УДК 663.51

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ЭТАНОЛ-МЕТАБОЛИЗИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ИЗ ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE

[1]Бабич О.О., [1]Сухих С.А., [1]Асякина Л.К., [2]Крупин А.В.

[1]ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», Кемерово, e-mail: olich.43@rambelr.ru;

[2]ЗАО Холдинговая компания «СДС-Алко», Кемерово, e-mail: td@sds-alko.ru

Определены рациональные условия очистки ЭМС: диализ против дистиллированной воды при температуре 0 ± 2 °С в течение 24 ч; ультрафильтрация на мембранах марки УПМ-67; микрофильтрация на мембранах фирмы «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм; сорбция белка на колонке с карбоксиметилцеллюлозой, 0,020 М фосфатный буфер (pH 7,4); элюация белкового комплекса градиентом концентраций 0,4М NaCl растворенного в 0,020 М фосфатном буфере (pH 7,4). В этих условиях сорбция ферментной системы достигла 95 %, элюция 85−87 %. Подобранные условия позволили отделить инертные белки и другие полимерные вещества, которые снижают потребительские и каталитические свойства ЭМС. В результате проведенных исследований каталитическая активность ЭМС повысилась более чем в 10 раз, что связано со значительным снижением количества сопутствующих белков.

Ключевые слова: этанол-метаболизирующая система, осаждения, очистка, выделение, фракционирование, каталитическая активность

DEVELOPMENT TECHNOLOGY ISOLATION AND PURIFICATION OF ETHANOL IS METABOLIZED SYSTEM FROM YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE

[1]Babich O.O., [1]Suchyh C.A., [1]Asyakina L.K., [2]Krupin A.V.

[1]FGBOU VPO «Kemerovo Technological Institute of Food Industry», Kemerovo, e-mail: olich.43@rambelr.ru;

[2]Holding company «SDS-Alco», Kemerovo, e-mail: td@sds-alko.ru

A rational treatment conditions EMC: dialysis against distilled water at a temperature of 0 ± 2 °C for 24 h, ultrafiltration membranes to mark UPM-67; microfiltration membranes by the company «Millipore» with a diameter of 0,22 microns, the sorption of protein on a column of CM-cellulose, 0,020 M phosphate buffer (pH 7,4); elyuatsiya protein complex concentration gradient 0,4 M NaCl dissolved in 0,020 M phosphate buffer (pH 7,4). Under these conditions, adsorption of the enzyme system has reached 95 %, elution of 85–87 %. The selected conditions allowed to separate the inert proteins and other polymeric substances, which reduce consumption, and catalytic properties of the EMC. The research resulted in the catalytic activity of EMC rose more than 10 times that associated with a significant reduction in the number of associated proteins.

Keywords: ethanol metabolized system, deposition, purification, extraction, fractionation, catalytic activity

Употребление алкогольных напитков широко распространено во многих культурах и социумах [1]. Этанол в силу своих химических свойств и особенностей биотрансформации оказывает токсическое и наркотическое воздействие на живой организм [2]. Негативные последствия потребления этилового спирта связаны с накоплением высокой концентрации высокотоксичного вещества – ацетальдегида. Токсическое и наркотическое действие уменьшается по мере его окисления. Метаболическое окисление алкоголя происходит с участием мультиферментной системы, состоящей из двух ферментов: цитозольной алкогольдегидрогеназы (АДГ) и митохондриальной ацетальдегидрогеназы (АЛДГ) [3]. Скорость катаболизма алкоголя и альдегида уксусной кислоты различна у каждого человека и определяется генетическим фактором. У людей с низкой каталитической активностью этанолметаболизирующей системы после потребления спиртного отмечается очень высокое содержание альдегида уксусной кислоты, который выводится из организма более 10 суток.

Цель исследования – с связи с этим создание технологии выделения и очистки этанол-метаболизирующей системы из дрожжей Saccharomyces cerevisiae, предназначенных для связывания и выведения токсических продуктов метаболизма этилового спирта из организма, является актуальным и практически важным.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследований были выбраны дрожжи S. cerevisiae, обладающие высокой каталитической активностью по отношению к этиловому спирту и ацетальгидегиду.

Культивирование дрожжей осуществляли в периодическом биореакторе объемом 5,0 л на питательной среде с использованием молочной сыворотки в течение 18 ч при температуре 36 ± 2 °С, pH среды 4,8 ± 0,2, перемешивании 500 ± 5 об./мин и аэрации воздуха 30 ± 0,2 л/ч. По окончании процесса культивирования дрожжи отделяли от культуральной жид-

кости центрифугированием в течение 15 ± 1 мин при 15000 ± 100 об./мин, промывали дистиллированной водой.

Определение биомассы дрожжей осуществляли как разницу биомассы до и после культивирования. Для количественной характеристики культивирования дрожжей пользовались показателем удельной скорости роста, которая характеризует часовой прирост на единицу растущей биомассы.

Для выделения этанол-окисляющего мультиферментного комплекса дрожжи S. cerevisiae измельчали на планетарной шаровой мельнице РМ 400 в присутствии стеклянных шаров марки Glass beads approximately 80 mesh. Особенности трансформации дрожжей рода S. cerevisiae изучали в электронном микроскопе JTM-100Ex (JEOL) с увеличением в 8000–10000 раз методом негативного контрастирования.

Каталитическую активность АДГ оценивали по скорости окисления кофермента никотинамиддинуклеотида восстановленного (НАДН), которую регистрировали на самописце спектрофотометра по убыли величины оптической плотности при длине волны 340 нм. Каталитическую активность альдегиддегидрогеназы (АЛДГ) определяли методом Б.М. Кершенгольц и Е.В. Серкиной [4], регистрируя начальную скорость образования НАДН при окислении ацетальдегида с образованием уксусной кислоты.

Содержание белка определяли на анализаторе общего азота (белка) «Rapid N cube», работающего по методу сжигания пробы Дюма с регистрацией общего азота на детекторе теплопроводности.

Концентрирование этанол-окисляющей мультиферментной системы проводили методом ультрафильтрации, через полиамидные мембраны УПМ 67.

С целью очистки концентрата от контаминирующей микрофлоры был применен способ микрофильтрации с использованием мембран марки фирмы «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм. Процесс микрофильтрации проводили при температуре 19 ± 2 °С под разрежением 0,1–0,3 МПа.

Далее для более полной очистки ферментного комплекса от инертных белков и белков, молекулярная масса которых более 100 кДа, был применен метод ионообменной хроматографии (ИОХ) на колонке с карбоксиметилцеллюлозой (КМ-целлюлозой) и диэтиламиноэтилцеллюлозой (ДЭАЭ-целлюлозой). КМ-целлюлоза, благодаря своей функциональной группе, обладает свойствами слабого анионообменника, а ДЭАЭ-целлюлоза – свойствами слабого катионообменника.

Степень чистоты на каждой стадии получения и очистки ферментного комплекса определяли электрофоретическим способом в полиакриламидном геле (ПААГ).

Специфичность белковой фракции к этиловому спирту и ацетальдегиду проверяли путем сравнения аминокислотного состава с коммерческими препаратами. Определение аминокислотной последовательности проводили на автоматическом секвенаторе, работающем по методу Эдмана, основанном на обработке исследуемого белка фенилизотиоцианата, что приводит к отщеплению одной аминокислоты с N-конца последовательности и последующей ее идентификацией с помощью жидкостной хроматографии под давлением.

Степень микробиологической чистоты оценивали путем подсчета колоний, выросших на чашках Петри с питательными средами. В качестве питательных сред использовали мясо-пептонный агар, картофельный и солодовый агары.

Общую бактериальную обсемененность ферментного препарата рассчитывали, как среднее арифметическое число колоний микроорганизмов на 1 г препарата для всех разведений.

Достоверность экспериментальных данных определяли методом математической статистики на ЭВМ.

Изоэлектрическую точку ферментов определяли методом изоэлектрического фокусирования на установке фирмы «BioRat».

Молекулярную массу полученного АДГ и АЛДГ определяли методом гель-фильтрации на хроматографе FPLC с использованием тестовых белков.

Титруемую кислотность молочного сырья определяли методом прямого титрования, основанным на нейтрализации кислотных компонентов раствором едкого натрия в присутствии индикатора фенолфталеина.

Результаты исследования и их обсуждение

Выбор рациональных условий осаждения этанол-метаболизирующей системы. Для выделения белков из сырья широко используется метод осаждения смешивающимися с водой органическими растворителями. Добавление к белковому экстракту растворителя вызывает эффекты, приводящие к осаждению белков. К основным причинам данного явления можно отнести: снижение активности воды, способность образования агрегатов под действием на белковые вещества органических растворителей и, как следствие, выпадение их в осадок, поскольку сила электростатического притяжения обратно пропорциональна диэлектрической постоянной среды [5].

Используемый растворитель должен полностью смешиваться с водой, не реагировать с белками и обладать хорошим осаждающим действием. В химии белка для осаждения ферментов используют ацетон, этиловый и изопропиловый спирты. В связи с этим изучено влияние этих растворителей на способность эффективного осаждения этанол-метаболизирующей системы (ЭМС).

Результаты выбора органического растворителя для наиболее эффективного осаждения ЭМС представлены на рис. 1.

Согласно результатам, представленным на рис. 1, можно сделать вывод о том, что максимальный выход ЭМС наблюдается при осаждении раствором ацетона с массовой долей растворителя 90 %. В этом случае количественный выход ЭМС значительно выше, чем при осаждении этиловым и изопропиловым спиртами. Это связано, возможно, с тем, что ЭМС в процессе осаждения взаимодействует с этанолом и изопропанолом.

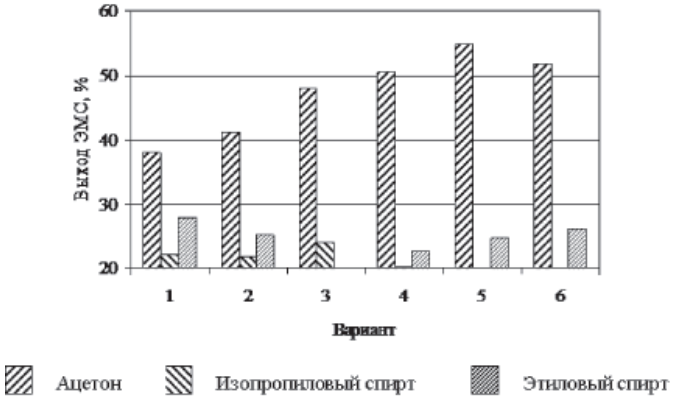

Рис. 1. Влияние массовой доли органических растворителей на эффективность осаждения ЭМС при концентрации органического растворителя, %: 1 – 50; 2 – 60; 3 – 70; 4 – 80; 5 – 90; 6 – 96

Преимуществом ацетона как растворителя перед этанолом и изопропанолом является то, что при низкой температуре требуются более низкие его концентрации, необходимые для осаждения белка. Он также более летуч, что позволяет легко удалять его из растворенного осадка при пониженном давлении. Благодаря данному свойству ацетон обладает менее выраженным денатурирующим эффектом.

Изучение влияния массовой доли органического растворителя на каталитическую активность АДГ и АЛДГ в процессе осаждения представлено на рис. 2.

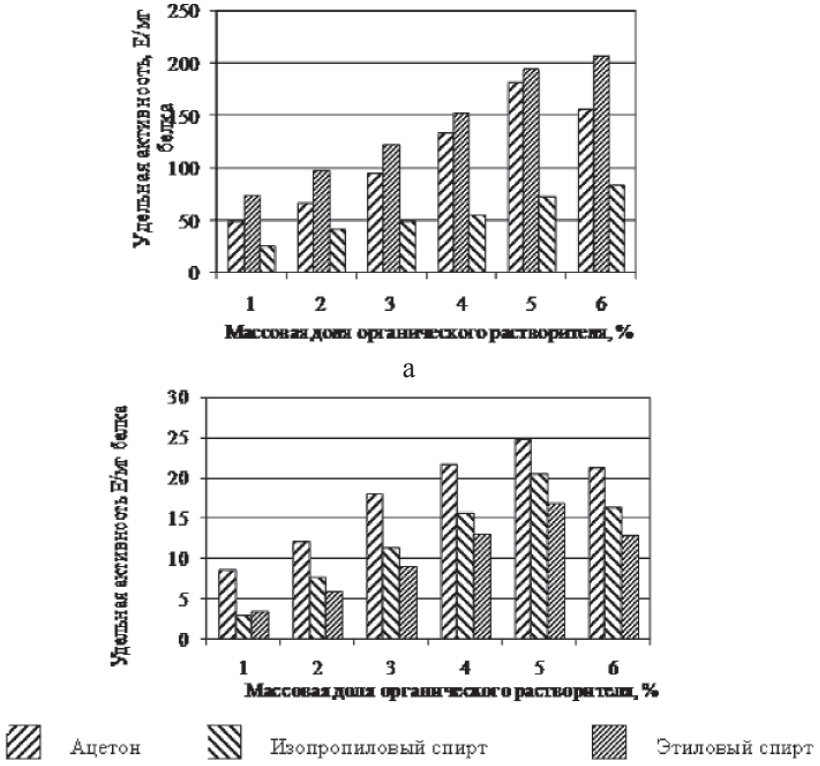

Рис. 2. Влияние органического растворителя на каталитическую активность ЭМС (а – АДГ; б – АЛДГ) в процессе осаждения при массовой доле органического растворителя, %: 1 – 50; 2 – 60; 3 – 70; 4 – 80; 5 – 90; 6 – 96

Согласно данным, представленным на рис. 2, можно сделать вывод о том, что каталитическая активность ЭМС проявляется при использовании в процессе осаждения таких органических растворителей, как ацетон, этиловый и изопропиловый спирты.

Максимальная каталитическая активность АДГ отмечена при использовании в качестве осадителя этилового спирта с массовой долей 96%. Максимальная каталитическая активность АЛДГ отмечена при осаждении ЭМС ацетоном с массовой долей 90%. При этой же массовой доле ацетона каталитическая активность АДГ в 1,9 раз меньше, чем при осаждении 96%-м этиловым спиртом. Но, согласно исследованиям, представленным на рис. 1, при использовании этилового спирта выход целевого белка значительно ниже, чем при осаждении ацетоном с массовой долей 90%. В этой связи для дальнейших исследований выбрали ацетон с массовой долей 90%.

Для осаждения ЭМС ацетоном необходимо правильно подобрать pH реакционной среды, рабочую концентрацию растворителя, температурный режим и скорость вращения ротора при центрифугировании, так как совместно эти факторы способны оказывать существенное воздействие на биологическую и каталитическую активность, а также выход целевого белка.

С целью предотвращения денатурации ферментов при осаждении органическими растворителями согласно литературным данным [6] температурный режим должен быть не более 0 ± 2 °С, так как при более высокой температуре молекулы органического растворителя попадают во внутренние участки глобулы, дестабилизируют ее, связываются за счет гидрофобных взаимодействий с внутриглобулярными остатками, в результате чего происходит денатурация белка. Поэтому процесс осаждения белковой фракции из экстракта проводили при температуре 0 ± 2 °С.

Результаты изучения влияния активной кислотности на изменение выхода белка в процессе осаждения представлены на рис. 3.

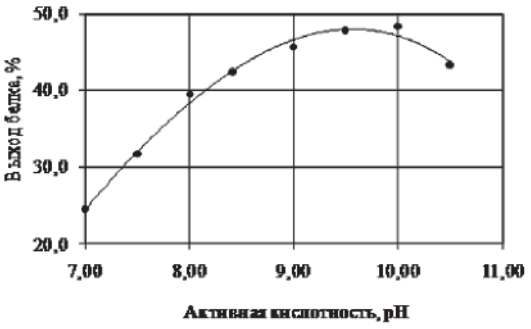

Рис. 3. Влияние активной кислотности на выход белка

Анализ результатов, представленных на рис. 3, свидетельствует о том, что наибольший выход ЭМС наблюдается при проведении процесса осаждения в интервалах pH 9,0 ± 0,5. Эти результаты согласуются с литературными данными о том, что максимальная каталитическая активность фермента АДГ достигается при pH 8,5, а максимальная каталитическая активность АЛДГ наблюдается при pH 9,5 [5].

Эффективность осаждения ЭМС зависит от скорости вращения ротора при центрифугировании. После центрифугирования часть жидкости удерживается осадком. Принимая во внимание, что общие потери суперната, а следовательно, и ферментной системы, пропорциональны отношению объема осадка к объему жидкой фазы, дальнейшие исследования направлены на подбор скорости движения ротора, при которой потери ферментной системы будут минимальными. Результаты изучения влияния скорости движения ротора на процесс осаждения нерастворимого материала представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние скорости движения ротора на процесс осаждения ЭМС

Скорость вращения ротора, об/мин	Объем осадка, мл	Объем супернатанта, мл	Отношение объема осадка к объему жидкости	Выход, %
8000	5,00 ± 0,32	93,50 ± 5,62	0,053 ± 0,003	30,00 ± 1,18
9000	7,90 ± 0,49	89,80 ± 5,39	0,087 ± 0,005	48,00 ± 2,88
10000	14,90 ± 0,89	84,70 ± 5,08	0,176 ± 0,011	54,00 ± 3,24
12000	30,50 ± 1,83	68,50 ± 4,11	0,445 ± 0,026	60,00 ± 3,58
14000	31,60 ± 1,90	67,50 ± 4,06	0,468 ± 0,029	62,00 ± 3,72
16000	30,90 ± 1,54	67,40 ± 4,04	0,458 ± 0028	61,00 ± 3,66

Из табл. 1 следует, что минимальные потери ЭМС отмечаются при проведении осаждения со скоростью вращения ротора 12000 об./мин и более. Но при повышении скорости вращения ротора более 12000 об./мин выход ЭМС практически не меняется, поэтому увеличение скорости вращения ротора более 120000 об./мин считаем нецелесообразным.

Таким образом, подобраны рациональные условия осаждения ЭМС: массовая доля ацетона 90%, pH реакционной среды 9,5 ± 0,5, температура минус 0 ± 2 °С, скорость движения ротора 12000 об./мин.

Фракционирование и очистка этанол-метаболизирующей системы мембранными методами. Основными преимуществами использования мембранных методов фракционирования и очистки являются следующие: возможность направленного регулирования состава и свойств целевых (разделяемых) продуктов; комплексное и рациональное использование безотходных технологических процессов, экономическая целесообразность, заключающаяся в сопоставимых стоимостных затратах с другими методами фракционирования [7].

Удаление остатков молекул ацетона от ЭМС проводили методом диализа. Для этого применяли полупроницаемую мембрану (коллодийную пленку), диаметр пор которой не позволяет диффундировать ЭМС через мембрану, в то время как низкомолекулярные вещества легко проникают через нее в окружающую среду. При осаждении ЭМС имели дело с разбавленными растворами. В этой связи с целью концентрирования растворов высокомолекулярных веществ и их очистки от сопутствующих балластных соединений применяли метод ультрафильтрации. Для этого использовали полупроницаемые мембраны, обладающие способностью избирательно пропускать компоненты фильтрующей жидкости.

Для концентрирования белкового раствора, полученного после разрушения дрожжевой суспензии, последний подвергали ультрафильтрации через мембраны различной пористости и, как следствие, проницаемости, для низкомолекулярных веществ и растворителя.

Сравнительный анализ результатов ультрафильтрации ферментного раствора с использованием мембран марки УПМ с различной пористостью показал, что оптимальное соотношение производительности, выхода ЭМС по активности и степени очистки в процессе ультраконцентрирования обеспечивает полиамидная мембрана марки УПМ-67. Полиамидная мембрана позволяет получить концентрат со степенью очистки 7,3 и удельной активностью по АДГ 780,0 ± 46,5 Е/мг белка и АЛДГ 55,4 ± 3,5 Е/мг белка, что указывает на эффективность применения стадии ультрафильтрации для получения ферментных препаратов высокой степени очистки.

С целью очистки концентрата от контаминирующей микрофлоры методом микрофильтрации подбирали диаметр пор. Для этого использовали мембраны фирмы «Millipore» с диаметром пор 0,60; 0,40 и 0,22 мкм. Эффективность микрофильтрации определяли методом посева концентрата на питательные среды, данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты микробиологических исследований ЭМС

Показатель	Норматив	Диаметр пор, мкм		
		0,60	0,40	0,22
Бактерии группы кишечной палочки (колиформы) в 0,1 г	Не допускаются	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Патогенные микроорганизмы, в т.ч. L. monocytogenes и бактерии рода сальмонелл в 25,0 г	Не допускаются	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
St. aureus в 1,0 г	Не допускаются	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено
Мезофильные аэробные, КОЕ/г, не более	$5\cdot10^4$	$8\cdot10^6$	$9\cdot10^4$	$3\cdot10^2$
Факультативно-анаэробные микроорганизмы, КОЕ/г, не более	$1\cdot10^4$	$6\cdot10^5$	$8\cdot10^3$	$0,7\cdot10^2$

Результаты микробиологических исследований, представленные в табл. 2, свидетельствует о том, что фильтрация через мембраны с размерами пор 0,60 и 0,40 мкм недостаточно эффективна, поскольку в этом случае наблюдается развитие колоний микроорганизмов на питательной среде в процессе инкубации при температуре 37 ± 2 °С в течение 12 ч. Стерилизующая фильтрация с использованием мембран с диаметром пор 0,22 мкм позволила получить готовый продукт, соответствующий по микробиологическим показателям требованиям Государственной фармакопеи.

Известно, что белки избирательно адсорбируются на твердых фазах самых разных видов носителей. Поэтому адсорбционные методы, такие как хроматография, широко используются для разделения и фракционирования белков. Хроматографические методы позволяют получить наибольшую степень очистки белков, что в случае ферментов означает максимально возможное повышение их удельной активности. Для качественного проведения фракционирования ЭМС необходимо, чтобы адсорбент был рыхлый по структуре, чтобы белок мог проникнуть внутрь частиц и достичь центров

связывания. Кроме того, адсорбент не должен оказывать вредного влияния на белки и не должен взаимодействовать с ним.

Для повышения каталитической активности ЭМС и удаления положительно заряженных белков проводили ИОХ на колонке с КМ-целлюлозой. Применение КМ-целлюлозы позволяет обеспечить постоянную скорость протекания элюента через колонку. Для очистки методом ионообменной хроматографии раствор ЭМС наносили на колонку (2,2×10,0 см), элюировали градиентом концентраций NaCl в фосфатном буфере (pH 6,5) со скоростью 10,0 см^3/ч. Элюат собирали порциями по 3,0 ± 0,1 см^3. В каждой фракции определяли концентрацию белка на приборе Rapid N и удельную активность АДГ и АЛДГ. Степень очистки ЭМС после проведения ионообменной хроматографии на колонке с КМ-целлюлозой составила 10,5 ± 0,65, выход по активности ЭМС – 25,4 ± 1,50, белку – 4,3 ± 1,3 %.

Выявлено, что подобранные условия позволили сорбировать на носитель положительно заряженные белки. Показано, что ЭМС вышла в пике несорбированных белков, что позволило значительно повысить каталитическую активность АДГ и АЛДГ, а также удалить часть примесей белковой природы.

Далее для очистки ЭМС с помощью ИОХ выбрали ДЭАЭ-целлюлозу. Применение ДЭАЭ-целлюлозы для очистки ЭМС имеет два преимущества: во-первых, полимерные цепи ионообменной целлюлозы сравнительно сильно разделены в пространстве, поэтому даже очень крупные белки могут свободно диффундировать через ионнообменую матрицу, взаимодействуя с заряженными группами; во-вторых, плотность распределения заряженных групп в ДЭАЭ-целлюлозе относительно невелика, следовательно, отдельные молекулы белка взаимодействуют в каждый момент времени лишь с одной или несколькими заряженными группами ионообменника. Это позволяет элюировать белково-ферментный комплекс в сравнительно мягких условиях [8].

Концентрированные активные фракции ЭМС наносили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенную предварительно 0,020 М фосфатным буфером (pH 7,4), затем проводили элюацию сорбированной ЭМС NaCl в ступенчатом градиенте концентраций, в 0,020 М фосфатном буфере (pH 7,4) со скоростью 10,0 см^3/ч.

На рис. 4 показана ионообменная хроматограмма активных фракций ЭМС, полученная на колонках ДЭАЭ-целлюлозы.

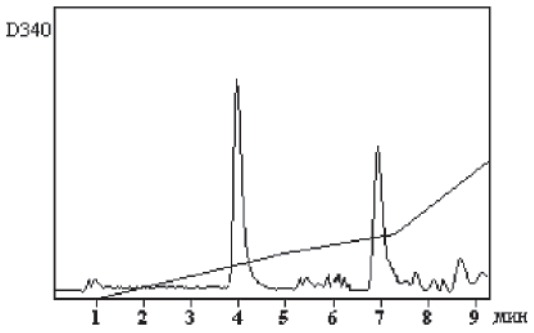

Рис. 4. Ионообменная хроматограмма активных фракций этанол-метаболизирующего комплекса на колонке ДЭАЭ-целлюлозы

В результате анализа данных, представленных на рис. 4, можно сделать вывод о том, что каталитическая активность ЭМС зарегистрирована в двух пиках, вышедших при концентрации соли 0,4 М. Первый пик характеризуется каталитической активностью по отношению к этиловому спирту. В результате можно сделать вывод о том, что это АДГ. Измерение каталитической активности второго пика показало, что фракция представляет собой АЛДГ. Активные фракции объединяли и проводили обессолевание методом диализа.

Электрофоретические исследования фракций (рис. 5) показали наличие двух полос, соответствующих по молекулярной массе АДГ и АЛДГ. Результаты свидетельствуют о гомогенности и чистоте полученной ЭМС.

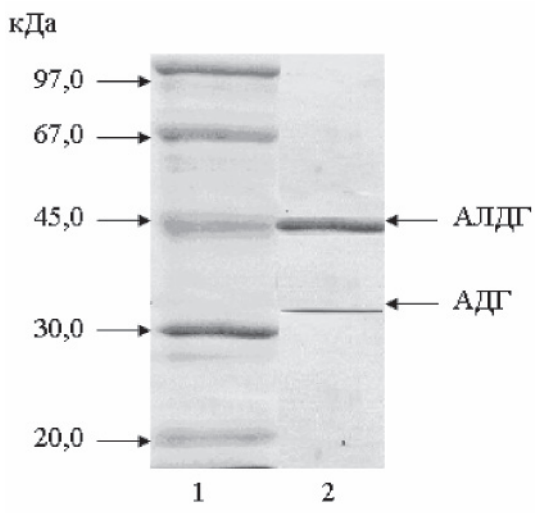

Рис. 5. Электрофореграмма очищенной ЭМС в полиакриламидном геле с додецидсульфатом натрия: 1 – контроль; 2 – опытный образец

Результаты по очистке ЭМС представлены в табл. 3.

Таблица 3

Характеристика стадий очистки ЭМС

Стадии процесса	Объем, (масса), см^3, (г)	Массовая доля белка, %	Удельная активность, Е/мг белка		Выход, %
			АДГ	АЛДГ	
Экстракция сырья	150,0	1,60 ± 0,1	43,0 ± 2,58	2,10 ± 0,12	100
Диализ	80,0	1,17 ± 0,07	206,0 ± 12,35	27,32 ± 1,62	95
Ультрафильтрация	25,0	1,00 ± 0,06	643,0 ± 38,60	43,84 ± 2,65	82
ИОХ на ДЭАЕ-целлюлозе	15,0	0,54 ± 0,03	1293,01 ± 77,58	92,56 ± 5,55	80

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что подобранные параметры очистки обеспечивают 80%-й выход целевого белка, обладающего каталитической активностью по отношению к этиловому спирту и ацетальдегиду (каталитическая активность АДГ 1293,0 Е/мг белка, каталитическая активность АЛДГ 92,5 Е/мг белка).

Таким образом, рациональными условиями очистки ЭМС являются: диализ против дистиллированной воды при температуре 0 ± 2 °С в течение 24 ч; ультрафильтрация на мембранах марки УПМ-67; микрофильтрация на мембранах фирмы «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм; сорбция белка на колонке с КМ-целлюлозой, 0,020 М фосфатный буфер (pH 7,4); элюация белкового комплекса градиентом концентраций 0,4 М NaCl, растворенного в 0,020 М фосфатном буфере (pH 7,4). В этих условиях сорбция ферментной системы достигла 95%, элюция 85–87%. Подобранные условия позволили отделить инертные белки и другие полимерные вещества, которые снижают потребительские и каталитические свойства ЭМС.

Вывод

В результате проведенных исследований каталитическая активность ЭМС повысилась более чем в 10 раз, что связано со значительным снижением количества сопутствующих белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ.

Список литературы

1. Нечаев А.П. Пищевые добавки (понятие, аспекты современного использования в пищевых технологиях, проблемы, тенденции развития) // Пищевая промышленность. – 1998. – №6. – С. 12–15.

2. Баньковский А.А. Изоферменты альдегиддегидрогеназы печени и их роль в предпочтении крысами этанола / А.А. Баньковский, Ю.Н. Островский, В.И. Сатановская // Вопросы медицинской химии. − 1986. − Т.32. − №2. − С. 34-36.

3. Бокий И.В. Использование анализа активности алкогольдегидрогеназы и липидного состава крови в качестве дополнительных критериев для диагностики острой и хронической интоксикации алкоголем: методические рекомендации. – Л., 1985. – С. 20.

4. Кершенгольц Б.М. Некоторые методические подходы к изучению метаболизма этанола / Б.М. Кершенгольц, Е.В. Серкина // Лабораторное дело. – 981. – №2. – С. 126.

5. Антипова, Л.В. Прикладная биотехнология / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, А.И. Жаренов. – Воронеж, 2000. – 332 с.

6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. − М.: Высшая школа, 1980. − 272 с.

7. Бернхард С. Структура и функция ферментов: пер. с англ. Л.М. Гинодмана и И.И. Рапановича; под ред. и с пред. акад. А.Е. Браунштейна. – М.: Мир, 1971. – 336 с.

8. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – 536 с.

References

1. Nechaev, A.P. *Food additives (a concept used in the modern aspects of food technology issues and trends) – Food Industry*, 1998. no.6. pp. 12–15.

2. Bankovsky, A.A., Ostrovsky U.N., Satanovsky V.I. *Aldehyde dehydrogenase isozymes of the liver and their role in ethanol preference by rats – Problems of medicinal chemistry,* 1986. no 2. pp. 34–36.

3. Boki, I.V. Use of alcohol dehydrogenase activity analysis and lipid composition of blood as additional criteria for the diagnosis of acute and chronic alcohol intoxication: [Guidelines]. L., 1985. 20 p.

4. Kerchengolts, B.M., Serkina E.V. *Some methodological approaches to studying the metabolism of ethanol – Laboratory business*, 1981. no. 2. 126 p.

5. Antipov, L.V., Glotova I. A., Zharenov A.I. Applied Biotechnology [*Biotechnology*]. Voronezh, 2000. 332 p.

6. Kochetov, G.A. A Practical Guide to Enzymology [*Enzymology*]. Moscow, High School, 1980. 272 p.

7. Bernhard, S. Structure and function of enzymes [*Structure and function of enzymes*]. Moskov, 1971. 336 p.

8. Osterman, L.A. Chromatography of proteins and nucleic acids [*Chromatography of proteins and nucleic acids*].Moscow: Nauka, 1985. 536 p.

Рецензенты:

Майоров А.А., д.т.н., профессор, директор ГНУ «Сибирский НИИ сыроделия Сибирского отделения Россельхозакадемии», г. Барнаул;

Гаврилов Г.Б., д.т.н., профессор, директор ГУ ЯО ЯГИКСПП, г. Ярославль.

Работа поступила в редакцию 16.02.2012.