

УДК 665.6-404

## ФОРМАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ОПТИМИЗАЦИЯ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПРОЦЕССЕ БИОКОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКОГО СЫРЬЯ

М.Г. Сульман, В.П. Молчанов, Ю.Ю. Косивцов, К.М. Хуснутдинова

Тверской государственной технической университет  
*Кафедра стандартизации, сертификации и управления качеством*

Рассмотрены формально-кинетический анализ и оптимизация биокаталитического синтеза свободных аминокислот в процессе биоконверсии органического сырья.

**Ключевые слова:** *формально-кинетический анализ, оптимизация биокаталитического синтеза, синтез свободных аминокислот, биоконверсия.*

Биоконверсия является наиболее перспективным способом переработки органических отходов различной природы. Одним из технологических вариантов биоконверсии является твердофазная ферментация, которая происходит в регулируемых условиях биореактора. Твердофазная ферментация наряду с другими методами современной биотехнологии может быть использована для биоконверсии коммунальных отходов и отходов пищевой промышленности [1]. Примером практического использования твердофазной ферментации с целью биоконверсии пищевых отходов является их переработка в компост многоцелевого назначения [2].

Получение компоста многоцелевого назначения с помощью метода твердофазной ферментации представляет сложный динамический микробиальный процесс. Твердофазная ферментация обеспечивает жизнедеятельность различных систематических групп микроорганизмов: бактерий, грибов и актиномицетов [3]. Все они обладают выраженной способностью к целлюлозоразрушению, среди которых, благодаря наличию мощной мультиферментной системы, необходимой для гидролиза целлюлозы, выделяются грибы, на продуктах жизнедеятельности которых активно развиваются бактерии и актиномицеты [4].

С химической точки зрения процесс биоконверсии представляет собой совокупность большого количества биохимических реакций, протекающих внутри микробных клеток под действием определенных ферментных систем. В связи с этим построение кинетических моделей образования продуктов ферментации в исследуемой системе и

раскрытие механизмов конкретных химических реакций сопряжено с известными трудностями. Описание процесса накопления свободных аминокислот в смеси осложняется также тем, что речь идет об образовании целой группы продуктов, каждый из которых формируется в результате протекания некоторой последовательности химических превращений [5]. Тем не менее имеются все основания предполагать, что накопление аминокислот подчиняется обычным закономерностям химической кинетики, так как для неэлементарных реакций всегда может быть обнаружена лимитирующая стадия, определяющая скорость протекания исследуемого процесса [6].

Таким образом, процесс образования свободных аминокислот в ходе биоконверсии может быть описан при помощи аппарата формальной кинетики с нахождением числовых значений параметров уравнений математического описания [7]. Особый интерес представляет исследование закономерностей изменения указанных параметров под влиянием стимуляторов процесса биоферментации.

Для определения закономерностей накопления свободных аминокислот в опытах с добавлением в исходную смесь аскорбинатов различных металлов и в контрольном эксперименте без использования стимуляторов была решена обратная задача химической кинетики с нахождением значений кинетических параметров. При этом в качестве математического описания было использовано степенное уравнение, сходное с классическим уравнением формальной кинетики дробного порядка:

$$\frac{d[P]}{dt} = k \times [S]^n, \quad (1)$$

где [P] – концентрация свободных аминокислот в массовых процентах;

t – время от начала протекания процесса инкубации, ч;

k – константа скорости реакции образования свободных аминокислот, 1/ч;

[S] – концентрация субстрата в массовых процентах;

n – порядок реакции.

Логарифмирование уравнения (1) позволяет прийти к соотношению, с помощью которого легко могут быть определены значения кинетических параметров (константы скорости и порядка реакции):

$$\ln \frac{d[P]}{dt} = n \times \ln[S] + \ln k. \quad (2)$$

Проведенный анализ показал, что для всех экспериментальных данных достигается высокая степень линеаризации, которая

свидетельствует о справедливости выбранного соотношения. В табл. 1 представлены результаты определения кинетических параметров процесса образования свободных аминокислот при внесении в исходную смесь исследуемых солей аскорбиновой кислоты в концентрации 0.045 %.

Приведенные данные показывают, что определяемые кинетические параметры процесса обнаруживают высокую чувствительность к природе применяемого биостимулятора. Видна некоторая тенденция, в соответствии с которой порядок реакции снижается при добавлении высокоэффективных аскорбинатов и, напротив, увеличивается при внесении биостимуляторов, незначительно интенсифицирующих процесс накопления свободных аминокислот. Вероятнее всего, подобный феномен связан с процессом активизации различных ферментных систем микробных клеток под действием катионов металлов, входящих в состав применяемых солей аскорбиновой кислоты.

Таблица 1

Кинетические параметры процесса  
при добавлении оптимальных количеств биостимуляторов

Вносимый аскорбинат	Порядок реакции	Константа скорости, 1/час
Аскорбинат Со	0.9	0.013
Аскорбинат Na	1.8	0.009
Аскорбинат К	2.1	0.010
Аскорбинат Са	1.8	0.019
Аскорбинат Zn	0.9	0.040
Аскорбинат Fe	0.2	0.047
Без аскорбинатов	1.4	0.007

Влияние концентрации вносимого биостимулятора на определяемые кинетические параметры рассмотрено на примере результатов экспериментов с применением аскорбината железа, данные о значениях порядка реакции и константы скорости при использовании которого представлены в табл. 2.

Из данных таблицы видно, что константа скорости и порядок реакции достаточно сильно изменяются при повышении или понижении

концентрации биостимулятора от оптимального значения. При использовании оптимального количества аскорбината происходит значительное уменьшение значения порядка реакции, то есть в этом случае скорость образования аминокислот в соответствии с уравнением (1) слабее всего зависит от содержания субстрата в процессе биоконверсии.

Таблица 2

Кинетические параметры процесса  
при варьировании концентрации аскорбината железа

Концентрация аскорбината, %	Порядок реакции	Константа скорости, 1/час
0.025	1.8	0.015
0.030	0.9	0.034
0.045	0.2	0.047
0.055	1.0	0.030
0.070	1.3	0.020
0.090	2.1	0.012

Такой эффект может быть обусловлен различной степенью активизации внутриклеточных ферментов в условиях изменения содержания катионов железа. Механизм подобной активизации вероятнее всего неоднозначен. Можно предположить, например, что катионы этого металла входят в состав ферментных систем, участвующих в процессах образования свободных аминокислот, выступая в качестве коферментов.

Итак, решение обратной задачи химической кинетики позволило выявить закономерности изменения кинетических параметров процесса образования аминокислот в ходе биоконверсии в условиях его интенсификации с применением солей аскорбиновой кислоты различных металлов. Проведенные исследования показывают, что существует тенденция снижения порядка реакции при использовании более эффективных биостимуляторов в концентрациях, оптимальных для максимального накопления свободных аминокислот в смеси.

Вместе с тем обнаружено, что внесение аскорбинатов, которые менее значительно интенсифицируют процесс, приводит к повышению порядка реакции по сравнению со значением, достигаемым без использования стимуляторов. Аналогичный эффект наблюдается и при использовании аскорбинатов цинка и железа в концентрациях,

отличающихся от оптимальных. Однако следует отметить, что в указанных условиях выход свободных аминокислот существенно выше, чем в случае без применения аскорбинатов. Вероятнее всего, это связано с отсутствием периода индукции на кинетических кривых роста микробных популяций, которое всегда наблюдается при использовании биостимуляторов.

Анализ полученных в ходе кинетического моделирования результатов позволяет сделать важный вывод о сложности и множественности механизмов образования свободных аминокислот в ходе исследуемого процесса биоферментации.

В целях определения механизма интенсификации процесса образования аминокислот в ходе биоконверсии при использовании солей аскорбиновой кислоты была решена обратная задача химической кинетики при варьировании температуры инкубации с нахождением кажущейся энергии активации. Связь последней с температурой проведения химических реакций дается уравнением Аррениуса:

$$k = A \times e^{-E_k / RT}, \quad (3)$$

где  $k$  – константа скорости реакции образования свободных аминокислот, 1/час;

$A$  – предэкспоненциальный множитель уравнения Аррениуса, 1/час;

$E_k$  – кажущаяся энергия активации, Дж/моль;

$R$  – универсальная газовая постоянная, Дж/К\*моль;

$T$  – температура процесса, К.

Определение параметров уравнения Аррениуса (энергии активации и предэкспоненциального множителя) производится путем предварительного логарифмирования соотношения (3):

$$\ln k = \left( - \frac{E_k}{R} \right) \times \left( \frac{1}{T} \right) + \ln A. \quad (4)$$

При помощи соотношения (4) была определена кажущаяся энергия активации для экспериментов без добавления аскорбинатов, а также для случая с использованием оптимальных количеств наиболее эффективных биостимуляторов – аскорбинатов железа и цинка. Предварительно были найдены кинетические параметры уравнения (1) для различных температур инкубации. При этом использовались данные только тех экспериментов, в которых температура процесса не превышала 37 °С, так как очевидно, что при более высоких температурах система не подчиняется уравнению Аррениуса из-за инактивации внутриклеточных ферментов. Результаты определения

порядка реакции и константы скорости при варьировании температуры инкубации приведены в табл. 3–5.

По экспериментальным данным, с применением метода наименьших квадратов были определены значения кажущейся энергии активации процесса образования аминокислот. Результаты расчета для трех указанных выше случаев представлены в табл. 6.

Таблица 3

Кинетические параметры процесса  
при варьировании температуры в опытах без биостимуляторов

Температура, °С	Порядок реакции	Константа скорости, 1/час
25	1.4	0.004
30		0.005
37		0.007

Таблица 4

Кинетические параметры процесса  
при варьировании температуры в опытах с аскорбинатом цинка

Температура, °С	Порядок реакции	Константа скорости, 1/час
25	0.9	0.027
30		0.038
37		0.040

Таблица 5

Кинетические параметры процесса  
при варьировании температуры в опытах с аскорбинатом железа

Температура, °С	Порядок реакции	Константа скорости, 1/час
25	0.2	0.033
30		0.042
37		0.047

Параметры уравнения Аррениуса  
при добавлении оптимальных количеств биостимуляторов

Вносимый аскорбинат	Предэкспоненциальный множитель, 1/час	Кажущаяся энергия активации, кДж/моль
аскорбинат Zn	273	22.7
аскорбинат Fe	232	21.8
без аскорбинатов	887	30.3

Данные табл. 6 показывают, что при использовании эффективных биостимуляторов происходит существенное снижение кажущейся энергии активации процесса накопления свободных аминокислот. Вероятнее всего, это свидетельствует о том, что катионы металлов, входящих в состав применяемых солей аскорбиновой кислоты, интенсифицируют образование аминокислот посредством активации внутриклеточных ферментных систем микроорганизмов, осуществляющих процесс биоконверсии. Вместе с тем наличие оптимумов концентрации вносимых биостимуляторов, а также феномен изменения порядка реакции при варьировании содержания аскорбинатов свидетельствует о том, что их роль в микробном метаболизме, по всей видимости, неоднозначна и не ограничивается прямой интенсификацией некоторых ферментативных процессов.

Проведенные исследования по изучению влияния солей аскорбиновой кислоты различных металлов на накопление свободных аминокислот в ходе биоконверсии органического сырья, а также определение кинетических параметров по их результатам позволили осуществить серию лабораторных испытаний процесса биоконверсии с получением продуктов, обогащенных биологически активными веществами, и подготовить рекомендации по возможности дальнейшего практического использования таких продуктов.

#### Список литературы

- 1 Осадочная А.И., Подгорский В.С., Семенов В.Ф. Биотехнологическое использование отходов растениеводства. Киев: Наукова думка, 1990. 183 с.
- 2 Наумова Г.В. Торф в биотехнологии. Минск: Наука и техника, 1987. 151с.

- 3 Мудрецова-Висс К.А. Микробиология. М.: Экономика, 1985. 256 с.
- 4 Сидоренко О.Д. // Агрехимический вестник. Химия в сельском хозяйстве. 1997. №6. С.3–4.
- 5 Технология приготовления КМН. // Тверь: ВНИИМЗ, 1994. 14с.
- 6 Комбикорма, кормовые добавки и ЗЦМ для животных: Справочник / под ред. В.А. Крохиной. М.: Агропромиздат, 1990. 304 с.
- 7 Микробиологический синтез аминокислот: сб. АН ЛатвССР, ин-т микробиологии им. А.Кирхенштейна. / Под ред. П.А. Кукайн, Ю.О.Якобсон, А.Э.Дук. Рига: Зинатне, 1972. 130 с.

### FORMAL KINETIC ANALYSIS AND OPTIMIZATION BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF FREE AMINO ACIDS IN THE COURSE OF BIOCONVERSION OF ORGANIC RAW MATERIALS

**M.G. Sulman, V.P. Molchanov, Yu.Yu. Kosivtsov, K.M. Husnutdinova**

Tver State Technical University  
*Department of Biotechnology and Chemistry*

In this article the formal and kinetic analysis and optimization of biokatalitichsky synthesis of free amino acids in the course of bioconversion of organic raw materials are considered.

**Keywords:** *formal and kinetic analysis, optimization of biocatalytic synthesis, synthesis of free amino acids, biokonvensiya.*

*Об авторах:*

СУЛЬМАН Михаил Геннадиевич – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой стандартизации сертификации и управления качеством, Тверской государственный технический университет, [science@science.tver.ru](mailto:science@science.tver.ru)

МОЛЧАНОВ Владимир Петрович – кандидат химических наук, доцент кафедры стандартизации сертификации и управления качеством, Тверской государственный технический университет, e-mail: [science@science.tver.ru](mailto:science@science.tver.ru)

КОСИВЦОВ Юрий Юрьевич – доктор химических наук, профессор кафедры стандартизации сертификации и управления качеством Тверского государственного технического университета, e-mail: [kosivtsov@science.tver.ru](mailto:kosivtsov@science.tver.ru)

ХУСНУТДИНОВА Кристина Маратовна – студентка химико-технологического факультета Тверского государственного технического университета, e-mail: [huskris95@gmail.com](mailto:huskris95@gmail.com)