УДК 54.056:636

ПОЛУЧЕНИЕ РАСТВОРИМОЙ МОДИФИКАЦИИ КЕРАТИНА ИЗ БЕЛОКСОДЕРЖАЩИХ ОТХОДОВ ЖИВОТНОВОДСТВА

Бортников С.В., Горенкова Г.А.

ФГБОУ ВО «Хакасский государственный университет имени Н.Ф. Катанова», Абакан, e-mail: svb@khsu.ru

На различных стадиях переработки продуктов животноводства около половины исходного сырья превращается в отходы. Это касается, в частности, белоксодержащих отходов животноводства (перо, шерсть), основу которых составляет уникальный по своему составу, структуре и свойствам фибриллярный белок кератин. Проблема перевода кератина в водорастворимое состояние ограничивает использование этих отходов в качестве вторичного сырья в различных отраслях хозяйства для получения ряда ценных продуктов и материалов. Известные методы переработки кератинсодержащего сырья основаны на разрыве связей, образующих структуру белка, в условиях кислотного, щелочного или ферментативного гидролиза с протеканием большого числа конкурирующих реакций и образованием смеси продуктов частичной и полной деструкции полипептида. Наиболее прочная связь, формирующая третичную структуру кератина (дисульфидная), может быть разорвана и в ходе окислительно-восстановительного процесса в относительно мягких условиях. Предлагаемый метод получения растворимой модификации кератина основан на взаимодействии белоксодержащих материалов (перо, шерсть) с агентами, обладающими окислительно-восстановительными свойствами: сульфидом натрия, сульфитом натрия и перекисью водорода. Переход кератина в раствор в разной степени происходит во всех модельных системах, при этом концентрация белка в растворе при использовании сульфида натрия возрастает быстрее и достигает большего значения, чем в случае с сульфитом натрия и перекисью водорода. Можно предположить, что в случае с сульфидом процесс ограничивается реакцией восстановления с образованием производных тиолов, а в случае с сульфитом и перекисью водорода процесс осложняется конкурирующей реакцией окисления с образованием конечных продуктов более сложного состава. Предлагаемая технология позволяет в мягких условиях, без деструкции белка и побочных процессов получить его водорастворимую форму.

Ключевые слова: кератин, белоксодержащие отходы животноводства, перо, шерсть, нативная структура белка, дисульфидные связи, окислительно-восстановительные реагенты, модификация

PRODUCTION OF SOLUBLE MODIFICATION OF KERATIN FROM PROTEIN-CONTAINING ANIMAL WASTES

Bortnikov S.V., Gorenkova G.A.

Federal State-Funded Educational Institution of Higher Education «Katanov Khakass State University», Abakan, e-mail: svb@khsu.ru

At the various stages of processing livestock animal wastes products about half of the feedstock is converted to waste. This applies, in particular, to protein-containing animal wastes (feathers, wool), the basis of which is unique in its composition, structure and properties the fibrillar protein keratin. The problem of transferring keratin to a water-soluble state limits the use of these wastes as secondary raw materials in various branches of the economy in order to obtain a number of valuable products and materials. Known methods for processing keratin-containing raw materials are based on the breakdown of the bonds, forming the protein structure, under acidic, alkaline or enzymatic hydrolysis with a large number of competing reactions and the formation of a mixture of products of partial and complete destruction of the polypeptide. The strongest bond, forming the tertiary structure of keratin (disulphide), can also be broken during the oxidation-reduction process under relatively mild conditions. The proposed method of obtaining a soluble keratin modification is based on the interaction of protein-containing materials (feather, wool) with agents, having redox properties: sodium sulfide, sodium sulfite and hydrogen peroxide. The transition of keratin to a solution occurs to a varying degree in all model systems, while the protein concentration in the solution increases more rapidly with the use of sodium sulfide and reaches a higher value than in the case of sodium sulfite and hydrogen peroxide. It can be assumed that in the case of a sulfide, the process is limited to a reduction reaction to form thiol derivatives, and in the case of a sulfite and hydrogen peroxide the process is complicated by a competing oxidation reaction to form final products of a more complex composition. The proposed technology allows in mild conditions, without protein degradation and side processes to obtain its water-soluble form.

Keywords: keratin, protein-containing animal wastes, feather, wool, native protein structure, disulfide bonds, redox reagents, modification

Специфика переработки продуктов животноводства заключается в том, что в процессе получения основной товарной продукции до половины исходного сырья на различных стадиях технологического процесса превращается в отходы. Это касается, в частности, белоксодержащих отходов птицеводства и шерстеперерабатывающих производств.

В крупных животноводческих хозяйствах белоксодержащие отходы могут, в определенной степени, представлять угрозу экологическому состоянию – медленно разлагаясь и выделяя загрязняющие, в том числе токсичные вещества в окружающую среду [1]. Так, накапливающиеся в анаэробных условиях в почве продукты разложения белков (диамины) проявляют

ярко выраженные фитотоксичные свойства и нередко способствуют угнетению роста растений [2, 3].

Кератин, являясь животным белком, состоит из α-аминокислот, из которых порядка 30 % относятся к группе незаменимых для животного организма. Природные кератины очень богаты кислыми и основными аминокислотами. Эти белки отличаются также необычно высоким содержанием остатков цистеина – аминокислоты, содержащей тиольную группу (SH). Во многом по этой причине кератин характеризуется особыми физико-химическими свойствами. В частности, кератин отличается высокой устойчивостью к воздействию различных реагентов: в воде, растворах нейтральных солей и в разбавленных растворах кислот и щелочей кератин нерастворим. Он не подвергается гидролизу под действием ферментов, кроме фермента кератиназы. Наличие в составе этого белка большого числа тиольных групп обуславливает значительную роль дисульфидных ковалентных связей, формирующих и поддерживающих нативную структуру полипептида.

Устойчивость кератина к химическим реагентам, внешним воздействиям, ферментам пищеварительных соков животных обусловлена главным образом именно наличием в структуре его дисульфидной (цистиновой) связи. По этой причине большинство животных организмов усваивать этот белок в нативном состоянии не может [4].

Очевидно, чтобы перевести кератин в усваиваемое (водорастворимое) состояние, необходимо разрушить третичную структуру белка.

Процесс денатурации способствует разворачиванию укладки цепей полипептида. В ходе этого процесса утрачиваются свойства, характерные для нативного кератина. При денатурации становятся доступны функциональные группы, ранее находящиеся в положении скрытых в нативном состоянии молекул. Следовательно, для того, чтобы получить водорастворимый кератин, следует оказывать воздействия, вызывающие процесс денатурации. Это может быть изменение суммарного заряда полипептида за счет варьирования pH и частичный разрыв ковалентных дисульфидных связей. В результате изменения pH молекула белка кератина как полиамфолит меняет свою структуру и свойства, увеличивается способность к гидратации, набуханию и растворению в воде. Разрушение дисульфидных связей, формирующих третичную структуру белка, приводит к её нарушению, что выражается в разрыхлении структуры пера, снижению его прочности, что облегчает проникновение молекул воды внутрь структуры и сопровождается его более эффективным набуханием.

Одной из главных характеристик химической активности тиолов и их производных (сульфидов) является их способность к окислительно-восстановительным превращениям. Так, при действии на дисульфиды восстановителей (сульфидов, бисульфитов, гидросульфитов и др.) дисульфидные связи разрываются с последующим присоединением по месту освободившихся валентностей различных групп в зависимости от применяемого реагента. В биохимических реакциях роль восстанавливающего реагента играет фермент кератиназа, наличие которого дает возможность некоторым организмам усваивать кератин (*Tineola bisselliella*). При окислении тиолы превращаются в сульфоновые кислоты, образующие в щелочной среде соответствующие соли, тем самым нейтрализуя конечный раствор.

В литературных источниках описаны различные методы получения гидролизатов из кератинсодержащего сырья: гидротермический, щелочной, кислотный, ферментативный [5]. Известные методы по переработке кератинсодержащего сырья основаны на разрыве связей, образующих четвертичную, третичную, вторичную и первичную структуры. В последнем случае деструкция кератина идет до свободных аминокислот. Как показывает анализ доступной научно-технической информации, в основном используют комбинацию физических и химических воздействий на кератинсодержащее сырьё для извлечения белка. Чтобы получить растворимый белок из нерастворимого полипептида, необходимо подобрать условия и реагенты, которые позволили бы разрушить четвертичную, третичную, вторичную структуры. В числе факторов, которые изменяют четвертичную структуру перьевого кератина, – изменение pH, повышение температуры, действие детергентов и т.д. К разрушению третичной и вторичной структуры без разрыва пептидных связей (денатурации) могут привести: нагревание растворов белка выше 60 °C, изменение pH (<3–4 или >10), ультразвук, органические растворители, соли тяжелых металлов, детергенты и т.д. И как результат – изменяются кристаллическая структура, растворимость и др. [5, 6].

При гидролизе в качестве реагентов используют 0,25–10 % растворы гидроксида натрия, 13 % раствор гидроксида калия или 25 % раствор аммиака, растворы минеральных и органических кислот. Гидролиз, как правило, осуществляют при нагревании до 95 °C в течение длительного времени (до 5 и более часов) [7].

Основными недостатками гидролиза при высоких температурах являются значительная деструкция как самого белка, так и отдельных аминокислот, входящих в его состав. Длительность процесса и жесткие условия приводят к разрушению аминокислот и их частичной рацемизации [7].

Так, некоторые авторы [8] указывают, что при использовании жестких температурных режимов сильно возрастает потеря серосодержащих аминокислот (цистеина).

Материалы и методы исследования

Щелочной гидролиз. 10 г пера промывали тёплым мыльным раствором, несколько раз ополаскивали дистиллированой водой, помещали в колбу и добавляли 100 мл 10 % раствора NaOH. Отбирали пробы через 24, 48, 72, 144, 168 часов. Определяли концентрацию белка.

Гидролиз в присутствии восстановителя. 10 г пера промывали тёплым мыльным раствором, несколько раз ополаскивали дистиллированной водой, помещали в колбу и добавляли 200 мл 0,1 н раствора NaOH, и 200 мл 10 % раствора H_2O_2, Na_2S, Na_2SO_3. Отбирали пробы через 24, 48, 72, 144, 168 часов. Определяли концентрацию белка.

Количественную оценку содержания белка проводили фотоколориметрическим методом по биуретовой реакции.

Результаты исследования и их обсуждение

Моделирование процесса гидролиза пера птицы, основанное на литературных аналогиях, заключающееся в длительном кипячении исходного сырья в растворах щёлочи и кислоты, обнаружило полное растворение пера и глубокую деструкцию кератина. По истечении 5 часов кипячения нерастворимой фракции в системе не осталось. В случае обработки кислотой наблюдалось также и значительное обугливание органического вещества.

Тонкослойная хроматография с нингидрином показала наличие серосодержащих аминокислот (цистеина и метионина) в гидролизатах исследуемых образцов. Это подтверждает, что при использованном методе обработки пухо-перового сырья происходит разрушение не только третичной и вторичной, но также и первичной структуры белка с образованием олигопептидов с низкой молекулярной массой и свободных аминокислот.

Во избежание указанных негативных процессов в системе нами осуществлен щелочной гидролиз в мягких условиях, когда перо выдерживалось в 10 % растворе NaOH при комнатной температуре. Эксперимент показал, что в течение суток произошло полное растворение пера.

Таким образом, при действии щелочи в мягких условиях кератин также переходит в раствор за счет селективного гидролиза дисульфидных -S-S- связей в молекуле. Образующиеся продукты реакции (тиолы, сульфоновые кислоты), как правило, неустойчивы в щелочных растворах, и в них могут протекать дальнейшие изменения, осложняющие процесс и загрязняющие конечный целевой продукт.

Подобных нежелательных последствий при осуществлении процесса гидролиза можно попытаться избежать используя особенности химического поведения рассматриваемых веществ.

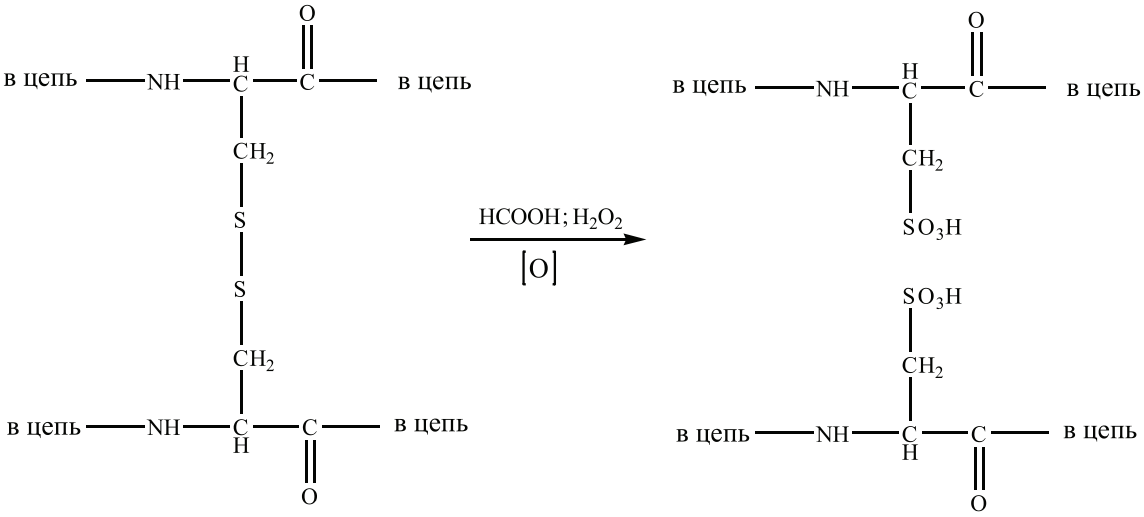
Предлагаемый в настоящей работе метод получения растворимой модификации кератина основан на взаимодействии кератина с агентами, обладающими окислительно-восстановительными свойствами: сульфидом натрия, сульфитом натрия и перекисью водорода. Эффективность метода оценивалась по содержанию белка в растворе.

Известно, что в случае реакции окисления дисульфидной связи перекисью водорода в присутствии муравьиной кислоты образуются сульфоновые кислоты (схема).

Дисульфидная связь при этом разрушается, белок переходит в водорастворимое состояние. При этом большая часть тиольных групп остатков цистеиновой кислоты в белке будет окислена, что означает фактическую потерю цистеина в конечном продукте.

В случае восстановления дисульфидной связи можно предположить образование тиолов, производной которых белковая аминокислота цистеин и является.

$$R—S—S—R \xrightarrow{[H]} R—SH + HS—R$$



Как показал эксперимент, предлагаемые методы оказались достаточно эффективными. Переход кератина в раствор в разной степени происходит во всех модельных системах. После 96-часовой экспозиции обработки пера наблюдалось полное его растворение, несмотря на значительно меньшую концентрацию (0,5% раствор по сравнению с 10% раствором в предыдущем опыте) щелочи в рабочем растворе. Можно предположить, что в этом случае растворение белка связано не с щелочным гидролизом, а с окислительно-восстановительным процессом преобразования дисульфидной связи. Полученная система представляла собой прозрачный практически бесцветный раствор. Следует отметить, что проведение реакции в жестких условиях (при температуре 80–90 °C) приводило к образованию сильно окрашенных растворов, что является следствием побочных деструктивных и окислительных реакций [9].

Концентрация белка во всех случаях возрастала на протяжении 48 часов. Затем наблюдалась определенная стабилизация системы. В течение 2–3 суток концентрация белка оставалась практически постоянной. После этого в эксперименте отмечалось резкое снижение содержания белка в растворе, что может быть связано с самопроизвольным разрушением белковой молекулы (рис. 1).

Обращает на себя внимание, что концентрация белка в растворе при использовании сульфида натрия возрастает быстрее и достигает большего значения (до 57 г/л), чем в случае с сульфитом натрия и перекисью водорода. С химической точки зрения это выглядит вполне обоснованно, учитывая, что сульфид – типичный восстановитель в окислительно-восстановительных реакциях, а сульфит и перекись водорода – реагенты с двоякими свойствами (окислителя и восстановителя).

Можно предположить, что в случае с сульфидом процесс ограничивается реакцией восстановления с образованием производных тиолов, а в случае с сульфитом и перекисью водорода процесс осложняется конкурирующей реакцией окисления с образованием конечных продуктов более сложного состава.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что для получения водорастворимой формы кератина из пера наиболее целесообразным является способ обработки кератинсодержащего сырья раствором, содержащим типичный восстановитель в щелочной среде.

Аналогичный результат был получен в случае эксперимента по переводу в растворимое состояние кератина шерсти. В опыте с раствором сульфида натрия в щелочной среде наблюдалось увеличение концентрации белка до 43 г/л в течение 48 часов (рис. 2).

Выводы

В присутствии в растворе химических реагентов с окислительно-восстановительными свойствами осуществлен процесс перехода кератина пера и шерсти в водорастворимое состояние. В результате такой обработки дисульфидные связи в молекуле белка разрываются с образованием продуктов окисления и восстановления серы, что влечет за собой изменение структуры белка и увеличение его растворимости. Наиболее эффективным вариантом в плане скорости процесса и выхода конечного продукта оказался способ воздействия раствором, содержащим типичный восстановитель (сульфид натрия) в щелочной среде.

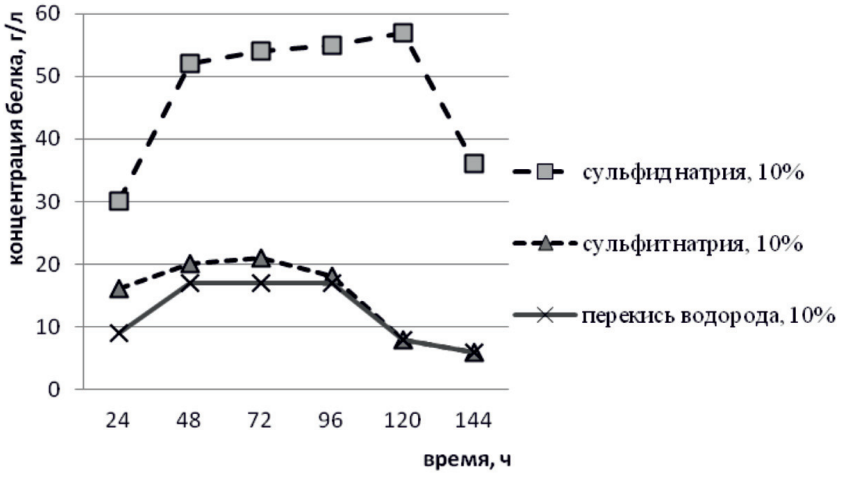


Рис. 1. Изменение концентрации белка в гидролизатах пера в модельных системах

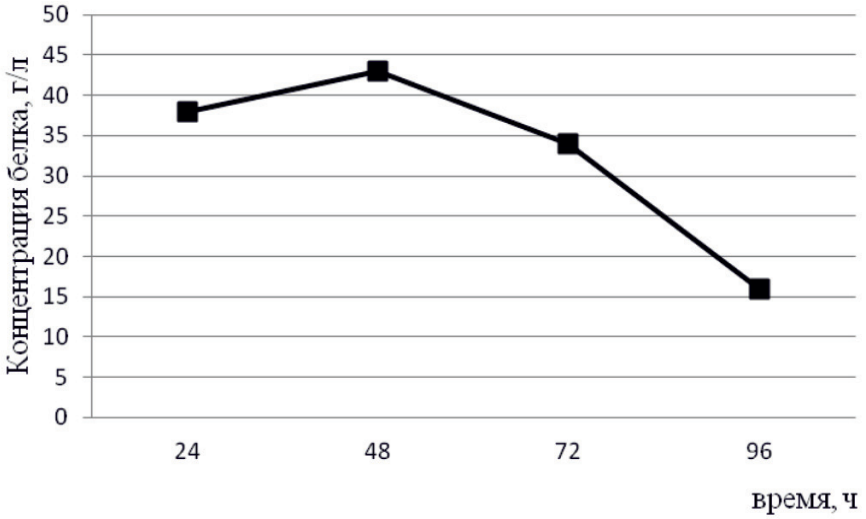


Рис. 2. Изменение концентрации белка в гидролизате шерсти в модельной системе NaOH (0,5%) : Na_2S (10%)

Проведенные исследования показали, что получение растворимой модификации кератина из соответствующего белоксодержащего сырья (перо, шерсть) можно эффективно проводить в мягких условиях, не прибегая к высоким температурным режимам и агрессивным реагентам.

Данная технология позволяет в мягких условиях, без деструкции белка и побочных процессов получить его водорастворимую форму, которая может быть использована в различных отраслях практической деятельности. Кроме того, утилизация подобных отходов имеет большое экологическое значение, предотвращая попадание токсичных веществ в окружающую среду, и способствует переходу к высокопродуктивному и экологически чистому сельскому хозяйству.

Список литературы

1. Ларионов М.В. Биогеоценотический уровень экотоксикологических эффектов в сообществах живых организмов Саратовской области / М.В. Ларионов, Н.В. Ларионов // Вестник ВолГУ. Серия 3: Экономика. Экология. – 2009. – № 1. – С. 238–243.

2. Ларионов М.В. Общая экология: практикум / М.В. Ларионов, Н.В. Ларионов. – Саратов: Саратовский источник, 2014. – 164 с.

3. Актуальные задачи биологии и экологии в региональном контексте: монография / под ред. М.В. Ларионова. – Новосибирск: АНС СибАК, 2016. – 124 с.

4. Эффективное использование вторичного сырья, получаемого при переработке птицы / В.Г. Волик [и др.] // Птица и птицепродукты. – 2011. – № 3. – С. 16–19.

5. Сапожникова А.И. Разработка и оценка качества продукции на основе фибриллярных белков из отходов сырья животного происхождения: дис…. докт. техн. наук. – Москва, 1999. – 312 с.

6. Переработка вторичного кератинсодержащего сырья и получение белковых гидролизатов на пищевые и кормовые цели / О.О. Бабич [и др.] // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 2. – С. 7–11.

7. Полетаев А.Ю. Особенности переработки белкового сырья в полноценные корма для сельскохозяйственных животных / А.Ю. Полетаев, М.Г. Курбанова // Техника и технология пищевых производств. – 2010. – № 3. – С. 29–34.

8. Белова А.В. Разработка технологии двухстадийного гидролиза отходов птицеперерабатывающих производств: дис…. канд. техн. наук. – Санкт-Петербург, 2004. – 160 с.

9. Бортников С.В. Получение кератинсодержащих белковых дисперсий из перо-пуховых отходов / С.В. Бортников, Г.А. Горенкова, О.В. Комарова // Вестник Хакасского государственного университета им. Н.Ф. Катанова. – 2015. – № 14. – С. 11–14.

References

1. Larionov M.V., Larionov N.V. Biogeotsenoticheskii uroven ekotoksikologicheskikh effektov v soobshchestvakh zhivykh organizmov Saratovskoi oblasti [Biogeocenotic level of ecotoxicological effects in communities of living organisms in the Saratov region]. Vestnik VolGU. Seriia 3: Ekonomika. Ekologiia – Bulletin of Volgograd State University. Series 3: The Economy. Ecology, 2009, no. 1, pp. 238–243.

2. Larionov M.V., Larionov N.V. Obshchaia ekologiia: praktikum [General ecology: workshop]. Saratov, Saratovskii istochnik, 2014. 164 p.

3. Larionov M.V., Domashenko Iu.E., Kulik M.I., Mazina S.E., Sukisian A.R. Aktualnye zadachi biologii i ekologii v regionalnom kontekste: monografiia [Actual problems of biology and ecology in the regional context: monograph]. Novosibirsk, ANS SibAK, 2016. 124 p.

4. Volik V.G, Ismailova D.Iu., Erokhina O.N., Zinovev S.V., Kozak S.S., Mukhin Iu.E., Koroleva O.V. Effektivnoe ispolzovanie vtorichnogo syria, poluchaemogo pri pererabotke ptitsy [Effective use of secondary raw materials obtained from poultry processing]. Ptitsa i ptitseprodukty – Poultry and poultry products, 2011, no. 3, pp. 16–19.

5. Sapozhnikova A.I. Razrabotka i otsenka kachestva produktsii na osnove fibrilliarnykh belkov iz otkhodov syria zhivotnogo proiskhozhdeniia: dis…. dokt. tekhn. nauk [Development and evaluation of product quality on the basis of fibrillary proteins from waste materials of animal origin]. Moscow, Moskovskaia gosudarstvennaia akademiia veterinarnoi meditsiny i biotekhnologii im. K.I. Skriabina, 1999. 312 p.

6. Babich O.O., Razumnikova I.S., Poletaev A.Iu., Morozova A.I. Pererabotka vtorichnogo keratinsoderzhashchego syria i poluchenie belkovykh gidrolizatov na pishchevye i kormovye tseli [Processing of secondary keratin-containing raw materials and production of protein hydrolysates for food and feed purposes]. Tekhnika i tekhnologiia pishchevykh proizvodstv – Technique and technology of food production, 2011, no. 2, pp. 7–11.

7. Poletaev A.Iu., Kurbanova M.G. Osobennosti pererabotki belkovogo syria v polnotsennye korma dlia selskokhoziaistvennykh zhivotnykh [Features of processing of protein raw materials in high-grade fodder for farm animals]. Tekhnika i tekhnologiia pishchevykh proizvodstv – Tekhnika i tekhnologiia pishchevykh proizvodstv, 2010, no. 3, pp. 29–34.

8. Belova A.V. Razrabotka tekhnologii dvukhstadiinogo gidroliza otkhodov ptitsepererabatyvaiushchikh proizvodstv: dis…. kand. tekhn. nauk [Development of technology for two-stage hydrolysis of poultry processing waste]. St. Petersburg, Sankt-Peterburgskii gosudarstvennyi universitet nizkotemperaturnykh i pishchevykh tekhnologii, 2004. 160 p.

9. Bortnikov S.V., Gorenkova G.A., Komarova O.V. Poluchenie keratinsoderzhashchikh belkovykh dispersii iz peropukhovykh otkhodov [Keratin Protein Dispersion Obtaining from Waste Feather and Down]. Vestnik Khakasskogo gosudarstvennogo universiteta im. N.F. Katanova – Herald of Katanov Khakass State University, 2015, no. 14, pp. 11–14.