

402

TALLINNA POLÜTEHNILISE
INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 402

СБОРНИК СТАТЕЙ
ПО ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ
ТЕХНОЛОГИИ
XLI

(Технология пищевых производств У1)

Ep.6.7

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 402

1976

УДК 663/.664

Сборник статей

по

**ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ
ТЕХНОЛОГИИ
XLI**

(Технология пищевых производств У1)

Таллин 1976



УДК 577.154.25.002.237

К.Э.Паппель, Х.Я.Киппер, А.И.Кёстнер,
А.К. Куликова, А.С. Тихомирова

СТАБИЛЬНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ ЛАКТАЗЫ

Основная прикладная цель получения иммобилизованных ферментов заключается в увеличении интегральной активности фермента, определяемой суммарным количеством полученного с их помощью продукта [1]. Основными факторами при этом являются эффективность иммобилизации фермента и его стабильность. Иммобилизация грибной лактазы на разных носителях описана нами ранее [2,3,4]. В данном сообщении рассматривается стабильность полученных иммобилизованных препаратов.

Материалы и методы

Работы проводили с грибной лактазой (β -D-галактозид-галактогидролазой КФ 3.2.1.23), иммобилизованной по описанной нами методике [5]. Носителями служили силихром [5], силихром покрытый нейлоном, силихром обработанный поликарбамидом (см. наст. сб. с.23-29) и силикагель (удельная поверхность = $26 \text{ м}^2/\text{г}$, средний диаметр пор = 1400 \AA). Стабильность полученных препаратов исследовали в термостабируемых колонках при длительном гидролизе лактозы. Для получения хорошо сравнимых условий исследования, гидролиз лактозы провели не в сыворотке молока, а в 5%-ном буферном растворе лактозы с pH 4,5. Для приближения модельной смеси к сыворотке молока раствор лактозы готовили в 0,1 М фосфат-цитратном буфере. В реакционной смеси определяли глюкозу глюкозооксидазным методом [6]. Стабильность препаратов определяли также по активности их в реакторе перемешивания (по начальной скорости гидролиза лактозы) пос-

ле их 10 - 20-суточного использования в колонках.

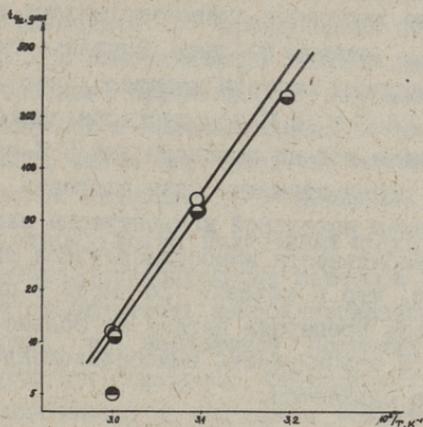
Линеаризацию экспериментальных данных по методу наименьших квадратов проводили с помощью вычислительной машины "Канона ЛП 20".

Результаты и обсуждение

По литературным данным стабильность иммобилизованных ферментов в рабочих условиях характеризуется полупериодом распада активности фермента - $t_{1/2}$ [7]. Нужно подчеркнуть, что применение величины $t_{1/2}$ не всегда себя оправдывает, так как для большинства ферментов зависимость $A_{ост} = f(t)$ ($A_{ост}$ - остаточная активность, t - время реакции) описывается в виде двух пересекающихся прямых. В таких случаях обычно делается заключение, что в препарате содержится две фракции с различной стабильностью. В наших опытах доля менее стабильной фракции не превышает 5%. Отсюда вытекает, что ошибка при линеаризации зависимости $A_{ост} = f(t)$ будет небольшим и значение $t_{1/2}$ может быть рассмотрено как характерный показатель стабильности.

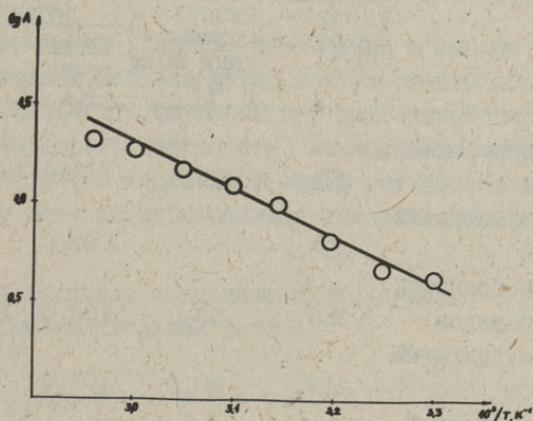
Стабильность иммобилизованной на силихроме и силикагеле лактазы исследована при температуре от 40 до 60 ° (фиг. 1). Различия в стабильности лактазы, иммобилизованной на названных носителях, при применении материала в колонках не замечено. Приведенные данные в общем согласуются с литературными, полученными при исследовании стабильности иммобилизованной лактазы в деионизированной и депротеинизированной сыворотке молока [8]. Значение энергии активации процесса денатурации иммобилизованной на силихроме лактазы равняется 140 кдж/моль (33,5 ккал/моль), что 1,2 раза меньше соответствующего показателя, полученного Питчером [8]. Повышением температуры гидролиза от 40 до 50 ° $t_{1/2}$ снижается около 5,1 раз, а повышением температуры до 60 ° около 23 раз. Скорость гидролиза в тех же пределах увеличивается соответственно в 1,9 и 2,9 раз (фиг. 2). Учитывая вышеназванное, гидролиз лактозы в молочных продуктах иммобилизованной на силихроме лактазой целесообразно провести при температуре не выше 50 °.

Кроме названного стабильность иммобилизованной лактазы сильно зависит от состава гидролизуемой смеси. Так по



Фиг.1. Зависимость полупериода распада активности иммобилизованной лактазы $t_{1/2}$ от температуры.

- — иммобилизованная на силианизированном силихроме лактаза;
- — иммобилизованная на силианизированном силикагеле лактаза;
- — иммобилизованная на силихроме, покрытом нейлоном, лактаза;
- — иммобилизованная на силихроме, покрытом поликарбамидом, лактаза.



Фиг.2. Зависимость активности лактазы от температуры.

данным Питчера при гидролизе лактозы в демонизированной и депротенизированной сыворотке молока значение $t_{1/2}$ при 50° равняется 62 дням, а в сырой сыворотке 8 дням [8]. По нашим данным стабильность иммобилизованной на силихроме лак-

тазы при гидролизе лактозы в сыворотке молока характеризуется значением $t_{1/2}$, равным 30 дням. Изучение стабилизирующего эффекта концентрации лактозы показало, что константа инактивации k_2 при 68° в 15 %-ном растворе лактозы приблизительно 10 раз меньше той же величины для 5 %-ного раствора лактозы. В то же время относительная скорость гидролиза лактозы с повышением начальной концентрации лактозы уменьшается. Изучение стабильности иммобилизованной лактазы от pH при 50° показало, что в течение 24 часов в пределах pH от 3 до 6,5 активность препарата падает не больше 20 %. При значениях pH выше 6,5 стабильность иммобилизованной на силихроме лактазы быстро снижается.

С целью увеличения стабильности иммобилизованной лактазы исследовано покрытие поверхности силихрома полимерами. Иммобилизацию лактазы на таких носителях характеризуют данные в табл. I.

Т а б л и ц а I

Сравнение иммобилизации лактазы на разных носителях

| №№ | Носитель | Исходная активность, Е/г | Активность промывных вод, Е/г | Иммобилизованный фермент | | |
|----|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|----------|
| | | | | активность, Е/г | α | γ |
| 1. | Силанизированный силихром | 204,5 | 51,9 | 112,5 | 74,5 | 54,9 |
| 2. | Силохром, покрытый найлоном | 250 | - | 98,6 | - | 39,4 |
| 3. | Силохром, покрытый поликарбамидом | 250 | 58,0 | 192,0 | 100,0 | 75,8 |
| 4. | Силохром, покрытый акрилатом | 218 | 30,0 | 109,0 | 86,3 | 50,0 |
| 5. | Силанизированный силикагель | 250 | 91,8 | 76,2 | 63,2 | 30,4 |
| 6. | Полиакриламидный гель | 116 | 0 | 32,0 | 100,0 | 30,0 |

Как показывают опытные данные, эффективность иммобилизации лактазы на силикагеле по сравнению с иммобилизацией на силихроме уступает, что связано наверно с меньшей удельной

поверхностью силикагеля. Наивысшая активность препарата лактазы с высоким значением γ (коэффициент сохранения активности) получена при иммобилизации лактазы на силохроме, покрытом поликарбамидом. Эффективность иммобилизации на таком носителе по сравнению с иммобилизацией на силанизованном силохроме повышалась около двух раз, что может быть связано с лучшей доступностью активных групп носителя.

Изучение стабильности полученных препаратов показало, что покрытие поверхности силохрома нейлоном на несколько процентов повышает стабильность иммобилизованного препарата. Можно предполагать, что нейлоновое покрытие уменьшает растворимость поверхности силохрома. Стабильность препаратов лактазы, иммобилизованной на силохроме, покрытом поликарбамидом, исследована при 60 °С. Полученное значение $t_{1/2}$ 2 раза уступает тем же показателям для лактазы, иммобилизованной на "непокрытом" силохроме. Можно предполагать, что меньшая стабильность таких препаратов связана с частичной растворимостью покрытия. Стабильность иммобилизованной в полиакриламидном геле лактазы при 50 °С характеризуется значением $t_{1/2}$ 100 дней, но эффективность иммобилизации приблизительно 6 раз меньше эффективности иммобилизации лактазы на силохроме.

В общем можно сказать, что вопрос о выборе носителя для иммобилизации лактазы нужно всегда решить комплексно, т.е. учитывая стабильность фермента при длительной работе, температурную зависимость активности, возможности загрязнения продукта или исходного вещества и выход активности при иммобилизации, при этом не переоценивая значение последнего показателя.

Авторы выражают искреннюю благодарность Э.У.Маргна за помощь в экспериментальной работе.

Л и т е р а т у р а

1. К ё с т н е р А.И. Иммобилизованные ферменты. - "Успехи химии", 1974, т. 43, № 8, с. 1480.
2. П а п п е л ь К.Э., К ё с т н е р А.И., Ф е н и к - с о в а Р.В., Т и х о м и р о в а А.С. Получение иммобилизованной β -галактозидазы. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 1974, № 367, с. 35-40.

3. Кёстнер А.И., Паппель К.Э., Фениксова Р.В., Тихомирова А.С., Загустина Н.А., Летунова Е.В. Получение и свойства иммобилизованной β -галактозидазы. - "Прикладн. биохим. микробиол.", 1974, т. 10, № 6, с. 851-856.

4. Паппель К.Э., Кёстнер А.И., Тихомирова А.С., Загустина Н.А., Летунова Е.В. Иммобилизация β -галактозидазы на неорганических носителях. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 1975, № 383, с. 9-15.

5. Паппель К.Э., Кёстнер А.И., Летунова Е.В., Тихомирова А.С. Иммобилизация β -галактозидазы на силихроме. - "Прикладн. биохим. микробиол.", 1976, № 4, т. 12, вып. 3, с. 411-415.

6. Samogui, M. Notes on sugar determination. - "J. Biol. Chem.", 1952, vol. 195, № 1, p. 19.

7. Ford, J.R., Pitcher, W.H. Enzyme engineering case study: Immobilized lactase. 1975, Corning Glass Works, prepint, pp. 1-15.

8. Messing, R.A. Immobilized enzymes for industrial reactors. 1975, Ac. Press N-Y, p. 180.

K. Pappel, H. Kipper,
A. Köstner, A. Kulikova,
A. Tikhomirova

On the Stability of Immobilized
 β -Galactosidase Preparations

| Summary

β -galactosidase preparations covalently bound to porous siliceous carriers have been obtained with the help of glutaraldehyde linking. The half-life times have been determined in packed-bed reactors at 40-60°C. The best activities have been found in the case of polyurea-coated carrier, but the pretreatment with nylon led to higher stabilities. The half-life time at 50°C was more than 50 days, which is sufficient for industrial whey treatment with prepared immobilized enzyme.

УДК 577.153.002.237

Х.Я. Кальюла, А.И. Кёстнер

ВКЛЮЧЕНИЕ АМИНОАЦИЛАЗЫ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ РАДИОПОЛИМЕРИЗАЦИЕЙ

Аминоацилаза (ацилоаминокислота амидогидролаза K_{Φ} 3.5.1.14), в частности, в иммобилизованной форме является эффективным катализатором для технологического процесса разделения рацемических смесей аминокислот [1,2]. Аминоацилазу применяют для гидролиза низкомолекулярных субстратов и, следовательно, для ее иммобилизации может быть рекомендовано включение в полиакриламидный гель (ПААГ). Для эффективной реализации данного процесса иммобилизации необходимо подобрать оптимальный состав реакционной смеси и метод иницирования полимеризации.

Настоящая работа посвящена выяснению оптимальных условий иммобилизации почечной аминоацилазой включением в ПААГ. На основе наших предварительных опытов и литературных данных, которые доказывают эффективность радиационного иницирования [3, 4], основная работа проведена этим способом.

Материалы и методы

Применяется препарат аминоацилаза из свиных почек производства Олайнеского завода химреактивов с активностью 5000 Е/г. Ферментативная активность определялась на 0,018 М растворе N-D, L-ацетилметионина в 0,1 фосфатном буфере pH = 7,0 при температуре 37 °С. Концентрация образующего метионина определялась нингидриным реактивом и спектрофотометрированием при 570 нм. Активность вычислялась в микромолях в минуту. Субстрат N-D, L-ацетилметионин был синтезирован в нашей лаборатории ацелированием с помощью искусственного ангидрида. Исходные мономеры - акриламид и N,N'-бисак-

риламид венгерской фирмы "Реанал". Полимеризацию проводили на гамма-установке Луч-1, обеспечивающую интенсивность облучения 50 рад в минуту. Полимеризацию проводили следующим образом: в пробирках составляли реакционную смесь из 50 %-ного раствора мономеров, фермента, растворенного в буферном растворе и при необходимости добавляли растворы модификаторов. Готовую полимеризационную смесь деаэрировали продуванием азотом в течение 1-2 минут. Во время облучения пробирки были помещены в ледяную баню. Образовавшие гели измельчали продавливанием через капроновое сито с диаметром отверстия 0,4 мм, промывали буфером. Для составления баланса определяли активность полученных гелей и промывных вод.

Результаты и обсуждение

Предварительные опыты полимеризации показывали, что скорость гелеобразования существенно зависит от состава полимеризационной смеси. В первую очередь отмечалось значительное ингибирующее действие кислорода воздуха и поэтому все последующие опыты были проведены после деаэрации реакционной смеси. В отсутствие других замедлителей полимеризации гелеобразование отмечалось в среднем через 15 минут после начала облучения. После образования геля активность препаратов мало зависела от общей дозы облучения. Поэтому для последующих опытов было выбрано единое время облучения, равное 90 минутам, чему соответствует суммарная доза 45 крад. Контрольный опыт облучения раствора свободного фермента в течение такого же времени показал, что такая доза не вызывает заметного снижения активности.

Основная работа была проведена с целью выяснения оптимального состава реакционной смеси. Для достоверного выявления значения отдельных факторов серии опытов были проведены по дробным факторным планам. В первых двух сериях ставилось целью выяснить значения отдельных добавок на эффективность включения. Для этого были проведены серии по планам 2² и 2³, основные результаты которых приведены в таблице I.

Из данных таблицы I вытекает, что из испытанных добавок наибольшее значение имеют добавки аланина и ангидри-

да итаконовой кислоты. Для выяснения оптимальных концентраций этих добавок были проведены следующие серии опытов, в которых три фактора варьировали согласно дробно-факторному плану 2^2 , а четвертому фактору дали ряд различных значений. Учитывая то, что в наших работах с другими ферментами обнаружено весьма положительное влияние добавки глутарового альдегида (ГА), первая серия опытов была проведена для выяснения возможности применения этого реактива для иммобилизации аминоксилазы. Основные результаты этой серии показаны на фиг. 1.

Т а б л и ц а I

Главные эффекты гель-аццилазы

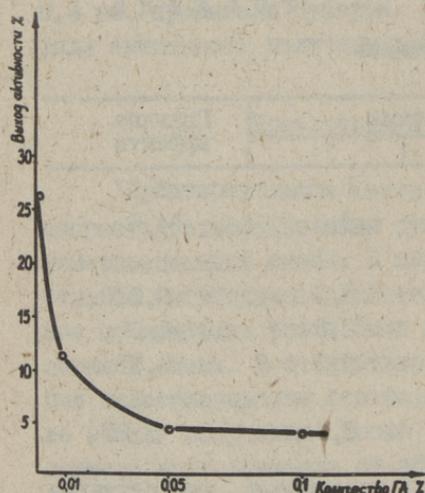
| Источник изменчивости | Уровни | | Главные эффекты |
|-----------------------------------|--------|-----|-----------------|
| | - | + | |
| Сахар | 0 | 5 | 0,97 |
| Аланин | 0 | 0,5 | 14,5 |
| Натриевая соль итаконовой кислоты | 0 | 0,2 | -0,025 |
| Крахмал | 0 | 0,5 | -0,02 |
| Альбумин | 0 | 0,5 | 0,81 |
| Ангидрид итаконовой кислоты | 0 | 0,2 | 9,25 |

Результаты, приведенные на фиг. 1, показывают, что глутаровый альдегид по-видимому инактивирует аминоксилазу и с его помощью нам не удалось улучшить показатели связывания. В следующих сериях была сделана попытка оптимизировать концентрацию аланина и ангидрида итаконовой кислоты в зависимости от концентрации мономера. Опыты, проведенные с натриевой солью итаконовой кислоты не дали существенного эффекта. Ангидрид итаконовой кислоты (АИК) улучшает показатели связывания. На фигуре 2 изображено влияние АИК на выход активности геля в зависимости от концентрации мономеров. Наибольший эффект добавки АИК обнаружен в пределах 15-25%. В результате опытов оптимизации выяснилось, что положительное действие аланина лучше всего достигается при его концентрации 0,4-0,6%.

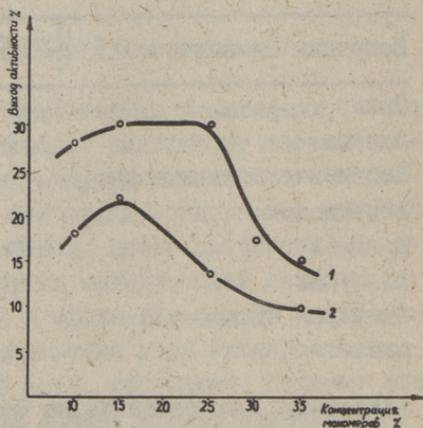
Приведенные результаты показывают, что аланин и ангидрид итаконовой кислоты могут быть рекомендованы как

добавки, улучшающие результаты связывания. На данной стадии оптимизации мы можем рекомендовать реакционные смеси содержанием 15 % мономеров и добавок 0,2 % АИК, 0,5 % аланина. В этих условиях обеспечивается сохранение активности на уровне 30–35 %.

При промышленном применении ферментных катализаторов весьма важную роль играет стабильность полученных препаратов. Для контроля стабильности полученного препарата с составом 0–0,2 % АИК, 0,25 – 0,75 % аланина была исследована и непрерывная работа в колонке при 37 °С в течение 30 часов.



Фиг. 1. Влияние глутарового альдегида на активность геля.



Фиг. 2. Зависимость активности геля от концентрации мономеров.
1 — содержание ангидрида глутаровой кислоты (АИК) 0,2% в реакционной смеси,
2 — без АИК.

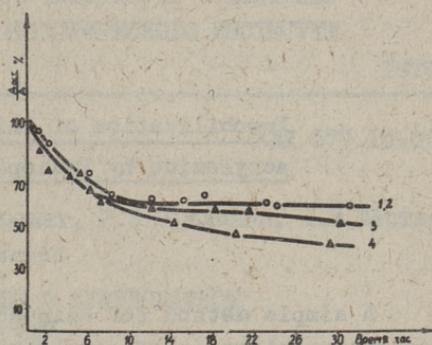
Результаты этих опытов приведены на фигуре 3. На этих фигурах выявляется весьма характерная для иммобилизованных ферментов картина, где в первых стадиях работы наблюдается длительная инактивация препарата, а после этого катализатор может работать длительное время без существенной инактивации. В случае полученных нами препаратов после I стадии инактивации сохраняется примерно 40–60 % активности, что в общей сложности дает коэффициент связывания фермента около 15 %. Такому уровню активности препарата можно считать удовлет-

ворительной и на этой основе сделать заключение, что разработанные нами условия полимеризации в принципе могут быть основой для получения промышленных ферментных катализаторов. Однако, нами до сих пор не достигнуты достаточные для промышленных процессов абсолютные активности препаратов.

Авторы выражают свою искреннюю благодарность сотрудникам Института экспериментальной биологии АН ЭССР Ю. Вахер и Т. Кюпп за предоставление возможности проведения опытов радиополимеризации и Э. Пылдре за добросовестное участие в экспериментальной работе.

Л и т е р а т у р а

1. T o s a, T., M o r i, T., F u s e, N., C h i - b a t a, N. Studies on Continuous Enzyme Reactions. V - "Agr. Biol. Chem.", 1969, 33, 7.
2. T o s a, T., C h i b a t a, I., S a t o, T. Preparation and Industrial application of immobilized aminoacylase.- Fourth. Int. Ferment. Symp. Kyoto, 1972, 73-74.
3. K a w a s h i m a, K., U m e d a, K. Immobilization of enzymes by radiopolymerization of acrylamide.- "Biotechnol. Bioeng.", 1974, 16, 5.
4. K a w a s h i m a, K., U m e d a, K. Immobilization of enzymes by radiopolymerization of monomers.- "Biotechnol. Bioeng.", 1975, 17, 4.



Фиг. 3. Стабильность препарата при гидролизе в колонне.

- { 1 - 10 %-ный гель, 0,2 % АИК
- { 2 - 15 %-ный гель, 0,2 % АИК
- △—△— 3 - 15 %-ный гель, без АИК
- △—△— 4 - 10 %-ный гель, без АИК.

Immobilization of Aminoacylase in Poly-
acrylamide by Radiopolymerization

Summary

A simple method for aminoacylase immobilization by radiopolymerization of acrylamide has been proposed. For this enzyme-monomer solutions were irradiated with a dose of 45 krad at 0°C. To increase the enzyme activity retention in gel the influence of some possible ingredients has been investigated. The best results were obtained in the case of adding 0,2 % itaconic anhydride and 0,5 % alanine to the polymerization solution. After entrapment in polyacrylamide gel about 30-35 % of the initial activity was present in the preparation. N-acetyl-DL-methionine solution has been hydrolyzed in the column packed with prepared gels. After continuous operation at 37° during 30 hours the column retained 40-60 % of its initial activity.

В.А.Кросинг, Р.Э.Трейманн, А.И.Кэстнер

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ИНВЕРТАЗЫ В АРМИРОВАННОМ ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Инвертаза (КФ 3.2.1.26), β -фруктозидаза или β -фруктозид β -фруктогидролаза с успехом может быть иммобилизована включением в полиакриламидный гель (ПААГ) [1]. Иммобилизованную инвертазу в первую очередь предусматривается использовать в технологических процессах для переработки концентрированных вязких растворов сахарозы. В этих условиях особое значение приобретают механические свойства катализатора. Наши предварительные опыты показали, что колонки, заполненные полиакриламидным гелем (ПААГ), в этих условиях склонны к закупориванию и довольно трудно обеспечить устойчивую работу этих установок. Для улучшения механических свойств полиакриламидного геля и полученных на этой основе биокатализаторов модифицировали способ полимеризации в порах твердого неорганического носителя [2].

Целью настоящей работы ставилась разработка способа получения иммобилизованной таким способом инвертазы в количествах, необходимых для проведения укрупненных опытов. На основе того, что известно положительное влияние добавки ангидрида итаконовой кислоты в полимеризационную смесь [3], исследовалось также влияние этой добавки.

Материалы и методы

Инвертаза, выработанная на Олайнеском заводе химреактивов из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, с активностью 35000 Е/г. Активность инвертазы определялась на 7%-ном растворе сахарозы при 30 °С, рН 4,8 и выражалась в Е, т.е. мкмоль/мин. — Акриламид (АА), N,N'-метилденбисакриламид

(бисАА), тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД) и аммоний надсерноокислый производства фирмы "Реанал". Ангидрид итаконовой кислоты (АИК) производства Олайнского завода химреактивов. Силохром СХ-3 производства Горьковского опытного завода ВНИИПН.

Иммобилизация осуществлялась следующим образом. Полимеризационную смесь составили из раствора фермента в ацетатном буфере, из растворов мономеров и инициаторов в предусмотренных соотношениях. Непосредственно после добавления инициаторов в реакционную смесь в последнюю впитывали навеску носителя. Количество раствора и силохрома были выбраны с учетом водопоглощающей способности последнего таким образом, что поры носителя были полностью заполнены полимеризационной смесью, а на поверхности носителя не осталось излишней жидкой фазы. Полученную влажную сыпучую массу выдерживали для завершения полимеризации в течение 2 часов и затем промывали ацетатным буфером. Определяли активность промывных вод и полученных препаратов и вычисляли характерные коэффициенты связывания. Следует подчеркнуть важность правильного подбора соотношения жидкой фазы и носителя. Излишнее количество жидкой фазы превращает продукт в трудно-измельчимую твердую массу.

В ходе оптимизации применялась также блочная полимеризация, измельчение полученного геля через сито с размером 0,64 мм.

Активность полученных препаратов иммобилизованной инвертазы определялась в реакторах перемешивания.

Укрупненные опыты гидролиза концентрированных растворов сахарозы проводились в термостатируемой колонке фирмы "фармация" К-100 с диаметром 100 мм.

Результаты и обсуждения

Известно, что ход полимеризации во многом зависит от концентрации мономеров; условий иницирования, а также от наличия различных добавок, введенных в полимеризационную смесь. Для выяснения эффективности различного рода добавок и условий полимеризации была проведена серия опытов по ортогональному дробно-факторному плану 2^3 . В опытах применялся раствор фермента с активностью 217 Е/мл, общая концент-

рация мономеров 7 %. Варьируемые показатели и вызванные их вариациями главные эффекты приведены в таблице I. Активности, по которым вычислены главные эффекты, были выражены в процентах от введенной в полимеризационную смесь активности. Результаты таблицы I показывают, что большинство варьируемых показателей мало влияет на результаты иммобилизации.

Т а б л и ц а I

Главные эффекты для эксперимента по изучению влияния состава полимеризационной смеси на характеристики связывания инвертазы в 7 % полиакриламидный гель химической полимеризацией

| Источники изменчивости | Уровни, % | | Главные эффекты | | |
|------------------------------------|-----------|-----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | - | + | по активности гель-фермента | по активности промывных вод | по потерям активности |
| Относительная концентрация бис АА | 5 | 10 | +8,5 | +4,0 | -8,7 |
| Наличие сахарозы | 0 | 10 | -5,5 | +66,3 | -63,7 |
| Наличие АИК | 0 | 0,2 | +297,1 | -85,8 | -51,3 |
| Концентрация ТЕМЭД | 0,25 | 1,0 | -47,5 | -3,2 | +24,5 |
| Концентрация надсернистого аммония | 0,25 | 1,0 | +40,7 | -73,0 | +59,1 |
| Наличие кислорода | нет | да | +16,7 | +24,2 | -31,1 |
| Концентрация альбумина | 0 | 0,1 | -39,3 | +6,6 | +12,5 |

Значительный положительный эффект достигается добавлением ангидрида итаконовой кислоты. На этой основе вся последующая работа была проведена с реакционными смесями, которые содержали АИК. В то же время четко отмечалось замедляющее действие АИК на полимеризацию, которое может быть скомпенсировано увеличением концентрации ТЕМЭД-а. В случае полимеризации в порах необходимо работать со смесями, время полимеризации которых было бы в пределах от 15 до 45 минут.

Для подбора состава реакционной смеси по продолжительности полимеризации была проведена следующая серия опытов. В полимеризационную смесь, содержащую 6,65 % АА, 0,35 % бисАА, 0,25 % аммония надсернокислового, 0,2 % АИК и около 3 % Олайнской инвертазы, прибавили ТЕМЭД в количестве 0,25; 0,5; 0,75 и 1 %. Продолжительность полимеризации была при 0,25 % ТЕМЭД-а 15 минут, при остальных концентрациях – 30 секунд. Следовательно, для полимеризации смеси с содержанием АИК в порах твердого носителя можно рекомендовать иницирование с 0,25 % ТЕМЭД. На основе этого состава реакционной смеси переходили к полимеризации в порах.

В первых опытах выяснилось, что подходящее весовое соотношение силохром:полимеризационная смесь равняется 1:2,7. Также выяснили, что количество впитываемого раствора и активность получаемых препаратов не зависит от вакуумирования системы до полимеризации. Следующие опыты проводились простым пропитыванием раствора в сухой носитель.

В таблице 2 представлены результаты опытов по получению армированной геля-инвертазы.

Опыты были проведены по полным факторным планам 2^2 . Изменили следующие факторы – концентрация фермента (3 и 5 %), концентрация АИК (0,2 и 0,4 %), время полимеризации, т.е. время выдерживания препарата до промывания (2 и 24 часа).

Хотя применение такого метода планированного опыта нельзя считать строгой оптимизацией на основе полученных результатов можно рекомендовать следующий режим получения катализатора: концентрация фермента 3 %, концентрация АИК 0,2 %, продолжительность выдерживания препарата до промывания – 2 часа, 24 часа вызвало частичную инактивацию фермента. Количество получаемого препарата в одном опыте было в пределах от 400–700 г.

Учитывая то, что полученные препараты имели довольно близкие показатели, впоследствии они соединялись и применялись для дальнейших опытов. Всего в этой стадии было выработано 5,7 кг геля, со средней активностью 202,5 Е/г. Полученные препараты были испытаны для гидролиза

50 % раствора сахарозы при 50 °С. В этих условиях в течение первых 8 часов выявляемая активность препарата уменьшается на 37 %, после чего остается на более-менее постоянном уровне в течение всего опыта (пяти суток работы). Более быстрое снижение активности в начале работы можно объяснить тем, что часть фермента была адсорбирована на матрице и вымывалась под действием субстрата. Однако, остаточная активность фермента осталась на достаточно высоком уровне, что создает условия для длительного применения препарата в технологических процессах. Следует подчеркнуть, что в этих условиях гидродинамическое сопротивление колонок осталось постоянным в течение всей работы, в отличие от неармированных ПААГ, колонки с которым в этих условиях довольно быстро закупориваются. Для проверки улучшенных гидродинамических показателей полученного геля были проведены опыты в колонке К-100. Для этого в колонку с диаметром 100 мм загружали 2,8 кг геля, что дало столб высотой 71 мм, объем 5,6 л. Эту колонку впустили в работу током снизу вверх с 50 % субстратом при 50 °С. В этих условиях данная колонка показала вполне удовлетворительные гидродинамические показатели в течение длительной работы и позволила получить инвертный сироп со степенью конверсии от 20 до 98 %.

Т а б л и ц а 2

Результаты опытов по получению армированной
гель-инвертазы

| Концентрация фермента, % | Активность армированной гель-инвертазы | | Потери промывными водами, % | Остальные потери (инактивация) % |
|--------------------------|--|------|-----------------------------|----------------------------------|
| | Е/г | % | | |
| 3 | 211,4 | 35,7 | 32,3 | 32,0 |
| 5 | 152,6 | 16,8 | 33,8 | 49,4 |
| 3 | 253,7 | 42,9 | 27,4 | 29,7 |
| 5 | 384,8 | 42,6 | 35,7 | 21,9 |
| 3 | 209,1 | 40,0 | 37,8 | 22,2 |
| 3 | 177,9 | 41,4 | 32,1 | 26,5 |
| 3 | 161,0 | 32,3 | 29,1 | 38,6 |
| 3 | 172,9 | 35,5 | 31,2 | 33,3 |

Вышеописанные опыты показывают, что включение инвертазы в модифицированный итаконовым ангидридом полиакриламидный гель методом полимеризации в порах пористого кремнеземного материала силохром СХ-3 дает нам активные препараты, пригодные для гидролиза 50 %-ного раствора сахарозы в колонках.

Л и т е р а т у р а

1. Кёстнер А.И., Креэн М.И., Калунянц К.А. Свойства связанной в гель инвертазы. Реф. сб. "Микробиологическая промышленность", 1973, 3 (99), с. II.

2. Кёстнер А.И., Мандель М.О., Федосеев В.Н., Сиймер Э.Х. Способ получения нерастворимых ферментов. Заявл. 8.02.1974, реш. 30.07.75. заявка № 1989900/28-13, / с 07а, 7/00, с 12а13/10/.

3. Кёстнер А.И., Креэн М.И. Способ получения иммобилизованных в структуре полимеризационных гелей ферментов. Заявл. 13.09.73. опубл. 25.09.74. БИ № 35, м.кл. с 12а13/10. СССР А.С. № 443902.

A. Krosing, R. Treimann,
A. Köstner

Invertase Entrapped in Reinforced Polyacrylamide Gel

Summary

Invertase has been entrapped in itaconic anhydride modified polyacrylamide gel. To enhance the hydrodynamic properties of gel the polymerization has been carried out in the porous silicious material silochrome. The produced reinforced invertase gel has been used for the hydrolysis of concentrated sucrose solutions in packed bed reactor.

УДК 577.1504.668

Х.Я.Киппер, А.Э.Эрин, Х.Я.Егоров,
К.А.Кивисилла, А.И.Кёстнер

ПОЛУЧЕНИЕ АКТИВИРОВАННЫХ ИЗОЦИАНАТАМИ КРЕМНЕ- ЗЕМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Кремнеземные пористые материалы, как стекло, силикагель, силдохром и керамические материалы, широко используются в качестве носителей для иммобилизации ферментов [1]. Весьма существенным этапом для получения иммобилизованных на кремнеземных материалах ферментов является их активация. Чаще всего это производится силанизацией материала с помощью γ -аминопропилтриэтоксисиланом с последующей активацией полученных продуктов. Наряду с неоспоримыми достоинствами этого метода активации следует отметить, что кремнеорганическое покрытие и связанные через него ферменты с определенной скоростью вымываются с поверхности пористого носителя. Это явление приводит к недостаточной стойкости полученных препаратов. Можно предполагать, что покрывая носители нерастворимыми в воде полимерами, можно добиться повышенной стойкости препаратов.

Для иммобилизации ферментов применяется насыщение поверхности носителя функциональными группами, которые способны к реакции с белковыми макромолекулами, в частности, с первичными аминогруппами лизина. Для этих целей рекомендовано множество реагентов. Среди них выгодно отличаются изоцианаты, которые способны реагировать с первичными и вторичными аминогруппами, с гидроксильными и прочими соединениями и довольно легко синтезируются из простых исходных веществ [2]. В настоящей статье излагаются результаты наших опытов, в которых изучались разные способы активации кремнеземных материалов изоцианатными группами и проверялись свойства этих материалов при иммобилизации панкреатических протеаз.

Исходные материалы

В качестве носителей были использованы силихромы и крупнопористые силикагели производства Горьковского оптического завода ВНИИПН. Паспортные данные применяемых носителей приведены в таблице I.

Основное активирующее бифункциональное соединение — диизоцианат адипиновой кислоты (ДИЦА) был синтезирован из адипиновой кислоты по общеизвестной схеме через диэтиловый эфир, и дигидразид [3]. ДИЦА был использован в виде раствора в хлороформе без выделения основного вещества.

Полиметилметакрилат, капрон и найлон, применяемые для покрытия носителей, были обычными продажными препаратами и применялись в виде растворов в соответствующих растворителях.

Поликарбамид был синтезирован в нашей лаборатории из ДИЦА и гексаметилендиамина в эквивалентных соотношениях 2:1. Полученный препарат имел содержание первичных аминогрупп 700–100 мк-экв/г.

Для иммобилизации был использован препарат панкреатин фирмы "Спофа" удельной протеолитической активностью 1000 Е/г. Остальные реактивы были продажные препараты обычного качества.

Т а б л и ц а I
Характеристика применяемых носителей

| Тип носителя | Марка | Удельная поверхность м ² /г | Радиус пор, Å |
|--------------|-----------------|---|------------------|
| Силохромы | СХ-1,5 | 35 ±5 | 1000 |
| | СХ-3 | 80 ±5 | 250-400 |
| Силикагели | МСА-2 | 50 | 250 |
| | З.тов. | | |
| | МСА-2 оп. 77 | 26 | 500-700 |

Методы анализа

Содержание первичных аминогрупп определялось потенциометрическим титрованием 0,1 н соляной кислотой в водной среде. Определение аминогрупп на поверхности носителя проводилось таким же способом, выжидая после добавления каждой порции кислоты 10 минут для обеспечения полного проникновения титранта в поры носителя.

Для определения изоцианатных групп в исследуемую пробу добавлялся 0,1 н раствор N -бутиламина, выдерживали в течение 10 минут при комнатной температуре и непрореагировавший амин определяли потенциометрическим титрованием 0,1 н кислотой. Количество изоцианата выражалось по разности.

Определение аминного азота в гидролизатах проводилось формольным титрованием.

Определение ферментативной активности проводили по модифицированному методу Ансона на 2 %-ном растворе казеина при pH 8,0 и температуре 30 °C. Белок определяли по модифицированному методу Гартре-Лоури [4]. Активность фермента выражалась в единице $E = \mu\text{моль}$ несаждаемого тирозина в минуту. Определение стабильности полученных препаратов проводилось в тех же условиях в течение 17 часов. В этих опытах применялся реактор с активным ротором, который содержал исследуемый препарат иммобилизованного фермента. Стабильность препарата была выражена через содержание активности после контрольного гидролиза и с помощью т.н. коэффициента эффективности η , который выражается соотношением

$$\eta = \frac{\text{прирост аминного азота в ходе гидролиза, мг}}{\text{убыль активности ферментного препарата в течение гидролиза, E}}$$

Методы активации носителей и иммобилизация ферментов

Активация носителей непосредственно с ДИЦА проводилась кипячением препарата с раствором ДИЦА под обратным холодильником с последующим высушиванием препарата.

Для покрытия поверхности носителя с полимерными материалами носитель пропитывали раствором полимера в соответствующем растворителе. При этом соблюдали условия, в которых носитель был полностью пропитан раствором, но между зернами носителя не образовалось жидкой фазы. После пропитывания носитель при необходимости нагревали, затем высушивали в вакууме. Этот способ был использован в некоторых случаях также для обработки носителя с ДИПА. Активацию покрытого полиметилметакрилатом носителей проводили кипячением с гидразингидратом с последующим переводом в диизоцианаты через азиды кислот.

В полученных носителях определяли количество изоцианатных или аминных групп и они были использованы для связывания фермента. Иммунизация панкреатина на полученных носителях проводилась следующим способом: к активированному носителю добавляли раствор панкреатина, обычно с концентрацией по белку 30 мг/мл, вакуумировали и выдерживали при комнатной температуре в течение 1 часа и промывали 1 М раствором хлористого натрия для удаления адсорбированного белка. Вся работа по иммунизации проводили в боратном буфере с pH 8,0. По активности полученных препаратов и промывных вод и по содержанию белка в промывных водах были вычислены характерные коэффициенты иммунизации: коэффициент сохранения активности γ и коэффициент иммунизации α [5]. Для некоторых препаратов была исследована также стабильность в стандартных условиях.

Результаты и обсуждение

Результаты типичных опытов активации применяемых нами минеральных носителей сосредоточены в таблице 2. Из данных таблицы 2 вытекает, что применяемые нами методы активации позволяют ввести достаточное количество изоцианатных групп и получить активированные носители для иммунизации ферментов. Самые неудовлетворительные результаты получены при использовании покрытых полиметилметакрилатом носителей. По всей вероятности скорость реакций сложноэфирных групп в полимере с гидразингидратом низка для получения достаточно активированных поверхностей, сам полимер

Т а б л и ц а 2

Результаты активации носителей и иммобилизации
панкреатина

| Но- мер опы- та | Носитель | Способ акти- вации носи- теля | Активных НСО групп на носи- теле $\frac{\Delta - \text{экв}}{\Gamma}$ | Результаты имму- обилизации пан- креатина | | |
|--------------------------|-------------------------------|--|---|---|--------------|-----------------------------|
| | | | | актив- ность пре- парата Е/г | $\gamma, \%$ | $\alpha, \%$ по белку |
| 1. | Силохром СХ-1,5 | покрытие поли- метилметакри- латом | 64 | 3,8 | 10,6 | 0,1 |
| 2. | " | " | 40 | 6,1 | 11,1 | 0,2 |
| 3. | " | " | 20 | 5,4 | 15,0 | 0,3 |
| 4. | " | активация ДИЦА | 90 | 11,3 | 34,3 | 72,5 |
| 5. | " | " | 50 | 15,2 | 37,2 | 36,7 |
| 6. | " | " | 170 | 8,0 | 14,0 | 40,2 |
| 7. | Силохром СХ-3 | " | 170 | 10,7 | 24,2 | 33,9 |
| 8. | Силикагель МСА-2 З.тов. | " | 105 | 2,6 | 5,6 | 34,8 |
| 9. | Силикагель МСА-2 оп. 77 | " | 60 | 10 | 21 | 27,0 |
| 10. | Силохром СХ-1,5 | покрытие най- лоном | 108 | 9,6 | 24,4 | 66,7 |
| 11. | " | " | 130 | 8,8 | 23,9 | 40,0 |
| 12. | " | покрытие поли- карбамидом | 80 | 25,3 | 47,8 | 35,5 |
| 13. | " | " | 40 | 17,2 | 35,0 | 21,1 |

слишком гидрофобен и следовательно, получение препаратов с
удовлетворительной активностью затруднено. Интересно отме-

тить, что неорганические носители можно активировать также раствором ДИПА без предварительного покрытия или силанизации носителя полимером. Этот эффект может быть объяснен тем, что ДИПА реагирует с силанольными группами на поверхности носителя, образуя непосредственно ковалентную связь с носителем. Другое предположение основывается на том, что ДИПА способна к полимеризации с образованием водонерастворимых полимеров, которые могут оседать на порах носителя и создать достаточную активность препарата.

Достигнутые уровни активности препаратов можно считать вполне удовлетворительными. Для более детальной характеристики условий иммобилизации панкреатина на выбранных по предварительным опытам носителях были проведены дополнительные исследования с проверкой эксплуатационной стабильности полученных препаратов. Результаты этих опытов приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Характеристика препаратов иммобилизованного панкреатина по эксплуатационной стабильности

| Номер опыта по таблице 2 | Показатели контрольного гидролиза | | |
|--------------------------|---|--------|-------------------------------------|
| | Содержание аминокислот азота в гидролизате, % | η | Сохраненная активность препарата, % |
| 4 | 6,4 | 2,8 | 10 |
| 5 | 4,8 | 5,2 | 6 |
| 6 | 6,0 | 3,7 | 0 |
| 7 | 3,9 | 6,4 | 20 |
| 8 | 10,0 | 54,5 | 69 |
| 9 | 6,3 | 9,0 | 10 |
| 12 | 4,6 | 5,9 | 20 |
| 13 | 6,6 | 10,0 | 36 |

Результаты, приведенные в этих таблицах показывают, что силикагель МСА-2 (преп. 8), который по своей механической стабильности превышает довольно крупный силихром при иммобилизации дает в некоторых опытах заниженные результаты. Значительные различия выявляются в эффективной эксплуатационной стабильности полученных препаратов. Видно, что

самой низкой стабильностью обладают препараты, полученные активацией носителей с ДИЦА без предварительной обработки полимеров. Интересно отметить, что тот же метод активации в случае силикагеля дает вполне удовлетворительные стабильности препаратов. Следует подчеркнуть то, что покрытие силохрома с поликарбамидом последующей активацией с ДИЦА дает наибольшие достигнутые нами активности и сравнительно хорошие стабильности препаратов. Эти результаты подтверждают перспективность применения обработки полимерами для иммобилизации ферментов. Однако мы не уверены, что достигнутые к настоящему времени стабильности препаратов достаточны для применения в промышленных процессах. По всей вероятности следует еще усовершенствовать методику активации с целью повышения стойкости получаемых препаратов.

Авторы выражают свою благодарность лаборантам Т. Лаансалу, С. Тальвинг, М. Педак и Р. Лайсаар за добросовестную помощь при проведении экспериментальной работы.

Л и т е р а т у р а

1. M e s s i n g R.A. Immobilized Enzymes for Industrial Reactors. Acad. Press New York 1975, p. 39.
2. H i g u c h i M., T a k e s h i t a K., S e n j u R. The Reaction of Chlorocarbamoylethyl Starch with Amines in an Aqueous Alkaline Medium. Reactions of an Isocyanate Group. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 47,6, 1451-1454, 1974.
3. Органические реакции Сб. 3. Изд. иностранной литературы, М., 1951, с. 76.
4. Методы в биохимии. Материалы по второму съезду биохимиков Литовской ССР, Вильнюс, 1975, с. 5.
5. К р е з н М.И., К е с т н е р А.И., К а с к К.А. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", серия А, № 300, 1971, с.21-31.

H. Kipper, A. Erin, H. Yegorov
K. Kivisilla, A. Köstner

The Isocyanate-activated Siliceous
Matrices for Enzyme Immobilization

Summary

Macroporous silica gel and silochrome have been activated with the help of adipic acid diisocyanate. To increase the stability in aqueous solutions the coating with polymeric substances has been proposed. Pretreatment with polymethylmetacrylate was not effective, but coating with nylon and polyurea enhanced the stability of matrix-bound enzymes. The prepared carriers have been used for pancreatic complex protease immobilization.

М.Р. Семпер, А.И. Кёстнер

ОБ ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССАХ

Внедрение технологических процессов с применением иммобилизованных ферментов (ИФ) целесообразно и возможно только в случае достижения экономического или технологического эффекта. Технологический эффект может заключаться в создании новых процессов с выпуском недоступных до этого времени продуктов, в улучшении технологических показателей существующих процессов или в повышении качества продукции. При усовершенствовании существующих процессов внедрением ИФ может быть достигнуто улучшение таких показателей, которые также повышают экономичность процесса. Такими показателями являются повышение выхода основного продукта, снижение трудоемкости процесса, уменьшение удельных капитальных вложений, снижение себестоимости продукта.

Экономическая эффективность применения иммобилизованных ферментов может быть определена по показателям и критериям, принятым при определении сравнительной экономической эффективности капитальных вложений и новой техники. Для этого должны быть сравнены конкурирующие в данном случае варианты с иммобилизованным и растворимым ферментом. При определении экономической эффективности применения ИФ следует иметь в виду, что стоимость единицы активности фермента при иммобилизации всегда повышается. При фиксации фермента его активность почти всегда снижается, т.е. выявляется только часть введенной активности, которую можно называть коэффициентом сохранения активности. Кроме этого в стоимость ИФ всегда входят стоимость носителя и расходы на иммобилизацию. Также должны быть учтены расходы на дополни-

тельную очистку препарата, если для иммобилизации употребляется недостаточно чистый фермент. Следовательно, стоимость единицы активности ИФ может быть определена следующим уравнением:

$$c_1 = \frac{c_{\phi} + A_0 c_0}{\gamma A_0}, \quad (I)$$

где c_1 — стоимость единицы активности иммобилизованного фермента;

c_{ϕ} — стоимость носителя и расходы на процесс фиксации;

A_0 — введенная активность;

c_0 — стоимость единицы активности свободного фермента;

γ — доля выявляемой активности в отношении к введенной активности.

При разработке методов иммобилизации должны быть минимизированы расходы на иммобилизацию, в том числе расходы на носитель. В принципе последнее условие может быть выполнено с применением дешевых носителей или регенерацией носителей с более высокой ценой. Также вытекает из уравнения, что относительное удорожание ферментной единицы уменьшается с увеличением стоимости растворимого фермента, примененного в процессе иммобилизации. Поэтому при существующих условиях, когда в процессе иммобилизации требуются значительные затраты, применение ИФ может быть в первую очередь рекомендовано в процессах, требующих расходования очищенных или дорогостоящих ферментов. По той же причине необходимо добиться условий, при которых получают ИФ с наибольшей активностью.

Нами определена себестоимость нескольких ИФ, полученных по методам иммобилизации, разработанным в ТПИ. По себестоимости иммобилизованных в полиакриламидном геле инвертазы и пенициллинамидазы, а также в силихроме β -галактозидазы, можно считать, что в случае иммобилизации промышленных препаратов очень трудно добиться коэффициента удорожания ферментной единицы ниже 2-3.

Экономическая эффективность ИФ выявляется не при производстве ИФ, а при их применении в технологических процес-

сах. Она в основном зависит от стойкости ферментного катализатора в рабочих условиях. При этом необходимо учитывать как ферментативную, так и механическую стабильность препарата.

Назовем период, в течение которого можно использовать данное количество ИФ, фондом эффективного времени его действия. Конечно, ферменты не могут действовать в технологических процессах до полной потери активности. Когда активность фермента снижается до определенного предела, длительность процесса увеличивается и производительность установки уменьшается до недопустимых в технологических условиях величин. Степень инактивации, при которой требуется замена катализатора, в основном зависит от конкретных технологических условий. Выражаем эту величину коэффициентом η .

$$\eta = \frac{A - A'}{A}, \quad (2)$$

где A — исходная активность катализатора;
 A' — минимальная активность, при которой катализатор применим.

Допуская, что инактивация ИФ протекает реакцией первого порядка с константой скорости K , фонд эффективного времени действия T выражается:

$$T = \ln \frac{1 - \eta}{K}. \quad (3)$$

Не имея дополнительных данных о характере процесса применения ИФ, мы можем принять η равным 0,5. В отдельных случаях, наверно, можно работать с η до 0,7.

Годовой экономический эффект применения иммобилизованных ферментов может быть определен следующим уравнением

$$\begin{aligned} \varepsilon = & [B(I_0 + n_0 \Pi_0) + c_0 + K_0 E_n] - \\ & - [B(I + \frac{n \Pi}{N B_u}) + c + K E_n], \end{aligned} \quad (4)$$

где ε — годовой экономический эффект от применения ИФ (руб);
 B — годовой выпуск продукции (кг);
 I_0 — расходы на сырье и материалы в себестоимости 1 кг продукции с применением растворимого фермента;
 n_0 — норма расхода растворимого фермента стандартной активности на единицу продукции (кг/кг);

- P_0 - оптовая цена растворимого фермента стандартной активности (руб/кг);
- C_0 - эксплуатационные расходы установки без расходов на сырье и материалы с применением растворимого фермента за год (руб);
- K_0 - капитальные вложения на установку при применении растворимого фермента (руб);
- E_n - нормативный коэффициент эффективности капитальных вложений, ($E_n = 0,15$);
- I - расходы на сырье и материалы в себестоимости 1 кг продукции при применении ИФ, (кг);
- n - норма загрузки ИФ стандартной активности в реакторе, (кг);
- P - оптовая цена ИФ стандартной активности (руб/кг);
- N - число эффективных циклов работы ИФ;
- $V_{ц}$ - средний выход продукции с одного цикла (кг);
- C - эксплуатационные расходы установки без расходов на сырье и материалы с применением ИФ за год (руб);
- K - капитальные вложения на установку с ИФ (руб).

При этом число циклов N вычисляется

$$N = \frac{T}{\bar{\tau}},$$

где T - фонд эффективного времени действия ИФ (мин.);
 $\bar{\tau}$ - средняя длительность одного цикла (мин.).

Приведенное уравнение является приближенным и не отражает экономическую эффективность повышения качества продукции, улучшения условий труда и охраны окружающей среды.

Поэтому для выяснения влияния последних факторов на экономическую эффективность технологических процессов с иммобилизованными ферментами нужны дальнейшие исследования комплексного характера.

M.Semper, A.Köstner

On the Economical Efficiency of the
Immobilized Enzymes Application in
Technology

Summary

The price of immobilized enzymes and the efficiency of their industrial application have been considered.

Some formulae for calculating the corresponding criteria have been proposed and discussed.

УДК 635.41:664.546.175

К.А.Каск, А.А.Сууртхаль, Ю.М.Канн,
А.Х.Линнамяги, В.А.Мандел, А.-М.А.
Мэльдерики

О СОДЕРЖАНИИ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ В ОВОЩАХ

Интерес к содержанию нитратов и нитритов в пищевых продуктах повысился в связи с возможностью заболевания метгемоглобинией и обнаружением канцерогенных свойств N-нитрозаминов. Токсичность нитратов низка, но вредное для здоровья действие образовавшихся при их восстановлении нитритов является уже более опасным. По рекомендациям ФАО/ВОЗ допустимая дневная доза нитратов 0-3,6; нитритов 0-0,27 мг/кг массы тела. Важнейшими источниками нитратов и нитритов могут быть питьевая вода, овощи и некоторые мясные продукты. В воде водоемов санитарно-бытового водопользования содержание нитратов может быть до 50 мг $\text{NO}_3/\text{л}$.

В последние годы много внимания уделялось исследованию содержания нитратов в овощах в связи с увеличением использования минеральных удобрений в сельском хозяйстве. Известно, что вместе с увеличением количества N-удобрений, особенно при неуравновешенном использовании их, повышается урожай овощей, но ухудшаются внешний вид товара, его сохраняемость и вкусовые свойства и снижается питательная ценность. Под действием K- и P-удобрений у большинства овощей повышается содержание витаминов и сахаров. Содержание аскорбиновой кислоты в овощах и фруктах повышается также благодаря солнечной погоде [2,4]. Содержание нитратов в овощах зависит от вида, сорта и условий выращивания последних, для некоторых же овощей - в основном от содержания азота (достижимого для растений) в почве. Высокое содержание нитратов (свыше 4000 мг/кг) обнаружено в салате, редиске, шпинате и свекле [5-9].

Содержание нитритов в свежесобранных овощах невысоко, но при транспортировке, хранении и обработке содержание нитритов в них увеличивается. Исследования Хейслера и его сотрудников [7] показали, что содержание нитратов в нарезанной свекле после двухдневного хранения повысилось до 1000 мг/кг, в замороженном шпинате после размораживания - до 370 мг/кг, в шпинатном соке - даже до 900 мг/кг. N-нитрозаминов в этих пробах не обнаружено. В овощных консервах и готовых продуктах при применении правильной технологии приготовления содержание нитритов невысоко [7, 10]. В соленых мясных продуктах обнаружено содержание нитритов до 575 мг/кг [11].

По данным Роома [14] содержание нитратов высоко в зелени с коротким периодом роста, достигая в салатах 398 мг % (в виде NaNO_3).

Т а б л и ц а I

Содержание нитратов и нитритов в некоторых овощах выращиваемых в Эстонской ССР

| Овощи | Число проб | NO_3 , мг/кг | | NO_2 , мг/кг | |
|-----------|------------|-----------------------|---------|-----------------------|---------|
| | | границы | среднее | границы | среднее |
| Свекла | 10 | 830-4730 | 2640 | 0,1-360 | 46 |
| Салат | 18 | 380-3110 | 2440 | 0,1-5,6 | 2,7 |
| Редиска | 6 | 1300-3200 | 2080 | 0,1-190 | 63 |
| Редька | 4 | 410-2380 | 1410 | 0,5-11 | 5,4 |
| Брюква | 10 | 110-3760 | 1060 | 0,3-36 | 14 |
| Ревень | 6 | 100-3380 | 980 | 0,1-26 | 12 |
| Тыква | 6 | 23-1380 | 630 | 1,0-11 | 3 |
| Огурцы | 13 | 32-1000 | 480 | 0,1-9,1 | 4,2 |
| Морковь | 13 | 90-760 | 390 | 0,1-5,6 | 2,7 |
| Картофель | 10 | 26-370 | 48 | 0,1-1,0 | 0,8 |

В период 1969-1973 гг. нами исследовалось содержание нитратов и нитритов в овощах, выращенных в Эстонской ССР (табл. I). Пробы овощей брались с полей, из овощехранилищ и торговой сети. При определении содержания нитратов и нитритов применялись колориметрические методы [12, 13].

Для исследования влияния азотных удобрений на содержание нитратов в овощах в период 1973-1975 гг. на опытных полях экспериментальной базы "Юдику" выращивались морковь, капуста и свекла. На капустных полях использовали 0,15 %-ный раствор инсектицида Вi-58 и 0,3 %-ный раствор хлорофоса. На свекольных полях использовали гербицид пирамин по 5 кг/га и на морковных полях - прометрин по 4 кг/га. Показатели, характеризующие погодные условия периодов роста, отличаются от средних показателей за много лет следующим образом:

| | отклонение суммы эффективных температур, °С | отклонение количества осадков, % |
|---------|---|--|
| 1973 г. | +172 | 101 |
| 1974 г. | -112 | 71 |
| 1975 г. | +132 | 94 |

В 1973 г. летом погода была теплая и сухая, но сентябрь был прохладный и с обильными осадками. В 1974 г. было мало как осадков, так и солнечных дней. В 1975 г. в начале периода роста овощей погода была прохладная, но начиная с июля по сентябрь - жаркая и засушливая.

Результаты и обсуждение

Содержание нитратов в овощах, выращенных в Эстонской ССР, зависело от вида, сорта и места выращивания овощей. Зачастую различия бывали велики также и в плодах, произраставших рядом, на одном поле, в силу чего для составления средней пробы желательно использовать по крайней мере 10 плодов. Для большинства овощей содержание нитратов в мелких плодах было выше, чем в крупных плодах. Содержание нитритов в свежесобранных плодах в основном было низко, за исключением свеклы, которая иногда содержала NO'_2 по 10-15 мг/кг. При хранении содержание нитритов увеличивалось, в особенности в тех случаях, когда овощи в течение нескольких дней сохранялись при комнатной температуре. Содержание нитритов в овощных консервах невысоко, только в отдельных пробах консервов, содержащих свеклу и тыкву, обнаружили NO'_2 соответственно до 70 и 30 мг/кг.

Результаты анализов овощей, выращенных при различных нормах минеральных удобрений

| № ис- пыта- ний | Овощи | Минеральные удоб- рения, кг/га | | | Урожай, ц/га | Сухое вещест- во, % | Зола, % | Сырой белок, % | Аскор- биновая кислота, мг % | Каро- тин, мг, % | NO ₃ мг/кг | NO ₂ мг/кг |
|-----------------------|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------|---------------------------|------------|----------------------|---------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | N | P ₂ O ₅ | K ₂ O | | | | | | | | |
| 1 | Морковь "Нантес" | 165 | 126 | 158 | 425 | 10,9 | 0,74 | 1,23 | 9,8 | 4,8 | 300 | следы |
| 2 | | 99 | 90 | 113 | 443 | 10,9 | 0,83 | 1,26 | 7,6 | 5,1 | 240 | " |
| 3 | | 33 | 90 | 113 | 446 | 10,6 | 0,73 | 0,93 | 5,9 | 4,4 | 210 | " |
| 4 | Свекла "Бордо" | 165 | 126 | 158 | 669 | 14,8 | 0,83 | 2,10 | 12,8 | | 1430 | 10 |
| 5 | | 99 | 90 | 113 | 558 | 15,0 | 0,73 | 1,84 | 8,6 | | 970 | 9 |
| 6 | | 33 | 90 | 113 | 501 | 15,9 | 0,75 | 1,70 | 8,3 | | 810 | 8 |
| 7 | Капуста "Лугева" | 232 | 144 | 180 | 723 | 6,3 | 0,57 | 1,45 | 35,2 | | 530 | следы |
| 8 | | 132 | 126 | 158 | 632 | 7,7 | 0,58 | 1,31 | 28,5 | | 400 | " |
| 9 | | 66 | 90 | 113 | 528 | 7,9 | 0,57 | 1,27 | 34,9 | | 250 | " |

В таблице 2 приведены средние данные относительно химического состава овощей, выращенных в 1973-1975 гг. на экспериментальной базе "Юлику". Урожай моркови не зависел от количества примененных минеральных удобрений, но содержание сырых белков, аскорбиновой кислоты и нитратов было тем выше, чем больше было количество (норма) N-удобрения. Сильнее всего от количества использованных минеральных удобрений зависела урожайность свеклы. При обильном использовании N-удобрения увеличивалась урожайность свеклы, повышалось содержание в ней нитратов, сырых белков и аскорбиновой кислоты, но заметно снижалось содержание сухого вещества. Аналогичная закономерность наблюдалась и у капусты. Содержание нитратов в овощах было самым высоким в 1973 г., когда в конце периода роста погода была дождливой и холодной. Самая низкая урожайность овощей, а также плохая сохранность их наблюдалась в 1975 году.

Содержание нитратов в свежесобранных овощах было низким. В результате хранения свеклы в наземном складе содержание нитритов в ней повысилось в марте до 20-30 мг/кг, а в апреле - до 70-110 мг/кг. Содержание нитритов в моркови при хранении повышалось незначительно и даже в апреле ни в одном году не превышало 10 мг/кг. Квашеная капуста нитритов не содержала.

Из выращенных овощей самое высокое содержание нитратов и нитритов имела свекла. С учетом урожайности и химического состава плодов при выращивании свеклы нежелательно использовать N-удобрения свыше 100 кг/га. Хотя содержание нитратов в капусте невелико, но учитывая уменьшение сухого вещества капусты при высоких концентрациях удобрения, можно предложить для нее норму N-удобрения до 130 кг/га. Содержание нитратов в моркови было низким и ее урожайность не зависела от количества использованного N-удобрения. При выборе нормы нужно учитывать содержание питательных (для растения) веществ в почве и выбирать количество N-удобрения в пределах 30 кг/га.

Л и т е р а т у р а

1. Предельно допустимые концентрации вредных веществ в воздухе и воде. Изд. "Химия", Л., 1975, с. 202.

2. Кузьякина В.М., Зайцев А.И. "Сельское хозяйство за рубежом", 1975, № 10, 2-5.
3. W i r t h , W. "Berichte über Landwirtschaft", 1972, 50, Nr. 2.488-504.
4. L e e , C.Y. "J.Food. Sci.", 1974, 39, Nr. 6, 1075-1079.
5. K a d a r , L.L. "Konzerv- es paprikaipar", 1974, külön szam, 53-55.
6. A c h t z e h n , M., H a w a t , H. "Nahrung", 1970, 14, Nr. 383-392.
7. H e i s l e r , E.G. et al. "J.Agr. and Food Chem.", 1974, 22, Nr. 6, 1029-1032.
8. G o v i n d a r a j a n , S. " Food Prod. Develop.", 1972, 6, Nr. 6, 33-36.
9. S c h u p h a n , W. "Qual.plant.", 1974, 24, nr.1-2, 19-35.
10. R e i n t o n , R. "Tidsskr. hermetikind", 1974, 60, Nr. 10-11, 196-199.
11. R a g n a r s s o n , J.O. "Timarit verkfredingafelag Isl.", 1974, 59, Nr. 4, 57-59.
12. S t o y a , W. "Otsch. Lebensmittel-Rdsch.", 1969, 5, 144-147.
13. W o l l e y , T., H i c k s , C., H a g e m a n , R. "J.Agric. and Food Chem.", 1960, 8, Nr. 6, 481-482.
14. Р о о м а М.Я. Гигиеническое исследование овощей, выращенных с применением азотсодержащих удобрений. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Тарту, 1973.

K. Kask, A. Suurthal, J. Kann,
A. Linnamägi, V. Mandel,
A.-M. Mölderkiivi

Content of Nitrites and Nitrates in
Vegetables

Summary

The content of nitrites and nitrates in Estonian vegetables has been determined and the chemical composition of carrots, beets and cabbages depending on the amount of N-fertilizers has been investigated. The nitrates content was high in beets and in broad-leaved vegetables with short growth periods. The content of nitrites was low in fresh vegetables but increased by storing. The negative influence of N-fertilizers is the strongest in beets. Productivity of carrots did not depend on the amount of N-fertilizers, though it had an influence on nitrates content. The recommendations for choosing right amounts of N-fertilizer when growing carrots, beets and cabbages are given.

УДК 664.841:576.8

Т.Л.Лиеберт, А.Г.Канн, В.А.Мандел

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМОУСТОЙЧИВОСТИ СПОР
CL. SPOROGENES 25 В КОНСЕРВЕ "ФАСОЛЬ
СО СВИНИНОЙ"

Подсчет режимов стерилизации основывается на экспериментальных данных о термоустойчивости микрофлоры в продукте. Для определения термоустойчивости должны быть взяты наиболее термоустойчивые микроорганизмы – возбудители порчи данного вида консервов. Степень термоустойчивости должна приближаться к термоустойчивости аналогичной культуры, используемой в мировой практике, о чем судят по показателям термоустойчивости в фосфатном буфере при pH 7,0.

Существует несколько методов определения термоустойчивости микроорганизмов. Наиболее распространенным является метод подсчета истинного числа спор, выдерживающих нагревание, так называемый графический метод [1]. Используется также пробит-анализ альтернативных данных выживаемости прогретых спор, который ввиду особенностей расчета не позволяет получить истинные значения термоустойчивости отдельных фракций спор, но дает условные средние величины, характеризующие популяцию спор при имеющемся в ней соотношении термолабильных и термостабильных клеток [1].

Целью настоящей работы являлось установление требуемой летальности при стерилизации консерва "Фасоль со свиной". Согласно "Положению о разработке режимов стерилизации и пастеризации консервов для автоклава периодического действия" [2] для консервированных продуктов с pH > 4,2 при разработке режимов стерилизации консервов, предназначенных к реализации в условиях умеренного климата в качестве тест-культуры используют Cl. sporogenes 25. Термо-

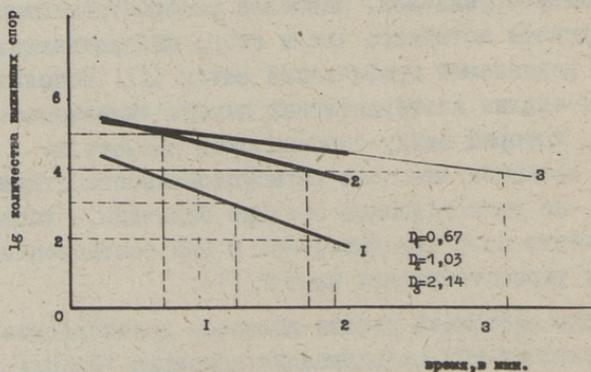
устойчивость спор тест-культуры в фосфатном буфере при pH 7,0 должна быть $D_{120} \geq 0,63$ мин.

Материалы и методы

Споры *Cl. sporogenes* 25 выращивали на среде Китта-Тароцци и получали по общепринятой методике [3]. Выживаемость спор изучали при трех температурах. Капилляры со суспензией спор прогревали в каждом варианте в четырех повторностях. Содержимое капилляров вымывали и высевали в разведениях в трубки Вейона на мясопептонный агар с добавлением дополнительно 0,05 % тиогликолевой кислоты. Обработка полученных данных проводилась на электронно-вычислительной машине "Canola F-20 P".

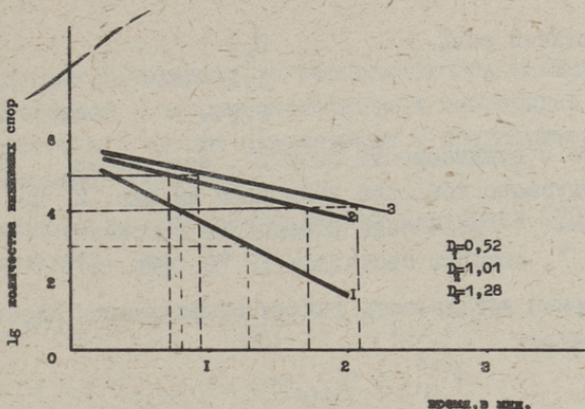
Результаты и обсуждение

Выживаемость спор изучали при температурах 121,1 °C, 118 °C и 115 °C при экспозициях времени от 0,25 до 2 мин. в буферном растворе при pH 7,0. Полученные данные приведены на фиг. 1 и 3. На основании данных о кинетике выживаемости спор *Cl. sporogenes* 25 были определены константы



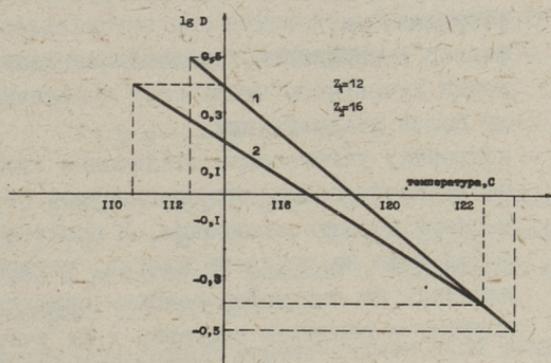
Фиг. 1. Кривые выживаемости спор *Cl. sporogenes* 25 при различных температурах в буферном растворе при pH 7

- 1 - 121,1 °C
- 2 - 118 °C
- 3 - 115 °C.



Фиг. 2. Кривые выживаемости спор *Cl. sporogenes* 25 при различных температурах в консерве "Фасоль со свиной".

- 1 - 121,1⁰С
- 2 - 118⁰С
- 3 - 115⁰С.



Фиг. 3. Кривые термического летального времени для спор *Cl. sporogenes* 25.

- 1 - в буферном растворе
- 2 - в консерве "Фасоль со свиной".

термоустойчивости $D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 0,67$ и $Z = 12$, которые полностью отвечают представленным требованиям.

На термоустойчивость микроорганизмов влияет pH консерва, содержание поваренной соли, жира и т.д. Данные химического анализа консерва "Фасоль со свиной" следующие (в %):

| | |
|----------------|------|
| сухие вещества | 35,6 |
| белки | 10,6 |
| жир | 11,3 |

| | |
|-----------------|-----|
| поваренная соль | 0,9 |
| зола | 1,1 |
| pH | 6,7 |

Данные о выживаемости спор *Cl. sporogenes* 25 в вытяжке исследуемого консерва приведены на фиг. 2. По найденным значениям D графически определяли константу термостойчивости Z , которая составила 16°C (фиг. 2).

Требуемая летальность режима стерилизации рассчитывается по формуле:

$$F_{121,1}^{z^\circ} = D_{121,1}(n+x),$$

- где D — константа термостойчивости микроорганизмов, представляет собой период времени в мин. при температуре $121,1^\circ\text{C}$, в течение которого количество микроорганизмов снижается в 10 раз;
- $121,1^\circ\text{C}$ — стандартная температура при расчете режимов стерилизации;
- n — фактор инактивации, представляет логарифм отношения начального числа спор к конечному их числу после стерилизации;
- x — поправка, учитывающая отклонение числа выживших после прогревания микроорганизмов от логарифмического порядка отмирания. В процессе исследований нами не выявлены клетки, которые не подчинялись бы логарифмическому порядку отмирания, поэтому в расчетах поправки x не учитывали.

Величина n рассчитывается по формуле:

$$n = \lg \frac{C_0 \cdot V \cdot 100}{S},$$

- где C_0 — число спор анаэробов в 1 см^3 продукта;
- V — объем продукта в банке, см^3 ;
- S — количество брака, принимаемое за допустимое при расчетах режимов стерилизации, %.

Для получения достаточных гарантий выработки микробиологически стабильных консервов режим стерилизации рассчитывают, исходя из брака $0,01\%$, что позволяет ограничить производственный брак $0,1-0,2\%$.

По данным Мазохиной [3] обсемененность овощных обеденных консервов спорами мезофильных клостридий достигает 10 клеток в 1 мл при определении в предварительно гомогенизированных продуктах.

На основании полученных данных для банки СКО 83-I можно подсчитать, что

$$F_{121,1^{\circ}\text{C}}^{12^{\circ}\text{C}} = D_{121,1^{\circ}\text{C}} \cdot \left(\lg \frac{10 \cdot 500 \cdot 100}{0,01} \right) = D_{121,1^{\circ}\text{C}} \cdot (\lg 5 \cdot 10^7) =$$

$$= 7,7 \cdot D_{121,1^{\circ}\text{C}} \approx 8 D_{121,1^{\circ}\text{C}}.$$

В вытяжке консерва "Фасоль со свиной" $D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 0,52$ и

$$F_{121,1^{\circ}\text{C}}^{12^{\circ}\text{C}} = 0,52 \cdot 8 = 4,16 \approx 4,2.$$

Установленная величина требуемой летальности для консервов "Фасоль со свиной" $F_{121,1^{\circ}\text{C}}^{12^{\circ}\text{C}} = 4,2$, которая может быть использована для научного обоснования действующего режима стерилизации этих консервов.

Л и т е р а т у р а

1. Рогачев В.И., Мазохина Н.Н., Богданова Н.В., Устинова М.С. Термостойчивость микроорганизмов и разработка режимов стерилизации консервов. ЦИНТИпищепром, М., 1968.

2. Решение Всесоюзной научно-технической конференции по вопросам теории и практики стерилизации и пастеризации пищевых продуктов (г.Одесса 10-12 сент. 1975 г.) Государственный Комитет Совета Министров СССР по науке и технике.

3. Мазохина Н.Н. Термостойчивость Cl. sporogenez 25 - возбудителя ботулизма в овощных закусочных и обеденных консервах. "Консервная и овощесушильная промышленность", 1974, № 6, с. 34-37.

Investigation of the Heat Resistance of
Spores Cl.Sporogenes 25 in the Canned
Product "Beans with Pork"

Summary

Heat resistance of spores Clostridium Sporogenes 25 was determined in phosphate buffer pH 7,0 and in extract of the canned product "Beans with pork".

On the basis of D- and Z-values the F-effect was calculated, which could be used for scientific motivation of existing sterilization regime.

УДК 664.8.036:536.6

А.Г. Канн, Т.Л. Лиеберт,
А.А. Сууртхаль, К.А. Каск

ИЗМЕНЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ В КОНСЕРВНОЙ БАНКЕ ВО ВРЕМЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Одним из обязательных этапов разработки новых и проверки действующих режимов стерилизации является определение фактической летальности режима стерилизации [1].

Для определения фактической летальности существует несколько методов [2,3]. В отраслевой лаборатории пищевых продуктов ТПИ применяется классический метод, в расчетах которого принимается во внимание изменение температуры продукта в наименее прогреваемой точке консервной банки. Эта точка называется термическим центром консерва. Местоположение этой точки зависит от материала и величины консервной банки, от однородности и природы продукта. Для продуктов, прогреваемых в основном за счет теплопроводности термический центр располагается по оси тары в геометрическом центре продукта [4], который определяется по формуле (отсчет от крышки банки) [1]:

$$\frac{H_{\delta} + h_{\text{сб.нр.}}}{2},$$

где H_{δ} - высота банки (мм);
 $h_{\text{сб.нр.}}$ - высота незаполненного пространства в банке (мм).

Для характеристики скорости распространения тепла в автоклаве и в консервах необходимо провести непосредственные замеры температуры в автоклаве и в консервной банке.

Материалы и методы

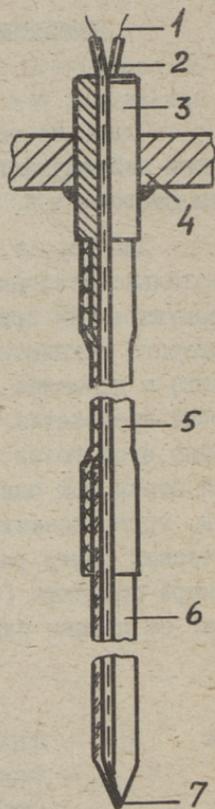
Для стерилизации консервов применяли вертикальный автоклав АВ-1 с электрическим обогревом, который перестроили и переоборудовали. Изменение температуры изучалось в консерве "Фасоль со свиной", Подсчет фактической летальности проводился по методике, одобренной на Всесоюзной научно-технической конференции в Одессе в 1975 г. [1].

Для проведения стерилизации в водной среде водяную-паровую рубашку автоклава разрезали. Этим самым получили возможность охлаждения консервов

водопроводной водой с давлением ≈ 3 атм. Мощность обогрева автоклава увеличили до 7,8 кВт. При этом обогрев автоклава можно осуществить при мощности 3,9 кВт или 7,8 кВт.

В качестве датчиков температуры использовали хромель-копелевые термопары с диаметром термоэлектродов 0,5 мм.

Конструктивная схема хромель-копелевой термопары и ее ввода в автоклав приведена на фиг. 1. Термоэлектроды (1) термопары изолируются друг от друга полихлорвиниловыми трубками (2), которые на расстоянии 15 см от горячего спая (7) помещаются в стеклянную трубку (6) с наружным диаметром 5 мм и внутренним 3 мм. Конец стеклянной трубки помещен в трубку из силиконового каучука (5), который является очень термоустойчивым материалом и изолирует термоэлектроды от греющей среды автоклава. С другого конца трубка из силиконового каучука надевается на штуцер (3), который при монтаже вводится в отверстие, просверлен-



Фиг. 1. Конструктивная схема термопары и ее ввода в автоклав.

- 1 - термоэлектроды термопары,
- 2 - трубка полихлорвиниловая,
- 3 - штуцер,
- 4 - крышка автоклава
- 5 - трубка из силиконового каучука,
- 6 - трубка стеклянная,
- 7 - горячий спай термопары.

ное в крышке автоклава (4) и приваривается стационарно к крышке. Термоэлектроды термомпар в полихлорвиниловой изоляции пропускаются через штуцер, затем защитные трубки из силиконового каучука натягиваются на штуцер.

Так как при исследовании режима стерилизации необходимо одновременно измерять температуры в трех консервных банках и в греющей среде, к крышке автоклава приваривается 4 штуцера для четырех термомпар. Для ввода термомпары в тару с исследуемым продуктом применяли конструктивную схему, предложенную ВНИИКОП-ом [5] с некоторыми дополнениями. В центре крышки тары высверливается круглое отверстие диаметром 5,0 мм, которое расширяется до 7 мм и нарезает винтовую резьбу М 8. В это отверстие ввинчивается штуцер М 8 с сальниковым устройством. Место стыка штуцера с крышкой тары и со стеклянной трубкой термомпары герметизируется прокладкой из резины.

Термомпары подключаются к электронному самопишущему потенциометру КСП-4 (модификация 4I.440.50.044, диапазон измерения 0-10 мВ), который фиксирует их показания на диаграммной бумаге в течение всего цикла стерилизации. При измерении температуры в консервной банке горячий спай термомпары помещается в термический центр консерва, холодный спай в сосуд Дьюара при 0°C.

Результаты и обсуждение

Экспериментальные данные, полученные при измерении температуры в автоклаве и в термическом центре консервов "Фасоль со свинойной" в банке СКО 83-I во время стерилизации по формуле $\frac{25 - 60 - 40}{120}$, приведены в таблице I.

Фактическую летальность процесса вычисляют суммированием летального действия нагревания при различных температурах выше 95 °, имеющих место во время старилизации, после пересчета этих величин на эквивалентные значения действия стандартной температуры.

Расчет проводят по уравнению [6]:

Т а б л и ц а I

Расчет фактической летальности процесса
стерилизации консервов "Фасоль со свиной"

| Продолжитель- ность стерили- зации, мин | Температура, °C | | Коэффициент летальности (на основании $Z = 12$) |
|---|-----------------|----------------------------------|---|
| | в автоклаве | в термическом центре консерва | |
| I | 2 | 3 | 4 |
| 0 | 70 | 60 | - |
| 5 | 81 | 63 | - |
| 10 | 97 | 65 | - |
| 15 | 104 | 68 | - |
| 20 | 109 | 71 | - |
| 25 | 120 | 73 | - |
| 30 | 120 | 78 | - |
| 35 | 120 | 83 | - |
| 40 | 120 | 91 | - |
| 45 | 120 | 97 | 0,009817 |
| 50 | 120 | 101 | 0,0213 |
| 55 | 120 | 105 | 0,0457 |
| 60 | 120 | 108 | 0,0812 |
| 65 | 120 | 111 | 0,1445 |
| 70 | 120 | 113 | 0,2138 |
| 75 | 120 | 114 | 0,2570 |
| 80 | 120 | 116 | 0,3802 |
| 85 | 120 | 117 | 0,4571 |
| 90 | 88 | 117 | 0,4571 |
| 95 | 44 | 112 | 0,1778 |
| 100 | 29 | 104 | 0,0380 |
| 105 | 21 | 97 | 0,009817 |
| 110 | 20 | 89 | - |
| 115 | 19 | 82 | - |
| 120 | 15 | 75 | - |
| 125 | 12 | 68 | - |

2,293

$$L_{T^{\circ}C}^{z^{\circ}C} = l_{t_1^{\circ}}^{z^{\circ}C} \cdot \tau_{t_1^{\circ}} + l_{t_2^{\circ}}^{z^{\circ}C} \cdot \tau_{t_2^{\circ}} + \dots + l_{t_n^{\circ}}^{z^{\circ}C} \cdot \tau_{t_n^{\circ}}$$

где $l_{t_1^{\circ}}, l_{t_2^{\circ}} \dots l_{t_n^{\circ}}$ — коэффициент пересчета летального действия температуры $t_1^{\circ}, t_2^{\circ} \dots t_n^{\circ}$;

$\tau_{t_1^{\circ}}, \tau_{t_2^{\circ}} \dots \tau_{t_n^{\circ}}$ — продолжительность действия температур $t_1^{\circ}, t_2^{\circ} \dots t_n^{\circ}$.

Коэффициенты летальности для значения $Z = 12^{\circ}C$ приведены в справочных таблицах [7].

На основе приведенных в таблице I данных для консерва "Фасоль со свиной" $L_{121,1^{\circ}C}^{12^{\circ}C} = 11,5$.

Л и т е р а т у р а

1. Решение Всесоюзной научно-технической конференции по вопросам теории и практики стерилизации и пастеризации пищевых продуктов. 10-12 сентября 1975 г., Одесса, 1975.

2. Ball, C.O., Olson, F.C.W. Sterilization in Food Technology. New-York, Toronto, London, 1957, p.292-303.

3. Stumbo, C.R., Longley, R.E. New Parameters for Process Calculation. Food Technology 1966, 20, 3, p. 109-113.

4. Рогачев В.И., Бабарин В.П., Милованова Г.П., Ганцов В.Н. Определение термического центра в консервах. Труды ВНИИКОП, вып. XX "Новое в технике и технологии консервного производства". М., 1974, с. 74-78.

5. Информационный листок № 5 - 74. Мин. пищ.пром. СССР ЦНИИТЭИпищепром, М., 1974.

6. Современное состояние и перспективы развития техники стерилизации консервов. ЦНИИТЭИпищепром, М., 1975.

7. Рогачев В.И., Мазохина Н.Н., Богданова Н.В., Устинова М.С. Термоустойчивость микроорганизмов и разработка режимов стерилизации консервов ЦИНТИпищепром М., 1968, с. 94.

A. Kann, T. Liebert,
A. Suurthal, K. Kask

The Change of Temperature in Cans during
Sterilization Process

Summary

Temperature measurement in cans during sterilization process is described. Measurements were made with coppel - cromell thermocouple. The calculation of the lethality of the process is described and illustrated.

УДК 639.38

Ю.М.Канн, М.В.Ээсмаа, А.Г.Канн,
К.Э.Сильвет, В.В.Вээланг, Х.К.Кальда

О ВОЗМОЖНОСТЯХ ПРИМЕНЕНИЯ ПАСТЫ "ОКЕАН"

Наш пищевой рацион неуравновешен: калорийность пищи на 15 % выше нормы, но в то же время имеется недостаток белков, витаминов и минеральных веществ. В разных областях пищевой промышленности ведутся работы по обогащению продуктов питания белками, минеральными веществами и витаминами, а также внедряются новые виды сырья, имеющие высокую пищевую ценность.

Полноценным источником белка для питания человека является криль – мелкая креветка, вылов которого в последние годы заметно увеличился. Разработаны новые способы его использования и переработки для получения пищевых продуктов [1, 2]. У нас криль в основном поступает в продажу в виде белковой пасты "Океан". Паста обладает приятным сладковатым вкусом и ароматом. По литературным данным химический состав её следующий (в %): влаги 65–75, жира 3–10, азотистых веществ 15–20, углеводов 2 и золы 1,5–3,0 %.

В состав минеральных веществ пасты входят многие ценные макро- и микроэлементы. По аминокислотному составу паста из криля не уступает таким продуктам как мясо трески и цыплят [2].

Несмотря на полноценный состав и хорошие кулинарные качества, пасту "Океан" в нашей республике используют в небольших количествах.

Целью настоящей работы была разработка новых способов использования пасты "Океан" в кулинарии и в консервной промышленности.

Материалы и методы

В настоящей работе использованы разные партии пасты "Океан", приготовленные в основном в 1975 г. Срок хранения пасты 12 месяцев при температуре -18°C .

Для проведения химических анализов применяли общеизвестные методы. В сырье определяли содержание влаги, азотистых веществ, жира, углеводов, зола [3, 4]. В консервах определяли кислотность [5], содержание NaCl , сухое вещество, число омыления и эфирное число [3].

При проведении микробиологических анализов определяли общее число микроорганизмов и титр коли [6].

Для готовых продуктов, как кулинарных, так и промышленных проводили дегустацию в системе 25 баллов. Изделиям, получившим от дегустаторов оценку 23-25 баллов, дали оценку "отлично", 20-23 балла - "хорошо", 18-20 баллов - "удовлетворительно" и меньше 18 баллов - "неудовлетворительно".

Результаты и обсуждение

Определяли химический состав всех партий пасты "Океан", применяемых в данной работе. Результаты этих анализов приведены в таблице I.

Как видно из данных таблицы I, разные партии пасты "Океан" несколько отличаются друг от друга по своему химическому составу. Самой большой разницей в результатах проведенных анализов по сравнению с данными, приведенными в литературе, является более высокое содержание жира [7].

Для расширения возможностей применения пасты "Океан" разработали 31 рецепт для ее использования в кулинарии. Из них 12 рецептов являются новыми, 19 названий являются дополненными и измененными вариантами существующих раньше рецептов. Блюда, приготовленные по названным рецептам, получили на дегустациях оценки "отлично" или "хорошо" и их

можно предложить для использования на предприятиях общественного питания и в домашних условиях. Среди разработанных рецептов имеются рецепты салатов, паштетов, первых и вторых обеденных блюд, бутербродов, пирожков и т.д.

Т а б л и ц а I

Химический состав пасты "Океан"

| Показатели | Содержание, % | |
|--------------------|-------------------|-------------------|
| | на сырое вещество | на сухое вещество |
| Влага | 65,3-67,4 | - |
| Азотистые вещества | 11,0-13,2 | 32,0-37,0 |
| Жир | 12,0-14,3 | 35,0-40,0 |
| Зола | 1,8-2,0 | 5,3-6,0 |
| Углеводы | 5,2-7,6 | 15,0-20,0 |
| pH | 7,6-7,7 | - |

Для примера приводим два рецепта, которые получили максимальную оценку на дегустациях.

Суфле рыбной пасты

| | |
|--------------------|----------|
| Треска или судак | 32 г |
| паста "Океан" | 64 г |
| сливки | 55 г |
| мука | 5 г |
| подсолнечное масло | 5 г |
| яичный белок | 2 белка |
| соль | по вкусу |

Вареную рыбу очищают, добавляют измельченную крилевую пасту, сливки, муку, сбитые яичные белки. Выпекают в печи при температуре $\approx 200^{\circ}\text{C}$ в течение 5-7 минут и подают на стол в горячем виде.

Горячие бутерброды

| | |
|----------------|-------|
| Сыр | 60 г |
| паста "Океан" | 30 г |
| сметана | 70 г |
| хлеб пшеничный | 300 г |

К измельченной в мясорубке пасте "Океан" добавляют натертый сыр и сметану и перемешивают. Смесь покрывают бутерброды, выпекают в течение 3-4 минут при температуре $\approx 200^{\circ}\text{C}$ и подают на стол в горячем виде.

В ходе работы проводили микробиологические анализы пасты "Океан" и кулинарных изделий, выработанных на базе пасты. Во всех случаях общее число микроорганизмов и число *Bact. coli* оказалось низкими по сравнению с нормами, предъявленными рыбным кулинарным изделиям, и не увеличилось заметно при хранении блюд в течение предполагаемого срока реализации.

Разрабатывали рецептуру и технологию для приготовления некоторых консервов на базе пасты "Океан". Для тепловой обработки консервов применяли режим стерилизации консервов "Завтрак рыбака" по формуле $\frac{15 - 40 - 20}{120}$.

Четыре консерва, приготовленные по новым рецептурам, получили высокую оценку на дегустации в Управлении рыбного хозяйства ЭССР, в которой принимали участие дегустаторы из нашей республики и из всесоюзных организаций. После проверки режима стерилизации можно провести промышленные испытания новых консервов. Один из рецептов новых консервов приводится ниже.

Детский консерв с морковью

| | |
|---------------------------|----------|
| Паста "Океан" | 140 г |
| морковь (тушеная в масле) | 100 г |
| масло | 20 г |
| соль | по вкусу |
| сахар | по вкусу |
| вода | 30 г |

В течение 4 минут крилевою пасту нагревают при 100°C , добавляют морковь, тушеную в масле и измельчают в мясорубке. Добавляют воду, пряности, гомогенизируют и расфасовывают в консервные банки.

Результаты химических анализов разработанных консервов приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Химические анализы консервов после стерилизации

| Наименование консерва | Кислотность, % | % | Сухое вещество, % | pH | Число омыления | Эфирное число | Кислотное число |
|----------------------------|----------------|-----|-------------------|-----|----------------|---------------|-----------------|
| Детский консерв с морковью | 0,6 | 1,2 | 21,5 | 7,2 | 92,0 | 31,0 | 61,0 |
| Детский консерв с рыбой | 0,6 | 1,2 | 23,5 | 7,3 | 98,0 | 38,0 | 60,0 |
| Слоеный консерв с рыбой | 0,8 | 1,3 | 23,5 | 7,1 | 108,3 | 40,3 | 68,0 |
| Консерв с копченой рыбой | 0,6 | 1,2 | 26,0 | 7,2 | 63,0 | 21,0 | 42,0 |

На основе проведенной работы можно подтвердить целесообразность применения пасты "Океан" в кулинарии и в консервной промышленности. Блюда и консервы, приготовленные по разработанной рецептуре, являются приятными и полноценными по пищевой ценности дополнениями к нашему меню.

Л и т е р а т у р а

1. Крвчкова М.И., Дагунов Л.Л. Криль - источник белкового питания. - "Рыбное хозяйство", 1969, № 5, с. 58-59.

2. Крвчкова М.И. Получение пищевого белка из криля. - "Рыбное хозяйство", 1970, № II, с. 53-56.

3. Бородин З.В., Гримм А.И., Данилов М.М. и др. Исследование продовольственных товаров. "Экономика", М., 1970.

4. Бурштейн А.И. Методы исследования пищевых продуктов. Медиздат, УССР, Киев, 1963.

5. Šarigo, M., Trainina, G. Laboratoorne kontroll ühiskondliku toitlustamise ettevõtetes. Tallinn, 1966.

6. Инструкция о порядке санитарно-технического контроля консервов на производственных предприятиях, оптовых

базах, розничной торговле и на предприятиях общественного питания, Минист. здравоохранения СССР, М., "Пищ. промышленность", 1974.

7. Лещенко П.Д., Генсичкий И.П., Новдрачев С.И. Гигиеническая оценка нового продукта моря - пасты из криля. "Вопросы питания", 1974, № 6, с. 38-40.

J. Kann, M. Eesmaa, A. Kann,
K. Silvet, V. Veelang, H. Kalda

Some Ways of Using Shrimp Pasta "Ocean" in
the Culinary Art and in Industry

Summary

Some chemical and microbiological analyses have been made about the "Ocean" pasta. A number of recipes of dishes and tinned foods for using it in the culinary art and in canned product industry have also been worked out. Chemical and microbiological analyses about the already worked out dishes and tinned foods have also been carried out.

УДК 664.0:543.81.543.54

Ю.М. Кани, О.В. Таутс, У.О. Лойгом

ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРА НА СОДЕРЖАНИЕ N-НИТРОЗАМИНОВ

При производстве некоторых сортов сыров прибавляется в молоко определенное количество нитратов. Возможное восстановление нитратов до нитритов в ходе созревания сыра делает реальным синтез N-нитрозаминов из нитритов и вторичных аминов.

Целью данной работы было определить остаточное содержание летучих с водяным паром N-нитрозаминов в сыре.

Материалы и методы

Объектом исследования был костромской сыр, полученный из Всесоюзного научно-исследовательского института маслодельной и сыродельной промышленности.

При выделении N-нитрозаминов из проб сыра пользовались дистилляцией с водяным паром. Дальнейшая очистка проводилась последовательной дистилляцией из кислой и щелочной среды. Затем дистиллят экстрагировали диэтиловым эфиром. Подробное описание методики приведено в статье [1].

Полученный экстракт концентрировали до объема 0,2 мл и компоненты разделяли газохроматографом Хром-31. Условия разделения были следующие:

стальная колонка 3,6 м, ϕ 6 мм,
носитель Chromaton N-AW - HDMS 0,16-0,2 мм,
жидкая фаза 5 % PEG 4000
газ-носитель H_2 60 мл/мин
начальная температура колонки 110 °C 12 мин, программа 12 °C мин до 140 °C.

При количественном определении N-нитрозамины детектировали микрокулонометром КДС-2. Общий выход был: диметилнитрозамина $63\% \pm 9$, диэтилнитрозамина $67\% \pm 11$, дипропилнитрозамина $65\% \pm 13$. Хроматограмма экстракта сыра с модельными веществами приведена на фигуре I А.

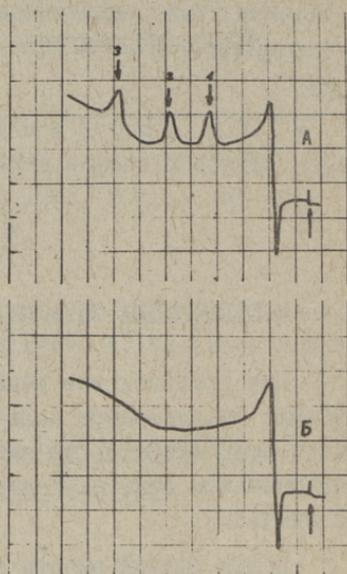
Результаты и обсуждение

Анализировали II проб костромского сыра, изготовленные в вышеуказанном институте в июне 1974 года. При изготовлении сыра на 100 л исходного молока прибавляли от 0 до 30 г нитрата натрия. Выделение и разделение N-нитрозаминов описано выше. Хроматограмма экстракта исследуемого сыра приведена на фигуре IБ.

При чувствительности 10 мкг/кг в пробах сыра не было обнаружено N-нитрозаминов. Результаты свидетельствуют о том, что в исследуемом сыре не происходит синтеза N-нитрозаминов в количестве, которое можно обнаружить при данной чувствительности метода.

Л и т е р а т у р а

И. Канн Ю.М., Таутс О.В. Методика определения N-нитрозаминов в пищевых продуктах. - "Канцерогенные нитрозо-соединения - действие, синтез, определение". Материалы 2-го симпозиума. Таллин, 1975, с. 60-63.



Фиг. 1.
 А. Хроматограмма экстракта сыра с модельными веществами
 1. диметилнитрозамин,
 2. диэтилнитрозамин,
 3. дипропилнитрозамин.
 Б. Хроматограмма экстракта исследуемого сыра.

Formation of N-nitroso Compounds in Cheese

Summary

The content of volatile nitrosamines in Kostroma cheese has been determined. It was found that the milk used for cheese-making contained 0 to 30 milligrams sodium nitrate per 100 l milk. However at the sensitivity of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ the presence of N-nitrosamines was not established.

УДК 661.982.094.3

Ю.М. Канн, Р.Э. Калве, А.Х. Касс

ОКИСЛЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА ПЕРМАНГАНАТОМ КАЛИЯ

Загрязнение воздуха выбросами отходящих газов промышленных предприятий, в том числе оксидами азота, наносит вред близлежащим районам, растительному и животному миру, вызывает различные заболевания у людей.

Кроме того, оксиды азота являются одним из исходных компонентов при синтезе канцерогенных N-нитрозаминов. Этот синтез может быть причиной повышенного содержания N-нитрозаминов в пищевых продуктах, которые имеют контакт с оксидами азота (например, при копчении, так как в копильном дыме содержатся оксиды азота).

В связи с этим проводятся исследования по определению оксидов азота в различных средах.

Для определения оксидов азота разработаны различные методы анализа. Наиболее распространенными для определения небольших количеств вещества являются оптические методы определения оксидов азота в виде ионов NO_2^- . Однако для определения оксида азота его надо предварительно окислять до двуокиси. Окисление можно провести в газовой фазе кислородом [1], фотохимически в присутствии диенов [2] или в жидкой фазе, пропуская оксид азота через раствор перманганата калия и серной [3] или фосфорной кислоты [4].

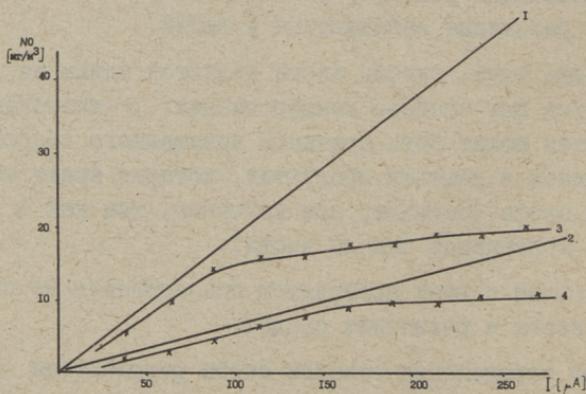
Оксид азота также можно окислять в трубке, заполненной силикагелем или стекловолокном, обработанным вышеуказанными веществами [5], или пропуская через диатомит, пропитанный бихроматом калия [6].

В работе Бука и Стратмана [4] была достигнута степень окисления 99 % при концентрации оксида азота в газовой смеси 0,04–3,5 мг/м³.

Целью настоящей работы было выяснить возможность применения перманганатного метода окисления при концентрациях окиси азота до 30 мг/м^3 (предполагаемая концентрация окиси азота в коптильном дыме).

Материалы и методы

Для получения эталонных газовых смесей использовали способ электрохимического дозирования. По данным литературы [7] электрохимическая система $\text{Pt}/\text{NOHSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4/\text{Pt}$ при поляризации может количественно выделять окись азота пропорционально току, согласно закону Фарадея.



Фиг. 1. Зависимость концентрации окиси азота от тока в электролизере.

- Расчетная : 1. При скорости газа-носителя 100 мл/мин.
2. При скорости газа-носителя 240 мл/мин.
Экспериментальная : 3. При скорости газа-носителя 100 мл/мин.
4. При скорости газа-носителя 240 мл/мин.

Для этой цели сконструировали стеклянный электролизер с впаянными платиновыми электродами. Электролит приготовляли путем растворения синтезированного нитрозилгидросульфата (NOHSO_4) в концентрированной серной кислоте. Все химические реактивы имели марку х.ч.

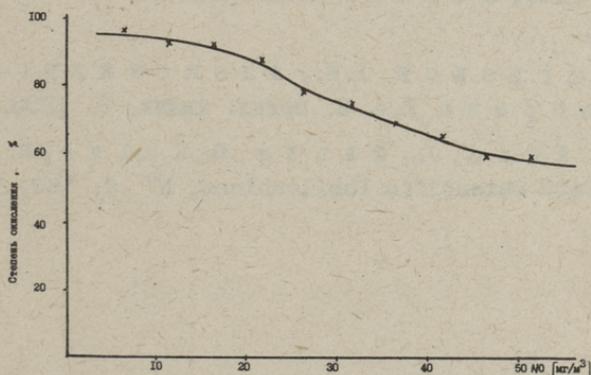
Количественный анализ двуокиси азота (после окисления перманганатом калия) проводился по описанной нами ранее методике [8].

Окислитель готовили следующим образом: к 60 мл фосфорной кислоты ($d_4^{20} = 1,71 \text{ г/см}^3$) добавляли 10 мл концентрированной серной кислоты, довели дистиллированной водой до 100 мл и в полученной смеси растворяли 0,5 г перманганата калия. Количество окислителя в абсорбере было 20 мл. Длительность одного цикла анализа 10 минут. Расход газа-носителя (азот) 100 мл/мин и 240 мл/мин. Газ-носитель предварительно сушили фосфорным ангидридом.

Результаты и обсуждение

При скорости газа-носителя 100 мл/мин, изменением силы тока электролизера от 50 до 260 μA получали расчетные количество окиси азота от 11 до 50 мг/м^3 . При скорости 240 мл/мин расчетное количество окиси азота было от 2,5 до 20 мг/м^3 .

Из фиг. 1 явствует, что при малых концентрациях окиси азота (2,5–12,5 мг/м^3) разница между расчетным и экспериментально определенным количеством окиси азота небольшая. При высоких концентрациях разница довольно большая и возрастает с повышением расчетной концентрации. Кроме того, при скорости 100 мл/мин разница больше, чем при скорости 240 мл/мин. Причиной этому может быть абсорбция двуокиси азота



Фиг. 12. Зависимость степени окисления от расчетного количества окиси азота при скорости газа-носителя 240 мл/мин.

окислителем, так как время контакта продолжительнее. Дополнительные опыты показали, что оптимальная скорость газа-носителя составляет 220-260 мл/мин. На фиг. 2 изображена зависимость степени окисления от расчетного количества окиси азота при скорости газа-носителя 240 мл/мин.

При расчетных концентрациях окиси азота до $25,0 \text{ мг/м}^3$ степень окисления превышает 80 %, затем постепенно уменьшается и при концентрации NO 50 мг/м^3 составляет около 60 %. Следовательно, перманганатный способ окисления целесообразно применять при концентрации окиси азота до 25 мг/м^3 .

Л и т е р а т у р а

1. Fine, D.M. Env. Sci. and Techn., 6, 348, 1972.
2. Навалихина М.Д., Дзисяк А.М., Лисовский Н.В. Аналит.химия, I, 134, 1972.
3. Köhler, R. Mitt. Inst. Energet., 88, 502, 1966.
4. Buck, M., Stratmann, H. Staub-Reinhalt. Luft, 27, 265, 1967.
5. Ellis, C.F. Air and Water Pollution. 8, 297, 1967.
6. Дмитриев М.Т., Смолева Т.В., Сербина Л.Н., Фомина С.А. Гигиена и санитария, 9, 60, 1971.
7. Агранов Х.И., Александров В.В., Белозерова Л.А. Ж. прикл. химии, 6, 1238, 1973.
8. Kann, J., Tautz, O., Kalve, R., Paalme, T. IARC Scientific Publications, N° 9, 180, 1974.

J. Kann, R. Kalve, A. Kass

Oxidation of Nitric Oxide by Potassium
Permanganate

Summary

The possibility of using potassium permanganate as oxidizing agent at concentrations of NO up to 30 mg/m^3 (assumed concentration of NO in technological smoke) has been investigated.

For obtaining standard gas-mixtures the glass electrolyzer was designed.

At the concentrations of NO from 2,5 to 25 mg/m^3 the oxidation rate was 80-95 %.

УДК 542.958.2

К.К. Рая, Ю.М. Каян

КАТАЛИЗ НИТРОЗИРОВАНИЯ ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

После обнаружения канцерогенного действия диметилнитрозамина Магесом и Барнесом [1] установлено канцерогенное действие еще многих нитрозаминов [2]. Нитрозамины могут образоваться в пищевых продуктах [3] или в желудке [4,5] при реакции вторичных аминов с нитритами. Скорость нитрозирования обычно низкая, но реакция катализируется такими ионами как иодид, бромид, тиоцианид [6,7] и также формальдегидом [8] и т.д. До сих пор полагали, что N-нитрозосоединений синтезируется в опасном количестве только в кислых средах, но формальдегид катализирует синтез и при щелочных значениях pH [8]. Формальдегид широко распространен в окружающей нас среде. Его используют как гербицид и фунгицид для растений и овощей. Формальдегид образуется при неполном сгорании органических соединений и особенно много содержит формальдегида дым, используемый для копчения. Формальдегид содержится и в морской рыбе и его содержание увеличивается при хранении рыбы за счет распада оксида триметиламина. Формальдегид образуется при этом в эквивалентном количестве с диметиламином [9,10,11].

Материалы и методы

Химические реактивы: нитрит натрия, морфоллин, хлорная кислота, метилен хлористый имели чистоты ЧДА, формалин передистиллировали.

Для стабилизации pH использовались буферным раствором (цитрат-фосфат буфер, pH = 6,1).

Т а б л и ц а I

Синтез нитрозоморфолина

| Т °С | Ф:М: NaNO ₂ * | Время синтеза | | | | | | | |
|------|-----------------------------|-----------------------------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| | | I час | | 2 часа | | 4 часа | | 6 часов | |
| | | содержание нитрозоморфолина | | | | | | | |
| | | МГ МЛ | % макс. | МГ МЛ | % макс. | МГ МЛ | % макс. | МГ МЛ | % макс. |
| 25 | 0:I:IO | 7 | 2,4 | 20 | 6,9 | 23 | 7,9 | 28 | 9,7 |
| | I:I:IO | 9 | 3,1 | 20 | 6,9 | 25 | 8,6 | 33 | 11,4 |
| 37 | 0:I:IO | 6 | 2,1 | 12 | 4,1 | 20 | 6,9 | 29 | 10 |
| | I:I:IO | 9 | 3,1 | 14 | 4,8 | 28 | 9,6 | 29 | 10 |
| | 2:I:IO | 10 | 3,4 | 28 | 9,6 | 38 | 13,1 | 51 | 17,6 |
| | 5:I:IO | 10 | 3,4 | 25 | 8,6 | 34 | 11,7 | 48 | 16,6 |
| | 10:I:IO | 21 | 7,2 | 31 | 10,7 | 46 | 15,9 | 69 | 23,8 |
| | 0:I:IO | 3 | 1,0 | 36 | 12,4 | 56 | 19,3 | 72 | 24,8 |
| 45 | I:I:IO | 24 | 8,3 | 32 | 11,0 | 65 | 22,4 | 91 | 31,4 |
| | 2:I:IO | 31 | 10,7 | 47 | 16,2 | 90 | 31,0 | 111 | 38,3 |
| | 5:I:IO | 31 | 10,7 | 51 | 17,6 | 92 | 31,7 | 127 | 43,8 |
| | 10:I:IO | 31 | 10,7 | 49 | 16,9 | 81 | 27,9 | 90 | 31,0 |

* Относительная концентрация формальдегида (Ф), морфолина (М) и NaNO₂.

Синтез нитрозоморфолина провели в круглодонной колбе емкостью 500 мл, помещенной в водяной термостат. Перед началом синтеза измеряли рН среды.

Через определенное время (1 час, 2 часа, 4 часа и 6 часов) из исследуемой среды отбирали пробу. Из пробы в количестве 5 мл нитрозоморфолин (НМ) экстрагировали метиленхлоридом (4x2 мл). Метиленхлоридную фазу высушивали безводным Na₂SO₄ и объем доводили до 10 мл.

Этот раствор использовали для колориметрического определения НМ по методу Айсенбранда и Преуссмана [12]. Для вычисления содержания НМ использовали калибровочную кривую, построенную по модельным веществам.

Результаты и обсуждение

Исследование синтеза НМ проводили при температуре 25, 37 и 45 °С и при рН = 6,1. Молярное соотношение морфолина и нитрата натрия выбирали 1:10 (за единицу принимается концентрация 5 моль/л), при такой концентрации синтез нитрозо-морфолина не зависит от концентрации нитрита натрия. Молярное соотношение морфолина и формальдегида варьировали от 1:0 до 1:10.

В таблице I приведены результаты опытов.

Из предварительных опытов явствует, что формальдегид имеет каталитическое действие при синтезе нитрозаминов. Эффект формальдегида при температуре 25 °С заметен только после длительного контакта реагирующих веществ. Повышение температуры увеличивает эффект действия формальдегида, что имеет особое значение при технологической переработке охлажденной рыбы. При температуре 45 °С эквивалентное количество формальдегида по сравнению с амином дает положительный эффект уже в начале синтеза.

Л и т е р а т у р а

1. M a g e e, P.N., B a r n e s, J.M. Carcinogenic nitroso compounds. - "Adv.Cancer. Res.", 1967, vol. 10, p. 163.
2. D r u c k e r y, H., P r e u s s m a n n, R., I v a n k o v i c, S., S c h m ä l, D. Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso- Verbindungen an BD-Ratten. - "Z.Krebsforsch.", 1967, vol. 69, p. 103.
3. L i j i n s k y, W., E p s t e i n, S.S. Nitrosamines as enviromental carcinogens. - "Nature", 1970, vol. 225, p. 21-23.
4. S e n, N.P., S m i t h, D.C., S c h w i n g h a m e r, L. Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. - "Fd.Cosmet. Toxicol.", 1969, vol. 7., p. 301.

5. Alan, B.S., Saporoschetz, J.B., Epstein, S.S. Formation of N-nitrosopiperidine from piperidine and Sodium nitrite in the Stomach and the isolated intestinal loop of the rat. "Nature", 1971, vol. 232, p. 116-118.
6. Fan, T.Y., Tannenbaum, S.R., Factors influencing the rate of formation of nitrosomorpholine from morpholine and nitrite: acceleration by thiocyanate and other anions. - "J.Agr. Food Chem.", 1973, vol. 21, Nr.2. p. 237-240.
7. Boyland, E., Nice, E., Williams, F. The catalysis of nitrosation by thiocyanate from salvia. - "Fd.Cosmet.Toxicol.", 1971, vol. 9, Nr. 5, p. 639-643.
8. Keefe, L.K., Roller, P.P. N-Nitrosation by nitrite ion in neutral and basic medium "Science", 1973, vol. 181, p. 1245-1247.
9. Castell, C.H., Neal, W., Smith, B. Formation of dimethylamine in stored frozen sea fish. - "J.Fish.Res. Bd.Can.", 1970, vol. 27., Nr.10, p. 1685-1690.
10. Castell, C.H., Neal, W.E., Dale, J. Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine, and extractable protein in iced and frozen gadoid fillets. - "J.Fish.Res.Bd.Can.", 1973, vol. 30, Nr. 8, p.1246-1248.
11. Castell, C.H., Smith, B., Dyer, W.J. Effects of formaldehyde on salt extractable proteins of gadoid muscle. "J.Fish.Res. Bd. Can.", 1973, vol. 30, Nr.8, 1205-1213.
12. Eisenbrand, G., Preussmann, R. Eine neue Methode zur kolorimetrische Bestimmung von Nitrosaminen nach spaltung der N-Nitrosogruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig. - "Arzneim. - Forsch.", 1970, Jg.20, S. 1513-1517.

Catalysis of Nitrosation with Formaldehyde

Summary

Carcinogenic nitrosamines are formed by chemical reaction between nitrite and secondary amines. This reaction is usually slow, but it is catalysed by anions. The experiments described here show that formaldehyde catalyses the formation of nitrosomorpholine at pH 6.1.

Я.А. Уйбу, А.Г. Канн

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА
N - НИТРОЗАМИНОВ

После исследований, проведенных в области микробиологического синтеза канцерогенных N-нитрозаминов (НА) в течение последних восьми лет, стало общепризнанным, что названные вещества могут образоваться не только химическим, но и микробиологическим путем. Имеются данные о возможном образовании НА микробами в организме [1,2,3], в пищевых продуктах [4,5], а также в окружающей среде [6].

В отечественной литературе нами не найдены работы по изучению условий микробиологического синтеза НА. Соответствующие исследования зарубежных авторов характеризуются варьированием методов культивирования продуцентов НА, качеством и количеством предшественников НА и т.д. Кроме того, почти всегда используются сложные искусственные среды, изготовленные различными фирмами. Существенным недостатком этих сред является отсутствие сведений в отношении подробного химического состава, так как они изготовлены с добавлением различных экстрактов, продуктов белкового распада и др. Отдельные компоненты этих сложных смесей могут иметь решающее значение при синтезе НА, например, как предшественники НА, катализаторы или ингибиторы N-нитрозирования. Для устранения этих вероятных влияний мы ставили целью своего исследования разработать методы культивирования микробов в синтетической среде, а также определения НА в этой среде.

Материалы и методы

При выборе подходящей синтетической среды предъявили ей следующие требования: полноценность питательных веществ для роста исследуемых микроорганизмов, стабильность составных частей при стерилизации в автоклаве, доступность ингре-

диентов. Таким условиям соответствовала среда Гильтая: дистиллированная вода - 1000 мл, глюкоза - 2 г, KNO_3 - 1 г, KH_2PO_4 - 1 г, K_2HPO_4 - 1 г, MgSO_4 - 2 г, CaCl_2 - 0,2 г, FeCl_3 - следы. Среду стерилизовали в автоклаве при 1 атм в течение 15 мин. Из 21 штамма различных видов плесневых грибов и бактерий, изолированных из почвы и зерна, выросли удовлетворительно в этой среде 19 штаммов. Почвенные бактерии были получены из кафедры биохимии и физиологии растений Тартуского государственного университета, остальные микроорганизмы из Всесоюзного научно-исследовательского института зерна.

Как известно, микроорганизмы синтезируют НА при наличии соответствующих предшественников: с одной стороны, нитратов или нитритов, а с другой - аминов, преимущественно вторичных. В среде Гильтая уже имеется 0,1 % KNO_3 . Это количество близкое к концентрациям, использованным другими авторами при изучении микробиологического синтеза НА [1,2]. Нитриты образуются в среде в ходе восстановления нитратов микробами. В изучении микробиологического синтеза НА нашли применение различные представители вторичных аминов, но прежде всего диметиламин [5, 8, 7]. Это вполне понятно, потому что это соединение является предшественником наиболее опасного и изученного канцерогенного НА - диметилнитроз-амина.

Ввиду того, что диметиламин при комнатной температуре находится в фазе пара, в опытах пользуются гидрохлористым диметиламином. Использованная нами 0,02 %-ная концентрация этого вещества, соответствует количеству, употребленному другими авторами [5,8]. Водный раствор гидрохлористого диметиламина автоклавировали отдельно и добавляли в среду Гильтая при инокуляции микроорганизмами. Источником углерода в среде Гильтая могут быть применены различные химические соединения. В данном случае применяли в этой функции глюкозу, так как имеются данные об ее положительной роли в микробиологическом синтезе НА [1, 9].

Пробы культивировали в 250 мл колбах в 100 мл среды при оптимальной исследуемым штаммам температуре 28 °С. Колбы закрывали марле-ватовыми пробками. Время культивирования в зависимости от цели опыта длилось от нескольких часов до нескольких недель.

Определение НА в культивированной среде осуществляли в основном по методике Канн и Таутс [10], но со следующими изменениями:

- при дистилляции водяным паром оказалось достаточным добавление к пробе дистиллированной воды в количестве 100 мл, а хлорида натрия 40 г. Дистиллята отбирали в количестве 100 мл;

- проведение вторичной дистилляции из кислой среды оказалось ненужным;

- для дистилляции из щелочной среды добавляли 12 г NaOH.

По данным проведенных опытов с диметилнитрозамином названные изменения в методике оправданы и целесообразны с целью ускорения анализа,

Результаты и обсуждение

Используя вышеизложенные методики культивирования микроорганизмов и определения НА среди изученных штаммов обнаружили четыре продуцента НА: почвенные бактерии *Achromobacter agile*, *Pseudomonas denitrificans* и два штамма *Pseudomonas herbicola*, изолированные из нормального зерна.

Для выяснения роли микробов в синтезе НА проводили опыты, изложенные в таблице I. По полученным данным НА в выбранных условиях не образуются при отсутствии микроорганизмов, а также при отсутствии диметиламина. Если в среде имеются все компоненты микробиологического синтеза (соответствующие предшественники и продуценты), то имеет место образование НА.

По имеющимся у нас данным отобранные нами продуценты НА - *Achromobacter agile*, *Pseudomonas denitrificans* и *Pseudomonas herbicola* - не являлись предметом изучения синтеза НА у других авторов.

Единственным источником азота в среде Гильтая является KNO_3 . Это обстоятельство необходимо подчеркнуть, потому что при использовании разных продуктов белкового рас-

пада среда обогащается соединениями азота в такой мере, что у микробов отсутствует прямая потребность восстановления нитратов. Однако, как раз нитратредуктазной активности придадут особое значение при микробиологическом синтезе НА [1,2]. В таких случаях, когда работают с более требовательными к питательным веществам микробами, добавление органических соединений азота является неизбежным.

Т а б л и ц а I

Образование нитрозаминов при наличии и отсутствии диметиламина или микроорганизмов в среде

| Микроорганизмы | Время культивирования в сутках | Наличие диметил-амина в среде | Продукция НА в мг/кг |
|--------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------|
| <i>Ps. herbicola</i> 8 | 3 | + | 0,08 |
| <i>Ps. herbicola</i> 8 | 6 | + | 0,73 |
| <i>Ps. herbicola</i> 8 | 37 | + | 1,28 |
| <i>Ps. denitrificans</i> | 4 | + | 0,46 |
| <i>Ps. denitrificans</i> | 18 | + | 5,00 |
| <i>Ps. denitrificans</i> | 16 | - | - |
| <i>Ps. herbicola</i> 8 | 15 | - | - |
| Без микроорганизмов | 10 | + | - |
| Без микроорганизмов | 33 | + | - |

По некоторым данным литературы образование НА зависит от времени культивирования [4,5,7]. Эта зависимость отмечена и нами - при удлинении времени культивирования образование НА штаммом *Ps. herbicola* 8 была соответственно 0,08, 0,73 и 1,23 мкг/кг (табл. I). Поэтому для наиболее надежного определения продуцентов НА целесообразно проводить культивирование микробов от нескольких дней до нескольких недель. Однако многие авторы проводят культивирование микробов только в течение 18-20 часов [1,2,8,9].

На основе проведенной работы можно считать применение синтетической среды Гильтая, а также описанной методики культивирования микробов и определения НА из культивированной среды, целесообразным для отбора продуцентов НА и изучения условий микробиологического синтеза НА.

Л и т е р а т у р а

1. S a n d e r, J. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1968, 349, 429-432.
2. H a w k s w o r t h, G.M., H i l l, M.J. Br. J.Cancer, 1971, 25, 520-526.
3. H a r i n g t o n, J.S., N u n n, J.R., I r w i g, L. Nature, 1973, 241, 49-50.
4. F o n g, Y.Y., C h a n, W.C. Nature, 1973, 243, 421-422.
5. T a t e, R.L., A l e x a n d e r, M. J.Agric.Food.Chem., 1975, 23, 896-897.
6. A y a n a b a, A., V e r s t r a e t e, W., A l e x a n d e r, M. J.Nat. Cancer Inst., 1973, 50, 811-813.
7. A y a n a b a, A., A l e x a n d e r, M. Appl. Microbiol., 1973, 25, 862-868.
8. C o l l i n s - T h o m p s o n, D.L., S e n, N.P., A r i s, B., S c h w i n g h a m e r, L., Can.J. Microbiol., 1972, 18, 1968-1971.
9. K l u b e s, P., J o n d o r f, W.R. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1971, 2, 24-33.
10. К а н н Ю.М., Т а у т с О.В. Канцерогенные N-нитрозо-соединения - действие, синтез, определение. Матер. 2-го симпозиума, Таллин, 1975, с. 60-63.

J. Uibu, A. Kann

A Study of the Conditions of the Microbiological
Synthesis of N-Nitrosamines

Summary

Methods for selecting microbial producers of cancerogenic N-nitrosamines and investigating conditions of microbiological synthesis of the mentioned above substances are recommended.

Hiltay medium with added dimethylamine hydrochloride was used. Soil bacteria *Achromobacter agile*, *Pseudomonas denitrificans* and two strains *Pseudomonas herbicola* isolated from normal cereal appeared as producers of N-nitrosamines.

С о д е р ж а н и е

| | | |
|-----|--|----|
| I. | К.Э.Папшель, Х.Я.Киппер, А.И.Кёстнер, А.К.Куликова, А.С. Тихомирова. Стабильность иммобилизованных препаратов лактазы..... | 3 |
| 2. | Х.Я.Кальюла, А.И.Кёстнер. Включение аминоклазы в полиакриламидный гель радиополимеризацией..... | 9 |
| 3. | В.А.Кросинг, Р.Э.Трейманн, А.И.Кёстнер. Иммобилизация инвертазы в армированном полиакриламидном геле..... | 15 |
| 4. | Х.Я.Киппер, А.Э. Эрин, Х.Я. Егоров, К.А.Кивисилла, А.И. Кёстнер. Получение активированных изоцианатами кремнеземных носителей для иммобилизации ферментов..... | 21 |
| 5. | М.Р. Семпер, А.И.Кёстнер. Об экономической эффективности применения иммобилизованных ферментов в технологических процессах..... | 29 |
| 6. | К.А. Каск, А.А. Сууртхаль, Ю.М. Канн, А.Х. Линнамяги, В.А. Мандел, А.-М.А. Мэльдеркиви. О содержании нитратов и нитритов в овощах.. | 35 |
| 7. | Т.Л. Лиеберт, А.Г. Канн, В.А. Мандел. Изучение термоустойчивости спор <i>Cl. sporogenes</i> 25 в консерве "Фасоль со свиной"..... | 43 |
| 8. | А.Г.Канн, Т.Л. Лиеберт, А.А. Сууртхаль, К.А. Каск. Изменение температуры в консервной банке во время стерилизации..... | 49 |
| 9. | Ю.М.Канн, М.В. Ээсмаа, А.Г.Канн, К.Э.Сильвет, В.В.Вазланг, Х.К. Кальда. О возможностях применения пасты "Океан"..... | 55 |
| 10. | Ю.М. Канн, О.В. Таутс, У.О. Лойгом. Исследование сыра на содержание N-нитрозаминов.... | 61 |
| II. | Ю.М. Канн, Р.Э. Калве, А.Х.Касс. Окисление окиси азота перманганатом калия..... | 65 |

| | | |
|-----|---|----|
| 12. | К.К. Рая, Ю.М. Канн. Катализ нитрозирования формальдегидом..... | 71 |
| 13. | Я.А. Уйбу, А.Г. Канн. Изучение условий мик- робиологического синтеза N-нитрозаминов... | 77 |

© ТПИ, Таллин, 1976

Таллинский политехнический институт. Труды ТПИ № 402.
СБОРНИК СТАТЕЙ ПО ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ.
(Технология пищевых производств У1). Редактор А. Канн.
Технический редактор В. Ранник. Сборник утвержден коллегией
Трудов ТПИ 26 мая 1976 г. Подписано к печати 4 окт. 1976 г.
Бумага 60x90/16. Печ.л. 5,25 + 0,5 приложение. Уч.-изд.л. 3,8.
Тираж 300. МВ-07330. Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коскла, 2/9, Зак. № 1084
Цена 38 коп.

Цена 38 коп.