

TALLINNA POLÜTEHNILISE  
INSTITUUDI TOIMETISED  
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО  
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 367

**СБОРНИК СТАТЕЙ ПО  
ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ  
ТЕХНОЛОГИИ  
XXXVI**

**(Технология пищевых производств IV)**



Ep. 6.1

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED  
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 367

1974

УДК 541.183

Сборник статей

по

**ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ  
ТЕХНОЛОГИИ XXXVI**

(Технология пищевых производств 1У)

Таллин 1974

19.2.93

ALUMINA POLYMERISE KESTITÖIDY TOIMETUS  
ТУМАН ТАЛЛИНСКОГО ПОЛЫМЕРНОГО КОМПЛЕКСА  
1974

УДК 621.372.6

Оформление

№

XXIININ N XXIIINPECHON  
TEHNOLOGIN XXXVI

(Технология полимерных соединений)



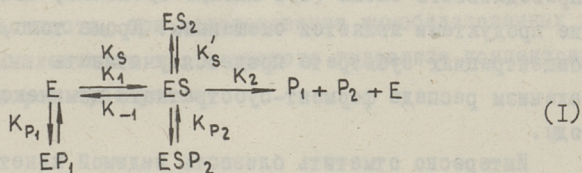
© ТПИ, Таллин, 1974

Э.Х.Сиймер, В.А.Кросинг, М.О.Мандель, А.И.Кёстнер

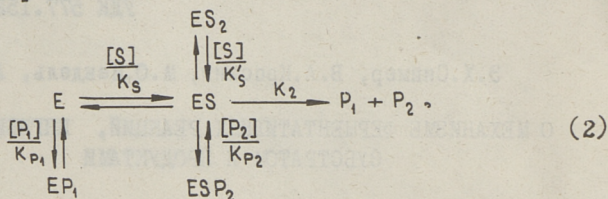
О МЕХАНИЗМЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ, ИНГИБИРУЕМЫХ  
 СУБСТРАТОМ И ПРОДУКТАМИ

В наших предыдущих сообщениях показано, что ферментативному гидролизу сахарозы и бензилпенициллина с иммобилизованными  $\beta$ -фруктофуранозидазой и пенициллинамидазой характерно ингибирование как субстратом, так и продуктами реакции [1-2]. С другой стороны, выяснилось, что в данном случае можно определять видимые константы ингибирования и Михаэлиса, применяя обычные методы линеаризации экспериментальных данных. Это значит, что несмотря на очевидное влияние диффузионных процессов на кинетику ферментативного гетерогенного катализа (вызывающих, в основном, увеличение видимой константы Михаэлиса [3]), можно по результатам экспериментов с иммобилизованными ферментами определять общий механизм ферментативных реакций, принципиально свойственный соответствующим реакциям с гомогенными ферментами.

Механизм вышеназванных реакций весьма правдоподобно описывается схемой (I), согласно которой ингибирование одним продуктом ( $P_1$ ) является полным конкурентным, вторым продуктом ( $P_2$ ) и субстратом (S) - полным неконкурентным. Через  $K_S = \frac{K_{-1}}{K_1} \cdot K'_S$ ,  $K_{P_1}$  и  $K_{P_2}$  обозначены константы диссоциации комплексов ES,  $ES_2$ ,  $EP_1$  и  $ESP_2$  соответственно.



Применяя диаграммный метод графов анализа ферментативных реакций [4-5], выбирая в качестве входа вершину E, схема (I) приобретает вид



из которой уравнение скорости легко выражается через величины дуг следующим образом (имея в виду микростационарность и условие  $K_2 \ll K_{-1}$ ):

$$v = \frac{K_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_S \left(1 + \frac{[P_1]}{K_{P_1}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[P_2]}{K_{P_2}} + \frac{[S]}{K'_S}\right)} \quad (3)$$

или, учитывая, что в рассматриваемых реакциях  $[P_1] \approx [P_2] \approx [S]_0 - [S]$ ,

$$v = \frac{K_2 \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_S \left(1 + \frac{[S]_0 - [S]}{K_{P_1}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[S]_0 - [S]}{K_{P_2}} + \frac{[S]}{K'_S}\right)} \quad (4)$$

В таблице I приведены средние значения констант равновесия (диссоциации) реакций ферментативного гидролиза бензилпенициллина и сахарозы с иммобилизованными в полиакриламидном геле ферментами. Ввиду условия  $K_2 \ll K_{-1}$  величины  $K_S$  приняты равными с определенными экспериментально  $K_{m(кж)}$ .

Нами показано, что уравнение (4) хорошо согласуется с экспериментальными данными определения скорости ферментативного гидролиза. Это, конечно, не подтверждает однозначно справедливость схемы (I). Вполне возможно, что ингибирование продуктами является смешанным. Кроме того, при высоких концентрациях субстрата придется учитывать бимолекулярный механизм распада фермент-субстратного комплекса с участием воды.

Интересно отметить близость видимой кинетики гидролиза, катализуемых двумя совсем различными ферментами. Вполне

Т а б л и ц а I

Средние значения констант равновесия (см. схему I) стадий ферментативного гидролиза бензилпенициллина и сахарозы с иммобилизованными ферментами [1, 2].

	Ф е р м е н т	
	Пенициллинамидаза	Инвертаза
Субстрат	Бензилпенициллин	Сахароза
Продукт $P_1$	Фенилуксусная кислота	Фруктоза
Продукт $P_2$	6-аминопеницилла- новая кислота	Глюкоза
Температура, °C	40	30
pH	7,5	4,8
$K_s, (M)$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-2}$
$K'_s, (M)$	1,0	1,0
$K_{P_1}, (M)$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,12
$K_{P_2}, (M)$	0,16	1,5

\* величина  $K_{P_2}$  для глюкозы найдена косвенным путем из экспериментальных данных

возможно, что явление ингибирования субстратом и продуктами распространено гораздо шире, чем это известно по существующим до сих пор исследованиям кинетики ферментативных реакций. Часто предпочитаемые методы, базирующие на определении начальных скоростей, принципиально не позволяют обнаруживать ингибирование продуктами. Это, в свою очередь, может вызывать значительные погрешности в определении самих начальных скоростей.

Всесторонний анализ глубокого превращения субстратов имеет особую важность при практическом использовании ферментов, в частности, при использовании иммобилизованных гидролаз в промышленности для глубокого гидролиза концентрированных растворов субстратов.

## В ы в о д ы

1. Приведена принципиальная схема ферментативных реакций, ингибируемых неконкурентно субстратом и одним продуктом и конкурентно вторым продуктом.
2. Представлены уравнения скорости гидролиза бензилпенициллина и сахарозы с иммобилизованными в полиакриламидном геле пенициллинамидазой и  $\beta$ -фруктофуранозидазой (инвертазой) соответственно.

## Л и т е р а т у р а

1. В.А. Кросинг, Ю.И. Ярвет, Э.Х. Сиймер, А.И. Кёстнер. См. наст. сб., с. 17.
2. М.О. Мандель, Э.Х. Сиймер, К.А. Кярема, А.И. Кёстнер. См. наст. сб., с. 9.
3. А.И. Кёстнер. "Тр. Таллинск. политехн.ин-та", № 331, с. 157-162.
4. М.В. Волькенштейн, Ю.Б. Магаршак. Биофизика, 15, 777 (1970).
5. М.В. Волькенштейн, Ю.Б. Магаршак. Биофизика, 15, 949 (1970).



E. Siimer, V. Krosing,  
M. Mandel, A. Köstner

On the Mechanism of Enzymatic Reaction Inhibited by  
Substrate and Products

Summary

A scheme for enzymatic reaction in the case of competitive inhibition by one product and uncompetitive inhibition by the other product and substrate is proposed. The solution of the graph led to a kinetic equation which has been proved to be valid in the case of polyacrylamide entrapped invertase and benzylpenicillin acylase. The values of all necessary equilibrium constants have been calculated from experiments. Probably the proposed equation is valid for numerous different enzymes and can be used for the calculation of immobilized enzyme reactor efficiency in the case of deep substrate conversion.



УДК 577.152.002.237 + 615.779.932

М.О.Мандель, Э.Х.Сиймер, К.А.Кярема, А.И.Кёстнер

ТОРМОЖЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА  
БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ  
ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ

Кинетика ферментативного деацилирования бензилпенициллина (БП) в условиях гетерогенного катализа является достаточно сложной, особенно при малых концентрациях субстрата, требуемых для определения кинетических параметров. Определяемые по принятым для растворимых ферментов методам кажущиеся константы могут отличаться от истинных из-за процессов массопередачи и связаны, таким образом, гидродинамическими условиями, свойствами носителя, константами диффузии внутри и вне зерен и т.д. [1, 2].

Нами было показано [3], что при полимеризации смеси акриламида,  $N,N'$ -метилен-бис-акриламида и бензилпенициллин-амидазы (БПА) можно получать нерастворимый активный иммобилизованный в полиакриламидном геле препарат (ИБПА). Известно, что ферментативный гидролиз БП ингибируется продуктами его распада - фенилуксусной кислотой (ФУК) и 6-аминопенициллановой кислотой (6-АПК), а также субстратом - БП. Однако имеющиеся в литературе данные о торможении иммобилизованной различными методами амидазы [4 - 6] отличаются противоречивостью, что побудило нас более детально исследовать этот процесс.

Материалы и методы

Иммобилизация БПА (ЕС 3.5.1.11, из *E. coli* ATCC 9637, получен от Рижского завода медпрепаратов) с различной степенью очистки, проводилась по описанной нами ранее методике [3]. Для изучения кинетических параметров проводили опыты

гидролиза БП при помощи ИБПА при температуре  $40^{\circ}\text{C}$  и  $\text{pH} = 7,5$ . Применяли рН-статированные периодические реакторы с перемешиванием объемами 10 - 500 мл. За скоростью основного процесса наблюдали по расходу  $\text{NaOH}$  и путем определения 6-АПК фотоколориметрическим методом [3]. Активность влажного препарата ИБПА выражалась в микромолях 6-АПК, которая определяется накапливающейся в течение часа в ходе гидролиза 17 мМ (0,63 %) раствора БП при температуре  $40^{\circ}\text{C}$  и  $\text{pH} = 7,5$  (единицах ФЕ).

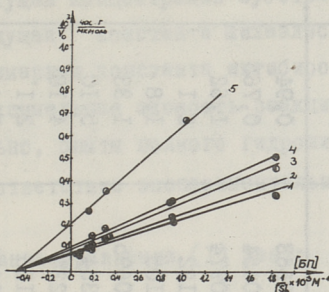
#### Результаты и обсуждение

Результаты опытов, проведенных с разными препаратами ИБПА с широким варьированием исходных условий, приведены в табл. I. Из этих данных следует, что наблюдаемая начальная скорость ( $v_0$ ) зависит линейно от количества фермента практически независимо от концентрации субстрата и степени наполнения реактора гелем до 40 %. Дополнительные опыты доказали слабое ингибирование реакции субстратом, соответственная величина  $K_i^{\text{БП}} = 0,98 \text{ M}$ .

Ингибирование реакции продуктами исследовалась добавлением в реакционную смесь ФУК ( $0 - 3 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ) и 6-АПК ( $0 - 0,28 \text{ M}$ ) при различных концентрациях субстрата ( $5 \cdot 10^{-4} - 2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ). Пересчитанные результаты этих опытов изображены в координатах  $\frac{1}{v_0}$ ,  $\frac{1}{S_0}$  (см. фиг. I и 2). Результаты опытов торможения процесса продуктами реакции показали, что ингибирование 6-АПК является неконкурентным (см. фиг. I) и соответствующая константа ингибирования равняется  $K_i^{6\text{-АПК}} = 0,15 \text{ M}$ , тогда как ингибирование ФУК является конкурентным (см. фиг. 2) и константа ингибирования равняется  $K_i^{\text{ФУК}} = 1,59 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ .

Хотя кинетическая схема гидролиза БП сложна [7], можно на основании вышеприведенного заключить, что характер торможения ИБПА определяется главным образом ФУК. В случае гидролиза БП без добавления ФУК процесс должен описываться уравнением (I):

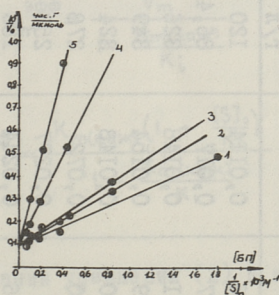
$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{v_m[S]}{K_m(\text{каж})\left(1 + \frac{[S]_0 - [S]}{K_i}\right) + [S]}, \quad (I)$$



Фиг.1. Ингибирование иммобилизованной пенициллинамидазы 6 - аминопенициллановой кислотой при температуре 40°C и pH = 7,5.

Условия опытов:

- 1- ●●● концентрация 6 - АПК = 0
- 2- ○○○ концентрация 6 - АПК =  $1,08 \cdot 10^{-2} M$ ;  $K_i = 0,153 M$ .
- 3- ○○○ концентрация 6 - АПК =  $5,4 \cdot 10^{-2} M$ ;  $K_i = 0,150 M$ .
- 4- ⊗⊗⊗ концентрация 6 - АПК =  $8,7 \cdot 10^{-2} M$ ;  $K_i = 0,153 M$ .
- 5- ⊗⊗⊗ концентрация 6 - АПК =  $2,8 \cdot 10^{-1} M$ ;  $K_i = 0,147 M$ .



Фиг.2. Ингибирование иммобилизованной пенициллинамидазы фенилуксусной кислотой при температуре 40°C и pH = 7,5.

Условия опытов:

- 1- ●●● концентрация ФУК = 0
- 2- ○○○ концентрация ФУК =  $1,0 \cdot 10^{-3} M$ ; ( $K_i = 1,05 \cdot 10^{-3} M$ )
- 3- ○○○ концентрация ФУК =  $2,0 \cdot 10^{-3} M$ ; ( $K_i = 1,87 \cdot 10^{-3} M$ )
- 4- ⊗⊗⊗ концентрация ФУК =  $8,5 \cdot 10^{-3} M$ ; ( $K_i = 1,71 \cdot 10^{-3} M$ )
- 5- ⊗⊗⊗ концентрация ФУК =  $3,0 \cdot 10^{-2} M$ ; ( $K_i = 1,82 \cdot 10^{-3} M$ )

Результаты определения начальной скорости гидролиза БП в реакторах при различных концентрациях субстрата и фермента

№	Исходная концентр. БП, М	Навеска геля, г	Объем реакц. смеси, л	Навеска геля на единицу объема реактора, г/л	Активность геля в ст. усл., Ф Е/г	Активность единицы реактора, (А) Ф Е/л	Начальная скорость по образ. 6-АПК (V <sub>0</sub> ) М/мин	$\frac{A}{V_0}$
1	0,015	1,36	0,0114	120	470	0,0563	0,94	16,8
2	0,015	1,47	0,017	86,4	532	0,0454	0,765	16,9
3	0,030	4,81	0,0148	326	299	0,0974	1,62	16,7
4	0,055	5,39	0,0154	349	450	0,122	2,1	16,5
5	0,055	4,80	0,0148	324	550	0,105	1,8	17,1
6	0,11	20,0	0,072	278	250	0,0695	1,33	19,1
7	0,125	7,0	0,0277	253	1230	0,334	5,10	15,3
8	0,140	4,46	0,0244	183	1285	0,234	4,18	17,8
9	0,140	40,0	0,360	110	1130	0,125	2,1	16,8
10	0,140	40,0	0,360	110	770	0,0855	1,4	15,4
11	0,15	30,0	0,075	400	250	0,10	1,75	17,5
12	0,17	30,0	0,085	353	250	0,084	1,49	17,2
13	0,20	30,3	0,200	151	1850	0,28	4,8	17,1
14	0,27	32,5	0,200	162	1850	0,31	4,8	15,5

где  $v$  - скорость реакции, М/мин;  
 $[S]_0$  - исходная концентрация субстрата, М;  
 $[S]$  - текущая концентрация субстрата, М;  
 $K_{m(\text{каж})}$  - кажущая константа Михаэлиса-Ментен, М;  
 $K_i$  - суммарная константа ингибирования, М;  
 $v_m$  - максимальная скорость реакции, М/мин.

Действительно, опыты полного гидролиза БП (см. табл. 2) подтверждают соответствие экспериментальных данных с уравнением.

Интегрирование уравнения (1) дает:

$$\frac{[P]}{t} = \frac{v_m}{1 - \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_i}} - \frac{K_{m(\text{каж})}(1 + \frac{[S]_0}{K_i})}{t(1 - \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_i})} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}, \quad (2)$$

где  $[P]$  - концентрация одного продукта, М;  
 $t$  - время, мин.

Сопоставляя это уравнение с интегрированным уравнением Михаэлиса-Ментен, можно отметить, что

$$v_m^{\text{эфф}} = \frac{v_m}{1 - \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_i}} \quad (3)$$

и

$$K_m^{\text{эфф}} = \frac{K_{m(\text{каж})}(1 + \frac{[S]_0}{K_i})}{1 - \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_i}}. \quad (4)$$

При использовании уравнения (2) в координатах

$$\frac{P}{t}, \quad \frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - [P]}$$

значение констант  $v_m^{\text{эфф}}$  (уравнение 3) и  $K_m^{\text{эфф}}$  (уравнение 4) оказались положительными, что доказывает  $K_{m(\text{каж})} < K_i$ . Из найденных графически значений  $v_m^{\text{эфф}}$  и  $K_m^{\text{эфф}}$  вычислены  $K_{m(\text{каж})}$  и  $K_i$ .

При более высоких концентрациях субстрата применяемый метод линеаризации дал неуверенные результаты, что не поз-

## Т а б л и ц а 2

Определение суммарной константы ингибирования ИБПА продуктами гидролиза БП  
(температура опытов 40 °С, рН = 7,5)

	Исходная конц. БП $[S]_0 \times 10^3 \text{М}$	$V_m \times 10^3 \text{М/мин}$	$K_m^{\text{эфф}} \times 10^3 \text{М}$	$V_m^{\text{эфф}} \times 10^3 \text{М/мин}$	$K_{\text{тпкжжх}} \times 10^3 \text{М}$	$K_{ij} \times 10^3 \text{М}$
1	2,7	0,243	1,0	0,455	0,42	1,11
2	5,0	0,600	1,33	2,5	0,46	1,65
3	10,0	0,605	10,0	1,33	0,523	1,04
4	15,8	1,080	10,0	2,02	0,44	1,05
5	20,0	0,190	5,95	0,22	0,18	0,78
6	22,5	0,895	3,7	1,19	0,63	0,39
7	23,0	0,250	6,9	0,31	0,23	0,87
8	32,0	0,320	9,4	0,44	0,285	0,947
9	52,0	0,450	16,6	0,68	0,29	1,17
Средняя:					0,385	1,00



волило вычислить эффективных величин. Расхождения в значениях определенных констант (см. табл. 2) могут быть обусловлены разными причинами. В связи с неоднородностью по размеру зерен ферментативного геля диффузионное сопротивление в отдельных опытах неодинаково. Неизбежно спонтанное разложение БП при температуре 40 °С, что вызывает дополнительную погрешность определения наблюдаемых величин констант диссоциации.

#### В ы в о д ы

1. Наблюдаемая начальная скорость ферментативного гидролиза БП зависит линейно от количества иммобилизованного фермента БПА, выраженного через введенную в единицу объема активность.
2. Процесс деацилирования БП тормозится главным образом ФУК ( $K_i^{\text{ФУК}} = 1,59 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ ) как конкурентным ингибитором, но влияние оказывают и 6-АПК ( $K_i^{\text{6-АПК}} = 0,15 \text{ М}$ ) и БП ( $K_i^{\text{БП}} = 0,98 \text{ М}$ ), ингибирующих фермент конкурентно.
3. Определяемая средняя константа Михаэлиса равняется  $K_{m(\text{кат})} = 0,385 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ .  
Суммарная средняя константа ингибирования равняется  $K_i = 1,00 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ .

#### Л и т е р а т у р а

1. А.И. К ё с т н е р. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 33I, 157, Таллин, 1973.
2. Э.Х. С и й м е р, А.И. К ё с т н е р. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 33I, 163, Таллин, 1973.
3. Г.И. К л е й н е р, Л.М. Е л и з а р о в с к а я, В.Я. Ш т а м е р, А.И. К ё с т н е р, М.О. М а н д е л ь, М.И. К р е э н. Микробиол. пром., 12, 1973.
4. D. Y. R u n, C. F. B r u n o, B. K. L e s. K. Venkata-subramanian Proc. 4-th IFS. Ferment. Technol. Today, Kyoto, Japan, 307-314, 1972.
5. D. W a r b u r g t o n, K. B a l a s i n g h a m, P. D u n n i l l, M. D. L i l l y. Biochim. Biophys. Acta, 284, 278, 1972.

6. D. A. Self, G. Kay, M. D. Lilly. *Biotechn. Bioengn.*, 11, 337, 1969.
7. Э.Х. Сиймер, В.А. Крозинг, М.О. Мандель, А.И. Кёстнер. О механизме ферментативных реакций ингибируемых субстратом и продуктами. См. наст. сб., с. 3-7.

M. Mandel, E. Siimer,  
K. Kärema, A. Köstner

Inhibition of Enzymatic Hydrolysis of Benzylpenicillin  
Using Immobilized Penicillin Amidase

Summary

The kinetics of benzylpenicillin hydrolysis by means of penicillin amidase immobilized in polyacrylamide gel has been studied. The linearity between initial velocity of hydrolysis and the quantity of immobilized enzyme has been estimated. It has been found that one product of the reaction - phenylacetic acid inhibits the enzyme competitively ( $k_i^{PAA} = 1,59 \cdot 10^{-3} M$ ). The other product, 6-aminopenicillanic acid, and substrate inhibit the enzyme noncompetitively and relatively weakly. For practical needs the kinetic equation with the only the total inhibition constant use  $k_i = 1,0 \cdot 10^{-3} M$  will be suitable. The exact description of hydrolysis is possible only if diffusion processes, spontaneous degradation of the substrate and other factors are considered.

УДК 577.154:21 66.097.64

В.А.Кросинг, Д.Й.Ярвет, Э.Х.Сиймер, А.И.Кёстнер

КИНЕТИКА РЕАКЦИИ ГИДРОЛИЗА ВОДНЫХ РАСТВОРОВ  
САХАРОЗЫ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ В  
ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ ИНВЕРТАЗОЙ

Хотя в последние годы достигнуты значительные успехи в изучении кинетики ферментативного гидролиза сахарозы, до сих пор никем количественно не описано ингибирующее действие продуктов этой реакции. Нами начаты исследования в этом направлении. Это неизбежно, так как инвертаза в иммобилизованном виде перспективна для применения в пищевой промышленности.

Открытое Нельсоном и Шубертом уменьшение начальной скорости гидролиза сахарозы при увеличении концентрации субстрата [1] обсуждается Мак-Лареном [2], который считает основной причиной этого явления увеличение диффузионного сопротивления, повышение вязкости растворов. Им рассмотрены и другие факторы, в том числе возможность существования неконкурентного ингибирования субстратом, ошибочно им названного конкурентным.

И. Бовски и др. показали недавно [3], что вязкость в данном случае не может служить лимитирующим фактором, а следует учитывать ингибирование субстратом и концентрацию "свободной" воды. Их выводы весьма достоверны, хотя предположение, что каждая молекула сахарозы прочно связывает семь молекул воды (остальная часть является свободной), кажется слишком категорическим. Кроме того, сопоставление экспериментальных данных с моделью ими проводится умножением скоростей реакции на "константу ассоциации", чисто эмпирическую величину.

Проверяя данную модель при гидролизе растворов сахарозы в реакторе с ультрафильтрационной системой, И. Бовски и др. заметили резкое уменьшение максимальной скорости реакции ( $v_m$ ) при увеличении степени конверсии сахарозы [4]. Авторы считали причиной замедления реакции явление концентрационной полимеризации.

В данном сообщении рассматриваются результаты исследования кинетики гидролиза сахарозы с иммобилизованной в полиакриламидном геле инвертазой, в частности, ингибиторное действие D-фруктозы, а также некоторые вопросы глубокого гидролиза растворов сахарозы в реакторах с перемешиванием.

#### Методика и исходные вещества

Для исследований применялся ферментный препарат "инвертин" Донецкого пивоваренного завода, который после очистки гельфильтрацией на сефадексе Г-75 иммобилизовали в полиакриламидном геле методом фотополимеризации [5]. Использованные гранулы 0,25-0,5 мм имели эффективную активность 30-80 Е/г.

Активность иммобилизованной инвертазы (ИИ) определяли на 7-процентном буферном растворе сахарозы при 30 °С в колонке и выражалась в  $E = \text{мкмоль/мин}$  [6].

При этом редуцирующие сахара определялись по комплексометрическому методу Тегге и Нирле [7], глюкоза - биохимическим методом, используя комплект реактивов ТС-М-Ш фирмы Boehringer & Soehne GmbH.

#### Результаты и их обсуждение

Определение начальных скоростей гидролиза растворов сахарозы разной концентрации при 30 °С и рН 4,8 образовавшихся редуцирующих сахаров дало результаты, близкие данным И. Бовски и др. [3] (фиг. 1 а).

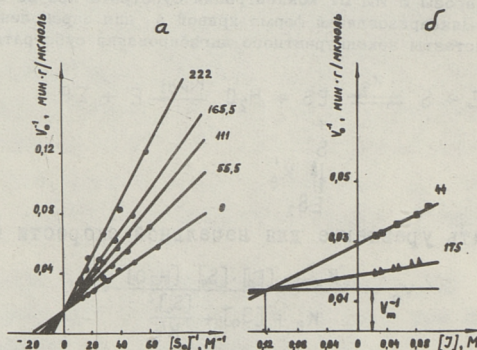
Согласно схеме (I) неконкурентного ингибирования субстратом (не учитывая возможность образования непродуктивно-го комплекса SE)



ные опыты уверенно подтверждали отсутствие инактивации фермента в ходе всей серии и полную обратимость взаимодействия фруктозы с компонентами реакционной смеси (перед каждым опытом колонка тщательно промывалась буфером). Опыты проведены при 30 °С; во фракциях определялось содержание глюкозы и сахарозы (после кислотного ее гидролиза, также биохимическим методом).

Вторая серия опытов проведена при постоянной концентрации сахарозы (0,044 и 0,175 М), изменяя концентрацию фруктозы в интервале от 0 до 0,1 М.

Результаты опытов приведены на фиг. 2 в координатах Лайнуйвера-Берка и Диксона.



Фиг. 2. Результаты опытов определения ингибиторного действия фруктозы в координатах а) Лайнуйвера-Берка и б) Диксона. Над кривыми фиг. 2а указаны концентрации фруктозы в мМ, фиг. 2б концентрации сахарозы в мМ.

Как видно из фиг. 2, фруктоза конкурентно ингибирует инвертазу, скорость реакции, таким образом, определяется уравнением (4)

$$V_0 = \frac{v_m \cdot [S_0]}{K_{m(\text{каж})} \left(1 + \frac{[J_0]}{K_i}\right) + S_0}, \quad (4)$$

где  $v_m$  - максимальная скорость реакции;  
 $K_{m(\text{каж})}$  - кажущаяся константа Михаэлиса;  
 $J$  - фруктоза (ингибитор);  
 $K_i$  - константа ингибирования (константа диссоциации фермент-фруктозного-комплекса).

Согласно графическим данным значение  $K_i$  равно  $0,123 \pm \pm 0,004$  (фиг. 2а) и  $0,125 M$  (фиг. 2б), в среднем  $0,124 M$ ; константа Михаэлиса  $K_{m(каж)} = 0,0455 M$ , а  $v_m = 71,5 E/г.$

Таким образом, можно считать серьезной причиной уменьшения скорости ферментативного гидролиза сахарозы в ходе реакции конкурентное ингибирование накапливающейся фруктозой.

Общая схема протекания реакции должна, по-видимому, учитывать как неконкурентное ингибирование субстратом и изменение концентрации воды (уравнение (2)), так и конкурентное ингибирование фруктозой (уравнение (4)). Уменьшение концентрации субстрата в ходе глубокого гидролиза концентрированных растворов сахарозы должно, в принципе, обуславливать увеличение скорости реакции. Этот эффект с избытком компенсируется ингибиторным действием образовавшейся фруктозы. Однако многочисленные экспериментальные данные глубокого гидролиза сахарных сиропов в реакторах периодического и непрерывного действия показали, что скорость реакции падает быстрее, чем это можно предвидеть по общей схеме, применяя найденные значения  $K_{m(каж)}$ ,  $K_s$  и  $K_i$ . По всей вероятности, образовавшаяся глюкоза также неконкурентно ингибирует фермент и влияние сахарозы в ходе гидролиза в значительной степени компенсируется влиянием глюкозы. Поэтому для практических целей процесс гидролиза раствора сахарозы в реакторе можно описывать уравнением, в котором учитывается конкурентное ингибирование продуктами ("суммарное ингибирование"):

$$v = \frac{v_m \cdot [S]}{K_{m(каж)} \cdot \left(1 + \frac{[P]}{K_p}\right) + [S]}, \quad (5)$$

где  $[P]$  - концентрация одного продукта;

$K_p$  - видимое значение константы ингибирования или, так как  $[P] = [S_0] - [S]$ ,

$$v = \frac{v_m \cdot [S]}{K_{m(каж)} \cdot \left(1 + \frac{[S_0] - [S]}{K_p}\right) + [S]}. \quad (6)$$

Принципиально уравнения (5) и (6) описывают ингибирование фруктозой, а частично компенсирующее неконкурентное ингибирование сахарозой и глюкозой учтено тем, что вместо определенной нами константы ингибирования фруктозой  $K_i$ ; в уравнение входит видимое значение константы ингибирования  $K_p$ . Прямое определение ингибиторного действия глюкозы нами еще не осуществлено и поэтому в первом приближении можно использовать для процессов в реакторах полуэмпирическое уравнение (6). Однако уже по существующим данным можно значительно уточнить схему и кинетическое уравнение ферментативного гидролиза сахарозы, что нами сделано в другом сообщении настоящего сборника [8].

Рассмотрим зависимость скорости ферментативного гидролиза от степени конверсии субстрата.

Приведем следующие обозначения:

$[S_0]$  - исходная концентрация субстрата;

$[S]$  - текущая концентрация субстрата;

$v_0$  - начальная скорость реакции;

$K = \frac{[S]}{[S_0]}$  - степень конверсии;

$v$  - текущая скорость реакции.

Согласно уравнению (6), получаем

$$v_0 = \frac{v_m [S_0]}{K_{m(\text{каж})} + [S_0]} \quad (7)$$

$$v = \frac{v_m [S]}{K_{m(\text{каж})} \cdot \left(1 + \frac{[S_0] - [S]}{K_p}\right) + [S]} \quad (8)$$

относительная скорость  $\frac{v}{v_0}$  в этом случае выражается следующим образом:

$$\frac{v}{v_0} = \frac{[S] \cdot (K_{m(\text{каж})} + [S_0])}{[S_0] \cdot \left[ K_{m(\text{каж})} \cdot \left(1 + \frac{[S_0] - [S]}{K_p}\right) + [S] \right]} \quad (9)$$

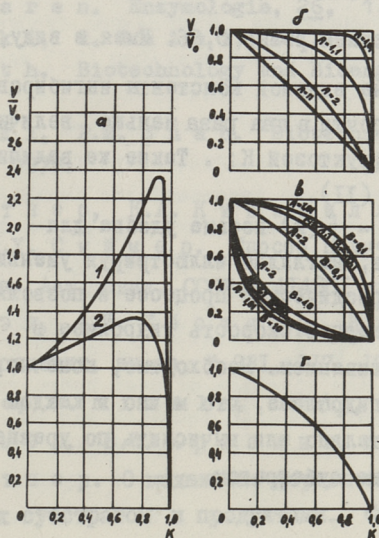
Обозначая через  $A$  величину  $1 + \frac{K_{m(\text{каж})}}{S_0}$ , получаем после простых преобразований

$$\frac{v}{v_0} = \frac{(1-k) \cdot A}{A - k \left(1 - \frac{K_{m(\text{каж})}}{K_p}\right)} \quad (10)$$



Таким образом, относительная скорость реакции зависит от степени конверсии, от соотношения  $\frac{K_m(\text{каж})}{K_p}$  и от исходной концентрации субстрата. При  $[S_0] \gg K_m(\text{каж})$   $A \approx 1$ , что позволяет по экспериментальным данным (согласно уравнению (10)) вычислять видимое значение  $\frac{K_m(\text{каж})}{K_p}$ :

$$B = \frac{K_m(\text{каж})}{K_p} = \left( \frac{1 - \frac{v}{v_0}}{\frac{v}{v_0}} \right) \left( \frac{1-k}{k} \right). \quad (\text{II})$$



Фиг. 3. Зависимость относительной скорости ферментативной реакции от степени конверсии субстрата, где

- а) учитывая только ингибирование субстратом, ур. (2), при  $K_5' = 1,0$  М.  
 1 -  $[S_0] = 2,34$  М (800 г/л)  
 2 -  $[S_0] = 0,88$  М (300 г/л),

б) без учета ингибирования субстратом и продуктами, ур. (10) ( $B = 0$ ), кинетика Михаэлиса,

в) учитывая ингибирование продуктами, ур. (10),

г) функция  $\frac{v}{v_0} = f(K)$ , ур. (12),

соответствующая экспериментальным данным глубокого гидролиза концентрированных растворов сахарозы при 30-50 °С.

На фиг. 3 показана зависимость относительной скорости гидролиза сахарозы от степени конверсии субстрата при различных случаях ингибирования. Кривая на фиг. 3г соответствует среднему ходу гидролиза 0,9 - 2,3 М растворов сахарозы в периодическом процессе при 30 - 50 °С и может быть выражена следующим эмпирическим уравнением с округленными коэффициентами:

$$\frac{v}{v_0} = 1 - 0,6k - 0,4k^2. \quad (12)$$

По уравнениям (II) и (12) можно вычислять соотношение  $\frac{K_m(\text{каж})}{K_p}$ , что в среднем равно 0,66. Имея в виду, что  $K_m(\text{каж}) = 0,045$  М, величина видимой константы ингибирования  $K_p$  равна 0,068 М, т.е. почти в два раза меньше величины константы ингибирования фруктозой  $K_i$ . Такие же величины  $K_p$  найдены по уравнению (II).

Функция  $\frac{v}{v_0} = f(k)$  весьма удобна для практических расчетов реакторов, наглядно иллюстрируя уменьшение скорости гидролиза в периодическом процессе и позволяющая сразу определить стационарную скорость гидролиза в непрерывном реакторе с перемешиванием. Необходимо, конечно, знать начальную скорость гидролиза, что можно в каждом случае определить экспериментально или вычислить по уравнению (2), учитывая ингибирование субстратом.

#### В ы в о д н ы

1. Показано, что ферментативному гидролизу растворов сахарозы с иммобилизованной в полиакриламидном геле инвертазой характерно ингибирование субстратом фруктозой, и по всей вероятности, также глюкозой.
2. Субстрат ингибирует инвертазу неконкурентно, значение константы ингибирования  $K'_s$  при 30 °С равно 1,0 М.
3. Фруктоза ингибирует инвертазу конкурентно, значение константы ингибирования  $K_i$  при 30 °С равно 0,124 М.
4. Приведены упрощенные кинетические уравнения для практи-

ческих расчетов процесса гидролиза и показана целесообразность для этих же целей применения зависимости относительной скорости от степени конверсии субстрата.

#### Л и т е р а т у р а

1. J.M. Nelson, M.P. Schubert. J. Amer. Chem. Soc, 50, 2188, 1928.
2. A.D. McLaren. Enzymologia, 26, 1, 1963.
3. L. Bowski, R. Saini, D.Y. Ryn, and W.R. Viet h. Biotechnology and Bioengineering, 13, 641, 1971.
4. L. Bowski, P.M. Shah. Biotechnol. & Bioeng. Symp. No. 3, 229, 1972.
5. А.И. Кёстнер, К.А. Кивисилла, М.О. Мандель, Э.Х. Сиймер. Способ получения микрогранул фермента. Авт. свид. СССР № 414301 кл. С 12 Д, 1974.
6. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, № 331, 117, 1973.
7. G. Tegge, W. Nierle. Stärke, 17, 4, 1965.
8. Э.Х. Сиймер, В.А. Кросинг, М.О. Мандель, А.И. Кёстнер. О механизме ферментативных реакций, ингибируемых субстратом и продуктами. См. наст. сб., с. 3-7.

V. Krosing, J. Järvet,  
E. Siimer, A. Köstner

The Kinetics of Sucrose Hydrolysis in Water  
in Presence of Entrapped into Polyacrylamide

Gel Invertase

Summary

As a result of kinetic investigation of polyacrylamide gel entrapped invertase uncompetitive inhibition by substrate (sucrose) and competitive inhibition by one of the products (fructose) have been demonstrated. Kinetic equations for this process have been proposed. The values of kinetic constants have been found to be equal  $K_m = 0.0455$  M,  $K_1$  (sucrose) = 1.0 M,  $K_1$  (fructose) = 0.124 M. Special attention is paid to the kinetics of deep hydrolysis of concentrated sucrose solutions. An equation for calculating relative reaction rate in dependence on the degree of substrate conversion has been proposed and proved experimentally.

М.И. Креэн, К.А. Кивисилла,  
В.Н. Федосеев, А.И. Кёстнер

### ОБ ИММОБИЛИЗАЦИИ ХИМОТРИПСИНА НЕКОТОРЫМИ МЕТОДАМИ

Разноречивость результатов, полученных при иммобилизации химотрипсина (ХТ), побудила нас проверить некоторые описанные методы и исследовать возможности разработки новых методов получения нерастворимых препаратов этого фермента, важного как с теоретической, так и с практической точки зрения.

#### Материалы и методы

Химотрипсин — препараты Олайнского завода химреактивов или фирм "Реанал" и "Спофа" с активностями по  $\alpha$ -N-ацетил-L-тирозин этиловому эфиру соответственно 300, 240 и 290 Е/мг.

Диатомит марки "Chromosorb P", I20 меш, диаметр пор до 15000 Å, удельная поверхность 1,0 м<sup>2</sup>/г.

Пористое стекло — изготовленное в Ленинградском политехническом институте (ЛПИ), диаметр пор 1600 Å, удельная поверхность 15 м<sup>2</sup>/г и изготовленное в секторе биохимии (СБ) Института кибернетики АН ЭССР с неизвестной пористостью.

Стекловата с диаметром волокон  $\sim 6 \cdot 10^{-3}$  мм, удельная поверхность 0,25 м<sup>2</sup>/г.

Компоненты полиакриламидного геля (ПААГ) — акриламид, N,N' — метилен-бис-акриламид, N,N,N',N' — тетраметилэтилендиамин — препараты фирмы "Реанал".

γ — аминопропилтриэтоксисилан — отечественный препарат АГМ-9.

Диметилловый эфир адипиновой кислоты — Харьковский завод химреактивов, марки "ч".

Гидразин - гидрат - ГОСТ 5832-65, препарат марки "чда".

Глutarовый альдегид - фирма "Мерк", 25 % раствор.

Ангидрид итаконовой кислоты (АИК) - Олайнеский завод химреактивов, марки "ч".

Ангидрид малеиновой кислоты (АМК) - Московский завод химреактивов, марки "чда".

Субстрат,  $\alpha$  - N - ацетил - L - тирозин этиловый эфир (АТЭЭ) - фирма "Реанал" или синтезированный в нашей лаборатории.

Активность свободного и иммобилизованного химотрипсина определялась титриметрическим методом в термостатируемой при 25 °С ячейке, снабженной магнитной мешалкой, содержащей 15,0 мл субстрата (0,01 М АТЭЭ, 0,2 М NaCl, 0,01 М CaCl<sub>2</sub>) в 0,02 М трис-НСl буфере с pH 8,0 - 9,0.

Характеризация препаратов иммобилизованного химотрипсина проводилась с помощью коэффициентов связывания  $\alpha$  и  $\gamma$  [1]. Активность выражалась в единицах мкмоля субстрата в минуту на 1 г влажного препарата.

Силанизация кремнийсодержащих носителей с целью введения первичных аминогрупп проводилась  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом по описанной методике [2]. В случае хромосорба и стекла (ЛПИ) содержание азота достигало 40 мкэкв/г носителя.

Синтез диазида адипиновой кислоты (ДААК). К раствору диметилового эфира адипиновой кислоты в этиловом спирте, 8,7 г (0,05 м), 10 мл добавляли 7,5 мл (0,1 м) 85 % гидразингидрата и перемешивали. Выпавшие кристаллы дигидразида адипиновой кислоты отделяли, промывали этиловым эфиром и высушивали. Полученный дигидразид (0,05 м) растворяли в 150 мл 0,8 н HCl, прибавляли 100 мл этилового эфира и охлаждали, при перемешивании прибавляли по каплям раствор NaNO<sub>2</sub> (7 г в 20 мл воды). После окончания реакции эфирный слой, содержащий ДААК, отделяли.

Связывание ХТ со стеклом и хромосорбом диазидным методом. Навеску 5 г силанизированного носителя помещали в 15 -

- 20 мл раствора ДААК в этиловом эфире и выдерживали при комнатной температуре 10 - 15 часов, периодически перемешивая. Активированный таким путем материал отделялся от раствора, промывался и высушивался. Связывание ХТ с носителем осуществлялось в 0,1 М трис-НСl буфере с рН 8,1 при температуре 4 - 6 °С и непрерывном перемешивании, согласно рекомендациям для препаратов "Энзакрил" [3]. На каждый грамм носителя брали 5 - 10 мл раствора ХТ (1 - 5 мг/мл) в буфере.

Связывание ХТ со стеклом и хромосорбом с помощью глutarового альдегида проводилось по методу Робинсона и др. [4].

Включение ХТ в полиакриламидный гель проводилось по описанному нами ранее способу [5] с той разницей, что вместо фотополимеризации использовалось окислительно-восстановительное иницирование. Введенное количество ХТ составляло 0,4 - 0,8 мг на 1 мл полимеризационной смеси.

Включение модифицированного ХТ в полиакриламидный гель проводилось в двух стадиях. С целью модифицирования фермента смешивали равные объемы растворов ХТ (7 - 10 мг/мл) и ангидрида итаконовой или малеиновой кислоты (10 мг/мл) и оставляли на 17 - 20 часов в холодильнике (+4 °С). Обработанный таким образом раствор ХТ вносили в среду полимеризации. Процесс включения проводился по описанному методу [5]. Концентрация ангидрида в полимеризационной среде составляла 0,38 %, содержание ХТ в ней 2,5 - 4,0 мг/мл.

#### Результаты и обсуждение

Данные, характеризующие полученные нами препараты ХТ, приведены в таблице I. Так как в опытах ковалентного связывания ХТ (преп. № I-6) были применены избыточные концентрации белка, то не было основы для расчета принятых нами характерных коэффициентов связывания. Полученные абсолютные активности, выраженные на вес или на единицу поверхности носителей, соответствуют в среднем приведенным в литературе значениям. При этом достижение более высоких поверхностных

активностей в случае крупнопористых и волокнистых материалов вполне логично.

По результатам заключения ХТ в структуру полиакриламидного геля (преп. № 7 - 14) видно, что несмотря на варьирование общей и относительной концентрации мономеров, значения коэффициента выхода активности связанного фермента ( $\gamma$ ) во всех случаях в пределах 3 - 5 %, хотя значения коэффициента иммобилизации ( $\alpha$ ) довольно высокие. Это говорит о значительной инактивации ХТ в ходе связывания. Включение фермента вместе с ингибитором  $n$  - бутанолом ( $10^{-2}M$ ), проведенное с целью снижения инактивации ХТ, не дало положительных результатов (преп. № 10). Изучением распределения белка между зернами геля и промывными водами установлено, что удельная активность ХТ, заключенного в полиакриламидный гель I5/10, составляет только 7,4 % от удельной активности растворимого фермента.

С целью уменьшения вымывания ферментного белка из полиакриламидного геля нами испытан оригинальный метод включения обогащенного винильными группами фермента. Для модификации фермент обрабатывался ангидридом малеиновой или итаконовой кислоты. Мы предполагаем, что в ходе полимеризации модифицирующие группы образуют сополимер с акриламидом и, таким образом, фермент связывается как ковалентными связями, так и включением. Этим методом достигнуты довольно хорошие показатели иммобилизации даже в случае низкопроцентных гелей (преп. № 15 - 19). Выход активности ( $\gamma$ ) иммобилизованных т.н. комбинированным методом препаратов ХТ колеблется от 7 до 15 %, что в 2 раза больше, чем при чистом заключении ХТ в гель. Варьирование соотношения амино- и ангидридных групп (принимая 15 аминогрупп на одну молекулу ХТ) не влияет заметно на активность препаратов. Судя по активностям нельзя также предпочесть один ангидрид другому. Как АИК, так и АМК замедляют образование геля.



Т а б л и ц а I

Результаты иммобилизации химотрипсина  
различными методами

№ преп.	Носитель	Связывающий реагент	Соотношение аминоксидных групп	Активность по АТЭЭ		Коэффициенты связывания, %	
				Е/г	Е/м <sup>2</sup>	α	γ
1	Стекловата	ДААК		10	40		
2	Хромосорб	ДААК		90	90		
3	Стекло (ЛПИ)	ДААК		60	4		
4	Стекло (ЛПИ)	ГА		112	7,5		
5	Стекло (СБ)	ГА		23	-		
6	Хромосорб	ГА		70	70		
7	ПААГ 7/10*			41		79,5	3,6
8	ПААГ 15/5			46		77,0	4,5
9	ПААГ 15/10			51		84,0	4,5
10	ПААГ 15/10			40		75,7	3,5
11	ПААГ 15/20			54		66,0	4,8
12	ПААГ 20/5			20		86,5	1,7
13	ПААГ 20/10			31		81,8	2,7
14	ПААГ 20/20			40		83,5	3,5
15	ПААГ 7/10	АИК	I : 40	74		95,4	9,5
16	ПААГ 7/10	АИК	I : 30	134		-	15,4
17	ПААГ 7/10	АИК	I : 15	88		-	10,2
18	ПААГ 7/10	АИК	I : 3	63		-	7,2
19	ПААГ 7/10	АМК	I : 40	141		97,5	9,5

\*Числитель обозначает общую концентрацию мономеров, знаменатель - относительную концентрацию N,N'-метилен-бис-акриламида.

## В ы в о д ы

1. Диазидным и альдегидным методами на неорганических носителях получены препараты иммобилизованного ХТ с активностью до 112 Е/г (до 90 Е/м<sup>2</sup>).
2. Включением ХТ в структуре полиакриламидного геля получены препараты с выходом активности 2 - 5 %.
3. Иммобилизация ХТ в полиакриламидный гель с помощью итаконного и малеинового ангидрида увеличивает выход активности связанного фермента до 15 %.

## Л и т е р а т у р а

1. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск, Тр. Таллинск. политехн. ин-та, серия А, 1971, № 300, с. 21-31.
2. H.H. Weetall, L.S. Hersh. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, vol. 185, nr. 2, p. 464.
3. R. Epton, T.H. Thomas. *An introduction of water-insoluble enzymes.* - Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook, 1971.
4. P.J. Robinson, P. Dunnill, M.D. Lilly. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, vol. 242, p. 659 - 661.
5. А.И. Кёстнер, М.И. Креэн, К.А. Калунянц. *Микробиологическая промышленность*, 1973, вып. 3, № 99, с. II - I6.

On Some Immobilization Techniques forChymotrypsin

## Summary

Chymotrypsin has been immobilized by covalent binding to silanized glass wool, porous glass and Chromosorb P by the help of adipic acid diazide and glutaric aldehyde. Maximal activities 112 U/g (or 90 U/m<sup>2</sup>) have been obtained. Entrapment of chymotrypsin in polyacrylamide gel yielded maximal activity about 50 U/g (up to 5 % initial activity), in the case of polymer concentration of 15 pc. A novel method to include vinyl groups to enzyme molecules by means of maleic anhydride or itaconic anhydride treatment was proved to be useful to enhance the activity yield in the case of entrapment.



УДК 577.154.25.04.002.237.

К.Э. Паппель, А.И. Кёстнер,  
Р.В. Фениксова, А.С. Тихомирова

### ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ $\beta$ - ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

Известна иммобилизация  $\beta$ -галактозидазы включением в полиакриламидный гель [1, 2]. В названных работах условия включения не уточнены. Решение этой задачи является предметом данной статьи.

#### Материалы и методы

Работу проводили с грибной  $\beta$ -галактозидазой (Г), выделенной в Институте биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, с активностью 400 - 700 Е/г. Активность фермента определяли колориметрическим методом по скорости расщепления о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозида (НФГ) до о-нитрофенола [3] или по скорости расщепления лактозы до глюкозы и галактозы [4]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкмоль субстрата при рН 4,2 и 30 °С за 1 мин.

В качестве носителя использовали полиакриламидный гель, который изготовляли из акриламида и  $N,N'$ -метилен-бис-акриламида химической полимеризацией. В качестве катализаторов применяли  $N,N,N',N'$ -тетраметил-этилен-диамина (ТЕМЭД) и персульфат аммония  $(NH_4)_2S_2O_8$ , все реактивы фирмы "Реанал". В опытах использовались растворы следующего состава: 50%-ный раствор мономеров с относительной концентрацией  $N,N'$ -метилен-бис-акриламида 3-12 %, 5%-ный раствор персульфата аммония, 5%-ный раствор ТЕМЭД, активность ферментного раствора при исследовании процесса иммобилизации была ~ 3,5 Е/мл. Раствор  $\beta$ -галактозидазы приготовили в 0,2 М ацетатном буфере рН 4,2. Для примера приводим приготовление геля с общим со-

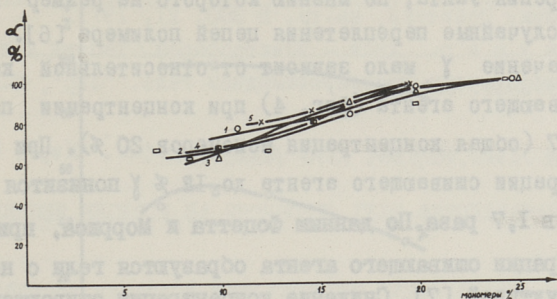
держанием мономеров 20 %. Растворы брали в следующих количествах: р-р мономеров 4 мл, р-р фермента 5 мл, р-р ТЕМЭД 0,5 мл, р-р  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  0,5 мл. Более низкие плотности геля достигались заменой определенной части р-ра мономеров на буфер.

Включение  $\beta$ -галактозидазы в полиакриламидный гель и определение активности гель-фермента проводилось по описанному ранее способу [5], с той разницей, что вместо фотополимеризации использовалась химическая полимеризация, применяя инициатором ТЕМЭД. Субстратом для определения активности ИГГ служил 0,002 М раствор НФГ или 0,13 М раствор лактозы в буфере рН 4,2. Эффективность иммобилизации характеризовалась коэффициентами  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  согласно рекомендациям М.И.Крезн и др. [5].

#### Результаты и их обсуждение

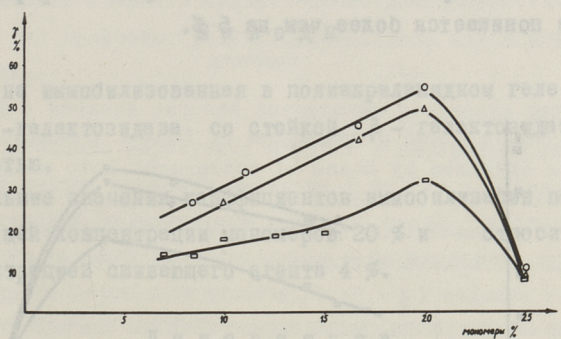
Эффективность иммобилизации (т.е. значение  $\gamma$ ) зависит от структуры образующего полиакриламидного геля. Учитывая, что размеры и распределение пор геля зависят как от суммарной концентрации акриламида и  $\text{N,N}'$ -метилен-бис-акриламида, так и от относительного содержания последнего, изучали эффективность иммобилизации фермента в геле в различных условиях. Концентрацию мономеров изменяли от 7 до 25 %, относительную концентрацию сшивающего агента  $\text{N,N}'$ -метилен-бис-акриламида от 3 до 12 %. Оказывается (фиг. 1), что степень иммобилизации  $\beta$ -галактозидазы в полиакриламидном геле довольно высокая - 60-99 %. Коэффициент иммобилизации  $\alpha$  мало зависит от относительной концентрации сшивающего агента. Эти данные согласуются с точкой зрения Орнштейна, а также Раймонда и Накамиси, по мнению которых размер пор мало зависит от концентрации сшивающего агента, а сшивки лишь придают гелю механическую прочность [6].

Значения коэффициента сохранения активности  $\gamma$  и коэффициента проявления активности  $\beta$  не превышают соответственно 54 % и 55 % (фиг. 2). Максимальные значения коэффициентов получены при концентрации мономеров 20 %. Более низкие значения коэффициента  $\beta$ , и следовательно,  $\gamma$  указывают



Фиг. 1. Зависимость значений коэффициента иммобилизации  $\alpha$  от общей концентрации мономеров.

- Относительная концентрация сшивающего агента 3 %
- Относительная концентрация сшивающего агента 4 %
- х—х Относительная концентрация сшивающего агента 5 %
- ▽—▽ Относительная концентрация сшивающего агента 7 %
- Относительная концентрация сшивающего агента 12 %.



Фиг. 2. Зависимость значений коэффициента сохранения активности ( $\gamma$ ) от общей концентрации мономеров.

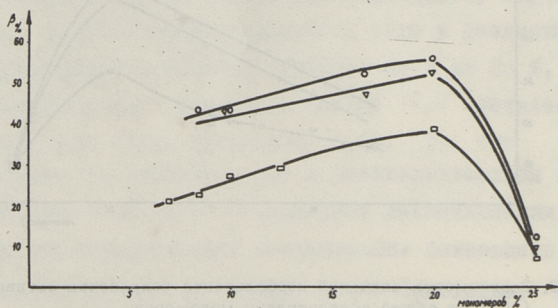
- Относительная концентрация сшивающего агента 4 %
- △—△ Относительная концентрация сшивающего агента 7 %
- Относительная концентрация сшивающего агента 12 %.

на инактивацию фермента при иммобилизации. Причины инактивации и некоторые расхождения в результатах параллельных опытов (приведены средние данные) в различных сериях требуют дальнейшего исследования. Следует обратить внимание на

точку зрения Уайта, по мнению которого на размер пор могут влиять случайные переплетения цепей полимера [6].

Значение  $\gamma$  мало зависит от относительной концентрации сшивающего агента (фиг. 4) при концентрации последнего от 4 - 7 (общая концентрация мономеров 20 %). При повышении концентрации сшивающего агента до 12 %  $\gamma$  понизится приблизительно в 1,7 раза. По данным Фокетта и Морриса, при высокой концентрации сшивающего агента образуются гели с неравномерной структурой [7]. Снижение концентрации сшивающего агента ниже 3 % ухудшает механические свойства ИГ.

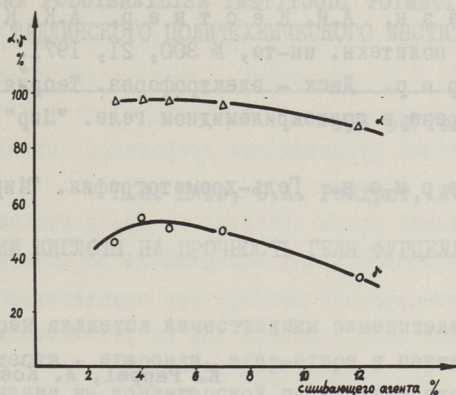
Исследование гидролиза 5%-ной лактозы или сыворотки молока с ИГ при 50 °С показало, что гидролиз сильно замедляется при степени конверсии 70 % и 60 % соответственно. Торможение гидролиза происходит, по нашим дополнительным данным, за счет ингибированного действия продукта реакции - галактозы. Активность ИГ при 30 °С в течение 60 суток непрерывной работы не понижается более чем на 5 %.



Фиг. 3. Зависимость значений коэффициента проявления активности ( $\beta$ ) от общей концентрации мономеров.

- Относительная концентрация сшивающего агента 4 %
- △—△ Относительная концентрация сшивающего агента 7 %
- Относительная концентрация сшивающего агента 12 %.





Фиг. 4. Зависимость коэффициента иммобилизации ( $\alpha$ ) и коэффициента сохранения активности ( $\gamma$ ) от концентрации сшивающего агента при общей концентрации мономеров 20 %.

△—△ Значения коэффициента  $\alpha$ .  
 ○—○ Значения коэффициента  $\gamma$ .

### Выводы

1. Получена иммобилизованная в полиакриламидном геле грибная  $\beta$ -галактозидаза со стойкой  $\beta$ -галактозидазной активностью.
2. Наибольшие значения коэффициентов иммобилизации получают при общей концентрации мономеров 20 % и относительной концентрацией сшивающего агента 4 %.

### Литература

1. P.S. Bunting, K.J. Laidler. *Biochemistry*, 11, 24, 4477, 1972.
2. H. Maeda, A. Yamauchi, H. Suzuki. *Biochim. Biophys. Acta*, 315, 1, 18, 1973.
3. S.A. Kubu, H.A. Lardy. *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4, 890, 1953.
4. В.Д. Шербухин, Л.И. Миронова, А.В. Кондреева, В.С. Грюнер. *Прикл. биохим. микробиол.*, 6, 4, 467, 1970.

5. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, А.К. Каск. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, № 300, 2I, 1971.
6. Г. Маурер. Диск - электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. "Мир", М., 1971, с.17.
7. Г. Детерман. Гель-хроматография. "Мир", М., 1970, с.30.

K. Pappel, A. Köstner,  
R. Feniksova, A. Tikhomirova

### Immobilization of $\beta$ -Galactosidase

#### Summary

An immobilized preparation of fungal  $\beta$ -galactosidase has been obtained by means of entrapment into polyacrylamide gel lattice. The influence of total monomer concentration and relative amount of cross-links on the activity retention ( $\gamma$ ) and entrapment efficiency ( $\alpha$ ) has been investigated. The best results ( $\gamma = 54\%$ ,  $\alpha = 99\%$ ) have been obtained in the case of 20 pc gel with 4 pc relative content of cross-links. Lactose solution and whey have been hydrolysed in the column packed with prepared gel. After continuous operation at 30°C during 60 days the column retained 95 pc its initial activity.

УДК 547.458.002.237.

П.А. Пяйв, С.А. Рандрют, А.И. Кёстнер

### О ВЛИЯНИИ КИСЛОТЫ НА ПРОЧНОСТЬ ГЕЛЯ ФУРЦЕЛЛАРАНА

Фурцелларан является качественным заменителем обычных желирующих веществ - агароида, агар-агара и пектина [1,2]. При его применении на кондитерской промышленности основным показателем его студнеобразующей способности является прочность образуемого геля.

Изучено, что студнеобразующие свойства полисахаридов морских водорослей зависят в основном от молекулярного веса полисахарида [3 - 6]. Фурцелларан имеет сравнительно низкую стабильность в кислой среде. Однако добавление кислоты необходимо для получения удовлетворительного вкуса кондитерских изделий.

Данных о влиянии условий нагревания растворов фурцелларана на прочность образуемых студней в литературе не имеется, кроме данных в работе Баранова В.И. [7]. Снижение прочности студней фурцелларана в кислой среде объясняется ионообменными реакциями, приводящими к образованию цитрата кальция и фурцелларановой кислоты.

Более подробно изучено изменение прочности геля в кислой среде других полисахаридов морских водорослей [8, 9].

Целью настоящей работы было выяснить основные закономерности кинетики изменения прочности геля фурцелларана в кислой среде. В дальнейшем выясненные закономерности должны стать основой для модификации технологии производства разных видов кондитерских изделий.

#### Материалы и методы

Для проведения опытов использовали стандартный фурцелларан (эстагар) [10], который был получен в цехе эстагара кондитерской фабрики "Калев".

Определение прочности проводилось в пробах, которые содержат 1,25 % фулцелларана (рассчитанного на сухие вещества) и 70 % сахара. Проба приготавлилась и определение прочности студня фулцелларана проводилось стандартным методом на приборе Валенти [10].

К упаренной массе добавлялось требуемое количество кислоты и подкисленную массу выдерживали до выливания в склянки при предусмотренной температуре определенное время. Динамическая вязкость определяется на ротационном вискозиметре "Рэотест" при температуре 80 °С.

#### Результаты и обсуждение

В первых сериях опытов исследовалось изменение прочности геля во времени в зависимости от концентрации кислоты при температуре 80 °С.

Полученные результаты изображены на фигурах 1 и 2.

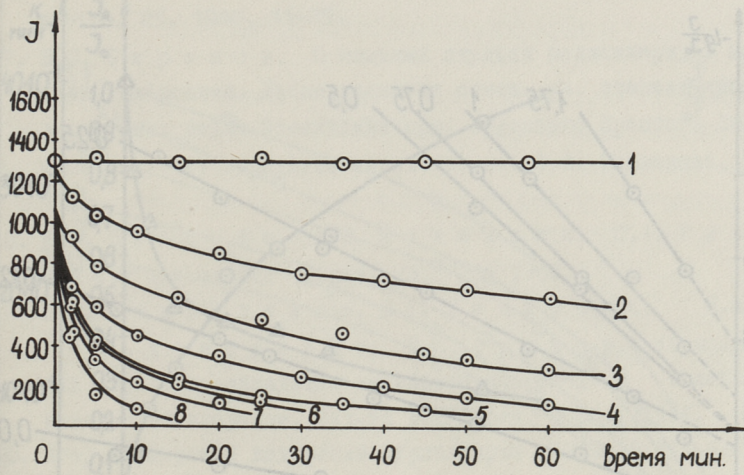
Из данных графиков видно, что в отсутствие кислоты фулцелларан при температуре 80 °С довольно стабилен, но в кислой среде прочность студня фулцелларана резко уменьшается. Скорость уменьшения прочности зависит от концентрации добавленной кислоты.

Анализ этих графиков показывает, что уменьшение прочности можно рассмотреть как двухстадийный процесс. Первая стадия протекает быстро, почти скачком, что не позволяет нашими методами наблюдать за её скоростью. Экстраполяцией прямых на фиг. 2 до оси ординат найдены величины начала скачкообразного снижения прочности. Эти результаты изображены на фиг. 3.

Эта стадия может быть объяснена ионообменными реакциями. Но наблюдаемый скачок может быть обусловлен и процессами гидролиза во время охлаждения пробы и таким образом имеет мнимый характер.

Вторая стадия протекает с измеряемой скоростью и может быть объяснена кислотным гидролизом фулцелларана.

На основе фиг. 2 вычислены значения константы скорости



Фиг. 1. Изменение прочности геля ( J ) во времени в зависимости от концентрации лимонной кислоты. Температура выдерживания массы 80°С.

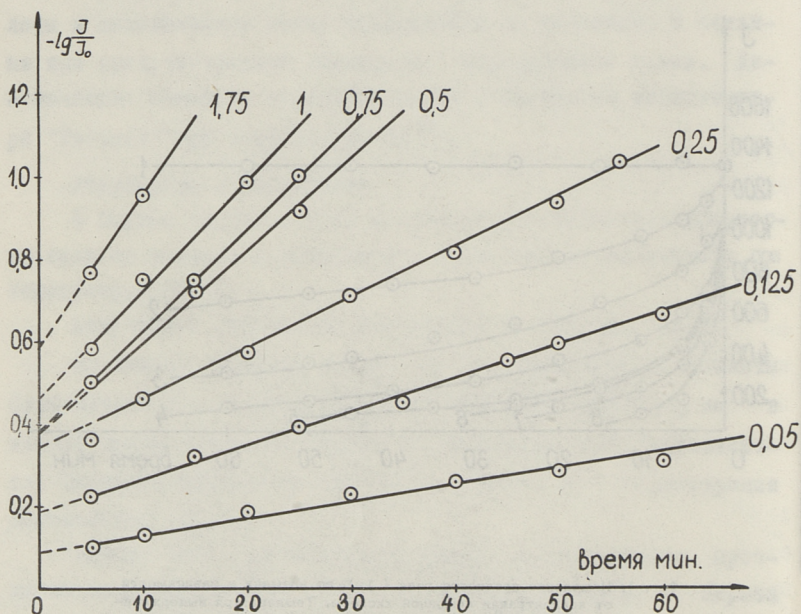
Концентрация лимонной кислоты 1 - 0 %; 2 - 0,05 %; 3 - 0,125 %; 4 - 0,25 %; 5 - 0,5 %; 6 - 0,75 %; 7 - 1,0%; 8 - 1,75%.

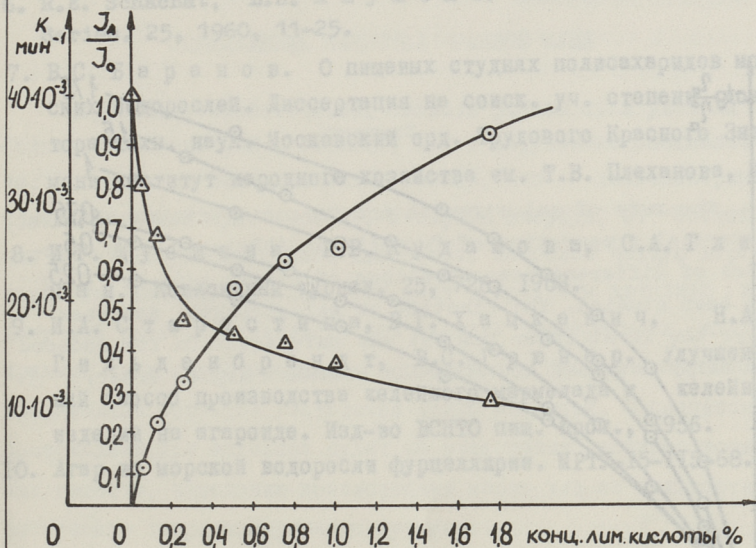
изменения прочности и изображены на фиг. 3 в зависимости от концентрации лимонной кислоты.

Эти данные показывают, что кинетика реакции близка к кинетике первого порядка, где скорость растет монотонно от концентрации лимонной кислоты. Во второй серии опытов исследовалось изменение вязкости раствора фурацелларана в тех же условиях.

Полученные результаты изображены на фиг. 4.

Фиг. 4 доказывает, что в случае вязкости не обнаруживается скачкообразного спада и что кинетика изменения вязкости не описывается уравнением первого порядка. Применяе-



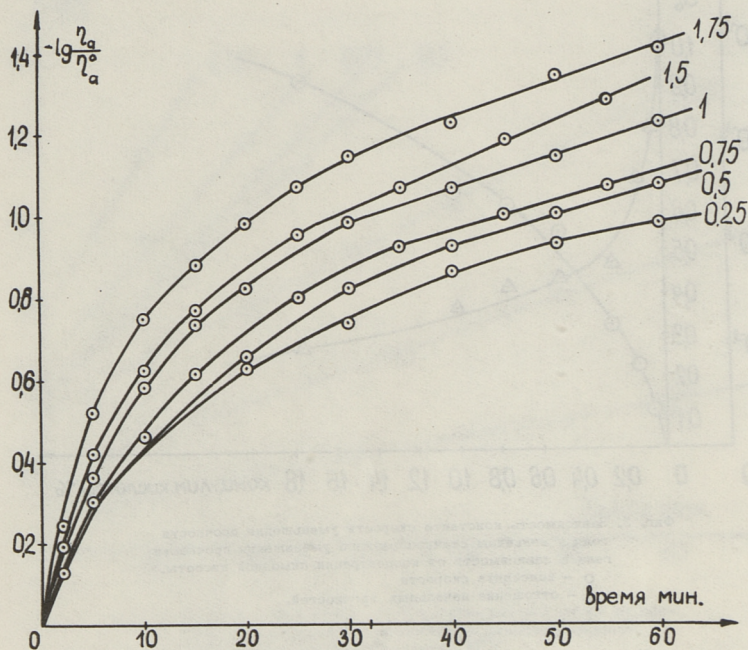


Фиг. 3. Зависимость константы скорости уменьшения прочности геля и величины скачкообразного уменьшения прочности геля в зависимости от концентрации лимонной кислоты.

○ - константа скорости

△ - отношение начальных прочностей.

Авторы выражают благодарность А.Э. Лухакодер за проведение части экспериментальной работы.



Фиг. 4. Изменение вязкости чистого фуцелларана в логарифмической шкале во времени в зависимости от концентрации лимонной кислоты. Температура выдержки массы  $80^{\circ}\text{C}$ .

#### Л и т е р а т у р а

1. Т. J. P a i n t e r. Can. J. Chem., 38, 112, 1960.
2. Новое в зарубежной пищевой промышленности, т. II, "Пищевая пром.", М., 1968, с. 145.



3. R.E. R e e v e s . *Advances in Carbohydrate Chem.* 6, 107, (1951).
4. J.D. F e r g y . *J. Phys. Chem.* 53, 992, (1954).
5. P.H. Н е г м а н s . *Colloid Science*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1949.
6. R.E. Schachat, L.Z. R a у м о n d . *Advances in Chem. Series.* 25, 1960, 11-25.
7. В.С. Б а р а н о в . О пищевых студнях полисахаридов морских водорослей. Диссертация на соиск. уч. степени доктора техн. наук. Московский орд. Трудового Красного Знамени институт народного хозяйства им. Т.В. Плеханова, М., 1973.
8. И.Г. Щ у б щ о в а , Р.В. К у д а ш о в а , С.А. Г л и к м а н . *Коллоидный журнал*, 25, 728, 1963.
9. И.А. С т а р о с т и н а , В.Г. Х а ц к е в и ч , Н.А. Г и л ь д е н б р а н д т , В.С. Г р ю н е р . Улучшенный способ производства желеиногo мармелада и желеиных изделий на агароиде. Изд-во ВСНТО пищ. пром., 1956.
10. Агар из морской водоросли фуццеллярии. МРТУ-15-II5-68.

P. Päiv, S. Randrüüt,

A. Köstner

On the Influence of Acid on Furcellaran Gel Strength

Summary

The rate of gel strength and viscosity decrease of a commercial preparation of furcellaran ("Estagar") in presence of different concentrations of citric acid at 80°C has been studied. The kinetics of gel strength decrease obeys the first order law but the rate equation for reduced viscosity decrease has formally somewhat higher order.

УДК 543.5:664.761.016.8

Т.Л. Лиеберт, В.А. Мандель

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА РЖАНОЙ МУКИ

Изучению технологических свойств ржаной муки уделяли большое внимание как советские, так и зарубежные специалисты. Проведенные исследования показали, что хлебопекарные свойства ржаной муки зависят, в первую очередь, от состояния ее углеводноамилазного комплекса. Наиболее полную характеристику качества ржаной муки дают результаты автолиза водомучной смеси, проводимого при высоких температурах, когда крахмал муки клейстеризуется и становится более атакуемым, а  $\alpha$ -амилаза остается достаточно долго активной. О процессах, происшедших при автолизе судят по накоплению водорастворимых веществ, изменению консистенции массы или ее вязкости, по степени гидролиза ржаного крахмала.

В нашей стране наиболее распространены следующие методы определения качества ржаной муки: определение автолитической активности и метод колобковой выпечки [1]. За рубежом широко применяются: определение числа падения (метод Харберга) [2], колориметрический метод [3] и др. методы, которые могут применяться только в хорошо оснащенных лабораториях.

Наше внимание привлек метод Фреде [4], который очень простой и не требует много времени и специальных приборов. Сущность метода следующее: из воды и муки готовят болтушку, которую ставят в кипящую водяную баню и, энергично перемешивая, держат там определенное время. Потом выливают образовавшийся клейстер на стеклянную плиту, снабженную концент-

рическими кругами. После некоторого времени определяют номер круга, который совпадает с краем расплывающегося клейстера. Этот же номер круга обозначает так называемую клейстерообразующую способность ржаной муки.

По данным автора, имеется хорошая корреляция между величиной числа падения и полученными автором данными. К сожалению, в описании методики не даны конкретные количества муки и воды и их соотношение, время клейстеризации, время, по истечении которого считают величины и диаметры кругов. Поэтому целью нашей работы было уточнить методику Фреде и определить взаимосвязь между показателями данного метода с данными колориметрического метода, автолитической активностью и удельным объемом хлеба [1].

Исследуемые образцы ржаной муки получили с Таллинского хлебозавода № 1. Влажность, содержание белка и зольность исследуемых образцов были в пределах нормы.

Для исследования хлебопекарных свойств ржаной муки по методу Фреде нужны следующие приборы: ультратермостат при  $100^{\circ}$  (или кипящая водяная баня), стаканы с объемом 200 мл, секундомер, стеклянная плита, снабженная концентрическими кружками. Диаметры кругов выбирали следующие: диаметр самого внутреннего круга 40 мм, каждого следующего на 10 мм больше. Количество кругов 15, причем нумерация начинается изнутри.

Водо-мучную болтушку замешивали из следующих количеств муки и воды - 10/50, 10/60 и 10/70 и время клейстеризации варьировали от 2 до 4 мин. По истечении 6 мин после выливания клейстера определяли номер круга, который совпадает с краем расплывающегося клейстера. Оптимальным соотношением оказалось 10/60, оптимальным временем 3 мин. Проведение всего анализа занимает 15 мин.

Для установления корреляционной зависимости различных показателей определяли и активность  $\alpha$ -амилазы [3], автолитическую активность и проводили лабораторные выпечки [1]. Образцы муки характеризовались показателями, приведенными в таблице 1.

Т а б л и ц а I

## Разные показатели качества ржаной муки

Номера образцов	Количество водорастворимых веществ, %	Активность $\alpha$ -амилазы, Е	Клейстерообразующая способность, Е	Удельный объем хлеба, мл/100 г
№ 1	39,1	35,5	8,25	320
№ 2	44,2	36,6	8,00	303
№ 3	58,8	44,5	10,50	290
№ 4	57,8	49,1	11,0	281
№ 5	43,0	31,2	8,00	298
№ 6	28,3	14,0	7,50	341
№ 7	25,7	11,5	7,25	332
№ 8	35,3	34,1	8,50	316

Взаимосвязь между исследованными показателями

Показатели	Коэффициент корреляции, R
Содержание водорастворимых веществ и активность $\alpha$ -амилазы	+ 0,92
Содержание водорастворимых веществ и клейстерообразующая способность	+ 0,91
Содержание водорастворимых веществ и удельный объем хлеба	- 0,94
Активность $\alpha$ -амилазы и клейстерообразующая способность	+ 0,85
Активность $\alpha$ -амилазы и удельный объем хлеба	- 0,90
Клейстерообразующая способность и удельный объем хлеба	- 0,82

Вычисляли коэффициенты корреляции между разными показателями муки. Из данных, приведенных в таблице 2 следует, что существует хорошая корреляция между исследуемыми показателями качества ржаной муки, которая позволит успешно заменить один метод определения качества другим. Поэтому мы советуем метод Фреде для хлебопекарного производства как метод, который не требует сложной аппаратуры, но в то же время достаточно точный и короткий.

Так как по нашим данным клейстерообразующая способность муки зависит от температуры окружающего воздуха, мы советуем брать какую-нибудь высококачественную муку в качестве стандарта и определять качество других образцов в соотношении с ним.

#### В ы в о д ы

I. Уточняли параметры метода Фреде для определения хлебопекарного качества ржаной муки.

2. Между клейстеризующей способностью, содержанием водорастворимых веществ, активностью  $\alpha$ -амилазы и удельным объемом хлеба существует хорошая корреляция. Поэтому мы советуем метод Фреде для широкого использования в хлебопекарной промышленности.

### Л и т е р а т у р а

1. Л.И. Пучкова. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства, "Пищ. пром.", М., 1971.
2. P. S p i l l a n, Ber. 3-er Tagung, 1967, 3, 17.
3. H. F e r t e n, Cereal Chem., 1966, 43, nr. 3, 336.
4. L. F r e d e, Brot und Gebäck, 1970, 5, 94.

В настоящей работе исследовались свойства различных сортов пшеницы и ржи при производстве хлеба. В частности, изучались свойства теста и хлеба, а также влияние различных факторов на качество хлеба. В частности, изучались свойства теста и хлеба, а также влияние различных факторов на качество хлеба.

Для количественной оценки степени черствения хлеба в исследовании динамики этого процесса применяли пять различных методов:

1) денситометрический метод. При определении реологических свойств теста учитываются: объем его деформации; эластическая (остаточная) деформация; упругая деформация как разность между объемом и эластической деформацией; относительная упругость, выражаемая включенной упругой деформацией в процентах от объема [1].

Применялся автоматический денситометр АН 4/2, изготовленный в ГДР.

2) седиментационный метод. Этот метод основывается на определении гидрофильности теста хлеба по способности взвешенности теста к набуханию в воде [2].

T. Liebert, V. Mandel

Determination of the Rye Flour Quality

Summary

The parametres of the method prescribed by Frede have been specified in this paper. It was found that between the paste formation ability, the content of the water-soluble substances, the  $\alpha$ -amylase activity and the volume of bread a good correlation occurred. Based on the results obtained this method can be recommended for a wide use in bread industry.



УДК 664.657

А.Г. Канн, К.Э. Кивиаэд

### ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕРСТВЕНИЯ ХЛЕБА

Черствение хлеба – сложный процесс, сущность и механизм которого до сих пор недостаточно ясны. Степень свежести хлеба можно определять органолептически и при помощи целого ряда объективных методов, так как при хранении закономерно изменяются определенные свойства мякиша хлеба. На процесс черствения хлеба оказывают влияние вид, состав и свойства сырья и специальных добавок, технологический режим приготовления теста и выпечки хлеба, условия хранения хлеба.

В настоящей работе исследовалось влияние некоторых молочных добавок, способа тестоведения и упаковки на черствение хлебо-булочных изделий.

Для количественной оценки степени черствения хлеба и исследования динамики этого процесса применяли пять различных методов:

1) пенетрометрический метод. При определении реологических свойств мякиша учитывается: общая его деформация; пластическая (остаточная) деформация; упругая деформация как разность между общей и пластической; относительная упругость, выражаемая величиной упругой деформации в процентах от общей [1].

Применялся автоматический пенетрометр АП 4/2, изготовленный в ГДР.

2) седиментационный метод. Этот метод основывается на определении гидрофильности мякиша хлеба по способности измельченного мякиша к набуханию в воде [2].

3) определение связанной воды в мякише хлеба [3].

4) определение способности крахмала гидролизываться под воздействием  $\beta$ -амилазы [4]. Применение этого метода позволяет обнаружить изменения в атакуемости зерен крахмала мякише хлеба.

5) органолептическая оценка степени черствости хлеба [5].

Выпечки проводились на Таллинском хлебокомбинате в производственных условиях по рецептурам следующих батонов: "Сакала", "Солённый", "Вадакусай".

При опарном методе тестоведения добавление обезжиренного сухого молока в количестве 2,5 % в тесто несколько ускоряет процесс черствения хлеба, определенный пенетрометрическим и седиментационным методом и дегустацией. Количество связанной воды оказалось в батонах с обезжиренным сухим молоком даже несколько выше, чем в контроле.

При упаковке батонов "Сакала", изготовленных с обезжиренным сухим молоком и без него, в полиэтиленовую пленку разница всех объективных показателей степени черствения хлеба оказалась очень незначительной. При сравнении процесса черствения упакованных батонов и без упаковки в течение 140 часов после выпечки по определенным нами объективным показателям черствения оказалось, что в большинстве случаев упакованные батон оказались "более свежими", хотя разница небольшая. В таблице I приведены результаты определения показателей черствения на пенетрометре для "Соленого батона".

Т а б л и ц а I

Определение черствения на пенетрометре, в мм

Время хранения хлеба после выпечки, час.	Упакованный батон			Батон без упаковки		
	$H_1^{1)}$	$H_2^{2)}$	$H_3^{3)}$	$H_1$	$H_2$	$H_3$
1	2	3	4	5	6	7
4	11,55	8,92	2,63	11,55	8,92	2,63
24	5,54	4,15	1,39	4,80	3,70	1,10

1	2	3	4	5	6	7
48	4,33	3,47	0,86	4,03	3,21	0,82
72	3,60	2,88	0,72	2,93	2,30	0,63
140	3,19	2,53	0,66	2,44	1,89	0,55

- 1)  $H_1$  - общая деформация сжатия мякиша
- 2)  $H_2$  - остаточная деформация мякиша, т.е. пластичность
- 3)  $H_3$  - упругость мякиша ( $H_3 = H_1 - H_2$ ).

Из таблицы 1 следует, что общая деформация сжатия и упругость мякиша упакованных батонов несколько выше, чем у батонов без упаковки.

В таблице 2 приведены данные по атакуемости крахмала  $\beta$ -амилазой.

Т а б л и ц а 2

Атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой "Соленых батонов"  
(мг мальтозы на 1 г сухого вещества)

Время хранения, час	Батоны в упаковке	Батоны без упаковки
4	291	291
24	191	154
48	180	157
72	156	150

Из приведенных данных явствует, что способность крахмала гидролизываться под воздействием  $\beta$ -амилазы у упакованных батонов несколько выше.

Проводились опыты по рецептуре "Вадакусай". В рецептуре контроля сыворотку заменили водой. По показателям пенетрометра и по седиментационному методу черствение батона с сывороткой идет лишь незначительно медленнее, чем без сыворотки. Содержание же связанной воды и особенно атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой в батонах с сывороткой заметно выше. Батоны с сывороткой получали более высокие оценки при дегустации.

Пять серии опытов проводились по рецептуре батонов "Сакала" ускоренным методом на дисперсной смеси [6]. Контролем служили батоны, выработанные опарным методом. Во всех сериях атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой оказалась выше у батонов ускоренного метода (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой у батонов "Сакала"  
(мг мальтозы на 1 г сухого вещества)

Время хранения, час	Опарный метод		Ускоренный метод	
	без упа- ковки	в упаковке	без упаковки	в упаковке
4	150	150	177	177
24	135	138	145	147
48	123	128	142	157
72	118	126,8	138	154
96	119	117	148	152

При определении реологических свойств мякиша хлеба выяснилось, что общая и упругая деформация хлеба, изготовленного опарным способом, несколько выше соответствующих показателей хлеба, изготовленного ускоренным методом тестоведения (табл. 4, I часть).

Т а б л и ц а 4

Показатели пенетromетра для батонов "Сакала", в мм

Способ хранения	Метод тестоведения	Время хранения, час					
		4	24	48	72	96	
1	2	3	4	5	6	7	
Без упаковки	Опарный	$H_1$	8,87	4,27	2,92	2,48	2,22
		$H_2$	6,73	3,28	2,25	1,97	1,48
		$H_3$	2,14	0,99	0,67	0,51	0,74
	Ускоренный	$H_1$	6,83	2,83	2,47	1,90	1,76
		$H_2$	4,45	1,78	1,59	1,27	1,19
		$H_3$	2,38	1,75	0,88	0,63	0,57

1	2	3	4	5	6	7	
Упакованные батоны	Опарный	H <sub>1</sub>	8,87	4,87	3,47	3,28	2,60
		H <sub>2</sub>	6,73	3,81	2,70	2,65	1,94
		H <sub>3</sub>	2,14	1,06	0,77	0,63	0,66
	Ускорен- ный	H <sub>1</sub>	6,83	3,30	2,77	2,17	2,0
		H <sub>2</sub>	4,45	2,23	2,09	1,65	1,3
		H <sub>3</sub>	2,38	1,07	0,68	0,55	0,70

Хотя общая деформация скатия и упругая деформация мякиша при опарном методе выше, после 96-часового хранения у хлеба ускоренного метода общая деформация составляет 25,8 % от первоначальной, а у хлеба опарного метода - 25,0 %, соответствующие величины упругости 34,6 % и 23,9 % от первоначальной. Таким образом, процесс черствения хлеба ускоренного тестоведения с дисперсной смесью идет несколько медленнее.

По показателям содержания связанной воды и седиментационным методом существенной разницы между упомянутыми методами тестоведения не замечалось.

Параллельно с изучением влияния метода тестоведения проводилось исследование влияния упаковки на процесс черствения хлеба. В обоих случаях тестоведения упакованные батоны сохранялись лучше (таблицы 3, 4).

При дегустации существенной разницы между батонами, изготовленными опарным и ускоренным методами, не обнаружили.

#### В ы в о д ы

1. Из примененных методов определения степени черствения более целесообразными оказались пенетрометрический метод и определение атакруемости крахмала  $\beta$ -амилазой.
2. Добавление обезжиренного сухого молока в тесто в количестве 2,5 % несколько ускоряет процесс черствения хлеба при опарном методе тестоведения.
3. Применение сыворотки в тесте не оказывает существенного влияния на процесс черствения.

4. При применении ускоренного метода тестоведения процесс черствения несколько задерживается, при этом разница при определении черствения пенетрометрическим методом, по связанной воде и по седиментационному методу незначительная, но атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой значительно выше при ускоренном методе.
5. Упаковка батонов в полиэтиленовую пленку во всех случаях в некоторой степени способствовала сохранению свежести хлеба.

#### Л и т е р а т у р а

1. Л.И. Пучкова. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства. "Пищ. пром.", М., 1971.
2. Б.Г. Сарычев. Технология и технохимический контроль хлебопекарного производства. "Пищ. пром.", М., 1960.
3. М.И. Княгиничев и др. Хлебопекарная и кондитерская промышленность, II, 8, 1970.
4. Р.Г. Рахманкулова, З.Ф. Фалунина. Пищ. технол. Изв. ВУЗов, 1960, № 2.
5. Н.П. Козьмина, Т.Н. Ильинская. Современные аспекты черствения хлеба, М., 1973.
6. И.А., Ганзурова, А.Г. Канн, Р.Х. Кяэри, Л.О. Рауд. "Хлебопекарная и кондитерская промышленность", № 4, 1971.

Investigation of the Staling of Bread

A. Kann, K. Kiviaed, M. N. Zesman,  
P. E. Arsen, E. A. Dakheluu

ВОЗМОЖНОСТИ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА МЯСНЫХ ТОВАРОВ

Summary

Из предприятий мясной промышленности удаляется большое количество отходов полуфабрикатов и готовых изделий.

The effect of different methods of maturity of bread, of additions of whey and milk powder and the effect of wrapping have been investigated.

Four objective methods of determination of bread staling and the results of testing have been used.

В данной работе исследовалось применение некоторых протеолитических ферментов для улучшения качества мясных товаров (полуфабрикатов и готовых изделий), изготовленных из мяса разных сортов.

В качестве протеолитических ферментов применялись протерины ЦИМ, пепсин и биопрепарат ТНН. Для опытов протеринки мяную и лопаточную часть говяжьей туши, из которой готовились порционные блюда. Мясо получало с Таллинского мясокомбината.

В опытах определяли действия различных ферментных препаратов на свойства мяса, устанавливали оптимальные количества ферментных препаратов, оптимальную температуру и время действия ферментов, изучались различные способы ферментирования, применяя мясо различного качества с различными размерами, исследовалось действие разных способов термической обработки на качество готовых продуктов. Для оценки сохранности упакованных готовых продуктов проводился эксперимент





УДК 637.523

А.Г.Канн, К.А.Каск, М.В.Ээсмаа,  
Р.Е.Ахвен, Е.А.Пяхлапуу

## ВОЗМОЖНОСТИ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА МЯСНЫХ ТОВАРОВ

На предприятиях мясной промышленности уделяется большое внимание выработке полуфабрикатов и кулинарных изделий как для предприятий общественного питания, так и для домашнего пользования. Порционные блюда изготавливаются лишь из лучших сортов мяса. Целесообразным представляется изучение возможностей обработки некоторых низкокачественных частей говяжьей туши с целью их применения для приготовления порционных блюд.

В данной работе исследовалось применение некоторых протеолитических ферментов для улучшения качества мясных товаров (полуфабрикатов и готовых вторых блюд), изготовленных из мяса низких сортов.

В качестве протеолитических ферментов применяли прототерризин ПЮх, папаин и биопрепарат ТПИ. Для опытов применяли шейную и лопаточную часть говяжьей туши, из которых готовили порционные блюда. Мясо получали с Таллинского мясокомбината.

В опытах определяли действие различных ферментных препаратов на свойства мяса, установили оптимальные количества ферментных препаратов, оптимальную температуру и время действия ферментов, изучались различные способы ферментирования, применяли мясо различного качества с различными размерами, исследовалось действие разных способов термической обработки на качество готовых продуктов. Для оценки сохранности упакованных готовых продуктов проводили кроме органо-

лептического анализа еще микробиологический анализ после определенных сроков хранения.

Для ферментирования применяли четыре метода:

1) куски мяса (от 50 до 150 г) посыпали с обеих сторон смесью ферментного препарата и поваренной соли. Время ферментирования мяса варьировалось от 10 мин до 24 часов, температуру ферментирования изменяли от +4 до +60°.

2) куски мяса (от 50 до 150 г) отбивали с обеих сторон металлической тяткой и выдерживали в растворе ферментного препарата и поваренной соли, концентрацию которых изменяли. Время выдерживания варьировали от 30 мин до 24 часов, температуру от 4 до 60 °С.

3) то же самое проводилось при механическом перемешивании кусков мяса в ферментном растворе. При этом изменяли еще скорость рабочего органа мешалки и время перемешивания от 15 минут до 2 часов.

4) при введении в мясо ферментного раствора шприцеванием применяли куски мяса от 2 до 4 кг. Уколы проводили по 5 мл через 2-3 см. В опытах варьировали количество ферментного препарата, время ферментирования от 0,5 до 24 часов, температуру ферментирования от 4 до 60°.

Для контрольных проб куски мяса весом 50-150 г отбивали с обеих сторон металлической тяткой, посыпали солью и давали на термическую обработку.

Подготовленные полуфабрикаты взвешивали и обрабатывали термически: жарили в большом или небольшом количестве жира.

В сырье и готовых изделиях определяли содержание жира по методу Гербера [1]. Во всех случаях проводили дегустацию готовых продуктов в 25-балловой системе. Максимальные оценки были: за вкус - 10 баллов, за аромат - 5 баллов, за консистенцию - 5 баллов, за внешний вид - 5 баллов. После термической обработки мясо упаковывали в вакууме, хранили при температуре +4 - +6° и через каждые 2-3 дня проводили органолептические и микробиологические анализы.

Самыми подходящими методами ферментирования оказались во всех случаях введение ферментного раствора шприцеванием

или выдерживание мяса в ферментном растворе при перемешивании.

При применении прототерризина ШОх оптимальным количеством фермента было 5 - 7 Е/100 г мяса, время ферментирования от 40 минут до 1 часа в зависимости от способа ферментирования. Скорость работы мешалки при перемешивании - 35 об/мин. Время термической обработки ферментированного мяса 5-8 минут, контроля 8-10 минут, выход соответственно 50-56 % и 48-52 %. Дегустационные оценки ферментированного мяса были на уровне с контролем или несколько выше. Особенно отмечалось улучшение консистенции мяса.

Папаин применяли в количестве 1,3-5 Е/100 г мяса. Дегустационные оценки готовых продуктов при применении папаина оказались всегда низкими. При условиях ферментирования, где добивалось смягчение мяса, появилась неприятная мукообразная консистенция мяса. Применение папаина оказалось нецелесообразным.

Самыми лучшими оказались результаты с применением биопрепарата. Биопрепарат получали выращиванием гриба *Asp. oryzae* 3-9-15 глубинным способом на сыворотке. Получение биопрепарата и исследование его свойств проводилось в лаборатории пищевых продуктов ТПИ [2]. Применяли биопрепарат с активностью 25 Е/100 мл, рН биопрепарата было 8,6-8,8, содержание сухих веществ 5 %.

Проводились серии опытов по разным способам ферментирования с различными количествами биопрепарата. Самыми подходящими оказались введение биопрепарата шприцеванием (3-5 Е/100 г мяса) и выдерживание мяса в ферментном растворе при перемешивании. Средние данные 5 серий опытов с биопрепаратом при ферментировании с перемешиванием кусков мяса приведены в табл. I.

При увеличении времени ферментации свыше 60 мин куски мяса деформировались и дополнительного положительного эффекта в других показателях не добивались. При ферментации в течение 10-35 мин действие фермента было мало выражено.

Т а б л и ц а I

## Действие биопрепарата на мясо

Время ферментирования, мин	Способ термической обработки	Время термической обработки, мин			Выход, %			Дегустационная оценка		
		концентрация фермента Е/100г мяса		конт-роль	концентрация фермента Е/100г мяса		конт-роль	концентрация фермента Е/100г мяса		конт-роль
		3,45	5		3,45	5		3,45	5	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
40	1. В большом количестве жира	9	8	10	68,4	61,3	58,1	19,0	21,0	15,5
40	2. В большом количестве жира	8	7	9	60,7	53,8	49,4	18,0	18,5	16,0
60	1. В большом количестве жира	7	9	10	66,7	79,0	52,8	17,0	20,0	15,5
60	2. В большом количестве жира	8	7	10	61,7	54,5	42,9	18,0	18,5	16,0

Оптимальным временем ферментирования оказалось 40-50 мин, нужным количеством ферментного препарата 3 - 5 Е/100 г мяса.

Самой подходящей температурой во всех опытах оказалась 20-25°.

На основе полученных данных проводились полупромышленные опыты на Таллинском мясокомбинате. Применяли прототеризин ПЮх и биопрепарат. Обработку мяса проводили в установленных оптимальных условиях. После термической обра-

ботки мясо упаковывалось в вакууме и сохранялось при температуре  $+4 - +6^{\circ}$  в течение 14 дней. Периодически через 1,3, 5,7,10 и 14 дней проводились дегустации и микробиологические анализы (определяли общее количество микроорганизмов, количество грибов и *Bact. proteus*). Во всех случаях готовые продукты получали высокие дегустационные оценки, а количество микроорганизмов не превышало норм.

### В ы в о д ы

1. При обработке низкокачественного мяса перед термической обработкой протеолитическими ферментами представляется возможным его применение для приготовления порционных блюд.

2. Подходящими ферментными препаратами для обработки мяса оказались прототерризин ПЮх и биопрепарат ТПИ.

3. Подходящими методами ферментирования оказались введение ферментного раствора шприцеванием или выдерживание мяса в ферментном растворе при перемешивании.

4. Оптимальные условия действия этих ферментов при разных способах ферментирования приведены выше.

5. Из способов термической обработки **советуют обжаривание в большом и небольшом количестве жира.**

6. Готовые продукты целесообразно хранить в вакуумупаковке при температуре  $+4 - +7^{\circ}$ .

### Л и т е р а т у р а

1. А.И. Б у р ш т е й н. Методы исследования пищевых продуктов, Госмедиздат УССР, Киев, 1963.
2. К.А. К а с к, Х.Я. К и п п е р, Т.Л. Л и е б е р т, К.К. Р а я, А.Г. К а н н, М.И. К р э е н. Способ получения комплекса амилалитических и протеолитических ферментов, Авт. свид. № 320528, 20 авг. 1971.

A. Kann, K. Kask, M. Eesmaa

## Possibilities of Improving the Quality of Meat

### Products

#### Summary

Low-quality meat had been treated before the thermal processing with preparations of proteolytic enzymes prototerrisin P 10 x and biopreparation developed at the TPI.

The injection of enzyme solution by means of a syringe or keeping the meat in enzyme solution by continuous stirring have turned out to be suitable methods of fermentation.

Optimal conditions of the influence of enzymes have been determined.

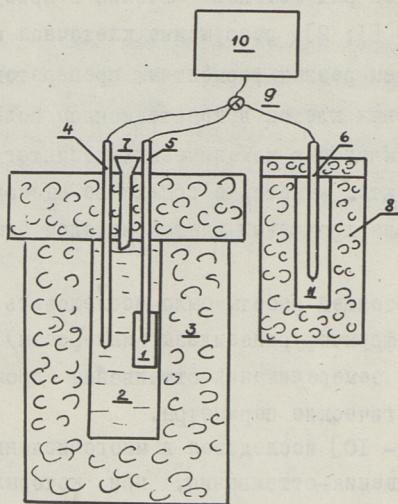
ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА  $\beta$ -ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ ИЗ ПИВНЫХ  
ДРОЖЕЙ МЕТОДОМ ЗАМОРАЖИВАНИЯ - ОТТАИВАНИЯ ДРОЖЕВЫХ  
КЛЕТОК

Для получения фермента  $\beta$ -фруктофуранозидазы из пивных дрожжей известен ряд методов: автолиз в присутствии разных клеточных ядов [1; 2], разрушение клеточной оболочки дрожжей под влиянием разных ферментных препаратов [2; 3]; разрушение дрожжевых клеток в кавитационном поле, разрушение дрожжевых клеток в механических дезинтеграторах [5]. В литературе имеются некоторые ссылки на возможности выделения инвертазы из дрожжевых клеток методом замораживания-оттаивания [5].

Целью настоящей работы было исследовать возможности выделения  $\beta$ -фруктофуранозидазы (инвертазы) из дрожжевых клеток методом замораживания-оттаивания дрожжей и разработать технологические параметры.

Мазур [6 - 10] исследовал в многочисленных работах условия замораживания-оттаивания, при которых дрожжевые клетки погибают и при которых остаются живыми. Образование внутриклеточных ледяных кристаллов при замораживании и их перекристаллизация при оттаивании, а также изменение кинетики внутриклеточных биохимических процессов при сильном падении температуры (термический шок) считаются основными причинами гибели клеток [6; 11]. Погибшие клетки сохраняют свой первоначальный внешний вид. Замечены некоторые изменения в структуре клеточной оболочки и уменьшение объема клетки [8].

В настоящей работе использовали чистую культуру пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расы XI, выращенной 48 ч на пивном сусле плотностью 8<sup>0</sup>Б при температуре + 30 °С. Опытная установка для замораживания дрожжей изображена на фигуре I. Дрожжи (23 % с.в.) тонким слоем в полиэтиленовом мешочке перевели в среду замораживания. В качестве среды замораживания использовали этанол, охлажденный добавлением твердой CO<sub>2</sub>. Температуры дрожжей и этанола измеряли хромел-алюмелевыми термопарами и регистрировали при помощи самопишущего микровольтметра EZ-10. За изменениями дрожжевых клеток следили при помощи лабораторного микроскопа.



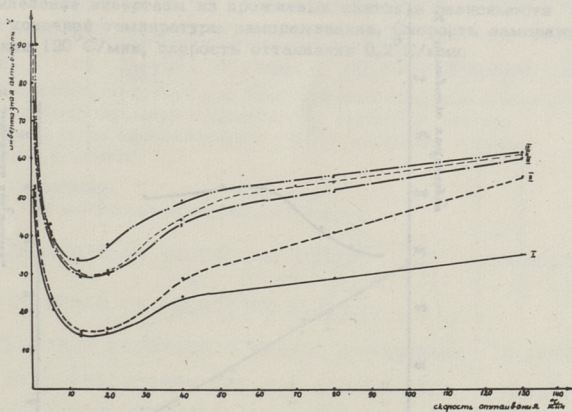
Фиг. 1. Опытная установка для замораживания-оттаивания дрожжей.

- 1 - дрожжи в полиэтиленовом мешке; 2 - переохлажденный этанол;  
 3, 8 - изоляция из пенопласта; 4, 5, 6 - термопары;  
 7 - воронка для добавления твердой углекислоты; 9 - переключатель; 10 - самопишущий микровольтметр E-10.



В течение работы использовали разные партии дрожжей, инвертазная активность которых колебалась в довольно широких пределах. Для сравнения экспериментальных данных из каждой партии дрожжей делали анализ в присутствии 5 % бензола, что является классическим методом выделения инвертазы из дрожжей [2]. Инвертазную активность, выделенную из дрожжей при замораживании-оттаивании, сравнивали с активностью контрольного автолизата и выражали в процентах. Инвертазную активность определяли из профильтрованных проб микрометодом [1].

Предварительными опытами выяснили, что выделению инвертазы из дрожжевых клеток способствуют быстрое замораживание до возможно низких температур и медленное оттаивание. При многократном замораживании-оттаивании дрожжей увеличивается выделение инвертазы.



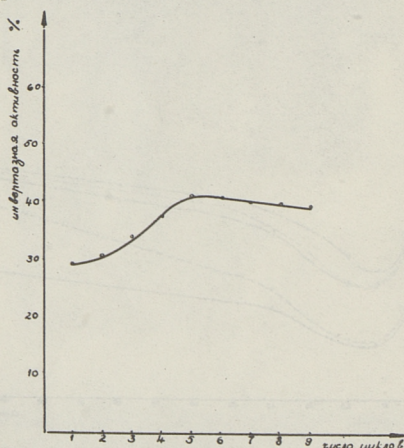
Фиг. 2. Выделение инвертазы из дрожжевых клеток при многократном замораживании - оттаивании дрожжей в зависимости от скорости оттаивания.

- 1 - однократное замораживание-оттаивание;
- 2 - двукратное замораживание-оттаивание;
- 3 - трёхкратное замораживание-оттаивание;
- 4 - четырёхкратное замораживание-оттаивание;
- 5 - пятикратное замораживание-оттаивание.

Выделение инвертазы при многократном замораживании-оттаивании дрожжей в зависимости от скорости оттаивания изображено на фигуре 2.

Замораживали скоростью  $140 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$  до температуры  $-70^{\circ}\text{C}$ . С увеличением скорости оттаивания от  $0,1$  до  $+10 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$  уменьшается количество выделяемой инвертазы. При средних скоростях оттаивания ( $10-20 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ) выделение инвертазы небольшое. С увеличением скорости оттаивания до  $140 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$  выделение инвертазы возрастает, но остается меньшим, чем при очень медленном оттаивании ( $0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ).

Для выяснения оптимального количества циклов замораживания-оттаивания дрожжи замораживали-оттаивали десять раз. Скорость замораживания была  $100 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ , конечная температура  $-40^{\circ}\text{C}$ , скорость оттаивания  $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ . Выделение инвертазы при этом приведено на фигуре 3. Оптимальной следует считать пятикратное замораживание-оттаивание.

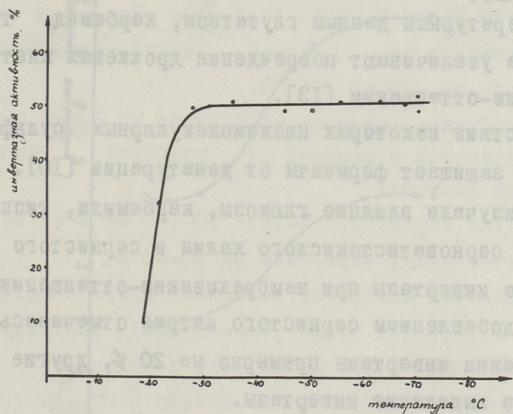


Фиг. 3. Выделение инвертазы дрожжевых клеток в зависимости от количества циклов замораживания-оттаивания.

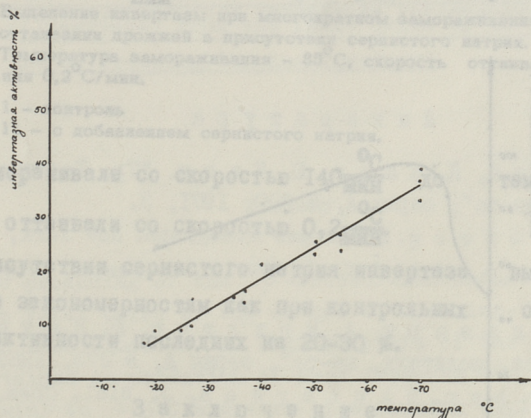
Для выяснения требуемой конечной температуры замораживания провели две серии опытов.

Дрожжи замораживали скоростью  $120 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$  и оттаивали при первой серии со скоростью  $0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ , при второй серии  $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ . Конечные температуры замораживания были в пределах от  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Выделение инвертазы изображено на фигурах 4 и 5. При скором



Фиг. 4. Выделение инвертазы из дрожжевых клеток в зависимости от конечной температуры замораживания. Скорость замораживания  $120^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , скорость оттаивания  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .



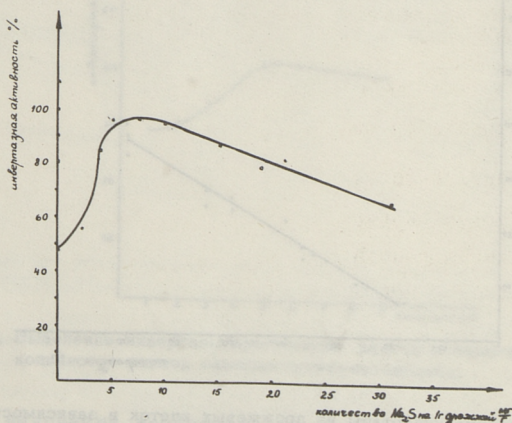
Фиг. 5. Выделение инвертазы из дрожжевых клеток в зависимости от конечной температуры замораживания  $120^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ , скорость оттаивания  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

замораживании и очень медленном оттаивании ( $0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ) выделение инвертазы не зависит от конечной температуры замораживания в пределах от  $-20$  до  $-70^{\circ}\text{C}$ . При более быстром оттаивании ( $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ) выделение инвертазы зависит от конечной температуры линейно.

По литературным данным глутатион, карбамид, тиокарбамид, глюкоза увеличивают повреждения дрожжевых клеток при замораживании-оттаивании [13].

Присутствие некоторых низкомолекулярных сульфгидрильных веществ защищает ферменты от денатурации [10]. В настоящей работе изучали влияние глюкозы, карбамида, тиокарбамида, глутатиона, серноватистокислого калия и сернистого натрия на выделение инвертазы при замораживании-оттаивании дрожжей. В пробах с добавлением сернистого натрия отмечалось увеличение выделения инвертазы примерно на 20 %, другие примеси не влияли на выделение инвертазы.

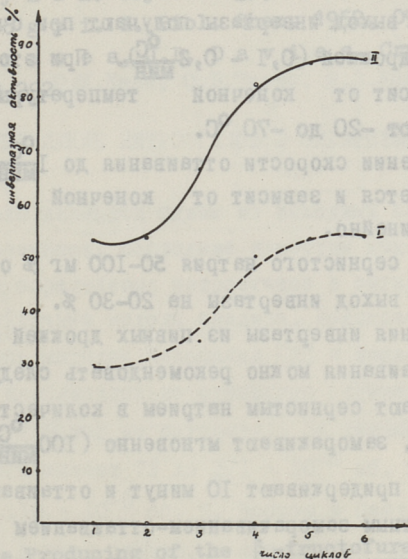
Выделение инвертазы из дрожжей в зависимости от концентрации добавляемого сернистого натрия изображено на фигуре 6. Замораживали со скоростью  $140 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$  до температуры



Фиг. 6. Выделение инвертазы при замораживании-оттаивании дрожжей в зависимости от добавляемого количества сернистого натрия.

- 67 °C. Оттаивали со скоростью  $0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ . Оптимальной следует считать 50-100 мг % сернистого натрия от веса дрожжей.

Выделение инвертазы при многократном замораживании-оттаивании дрожжей в присутствии сернистого натрия изображено на фигуре 7.



Фиг. 7. Выделение инвертазы при многократном замораживании-оттаивании дрожжей в присутствии сернистого натрия. Температура замораживания - 35 °C, скорость оттаивания  $0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ .

1 - контроль

II - с добавлением сернистого натрия.

Дрожжи замораживали со скоростью  $140 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$  до температуры - 35 °C и оттаивали со скоростью  $0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ .

В присутствии сернистого натрия инвертаза выделяется по этим же закономерностям как при контрольных образцах, превышая активности последних на 20-30 %.

### З а к л ю ч е н и е

Дрожжевые клетки довольно устойчивы к замораживанию-оттаиванию при медленном замораживании ( $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ).

При очень скором замораживании ( $50 - 140 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ) разрушение структур клеточной оболочки и выделение инвертазы зависят от конечной температуры замораживания и от скорости оттаивания.

Наибольший выход инвертазы получают при очень медленном оттаивании дрожжей ( $0,1 - 0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ). При этом выход инвертазы не зависит от конечной температуры замораживания в пределах от  $-20$  до  $-70$   $^{\circ}\text{C}$ .

При увеличении скорости оттаивания до  $1 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$  выход инвертазы уменьшается и зависит от конечной температуры замораживания линейно.

Добавление сернистого натрия  $50-100$  мг % от веса дрожжей увеличивает выход инвертазы на  $20-30$  %.

Для выделения инвертазы из пивных дрожжей методом замораживания-оттаивания можно рекомендовать следующую схему. Дрожжи размещивают сернистым натрием в количестве  $50$  мг % от веса дрожжей, замораживают мгновенно ( $100 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ ) до температуры  $-35$   $^{\circ}\text{C}$ , придерживают  $10$  минут и оттаивают скоростью  $0,2 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{МИН}}$ . Пятикратным замораживанием-оттаиванием выделяется до  $140$  % инвертазной активности контрольного автолизата.

#### Л и т е р а т у р а

1. А. Э р и н, К. К а с к, Ю. К а н н. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", серия А, № 300, 1971, 3.
2. С. N e u b e r g. *Invertase Monograph*. New York, 1946.
3. J. O. L a m p r e n, *Antonie van Leeuwenhoek*. 1968, 34, 1-18.
4. А. Т а л ь в а р и, А. М ю х л и н г, Ю. К а н н. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", серия А, № 273, 1969, 27.
5. K e s s l e r, N i s k e r s o n. *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 2281.
6. P. M a z u r. *Annals of the New York Academy of Science*, 1961, 85, 2, 610.
7. P. M a z u r. *J. Bacteriol.*, 1961, 82, 5, 662-671.
8. P. M a z u r. *J. Bacteriol.*, 1961, 82, 5, 673-684.

9. P. M a z u r. Annals of the New York Academy of Science, 1965, 125, 658-676.
10. P. M a z u r. Cryobiology, 1965, 2, 4, 181-192.
11. H. M e r y m a n. Cryobiology, 1966, New York, 520.
12. M. S o m o g y i. J. Biol. Chem. 1952, 095, 1, 19.
13. K.I.N. G r a v e s, J.D. D a v i e s. Cryobiology, 1967, 3, 4, 283-292.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРОГАЗОВ В СИГАРЕТНОМ ДМЕ

Нитрогены являются одним из основных компонентов при синтезе нитрозаминов. Последнее известно как сильное канцерогены. Для определения нитрогенов в сигаретном дыме исследованы различные методы анализа. Боксховен и Ниссон [1] исследовались методом Сальмана [2] и нашли, что содержание  $\text{NO}$  и  $\text{NO}_2$  приблизительно одинаково (суммарное содержание от 140 до 235 мкг на сигарету). По данным A. Erin содержание  $\text{NO}$  составляет 72 до 271  $\cdot 10^{-6}$  об. % и содержание  $\text{NO}_2$  от 19 до 118  $\cdot 10^{-6}$  об. %. Бурел и Кент [4]  $\text{NO}_2$  обнаружил в дыме [5] определяли суммарное содержание нитрогенов в сигаретном дыме. По их данным содержание  $\text{NO}$  и  $\text{NO}_2$  составляет от 45 до 560 мкг на сигарету. Мурет и др. [6] определяли содержание  $\text{NO}$  при помощи метода диффузионно-интерференции.

A. Erin

### The Producing of the $\beta$ -fructofuranosidase (invertase) from the Yeast Cells by the Method of Freezing-thawing Treatment

#### Summary

The producing of the  $\beta$ -fructofuranosidase (invertase) from the yeast cells by the method of freezing-thawing treatment has been studied. The highest yield of the enzyme has been obtained in condition of fast freezing of yeast cells ( $140^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) to  $-35^{\circ}\text{C}$  and very slow thawing ( $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ). By adding 50-100 mg% sodium sulfide to yeast the yield of invertase enhanced 20-30 % in comparison with control.





Ю.М.Канн, О.В.Таутс, Р.Э.Калве, Т.Г.Паалме

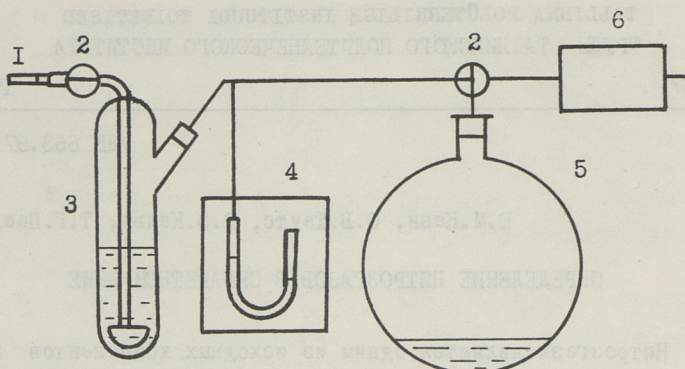
### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРОЗГАЗОВ В СИГАРЕТНОМ ДЫМЕ

Нитроггазы являются одним из исходных компонентов при синтезе нитрозаминов. Последние известны как сильные канцерогены. Для определения нитроггазов в сигаретном дыме использованы различные методы анализа. Боксховен и Ниесен [1] воспользовались методом Сальцмана [2] и нашли, что содержание NO и NO<sub>2</sub> приблизительно одинаково (суммарное содержание от 140 до 255 мкг на сигарету). По данным Тада [3] содержание NO составляет 72 до 271 · 10<sup>-6</sup> об. % и содержание NO<sub>2</sub> от 19 до 118 · 10<sup>-6</sup> об. %. Норман и Кейт [4] NO<sub>2</sub> обнаружили только в виде следов, а содержание NO колебалось от 442 до 1008 · 10<sup>-6</sup> об. %. Низкое содержание NO<sub>2</sub> объясняется малой скоростью окисления NO.

Шмидт и др. [5] определили суммарное содержание нитроггазов в сигаретном дыме. По их данным содержание NO и NO<sub>2</sub> составляет от 45 до 580 мкг на сигарету. Неурат и др. [6] определяли содержание NO при помощи метода хемолюминесценции. По их данным содержание NO колеблется от 148 до 1590 · 10<sup>-6</sup> об. %.

Чтобы найти достоверное содержание NO и NO<sub>2</sub> в сигаретном дыме, была разработана методика [7], которая основывается на методике Сальцмана, но модифицирована дополнительной очисткой проб дыма от примесей.

Аппаратура для определения NO и NO<sub>2</sub> в сигаретном дыме изображена на фиг. 1. Результаты определения приведены в таблице 1.



Фиг. 1. 1 - сигарета,  
 2 - краны,  
 3 - адсорбер,  
 4 - вакуумметр,  
 5 - эвакуационная колба,  
 6 - вакуум-насос.

Из полученных данных явствует, что содержание нитрозгазов как в эстонских, так и в болгарских сигаретах сравнительно низкое. Чем выше качество сигарет, тем ниже они содержат нитрозгазов. Наряду с  $\text{NO}$  и  $\text{NO}_2$  по методике Стойа [8] определено и содержание нитритов и нитратов в табаке соответствующих сигарет. Содержание нитритов оказалось незначительным (5-10 мкг), в то время как содержание нитратов было довольно высокое. Содержание нитратов хорошо коррелируется с содержанием  $\text{NO}_2$  в дыме. Это подтвердили и опыты, в которых к табаку сигарет перед их сжиганием добавлялось  $\text{NaNO}_3$ .

Из вышеизложенного можно заключить, что образование  $\text{NO}_2$  в сигаретном дыме главным образом связано с содержанием  $\text{NO}_3^-$  в табаке.

Содержание общего азота в исследуемых образцах болгарских сигарет было ниже, чем в эстонских.

## Результаты анализа дыма и табака некоторых сигарет

Марка сигарет	Содержание в дыме мкг/на сигарету			Содержание NO <sub>2</sub> <sup>+</sup> + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> в табаке мгк/на сигарету	Содержание общего азота %	Вес сигареты г
	NO <sub>2</sub>	NO*	NO <sub>2</sub> +NO			
БТ (болгарские) (с фильтром)	40-45	120-130	160-175	357-432	1,7 - 1,8	1,02 - 1,07
"Таллин" (с фильтром)	30-34	175-180	205-224	410-460	1,9 - 2,0	1,13 - 1,18
"Экстра" (с фильтром)	46-51	184-216	230-260	505-565	2,2 - 2,3	1,15 - 1,20
"Цалъ" (без фильтра)	50-62	210-240	260-300	446-535	2,4 - 2,7	0,84 - 0,90
"Ту-134" (болг.) (без фильтра)	70-80	190-210	260-290	775-835	1,6 - 1,8	1,09 - 1,15
"Тудуке" (без фильтра)	50-60	200-225	255-290	650-680	2,3 - 2,7	0,81 - 0,90
"Ажда" (болг.) (с фильтром)	70-80	225-235	295-315		1,6 - 1,7	1,01 - 1,04
"Ориент" (с фильтром)	35-40	170-190	200-226		2,2 - 2,3	1,00 - 1,09
"Вана Тормас" (с фильтром)	50-60	220-250	270-310		2,4 - 2,7	1,00 - 1,07

\* Пересчитана на NO<sub>2</sub>

Что касается возможностей снижения содержания нитро-  
газов в табачном дыме, то одними из лучших считаются фильтры  
с активированным углем [5]. Однако имеются некоторые пред-  
положения о том, что нитрогазы, реагируя с органическими  
радикалами в зоне горения сигарет, могут ингибировать син-  
тез ароматических углеводов, включая и канцерогенные  
[9]. Данный вопрос нуждается в более тщательном изучении.

### В ы в о д ы

1. Определено содержание нитрогазов в некоторых об-  
разцах болгарских и эстонских сигарет. Общее содержание их  
оказалось в пределах от 160 до 310 мкг на сигарету.

2. Содержание  $\text{NO}_2$  в дыме хорошо коррелируется с содер-  
жанием  $\text{NO}_3^-$  в исходном табаке сигарет.

3. Определено содержание  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  и общего азота в та-  
баке некоторых сигарет.

### Л и т е р а т у р а

1. C. V o k h o v e n, M. N i e s s e n. Nature, 192, 458, 1961.
2. B. E. S a l t z m a n n. Anal. Chem., 26, 1949, 1954.
3. O. T a d a. Rep. Inst. Sci. Lab. Kurashiki, 60, 7, 1962.
4. V. N o r m a n, C. K e i t h. Nature, 205, 915, 1965.
5. G. A. S m i t h, P. I. S u l l i v a n, W. I. I r v i n e. Ana-  
lyst, 92, 452, 1967.
6. G. B. N e u r a t h, M. D ü n g e r.  
N - Nitroso Comp. in environment, 1974.
7. J. K a n n, O. T a u t s, R. K a l v e, T. P a a l m e.  
N - Nitroso Comp. in environment, 1974, p. 225.
8. N. v a n S t o y a. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 65, 144,  
1969.
9. D. H o f f m a n n, G. R a t h k a m p.  
Beitr. Tabakforsch., 4, 124, 1968.

Measurement of the Nitrogen Oxides in  
Cigarette Smoke

Summary

The nitrous gases are possible precursors of nitrosamines, the toxic and cancerogenic properties of which are well-known.

The smoke of 10 different cigarettes have been studied.

It was found that the smoke of some cigarettes consists of 160 to 310 micrograms of nitrogen dioxide per cigarette.

The water-soluble nitrate content of a cigarette and the nitrogen dioxide concentration in the smoke produced by it are generally proportionally related.



УДК 664.0:543.81:543.54

Ю.М.Канн, О.В.Таутс, К.К.Рая, К.А. Каск

ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ НИТРОЗАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Сообщение II

В предыдущем сообщении [I] нами был изложен краткий литературный обзор о проблеме N-нитрозаминов в пищевых продуктах и оптимальных условиях разделения модельных смесей нитрозаминов на газовом хроматографе.

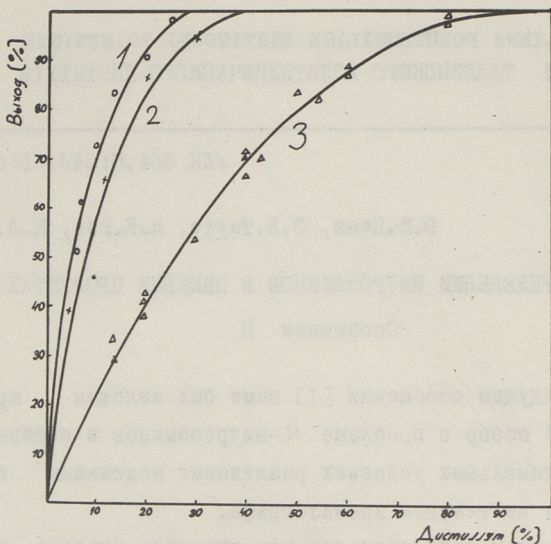
В настоящем сообщении главное внимание уделено разработке методики определения N-нитрозаминов в пищевых продуктах.

Разработанная методика состоит из следующих этапов:

1. Выделение N-нитрозаминов из пробы дистилляцией с водяным паром.
2. Вторичная дистилляция из кислой среды.
3. Дистилляция из щелочной среды.
4. Экстракция метиленхлоридом.
5. Упаривание экстракта.
6. Суммарное и индивидуальное определение летучих с водяным паром N-нитрозаминов.

Проба в среднем количестве 100 г измельчалась в гомогенизаторе с прибавлением 200 мл дистиллированной воды и 70 г NaCl. Как видно из фигуры 1, добавление поваренной соли улучшает переход летучих с водяным паром N-нитрозаминов в дистиллят.

Отбираемый дистиллят в количестве 150 мл подвергался вторичной дистилляции, подкислением последней перед этим серной кислотой до 0,2 н и добавлением 27 г Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Проведенные предварительные испытания показали (см. фиг. 2), что при дистилляции из 0,1 н раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> не имеет места раз-



Фиг. 1. Выход диметилнитроамина при дистилляции его  
 1. водного раствора NaCl  
 2. водного раствора NaCl плюс водяной пар  
 3. водного раствора

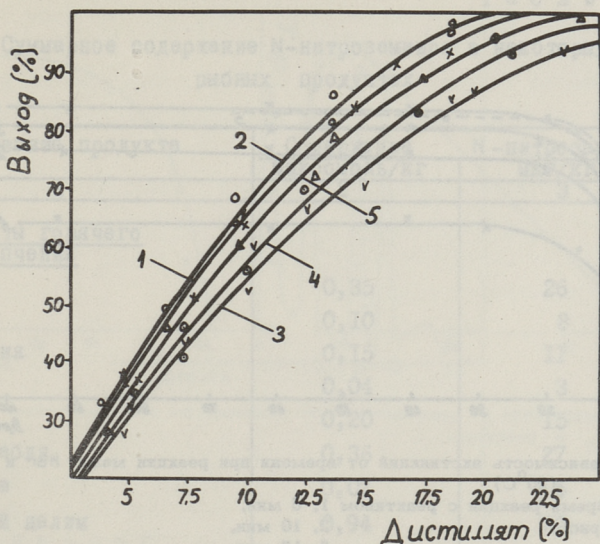
ложение N-нитрозосоединений. Полученный вторично дистиллят в количестве 80 мл подвергался последующей дистилляции из щелочной среды для удаления кислотных компонентов. В связи с этим в полученный концентрат прибавлялось 9,6 г NaOH и дистиллировалось, отбирая 40 мл дистиллята.

Полученный третичный дистиллят насыщался  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  для улучшения коэффициента распределения N-нитрозаминов между фазами  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : вода и экстрагировался 4 x 10 мл  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Органическая фаза высушивалась с 3 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и упаривалась при  $50^\circ\text{C}$  под колонкой до 1 мл.

При суммарном определении летучих с водяным паром N-нитрозаминов в полученной пробе пользовались модифицированной методикой Преуссмана [2]. Данный метод базируется на разложении нитроаминов бромистоводородной кислотой в ледяной уксусной кислоте и определении образующих ионов  $\text{NO}_2^-$  реактивом Грисса.

Полученная при выделении нитроаминов из пищевых продуктов проба в количестве 1 мл вводилась в мерную колбу





Фиг. 2. Выход диметилнитрозамина при его дистилляции из  
 1. x 3 и раствора  $\text{NaOH}$ ,  
 2. o раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  
 3. v 0,4 и раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , при добавлении  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  
 4. o 0,2 и раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , при добавлении  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  
 5.  $\Delta$  0,1 и раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , при добавлении  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

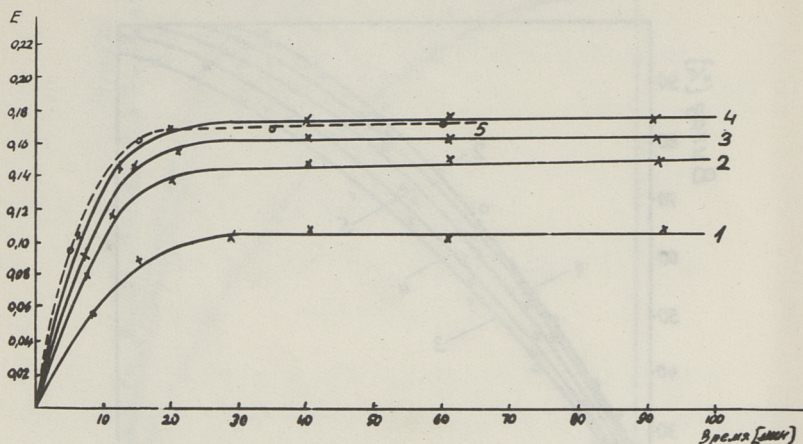
объемом 10 мл, с прибавлением в нее 5 мл 3-процентного раствора  $\text{HBr}$  в ледяной уксусной кислоте и доведении уровня в мерной колбе с ледяной уксусной кислотой до метки. Колба с периодическим встряхиванием отстаивалась при  $20^\circ\text{C}$  в течение 30 минут.

Из фигуры 3 видно, что предлагаемый период времени для полного разложения нитрозаминов вполне приемлем. К полученной смеси реакции прибавлялось равное количество реактива Грисса и после 15-минутной выдержки колориметрировалось.

В таблице I представлены предварительные результаты определения содержания летучих с водяным паром N-нитрозосоединений в некоторых рыбных продуктах.

Из приведенных данных явствует, что при определении N-нитрозаминов в рыбных продуктах более подробному рассмотрению должны подвергаться продукты горячего копчения.

При определении индивидуальных N-нитрозаминов в пробах, приготовленных по вышеописанной методике, к 1 мл кон-



Фиг. 3. Зависимость экстинкций от времени при реакции между  $\text{NBr}$  и  $\text{DMNA}$  ( $20^\circ\text{C}$ )

Время реакции с реактивом	1. 5 мин.
Грисса	2. 10 мин.
	3. 15 мин.
	4. 30 мин.
Время реакции с $\text{NBr}$	5. 30 мин.

центра (раствор изучаемых нитрозаминов в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) прибавлялся 1 мл гексана, отгонялось  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  и проба концентрировалась до 0,2 мл. Идентификация отдельных нитрозаминов была проведена на газовом хроматографе Chrom-31, снабженном микроулонометрическим детектором КДС.

При определении оптимальных параметров разделения использовались наполнительные колонки длиной 3,6 м, 5 % PEG 4000 на Chromaton N-AW-HMDS 0,16 + 0,20 мм.

Параметры разделения:

- температура колонки -  $80 + 180^\circ\text{C}$ ,
- температура испарителя хроматографа -  $230^\circ\text{C}$ ,
- скорость потока газоносителя 60 мл/мин,
- температура испарителя детектора -  $500^\circ\text{C}$ ,
- температура реактора -  $800^\circ\text{C}$ ,
- расход водорода - 120 мл/мин

Т а б л и ц а I

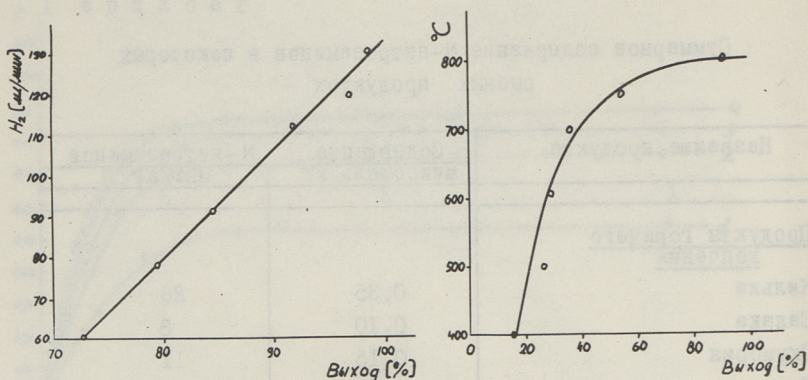
Суммарное содержание N-нитрозаминов в некоторых  
рыбных продуктах

Название продукта	Содержание микромоль/кг	N-нитрозаминов мкг/кг
1	2	3
<u>Продукты горячего копчения</u>		
Килька	0,35	26
Салака	0,10	8
Скумбрия	0,15	11
Треска	0,04	3
Сельдь	0,20	15
Рыба-сабля	0,36	27
Камбала	0,07	5
Морской налим	0,94	70
Сайда	0,02	2
Морской окунь	0,04	3
<u>Жареная рыба</u>		
4 пробы различных рыб	0,01-0,04	I - 3
<u>Свежая рыба</u>		
5 проб различных рыб	0 - 0,06	0 - 5
<u>Рыбные консервы</u>		
11 проб	0 - 0,06	0 - 5
Балык	0,03	2
Черная икра	0,14	10
Печень трески	0,02	2

\* Содержание пересчитано на диметилнитрозамин

На фигуре 4 приведен пример определения оптимальных параметров работы реактора микроулонометрического детектора КДС, изготовленного в СКБ АН ЭССР.

На фигуре 5 приведены данные о содержании некоторых индивидуальных N-нитрозаминов в рыбах горячего копчения, которые представлены в таблице 2.



Фиг. 4. Выход DMNA в зависимости от температуры и концентрации  $H_2$  в реакторе.

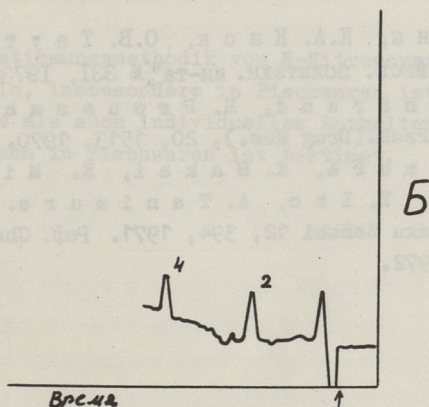
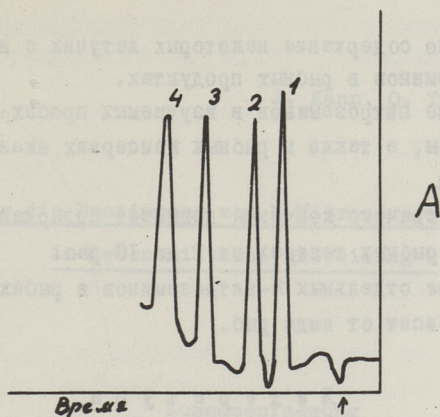
Т а б л и ц а 2

Содержание диалкилнитрозаминов в некоторых рыбах горячего копчения

Название рыбы	Суммарное содержание мкг/кг*	Содержание индивидуальных нитрозаминов, %			
		DMNA	DENA	DPcNA	DBNA
1	2	3	4	5	6
Килька	26	-	45	-	55
Морской налим	70	32	13	44	11
Сельдь	15	24	25	30	21
Камбала	5	35	31	34	-
Скумбрия	11	33	17	26	24
Морской окунь	3	13	23	64	-
Сайда	2	8	13	36	43

\* Суммарное содержание N-нитрозаминов пересчитано по DMNA.

Приводимые данные противоречат исследованиям японских ученых [3], утверждающих, что из летучих с водяным паром N-нитрозаминов в рыбных продуктах главным образом являются DMNA и DENA. Почти у всех изучаемых рыб горячего копчения



Фиг. 5. А. Хроматограмма модельных веществ в гексане  
 Б. Хроматограмма, полученная при анализе экстракта  
 горячепочечной кильки  
 1. диметилнитрозамины, 2. диэтилнитрозамины, 3. динро-  
 пилнитрозамины, 4. дибутилнитрозамины, 5. дипентилнитроз-  
 амин.

сравнительно высоким оказалось содержание дипропилнитроз-  
 амина.

Содержание отдельных N-нитроаминов в рыбах горячего  
 копчения во многом зависит от вида рыб.

### Выводы

I. Разработана методика определения N-нитроаминов в пище-  
 вых продуктах.

2. Определено содержание некоторых летучих с водяным паром N-нитрозаминов в рыбных продуктах.
3. Содержание нитрозаминов в изучаемых пробах свежей и жареной рыбы, а также в рыбных консервах оказалось довольно низким.
4. Процесс горячего копчения повышает содержание N-нитрозаминов в рыбных товарах от 2 до 10 раз.
5. Содержание отдельных N-нитрозаминов в рыбах горячего копчения зависит от вида рыб.

#### Л и т е р а т у р а

1. Ю.М. Канн, К.А. Каск, О.В. Таутс, К.К. Рая. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 331, 1973. с. 109-116.
2. G. Eisenbrand, R. Preussmann. *Arzneim. - Forsch. (Drug Res.)*, 20, 1513, 1970.
3. Т. Kawamura, К. Sakai, Е. Miyazawa, Н. Wada, Y. Ito, А. Tanigawa. *Ves. Hoku-hin Eiseieaku Zasshi* 12, 394, 1971. Реф. Chem. Abstr. 76, 71232 g, 1972.

Über die Bestimmung von N-Nitrosoverbindungen  
in Lebensmitteln. Mitteilung 2.

О СОВЕРШАНИИ ПЕРЕВОДА И ПРОВЕРКИ НА ПРАВИЛЬНОСТЬ ПЕРЕВОДА

Zusammenfassung

Die Bestimmungsmethodik von N-Nitrosoverbindungen in Lebensmitteln, insbesondere in Fischwaren ist gegeben. Summarisches als auch individuelles Enthalten von einigen N-Nitrosaminen in Fischwaren ist bestimmt.

Методика определения нитрозов в продуктах животного происхождения

Полученные данные о содержании нитрозов в продуктах животного происхождения

Из приведенных данных следует, что содержание нитрозов в печени и селезенке морской рыбы колеблется в зависимости от вида рыбы от 0,1 до 0,9 мг/г сухого вещества, а содержание нитрозов - от 0 до 10,4 мг/г сухого вещества.

В рыбе горького копчения содержание нитрозов в среднем повышается в 5 раз, а содержание нитрозов - в 1,3 раза.

Приведенные систематические данные некоторых видов рыбы о содержании нитрозов в печени, обусловленные различными условиями технологии переработки, а также содержание нитрозов в печени, морской камбале и селезенке подвергались варке, копчению и жарению. Полученные данные представлены на фиг. 1.

Из приведенных данных следует, что содержание  $NO_2$  и  $NO$  увеличивается при жарении. Это может быть обусловлено





УДК 637.5:664.9.035.2.

О.В. Таутс, Д.М. Канн, К.А. Каск

### О СОДЕРЖАНИИ НИТРИТОВ И НИТРАТОВ В РЫБНЫХ ТОВАРАХ

Настоящая работа является продолжением тех работ, результаты которых опубликованы нами ранее [1, 2].

Содержание вторичных аминов в рыбных товарах по литературным данным [3] сравнительно высокое. Мы считаем целесообразным определить в некоторых рыбах и в продуктах их переработки также содержание нитритов и нитратов, чтобы получить определенное представление о потенциальной возможности синтеза N-нитрозаминов в рыбных товарах

Методика определения нитритов и нитратов опубликована ранее [1].

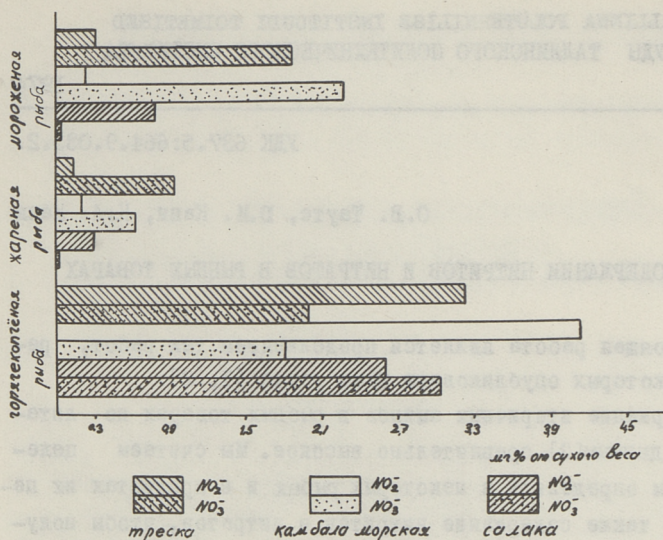
Полученные данные о содержании нитритов и нитратов в некоторых рыбных товарах приведены в таблице I.

Из приведенных данных явствует, что содержание нитритов в свежей и мороженой рыбе колеблется в зависимости от вида рыбы от 0,1 до 0,9 мг/ % сухого вещества, а содержание нитратов - от 0 до 10,4 мг/ % сухого вещества.

В рыбе горячего копчения содержание нитритов в среднем повышается в 5 раз, а содержание нитратов - в 1,3 раза.

Проведенный систематический анализ некоторых рыбных товаров на содержание нитритов и нитратов обуславливает подробное изучение влияния технологической переработки на их содержание. Треска, морская камбала и салака подвергались варке, копчению и жарению. Полученные данные представлены на фиг. I.

Из приведенных данных явствует, что содержание  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  уменьшается при жарении. Это может быть обусловлено



Фиг. 1. Изменение содержания нитритов и нитратов в рыбе при её переработке.

разложением названных функциональных групп при тепловой обработке.

Причиной повышения содержания  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  в рыбе горячего копчения, по-видимому, является содержание нитрозгазов в коптильном дыме, для уменьшения которых приемлемого метода пока не существует.

При варке рыбного фарша (50 г фарша в 50 мл дистиллированной воды) содержание  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  уменьшается (фиг. 2), причиной чего служит экстракция [4] и разложение нитритов на  $\text{N}_2$  и  $\text{NO}$ .

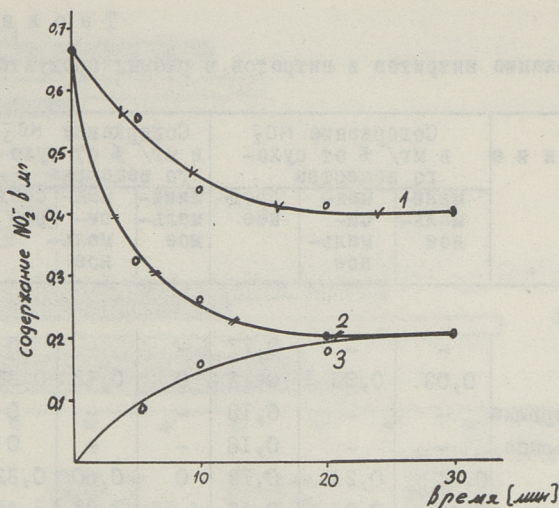
Затем исследовалась стабильность ионов нитрита в присутствии некоторых химических соединений, содержащихся также в пище.

Опыты проводились при pH 1 + 2 и при температуре 37 °C. Из полученных данных выяснилось, что фруктоза, щавелевая кислота, витамин PP, молочная кислота и некоторые другие существенного влияния на содержание  $\text{NO}_2^-$  в растворе не оказывают (концентрация  $\text{NO}_2^-$  в растворе 0,5 мкг/мл).

Т а б л и ц а I

## Содержание нитритов и нитратов в рыбных продуктах

И з в е с т и е	Содержание NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> в мг/ % от сухо- го вещества			Содержание NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> в мг/ % от сухо- го вещества			Коли- чест- во проб
	мини- маль- ное	максималь- ное	сред- нее	мини- маль- ное	максималь- ное	сред- нее	
<b>Свежая рыба</b>							
Салака	-	-	0,77	-	-	0	I
Килька	0,03	0,20	0,12	0	0,48	0,28	2
Морская корюшка	-	-	0,18	-	-	0	I
Мороженая рыба	-	-	0,18	-	-	0	I
Рыба-сабля	0,14	0,23	0,19	0	0,60	0,32	3
Сайда	0,14	0,96	0,48	4,12	7,92	5,45	3
Морской налим	0,94	1,05	0,99	13,32	13,92	13,62	2
Морской окунь	0,12	0,42	0,27	3,00	11,60	5,61	5
Морская камбала	0,05	0,31	0,20	0,75	4,97	2,26	4
Треска	0,09	0,60	0,30	0	3,74	1,82	4
Морской карась	0,89	0,92	0,91	8,70	12,13	10,42	2
Серебристый хек	0,56	1,18	0,87	9,03	9,32	9,18	2
Макрурус	0	0,06	0,04	0	11,00	5,50	2
Кальмар	-	-	0,16	-	-	0,12	I
<b>Рыба горячего копчения</b>							
Салака	2,96	3,78	3,21	0,85	6,40	3,03	3
Килька	4,08	6,42	5,25	0,81	4,07	2,44	2
Рыба-сабля	1,89	2,39	1,98	0,78	2,52	1,84	3
Сайда	7,72	8,30	8,01	6,91	9,51	8,21	2
Морской налим	-	-	9,13	-	-	0	I
Морской окунь	4,93	6,03	5,48	3,80	5,74	4,77	2
Морская камбала	3,58	5,42	4,50	1,60	2,01	1,81	2
Морской карась	2,34	2,39	2,37	1,85	2,61	2,23	2
Треска	3,13	3,97	3,22	0,06	3,32	2,00	4
<b>Рыба жареная</b>							
Салака	0,23	0,29	0,26	-	-	0	2
Треска	0,19	0,15	0,13	-	-	0,67	I
Камбала	-	-	0,16	0,0	2,24	1,12	2



Фиг. 2. Изменение содержания нитритов при варке рыбного фарша:

1. суммарное содержание,
2. содержание в фарше,
3. содержание в фильтрате.

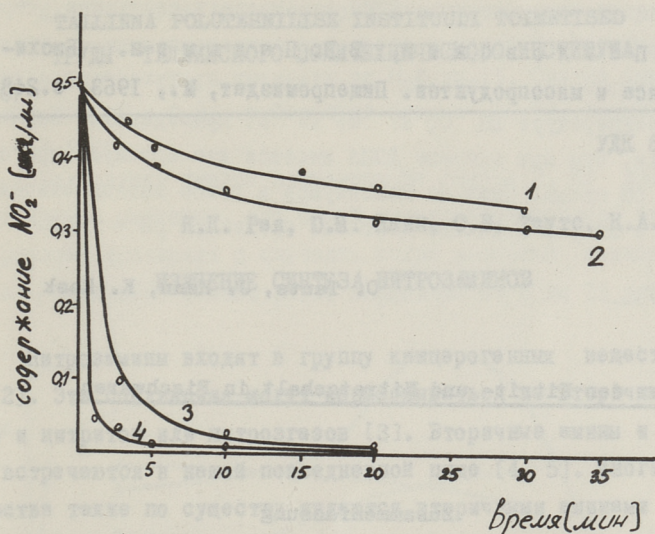
Присутствие аскорбиновой кислоты (фиг. 3) в растворе резко уменьшает концентрацию  $\text{NO}_2^-$ , восстанавливая ее до  $\text{NO}$  [5].

## Выводы

1. Содержание нитритов и нитратов в анализируемых рыбных товарах не превышает принятых в настоящее время норм.

2. Как варка, так и жарение снижают содержание  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{NO}_3^-$  в рыбных товарах. При горячем копчении содержание нитритов повышается в 5 раз, а содержание нитратов — в 1,3 раза.

3. При наличии аскорбиновой кислоты содержание  $\text{NO}_2^-$  в рыбных товарах резко уменьшается.



Фиг. 3. Изменение содержания нитритов от времени при разных концентрациях аскорбиновой кислоты (pH = 2, температура 37°C).

Концентрация аскорбиновой кислоты: 1. 0,250 мг/мл,  
 2. 0,125 мг/мл,  
 3. 0,007 мг/мл,  
 4. 0,005 мг/мл.

### Л и т е р а т у р а

1. Д.М. К а н н, О.В. Т а у т с, А.А. С у у р т х а л ь, М.А. Х у н т. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та." Сборник статей по химии и химической технологии, XXXI, 331, 103, 1973.
2. Д.М. К а н н. Канцерогенные N-нитрозосоединения - действие, синтез, определение. Материалы I-го симпозиума. Таллин, 1973, с. 9.
3. Т. К а в а м у р а, К. S a k a i, Ф. М и я з а w a, Н. W a d a, Y. I t o, А. Т а н и м у р а. Y. Food Hyg. Soc. Japan, 12, 192, 1971.
4. 18. Kongress Europäischer Fleischforscher, 1972. Die Fleischwirtschaft 53, 510, 1973.

5. П. Е. Павловский, В.В. Пальмин. Биохимия мяса и мясопродуктов. Пищепромиздат, М., 1963, с.248.

O. Tauts, J. Kann, K. Kask

### Über den Nitrit- und Nitratgehalt in Fischwaren

#### Zusammenfassung

In verschiedenen Fischwaren wurde der Nitrit- und Nitratgehalt bestimmt. Die Analysen zeigten, dass der Nitritgehalt in dem analysierten Problem nicht höher war, als gesetzmässig vorgesehen ist.

Beim Kochen und Braten nimmt der  $\text{NO}_2^-$ - und  $\text{NO}_3^-$ -Gehalt ab, beim Räuchern vergrössert sich der  $\text{NO}_2^-$ -Gehalt ungefähr fünfmal und  $\text{NO}_3^-$ -Gehalt anderthalbmal. Zusatz von Ascorbinsäure vermindert den  $\text{NO}_2^-$ -Gehalt.

К.К. Рая, Д.М. Канн, О.В. Таутс, К.А. Каск

### ИЗУЧЕНИЕ СИНТЕЗА НИТРОЗАМИНОВ

Нитрозамины входят в группу канцерогенных веществ [1, 3, 2]. Эти соединения могут образовываться из вторичных аминов и нитритов или нитрогенов [3]. Вторичные амины и нитриты встречаются в нашей повседневной пище [4, 5]. Многие лекарства также по существу являются вторичными аминами [6]. Следовательно, есть потенциальная возможность синтеза нитрозаминов как *in vitro*, так и *in vivo* [7, 8].

Для изучения синтеза нитрозаминов (НА) исходили из диэтиламина (ДЭА) и морфолина (М), так как по данным многих исследователей пищевые продукты содержат в основном первые члены ряда алифатических вторичных аминов и морфолин является составным компонентом многих лекарств.

Аппаратура для синтеза диэтилнитрозамина (ДЭНА) состоит из двух частей:

- 1) первая часть для получения газообразной двуокиси азота;
- 2) вторая часть - сосуд барботирования с раствором ДЭА, через которую высасывали двуокись азота.

Полученный при синтезе ДЭНА определялся газовым хроматографом АБК-2 с пламенно-ионизационным детектором. Длина колонки 2,45 м, диаметр - 4 мм.

Твердый носитель - Chromaton N,

жидкая фаза - PEG 4000,

рабочая температура колонки - 130 °С,

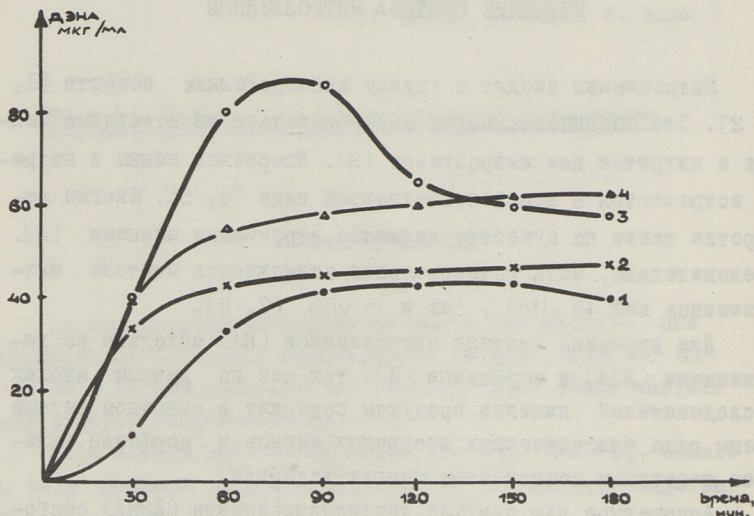
температура испарителя - 250 °С,

скорость газо-носителя - гелия 60 мл/мин,

скорость водорода - 30 мл/мин,

скорость воздуха - 450 мл/мин.

Для изучения синтеза ДЭНА варьировали следующие параметры раствора ДЭА: рН, температуру, концентрацию. Синтез был проведен при следующих значениях рН: 1,1; 4,0; 6,4; 12,4; и при температуре 22 °С, 37 °С, 47 °С. Проведенные анализы показали, что при синтезе ДЭНА имеется два оптимума при значениях рН среды. Один из максимумов в слабо кислом значении рН=4,0 и второй в сильно щелочной среде при рН = 12,4.



Фиг. 1. Синтез ДЭНА в зависимости от времени синтеза, рН и температуры среды

1 - рН = 4,0                      37°C                      3 - рН = 4,0                      22°C  
 2 - рН = 12,3                      4 - рН = 12,3

Из фиг.1 следует, что при всех значениях рН, за исключением сильно щелочной среды, на графике зависимости концентрации ДЭНА относительно времени синтеза получены кривые колоколообразной формы.

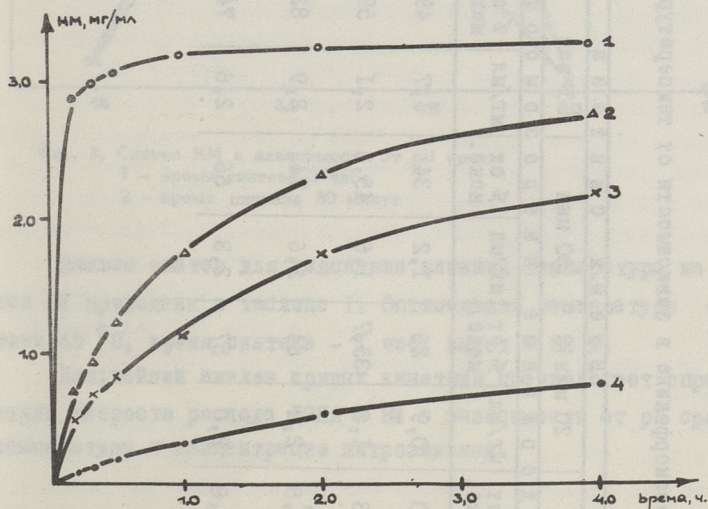
Из этого можно сделать вывод, что среда с рН 12,4 является наиболее благоприятной для стабильности ДЭНА.

При синтезе нитрозоморфолина (НМ) исходили из раствора морфолина (М), нитрита натрия, а для регулирования рН среды использовали перхлоратную кислоту. Нитрозоморфолин определяли по модифицированному методу Преуссмана.



Для выяснения влияния концентрации нитрита натрия при синтезе нитрозоморфолина варьировали молярное соотношение  $\text{NaNO}_2$  и морфолина в пределах от 0,5 до 15. Синтез был проведен при  $\text{pH} = 4,5$ , температура среды  $- 26^\circ\text{C}$ . Время синтеза  $- 4$  часа.

Полученные данные приведены на фигуре 2. Из приведенных данных явствует, что самый интенсивный синтез нитрозоморфолина протекает в случаях, когда молярная концентрация  $\text{NaNO}_2$  превышает концентрацию морфолина от 5 до 15 раз.



Фиг. 2. Синтез НМ в зависимости от соотношения концентрации  $\text{NaNO}_2$  к морфолину и от времени синтеза

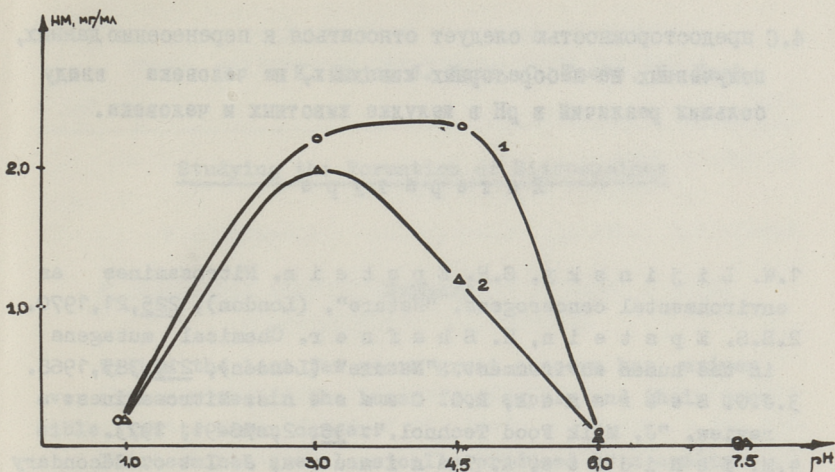
- 1 -  $\text{NaNO}_2$ : M = 10
- 2 -  $\text{NaNO}_2$ : M = 2
- 3 -  $\text{NaNO}_2$ : M = 1
- 4 -  $\text{NaNO}_2$ : M = 0,5

При изучении влияния  $\text{pH}$  на синтез нитрозоморфолина исходили из отношения концентрации  $\text{NaNO}_2$ : морфолин  $- 1 : 2$ . Из фигуры 3 явствует, что синтез нитрозоморфолина имеет максимум в кислой среде. При значениях  $\text{pH} 7,5$  и  $10,7$  синтез нитрозоморфолина не заметен. При  $\text{pH} 0,9$  синтез НМ очень незначительный и составляет от теоретического  $4,4\%$ . При максимальном синтезе НМ ( $\text{pH} = 4,5$ ) выход составляет  $77\%$ .

Таблица I

Синтез нитрозоморфолина в зависимости от температуры среды

Температура °С	рН	Время синтеза											
		10 мин		20 мин		30 мин		1 час		2 часа		4 часа	
		Содержание нитрозоморфолина											
		мг/мл	% от макс.	мг/мл	% от макс.	мг/мл	% от макс.	мг/мл	% от макс.	мг/мл	% от макс.	мг/мл	% от макс.
26	4,5	0,7	20	0,9	26	1,2	34	1,7	49	2,3	66	2,7	77
37	4,5	0,8	23	1,2	35,7	1,6	45,5	2,1	59	2,6	73	2,9	82
45	4,5	1,8	50,8	2,2	64	2,6	74	2,9	82	2,9	82	2,9	82
54	4,5	1,8	50,8	2,0	57	2,3	66	2,6	74	3,0	85	3,0	85



Фиг. 3. Синтез НМ в зависимости от рН среды  
 1 - время синтеза 2 часа  
 2 - время синтеза 30 минут

Данные опытов для выяснения влияния температуры на синтез НМ приведены в таблице I. Оптимальная температура синтеза 45 °С, время синтеза - I час, выход - 82 %.

Дальнейший анализ кривых кинетики предполагает определение скорости распада ДЭНА и НМ в зависимости от рН среды, температуры и концентрации нитрозаминов.

#### Выводы

1. Синтез ДЭНА имеет два оптимума - один при рН=4,0 и второй - при 12,4. Среда с рН 12,4 является наиболее благоприятной для стабильности ДЭНА.
2. Оптимальные условия синтеза НМ:
  - молярное соотношение морфолина и нитрита - 1 : 2
  - рН синтеза 4,5
  - температура - 45 °С
  - время синтеза - I час.
3. Данные экспериментов позволяют утверждать, что синтез НА в желудке человека возможен при пониженной кислотности.

4. С предосторожностью следует относиться к перенесению данных, полученных на лабораторных животных, на человека ввиду больших различий в рН в желудке животных и человека.

### Л и т е р а т у р а

1. W. L i j i n s k y, S. S. E p s t e i n. Nitrosamines as environmental cancerogens. "Nature", (London), 225, 21, 1970.
2. S. S. E p s t e i n, H. S h a f n e r. Chemical mutagens in the human environment. "Nature" (London), 219, 385, 1968.
3. J. G. S e b r a n e k, R. G. C a s s e n s. Nitrosamines: a review. "J. Milk Food Technol.". 36, 2, 76-91, 1973.
4. M. I s h i d a t e, A. T a n i m u r a, J. I t o. Secondary amines, nitrite and nitrosamines in Japanese foods. "J. Jap. Pharm. Assoc.", 23, 12, 47-51, 1971.
5. T. K a w a m u r a, K. S a k a i, F. M i y a z a w a. Nitrosamines in foods. V, Distribution of secondary amines in foods. Chemical Abstracts, 76, 13, 71232, 1972.
6. W. L i j i n s k y, H. W. T a y l o r, C. S n y d e r. Malignant tumours of liver and lung in rats fed aminopyrine or heptamethylemeimine together with nitrite. "Nature" (London), 244, 5412, 176-178, 1973.
7. B. S. A l a m, I. B. S a p o r o s c h e t z, S. S. E p s t e i n. Formation of N - nitrosopiperidine from piperidine and sodium nitrite in the stomach and the isolated intestinal loop of the rat. "Nature" (London), 232, 5306, 116-118, 1971.
8. E. B o y l a n d, E. N i c e, K. W i l l i a m s. The catalysis of nitrosation by thiocyanate from salvia. "Food and Cosmet. Toxicol.", 9, 5, 639-643, 1971.

Studying the Formation of Nitrosamines

Summary

Within the last few years great concern has arisen over nitrosamines in the human food supply and their possible link to human cancer.

Nitrosamines are classically produced by a combination reaction of nitrite (or nitrous acid) with secondary amines - dimethylamine or morpholine - under acid conditions. This reaction depends on pH and relative concentrations of presources. The maximum nitrosation of morpholine occurs at pH 4,5.



УДК 632.95:543

Р.Э.Треиманн, А.А.Сууртхаль, К.А.Каск, Х.И.Лутсоя

О СОДЕРЖАНИИ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В СЫРЬЕ  
КОНДИТЕРСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

При интенсификации сельскохозяйственного производства важную роль играет химизация сельского хозяйства, в том числе применение химических средств защиты растений. Но при массовом применении пестицидов требуется, чтобы сельскохозяйственные продукты и окружающая среда не подвергали опасности здоровье человека ввиду высокого содержания в них остатков пестицидов. Так как содержание пестицидов в продуктах питания обычно очень низкое, для их определения нужны специфические и очень чувствительные методы анализа. В настоящее время для определения пестицидов разработано много методов, из которых чаще всего применяются оптические (колориметрия, спектрофотометрия), электрохимические и хроматографические методы.

За рубежом в 1970-71 годах при определении пестицидов в 70 % случаев применялись методы газовой хроматографии, в 25 % - методы тонкослойной хроматографии и только в 5 % - другие методы [1]. Среди них методы газо-жидкостной хроматографии отличаются очень высокой селективностью и чувствительностью.

При определении остаточного содержания пестицидов необходимо решить следующие проблемы:

- извлечение пестицидов из исследуемой пробы,
- очистка экстракта,
- обнаружение и количественное определение пестицидов.

При разработке методики анализа хлорорганических пестицидов исходили из оригинальной методики, предложенной М.А. Клисенко и З.Ф. Дрковой [2]. Так как в основном исследова-

лось содержание пестицидов в продуктах питания, богатых жирами, целесообразно было обратить особое внимание на очистку экстракта. Лучшие результаты были получены разведением ацетоновых экстрактов водой с последующей выдержкой проб при низкой температуре. В результате этого существенно падает растворимость жиров и восков в ацетоне. Примеси, оставшиеся в экстракте, можно удалить почти полностью при обработке экстракта концентрированной серной кислотой [3].

На основании результатов предпринятых нами опытов разработан следующий метод для определения хлорорганических пестицидов в продуктах питания.

Исследуемую измельченную пробу (50-100 г) экстрагируют 4-5 раз порциями ацетона (по 50-100 мл) в течение 24-36 часов. В результате разведения ацетона водой (1 : 1) и выдерживания пробы при 0 °С осаждаются основные примеси, которые отделяют фильтрованием. Ацетон отгоняют в вакууме в ротационном выпарителе. Из водного экстракта пестициды экстрагируются 4-5 раз н-гексаном (по 15-20 мл). Полученный гексановый экстракт обрабатывается концентрированной серной кислотой 3-4 раза, высушивается безводным сернокислым натрием и затем отгоняется н-гексаном. Перед хроматографическим определением к пробам добавляется по 0,5 мл ацетона. В газовый хроматограф вводится 1-8 мкл ацетонового экстракта.

Остаточное содержание пестицидов определялось на газовом хроматографе "Цвет-5" с детектором по захвату электронов. В стеклянной колонне (1-2 м) применялся носитель Chromaton N-AW-HMDS (размер диаметра зерен 0,430-0,600 мм), в качестве неподвижной фазы использовалось 5 % силиконового масла Е 301, а газом-носителем являлся аргон при давлении 1,2 атм.

При помощи вышеописанного метода определялось содержание ДДТ, ДДЕ и гексахлорана в импортном сырье кондитерской фабрики "Калев" (табл. I). Остаточное содержание пестицидов в продуктах питания зависит от происхождения сырья.

Разработанная методика оказалась подходящей для определения остаточного содержания пестицидов в продуктах пита-



## Содержание пестицидов в импортном сырье кондитерской фабрики "Калев"

Продукт	Исследовано проб	Содержание ДДТ, мкг/кг		Содержание ДДЕ, мкг/кг		Содержание всего ДДТ и ДДЕ, мкг/кг		Содержание гексахлорана, мкг/кг	
		пределы	средн.	пределы	средн.	пределы	средн.	пределы	средн.
Арахисовые орехи	5	0,3-1,0	0,5	0-0,2	0,2	0,5-1,2	0,7	0,1-0,5	0,2
Бобы какао	12	0,2-8,5	1,9	0-0,8	0,3	0,4-9,2	2,1	0-17,0	5,3
Бобы какао очищенные	11	0,1-1,9	0,5	0-0,2	0,2	0,1-2,1	0,7	0-16,5	4,5
Какавелла	10	0,4-51,3	10,3	0,1-5,0	1,2	0,5-55,8	11,3	0,8-54,5	21,1
Масса из бобов какао	1		0,4		0,1		0,5		7,1
Шоколад	6	0,4-6,7	2,2	0-0,9	0,5	0,5-7,5	2,7	0-33,9	11,7
Лесные орехи, обыкновенные	2	0,2	0,2	0,2-0,5	0,4	0,4-0,7	0,6	0-0,1	0,1
Кокосовый жир	2	0,4-1,2	0,8	0 -0,2	0,1	0,6-1,2	0,9		следы
Подсолнечное масло	2	0,7-1,2	1,0	0-0,1	0,1	0,8-1,2	1,0		следы
Кофейные бобы, необжаренные	1		1,8		0,4		2,2		6,4
Цитрусовый пектин	1		1,1		0,1		1,2		следы
Кунжут	5	0,3-3,4	1,3	0,1-0,4	0,3	0,6-3,8	1,6	0-6,9	1,8
Халва тахиновая-ванильная	1		0,9		0,3		1,2		0,4
ИЗМ	2	6,2-11,6	8,9	0,6-1,2	0,9	6,7-12,7	9,7	0,7-1,2	1,0

ния, богатых жирами. Остаточное количество гексахлорана, обнаруженное в импортном сырье фабрики "Калев", не превышало допустимой нормы (1 мг/кг) [4]. Наличие остатков ДДТ в пищевых продуктах, кроме овощей и фруктов, не допускается, если анализ проводится колориметрическим методом или методом тонкослойной хроматографии (чувствительность последнего 0,01-0,1 мг/кг в зависимости от объекта исследования). Метод газовой хроматографии на один порядок более чувствителен. Но так как обнаруженные нами количества ДДТ не превышают чувствительности официального метода тонкослойной хроматографии, то их можно считать допустимыми. В наших опытах максимальное содержание ДДТ и ДДЕ обнаружено в изюме (средн. 9,7 мкг/кг) и какавелле (средн. 11,3 мкг/кг).

#### Л и т е р а т у р а

1. М.А. К л и с е н к о. Газовая хроматография пестицидов. Материалы I всесоюзн. семинара по хром. пест. Таллин, 1972, с. 9-12.
2. М.А. К л и с е н к о, З.Ф. Ю р к о в а. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, почве и воде. Методическое письмо. М., 1968.
3. З.Н. Б о г о м о л о в а. Газовая хроматография пестицидов. Материалы I всесоюзн. семинара по хром. пест. Таллин, 1972, с. 209-211.
4. О.Н. П р о к о ф ь е в. Справочник по ядохимикатам. Алма-Ата, 1972.

R. Treimann, A. Suurthal, K. Kask,  
H. Lutsoja, H. Kipper

Organochlorine Pesticide Residues in Import  
Raw Materials of Confectionery Production

Summary

A method for determination of organochlorine pesticide residues in the foodstuffs with high fat content has been elaborated. The results of experimental studies of hexachlorane, DDT and DDE residuals in imported raw materials of confectionery factory "Kalev" are presented in this paper.



УДК 664:546.49:543

Р.Э. Отт, К.А. Каск, Э.Р. Велленд

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ РТУТИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛАХ

В основу разработанной методики определения содержания ртути в биологических материалах взяты исследования и опубликованная литература об определении содержания ртути в разных материалах [1-7].

Определение ртути проводилось методом атомной абсорбции, пары ртути регистрировались по линии поглощения при длине волны 253,7 нм. В качестве аппаратуры использовался спектрофотометр "Spectord UV VIS", который был дополнен газовой кветтой, перистальтическим насосом и аэратором. Чувствительность определения - 1 нг ртути в мл. При некоторых определениях использовался беспламенно-атомно-абсорбционный спектрофотометр MAS-50 фирмы Perkin-Elmer, чувствительность определения - 0,1 нг ртути в мл.

Предварительная обработка пробы проводилась в колбе Эрленмейера под обратным холодильником на водяной бане при температуре 75-80°. Навеска пробы (0,1 - 3 г) зависит от характера биологического материала. К пробе добавлялось 10-20 мл концентрированной  $H_2SO_4$  и  $HNO_3$  (1:1) в зависимости от содержания жира в исследуемом продукте. Нагревание проводилось в течение 1-2 часов, затем после добавления 30-40 мл дист. воды продолжалось нагревание при температуре 100° еще около 1 часа. После охлаждения в реакционную смесь в избыточном количестве добавлялся 5-процентный раствор  $KMnO_4$  и смесь отстаивалась не менее 0,5 часа. Затем объем пробы доводился до 100 мл. дист. водой и добавлялось 5 мл конц.  $H_2SO_4$  и  $HNO_3$  (1:1). Из редуцирующих реагентов к пробе добавлялось 5 мл 1,5-процентного раствора солянокислого гидроксилamina.

Если раствор не становился прозрачным, то к нему добавлялись кристаллы  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ , а затем  $\text{Hg}^{2+}$  восстанавливали хлористым оловом до металлической ртути, добавляя 5 мл 10-процентного раствора  $\text{SnCl}_2$ . После этого сосуд плотно закрывался, включался аэратор и регистрировалось высшее показание пера.

Проведен анализ некоторых биологических материалов по содержанию ртути. Полученные данные приведены в таблице I. Точность определения  $\pm 30$  мкг/кг.

Т а б л и ц а I

Содержание ртути в биологических материалах

Биологический материал	Количество проб	Содержание ртути в мкг/кг	Примечание
1	2	3	4
Фукус	4	30-80	на сухое вещество
Зеленые водоросли	4	100-250	"-
Медуза	2	130	"-
Перья птицы	2	1000-2000	
Волосы человеческие	1	860	
Язь	4	330-400	
Угорь	4	330-400	
Щука	12	290-420	
Минога	2	2000	
Минога	4	50-150	маринованная
Судак	4	100	
Окунь морской	2	100	
Налим	2	60	
Карась океанский	2	100	

Проведенные анализы не достаточно систематичны, но из полученных данных следует, что в пищевых продуктах, исследованных авторами, содержание ртути не превышает допустимой нормы Министерства здравоохранения СССР, которая составляет 0,5 мг/кг в пищевых продуктах.

## В ы в о д ы

1. Разработана методика определения содержания ртути в разных биологических материалах на спектрофотометре "Spectrocord UV vis", чувствительность метода 1 нг ртути в мл.

2. Содержание ртути в исследованных пищевых продуктах не превышало допустимой нормы Министерства здравоохранения СССР, которая составляет 0,5 мг/кг в пищевых продуктах.

## Л и т е р а т у р а

1. G. B ö n i g. Landwirtschaftliche Forschung, 1969, 22, 285.
2. W. H a t c h, W.L. O t t. Anal. Chem., 1968, 40, 2085.
3. P.C. H e a d, R.A. N i c h o l s o n. Analyst, 1973, 98, No1, 53-56.
4. I.K. I s k a n d e r, J.K. S y e r s, L.W. J a c o b s, D.R. K e e n e y, J.T. G i l m o u r. Analyst, 1972, 97, No5, 388-393.
5. M.T. J e f f u s, J.S. E l k i n s. C.T. K e n n e r. J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 1970, 53, 1172.
6. G. L i n d s t e d t. Analyst, 1970, 95, 264.
7. I. S k a r e. Analyst, 1972, 97, No 2, 148-155.

Determination of Mercury in Biological Samples

Summary

A method of determination of mercury in a variety of biological samples is described.

The sample is digested with sulphuric-nitric acid mixture. The digestion time is about 2 - 3 hours, what is sufficient to convert the mercury into an inorganic form so that it can be reduced to the elemental state. The mercury is determined by atomic absorption at 253.7 nm by aerating the sample.

The mercury content of several kinds of aquatic organisms has been determined by this method.



## С о д е р ж а н и е

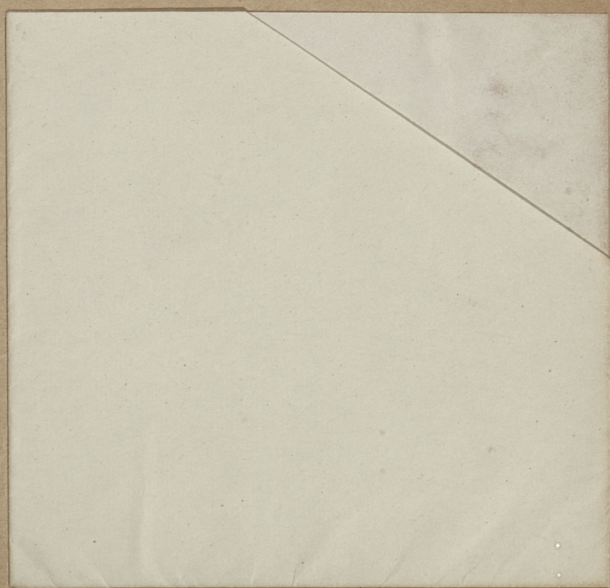
1. Э.Х. Сиймер, В.А. Кросинг, М.О. Мандель, А.И. Кёстнер. О механизме ферментативных реакций, ингибируемых субстратом и продуктами .....	3
2. М.О. Мандель, Э.Х. Сиймер, К.А. Кярема, А.И. Кёстнер. Торможение ферментативного гидролиза бензилпенициллина в условиях применения иммобилизованной пенициллинамидазы .....	9
3. В.А. Кросинг, Ю.Й. Ярвет, Э.Х. Сиймер, А.И. Кёстнер. Кинетика реакции гидролиза водных растворов сахарозы, катализируемой иммобилизованной в полиакриламидном геле инвертазой .....	17
4. М.И. Креэн, К.А. Кивисилла, В.Н. Федосеев, А.И. Кёстнер. Об иммобилизации химотрипсина некоторыми методами .....	27
5. К.Э. Паппель, А.И. Кёстнер, Р.В. Фениксова, А.С. Тихомирова. Получение иммобилизованной $\beta$ -галактозидазы .....	35
6. П.А. Пяйв, С.А. Рандрут, А.И. Кёстнер. О влиянии кислоты на прочность геля фулцелларана .....	41
7. Т.Л. Лиеберт, В.А. Мандель. Определение качества ржаной муки .....	49
8. А.Г. Канн, К.Э. Кивизад. Исследование черствения хлеба .....	55
9. А.Г. Канн, К.А. Каск, М.В. Ээсмаа, Р.Е. Ахвен, Е.А. Пяхлапуу. Возможности улучшения качества мясных товаров .....	63
10. А.Э. Эрин. Выделение фермента $\beta$ -фруктофуранозидазы из пивных дрожжей методом замораживания-оттаивания дрожжевых клеток .....	69
11. Ю.М. Канн, О.В. Таутс, Р.Э. Калве, Т.Г. Паалме. Определение нитрозгазов в сигаретном дыме .....	79
12. Ю.М. Канн, О.В. Таутс, К.К. Рая, К.А. Каск. Об определении нитрозаминов в пищевых продуктах. Сообщение II .....	85
13. О.В. Таутс, Ю.М. Канн, К.А. Каск. О содержании нитритов и нитратов в рыбных товарах .....	95
14. К.К. Рая, Ю.М. Канн, О.В. Таутс, К.А. Каск. Изучение синтеза нитрозаминов .....	101
15. Р.Э. Трейманн, А.А. Сууртхаль, К.А. Каск, Х.И. Лутсоя, Х.Я. Кишпер. О содержании хлорорганических пестицидов в сырье кондитерского производства .....	109
16. Р.Э. Отт, К.А. Каск, Э.Р. Велленд. Определение ртути в биологических материалах .....	115

Сборник статей по  
ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ XXXVI

Таллинский политехнический институт  
Утвержден коллегией Трудов ТПИ 7 июня 1974 г.  
Редактор А.Канн. Техн. редактор В.Райник

---

Подписано к печати 13 ноября 1974 г.  
Бумага 80x90/16. Печ. л. 7,5 + 0,75. Уч.-изд.л.5,15  
Тираж 350. МВ-09808. 3ак. №679  
Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коскла, 2/9  
Цена 52 коп.



Цена 52 коп.