

БИОПОЛИМЕРЫ, ГИДРОГЕЛИ

УДК 577.112.322.

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА *BOMBUX MORI* ИЗ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА ШЕЛКА

О.Б. Авазова, Р.Ю. Милушева, С.Ш. Рашидова

Научно-исследовательский центр химии и физики полимеров при НУУз,
г. Ташкент

Разработана методика выделения белков из куколок тутового шелкопряда *Bombux mori*. Определены физико-химические характеристики осаждённых образцов белка. Показано, что при осаждении куколочного белка *Bombux mori* при приближении рН к изоэлектрической точке выход белка достигает максимума и составляет 40–45%, содержание азота при этом увеличивается на 10–15%. Количественное содержание белка в образцах достигает 90–95%, что свидетельствует о выделении высококачественного белка.

Ключевые слова: *выделение белка, изоэлектрическая точка, выход, высокопротеиновые корма.*

В последнее время куколки шелкопряда (КТШ) рассматриваются как потенциальное сырьё для получения весьма ценных продуктов, а именно, хитина для наработки биоактивного хитозана, масел для применения в косметологии, белков для добавления в корма птиц и рыбы [1, с. 49]. Почти половина массы куколки представляют белки, которые содержат незаменимые аминокислоты для организма. Белки могут быть использованы в рыбоводстве и птицеводстве как активные ингредиенты эффективных высокопротеиновых кормов. Применяемые в настоящее время корма являются несовершенными (низкопротеиновые) и дорогими (импортные). Применение всего комплекса полезных компонентов в кормах будет способствовать повышению продуктивности животных, уменьшению заболеваемости и улучшению качества продукции [2, с. 34]. В этой связи перед наукой и практикой стоит задача как рационального применения и совершенствования всех кормовых средств, так и использования нетрадиционных, новых кормовых добавок, базирующихся и производимых из местного сырья и являющихся к тому же отходом производства шелка. Использование местных видов сырья позволит рационально использовать природные ресурсы и утилизировать отходы.

С этой точки зрения создание высокоэффективных белковых кормов, выделяемых из местного сырья, перспективно, но требует проведения детальных исследований, направленных на определение

оптимальных путей и разработки технологии получения белков из куколок. Безусловно, анализ их очень важен для определения оптимальных путей выделения белка из куколок. Считается, что эффективным подходом для выделения белка является проведение гидролиза щелочного раствора. Осаждаемый при этом гидролизат белка тутового шелкопряда содержит в своем составе жизненно важные аминокислоты [3, с. 231].

Процесс выделения белков из куколок *Bombyx mori* заметно отличается от процедуры, используемой для отделения белка из других видов источников сырья. Наиболее устойчивой является первичная структура белка тутового шелкопряда, остальные легко разрушаются при повышении температуры, резком повышении pH среды и других воздействиях. Используемый при этом щелочной раствор в определенной степени влияет на физико-химическое состояние и может сопровождаться изменением количественного содержания белков в зависимости от условий проведения процессов. В связи с этим особое внимание было уделено физико-химическим характеристикам и количественному содержанию белков при осаждении их из щелочных растворов [4, с. 3].

Учитывая важность данного вопроса, отработку условий по получению белка проводили поэтапно:

На первом этапе куколки тутового шелкопряда очищали от механических примесей и высушивали до постоянного веса. Затем жировосковую часть куколки удаляли в аппарате Сокслета экстракцией этанолом. При этом выявлено, что жировосковая часть составляет около 25–30 % от массы куколки.

На втором этапе очищенные от масла куколки подвергали щелочной обработке для выделения белков. Обычно для этой цели используют 7 % раствор щелочи (NaOH). Однако данный щелочной раствор способствует денатурации белков вследствие высокой концентрации NaOH. В целях снижения или исключения денатурации белков обработку проводили при заниженной концентрации, т.е. 1 % раствором NaOH.

Чтобы оценить эффективность данного щелочного раствора для выделения белков проводили сравнительные опыты с раствором 7 % NaOH при 90 °С в течение 3 часов. Модуль «куколки / щелочной раствор» = 1/10.

Белок отделяли от хитина путем фильтрации через сито (с отверстием 1 мм). Выявлено, что выделенная масса хитина, включая минеральные примеси, составляет около 20 % от общей массы отходов. Выявлено, что после фильтрации в очищенном растворе содержится белок КТШ в количестве ~ 50 %.

Использование более высокой концентрации гидроксида натрия, т.е. 7 % NaOH, приводит к денатурации белка, образованию темноокрашенных продуктов окисления фенольных соединений белка и

значительному изменению качественных характеристик. Определено, что щелочная экстракция разбавленными 1% растворами гидроксида натрия при рН более 9.5 позволяет получать более высокий выход белка – до 65%.

На третьем этапе проводили осаждение куколочного белка из щелочного раствора. Известно, что степень осаждения зависит от начальной концентрации белковых веществ, поэтому для эффективного осаждения и определения изоэлектрической точки полученных щелочных растворов белка, осаждение проводили разбавленными растворами уксусной и азотной кислоты.

Для эффективного осаждения куколочного белка из раствора очень важен выбор необходимого значения рН. Применение азотной и уксусной кислоты обеспечивало достижение необходимого значения рН. Влияние рН осадителя (азотной и уксусной кислоты) на этапе осаждения белка из раствора экстрагента оценивали по массе осадка, отнесённой к максимально возможной (степени осаждения).

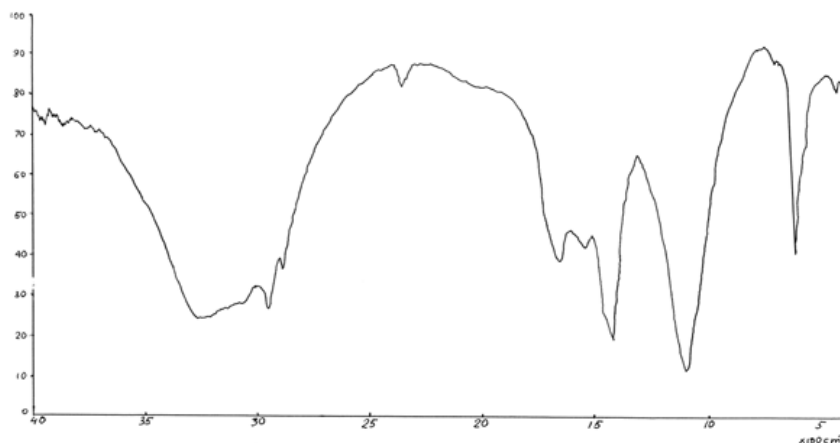
Для эффективного осаждения белка, полученного в щелочных условиях, была исследована динамика степени осаждения при различных концентрациях азотной и уксусной кислоты в интервале рН 1 – 6. Следует отметить, что максимальная степень осаждения достигается уже через 15–20 мин. Модуль осаждения «гидролизат:кислота» составлял 1:10. Низкомолекулярные соединения удаляли путем диализа. Повышение рН приводит к повышению степени осаждения белка, которая к значению рН 4.4–5.0 (при приближении рН к изоэлектрической точке) достигает максимума и выход составляет 40–45%, содержание азота при этом увеличивается на 10–15 %. При изоэлектрической точке происходит максимальное осаждение белка (увеличение выхода на 30–60 %).

Количественное содержание белка в образцах, осаждаемых при изоэлектрической точке, осуществлено по методу Каар-Каля на спектрофотометре СФ-46. Определено, что количественное содержание белка, осажденного в уксусной кислоте, составляет 91–95 %, а белка, осажденного в азотной кислоте, – 83–86 %, что действительно подтверждает эффективность осаждения при изоэлектрической точке данного белка.

Сравнительные опыты показали, что осаждение куколочного белка *Bombyx mori* из 1% щелочного белкового гидролизата при использовании уксусной кислоты намного эффективнее, чем при использовании азотной кислоты. Количественное содержание белка при коагуляции в этом случае увеличивается на 10–15%. С учетом этого, для осаждения белка из гидролизата выбрана уксусная кислота.

Проведены спектроскопические исследования выделенных белков. Сняты ИК-спектры белка в области $3600-3200\text{ см}^{-1}$, где проявляются валентные колебания ОН и NH – групп, связанных водородной связью (рис.1).

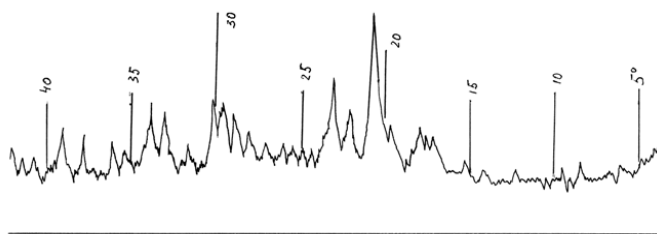
Так, на ИК-спектре белка полоса поглощения Амид-II ($C=O$) проявляется в обл. 1540 см^{-1} . Также на спектре наблюдается широкая интенсивная полоса OH и NH – групп в области $3600-3000\text{ см}^{-1}$, где NH – группы полипептида связаны водородными связями. Полоса поглощения CH , CH_2 -групп в обл. 2940 см^{-1} , δNH – групп в обл. 1660 см^{-1} .



Р и с . 1. ИК-спектр белка, выделенного из куколок тутового шелкопряда

Проведенное структурное исследование образцов белков методом ИК-спектроскопии подтверждает полипептидное строение макромолекул данного белка.

Проведены рентгеновские исследования выделенных белков. Получена рентгенограмма выделенного белка, которая имеет характерный вид для аморфных полимеров, без четко выраженных пиков (рис. 2).



Р и с . 2. Дифрактограмма выделенного белка из куколок тутового шелкопряда

Таким образом, отработаны условия эффективного осаждения белков из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori*, основанные на реакции осаждения при изоэлектрической точке, проведен комплекс физико-химических исследований, определено количественное содержание белков в образцах. Выявлено, что осаждение белков при изоэлектрической точке является весьма эффективным. Данные белки могут быть широко использованы в различных отраслях, в частности в сельском хозяйстве для производства высокопротеиновых кормов для птицеводства и рыбоводства.

Работа выполняется при финансовой поддержке инновационного гранта ИОТ-2015-7-20 "Освоение технологии производства белка и белковых комбикормов для рыбоводства"

Список литературы

1. Милушева Р.Ю., К.С. Ибрагимов, С.Ш. Рашидова // Узб. хим. журн. 2013, № 5, С. 48–51.
2. Курбанов А.Р., Милушева Р.Ю., Камилов Б.Г., Рашидова С.Ш. // AGRO ILM, 2015. 1(33)-SON, С. 34–35
3. Милушева Р.Ю., Ибрагимов К.С., Рашидова С.Ш. Биоактивные полимеры из отходов производства шелка. // XII Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Пермь, 25–30 июня 2014 г.). С. 230–232.
4. Заявка РСТ. ЕР 2005/014183 20051223. Хелинг А., Шульце М., Мотес З. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. Санкт-Петербург, 10.12.2009.

ISOLATION OF PROTEINS BOMBYX MORI FROM SILK WASTES PRODUCTION

O.B. Avazova, R.Yu. Milusheva, S.Sh. Rashidova

Polymer Chemistry and Physics Research Center at the National University of Uzbekistan, Tashkent

A method for isolation of proteins from the pupae of the silkworm *Bombyx mori* was developed. Physical - chemical characteristics of the precipitated protein samples were defined. It was shown that the precipitation of protein pupae *Bombyx mori* at the approaching of pH to the isoelectric point the protein reaches a maximum output and is 40-45%, the nitrogen content will be increased by 10-15%. Quantification of the protein content in the samples reaches 90- 95%, indicating the isolation of high-quality protein.

Keywords: *allocation of protein, isoelectric point, output, high protein feed*

Об авторах:

АВАЗОВА Ойнавад Баратовна – кандидат химических наук, младший научный сотрудник, Научно-исследовательский центр химии и физики полимеров при НУУз, г. Ташкент, e-mail: carbon@uzsci.net

МИЛУШЕВА Ракия Юнусовна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, Научно-исследовательский центр химии и физики полимеров при НУУз, г. Ташкент, e-mail: milur@rambler.ru

РАШИДОВА Сайера Шарафовна – доктор химических наук, директор, Научно-исследовательского центра химии и физики полимеров при НУУз, г. Ташкент, e-mail: carbon@uzsci.net