

POZYSKIWANIE LIZYNY Z ODPADÓW BIAŁKOWYCH

Jan Kryściak

Wydział Farmaceutyczny  
Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach

Działalności produkcyjnej we współczesnej cywilizacji towarzyszy wytwarzanie najrozmaitszych produktów odpadkowych. Nierząd-ko są to odpady bardzo uciążliwe dla środowiska, co pociąga za sobą konieczność możliwie skutecznego ich unieszkodliwienia. Nie-wątpliwie najlepszym unieszkodliwieniem najbardziej nawet uciąż-liwych odpadów byłaby pełna ich utylizacja jako ewenturalnego su-rowca do wytwarzania innych, przydatnych w gospodarce produktów.

Do najbardziej uciążliwych dla środowiska należą odpady o na-turze białkowej, najczęściej usuwane w formie mniej lub bardziej rozcieńczonych ścieków. Można tu wymienić masowo odprowadzane do rzek ścieki komunalne, ścieki z ferm przemysłowego chowu zwierząt, z zakładów mleczarskich itp. Utylizacja takich ścieków pod kątem wykorzystania zawartego w nich białka nie może być brana pod uwa-gę. Na przeszkodzie stoją takie czynniki jak: niejednokrotnie da-leko posunięty rozkład zawartego w nich białka, obecność różnych składników niebiałkowych, duże rozcieńczenie. Z drugiej jednak strony istnieje, przynajmniej teoretyczna, możliwość wykorzysta-nia różnych ścieków białkowych do otrzymywania z nich przynaj-mniej niektórych aminokwasów zawartych w białku takiego czy inne-go ścieku. Przy wykorzystywaniu ścieków do pozyskiwania aminokwa-sów nie stanowiłyby istotnej przeszkody ani daleko nawet posu-nięty rozkład białka, ani obecność niepożądanych składników nie-białkowych. Przez dobór odpowiednich warunków można tak pokiero-wać procesem wydzielania, że uzyskane aminokwasy nie będą zawie-rać ani produktów rozkładu białka ani żadnego ze składników nie-białkowych obecnych w ścieku. Aminokwas wydzielony z nadgniętego

surowca, jeśli będzie dostatecznie czysty, będzie tak samo przydatny, jak i aminokwas wydzielony z surowca czystego i świeżego. Białka zbudowane są najczęściej z reszt osiemnastu aminokwasów, a spośród nich dwa: lizyna i metionina produkowane są obecnie masowo dla potrzeb przemysłu paszowego. Najczęściej stosowane przy tym technologie opierają się na procesach mikrobiologicznych. Nie wykorzystuje się procesów ich wydzielenia z surowców białkowych. Procesy mikrobiologiczne pozwalają bowiem uzyskać produkt końcowy mniejszym nakładem kosztów. Można stąd wnioskować, że ewentualna utylizacja ścieków białkowych jako surowca do produkcji aminokwasów z góry jest skazana na niepowodzenie ze względu właśnie na koszt produkcji. Można jednak na problem kosztów spojrzeć z nieco innego punktu widzenia. Unieszkodliwienie ścieków białkowych wymaga odpowiednio dużych nakładów finansowych. Nakładów wymaga także budowa zakładu produkującego aminokwasy. Zakład taki z kolei jest nowym źródłem ścieków, które także należy unieszkodliwiać. Unieszkodliwianie ścieków białkowych przez ich wykorzystanie do produkcji poszukiwanych w przemyśle paszowym aminokwasów zmieniłoby stosunki nakładów finansowych, być może nawet na tyle, że mogłyby to być w sumie procesy ekonomicznie opłacalne.

Ze wspomnianych powyżej dwóch aminokwasów produkowanych masowo tzn. metioniny i lizyny ewentualne pozyskiwanie metioniny z tego rodzaju surowców praktycznie nie wchodzi w rachubę. Składa się na to kilka przyczyn. Zawartość metioniny jest w białkach niewielka, a przy tym jest to jeden z najmniej trwałych aminokwasów. Łatwo ulega rozkładowi zarówno w łańcuchu polipeptydowym, jak i w trakcie hydrolizy i dalszego wydzielenia. Znacznie korzystniejsza jest sytuacja w przypadku lizyny. Stosunkowo duże ilości tego aminokwasu znajdują się w odchodach zwierząt i ludzi. Wynika to z faktu, że na wszelakiego rodzaju odchody składają się niestrawione składniki pokarmowe, a więc także pewna ilość białka, masa bytujących w przewodzie pokarmowym mikroorganizmów, złuszczający się naskórek przewodu pokarmowego. Dość zasobne w lizynę są także inne odpady białkowe, jak np. serwatka.

Otrzymywanie jakiegokolwiek aminokwasu z naturalnych surowców białkowych składa się z dwóch zasadniczych procesów. Pierwszym z nich jest rozbicie wiązań peptydowych - czyli proces hydrolizy. Drugim procesem jest wydzielenie aminokwasu z otrzymanego hydrolizatu. Celem niniejszego przeglądu jest przedstawienie współ-

czesnych metod stosowanych w obu tych procesach, ze szczególnym uwzględnieniem tych, które mogłyby być podstawą do ekonomicznie efektywnego pozyskiwania lizyny z uciążliwych ścieków białkowych.

### HYDROLIZA

Przez hydrolizę białka należy rozumieć rozerwanie wiązania peptydowego między dwoma resztami aminokwasowymi. Rozerwaniu wiązania peptydowego towarzyszy pobranie cząsteczki wody ze środowiska reakcji. Reakcję hydrolizy stosuje się do celów preparatywnych (wydzielanie aminokwasów), jak i do celów analitycznych (oznaczanie zawartości reszt poszczególnych aminokwasów). Rozbicie wiązania peptydowego wymaga dość drastycznych środków. Konsekwencją tego są wtórne reakcje destrukcji uwalnianych z białka aminokwasów. Przy prowadzeniu hydrolizy do celów preparatywnych procesy destrukcji są niepożądane na tyle, że prowadzą do obniżenia wydajności procesu wydzielania danego aminokwasu. Różne aminokwasy są w różnym stopniu podatne na procesy destrukcji i jeśli wydzielany aminokwas jest w miarę odporny na destrukcyjny wpływ hydrolizy, to z praktycznego punktu widzenia nie ma już znaczenia fakt, że inny aminokwas rozkłada się np. całkowicie. Z drugiej zaś strony wydzielanie z surowców naturalnych stosuje się w produkcji różnych aminokwasów, ale tylko wtedy, gdy wydzielany aminokwas można łatwo oddzielić od całego balastu pozostałych aminokwasów i innych związków i gdy produkuje się ilości umiarkowane, rzędu kilkudziesięciu kilogramów rocznie. Wtedy bowiem nie opłaca się instalować ani urządzeń do produkcji mikrobiologicznej ani do syntezy chemicznej. Przy produkcji na skalę masową natomiast, jak dotąd, wydzielania się nie stosuje. W takim stanie rzeczy nie było potrzeby bardziej szczegółowego badania procesu hydrolizy prowadzonej do celów preparatywnych.

Przy hydrolizie do celów analitycznych destrukcja prowadzi do rozbieżności między oznaczonymi i rzeczywistymi zawartościami poszczególnych aminokwasów. Z tego względu hydroliza do celów analitycznych powinna być prowadzona w sposób eliminujący destrukcję. W praktyce okazało się to praktycznie niemożliwe. Wszelako intensywny rozwój badań nad białkami spowodował duże zapotrzebo-

wanie na dokładne analizy ich składu aminokwasowego. Oznaczenie zawartości poszczególnych aminokwasów w białku wymaga jednak uprzedniej jego hydrolizy. Dążąc do maksymalnej, dokładności oznaczeń opracowano wiele metod hydrolizy, które w mniejszym lub większym stopniu pozwalają wyeliminować destrukcję takich czy innych aminokwasów. Wprawdzie żadna z tych metod nie jest metodą idealną, ale ich różnorodność pozwala na wyciągnięcie bardziej ogólnych wniosków.

Na metodę hydrolizy składają się dwa aspekty: czynnik hydrolizujący i warunki w jakich przeprowadza się hydrolizę z użyciem danego czynnika. Wśród czynników hydrolizujących dość szczególne znaczenie mają różne enzymy proteolityczne [7]. Rozbijają one wiązania peptydowe w bardzo łagodnych warunkach. Zupełna hydroliza enzymatyczna białka wymaga stosowania kilku enzymów i jest dość czasochłonna.

Wszystkie inne czynniki hydrolizujące można nazwać czynnikami chemicznymi. Pierwszym takim czynnikiem hydrolizującym był roztwór kwasu siarkowego zastosowany w 1820 r. [12]. Po hydrolizie, przed dalszą obróbką hydrolizatu należy usunąć czynnik hydrolizujący. W tym przypadku jony  $\text{SO}_4^{2-}$  usuwano w postaci  $\text{BaSO}_4$ . W 1849 r. [12] zastosowano 6 N roztwór  $\text{HCl}$  i głównie ten czynnik hydrolizujący stosuje się po dzień dzisiejszy [4]. Kwas solny szybciej rozбивa wiązania peptydowe niż siarkowy, a jego usunięcie z hydrolizatu można również znacznie łatwiej osiągnąć przez odparowanie wody. Hydrolizę z kwasem solnym przeprowadza się gotując hydrolizowany materiał, najczęściej przez 24 godziny, pod chłodnicą zwrotną, bądź też ogrzewając w zatopionych ampulkach w temperaturze  $110^\circ\text{C}$  przez taki sam okres. W trakcie tak prowadzonego procesu hydrolizy zachodzą różne reakcje uboczne. Przede wszystkim pełnemu rozkładowi ulega tryptofan. Ponadto, zachodzi wiele reakcji między produktami rozpadu tryptofanu, różnymi aminokwasami i innymi składnikami hydroлизованego materiału wskutek czego powstaje pewna ilość ciemno zabarwionych produktów tzw. humin. Obecność węglowodanów, jonów metali ciężkich, tłuszczów, duże stężenie hydroлизованego materiału, dostęp tlenu - sprzyjają reakcjom ubocznym i powstaje wtedy szczególnie dużo humin [4]. Innym, obecnie dość często stosowanym, czynnikiem hydrolizującym jest roztwór wodorotlenku - najczęściej  $\text{NaOH}$  lub  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  [4]. Tak jak przy hydrolizie kwasem reakcję przepro-

wadza się gotując pod chłodnicą zwrotną lub ogrzewając w zatopionych, najlepiej plastikowych fiolkach przez odpowiedni okres (do 24 godzin). Wygodniejszy jest roztwór  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , gdyż po hydrolizie łatwo można usunąć jony baru jako  $\text{BaSO}_4$ . Przy hydrolizie alkalicznej nie ulega destrukcji tryptofan i to stanowi główną jej zaletę. Destrukcji zupełnej ulega natomiast arginina, a inne aminokwasy ulegają bądź zniszczeniu w znacznym stopniu, bądź racemizacji.

Oznaczenie wszystkich aminokwasów w analizowanym materiale wymaga więc przeprowadzenia dwóch hydroliz: alkalicznej dla oznaczenia tryptofanu i kwasowej dla oznaczenia wszystkich pozostałych aminokwasów. Korzystniejsza byłaby możliwość oznaczenia wszystkich aminokwasów w jednym hydrolizacie. Szukano więc innych czynników hydrolizujących. Underwood i Deatherage [26] próbowali hydrolizować kazeinę i inne materiały białkowe ogrzewając przez 95 godzin mieszaninę hydrolizowanego materiału z wodą i żywicą kationowymienną. Stosowali przy tym proporcje: na 400 mg białka, 40 ml wody i 2 g żywicy. Przy tak prowadzonej hydrolizie nie tworzą się huminy. Możliwość użycia żywicy kationowymiennej jako czynnika hydrolizującego była na tyle obiecująca, że poświęcono jej sporo uwagi. Paulson i Deatherage [18] badali mechanizm uwalniania poszczególnych aminokwasów w trakcie ogrzewania białka z kationitem. Paulson, Deatherage i Almy [19] prowadzili hydrolizę białka gotując je przez 48 godzin z kationitem i 0,05 N roztworem  $\text{HCl}$ . Bardziej szczegółowo hydrolizę z udziałem wymiennicza badali na modelowych peptydach Whitaker i Deatherage [27]. Davies i Harris [3] badali możliwość prowadzenia hydrolizy białka wymienniczami w temperaturze pokojowej poprzez przepuszczenie wodnej zawiesiny hydrolizowanego białka przez złożo kationitu lub anionitu. Wszystkie te badania wykazały ograniczoną przydatność kationitu jako czynnika hydrolizującego do przeprowadzenia całkowitej hydrolizy białka. Rozbiciu ulegają nie wszystkie wiązania peptydowe i w otrzymanym hydrolizacie znajdują się obok aminokwasów także peptydy o różnym ciężarze cząsteczkowym.

Pedersen i Baker [21] jako czynnik hydrolizujący zastosowali ciekły dwutlenek siarki. Reakcję przeprowadzano w ten sposób, że w grubościennej rurce umieszczano 2 g hydrolizowanego białka, 12 g ciekłego  $\text{SO}_2$  i 50 g lodu. Zatopiono i ogrzewano w  $100^\circ\text{C}$ . Hydroliza zachodziła w 100% po około 36 godzinach ogrzewania.

Dużymi zaletami tej metody są: możliwość łatwego usunięcia  $\text{SO}_2$  i fakt, że rozrywaniu wiązań peptydowych nie towarzyszy powstawanie humin. Ogrzewanie z  $\text{SO}_2$  do 24 godzin nie niszczy tryptofanu. Fakt ten wykorzystali Pedersen i Baker [20] oraz Parsons i Baker [17] i zastosowali hydrolizę samym dwutlenkiem siarki oraz mieszaniną  $\text{SO}_2$  i rozcieńczonego  $\text{HCl}$  do otrzymywania hydrolizatu kazeiny, przydatnego do doświadczeń żywieniowych.

Szybsze uwalnianie aminokwasów, a w konsekwencji mniejsze straty aminokwasów i mniejsze ilości humin obserwuje się w metodzie zaproponowanej przez Gurnani i Kumta [6]. Polega ona na tym, że hydrolizowany materiał traktuje się najpierw kwasem mrówkowym i dopiero potem dodaje się 6 N roztwór  $\text{HCl}$  i prowadzi właściwą hydrolizę.

Metodę hydrolizy białka „na sucho” zaproponowali Iachan, Disitzer i Perrone [8]. Polega ona na stopieniu analizowanego materiału z 10 częściami kwasu szczawiowego w temperaturze  $120^\circ\text{C}$ . Po skończonej reakcji mieszaninę się studzi i rozpuszcza w wodzie. Kwas szczawiowy usuwa się z mieszaniny dodatkiem  $\text{CaCO}_3$ . Maravalhas [14] zmodyfikował tę metodę wprowadzając dodatek 6 N  $\text{HCl}$  w proporcji: na 1,5 g kwasu szczawiowego 0,5 ml roztworu kwasu.

Najbardziej obiecująca, do celów analitycznych, wydaje się być metoda hydrolizy opracowana przez Liu i Changa [13]. Jako czynnik hydrolizujący zastosowali oni 3 N roztwór kwasu p-toluenosulfonowego z dodatkiem 0,2% tryptaminy. Hydrolizowany materiał ogrzewa się z tym roztworem w zatopionej ampulce przez 24 godziny. W tych warunkach nie ulega zniszczeniu tryptofan i można oznaczyć wszystkie aminokwasy przez analizę jednego hydrolizatu.

Oprócz wyszczególnionych powyżej czynników hydrolizujących wykorzystanych w różnych metodach hydrolizy znane są także czynniki, które wprawdzie nie stały się podstawą żadnej metody hydrolizy, ale w pewnych warunkach rozbijają wiązania peptydowe. Takie właściwości mają jony ceru, które w temperaturze  $37^\circ\text{C}$ , w alkalicznym środowisku wywołują szybkie pękanie wiązań peptydowych [1]. Podobnie działają jony lantanu, ale wymagają temperatury  $70^\circ\text{C}$  [2]. Proteolityczne działanie wykazuje także mono- i trójchloroetanol [22]. Ogrzewanie białka z chloroetanolem prowadzi do pękania wiązań peptydowych i jednocześnie zachodzi częściowa estryfikacja uwolnionych aminokwasów. Stein i Moore [25] w 1951 r. opublikowali wyniki obserwacji nad zachowaniem się aminokwasów w trakcie elektrolitycznego usuwania soli z ich roztworu. Stwier-

dzili oni, że w trakcie takiego elektrolitycznego odsalania ulega rozkładowi arginina z wytworzeniem ornityny i amoniaku. Rozbiciu ulega więc wiązanie między węglem i azotem - tak jak w wiązaniu peptydowym. W 1961 r. McEvoy-Bowe [15] stwierdza, że w trakcie elektrolitycznego odsalania rozkłada się także kwas hipurowy z wytworzeniem kwasu benzoesowego i glicyny. O ile w przypadku wiązania C-N w argininie jest to tylko wiązanie podobne do peptydowego, o tyle w kwasie hipurowym jest to już typowe wiązanie peptydowe. Fakty te są o tyle interesujące, że czynnikiem hydrolizującym pośrednio lub może nawet bezpośrednio byłby tu przepływ prądu elektrycznego.

#### WYDZIELANIE LIZYNY

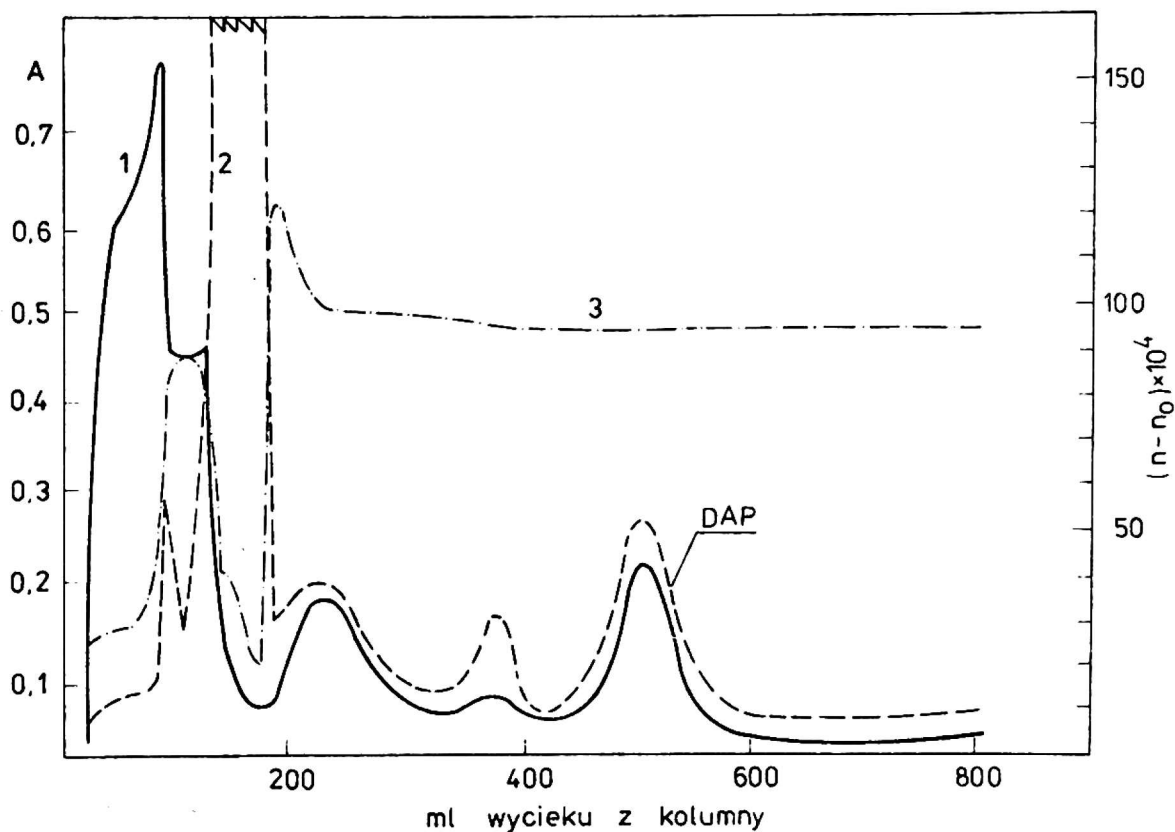
Proces hydrolizy miał na celu rozbicie wszystkich wiązań peptydowych i uwolnienie związanych w białku aminokwasów. W uzyskanym hydrolizacie obok aminokwasów znajdować się mogą jeszcze najrozmaitsze inne związki zależnie od tego jaki materiał był hydrolizowany. Generalnie, można spodziewać się obecności większych lub mniejszych ilości różnych monosacharydów, kwasów tłuszczowych, gliceryny, soli nieorganicznych, amin biogennych, humin i innych produktów rozkładu tych związków w trakcie hydrolizy, jak i produktów różnych reakcji ubocznych między tymi związkami. Proces wydzielania lizyny z takiej mieszaniny musi więc zapewnić uzyskanie produktu całkowicie pozbawionego związków innych niż aminokwasy. Produkt taki powinien zawierać możliwie najmniejsze ilości innych aminokwasów. Jeśli wydzielona lizyna byłaby stosowana jako ewentualny dodatek do pasz wtedy całkowite usunięcie innych aminokwasów nie jest absolutnie konieczne. Obecność innych aminokwasów jedynie obniża zawartość lizyny w uzyskanym preparacie i tym samym zmniejsza jego wartość jako dodatku do pasz. Proces wydzielania musiałby więc być procesem maksymalnie wybiórczym w stosunku do lizyny. Takim procesem jest np. wytrącenie lizyny w postaci soli z kwasem pikrynowym [23]. Odpowiednio przygotowany hydrolizat zadaje się równomolekularną w stosunku do lizyny ilością kwasu pikrynowego i doprowadza pH do około 5. Po ochłodzeniu wytrąca się pikrynian lizyny, który należy przekrystalizować, a potem rozłożyć gorącym kwasem solnym. Po rozłożeniu pikrynianu należy wyekstrahować benzenem kwas pikrynowy. Pozostałą w roztworze

lizynę, po dodatku etanolu wykryształizowuje się jako monochlorowoderek.

Przy okazji badań nad żywieniem przeżuwaczy wyłoniła się potrzeba oznaczania zawartości kwasu dwuaminopimelinowego (DAP) w takich materiałach jak: zawartość przewodu pokarmowego, mocz, kał. Spośród różnych obecnych w tych materiałach aminokwasów w najmniejszych ilościach obecny jest właśnie DAP. Jego oznaczanie na analizatorze aminokwasów wymaga więc nałożenia odpowiednio większej ilości hydrolizatu w porównaniu z ilościami nanoszonymi przy oznaczaniu innych aminokwasów białkowych. Praktycznie sprowadza się to do przygotowania bardziej stężonego roztworu hydrolizatu. W przypadku moczu uzyskanie dostatecznego stężenia DAP napotyka na pewne trudności. Przy zagęszczaniu moczu wykryształizują bowiem związki występujące w nim w dużych ilościach. Prowadzi to do utraty kontroli objętości roztworu, co z kolei mocno obniża dokładność oznaczenia. Aby ominąć te przeszkody opracowano specjalną metodę usuwania z analizowanego moczu soli, mocznika i innych związków występujących w dużych ilościach [9]. Procedura ta, nazwana krótko „odsalanie”, polega na tym, że porcję moczu (np. 100 ml) zakwaszoną do pH około 1 przepuszcza się przez złoże  $2 \times 10$  cm uformowane z kationitu w formie wodorowej, przemywa 50 ml 0,2 N roztworu HCl i następnie eluuje 1,4 N roztworem HCl. Przebieg takiego odsalania przedstawiono na rysunku 1. Wyciek z kolumny do odsalania zbierano w 5 ml frakcjach począwszy od momentu naniesienia moczu. Z zebranych frakcji odpipetowano po 2 ml i wybarwiono z odczynnikiem ninhydrynowym [16]. Pozwoliło to na uwidocznienie zachowania się związków reagujących z ninhydriną, a więc: mocznika, aminokwasów, amin. Dla zlokalizowania DAP w wycieku powtórzono procedurę odsalania moczu wraz z dodatkiem 10 mikromoli tego aminokwasu. Dla uwidocznienia zachowania się soli i innych cząsteczek elektrycznie obojętnych zmierzono współczynnik załamania światła poszczególnych frakcji.

Cały proces odsalania zachodzi w środowisku kwaśnym. Na złożu wymieniacza będą więc zatrzymywane aminokwasy, aminy i kationy nieorganiczne. Związki o cząsteczkach elektrycznie obojętnych (np. cukry), kwasy karboksylowe, aniony nieorganiczne będą swobodnie wędrować przez złoże. Potwierdza to przebieg zmian różnic ( $n - n_0$ ) współczynników załamania światła: dla danej frakcji ( $n$ ) i dla 0,2 N HCl ( $n_0$ ). Duża wartość tej różnicy w przypadku frak-





Rys. 1. Przebieg odsalania 100 ml moczu: 1 - frakcje wybarwione z kwaśnym odczynnikiem (reagują - DAP, cystyna, prolina i kilka innych), 2 - frakcje wybarwione z normalnym odczynnikiem, 3 - zmiany  $n - n_0$  ( $n$  - współczynnik załamania światła poszczególnych frakcji,  $n_0$  - współczynnik załamania światła 0,2 N HCl)

cji zebranych przy przepuszczaniu moczu odzwierciedla obecność związków o cząsteczkach elektrycznie obojętnych, kwasów organicznych, anionów nieorganicznych. Pojawienie się w wycieku 1,4 N HCl powoduje skok wartości różnicy  $n - n_0$ . Kwas o tym stężeniu usuwa ze złoża kationy nieorganiczne, co uwidacznia się charakterystycznym pikiem na początku krzywej dużych wartości  $n - n_0$  (przy objętości około 200 ml wycieku). W tej porcji wycieku, w której opuszcza kolumnę DAP, na krzywej wartości  $n - n_0$  brak zmian. Świadczy to o tym, że w tej porcji wycieku nie ma związków o cząsteczkach obojętnych ani kationów nieorganicznych.

Występujący w moczu w stosunkowo dużych ilościach mocznik także jest słabo zatrzymywany przez złożę i opuszcza kolumnę częściowo już przy przepuszczaniu moczu, a częściowo w trakcie przepłukiwania złoża 0,2 N roztworem HCl i na początku eluowania 1,4 N HCl (duży pik absorbancji po wybarwieniu z ninhydriną). Aminokwasy słabiej związane przez złożę kationitu opuszczają kolumnę na początku eluowania 1,4 N HCl. Silnie związane aminokwa-

sy i aminy pozostają w złożu nawet po wyeluowaniu DAP. Pewna tylko ich liczba opuszcza kolumnę do odsalania wraz z DAP. Przeprowadzone próby wykazały, że złoże o wymiarach 2 x 10 cm pozwala na analogiczne odsolenie do 250 ml moczu. Procedura odsalania przebiegała w ten sposób, że wyciek przy przepuszczaniu moczu, 50 ml popłuczyn i pierwsze 150 ml wycieku przy przepuszczaniu 1,4 N HCl odrzucano. Jako wyciek odsolony zbierano 350 ml dalszego wycieku. Po odparowaniu tej porcji wycieku odsolonego w kolbie wyparki pozostaje znikomo mała ilość suchej pozostałości. Po odsoleniu i odparowaniu odzyskuje się co najmniej 94% DAP zawartego w moczu [9]. Pełna analiza na zawartość aminokwasów w wycieku odsolonym wykazała obecność aminokwasów dwuaminodwukarboksylowych (cystationina, cystyna, DAP, kwas djenkolowy), kilku aminokwasów obojętnych (głównie rejestrowanych przez analizator aminokwasów w końcowej części chromatogramu z kolumny długiej), kilku zasadowych (głównie rejestrowanych przez analizator aminokwasów na początku chromatogramu z kolumny krótkiej) oraz pewną liczbę pików związków nieznanymi. Pozwalało to przypuszczać, że przedstawiona powyżej procedura odsalania może być przydatna do otrzymywania pewnych aminokwasów na skalę preparatywną. Opisaną procedurę odsalania zaadaptowano następnie do odsalania objętości moczu rzędu kilku litrów [11]. Na złożu o wymiarach 6,3 x 10 cm jednorazowo można uzyskać odsolenie 10 litrów moczu. Odsalanie na skalę preparatywną przebiega analogicznie do odsalania na skalę analityczną. Po przepuszczeniu przez złoże całej odsolonej objętości moczu złoże należy przemyć 500 ml 0,2 N roztworu HCl i eluować 1,4 N HCl. Jako wyciek odsolony należy zbierać porcję wycieku od 3001 do 6500 ml wycieku z kolumny przy przepuszczaniu 1,4 N HCl.

Procedurę odsalania na skalę preparatywną zastosowano także do hydrolizatu kału królika [10]. W hydrolizacie kału znajdowały się wszystkie aminokwasy występujące normalnie w białkach oraz DAP (z biomasy bakterii). Lizyny w tym hydrolizacie (z 1 kg świeżego kału) znajdowało się 3,58 g. W wycieku odsolonym natomiast stwierdzono obecność tylko 5 aminokwasów. Zawartość lizyny wynosiła 2,44 g, co stanowi około 3/4 ilości znajdującej się w hydrolizacie. Oprócz tych pięciu aminokwasów w wycieku odsolonym praktycznie nie ma innych związków.

## PERSPEKTYWY

Problem utylizacji ścieków białkowych przez wydzielanie z nich lizyny należy rozpatrywać z dwóch punktów widzenia. Z jednej strony należy uwzględniać aspekty techniczno-ekonomiczne, a z drugiej estetyczno-psychologiczne.

Od strony technicznej proces wydzielania lizyny musiałby obejmować: 1) hydrolizę przerabianego materiału, 2) odbarwienie otrzymanego hydrolizatu (np. dodatkiem węgla aktywnego) i usunięcie wszystkich nierozpuszczalnych składników, 3) usunięcie czynnika hydrolizującego i przygotowanie optymalnego stężenia hydrolizatu, także przez częściowe odparowanie wody, 4) wydzielenie lizyny z hydrolizatu, a więc uwolnienie jej od węglowodanów, kwasów tłuszczowych, soli nieorganicznych, różnych produktów reakcji ubocznych towarzyszących hydrolizie, innych aminokwasów, 5) przygotowanie stężenia odpowiedniego do przeprowadzenia krystalizacji, 6) krystalizację lizyny.

Wszystkie te etapy są obecnie technicznie wykonalne. Znacznie gorzej przedstawia się natomiast zagadnienie ekonomicznej ich opłacalności. Praktycznie żadna z omówionych powyżej metod hydrolizy, z ekonomicznego punktu widzenia, do stosowania na masową skalę się nie nadaje. Wypływa to z faktu, że chemikalia stosowane jako czynniki hydrolizujące są dość kosztowne, a przeprowadzenie wielogodzinnej hydrolizy w temperaturze wrzenia wymagałoby doprowadzenia znacznych ilości energii. Także bardzo energochłonne byłoby odparowywanie wody dla usunięcia czynnika hydrolizującego (gdyby stosować HCl), bądź dla uzyskania odpowiedniego stężenia roztworu hydrolizatu. Chociaż, gdyby stosować jako czynnik hydrolizujący ciekły  $\text{SO}_2$  - wtedy jego usunięcie po hydrolizie byłoby względnie łatwe. Ponadto, istniałaby możliwość powtórnego skroplenia odpędzanego  $\text{SO}_2$  i tym samym mniejsze byłoby jego zużycie, a to z kolei mogłoby obniżyć koszt hydrolizy. Dodatkowa korzyść byłaby jeszcze w tym, że przy hydrolizie dwutlenkiem siarki nie tworzą się huminy - to pozwoliłoby być może nawet całkowicie wyeliminować odbarwienie. Teoretycznie hydroliza przy użyciu  $\text{SO}_2$  mogłaby więc wchodzić w rachubę. Aby ustalić jak dalece sprawdzałaby się przydatność  $\text{SO}_2$  w praktyce należałoby jednak przeprowadzić wiele badań laboratoryjnych i przemysłowych.

Z przedstawionego powyżej przeglądu metod hydrolizy wynika, że reakcja ta choć w mniej więcej jednakowych warunkach (wielogo-

dzinne ogrzewanie zwykle w temperaturze wrzenia mieszaniny reagującej) zachodzi jednak pod wpływem dość zróżnicowanych czynników ( $H_2SO_4$ ,  $HCl$ ,  $NaOH$ , kwas szczawiowy, kwas p-toluenosulfonowy + tryptamina,  $SO_2$ ). Pozwala to sądzić, że dalsze badania nad reakcją hydrolizy białek mogą doprowadzić do znalezienia innych znacznie tańszych, a jednocześnie równie wydajnych czynników hydrolizujących, jak i korzystniejszych energetycznie warunków jej przeprowadzenia. Najbardziej obiecującą wydaje się możliwość hydrolizy elektrolitycznej. Można różnie na ten temat spekulować, ale udokumentowaną odpowiedź mogą dać tylko odpowiednio przeprowadzone eksperymenty. Rozerwanie typowo peptydowego wiązania C-N w kwasie hipurowym [15] spowodowane przepływającym przez jego roztwór prądem elektrycznym lub procesami towarzyszącymi przepływowi prądu na taką możliwość wskazuje, a jednocześnie może być punktem wyjścia do dalszych badań.

Po hydrolizie przerabianego materiału, po odbarwieniu uzyskanego roztworu hydrolizatu i usunięciu czynnika hydrolizującego można przystąpić do drugiego procesu przeróbki, czyli do wydzielania lizyny. Jak wspomniano powyżej zastosowana metoda wydzielania powinna być maksymalnie wybiórcza w stosunku do wydzielanego aminokwasu. Przykładowo przedstawione powyżej wytrącanie lizyny jako jej pikrynianu [23] nie jest proste i nie nadaje się do masowego stosowania na skalę przemysłową. Odsalanie na złożu kationitu można rozpatrywać jako, w pewnym sensie wybiórczą, metodę wydzielania lizyny z hydrolizatu materiału białkowego. Wprawdzie obok lizyny w wycieku odsolonym znajdują się jeszcze cztery aminokwasy, ale oprócz obecnych mogą znajdować się tylko śladowe ilości innych związków obecnych w hydrolizacie. Na podkreślenie zasługuje fakt, że tak efektywne oddzielenie lizyny od balastu innych związków można osiągnąć drogą jednej tylko operacji. Jeśli nawet ta operacja, nazwana krótko odsalaniem, nie nadaje się do bezpośredniego stosowania - to może być podstawą do opracowania bardzo wydajnego procesu wydzielania lizyny. Odsalanie na złożu kationitu ma jeszcze jedną bardzo istotną zaletę. Roztwór hydrolizatu przepuszczony przez złożo kationitu nie może być zbyt stężony. Oznacza to, że być może nie byłoby konieczne odparowywanie wody po hydrolizie.

Na ewentualne wykorzystanie ścieków białkowych, a głównie odchodów, do produkcji lizyny należy spojrzeć także od strony este-

tyczno-psychologicznej. Wykorzystywanie, choć pośrednio, odchodów do produkcji składnika mieszanek paszowych dla zwierząt, a w konsekwencji do wytwarzania żywności dla ludzi może budzić obrzydzenie. Wszelako pod tym względem pomysł wykorzystania odchodów do produkcji przeznaczonej na dodatek do pasz lizyny nie jest pomysłem oderwanym od rzeczywistości. Od wielu już lat prowadzone są badania nad wykorzystaniem odchodów drobiu jako paszy dla bydła i świń [5, 24]. W tym kontekście stosowanie lizyny otrzymanej z odchodów jest znacznie mniej odrażające.

Z przedstawionych danych wynika, że ewentualne wykorzystanie odpadów białkowych do produkcji lizyny wymaga prowadzenia jeszcze wielu badań. Wylania się stąd podstawowe pytanie: czy warto takie badania prowadzić? Z chemicznej strony warto, bo jest bardzo prawdopodobne, że badania takie doprowadzą do opracowania tanich i wydajnych metod hydrolizy materiałów białkowych. Tym samym wydzielenie lizyny może stać się ekonomicznie opłacalne. Od strony ochrony środowiska utylizacja uciążliwych ścieków białkowych oznacza mniejsze zanieczyszczenie wód, a więc także można odpowiedzieć, że warto.

#### LITERATURA

1. Bamann E., Rother A., Trapmann H., *Naturwissenschaften*, 43, 326, 1956.
2. Bamann E., Trapmann H., Rother A., *Chem. Ber.*, 91, 1744, 1958.
3. Davies J. W., Harris G., *Archiv. Biochem. Biophys.*, 74, 229, 1958.
4. Eastoe J. E., *Amino Acid Analysis of Glycoproteins*, w: *Glycoproteins, Their Composition, Structure, and Function*, Ed. by A. Gottschalk, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, str. 112, 1966.
5. Gajewski A., Machyna H., *Rocz. nauk. Zoot.*, 5, 197, 1978.
6. Gurnani S. U., Kumta U. S., Sahasrabudhe M. B., *Biochim. Biophys. Acta*, 16, 553, 1955.
7. Hill R. L., Schmidt W. R., *J. Biol. Chem.*, 237, 189, 1962.
8. Iachan A., Disitzer L. V., Perrone J. C., *Anais Acad. Brasil Cienc.*, 33, 196, 1961, C. A., 56, 15770a, 1962.
9. Kryściak J., *Chem. Anal.*, 20, 549, 1975.
10. Kryściak J., Mirek U., Kidzińska D., *Zesz. Probl.*, 270, 123, 1983.
11. Kryściak J., Mirek U., w druku.
12. Light A., Smith E. L., *Amino Acid Analysis of Peptides and Proteins*, w: *The Proteins*, Ed. by H. Neurath, Acad. Press, New York, London, vol. 1, 32, 1963.
13. Liu T.-Y., Chang Y.-H., *J. Biol. Chem.*, 246, 2842, 1971.
14. Maravalhas N., *J. Chromatogr.*, 50, 413, 1970.
15. McEvoy-Bowe E., *Nature*, 192, 1072, 1961.
16. Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.*, 176, 367, 1948.
17. Parsons T. R., Baker B. E., *J. Sci. Food Agr.*, 7, 261, 1956.

18. Paulson J. C., Deatherage F. E., J. Biol. Chem., 205, 909, 1953.
19. Paulson J. C., Deatherage F. E., Almy E. F., J. Am. Chem. Soc., 75, 2039, 1953.
20. Pedersen J. W., Baker B. E., J. Sci. Food Agr., 5, 549, 1954.
21. Pedersen J. W., Baker B. E., Nature, 169, 928, 1952.
22. Richter A. F., Čejkova B., Acta Biochim. Polon, 11, 337, 1964.
23. Robson W., Selim A. S. M., Biochem. J., 52, 318, 1952.
24. Stawska B., Roczn. nauk. Zoot., 5, 205, 1978.
25. Stein W. H., Moore S., J. Biol. Chem., 190, 103, 1951.
26. Underwood G. E., Deatherage F. E., Science, 115, 95, 1952.
27. Whitaker J. R., Deatherage F. E., J. Am. Chem. Soc., 77, 3360, 1955.

Я. Крысцяк

## ПРИОБРЕТЕНИЕ ЛИЗИНА ИЗ БЕЛКОВЫХ ОТХОДОВ

### Р е з ю м е

Обсуждается возможность использования белковых отходов для приобретения лизина пригодного для питательных целей. Приобретение лизина требует проведения двух основных процессов: гидролиза белкового материала и отделения лизина от остальных компонентов гидролизата. Обзор существующих методов белкового гидролиза позволяет констатировать, что ни один из до сих пор разработанных методов непригоден для применения в промышленном масштабе. В этих методах для гидролиза применяются довольно разнообразные гидролизующие факторы; это приводит к заключению, что расщепление пептидной связи может происходить при участии разных химических соединений. Это же означает в свою очередь, что дальнейшие исследования могут привести к развитию новых гидролизующих факторов. На этом основании могут быть разработаны более дешевые и продуктивные методы гидролиза, возможно даже пригодные для применения в промышленном масштабе.

Выделение лизина из гидролизата белковых отходов означает ее сепарацию от используемого гидролизующего фактора, других компонентов, солей, продуктов гидролитического распада небелковых компонентов перерабатываемого материала (т.е. продуктов дегградации углеводов, жиров, нуклеиновых кислот), а также от продуктов сопутствующей гидролизу деструкции. Традиционные методы выделения лизина из такого рода смесей непригодны для применения в промышленном масштабе. С другой стороны, очень пригодным может оказаться метод выделения лизина заключающийся в пропускании содержащего, лизин раствора через слой катионита с последующим промывом это-

го слоя разбавленной соляной кислотой. Таким образом в лабораторном - масштабе можно получать только в одном приеме продукт содержащий кроме лизина только небольшие количества нескольких лишь аминокислот (тирозин, фенилоаланин, диаминопимнликовую кислоту и гистидин).

J. Kryściak

#### GAINING LYSINE FROM PROTEIN WASTES

##### S u m m a r y

The possibility of utilization of protein wastes for gaining lysine useful for food production is discussed. Gaining lysine requires carrying out two main processes: analysis of the protein material and separation of lysine from other hydrolysate components. The survey of existing methods of the protein hydrolysis enables to state that no among the methods worked out hitherto is suitable for industrial use. Various hydrolysing agents are applied in these methods, what allows to conclude that the fragmentation of the peptide bond can occur at participation of various chemical compounds. It means that the further investigations, if any, can result in finding new hydrolysing agents. It can lead eventually to working out less expensive and more productive methods of hydrolysis, perhaps even suitable for application on the industrial scale.

Distinguishing lysine from the protein wastes requires its separation from the used hydrolyzing agent, other amino acids, salts, products of hydrolytic fragmentation of nonprotein components of the material processed (i.e. degradation products of carbohydrates, fats, nucleic acids) and from products of destruction accompanying hydrolysis. Traditional methods of the lysine separation from mixtures of such type are unsuitable for application on the industrial scale. On the other hand, very suitable can be the method separation, consisting in passing the lysine-containing solution through the cationite bed, with subsequent rinsing of the bed with diluted muriatic acid. Thus, the product containing beside lysine only little amounts of several other amino acids tyrosine, fenyloalanine, diaminopimelinic acid, histidine can be obtained within only one operation.