
РАЗДЕЛ 5

БИОХИМИЯ

УДК 619:615.012.8:543.645.6

УДАЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

Буханов В.Д.

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

Зуев Н.П.

Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

Тучков Н.С.

Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина

В статье рассмотрен способ удаления белков и аминного азота из водных растворов. Способ включает адсорбцию белков на гидроалюмосиликатном природном сорбенте, содержащем такие минералы, как глины, цеолит, полевые шпаты, слюды, кальцит, и фильтрование. Адсорбцию проводят при pH 1-3 1-10 минут.

Ключевые слова: адсорбция белков, гидроалюмосиликатный сорбент, аминный азот, «Экос».

REMOVAL OF PROTEIN COMPOUNDS FROM AQUEOUS SOLUTIONS

Bukhanov V.D.

Belgorod State National Research University

Zuev N.P.

Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I

Tuchkov N.S.

Belgorod State Agrarian University named after V.Ya. Gorin

The article describes a method for removing proteins and amine nitrogen from aqueous solutions. The method involves the adsorption of proteins on a hydroaluminosilicate natural sorbent containing minerals such as clays, zeolite, feldspar, mica, calcite, and filtration. Adsorption is carried out at pH 1-3 for 1-10 minutes.

Key words: protein adsorption, hydroaluminosilicate sorbent, amine nitrogen, "Ecos".

Известны способы удаления белков из водных растворов, основанные на осаждении белков нагреванием или обработкой кислотами [5]. Недостатки удаления белков обработкой кислотами заключаются в загрязнении безбелкового фильтрата агрессивными в химическом отношении веществами. Кипячение непригодно для депротеинизации разбавленных растворов.

По технической сущности и достигаемому положительному эффекту наиболее близкими к предлагаемому являются следующие два способа удаления белков из водных растворов.

Первый включает адсорбцию белков на сорбенте, в качестве которого используют гидроокись цинка, и отделение депротеинизированного раствора фильтрацией [6]. Этот способ сложен и длителен, так как перед удалением белков необходимо получать сорбент путем смешивания сернокислого цинка со щелочью и последующего кипячения и фильтрования. Сама депротеинизация также включает стадию термообработки. Депротеинизированные растворы загрязняются ионами цинка.

Второй способ, выбранный за прототип, предполагает использование в качестве сорбента гидрофильного аэросила А-3 00 и А-175 с удельной поверхностью 300 и 175 м²/г [1]. Аэросил депротенизирует водные растворы практически мгновенно. Этот способ эффективно используется для удаления белков из растворов, содержащих полисахариды, хлорофос, гепарин и органические кислоты при рН от 1 до 5,6. Он включает адсорбцию белков на сорбенте и отделение депротенизированного раствора фильтрованием.

Однако гидрофильный аэросил производится за рубежом, что вызывает определенные трудности при его приобретении [3].

Объекты и методы исследования

Согласно способу удаления белковых соединений из водных растворов, включающему адсорбцию белков на сорбенте и отделение депротенизированного раствора фильтрованием, в качестве сорбента используют гидроалюмосиликатный препарат «Экос», а адсорбцию проводят не менее одной минуты при рН 1-3.

Гидроалюмосиликатный препарат ЛПКД «Экос» - препарат отечественного производства из минерального сырья месторождений Белгородской области. Он предназначен для профилактики расстройств пищеварения и нормализации функции кишечника животных за счет способности связывать и выводить из организма тяжелые металлы и радиоактивные изотопы, нитраты, нитриты и остатки пестицидов, а также токсины патогенных микроорганизмов, и представляет собой порошок светло-серого цвета с желтоватым, зеленоватым или бурым оттенками, без специфического запаха. Величина частиц в основной массе колеблется в пределах от 0,03 до 1000 мкм. Удельная поверхность препарата составляет 1,2-1,9 м²/г. Сорбент содержит следующие элементы в пересчете на оксиды (в мас.%):

мас.%		10 ⁻³ мас.%	
SiO ₂	50.0-51.2	Ti	80
Al ₂ O ₃	13.8-15.7	V	6
CaO	12.6-13.3	Mn	5
Fe ₂ O ₃	4.27-4.47	Cr	4
MgO	1.66-1.96	Zn	3
TiO ₂	0.92-0.92	Ni	1
K ₂ O	0.84-0.84	Co	0.6
Na ₂ O	0.22-0.22	Cu	0.6
CO ₂	8,58-9,14	Pb	0.3
H ₂ O	4,76-4,82	Mo	0.1
		w	Н/о
		Ag	Н/о
		Cd	Н/о

Общая удельная радиоактивность на уровне 115,4±8,16 Бк/кг, что не превышает значений ПДК. В состав препарата входят монтмориллонит, каолинит, клиноптилолит, кальцит, опал, полевые шпаты, мусковит и глауконит. [2].

Гидроалюмосиликатный препарат «Экос» не имеет в своем составе химических веществ, негативно влияющих на организм животных и качество получаемой от них продукции. Добавка нетоксична для животных, не обладает кумулятивными свойствами. Эмбриотоксичность, тератогенность и раздражающее действие экспериментально не установлены [4].

Технический результат - использование предлагаемого гидроалюмосиликатного препарата «Экос» в качестве сорбента белковых соединений позволяет депротеинизировать растворы без подготовки сорбента в течение 1 минуты. Дополнительный технический результат - при этом одновременно из раствора происходит частичное удаление аминного азота.

Предлагаемый способ заключается в том, что для депротеинизации водных растворов, включающей адсорбцию белков на сорбенте и отделение депротеинизированного раствора фильтрованием, в качестве сорбента используют гидроалюмосиликатный препарат «Экос», а адсорбцию проводят не менее 1-10 минут при рН 1-3.

Новизну и изобретательский уровень предложенного способа подтверждает выявленная впервые способность препарата для профилактики расстройств пищеварения и нормализации функции кишечника животных адсорбировать из водных растворов белки и аминный азот. Депротеинизацию следует проводить при рН среды 1-3, так как дальнейшее увеличение рН приводит к снижению результативности сорбции белков гидроалюмосиликатным препаратом «Экос». Водные растворы депротеинизируются гидроалюмосиликатным препаратом «Экос» мгновенно. Не установлено разницы в депротеинизирующем действии гидроалюмосиликатного препарата «Экос» при контакте с раствором белка в течение 1-10 мин. Для удаления из водного раствора 0,76 мг белка требуется вносить 70 мг гидроалюмосиликатного препарата «Экос».

Результаты и их обсуждение

Преимущество способа заключается в его простоте при качественно быстром процессе депротеинизации.

Способ иллюстрируется следующими опытами.

Опыт 1. В пробирку наливают 9,9 мл изотонического раствора натрия хлорида (рН 5) и 0,1 мл сыворотки крови крупного рогатого скота; вносят 700 мг гидроалюмосиликатного препарата «Экос». Содержимое пробирки перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр "синяя лента" (для мелких и самых мелких осадков), промытый предварительно двумя порциями изотонического раствора натрия хлорида (рН 5). Отсутствие белка в фильтрате устанавливают пробой с сульфосалициловой кислотой (ССК). Для этого к 2 мл фильтрата добавляют 4 капли раствора ССК.

Прозрачность смеси свидетельствует об отсутствии белка в фильтрате. Весь белок из 0,1 мл сыворотки (7,6 мг) связывается 700 мг препарата «Экос». В табл. 1 приведены данные исследований по депротеинизации водных растворов, содержащих разные количества сыворотки, путем внесения различных количеств гидроалюмосиликатного препарата «Экос». В описанных условиях опыта 700 мг препарата способны связать весь белок, содержащийся в 0,1 мл сыворотки, т.е. 7,6 мг, что составляет 1,09% от массы навески препарата, внесенной в раствор.

Таблица 1

Установление минимальной депротеинизирующей дозы гидроалюмосиликатного препарата «Экос»

Изотонический раствор, мл	9,5	9,7	9,8	9,9	10,0	
Сыворотка крови, мл	0,5	0,3	0,2	0,1	-	
Концентрация белка, мг/мл	3,80	2,28	1,52	0,76	0,0	
Проба с ССК*						
Доза «Экоса», мг/мл раствора сыворотки	20	++	++	++	+	-
	30	++	++	++	+	-
	40	++	++	++	+	-
	50	++	++	++	±	-
	60	++	++	+	±	-
	70	++	++	±	-	-
*ССК - сульфосалициловая кислота						
«-» - отрицательная реакция						
«±» - опалесценция						
«+» - помутнение						
«++» - появление хлопьев в фильтрате						

В табл. 2 приведены данные об объективности связывания белка в 1%-ном водном растворе сыворотки крови при различных значениях рН. Снижение водородного показателя от 5 до 3 и 1 обуславливало уменьшение количества сорбента, необходимого для полной депротеинизации раствора. При рН 3 тест с ССК был отрицательным даже при внесении 300-400 мг гидроалюмосиликатного препарата «Экос» в 10 мл раствора сыворотки крови (7,6 мг белка). При рН 1 достаточными количествами препарата являются 200-300 мг препарата на 10 мл белоксодержащего раствора.

Таблица 2

Влияние реакции среды на сорбционную активность гидроалюмосиликатного препарата «Экос» в 1%-ном растворе сыворотки крови

Водородный показатель	рН 1	рН 3	рН 5	рН 7	рН 9	
Проба с ССК*						
Доза «Экоса», мг/мл раствора сыворотки (концентрация белка 0,76 мг/мл)	20	-	±	+	++	++
	30	-	-	+	+	++
	40	-	-	+	+	++
	50	-	-	±	+	++
	60	-	-	±	+	++
	70	-	-	-	±	++

Увеличение водородного показателя до 7 (нейтральная среда) заметно повышало минимально необходимую дозу гидроалюмосиликатного препарата «Экос», вызывающую депротеинизацию: лишь 700 мг его, внесенные в 10 мл раствора сыворотки, вызывали частичное связывание белков. Щелочная реакция среды раствора (рН 9) не способствует проявлению обсуждаемых сорбционных свойств гидроалюмосиликатного препарата «Экос» в отношении белков сыворотки крови.

Опыт 2. Для подтверждения способности гидроалюмосиликатного препарата «Экос» освобождать водные растворы не только от белковых молекул испытана его активность в отношении аминокислот и их остатков, появляющихся в растворе при гидролизе белков. В качестве объекта выступила жидкая питательная среда для культивирования микроорганизмов - бульон из панкреатического гидролизата кильки (120 мг% аминного азота). О количестве находящихся в нем аминокислот (и их остатков) судили по результатам реакции формольного титрования по Серенсену [7].

К 10 мл исследуемого бульона добавляли 5 мл свежеприготовленной формольной смеси (50 ч. формалина и 1 ч. фенолфталеина, доведенные 0,2 н. раствором щелочи до слабо-розового окрашивания). Титровали (в трех повторностях) 0,2 н. раствором щелочи (натрия гидроксида) до ярко-красного цвета, после чего добавляли по каплям 0,2 н. раствор соляной кислоты до слабо-розовой окраски жидкости. Получив сходимые результаты титрования, вели расчет содержания аминного азота с учетом разницы между объемами щелочи и кислоты, пошедшими на титрование пробы, и исходя из того, что 1 мл израсходованной щелочи эквивалентен 2,8 г аминного азота.

Снижение количества аминного азота на 34,5% регистрировали в бульоне из панкреатического гидролизата кильки после обработки его гидроалюмосиликатным препаратом «Экос» в концентрации 100 мг/мл при pH 3 (табл.3).

Во всех вариантах опыта увеличение концентрации гидроалюмосиликатного препарата «Экос» и понижение водородного показателя (подкисление среды) приводило к уменьшению содержания аминного азота в питательной среде за счет его связывания «Экосом».

Таблица 3

Результаты титрования бульона из панкреатического гидролизата кильки

№ опыта	Условия опытов		Содержание аминного азота, мг %	% убыли аминного азота
1.	Чистый бульон (фоновый контроль)		119,70	0
		50 (pH 7)	103,90	13,2
2.	Бульон после обработки «Экосом» в дозах (мг/мл):		101,50	15,2
		50 (pH 5)	95,50	20,2
		100(pH 5)	96,25	19,6
		50 (pH 3)	83,33	30,4
		100(pH 3)	78,40	34,5

Выводы

Несмотря на то, что удельная поверхность гидроалюмосиликатного препарата «Экос» значительно меньше, чем у гидрофильного аэросила А-175 и А-300, он способен достаточно эффективно депротенизировать растворы даже без стадий подготовки сорбента и кипячения белоксодержащих растворов. Связывание белков гидроалюмосиликатным препаратом «Экос» в течение 1 мин и исключение ряда стадий позволяет значительно ускорять депротенизацию.

Кроме того, гидроалюмосиликатный препарат «Экос» частично связывает и аминный азот жидких питательных сред для культивирования микроорганизмов (с pH 3-7).

Нерастворимость и химическая индифферентность гидроалюмосиликатного препарата «Экос» позволяют получать депротеинизированные водные растворы и питательные среды, частично лишённые аминного азота, не содержащие химически агрессивных соединений.

Список литературы

1. Авторское свидетельство № 1122354 А1 СССР, МПК G01N 33/18. Способ удаления белков из водных растворов: № 3610672: заявл. 26.04.1983: опубл. 07.11.1984 / Н. Б. Луцок, П. К. Загниборода, М. Ф. Кулик [и др.]; заявитель ВИННИЦКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ.Н.И.ПИРОГОВА. – EDN FKORRW.
 2. Использование природного гидроалюмосиликата в животноводстве и ветеринарии. Метод. рекомендации / А.А.Шапошников, Н.А.Мусиенко, А.И.Везенцев и др. - Белгород, изд-во Белгородской ГСХА, 2003. - С.4-5.
 3. Клинико-экспериментальное обоснование применения сорбентов геологического происхождения в животноводстве и ветеринарии / М. П. Семененко, Н. П. Зуев, Л. А. Матюшевский [и др.]. – Белгород: Белгородский государственный аграрный университет им. В.Я. Горина, 2021. – 200 с. – ISBN 978-5-906643-47-6. – DOI 10.48612/5544-dvfn-ezm5. – EDN ODJXGL.
 4. Патент № 2372982 С1 Российская Федерация, МПК В01J 20/16, С07К 1/14. Способ удаления белковых соединений из водных растворов: № 2008136299/15: заявл. 08.09.2008: опубл. 20.11.2009 / В. Д. Буханов, А. И. Везенцев, А. А. Шапошников [и др.]; заявитель Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Белгородский государственный университет". – EDN XQWMTD.
 5. Практикум по биохимии: Учеб пособие/Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьёвой. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 1989. -509 с.: ил.
 6. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии/Под ред. Т.Т. Березова. - М.: Медицина, 1976. - С.139.
 7. Справочник ветеринарного лаборанта / Ф.З.Андросов, И.Я.Беляев, Р.Т.Ключко и др.; под ред. В.Я.Антонова. - М.: Колос, 1981. - С.22-23.
-

Буханов Владимир Дмитриевич, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры медико-биологических основ физической культуры, факультета физической культуры, Белгородский государственный национальный исследовательский университет

308015, Российская Федерация, Белгородская область, город Белгород, ул. Победы, д.85

Телефон: +7 (4722) 30-12-11

E-mail: Info@bsu.edu.ru

Зуев Николай Петрович, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии, Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I

394087, Российская Федерация, г. Воронеж, ул. Мичурина, д.1

Телефон: 89914057424,

E-mail: zuev_1960_nikolai@mail.ru

Тучков Никита Сергеевич, студент, Белгородский государственный аграрный университет имени В.Я. Горина

308503, Российская Федерация, Белгородская обл.,

Белгородский р-н, п. Майский, ул. Вавилова, 1

Телефон: 89202071546,

E-mail: nikitaytuchkov@gmail.com