получением подсырных сливок, концентратов сывороточных белков, молочного сахара. Однако такие технологии, как правило, направлены на частичную переработку вторичного молочного сырья. В последние годы наибольший интерес вызывает глубокая переработка молочной сыворотки, предусматривающая извлечение из нее индивидуальных компонентов и получение их производных. Такие продукты могут найти более широкое применение в пищевой, медицинской и фармацевтической промышленности [Храмцов А.Г., 2003].

Наиболее ценными компонентами молочной сыворотки являются иммуноглобулины, лактоферрин и лактопероксидаза, хотя и присутствующие в небольших количествах, но обладающие защитной, антимикробной, антиоксидантной, иммуномодуляторной и регуляторной функциями. Данные соединения могут быть использованы в качестве основы для получения лечебно-профилактических продуктов [Ильина А.М., 2009]. В наибольшем количестве в молочной сыворотке содержатся β -лактоглобулин и α -лактоальбумин, содержащие оптимально сбалансированный набор аминокислот. Благодаря высокой биологической ценности данные белки могут быть использованы для производства продуктов детского и диетического питания [Токаев Э.С., 2007].

Таким образом, целесообразной является разработка технологии комплексной переработки молочной сыворотки, направленная на выделение высокоценных белковых компонентов и получение сопутствующих продуктов, обладающих важными биологическими функциями.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы является разработка технологии получения биологически активных продуктов белковой природы (лактопероксидазы, лактоферрина, иммуноглобулинов, белкового гидролизата, β -галактозидазы) при комплексной переработке молочной сыворотки.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- определить основные физико-химические характеристики образцов молочной сыворотки, полученные при использовании различных технологий переработки молока;
- выбрать оптимальную схему фракционирования молочной сыворотки, позволяющую получить отдельные белковые фракции;
- подобрать оптимальные условия выделения лактопероксидазы, лактоферрина и иммуноглобулинов из фракций, обогащенных вышеперечисленными белковыми компонентами;
- подобрать оптимальные условия получения белкового гидролизата из фракции, обогащенной главными сывороточными белками (β -лактоглобулином и α -лактоальбумином);
- исследовать ростовые характеристики дрожжей рода *Kluyveromyces* - продуцентов β -галактозидазы при культивировании на питательных средах, содержащих депротеинизированную молочную сыворотку;
- разработать режимы получения ферментного препарата β -галактозидазы из нативной биомассы дрожжей *Kluyveromyces marxianus*;
- провести технико-экономические и эколого-экономические расчеты эффективности разработанной технологии.

Научная новизна.

Показано, что в рамках одной технологической схемы комплексной переработки молочной сыворотки возможно получение биологически активных продуктов белковой природы: лактоферрина, лактопероксидазы, иммуноглобулинов, белкового гидролизата, β -галактозидазы.

Подтверждена возможность использования карбоксиметилцеллюлозы в качестве сорбента для выделения лактоферрина и лактопероксидазы из молочной сыворотки.

Экспериментально подобраны и научно обоснованы оптимальные условия ферментативного гидролиза фракции, обогащенной главными сывороточными белками (β -лактоглобулином и α -лактоальбумином), обеспечивающие степень гидролиза не менее 98 %.

Подтверждена возможность использования депротеинизированной молочной сыворотки и образующихся в предлагаемой технологии солевых стоков в качестве основы для приготовления питательной среды для культивирования дрожжей рода *Kluyveromyces* - продуцентов β -галактозидазы.

Практическая значимость.

Разработана комплексная малоотходная технология переработки молочной сыворотки с получением биологически активных продуктов белковой природы (лактопероксидазы, лактоферрина, иммуноглобулинов, белкового гидролизата, β -галактозидазы). Предлагаемая технология включает стадии ультраконцентрирования с использованием полупроницаемых мембран, ионообменную хроматографию на сорбенте карбоксиметилцеллюлозе, высаливание сульфатом аммония, ферментативный гидролиз, культивирование, дезинтеграцию клеток дрожжевой биомассы, осаждение в изoeлектрической точке. Разработаны способы очистки полученных белковых продуктов.

На основании полученных экспериментальных данных разработан лабораторный регламент и основные исходные данные для проектирования опытной установки комплексной переработки молочной сыворотки при расчетной мощности производства 30 000 тонн/год по перерабатываемому сырью. Проведена ориентировочная технико-экономическая оценка эффективности реализации предлагаемой технологии.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы доложены на международной научно-практической конференции в рамках повышения квалификации «Технология молочных и молочносодержащих продуктов» (Ставрополь, 2008); Международных конференциях молодых ученых «Успехи в химии и химической технологии» (Москва, 2008, 2009, 2011); 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); Международной конференции молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения» (Казань, 2009); Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 2010); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов» (Москва, 2011); Научно-практическом семинаре «Феномен молочной сыворотки: синтез науки, теории и практики» в рамках международной научно-технической конференции «Современные достижения биотехнологии» (Ставрополь, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, и 12 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей описание объектов и методов исследования, изложение результатов и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 209 наименований, в том числе 149 иностранных авторов, 4 приложения. Основной текст работы изложен на 140 страницах машинописного текста, включает 28 таблиц, 46 рисунков.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы описаны основные технологии переработки молока; приведены общая характеристика и химический состав молочной сыворотки, а также рассмотрены существующие технологии ее переработки. Описаны свойства биологически активных сывороточных белков, рассмотрены современные способы их выделения из молочного сырья и области последующего применения. На основе проведенного анализа научно-технической и патентной литературы сделан вывод о целесообразности использования молочной сыворотки для совместного получения биологически активных продуктов белковой природы: лактоферрина, лактопероксидазы, иммуноглобулинов, белкового гидролизата и β -галактозидазы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследования являлись образцы молочной сыворотки (подсырной, творожной, казеиновой), предоставленные молокоперерабатывающими предприятиями г. Москвы и Московской области.

В качестве микробных объектов использовали дрожжи *Kluyveromyces lactis* штамм Y-3268 и *Kluyveromyces marxianus* штамм Y-3240 из коллекции ФГУП ГНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Содержание белковых веществ определяли методом Лоури, общее содержание углеводов – методом Дюбуа, содержание липидов – методом Сокслета [Шакир И.В. и др., 2008]. Общее содержание иммуноглобулинов оценивали по концентрации имму-

ноглобулина IgG методом радиальной иммунодиффузии [Фримель, 1979]. Содержание лактоферрина определяли методом иммуноферментного анализа с использованием набора «Вектор-Бест», активность лактопероксидазы – методом Бояркина с использованием бензидина в качестве субстрата [Лапина, 2003], активность β -галактозидазы - с использованием о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид в качестве субстрата [Inchaurreto, 1994]. Активность протеолитических ферментов определяли модифицированным методом Ансона при использовании в качестве субстрата казеината натрия [Полыгалина, 2003].

Молекулярно-массовое распределение белковых веществ определяли методом гель-хроматографии с использованием колонки диаметром 1 см и высотой 20 см, заполненной полимерным гелем марок Молселект и Сефадекс.

Фракционирование молочной сыворотки проводили с использованием лабораторной ячейки с рабочим давлением 0,2 МПа и плоскими мембранными фильтрами производства «Владипор» (Россия).

Ионообменную хроматографию проводили в статических и динамических условиях, в качестве элюента использовали растворы хлорида натрия различной концентрации. Содержание белковых веществ в элюате оценивали спектрофотометрически при длине волны 280 нм.

Ферментативный гидролиз сывороточных белков осуществляли в аппарате с мешалкой и рубашкой при pH 7,5-8,0 и температуре 45-50 °С. Эффективность гидролиза оценивали по увеличению содержания низкомолекулярной пептидной фракции (молекулярная масса <2 кДа), неосаждаемой 50 %-ной трихлоруксусной кислотой. Степень гидролиза рассчитывали как отношение концентрации образующихся низкомолекулярных пептидов к исходной концентрации белка в растворе.

Культивирование дрожжей проводили в глубинных условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем питательной среды 100 мл) при инкубировании на качалках (150 об/мин) при температуре 28-30 °С, а также в лабораторном ферментере Фермус-3 объемом 5 л с заполнением питательной средой на 70% и постоянном перемешивании с интенсивностью 250 об/мин. Накопление микробной биомассы определяли прямым подсчетом клеток в камере Горяева и гравиметрическим методом.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование физико-химических характеристик образцов молочной сыворотки

Состав молочной сыворотки может существенно варьироваться в зависимости от исходного качества молока и технологических режимов производства целевых продуктов (творога, сыра и казеина). Поэтому в работе была исследована серия образцов молочной сыворотки и определены их основные физико-химические характеристики (табл. 1).

В результате проведенных исследований установлено, что основное влияние на состав молочной сыворотки оказывает качество исходного молока. В молочной сыворотке, полученной из восстановленного молока, практически отсутствуют минорные белки лактопероксидаза, лактоферрин и иммуноглобулины, в то время как молочная сыворотка, образующаяся при переработке цельного молока, обогащена этими ценными компонентами. Таким образом, молочная сыворотка из цельного молока может

быть использована не только для получения белкового гидролизата, но и лактопероксидазы, лактоферрина и иммуноглобулинов.

Таблица 1

Физико-химические характеристики образцов молочной сыворотки

Показатель	Вид молочной сыворотки					
	Творожная		Подсырная		Казеиновая	
Исходное сырье	Цельное молоко	Восстановленное молоко	Цельное молоко	Восстановленное молоко	Цельное молоко	Восстановленное молоко
Сухие вещества, %	5,7-6,7	5,5-6,5	6,5-7,2	6,2-7,0	5,5-6,5	5,5-6,4
Белки, г/л, в том числе:	7,8-9,6	6,5-9,0	7,8-8,9	6,2-7,5	7,1-10,4	6,0-9,5
Лактопероксидаза, ед/л	90-192	-	120-252	-	132-187	-
Лактоферрин, мг/л	10-45	-	15-50	-	15-25	-
Имуноглобулин G, г/л	0,3-0,8	0-0,1	0,4-0,9	0-0,1	0,3-0,8	0-0,1
Углеводы, г/л	35,0-39,5	35,0-38,5	39,7-46,1	39,5-45,5	38,6-45,5	37,0-47,0
Липиды, г/л	0,01-0,4	0,01-0,2	0,2-0,5	0,1-0,3	0,05-0,3	0,05-0,5
Плотность, кг/дм ³	1,01-1,02	1,01-1,02	1,01-1,03	1,01-1,03	1,01-1,02	1,01-1,02
pH	5,0-6,0	5,0-6,0	5,5-6,5	5,5-6,5	4,2-4,8	4,2-4,8

В дальнейшей работе была использована подсырная сыворотка, полученная при переработке цельного молока, так как она характеризуется максимальным содержанием наиболее ценных компонентов белковой природы.

Выбор схемы фракционного разделения молочной сыворотки

Молочная сыворотка – это комплексное вторичное сырье, содержащее белковые вещества с различными молекулярными массами. Анализ молекулярно-массового состава показал, что в ней содержится $19 \pm 1,5$ % белков с молекулярными массами >65 кДа (имуноглобулины, лактоферрин, лактопероксидаза, бычий сывороточный альбумин), $58 \pm 1,5$ % с молекулярными массами 30-40 кДа (димер β -лактоглобулина) и $23 \pm 1,5$ % с молекулярными массами 10-15 кДа (рис. 1). Следует отметить, что аналогичное молекулярно-массовое распределение белковых веществ характерно не только для подсырной, но и для творожной и казеиновой сыворотки.

Для получения отдельных белковых фракций на основе различия в молекулярных массах сывороточных белков был исследован процесс фракционирования молочной сыворотки на полупроницаемых мембранах с различной селективностью. В ходе эксперимента было установлено, что наиболее целесообразным является проведение двух последовательных стадий ультраконцентрирования по схеме, представленной на рис. 1.

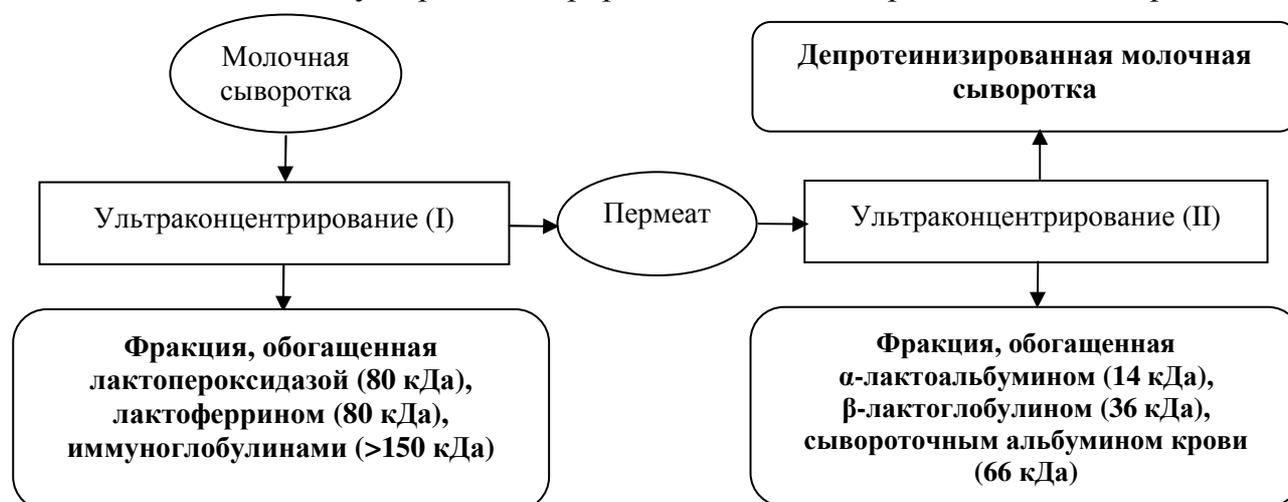


Рис. 1. Схема фракционирования молочной сыворотки

При подборе режимов проведения стадии «ультраконцентрирование (I)» были использованы мембраны УАМ-500, УАМ-100, УПМ-100 и УПМ-50. Установлено, что обладающая максимальной производительностью мембрана УАМ-500 задерживает иммуноглобулины, лактопероксидазу и лактоферрин и максимально пропускает остальные сывороточные белки при степени концентрирования, равной 10 (табл. 2).

Таблица 2

Основные характеристики мембран на стадии «ультраконцентрирование (I)»

Степень концентрирования	Удельная производительность мембраны, л/м ² *ч				Интегральная селективность мембраны по белкам, %			
	УАМ-500	УАМ-100	УПМ-100	УПМ-50	УАМ-500	УАМ-100	УПМ-100	УПМ-50
2	13,5±0,75	9,6±0,30	6,1±0,24	5,1±0,48	46,9±0,12	57,2±0,71	54,6±0,43	74,1±0,26
4	12,1±0,81	8,9±0,61	5,9±0,49	5,0±0,39	40,4±0,46	53,8±0,62	49,7±0,56	74,0±0,29
6	10,5±0,64	8,4±0,29	4,8±0,58	4,6±0,62	30,0±0,34	49,0±0,61	42,8±0,42	68,4±0,51
8	10,0±0,59	7,5±0,78	4,2±0,62	4,4±0,71	22,4±0,28	46,9±0,34	31,9±0,28	62,8±0,42
10	9,5±0,38	7,1±0,41	3,9±0,47	4,0±0,32	17,6±0,31	38,0±0,36	28,0±0,59	58,0±0,38

При подборе режимов проведения стадии «ультраконцентрирование (II)» были использованы мембраны УПМ-50, УПМ-20 и УПМ-10. Установлено, что мембрана УПМ-20 обеспечивает максимальную селективность по белкам при степени концентрирования, равной 5 (табл. 3).

Таблица 3

Основные характеристики мембран на стадии «ультраконцентрирование (II)»

Степень концентрирования	Удельная производительность мембраны, л/м ² *ч			Интегральная селективность мембраны по белкам, %		
	УПМ-50	УПМ-20	УПМ-10	УПМ-50	УПМ-20	УПМ-10
2	5,0±0,33	6,4±0,39	2,6±0,05	91,0±0,65	93,7±0,39	92,0±0,43
3	4,9±0,21	5,8±0,25	2,4±0,17	90,6±0,54	94,6±0,47	91,5±0,65
4	4,6±0,19	5,6±0,14	2,3±0,11	90,2±0,28	94,0±0,62	91,5±0,38
5	4,4±0,11	5,5±0,17	2,2±0,09	89,9±0,62	93,1±0,31	90,5±0,63

Получаемые в ходе ультрафильтрации обогащенные фракции содержат примеси низкомолекулярных компонентов, поэтому для их очистки была использована 3-х кратная диафильтрация. При этом эксперименты показали, что диафильтрат, полученный на стадии «ультраконцентрирование (I)», следует объединять с пермеатом и направлять на стадию «ультраконцентрирование (II)».

Таблица 4

Основные характеристики фракций, полученных при разделении молочной сыворотки

Фракция	Сухие вещества, %	Липиды, г/л	Углеводы, г/л	Белки, г/л
Фракция, обогащенная лактопероксидазой, лактоферрином, иммуноглобулинами	2,0±0,09	5,0±0,19	5,0±0,23	5,6±0,15
Фракция, обогащенная α-лактоальбумином, β-лактоглобулином, сывороточным альбумином крови	4,2±0,15	-	3,8±0,11	30,2±0,23
Депротеинизированная молочная сыворотка	4,4±0,12	-	38,0±0,45	0,57±0,05

Таким образом, показано, что последовательное ультрафильтрационное разделение молочной сыворотки на мембранах УАМ-500 и УПМ-20 позволяет получить три фракции: 1) фракцию, обогащенную лактопероксидазой, лактоферрином и иммуноглобулинами; 2) фракцию, обогащенную α-лактоальбумином, β-лактоглобулином и сывороточным альбумином крови; 3) депротеинизированную молочную сыворотку (табл. 4).

Подбор оптимальных условий выделения лактопероксидазы, лактоферрина и иммуноглобулинов

Выделение лактопероксидазы и лактоферрина

Использование ультрафильтрации позволило получить фракцию, обогащенную лактопероксидазой, лактоферрином и иммуноглобулинами. Известно, что лактоферрин и лактопероксидаза, в отличие от иммуноглобулинов, являются катионными белками, поэтому для их выделения чаще всего применяют ионный обмен с использованием сорбентов на основе целлюлозы, декстранов и агароз с различными функциональными группами [Сова, 2006]. В настоящей работе для сорбции лактопероксидазы и лактоферрина была использована карбоксиметилцеллюлоза, причем несорбированная фракция содержала иммуноглобулины.

Таблица 5

Подбор условий сорбции лактопероксидазы и лактоферрина в динамических условиях

Степень разбавления концентрата	Исходное содержание		Условия сорбции	Степень сорбции, %	
	Лактопероксидазы, ед/л	Лактоферрина, г/л		Лактопероксидазы	Лактоферрина
Без разбавления	1880±32,4	0,20±0,005	$V_{\text{раствора}} = 5V_{\text{колонки}}$	43	40
2	940±24,8	0,10±0,003	Скорость протекания 10 мл/мин	61	63
4	470±24,1	0,05±0,001		79	70
6	313±18,0	0,03±0,001		87	79
8	235±12,5	0,03±0,001	10 мл/мин	88	90
10	188±5,7	0,02±0,001		91	93

При выборе оптимальных условий сорбции лактоферрина и лактопероксидазы подбирали следующие параметры: режим (статический, динамический), содержание сорбента, исходную концентрацию сорбируемых компонентов. Предварительные исследования показали, что в статических условиях при содержании ионообменника 5-40 % по объему степень сорбции лактоферрина и лактопероксидазы из раствора не превышала 35 % и 40 %, соответственно. Для увеличения степени сорбции процесс осуществляли в динамических условиях при уменьшении исходного содержания лактоферрина и лактопероксидазы разбавлением исходного раствора фосфатным буфером в 2-10 раз (табл. 5).

Анализ результатов (табл. 5) показал, что оптимальными условиями сорбции лактоферрина и лактопероксидазы являются следующие: проведение процесса в динамических условиях, разбавление фракции, обогащенной лактопероксидазой, лактоферрином и иммуноглобулинами, фосфатным буфером в 10 раз до содержания лактоферрина 0,02 г/л и лактопероксидазы – 188 ед/л, что позволило добиться сорбции белков более чем на 90 %.

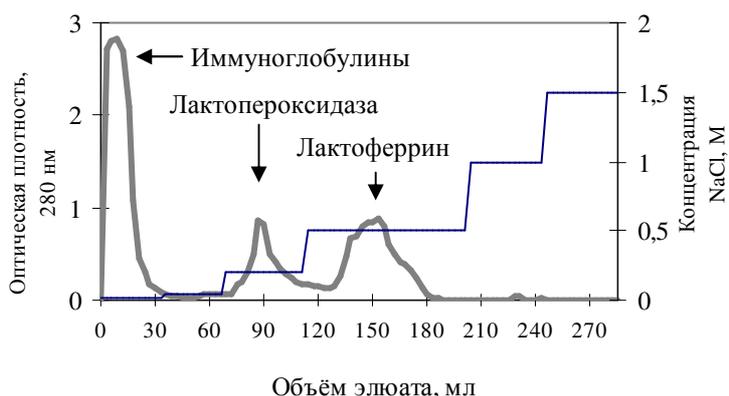


Рис. 2. Профиль элюции градиентом концентрации хлорида натрия

Из литературных данных известно, что для десорбции катионных белков чаще всего используется градиент концентрации хлорида натрия [Овчинникова О.В., 2008]. Повышение ионной силы элюента вызывает ослабление электростати-

ческого взаимодействия между белком и катионитом, что приводит к вымыванию белка в элюат.

В результате проведенных исследований было установлено, что элюцию следует проводить следующим образом: фосфатным буфером для удаления иммуноглобулинов, задержавшихся в свободной объеме колонки; 0,2 М раствором хлорида натрия для десорбции лактопероксидазы, 0,5 М раствором хлорида натрия для десорбции лактоферрина (рис. 2). Наличие белков с молекулярными массами, соответствующими лактопероксидазе и лактоферрину, в полученных фракциях было подтверждено гель-хроматографией.

Таблица 6

Основные характеристики полупродуктов, полученных при сорбции лактоферрина и лактопероксидазы

Фракция	Показатели									
	Сухие вещества, %	Липиды, г/л	Углеводы, г/л	Белки, г/л	Имуноглобулин G		Лактопероксидаза		Лактоферрин	
					г/л	%*	г/л	%*	г/л	%*
Исходный раствор	1,0± 0,02	0,50± 0,02	0,5± 0,03	0,65± 0,03	0,5± 0,04	100	188± 5,7	100	0,02± 0,001	100
Ионообменное разделение на карбоксиметилцеллюлозе										
Несорбированная фракция	1,0± 0,02	0,45± 0,02	0,5± 0,03	0,49± 0,03	0,4± 0,03	80	18± 0,3	9,6	следы	7,4
Промывная вода	1,3± 0,05	1,00± 0,05	-	2,44± 0,14	2,0± 0,12	20	-	-	-	-
Фракция лактопероксидазы	2,1± 0,07	-	-	0,36± 0,02	-	-	3400± 52,5	91,0	-	-
Фракция лактоферрина	3,8± 0,07	-	-	0,44± 0,02	-	-	-	-	0,37± 0,011	93,0
Ультраконцентрирование фракций лактопероксидазы и лактоферрина (мембрана УПМ-50)										
Концентрат лактопероксидазы	2,3± 0,07	-	-	3,04± 0,14	-	-	34000± 530,0	90,5	-	-
Концентрат лактоферрина	4,1± 0,09	-	-	3,93± 0,15	-	-	-	-	3,7± 0,10	92,5
Очистка концентратов лактопероксидазы и лактоферрина диафильтрацией (мембрана УПМ-50)										
Очищенный концентрат лактопероксидазы	1,2± 0,05	-	-	3,04± 0,14	-	-	34000± 530,0	90,5	-	-
Очищенный концентрат лактоферрина	1,3± 0,05	-	-	3,93± 0,15	-	-	-	-	3,7± 0,10	92,5

*- содержание от исходного количества в молочной сыворотке, %

Фракции лактопероксидазы и лактоферрина были сконцентрированы на мембране с отсекаемой молекулярной массой 50 кДа (УПМ-50) и очищены от избыточного количества хлорида натрия диафильтрацией. Выход лактоферрина и лактопероксидазы от исходного содержания в молочной сыворотке составил 92,5 % и 90,5 % соответственно. Основные характеристики полупродуктов, полученных в процессе сорбции и десорбции, а также стадии их дальнейшей переработки представлены в табл. 6. Полученные очищенные концентраты лактоферрина (3,7 г/л) и лактопероксидазы (34000 ед/л) могут быть направлены на сушку без дополнительной обработки.

Выделение иммуноглобулинов

Как было указано выше, иммуноглобулины содержатся в несорбированных фракциях, полученных после сорбции лактоферрина и лактопероксидазы и промывки сорбента фосфатным буфером, поэтому целесообразным является их объединение.

Поскольку в полученной объединенной фракции содержание белков невысоко (0,58 г/л), раствор был сконцентрирован на мембране УАМ-500, в результате чего удалось получить концентрат иммуноглобулинов следующего состава: содержание белков – 12,2 г/л (из них IgG 10,0 г/л), углеводов – 0,4 г/л, липидов – 10,0 г/л.

Концентрат иммуноглобулинов содержит значительные количества липидов (около 50% по сухому веществу), присутствие которых снижает качество конечного продукта. Проведенные исследования показали, что наиболее подходящим способом очистки иммуноглобулинов от липидов является высаливание. При исследовании зависимости степени осаждения иммуноглобулинов от концентрации сульфата аммония, вносимого в интервале 10–50 % от насыщения, было установлено, что при 40 %-ном насыщении раствора сульфатом аммония выпадает в осадок более 97 % иммуноглобулинов (рис. 3).

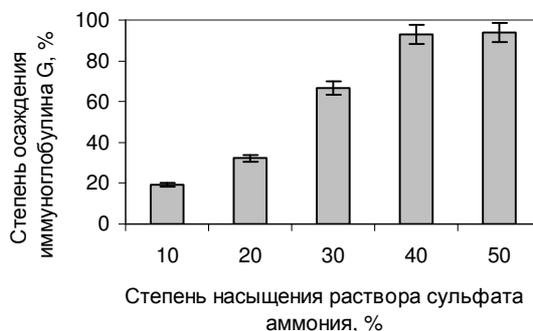


Рис. 3. Зависимость степени осаждения иммуноглобулина G от насыщения раствора сульфата аммония

Полученный после растворения осадка раствор иммуноглобулинов был очищен последовательными стадиями ультрафильтрации на мембране с отсекаемой молекулярной массой 100 кДа (УПМ-100) и диафильтрацией. При этом выход иммуноглобулинов составил 95 % от исходного количества в молочной сыворотке. Основные характеристики полупродуктов, получаемых в ходе очистки иммуноглобулинов, представлены в табл. 7.

Таблица 7

Основные характеристики полупродуктов, полученных на стадии выделения иммуноглобулинов

Фракция	Показатели					
	Сухие вещества, %	Липиды, г/л	Углеводы, г/л	Белки, г/л	Имуноглобулин G	
					г/л	% *
Объединенная фракция иммуноглобулинов	1,0±0,02	0,48±0,02	0,48±0,03	0,58±0,05	0,5±0,04	100
Ультраконцентрирование объединенной фракции иммуноглобулинов (мембрана УАМ-500)						
Концентрат иммуноглобулинов	3,0±0,09	10±0,4	0,4±0,02	12,2±0,41	10,0±0,41	99,5
Высаливание иммуноглобулинов сульфатом аммония						
Осадок иммуноглобулинов	67,8±3,35	-	-	17,4±0,51 % от сух. в-в	14,2±0,28 % от сух. в-в	96
Растворение осадка иммуноглобулинов после высаливания						
Раствор иммуноглобулинов	2,6±0,08	-	-	2,95±0,13	2,4±0,13	96
Ультраконцентрирование раствора иммуноглобулинов (мембрана УПМ-100)						
Концентрат иммуноглобулинов	3,4±0,09	-	-	11,8±0,37	9,6±0,48	95,2
Диафильтрация концентрата иммуноглобулинов (мембрана УПМ-100)						
Очищенный концентрат иммуноглобулинов	2,1±0,08	-	-	11,8±0,37	9,6±0,48	95,0

*- содержание от исходного количества в молочной сыворотке, %

Полученный очищенный раствор иммуноглобулинов с содержанием IgG 9,8 г/л может быть направлен на сушку без дополнительной очистки.

Ферментативный гидролиз фракции, обогащенной главными сывороточными белками

При ультрафильтрационном разделении молочной сыворотки одной из полученных белковых фракций является фракция, обогащенная α -лактоальбумином, β -лактоглобулином и сывороточным альбумином крови. Из литературных данных известно, что β -лактоглобулин является сильным аллергеном и чаще всего используется в виде гидролизатов, поэтому для повышения биологической ценности была проведена ферментативная обработка белков, содержащихся в данной фракции, с получением белковых гидролизатов.

Таблица 8

Подбор оптимальных условий ферментативного гидролиза

Ферментный препарат	Условия гидролиза		Характеристика гидролизата	
	Начальная концентрация белка, г/л	Расход фермента, %	Степень гидролиза, %	Содержание аминокислотного азота, %
Трипсин	15	3	35,5±0,80	11,0±0,45
	20	3	35,1±0,71	9,5±0,41
	20	0,5	22,8±0,67	9,1±0,42
	20	1,0	29,1±0,46	10,2±0,47
	20	2,0	32,5±0,80	9,9±0,39
	25	3	32,3±0,85	12,3±0,49
Химотрипсин	30	3	26,5±0,72	14,1±0,56
	15	3	38,9±1,25	14,3±0,52
	20	3	39,9±1,24	11,0±0,40
	20	0,5	25,5±0,51	8,8±0,32
	20	1,0	31,9±1,36	9,1±0,35
	20	2,0	35,8±1,55	11,0±0,37
Химопсин	25	3	36,4±1,28	12,9±0,48
	30	3	27,5±0,76	12,5±0,46
	15	3	98,0±1,55	22,6±0,91
	20	3	98,0±1,55	21,8±0,80
	20	0,5	77,9±1,23	16,5±0,62
	20	1,0	89,1±1,43	17,9±0,71
Панкреатин	20	2,0	98,0±1,50	17,5±0,75
	25	3	75,7±1,05	17,4±0,70
	30	3	61,2±1,14	17,3±0,68
	15	3	67,6±1,12	35,7±1,35
	20	0,5	39,7±1,10	15,9±0,59
	20	1,0	51,2±1,23	20,5±0,95
Панкреатин	20	2,0	66,2±1,32	24,7±0,87
	20	3	69,4±1,45	27,4±0,79
	25	3	50,6±1,50	20,9±0,84
	30	3	38,4±1,03	17,7±0,63

Для проведения ферментативного гидролиза были использованы отобранные в соответствии с литературными данными ферментные препараты: трипсин (4040±120 ед/г), химотрипсин (4960±150 ед/г), химопсин (5250±160 ед/г) и панкреатин (5310±160 ед/г) [Телишевская Л.Я., 2000].

При выборе оптимальных условий ферментативного гидролиза подбирали количество вносимого фермента (0,5-3,0 % от массы субстрата) и начальную концентрацию субстрата (15-30 г/л), которую устанавливали путем разбавления фракции, обогащенной главными сывороточными белками, дистиллированной водой. Продолжительность гидролиза была подобрана в ходе предварительных экспериментов и составила 3 ч. Основные результаты исследований приведены в табл. 8.

Анализ полученных данных показал, что гидролиз необходимо проводить при начальной концентрации белка не более 20 г/л. Это может быть связано с реологическими характеристиками системы: при высокой концентрации белка повышается вязкость, в результате чего возникают затруднения при контакте фермента с субстратом.

Таким образом, показано, что оптимальными условиями получения белкового гидролизата на основе фракции, обогащенной главными сывороточными белками, являются: начальная концентрация белка 20,0 г/л, расход химопсина 3 % от массы субстрата, продолжительность – 3 ч. В результате данного процесса удается достичь степени гидролиза 98 % при содержании аминокислотного азота в белковом гидролизате 21,8 %.

Использование депротеинизированной молочной сыворотки для получения β-галактозидазы

Молочная сыворотка помимо белковых компонентов содержит значительные количества лактозы и минеральных компонентов, которые в рамках данной технологии образуются из исходного сырья на начальных стадиях переработки в виде депротеинизированной молочной сыворотки. Высокое содержание лактозы, являющейся индуктором синтеза β-галактозидазы, позволяет рассматривать данную фракцию в качестве основы питательной среды для культивирования продуцентов β-галактозидазы. Анализ литературных данных показал, что эффективными продуцентами данного фермента являются дрожжевые культуры *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus*, способные расти на различных лактозосодержащих средах и накапливать большие количества β-галактозидазы.

Культивирование дрожжей рода *Kluyveromyces* на питательных средах, содержащих депротеинизированную молочную сыворотку

Предварительные исследования по культивированию дрожжей *Kluyveromyces lactis* и *Kluyveromyces marxianus* показали, что данные микроорганизмы способны активно расти на синтетических лактозосодержащей среде (контроль) и накапливать наибольшее количество β-галактозидазы в конце логарифмической фазы роста (рис. 4).

В ходе экспериментов была подобрана питательная среда на основе депротеинизированной молочной сыворотки (табл. 9), при культивировании на которой дрожжей *Kluyveromyces marxianus* удалось получить биомассу с максимальной активностью по β-галактозидазе, равной 463 ед/г.

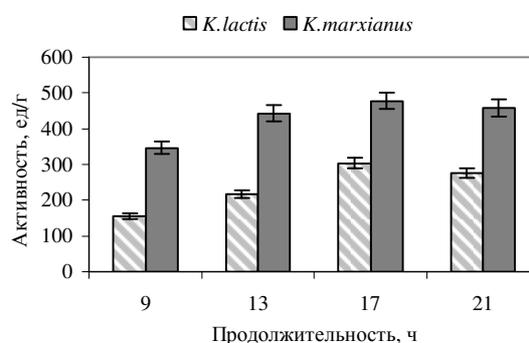


Рис. 4. Активность β-галактозидазы в биомассе дрожжей в зависимости от продолжительности культивирования

Таблица 9

Состав питательных сред, использованных для культивирования дрожжей *Kluyveromyces marxianus*

Контроль	Питательная среда на основе депротеинизированной молочной сыворотки	
	Подобранная	Комбинированная
Лактоза – 50 г/л, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 2 г/л, KH ₂ PO ₄ – 5 г/л, MgSO ₄ – 0,34 г/л, Дрожжевой экстракт – 2 г/л, рН 5,5.	Белки – 0,57 г/л, Углеводы – 38,0 г/л, NH ₄ H ₂ PO ₄ – 4 г/л, MnSO ₄ – 0,16 г/л, Дрожжевой экстракт – 1 г/л, рН 5,5.	Белки – 0,41 г/л, Углеводы – 25,8 г/л, Липиды – 0,29 г/л, (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4,5 г/л, MnSO ₄ – 0,16 г/л, Дрожжевой экстракт – 1 г/л, рН 5,5

В предложенной схеме комплексной переработки молочной сыворотки образуются стоки, содержащие лактозу и минеральные вещества. Для уменьшения нагрузки на очистные сооружения является целесообразным использование наиболее концентрированных стоков в качестве минеральной основы питательных сред. Поэтому была исследована возможность культивирования дрожжей *Kluyveromyces marxianus* на комбинированной среде, содержащей депротеинизированную молочную сыворотку, диафильтрат, полученный на стадии «ультраконцентрирование (II)», и надосадочную жидкость, полученную на стадии высаливания иммуноглобулинов и содержащую значительное количество сульфата аммония (табл. 9).

Основные ростовые характеристики при культивировании дрожжей *Kluyveromyces marxianus* на питательных средах, содержащих депротеинизированную молочную сыворотку, представлены в табл. 10.

Таблица 10

Ростовые характеристики *K. marxianus* при культивировании на питательных средах, содержащих депротеинизированную молочную сыворотку

Питательная среда	$\mu, \text{ч}^{-1}$	Биомасса, г/л	Степень усвоения углеводов, %	Y (по общим углеводам)	Активность β -галактозидазы	
					Удельная, ед/г	Общая, ед/л
Контроль	0,25	11,2 \pm 0,88	96,0	0,23	478 \pm 28,2	5357 \pm 212,0
Подобранная	0,3	13,1 \pm 0,95	97,0	0,36	463 \pm 19,5	6065 \pm 235,6
Комбинированная	0,3	12,8 \pm 0,73	96,5	0,51	486 \pm 28,7	6221 \pm 248,8

Анализ полученных данных показал, что при культивировании на комбинированной питательной среде дрожжи *Kluyveromyces marxianus* накапливают β -галактозидазу с наибольшей удельной активностью равной 486 ед/г.

Подбор оптимальных условий выделения β -галактозидазы из биомассы *Kluyveromyces marxianus*

Из литературных данных известно, что дрожжевая β -галактозидаза является внутриклеточным ферментом с молекулярной массой более 200 кДа [Гореликова Г.А., 2004], поэтому его выделение может быть осуществлено по следующей схеме: дезинтеграция клеток дрожжей, концентрирование и очистка фермента.

Для дезинтеграции клеток нативной биомассы были использованы физические (перетирание со стеклом, ультразвуковая обработка) и химические (органические растворители, детергенты) методы воздействия. Наилучшие результаты были достигнуты при воздействии толуолом в количестве 2 % от объема суспензии биомассы в течение 2 ч, причем выход фермента составил 88 % от его содержания в биомассе.

Раствор, содержащий β -галактозидазу, был сконцентрирован методом ультрафильтрации, очищен от внутриклеточных компонентов и низкомолекулярных примесей методами диафильтрации и осаждения в изоэлектрической точке (табл. 11).

Таблица 11

Основные характеристики полупродуктов, содержащих β -галактозидазу

Фракция	Показатели фракции			
	Сухие вещества, %	Белки, г/л	Активность β -галактозидазы	% выхода
Нативная биомасса	40,0 \pm 0,80	-	486 \pm 29 ед/г АСБ	100
Дезинтеграция клеток толуолом				
Экстракт β -галактозидазы	6,5 \pm 0,19	4,5 \pm 0,16	21530 \pm 520 ед/л	88,6
Ультраконцентрирование экстракта β -галактозидазы (мембрана УПМ-100)				
Концентрат β -галактозидазы	3,2 \pm 0,10	14,1 \pm 0,42	320760 \pm 4551 ед/л	88,0
Диафильтрация концентрата β -галактозидазы (мембрана УПМ-100)				
Очищенный концентрат β -галактозидазы	2,9 \pm 0,08	13,0 \pm 0,46	317115 \pm 3870 ед/л	87,0
Осаждение β -галактозидазы в изоэлектрической точке (pI 5,0)				
Осадок β -галактозидазы	95,0 \pm 2,85	80,0 \pm 2,45 % по сухому веществу	24400 \pm 455 ед/г	69,6

Полученный осадок β -галактозидазы с удельной активностью 24400 ед/г белка может быть далее направлен на стадию сушки без дополнительной обработки.

Технико-экономическая оценка разработанной технологии переработки молочной сыворотки

На основании проведенных исследований разработана принципиальная блок-схема комплексной переработки молочной сыворотки, включающая следующие стадии:

- последовательное разделение молочной сыворотки методом ультрафильтрации;
- выделение лактопероксидазы и лактоферрина сорбцией на карбоксиметилцеллюлозе с последующей десорбцией растворами хлорида натрия;
- выделение иммуноглобулинов высаливанием сульфатом аммония;
- получение очищенных концентратов лактопероксидазы, лактоферрина и иммуноглобулинов ультрафильтрацией и диафильтрацией;
- ферментативный гидролиз фракции, обогащенной α -лактоальбумином, β -лактоглобулином и сывороточным альбумином крови, ферментным препаратом химопсин;
- культивирование дрожжей *Kluyveromyces marxianus* – продуцентов β -галактозидазы на питательной среде, содержащей депротеинизированную молочную сыворотку и солевые стоки;
- выделение β -галактозидазы из нативной биомассы дезинтеграцией толуолом, ультраконцентрированием, диафильтрацией, осаждением в изоэлектрической точке (рис. 5).

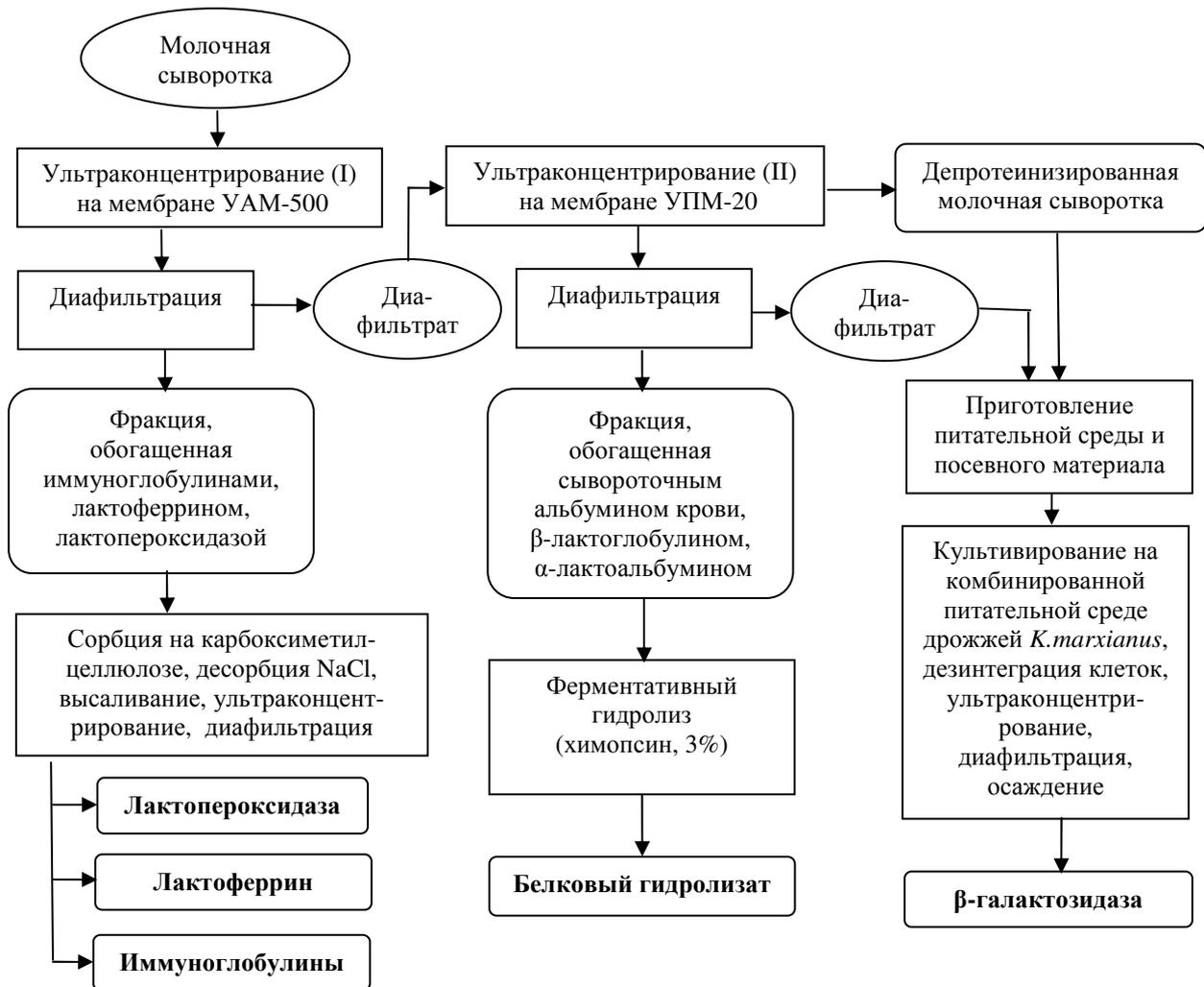


Рис. 5. Принципиальная блок-схема переработки молочной сыворотки с получением биологически активных продуктов белковой природы

На основе проведенных исследований рассчитаны технико-экономические показатели трех вариантов технологических схем комплексной переработки молочной сыворотки мощностью 30 000 тонн/год, отличающиеся характеристиками исходного сырья и предусматривающие получение:

1 - лактопероксидазы, лактоферрина, иммуноглобулинов, белкового гидролизата и β -галактозидазы;

2 - иммуноглобулинов, белкового гидролизата и β -галактозидазы;

3 - белкового гидролизата и β -галактозидазы (табл. 11).

Таблица 11

Технико-экономические показатели комплексной технологии переработки молочной сыворотки с получением биологически активных продуктов белковой природы

№ п/п	Наименование показателя	Единица измерения	Значение показателей		
			1	2	3
1	Капитальные затраты	тыс руб	107 730	107 190	104 640
2	Полная себестоимость годового выпуска	тыс руб	422 670	286 880	141 310
3	Себестоимость единицы продукции				
	- лактопероксидаза	тыс. руб/т	174,14	-	-
	- лактоферрин	тыс. руб/т	101,65	-	-
	- иммуноглобулины	тыс. руб/т	10,75	15,83	-
	- белковый гидролизат гидролизат	тыс. руб/т	0,42	0,61	1,25
	- β -галактозидаза	тыс. руб/т	4,58	6,75	13,71
4	Стоимость годового выпуска продукции	тыс. руб/т	507 280	344 420	169 570
5	Прибыль годовая	тыс руб	84 610	57 540	28 260
6	Рентабельность				
	а) производственных фондов	%	72	49	25
	б) продукции	%	20	20	20
7	Срок окупаемости капитальных вложений	год	1,3	1,9	3,7

Из представленных данных следует, что разработанная технология рентабельна при переработке молочной сыворотки, полученной как из цельного, так и восстановленного молока.

Предварительный расчет эколого-экономического эффекта от внедрения разработанной технологии с выбранной мощностью показал, что экономия средств за счет снижения расходов на переработку отходов превысит 3,6 млн руб/год, кроме того, переработка молочной сыворотки в конкурентоспособную продукцию позволит получить до 84,6 млн руб/год дополнительной прибыли.

ВЫВОДЫ

1. Разработана принципиальная схема комплексной переработки молочной сыворотки, позволяющая получить биологически активные продукты белковой природы: лактопероксидазу, лактоферрин, иммуноглобулины, белковый гидролизат и β -галактозидазу.
2. Обоснован выбор схемы фракционирования молочной сыворотки, основанной на мембранном разделении и позволяющей получить следующие фракции: 1) фракцию, обогащенную лактопероксидазой, лактоферрином, и иммуноглобулинами; 2) фракцию, обогащенную β -лактоглобулином, α -лактоальбумином и сывороточным альбумином крови; 3) депротеинизированную молочную сыворотку.
3. Подобраны условия выделения лактопероксидазы, лактоферрина и иммуноглобулинов, включающие стадии ионного обмена, высаливания, ультрафильтрации и диализа, позволяющие достичь выхода вышеперечисленных белков не ме-

нее 90 % от их исходного содержания в молочной сыворотке.

4. Подобраны условия получения белкового гидролизата со степенью гидролиза не менее 98 % и содержанием аминного азота 21,8 %, предполагающие обработку фракции, обогащенной β -лактоглобулином, α -лактоальбумином и сывороточным альбумином крови, с начальной концентрацией белка 20 г/л ферментным препаратом химопсином в количестве 3 % от массы субстрата.
5. Показана возможность использования депротеинизированной молочной сыворотки и минеральных стоков в качестве основы питательной среды для культивирования дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, что позволяет получить биомассу с активностью по β -галактозидазе 486 ед/г.
6. Подобраны условия выделения β -галактозидазы из нативной биомассы дрожжей *Kluyveromyces marxianus*, включающие стадии дезинтеграции клеток, концентрирования и осаждения в изоэлектрической точке и позволяющие получить ферментный препарат с активностью 24400 ед/г, что сопоставимо с активностью известных коммерческих препаратов.
7. Проведена ориентировочная технико-экономическая оценка реализации разработанной технологии переработки молочной сыворотки при расчетной мощности производства 30 000 тонн/год по перерабатываемому сырью. Предварительный расчет эколого-экономического эффекта от внедрения разработанной технологии с выбранной мощностью показал, что экономия средств за счет снижения расходов на переработку отходов превысит 3,6 млн руб/год.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Рытченкова, О.В. Исследование молекулярного распределения белков при ультраконцентрировании молочной сыворотки на мембранах / А.А. Красноштанова, В.Г. Попов, О.В. Рытченкова // Молочная промышленность. 2010 №7. С. 60-61.
2. Рытченкова, О.В. Оптимизация процесса получения ферментативных гидролизатов белков молочной сыворотки с применением протеолитических ферментов / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // Фундаментальные исследования. 2011. №8 (часть 3). С. 663-666.
3. Рытченкова, О.В. Выделение лактоферрина и лактопероксидазы из молочной сыворотки / А.А. Красноштанова, О.В. Рытченкова // Экология и промышленность России. 2011. №11. С. 48-51.
4. Рытченкова, О.В. Выделение белковых изолятов из концентрата молочной сыворотки / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // Международная научно-практическая конференция «Технология молочных и молкосодержащих продуктов». Ставрополь. 2008. С. 152-154.
5. Рытченкова, О.В. Исследование процесса выделения белков из концентрата молочной сыворотки / О.В. Рытченкова // IV Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии. Москва. 2008. Том XXII, №13. С. 79-82.
6. Рытченкова, О.В. Разработка приемов выделения белков из молочной сыворотки / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // 6-я Международная конференция «Сотрудничество для решения проблемы отходов». Харьков. 2009. С. 154-156.
7. Рытченкова, О.В. Разработка основ технологии выделения белковых фракций из концентрата молочной сыворотки / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // V Московский Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы раз-

- вития». 2009 г. ч.1. С. 432 – 433.
8. Рытченкова, О.В. Состав молочной сыворотки и ее переработка мембранными методами / О.В. Рытченкова, 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.204-207.
 9. Рытченкова, О.В. Получение α -лактоальбумина и β -лактоальбумина из молочной сыворотки / О.В. Рытченкова // V Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии. Москва. 2009. Том XXIII, №10. С. 96-99.
 10. Рытченкова, О.В. Исследование процесса выделения высокомолекулярных белков из молочной сыворотки / О.В. Рытченкова // XIII Международная конференция молодых ученых, студентов и аспирантов «Синтез, исследование свойств, модификация и переработка высокомолекулярных соединений – V Кирпичниковские чтения». Казань. 2009. С. 288.
 11. Рытченкова, О.В. Комплексная переработка молочной сыворотки с целью получения биологически активных веществ пищевого и медицинского назначения / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // Московская Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: экология крупных городов». Москва. 2010. С. 251-252.
 12. Рытченкова, О.В. Культивирование дрожжевых культур-продуцентов фермента β -галактозидазы на пермеате молочной сыворотки / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // Всероссийский симпозиум с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов». Москва. 2011. С. 99.
 13. Рытченкова, О.В. Исследование ферментативного гидролиза белков молочной сыворотки / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // VI Московский Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва. 2011. ч.1. С. 369-370.
 14. Рытченкова, О.В. Получение иммуноглобулинов, лактоферрина и лактопероксидазы из концентрата молочной сыворотки / О.В. Рытченкова, А.А. Красноштанова // Научно-практический семинар «Феномен молочной сыворотки: синтез науки и практики» в рамках Международной научно-технической конференции «Современные достижения биотехнологии». Ставрополь. 2011. С. 68-69.
 15. Рытченкова, О.В. Культивирование продуцентов β -галактозидазы на депротеинизированной молочной сыворотке / И.Р. Яхин, О.В. Рытченкова // VII Международный конгресс молодых ученых по химии и химической технологии. Москва. 2011. Том XXV. №10. С. 33-36.