

## Piotr GRZYBOWSKI

e-mail: grzybowski@ichip.pw.edu.pl

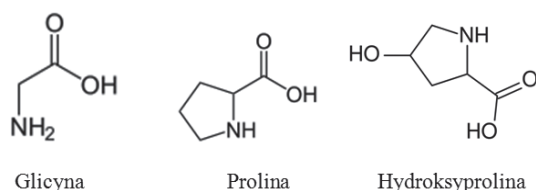
Katedra Inżynierii Procesów Zintegrowanych, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

## Otrzymywanie i dezaminacja hydrolizatów białkowych

## Wstęp

W przemyśle garbarskim powstają duże ilości odpadów skór tak surowych jak i wygarbowanych [1]. W procesie garbowania wykorzystuje się doskonale właściwości garbujące soli chromu  $\text{Cr}^{3+}$ . Chrom w przeliczeniu na metal stanowi około 4% wag. suchej masy wygarbowanej skóry. Odpady wygarbowanych chromowo skór nie ulegają łatwo biodegradacji, a przy ich spalaniu powstaje niebezpieczny  $\text{Cr}^{6+}$  mający właściwości rakotwórcze. Istnieją obecnie technologie zagospodarowania odpadowych skór z odzyskiem chromu, ale ich stosowanie jest niedochodowe ze względu na wysokie koszty. Jednym z produktów otrzymanym z odpadowych skór w części proponowanych rozwiązań technologicznych jest roztwór hydrolizatu białkowego. Nie ma dla takich roztworów dużego zastosowania i obecnie stałyby się one nowym typem już bezchromowego odpadu. Znalezienie zastosowania dla takich roztworów hydrolizatów stworzyłoby możliwość praktycznego zagospodarowania odpadów skór garbarskich.

Celem niniejszej pracy było określenie możliwości chemicznego przetwarzania produktów obecnych w hydrolizacie białkowym na bardziej wartościowe substancje, aby poprawić ekonomikę zagospodarowania wyjściowego odpadu. Podstawowe typy aminokwasów budujących kolagen to: glicyna, prolina i hydroksyprolina [2–4]. Budowę ich cząsteczek przedstawiono na rys. 1.



Rys. 1. Główne aminokwasy budujące białko kolagenu

Białka kolagenowe zawierają około 1/3 glicyny i są potencjalnie takim źródłem tego substratu po hydrolizie i po rozdzielaniu powstających aminokwasów.

## Otrzymywanie hydrolizatów białkowych

Kolagen będący głównym składnikiem skór wraz z innymi białkami ulega stopniowej hydrolizie w środowisku alkalicznym a także środowisku w kwasowym. Proces hydrolizy białek można realizować także przy użyciu enzymów. W badaniach zdecydowano się na prowadzenie hydrolizy alkalicznej. W jej trakcie powstają bardziej jasne produkty niż podczas hydrolizy kwasowej.

Próbki odpadów skór garbowanych chromem pozyskane z podwarszawskiej garbarni traktowano wstępnie 2,4% roztworem wodorotlenku sodowego w temperaturze około 100°C przez 24 godziny. Następnie odsączano wydzielony ciemnozielony osad  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ . W celu dokończenia hydrolizy do przesączu dodawano jeszcze 40 g NaOH na wyjściowe 100 g skór i kontynuowano reakcję hydrolizy przez kolejne 24 godziny w temperaturze około 100°C.

Następnie pobierano próbkę uzyskanego hydrolizatu i wykonywano próbę *Piotrowskiego* umożliwiającą wykrycie obecności białek i peptydów. W próbce tej używa się roztworu  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  w NaOH. Wobec białek i peptydów roztwór ten z niebieskiego barwi się na fioletowo. Uzyskiwano niebieskie roztwory świadczące o pełnej hydrolizie białek. Silnie alkaliczne roztwory po hydrolizie zawierały sole sodowe aminokwasów. Roztwory te miały jasnożółtą barwę i specyficzny zapach.

Roztwory takie można poddawać rozdzielaniu na poszczególne aminokwasy (np. chromatograficznie), ale w pracy nie podejmowano prób ich rozdzielania. Rozdzielanie aminokwasów jest dość złożone i pracochłonne, stąd w praktyce przemysłowej wiele z nich pozyskuje się drogą syntezy chemicznej.

## Proces dezaminacji hydrolizatu

Ze względu na trudność w rozdzielaniu aminokwasów rozważono w pracy ich wstępną dezaminację w celu uzyskania produktów możliwie pozbawionych azotu w cząsteczkach. Spodziewano się, że produkty po dezaminacji będzie można łatwiej rozdzielić klasycznymi technikami.

Dezaminację wykonywano przy użyciu reakcji *Van Slyke'a* [5]:



Reakcja ta jest wykorzystywana w analizie organicznej i umożliwia określenie ilościowej zawartości grup aminowych w próbce na podstawie ilości wydzielonego azotu. Reakcję *Van Slyke'a* na potrzeby procesu dezaminacji wykonywano w sposób opisany poniżej.

Wodny roztwór 20,7 g  $\text{NaNO}_2$  schładzano w lodówce. Próbkę 250 g roztworu hydrolizatu umieszczano w zlewce, a następnie wstawiano do naczynia z lodem umieszczonego na mieszadle magnetycznym. Do hydrolizatu dodawano roztwór stężonego HCl w takiej ilości, aby zneutralizować nadmiar NaOH w hydrolizacie. Następnie dodawano odmierzoną ilość kwasu fosforowego albo octowego w ilości odpowiadającej stechiometrycznej reakcji z 20,7 g  $\text{NaNO}_2$ . Do zakwaszonej i schłodzonej próbki hydrolizatu wkraplano zimny roztwór  $\text{NaNO}_2$ .

Towarzyszyło temu intensywne wydzielanie pęcherzyków gazowego azotu. Jednocześnie obserwowano powstawanie brunatnych dymów  $\text{NO}_2$  powstającego z utleniania NO tlenem z powietrza. Reakcje uboczne opisują następujące równania:



Po wprowadzeniu całej ilości przygotowanego roztworu  $\text{NaNO}_2$  próbkę pozostawiano jeszcze na 1 godzinę, a następnie odstawiano do oznaczenia zawartości azotu. Co ciekawe, próbki w trakcie wprowadzania roztworu  $\text{NaNO}_2$  przybierały zieloną barwę, a z biegiem czasu podczas przechowywania stawały się żółte, a następnie brązowe. Zmiany barwy były spowodowane zapewne powstawaniem i stopniowym rozkładem różnych azotowych związków barwnych.

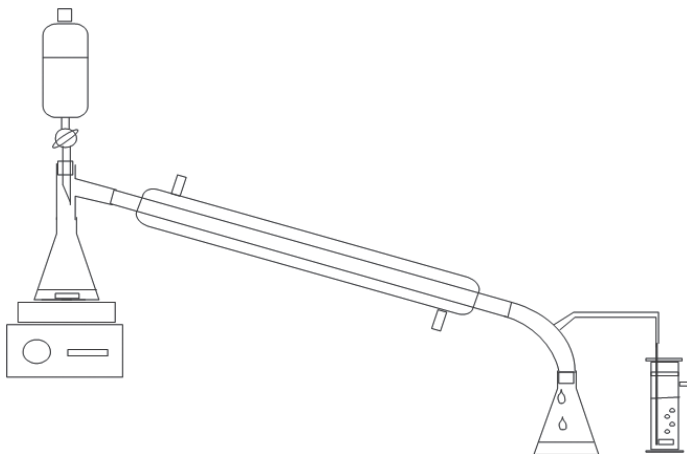
## Ocena stopnia dezaminacji próbek

Zawartość azotu w próbkach hydrolizatów wykonywano metodą *Kjeldahla*. Metoda ta polega na wstępnym zmineralizowaniu badanej próbki przy pomocy stężonego kwasu siarkowego z jednoczesnym przejściem całego azotu w próbce w siarczan amonowy.

Mineralizację próbek prowadzono gotując przez 1,5 godziny badaną próbkę o objętości 20  $\text{cm}^3$  z dodatkiem 40  $\text{cm}^3$  stężonego kwasu siarkowego pod chłodnicą zwrotną wobec katalitycznej ilości 0,6 g  $\text{TiO}_2$ . Dodatek  $\text{TiO}_2$  przyspieszał proces mineralizacji.

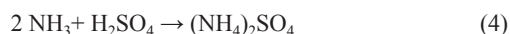
Następnie próbkę studzono i dodawano kroplę fenoloftaleiny i umieszczano w kolbce stożkowej z mieszadłem magnetycznym w zestawie pomiarowym pokazanym schematycznie na rys. 2. Przygotowywano osobno roztwór 67 g NaOH w 150  $\text{cm}^3$  wody i umieszczano go

we wkraplaczu. Kolbę ze zmineralizowaną próbką łączono z chłodnicą. W odbieralniku umieszczano odważoną ilość roztworu kwasu siarkowego. Odbieralnik łączono dalej z płuczką, w której umieszczano dodatkową odmierzoną ilość kwasu siarkowego. Po zmontowaniu całego zestawu badawczego, wlewano do kolby z próbką roztwór wodorotlenku sodowego i rozpoczynano ogrzewanie.



Rys. 2. Schemat układu badawczego

W trakcie ogrzewania wywiązywał się amoniak, który wraz z kondensującą w chłodnicy wodą dostawał się do odbieralnika gdzie ulegał neutralizacji:



Pozostały amoniak był pochłaniany w płuczce z roztworem kwasu. Ten etap procedury był trudny do wykonania ze względu na wyrzuty wrzącej cieczy w kolbie w wyniku gwałtownej desorpcji amoniaku z roztworu badanej próbki. W jednej z prób (nr 2 – Tab. 1) opary amoniaku najprawdopodobniej porwały pewną ilość alkalicznego roztworu z kolby do odbieralnika powodując bardzo duży błąd pomiarowy.

Odpędzanie amoniaku prowadzono aż do momentu, kiedy u wylotu chłodnicy nie stwierdzano odczynu alkalicznego. Odczyn kondensatu opuszczającego chłodnicę określano papierkiem wskaźnikowym rozłączając chwilowo aparaturę. Ogrzewanie i odbieranie amoniaku trwało około 4 godzin.

Ciecz zebraną w odbieralniku oraz roztwór kwasu z płuczki łączono i poddawano miareczkowaniu alkacymetrycznemu wobec fenoloftaleiny w celu określenia ilości zebranego amoniaku. Na podstawie ilości zebranego amoniaku obliczono ostatecznie zawartość azotu w wyjściowej próbce. Procedurą wyznaczania zawartości azotu objęto także próbki wyjściowych hydrolizatów. Porównanie zawartości azotu w próbkach hydrolizatów i w próbkach po dezaminacji umożliwiły ocenę stopnia dezaminacji próbek hydrolizatów.

### Wyniki badań

Wyniki oceny stopnia dezaminacji roztworów hydrolizatów białkowych otrzymanych ze skór odpadowych przedstawiono w tab. 1.

Tab.1. Zastawienie wyników pomiaru zawartości azotu w próbkach i obliczonych wartości stopnia dezaminacji

Próbka	Początkowa zawartość azotu, [g]	Zawartość azotu po dezaminacji [g]	Stopień dezaminacji, [%]
1	4,125	1,06	74,3
2	4,125	5,68	–
3	4,125	3,06	25,82
4	4,125	3,06	25,82
5	4,125	3,28	20,48
6	4,125	3,32	19,52

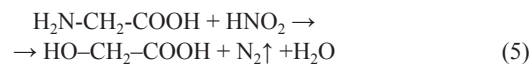
### Podsumowanie i wnioski

Po wykonaniu pełnej alkalicznej hydrolizy białek kolagenowych ze skór uzyskuje się wodny roztwór sodowych soli aminokwasów. Udało się uzyskać pełną hydrolizę, co potwierdziły pozytywne wyniki próby *Piotrowskiego*. Proces hydrolizy zachodził względnie szybko, a zastosowanie dużej ilości wodorotlenku sodowego gwarantowało osiągnięcie pełnej hydrolizy białek kolagenowych w przeciągu doby.

Wykonanie reakcji *Van Slyke'a* okazało się kłopotliwe ze względu na konieczność stosowania niskich temperatur zapewniających większą trwałość i lepszą rozpuszczalność kwasu azotowego (III) w wodzie. Ponadto w trakcie reakcji trudno jest zapobiec utlenianiu się tlenku azotu do dwutlenku. Zbyt gwałtowne dozowanie roztworu  $\text{NaNO}_2$  prowadzi do silnego pienienia się mieszaniny reakcyjnej na skutek wydzielania się gazowego azotu oraz pianotwórczego działania samych hydrolizatów. W związku z tym należy roztwór ten dozować wolno. Długiemu utrzymywaniu się piany sprzyjało większe stężenie roztworów, stąd lepiej jest stosować roztwory o niedużym stężeniu. To jednak wymaga kosztownej obróbki dużych ilości cieczy na jednostkę masy wyjściowych skór i podnosi koszt ewentualnego wydzielania produktów reakcji.

Spowolnieniu całego procesu przekształcania hydrolizatów towarzyszyły też niezbyt wysokie wydajności procesu dezaminacji za pomocą reakcji *van Slyke'a*. W przypadku próbki nr 2 mogło nastąpić porwanie kropli mieszaniny reakcyjnej do absorbera amoniaku i zniekształcenie wyników wykonywanych później miareczkowań.

Główny składnik kolagenu, jakim jest glicyna, w warunkach prowadzonej dezaminacji miały się przekształcić w kwas glikolowy według schematu:



Kwas ten ma różne zastosowanie m.in. używa się go w środkach do pielęgnacji skóry ze względu na jego silną zdolność do penetracji skóry. Jest także surowcem wyjściowym w różnych syntezach organicznych oraz używa się go w przemyśle spożywczym, tekstylnym, w garbarstwie a także wytwarza się z niego biodegradowalny polimer – poliglikolid.

Problematyczne wydaje się wydzielanie tego produktu z mieszaniny reakcyjnej z racji jego niewielkiego stężenia w związku ze stwierdzonymi niskimi stopniami dezaminacji, obecności wraz z nim wielu różnych związków w mieszaninie poreakcyjnej i dodatkowo ze względu na silną wrażliwość kwasu glikolowego na podwyższoną temperaturę. Kwas ten topi się w  $75^\circ\text{C}$  i rozkłada się podczas próby destylacji. Rozdzielanie produktów reakcji nie było jednak przedmiotem prowadzonych obecnie prac badawczych.

Dalsze badania nad dezaminacją hydrolizatów białkowych powinny przewidywać możliwość użycia większej ilości czynnika dezaminującego, zastosowanie łagodnych warunków procesu dezaminacji oraz opracowanie bezpiecznej i skutecznej metody wydzielania kwasu glikolowego np. drogą ekstrakcji.

Dezaminacja hydrolizatów białkowych otrzymywanych z odpadowych skór drogą reakcji *van Slyke'a* mimo, że wydaje się prosta i zachęcająca, nie jest ani łatwa w aplikacji technologicznej, ani nie jest zadowolająco wydajna.

### LITERATURA

- [1] A. Przepiórkowska, M. Stańczak: Przem. Chem. **82**, 1146 (2003).
- [2] K. Okuyama, S. Arnott, M. Takayanagi, M. Kakudo: J. Mol. Biol. **427** (1981).
- [3] R. D. B. Fraser, T. P. MacRae: Int. J. Biol. Macromol., **93** (1981).
- [4] D. J. Hulmes: J. Struct. Biol., **2**, 10 (2002).
- [5] D. Slyke: J. Biol. Chem. **9**, 185 (1911).