

TALLINNA POLÜTEHNILISE
INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 331

СБОРНИК СТАТЕЙ
**ПО ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ
ТЕХНОЛОГИИ**
XXX1

(Технология пищевых производств III)

УДК 541.183.57

Сборник статей
по
**ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ
ТЕХНОЛОГИИ XXXI**

(Технология пищевых производств III)

Таллин 1973

TALLINNA POLYTECHNILISE INSTITUUDI TOimetised
TRUDY TALLINNSKOGO POLITEKHNIЧЕСКОГО ИНСТИТУТА
1973

1973

Обзорная статья

по

ТЕХНОЛОГИИ И МАШИНОСТРОЕНИЮ
XXXI

(Технология и машиностроение XXXI)



©

ТПИ, Таллин, 1973

В.А. Кросинг, И.Р. Велдре

О СОДЕРЖАНИИ ЖИРА И БЕЛКОВ В МЯСЕ
БАЛТИЙСКОЙ КИЛЬКИ

Известно, что химический состав балтийской кильки (*Sprattus sprattus balticus*) подвергается закономерным сезонным изменениям на протяжении года. По данным Mikicinska [1] химический состав кильки колеблется в пределах:

вода	66,77-79,66 %
жир	2,75-17,66 %
белки	14,67-16,57 %
зола	1,08-2,16 %

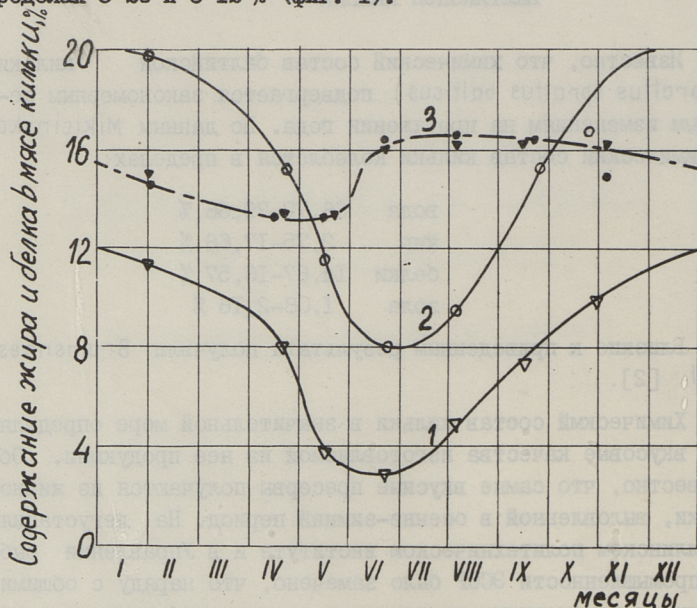
Близкие к приведенным результаты получили Bramsnaes et al. [2].

Химический состав кильки в значительной мере определяет и вкусовые качества изготавливаемой из нее продукции. Общеизвестно, что самые вкусные пресервы получаются из жирной кильки, выловленной в осенне-зимний период. На дегустациях в Таллинском политехническом институте и в Управлении рыбной промышленности ЭССР было замечено, что наряду с общими сезонными изменениями химического состава наблюдается и индивидуальная вариация упитанности кильки. Уловы кильки не являются однородными в отношении упитанности отдельных экземпляров. По внешнему виду в каждом улове кильки часть экземпляров (20-25 %) отличается более хорошей упитанностью, другая часть (20-25 %) отличается слабой упитанностью.

У более упитанных экземпляров кильки туловище кругловатое, голова маленькая, спина серая, длина тела около 10 см. У тощих экземпляров туловище более худое, голова относительно большая, спина темносерая, длина тела около 10 - 12 см.

В течение одного года (1970–1971) мы провели химический анализ мяса кильки у этих двух групп, выбранных по внешнему виду, чтобы проверить зависимость химического состава от упитанности кильки. В высушенном фарше определяли жир методом Сохслета и в сыром фарше белок методом Кьельдаля.

В течение всего года в мясе визуально более упитанных экземпляров содержалось в среднем в два раза больше жира, чем в мясе кильки тощих экземпляров. Содержание жира в мясе кильки колебалось у этих двух различных групп соответственно в пределах 8–20 и 3–12 % (фиг. 1).



Фиг. 1. Сезонная изменчивость содержания жира и белков в мясе кильки.
1 — жир в тощих, 2 — жир в упитанных, 3 — белки в обоих экземплярах.

В содержании белка у более упитанных и тощих экземпляров не наблюдалось существенной разницы. У обеих групп содержание белка было минимальное (около 13 %) весной и быстро повышалось летом (фиг. 1). Это совпадает с началом усиленного питания кильки (Бодниек [31]), а также с развитием гонад, так как нерест кильки в северной части Балтийского моря происходит массово в июле–августе. В конце июня содержание белка в мясе кильки превышало 16 %. Медленное снижение

содержания белка началось в конце года и продолжалось до весны.

Определение возраста по годовым кольцам на отолитах показало, что сортированные по упитанности экземпляры кильки различаются по своему возрасту. Более упитанные были преимущественно двухгодовалые, тощие — пяти — до десятигодовалые и старше. Получается, что жирность старших экземпляров кильки меньше, чем у младших экземпляров. Это как-будто противоречит общеизвестному мнению, по которому старшие экземпляры рыб являются более жирными. По данным Миндера [3] Krvarić и Muzinić [4] у сельдевых содержание жира увеличивается прямопропорционально с возрастом рыб.

По нашему мнению, установленные индивидуальные различия в жирности балтийской кильки вызваны в первую очередь различиями в темпе роста. Содержание жира больше у быстрорастущих экземпляров, которые являются более упитанными и имеют меньшую голову. Медленнорастущие — это тощие, имеющие большую голову экземпляры содержат меньше жира.

Необходимо отметить, что у балтийской кильки наблюдается связь между темпом роста и смертностью. Очевидно, смертность быстрорастущих экземпляров больше, чем у медленнорастущих. Этим объясняется факт, что в определенном возрасте средняя длина конкретного поколения кильки в уловах начинает уменьшаться. В результате этого средняя длина более молодого поколения может превышать длину более старого поколения в том же улове.

Несомненно, порционный нерест кильки содействует возникновению значительных различий темпа роста в пределах одного поколения. Причина большей смертности быстрорастущих экземпляров кильки пока неизвестна, но по всей вероятности, элиминация быстрорастущих экземпляров вызвана естественной смертностью.

В результате большей смертности быстрорастущих экземпляров среди старших возрастных групп доминируют медленнорастущие экземпляры, которые уже по внешнему виду являются тощими.

По стандартам (ГОСТ 5337-70) пресервы "Таллинской кильки пряного посола" должны быть изготовлены из бал-

тийской кильки с содержанием жира в мясе сырца не менее 8 %. Весной, когда средняя жирность кильки становится менее 8 %, можно тощие рыбы визуальнo отбирать, и таким образом продлить период изготовления пресервов "Таллинские кильки". Целесообразно в течение всего года отбирать явно тощие кильки из сырья для пресервов "Таллинские кильки", так как они заметно ухудшают вкусовые качества и внешний вид пресервов.

В ы в о д ы

Уловы кильки не являются однородными в отношении упитанности отдельных экземпляров. В каждом улове кильки часть экземпляров (20-25 %) отличается более хорошей упитанностью, другая часть (20-25 %) отличается слабой упитанностью. В течение всего года в мясе визуальнo более упитанных экземпляров содержалось в среднем в два раза больше жира, чем в мясе тощих экземпляров. В содержании белка существенной разницы не наблюдалось. Более упитанные экземпляры были преимущественно двухгодовалые, тощие экземпляры были пяти-десятигодовалые и старше,

Л и т е р а т у р а

1. J. M i k i s i n s k a. Sklad chemiczny szprota polawianego na poludniowy Baltyku w latach 1949-1953, Prace Morsk. Inst. Ryback, Gdyni, 1955, No. 8, 323-333.
2. F. B r a m s n a e s, E. M o g e n s e n and K. E. B i r n. Fedbestemelse i sild, brisling og makrel 1949-1952. Meed. Fiskeriminist. Forsogslab., Copenhagen, 1954.
3. Л. П. М и н д е р, О. Н. Ю д а н о в а. Весовой и химический состав атлантической сельди. Труды ПИНРО, 1962, вып. 13, стр. 77-92.
4. M. K r v a r i c and R. M u z i n i c. Investigation into the Fat Content in the Sardine (*Clupea pilchardus* Wahlb.) Tissues. Acta adriat. 1950, 4 (No. 8), 291-313.
5. В. М. Б о д н и е к. Питание балтийской кильки. "Ученые записки" X, Вопросы биологии. Рига, 1958, стр. 5-24.

About Fat and Protein Content

7.156.1:664.951.2

in the Flesh of Sprats

B.A. Krosing, K.A. Kask

Summary

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Catches of sprats (*Sprattus sprattus balticus*) include nearly 25% of extremely thin fish and nearly 25% extremely fatty fish. One can notice the difference visually. In the period of a year the flesh of thin fish had a maximum fat content of 8 to 12% during October - April and a minimum of 3 to 6% during May - August. Concerning fatty fish these data were 16 to 20% and 8 to 12% respectively. No difference was found in protein content. The age of fatty sprats was mostly 2 years, whereas that of thin sprats was from 5 to 10 years.

Для изучения способности кильки гидролизываться под действием собственных ферментов были подготовлены пробы из жира и мышечной ткани и из жира целой кильки. В пробы добавляли 7 % соли и 10 % толуола и инкубировали при 37 °C в течение 24 часов. Определяли прирост небелкового азота (НБА), т.е. азота, не осаждаемого трихлоруксусной кислотой (ТХУ), фильтрат сжигали по Кельдалю. Анализ проводился один раз в 1-2 месяца в течение одного года. Каждый раз готовили две отдельные средние пробы.

Активность ферментов определяли по методу Ансона [3]. Субстратом служил 2 % раствор казеина в нитратном буферном растворе при pH 8,0 $\pm$ 0,1. pH килькиных консервов колеблется в пределах от 5,0 до 6,7. Однако опыты, проведенные нами ранее, показали, что ферменты внутренних органов балтийской кильки в течение всего года имеют максимум протеолитической активности при pH 2,3-3,0 и pH 10,4-10,6. В интервале pH 5,5-7,5 протеолитическая активность внутренних органов резко уменьшается и даже наблюдается колебания в противоположные стороны. pH сильно влияет на результаты определений. В интер-

УДК 577.156.1:664.951.2

В.А. Кросинг, К.А. Каск

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ БАЛТИЙСКОЙ КИЛЬКИ

Известно [1-2], что основу созревания килечных пресервов составляет протеолиз под действием ферментов рыбы. Неизвестно пока, какую роль при этом играют ферменты пищеварительных органов и какую тканевые ферменты.

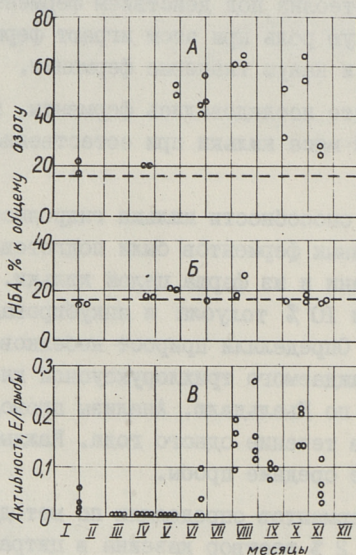
В данной работе исследовались ферменты, которые обуславливают гидролиз мяса кильки при естественном для соленой кильки pH.

Для изучения способности кильки гидролизироваться под действием собственных ферментов были подготовлены пробы из фарша мышечной ткани и из фарша целой кильки. В пробы добавляли 7 % соли и 10 % толуола и инкубировали при 37 °C в течение 24 часов. Определяли прирост небелкового азота (НБА), т.е. азота, не ссаждаемого трихлоруксусной кислотой (ТХУ), фильтрат сжигали по Кьельдалю. Анализы проводились один раз в 1-2 месяца в течение одного года. Каждый раз изготавливали две отдельные средние пробы.

Активность ферментов определяли по методу Ансона [3]. Субстратом служил 2 % раствор казеина в цитратном буферном растворе при pH 8,0 $\pm$ 0,1. pH килечных пресервов колеблется в пределах от 6,0 до 6,7. Однако опыты, проведенные нами раньше, показали, что ферменты внутренних органов балтийской кильки в течение всего года имеют максимумы протеолитической активности при pH 2,9-3,0 и pH 10,4-10,6. В интервале pH 5,5-7,5 протеолитическая активность внутренних органов резко увеличивается и даже малейшие колебания в величине pH сильно влияют на результаты определений. В интер-

вале pH 7,8-8,5 протеолитическая активность изменяется незначительно, независимо от его абсолютной величины. Исходя из этого, протеолитическую активность определяли во всех опытах при pH 8. Ферменты извлекались из внутренностей кильки 0,15 N раствором хлористого натрия. За единицу активности Е принимали мк-экв. освобожденного тирозина в минуту при 30 °C на 1 г веса рыбы. Определения проводились один раз в месяц на протяжении одного года. Каждый раз изготавливали четыре отдельные вытяжки.

Результаты, приведенные на фиг. 1, показывают, что значительная способность гидролизываться под действием собственных ферментов наблюдается только у фарша из целой кильки



Фиг. 1. Изменение активности протеолитических ферментов кильки на протяжении года.

А. Протеолиз фарша целой кильки.

Б. Протеолиз фарша мяса кильки.

В. Активность протеолитических ферментов внутренних органов при pH8.

---- содержание НБА в свежей кильке.

(фиг. 1А). Фарш из мышечной ткани гидролизуются при естественном для соленой кильки рН незначительно (фиг. 1Б). Некоторый гидролиз мышечной ткани в мае и августе может быть обусловлен ферментами внутренних органов, которые проникли в мясо перед отделением внутренностей, чему способствует в это время низкая жирность рыбы и повышенная температура окружающей среды. Из фиг. 1А и 1Б видно, что способность целой кильки гидролизываться под действием собственных ферментов, так и активность протеолитических ферментов внутренних органов в зимний и особенно весенний периоды года являются низкими, а в летний и осенний периоды — высокими.

В опытах фарш из кильки изготавливали из десяти рыб и вытяжку ферментов внутренностей из двух рыб. Как показывают данные на фиг. 1, активность ферментов внутренностей несколько различается у различных проб, изготовленных из кильки одного улова. По-видимому это связано с питанием рыб. Характерно, что большие колебания встречаются лишь во время усиленного питания, которое зависит от многих факторов, например, от состояния планктона в море [4] и от состояния рыбы.

Т а б л и ц а I

Активность протеолитических ферментов внутренних органов балтийской кильки

Орган	Средний вес в г	Протеолитическая ак- тивность	
		Е/г органа	%
Пилорические придатки	0,070	3,96	39,6
Желудок	0,143	0,12	2,4
Кишечник	0,103	3,30	48,3
Остальные органы	0,487	0,14	9,7
Всего			100,0

Для определения содержания протеаз в отдельных органах, внутренности кильки разделили на четыре части: пилорические придатки, желудок, кишечник и остальные органы. Кильки для этих опытов были выловлены 6 ноября 1970 г. и сразу же по-

мещены в лед. Внутренности удалили из кильки через 10 часов после вылова. Каждый орган внутренностей полоскали водой и из них изготавливали глицериновые вытяжки. Активность протеолитических ферментов определяли по методу Ансона на казеине при pH 8.

Как видно из таблицы I, высокой ферментативной активностью обладают пилорические придатки и кишечник. Другие органы, внутренностей, по-видимому, не влияют заметно на гидролиз мяса кильки при созревании.

В ы в о д ы

Мясо балтийской кильки при наличии 7 % хлористого натрия и при естественном для соленой кильки pH гидролизуются преимущественно под действием протеолитических ферментов внутренних органов. Активность протеолитических ферментов внутренних органов изменяется на протяжении года, являясь минимальной весной, а максимальной летом и осенью. Высокой ферментативной активностью обладают пилорические придатки и кишечник.

Л и т е р а т у р а

1. А.П. Черногорцев. Исследование процесса созревания и хранения килечных пресервов. Диссертация на соискание ученой степени канд. техн. наук, Астрахань, 1959.

2. Л.С. Левиева. Регулирование процесса созревания соленых сельдевых рыб и методы его оценки. Диссертация на соискание ученой степени канд. техн. наук, Л., 1965.

3. M.L. A n s o n. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiology, 22, p. 79-89, 1938.

4. В.М. Бодинек. Питание балтийской кильки. Ученые записки Рижского пединститута, X, Вопросы биологии, Рига, 1958, стр. 5-24.

V. Krosing, K. Kask

About Proteolytic Activity of

Enzymes of Baltic Sprats

Summary

The rapid decomposition of protein of ground and whole sprats of summer and autumn catches at 37°C was recorded. Decomposition ability decreased in winter. No marked decomposition of protein of spring sprats occurred. During all the year almost all protein remained undigested in ground sprats without entrails. Seasonal variation of activity of digestive enzymes correlated with decomposition ability of whole sprats.

Pyloric ceca and alimentary tract was found to be most active.

УДК 577.156.1:664.951.2

В.А. Кросинг, К.А. Каск

УСКОРЕНИЕ СОЗРЕВАНИЯ ПРЕСЕРВОВ ИЗ
БАЛТИЙСКОЙ КИЛЬКИ I (Применение
ферментных препаратов при изготовлении
килечных пресервов)

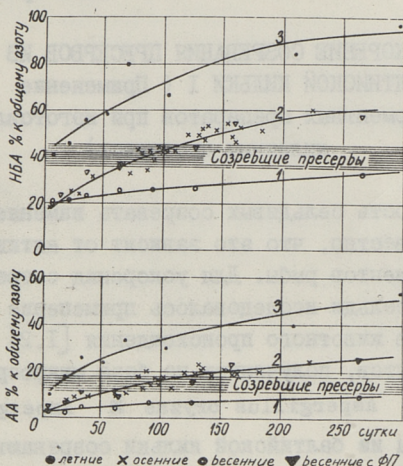
Способность сельдевых созреть изменяется на протяжении года. Известно, что это зависит от активности протеолитических ферментов рыбы. Для ускорения созревания медленно-созревающей сельди исследовалось применение протеолитических ферментов животного происхождения [1,2] и протеолитических ферментов, полученных на базе микроорганизмов, особенно грибов *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus terricola* [3-9]. Пресервы из балтийской кильки созревают нормально осенью (октябрь-декабрь). Весной (февраль-апрель) килька созревает очень медленно. Пресервы, изготовленные из весенней кильки не имеют хорошего качества, хотя жирность кильки в это время достаточно высокая.

Цель данной работы - выяснить возможность применения ферментных препаратов для получения хорошо созревших килечных пресервов из балтийской кильки весеннего сезона.

Для исследования процесса созревания мы изготавливали пресервы на Таллинском рыбокомбинате по рецепту "Таллинские кильки пряного посола". Исследованию подвергали четыре партии пресервов: осенние (изготовлены 6 ноября 1969 г.), весенние (6 мая 1969 г.), весенние с добавкой ферментативного препарата "прототерризин ПК 10 х" (6 мая 1969 г.) и летние (30 июня 1970 г.). Пресервы хранились в холодильном шкафу при температуре $0 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Процесс созревания характеризовали показателями небелкового азота (НБА), т.е. азота, не осаждаемого трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и определени-

ем аминного азота (АА). НБА определяли микрометодом Кьельдали и АА методом Поппе-Стивенсона [10].

По результатам анализа построили кривые, характеризующие ход созревания. Кривые вычислены методом наименьших квадратов по полиномам второй или третьей степени. Вычисления выполнены на электронно-вычислительной машине "Минск-22". Результаты представлены на фиг. 1.



Фиг. 1. Изменение количества небелкового азота (НБА) и аминного азота (АА) в кильчных пресервах при созревании.

1. Пресервы из весенней кильки.
2. Пресервы из осенней кильки и из весенней кильки с добавкой 0,01 % ферментного препарата "прототерризин ПК 10х".
3. Пресервы из летней кильки.

Наилучшую органолептическую оценку имеют пресервы с содержанием НБА 35-45 % и АА 12-18 %. Из фиг. 1 видно, что пресервы из осенней кильки созревают при 0 °С в два-три месяца и перезревают относительно медленно. Летняя килька (т.н. "калянусная" килька, у которой быстро лопаются брюшные стенки) созревает и перезревает очень быстро.

После одномесячного хранения пресервы были уже явно перезревшие. Весенняя килька достигает нижнего предела созревания лишь после годового хранения.

Скорость созревания осенних килек можно считать оптимальной, так как более быстрое созревание пресервов вызывает трудности в производстве и при реализации пресервов.

Снижение скорости созревания летней кильки — это проблема, которая требует специального изучения. Помимо снижения температуры хранения, может оказаться перспективным применение ингибиторов протеолитических ферментов, которые содержатся в соевых бобах или в картофеле II. Наши предварительные исследования показывали, что для полного ингибирования протеолитических ферментов, содержащихся в I кг летней кильки, требуется I литр картофельного сока, для 80 процентного ингибирования — 100 мл и для 50 процентного ингибирования 10 мл.

Для изучения ускорения созревания весенней кильки были изготовлены и продегустированы пресервы с добавкой следующих ферментных препаратов: 0,01 и 0,02 % "прототерризина ПК IOx", 0,01 и 0,02 % "протооризина ПК IOx", 0,01 % трипсина и 0,01 % папаина. Так как пресервы с 0,01 % добавкой ферментного препарата "прототерризина ПК IOx" получали на дегустациях всегда самые высокие оценки, для дальнейших исследований изготовили именно пресервы с 0,01 % добавкой "прототерризина ПК IOx" (ФП).

Как видно из фиг. I характер изменения содержания НБА и АА в пресервах из весенней кильки с добавкой ФП не отличается от характера изменения этих же показателей в пресервах из осенней кильки.

Органолептически сравнивать их трудно, так как они созревают в различные времена года: осенние — зимой, а весенние — летом. Органолептическое сравнение весенней кильки и весенней кильки с добавкой ферментного препарата дало существенное предпочтение последним (табл. I).

Т а б л и ц а I

Сводная таблица результатов дегустации весенних
килечных пресервов после 4-месячного хранения
при температуре $0 \pm 1^{\circ}\text{C}$

Вопросы	Кол-во лиц, которые дали предпочтение пресервам			Достоверность, с которой можно утверж- дать, что предпочтение существенное, %
	М ^I)	П ²)	не могли ска- зать	
I. Какой пробе даете об- щее предпочтение	2	18	0	99,9 (П)
2. Какой пробе даете предпочтение по за- паху	2	13	5	95 (П)
по вкусу	3	17	0	99 (П)
по внешнему виду	6	7	7	-
консистенции мяса	2	17	1	99 (П)
3. Какая проба более созревшая	1	19	0	99,9 (П)
жирная	1	9	10	-
соленая	10		10	99 (М)
4. Оценка 5	2	8		
4	4	9		
3	9	1		
2	2	0		
1	0	0		
не могу сказать	3	2		
Средняя оценка	3,35	4,88		
Количество лиц, которые считают пресервы отлич- ными	10 %	40 %		

М^I) - пресервы из весенней кильки

П²) - пресервы из весенней кильки с добавкой 0,01 % фермен-
тного препарата "прототеризин ПК 10х".

В ы в о д ы

Пресервы из осенней балтийской кильки созревают при $0 \pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение 2–3 месяцев. Содержание небелкового азота в созревших пресервах 35–45 %, содержание аминного азота 12–18 %. Пресервы из летней кильки созревают и перезревают очень быстро. После 1-месячного хранения при 0°C летние пресервы явно перезревают. Пресервы из весенней кильки созревают при 0°C в течение одного года или больше.

Продолжительность созревания весенней кильки можно сократить до 2–3 месяцев добавлением 0,01 % ферментного препарата "прототерризин ПК 10х". Такие пресервы отличаются хорошими вкусовыми качествами.

Л и т е р а т у р а

1. Ф.И. У х т о м с к а я. Ускорение созревания пресервов. Ж. Рыбная промышленность: сб. I, 1945, 49–52.
2. З.П. У с п е н с к а я. Об активности протеолитических ферментов некоторых промысловых рыб. Труды ВНИРО, 20, 1952, 256–265.
3. Л.Л. К о н с т а н т и н о в а и К.И. П а х о м о в а. Ускорение созревания атлантической сельди при посоле. Труды молодых ученых ВНИИМРХиО, 1964, 214–215.
4. Т.Н. Л о б а с о в а. Использование препаратов протеолитических ферментов для интенсификации процесса созревания соленой атлантической сельди. Сб. работ по технологии рыбных продуктов АтлантНИРО, 1964, 84–96.
5. Т.Н. Л о б а с о в а и В.П. Л и с о в а я. Разработка технологии ускоренного созревания соленого полуфабриката и готовых пресервов из атлантической сельди. Труды АтлантНИРО, вып. 16, 1965, 94–103.
6. Н.В. Ч е м е р е н к о, А.С. И в а н о в, В.Н. Г у щ и н а. Ускорение созревания сельди баночного посола с помощью ферментных препаратов. Труды КаспНИРО, 21, 1966, 43–51.

7. Л.Л. Константинова, К.И. Пахомова. Применение ферментных препаратов для улучшения созревания соленой атлантической сельди. Труды полярного научн.-исслед. и проектн. института морского рыбного хозяйства и океанографии, вып. 18, 1966, 161-173.

8. А.П. Леонова. Опыт применения ферментных препаратов при посоле сельди. Рыбохозяйственные исследования в бассейне Балтийского моря. Сб. 4, 1968, 257-261.

9. А.П. Леонова, А.П. Плоринь. Особенности созревания соленой рыбы под влиянием ферментного препарата. "Терризин ПК", там же, 262-278.

10. А.Г. Белозерский, Н.И. Проскуряков. Практическое руководство по биохимии растений. Изд. "Сов. Наука", 1951.

11. R. V o g e l, I. T r a u t s c h o l d and I. W e r l e. Natural proteinase inhibitors. New York, London, 1968.

V. Krosing, K. Kask

Acceleration of Ripening Process
=====

of Anchovies in Brine I
=====

Summary

Anchovy was made by packing Baltic sprats into tins with a dry mixture of salt, sugar and spices and was left to ripen in sealed tins at 0°C. After 2-3 months autumn sprats had ripened. Spring sprats had not ripened even after 11-12 months. The ripening process could be accelerated by means of adding 0.01 per cent of the "prototerrisin PK X" (proteolytic enzymes of mould *Aspergillus terricola*).

УДК 577.156.1:664.951.2

В.А. Кросинг, К.А. Каск, А.Г. Канн

УСКОРЕНИЕ СОЗРЕВАЕМОСТИ ПРЕСЕРВОВ ИЗ
БАЛТИЙСКОЙ КИЛЬКИ П (СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ
АМИНОКИСЛОТ В ПРЕСЕРВАХ)

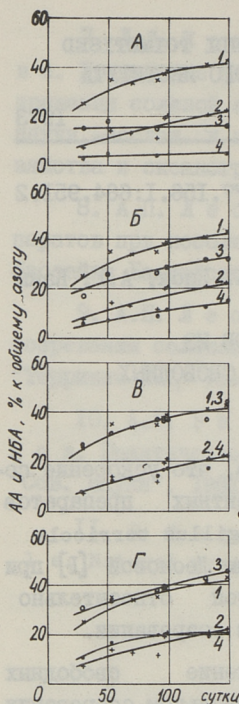
Многими исследователями установлено, что ускорение созревания соленой сельди при помощи ферментных препаратов из грибов *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus terricola* несколько изменяет вкус сельди. По данным Леоновой [1] при ускоренном созревании сельди освобождается относительно меньше аминокислот, чем при естественном созревании.

В данной работе сравнивается накопление свободных аминокислот в килечных пресервах при нормальном созревании и при созревании под действием ферментного препарата "прототерризин ПК 10 х" (ФП).

Было изготовлено пять партий пресервов:

1. Контрольная партия – стандартные пресервы "Таллинские кильки пряного посола".
2. Пресервы из килек без внутренностей.
3. Пресервы из килек без внутренностей с прибавлением 0,01 % ФП.
4. То же, с 0,2 % ФП.
5. То же, с 0,03 % ФП.

Пресервы были приготовлены из кильки, выловленной 16 декабря 1970 года. Во время выделения внутренних органов килька была еще в состоянии посмертного окоченения. Внутренности осторожно выделяли, кильки еще раз полоскали холодной водой. За ходом созревания пресервов следили по показателям небелкового азота (НБА) и аминного азота (АА), как и в первом этапе работы [2].



Фиг. 1. Изменение количества небелкового азота (НБА) и аминного азота (АА) в пресервах.

1. НБА в контрольных пресервах, 2. АА в контрольных пресервах, 3. НБА в опытных пресервах, 4. АА-в опытных пресервах.

Опытные пресервы: А - из килек без внутренностей, Б - из килек без внутренностей с прибавлением 0,01 % ФП, В - то же с 0,02 % ФП, Г - то же с 0,03 % ФП.

✕ НБА и + АА контрольных пресервов

● НБА и ● АА опытных пресервов

Как видно из фиг. 1А, гидролиз белков в пресервах под действием только мышечных ферментов идет крайне медленно. Чтобы добиться такой скорости гидролиза белков, как это наблюдается в контрольных пресервах, необходимо добавлять в пресервы 0,02 % ФП (фиг. 1В).

Содержание свободных аминокислот определяли в созревших контрольных пресервах и в созревших пресервах с 0,02 % добавкой ФП (после 3-месячного хранения при температуре $0 \pm 1^\circ \text{C}$). В пресервах из кильки без внутренностей содержание свободных аминокислот определяли после 3-х и 5-месячного хранения.

Свободные аминокислоты выделяли из водяной вытяжки содержимого пресервов центрифугированием после осаждения остальных фракций белков при помощи 1 % пикриновой кислоты. (В контрольных пресервах внутренности извлекали и от-

брасывали перед изготовлением вытяжки). Свободные аминокислоты определяли по методу Sprackman et al. [3] на автоматическом анализаторе аминокислот 6020-16A.

Содержание свободных аминокислот вычисляли в мг на 100 г мяса рыбы (графа 3 и 6 в таблицах I-3), в мг на 100 г белка (графа 4 и 7) и в процентах свободной аминокислоты от общего содержания данной аминокислоты в белках рыбы (графа 5 и 8). Общий аминокислотный состав белков рыбы взяли по Conell and Howgate [4].

Т а б л и ц а I

Содержание свободных аминокислот в пресервах из
килек без внутренностей

Наименование аминокислот	Общее содержание г/100г белков	Содержание свободных аминокислот					
		мг/100г мяса кильки	мг/100г белка	графа 4 графа 2 х 0,1 %	мг/100г мяса кильки	мг/100г белка	графа 7 графа 2 х 0,1 %
		3-х месячные пресервы			5-месячные пресервы		
I	2	3	4	5	6	7	8
Асп.	10,95	5,1	34,2	0,31	7,7	51,6	0,47
Тре.	5,34	7,1	47,6	0,43	10,2	68,4	0,62
Сер.	5,63						
Глу	16,95	5,1	34,2	0,20	8,9	59,5	0,35
Про	4,40	2,7	18,1	0,41	4,1	27,4	0,62
Гли	5,06	4,1	27,5	0,54	5,3	35,5	0,70
Ала	7,35	9,2	61,7	0,84	11,9	79,8	1,09
Вал.	6,00	5,0	33,5	0,56	6,4	42,7	0,71
Мет.	3,60	следы	следы	-	следы	следы	-
	5,09	3,2	21,4	0,42	3,9	26,1	0,51
	9,59	4,8	32,2	0,34	7,4	49,5	0,52
Тир.	4,10	1,6	10,7	0,26	2,2	14,7	0,36
Фен.	4,73	2,2	14,7	0,31	3,8	25,4	0,54
Лиз.	10,29	5,2	34,8	0,34	10,8	72,5	0,71
Гис.	3,69	13,9	93,0	2,52	11,3	75,7	2,06
Арг.	7,33	3,6	24,1	0,33	4,9	32,8	0,45
Цис I/2	1,42	следы	следы	-	1,4	9,4	0,66

1	2	3	4	5	6	7	8
Три.	1,41	н.о.	н.о.	—	н.о.	н.о.	—
	Всего	72,8	487,7		100,2	671,0	

НБА, %	15,2	16,2
АА, %	3,8	4,9

Т а б л и ц а 2

Содержание свободных аминокислот в созревших
контрольных пресервах ¹⁾

Наименование аминокислот	Общее со- держание г/100 бел- ка	Содержание свободных аминокислот		
		мг/100г мяса кильки	мг/100 г белка	% $\frac{\text{графа 4}}{\text{графа 2}} \times 0,1$
1	2	3	4	5
Асп.	10,95	37,8	253	2,31
Тре.	5,34			
Сер.	5,64	43,7	239	2,68
Глу.	16,95	37,9	254	1,54
Про.	4,40	16,9	113	2,57
Гли.	5,06	13,9	93	1,84
Ала.	7,35	29,3	196	2,68
Вал.	6,00	26,5	178	2,97
Мет.	3,60	11,3	76	2,11
И-лей	5,09	18,2	122	2,40
Лей	9,59	40,2	269	2,70
Тир.	4,10	16,2	109	2,60
Фен.	4,73	15,1	101	2,14
Лиз.	10,29	54,4	362	3,52
Гис.	3,69	23,2	154	4,17
Арг.	7,33	38,2	256	3,50
Цис I/2	1,42	12,1	81	5,70

I	2	3	4	5
Три	I,4I	н.о.	н.о.	-
Всего		434,6	29IO	
НБА, %			39,0	
АА, %			20,1	

- 1) Перед определением внутренности извлекали из килек и отбрасывали.

Т а б л и ц а 3

Содержание свободных аминокислот в созревших пресервах из килек без внутренностей с 0,02 % "прототерризином ПК IOx"

Наименование аминокислот	Общее содержание г 100 г белков	Содержание свободных аминокислот					
		мг/100 г мяса кильки	мг/100 г белка	4 % графа х графа 2	мг/100 г мяса кильки	мг/100 г белка	7 % графа х графа 2
I	2	3	4	5	6	7	8
Асп.	10,95	51,4	344	3,14	31,0	208	1,91
Тре.	5,34	57,5	385	3,51	39,0	261	2,38
Сер.	5,63						
Гли.	16,95	47,8	320	1,89	32,4	217	1,28
Про.	4,40	21,5	144	3,28	16,9	113	2,57
Гли.	5,06	18,4	123	2,44	12,2	82	1,62
Ала.	7,35	44,9	300	4,08	30,9	207	2,82
Вал.	6,00	34,1	228	3,80	28,4	190	3,17
Мет.	3,60	14,5	971	2,70	10,1	68	1,89
И-лей	5,09	28,5	191	3,76	14,7	99	1,94
Лей	9,59	60,1	402	4,20	37,8	254	2,65
Тир.	4,10	14,4	96,5	2,36	9,5	64	1,56
Фен.	4,73	24,2	162	3,43	15,5	104	2,20
Лиз.	10,29	38,3	257	2,50	49,4	395	3,84

I	2	3	4	5	6	7	8
Гис.	3,69	21,6	145	3,94	24,3	163	4,42
Арг.	7,33	49,7	330	4,50	40,8	274	3,74
Цис I/2	1,42	н.о.	н.о.	-	11,4	77	5,42
Всего		526,9	3600		404,3	2776	
НБА, %			36,1			35,4	
АА, %			12,2			17,4	

Как видно из табл. I, пресервы из килек без внутренностей содержат очень мало свободных аминокислот, что естественно, поскольку и протеолиз белков был незначительным. Только гистидин и аланин присутствуют в относительно больших количествах. Следует отметить, что мясо свежей сельди отличается высоким содержанием именно этих аминокислот [5].

Данные таблиц 2 и 3 свидетельствуют о том, что качественное и количественное содержание свободных аминокислот в созревших килечных пресервах, где ферменты внутренних органов были заменены ферментами гриба *Asp. terricola* при одинаковой скорости и степени созревания не отличается существенно от содержания свободных аминокислот в созревших контрольных пресервах.

В ы в о д ы

I. Без участия ферментов внутренних органов в килечных пресервах протеолиз белков и освобождение аминокислот идет крайне медленно.

2. При применении ферментного препарата из гриба *Asp. terricola* в килечных пресервах протеолиз не идет меньшей глубиной, чем при естественном созревании.

Авторы выражают благодарность кандидату хим. наук Л. Напша и инженеру С. Ребане за проведение анализов аминокислот на автоматическом анализаторе аминокислот 6020-16A.

Л и т е р а т у р а

1. А.П. Леонова. Опыт применения ферментных препаратов при посоле сельди. Рыбохозяйственные исследования в бассейне Балтийского моря. 1968, сб. 4, 257-261.

2. В.А. Кросинг, К.А. Каск. Ускорение созревания пресервов из балтийской кильки I, см. наст. сб., стр.15.

3. D. H. Sprackman, W. H. Stein and S. Moore. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem. 30, 1190-1206, 1958.

4. J. J. Connell and P. F. Howgate. The amino acid composition of some British food fishes, J. Sci. Food Agric., 10, 241-244, 1959.

5. R. B. Hughes. Chemical studies on the herring (*Clupea harengus*). II The free amino acids of herring flesh and their behavior during post-mortem spoilage. J. Sci. Food Agric., 10, 558-564, 1959.

V. Krosing, K. Kask, A. Kann

Acceleration of Ripening Process of

Anchovies in Brine II

Summary

Ripening of anchovies include the decomposition of fish proteins. Significant proteolytic decomposition of sprats occurred only in the presence of digestive enzymes. The deficiency of digestive enzymes in spring fish can be compensated by means of adding mould enzymes. No differences in the formation of nonprotein-nitrogen, amino-nitrogen, and only slight differences in content of free amino acids in ripe sprats were found, when digestive enzymes had been substituted by "prototerrisin PK 10 X" (proteolytic enzymes of mould *Aspergillus terricola*).

УДК 664.144:577.154.21

А.Э. Эрин, Ю.М. Канн, К.А. Каск

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНВЕРТАЗЫ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ ПОМАДНЫХ КОНФЕТ

Одним из наиболее существенных недостатков помадных конфет является их черствение, вызванное процессом кристаллизации сахарозы при хранении конфет.

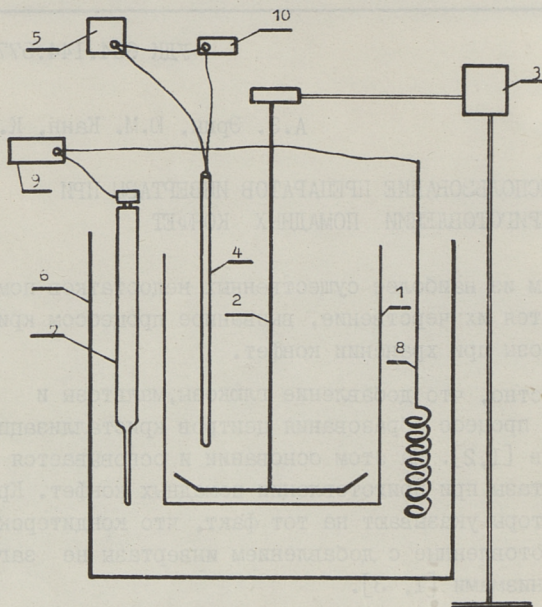
Известно, что добавление глюкозы, мальтозы и фруктозы замедляет процесс образования центров кристаллизации и рост кристаллов [1,2]. На этом основании и основывается применение инвертазы при приготовлении помадных конфет. Кроме того, многие авторы указывают на тот факт, что кондитерские изделия, приготовленные с добавлением инвертазы не загрязняются микроорганизмами [1, 3].

Целью настоящей работы было исследование возможностей улучшения качества помадных конфет применением фермента инвертазы. Для выяснения оптимальных параметров добавления фермента на кондитерской фабрике "Калев" были проведены полу-производственные опыты. Принципиальная схема опытной установки приведена на фиг. 1.

Помада была приготовлена по рецептуре конфеты "Фестиваль". Использовали порошкообразный ферментный препарат, полученный из института "Казгипропищепром" с β -фруктофуранозидазной активностью 2000 Е/г.

Помаду брали из термостата с температурой 90-100 °С. Фермент размешивали с небольшим количеством помады и добавляли в опытный сосуд, где выдерживали помаду при предусмотренной температуре и определенной влажности. Перемешивали 10 минут. Конфеты выливали вручную в крахмальные формы и сушили в скорой сушилке. Упаковывали вручную. Конфеты хранились в термостате при температуре 22 °С и φ 80 %. Периодически

определяли влажность, содержание редуцирующих сахаров и органолептические показатели конфет.

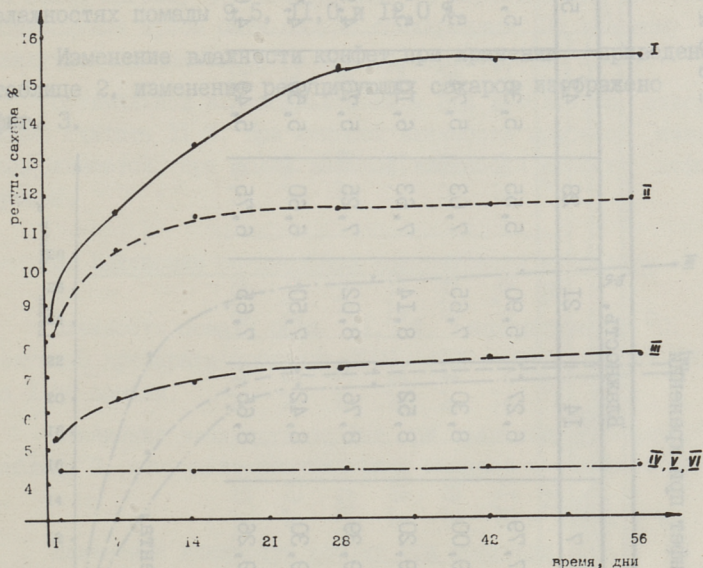


Фиг. 1. Опытная установка. 1 - сосуд для помады; 2 - мешалка; 3 - электромотор; 4 - термомпара; 5 - микровольтметр; 6 - водяная рубашка; 7 - контактный термометр; 8 - нагреватель; 9 - включатель; 10 - нулевая точка термомпары.

Редуцирующие сахара определяли по методу Тетге и Ниерле [4]. Влажность определяли при сушке до константного веса при температуре 105°C . Органолептически контролировали конфеты через 4 недели. Дегустационная комиссия состояла из 19 человек. Использовали парный метод сравнения проб [5].

1. Выяснение оптимальной температуры добавления инвертазы

Влажность помады была 10 %. Ферментного препарата добавили 6000 Е на 1 кг помады. Препарат добавляли при температурах 68, 75 и 80 °С. Параллельно провели контрольные опыты без фермента.



Фиг. 2. Изменение редуцирующих сахаров конфет при хранении.
 I — фермент добавили при температуре 68°С.
 II — " " " " " " " " 75°С.
 III — " " " " " " " " 80°С.
 IV, V, VI — контрольные опыты без фермента.

Изменение влажности конфет при хранении приведено в таблице I, измерение редуцирующих сахаров изображено на фиг. 2.

По органолептическим данным конфеты пробы № I были мягче и более приятны по консистенции, чем другие пробы (с вероятностью 95 %). По вкусу, аромату и внешнему виду разницы не было. Пробы № 2 и 3 не отличались от контрольных проб.

Т а б л и ц а I

Изменение влажности конфет при хранении

№ пробы	Температура добавления фермента	Влажность, %						Изменение влажности, %
		I	7	I4	2I	28	42	56
I	68	9,97	7,79	6,27	5,90	5,55	5,36	5,12
2	75	10,00	9,00	8,30	7,65	7,03	5,74	5,35
3	80	10,10	9,20	8,52	8,14	7,63	6,10	5,75
4 x)	68	9,90	9,39	8,76	8,02	7,25	5,70	4,95
5 x)	75	9,70	9,30	8,42	7,50	6,60	5,50	5,0
6 x)	80	9,70	9,26	8,65	7,65	6,75	5,49	5,08

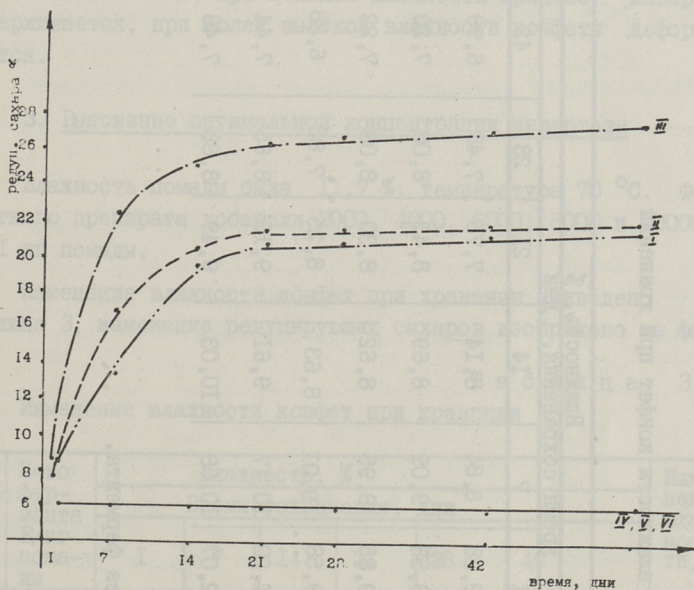
x) - контрольные опыты без фермента.

Из полученных данных явствует, что для добавления инвертазы температура помады не должна превышать 70°C .

2. Влияние влажности помады на инверсию сахара

Температура помады была 70°C . Ферментного препарата добавляли 6000 Е на 1 кг помады. Препарат добавляли при влажностях помады 9,5, 11,0 и 12,0 %.

Изменение влажности конфет при хранении приведено в таблице 2, изменение редуцирующих сахаров изображено на фиг. 3.



Фиг. 3. Изменение редуцирующих сахаров конфет при хранении.

I — фермент добавили при влажности 9,5 %

II — " " " " " " " " 11,0 %

III — " " " " " " " " 12,0 %

IV, V, VI — контрольные опыты без фермента.

Таблица 2

Изменение влажности конфет при хранении

№ пробы	Исходная влажность помады, %	Влажность, %							Изменение влажности, %
		время сохранения, дни							
		I	7	14	21	28	42	56	
I	9,5	9,38	8,84	8,14	7,75	7,40	6,99	6,72	2,86
2	11,0	9,88	9,09	8,69	8,43	8,00	7,20	6,80	4,40
3	12,0	9,85	8,95	8,62	8,30	8,08	7,22	6,75	5,32
4 х)	9,5	9,58	9,01	8,63	8,25	7,85	6,88	5,98	9,60
5 х)	11,0	11,20	10,17	9,61	9,10	8,65	7,44	6,27	4,93
6 х)	12,0	12,07	10,58	10,03	9,49	8,88	7,46	6,15	5,92

х) контрольные опыты без фермента.

Для инверсии сахарозы требуется достаточное количество свободной воды. При более высокой влажности помады инверсия сахарозы идет интенсивнее. Пробы № 5 и 6 были настолько мягкие, что деформировались даже при ручной упаковке. Пробы № 2 и 3 были более твердые и не деформировались, так как в течение инверсии связывалась часть воды.

Органолептически все пробы с ферментным препаратом были более мягкие, чем контрольные (с вероятностью 99 %). Все контрольные пробы были сильно осахаренные. По внешнему виду наилучшей оказалась проба № 2 (с вероятностью 95 %).

Оптимальной влажностью помады при добавлении инвертазы можно считать II %. При меньшей влажности процесс инверсии задерживается, при более высокой влажности конфеты деформируются.

3. Выяснение оптимальной концентрации инвертазы

Влажность помады была II,7 %, температура 70 °С. Ферментного препарата добавили 2000, 4000, 6000, 8000 и 10000 Е на I кг помады.

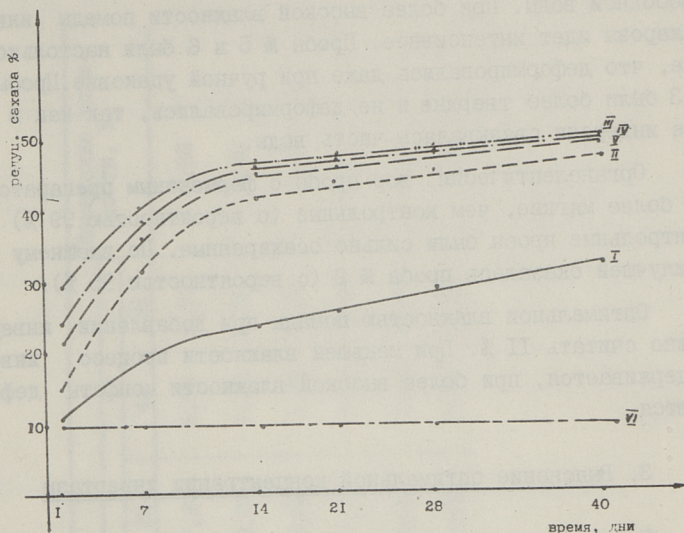
Изменение влажности конфет при хранении приведено в таблице 3, изменение редуцирующих сахаров изображено на фиг. 4.

Т а б л и ц а 3

Изменение влажности конфет при хранении

№ пробы	К-во фермента Е/кг помады	Влажность, %						Изменение влажности, %
		Время сохранения, дни						
		I	7	14	21	28	40	
1	2000	II,72	8,96	7,79	7,04	6,53	5,98	5,74
2	4000	II,69	7,99	6,78	6,41	6,41	5,65	6,04
3	6000	II,67	7,75	6,63	6,28	5,94	5,47	6,20
4	8000	II,65	7,41	6,50	6,08	5,75	5,28	6,37
5	10000	II,63	7,15	6,30	5,83	5,74	5,07	6,56
6 х)	0	II,71	8,95	8,25	7,78	7,98	6,75	4,96

х) — контроль.



Фиг. 4. Изменение редуцирующих сахаров при хранении.

1	-	фермент добавили	2000 Е/КГ
П	-	"	4000 "
Ш	-	"	6000 "
1У	-	"	8000 "
У	-	"	10000 "
У1	-	контроль без фермента.	

Органолептически отметили мягкость конфет в следующем порядке: № 5, № 4, № 3, № 2, № I, № 6 (с вероятностью 99 %). Несмотря на то, что при добавлении фермента в количестве 6000 Е/кг и больше у конфет отмечался специфический привкус, они по вкусу не уступали контрольным образцам. Следовательно привкус можно не считать неприятным. Оптимальной дозой инвертазы можно считать 4000 Е/кг.

4. Сравнение разных препаратов инвертазы

Влажность помады была 11,0 %, температура 70 °С. Инвертазы добавляли 4000 Е на 1 кг помады. Использовали следующие препараты инвертазы:

1) Порошкообразный дрожжевой препарат из института "Казгипропищепром" с β -фруктофуранозидазной активностью 2000 Е/г [6].

2) Сиропообразный препарат из института "Казгипропищепром" с β -фруктофуранозидазной активностью 300 Е/г [6].

3) Препарат из экспериментального цеха инвертазы пивного завода г. Донецк с β -фруктофуранозидазной активностью 1300 Е/г (7).

4. Препарат инвертазы, приготовленный в отраслевой лаборатории пищевых продуктов ТПИ с β -фруктофуранозидазной активностью 38600 Е/г. Препарат был приготовлен при автолизе пивных дрожжей в присутствии фосфата аммония и бензола и осажден этанолом.

Изменение влажности конфет приведено в таблица 4, изменение редуцирующих сахаров изображено на фиг. 4.

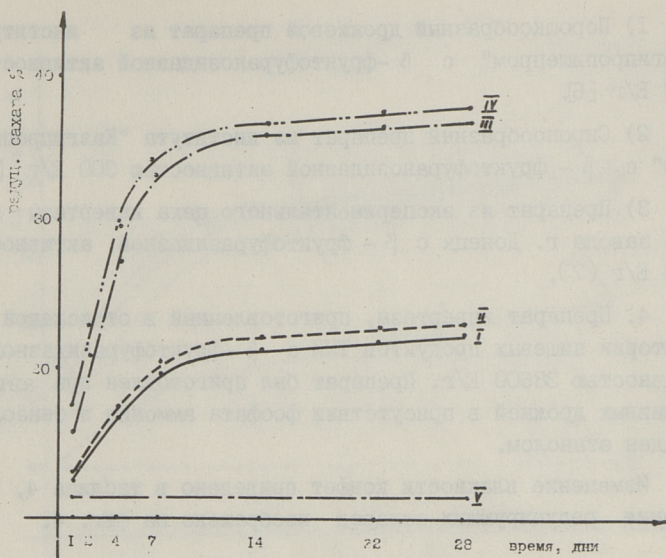
Т а б л и ц а 4

Изменение влажности конфет при хранении

№ п.п	№ пре- па- рата	Влажность, %								Изме- нение влаж- ности, %
		Время сохранения, дни								
		I	2	4	6	8	I4	22	28	
I	I	9,58	9,22	8,80	8,46	8,14	7,29	6,24	5,60	3,96
2	2	10,59	10,28	9,87	9,55	9,24	8,37	7,23	6,44	4,11
3	3	9,62	9,0	8,55	8,22	7,92	7,04	6,34	5,59	4,03
4	4	10,77	10,18	9,57	9,25	8,98	8,07	6,91	6,24	4,53
5	КОНТ- РОЛЬ	11,07	10,86	10,38	9,90	9,40	7,96	6,38	5,50	5,57

По органолептическим показателям самыми вкусными оказались пробы № 3 и 4 (с вероятностью 99 %), исследовались пробы № 2, № 1 (слабый дрожжевой привкус) и контрольные конфеты (черственный привкус).

По консистенции самыми приятными оказались пробы № 3 и № 4 (с вероятностью 99 %) исследовались пробы № 1, № 2 и контрольные конфеты (сильно засахаренные).



Фиг. 5 Изменение редуцирующих сахаров при хранении.

1 - с препаратом № 1; II - с препаратом № 2; III - с препаратом № 3; IV - с препаратом № 4; V - контроль без препарата.

Выводы

1. При добавлении инвертазы температура помады должна быть не более 70 °С.
2. Оптимальной влажностью помады следует считать II %.
3. Оптимальной концентрацией инвертазы следует считать 4000 Е на I кг помады.
4. При приготовлении помады следует предпочитать очищенные препараты инвертазы. Неочищенные препараты хотя и дешевле, но имеют привкус.

Л и т е р а т у р а

1. J.W. M a n s v e l t. The Use of Invertase in Confectionery, Confectionery Production, 6, 484-485, 1965.

2. В.Н. Н и к и ф о р о в а, А.В. З у б ч е н к о. Физико-химические основы производства сахарных кондитерских изделий, Москва, 1969.

3. А.З. Б а р у. Исследования по получению ферментных препаратов инвертина и применению их в кондитерской промышленности. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук. Москва, 1956 г.

4. G. T e g g e, W. N i e r l e. Stärke, 17, 4, 1965.

5. Д.Е. Т и л а н я н. Органолептический анализ пищевых продуктов. "ПП", Москва, 1962.

6. А.А. К а т а е в а, Л.Н. М е н д е л ь с о н, А.С. М а л и н о в с к и й. Регламент временного производства комплексного дрожжевого ферментного препарата с высокой активностью β -фруктофуранозидазы из пивных дрожжей. Алма-Ата, 1968.

7. В.Е. О г у р ц о в а, Н.В. Б а т к о в, Д.Б. Л и в - ш и ц. Ферментная и спиртовая пром. 8, 27-28, 1971.

A.Erin, J. Kann, K. Kask

The Use of Invertase Preparations in Pomade

Sweets

Summary

The use of invertase in pomade sweets has been discussed. The best results have been obtained by adding the invertase 4000 U to 1 kg of pomade at the temperature 70°C and moisture content 11%. The purified preparations of invertase are to be preferred.

УДК 663.256.12

Х.Я. Киппер

ТЕРМИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ЯГОДНЫХ ВИН

По сравнению с производством виноградных вин, технологические варианты производства плодоягодных вин досих пор изучались недостаточно. В районах, где по климатическим условиям виноград не выращивается, как например, в Эстонской ССР, развитие винодельной промышленности на базе плодов и ягод можно считать целесообразным.

Термическая обработка давно известна и часто применяется для ускорения созревания виноградных вин для придания некоторым сортам специфического вкуса и аромата. Можно считать, что этот прием может быть применен и для плодоягодных вин, как для ускорения их приготовления, так и для выработки новых сортов.

В настоящей работе исследовалось влияние термической обработки на некоторые ягодные вина, в частности, рябиновые. Рябиновое вино вкусно, но его производство является длительным, по продолжительности в 3-4 раза превышающее производство других плодово-ягодных вин.

В опытах применялись пробы вина и виноматериалов из рябины и черной аронии, доставленные с Валгаского винозавода, в также вино, сброженное в лаборатории в 20-литровых бутылках. В таблице I приведены данные по приготовлению вин и виноматериалов.

На Валгаском винозаводе мезга, состоящая из сока, сахара и воды, подвергается кратковременному сбраживанию до содержания этилового спирта 5-8 %. Затем путем прибавления этанола смесь консервируется. Получаемый виноматериал, содержащий много кислот, кондиционируется в вино, прибавляя

Приготовление вин и виномастералов

промышленного приготовления
лабораторного приготовления

Свойства вин и виноматериалов

Показатель	Ед.	О б о з н а ч е н и е									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Год приготовления		1967	1969	1969	1970	1971	1971	1971	1971	1970	1970
Сырье		рябина									
Содержание сока	мл/100 мл	40	74		35	74		34		30	красн. смород. + крыжовн.
Плотность	г/мл	1,050	1,015		1,048	1,015			1,057	1,057	
Этанол	мл/100 мл	17	17	16	16	16	16	16	16	13	
Общие кислоты	экв/л	0,11	0,26	0,13	0,14	0,26	0,12	0,10	0,07	0,13	
Летучие кислоты	мэкв/л		2,80	0,58	9,1	3,4	1,7	4,3	1,7	1,5	
Летучие сложн. эфиры	мэкв/л		6,20	3,09	5,0		1,3	3,3			
Сухие вещества	%	16,7	9,3	12,5	17,3	8,8	14,0		20,5	17,3	
Ред. сахара	г/100 мл		0,9	8,4	12,0	0,5	10,5		16,8	12,0	

Т а б л и ц а 3

Термическая обработка вин и виноматериалов и
результаты их дегустации

№ дегу- станции	Обозна- чение	Режим термической обработки		Возраст вин, месяцы		Оценка, балы
		°C	продолжи- тельность сутки	до тер- мичес- кой об- работки	при де- густа- ции	
I	2	3	4	5	6	7
I	I	-	-	-	40	8,7
	II	-	-	-	I6	7,8
	II	50	30	I5	I6	8,5
2	M II ^ж	-	-	-	I4	6,8
		38	34	8	I4	6,8
		38	68	8	I4	6,8
		38	I6I	8	I4	7,8
		54	33	8	I4	7,3
	II	-	-	-	20	7,3
3	III	50	60	I7	20	8,0
		-	-	-	9	6,9
	VII	50	60	6	9	7,7
		-	-	-	I8	6,9
	VI	50	60	I5	I8	7,7
		-	-	-	20	8,3
4	IV	50	60	I7	20	7,2
		-	-	-	4	8,5
		50	I4	2	4	8,6
		50	26	2	4	8,7
		50	32	2	4	8,7
		50	46	2	4	8,8
	65	5	2	4	8,3	

Продолжение таблицы 3

I	2	3	4	5	6	7
		65	9	2	4	8,4
		65	13	2	4	8,3
	M IV*	50	56	2	4	8,7
		65	11	2	4	8,5
		-	-	-	17	8,4
		50	10	15	17	8,4
	III	50	42	15	17	7,9
		65	5	15	17	8,3
4		65	10	15	17	8,5
		-	-	-	4	7,9
		50	7	2	4	7,9
		50	32	2	4	7,9
	Y	65	2	2	4	8,1
		65	2	2	4	8,0
		65	11	2	4	8,0

* Виноматериалы МI и M IV перед дегустацией кондиционировались в вина I и IV.

Анализ проб термически обработанных вин

В и н о	Режим термической обработки		Кислоты экв./л	Летучие соединения		
	t °C	продолжительность, сутки		кислоты мэкв/л	сложн. эфиры мэкв/л х 1000	альдегиды мг/л
Ш	-	-	0,133	9,1	5,0	
	50	10	0,132	9,1	3,2	
	50	42	0,127	7,4	4,4	
	65	5	0,130	9,0	4,0	
	65	10	0,125	7,9	5,4	
	-	-	0,096	4,3	3,3	
У	50	7	0,095	4,2	3,2	8,6
	50	32	0,093	4,3	3,1	11,8
	65	2	0,095	4,2	3,5	14,8
	65	5	0,093	4,3	3,1	14,8
	65	11	0,090	4,6	4,8	23,2
	-	-	0,114	1,7	1,3	2,9
IV	50	14	0,110			
	50	26	0,109	1,6	2,0	10,4
	50	32	0,108	1,5	1,8	5,9
	50	46	0,106	1,5	1,5	10,0
	65	5	0,109			
	65	9	0,108	1,5	2,0	8,6
М IV*	65	20	0,105	1,4	2,6	13,4
	50	56	0,106	1,6	2,2	2,2
	65	11	0,100	1,3	2,7	2,0

* термически обработанный виноматериал М IV перед анализом кондиционировался в вино IV.

этанол, воду и сахар до установления предвиденного им содержания.

Возможен и другой вариант — сброженная мезга сразу кондиционируется.

По приведенным в таблице I данным видно изменение содержания кислот при сбраживании и выдержке вин. Промышленное сбраживание рябиновой мезги приведет к некоторому уменьшению содержания кислот. Приготовление виноматериала и кондиционирование не изменяют общего количества кислот, их концентрация, конечно, изменяется.

Содержание кислот при выдержке промышленных вин в одном случае повышалось (возраст вина 3 года), в другом случае (после 0,3-год выдержки) осталось практически неизменным. В лабораторном рябиновом вине, однако, содержание кислот во время 105-суточного сбраживания значительно повысилось, при выдержке — снизилось. Содержание кислот в вине, изготовленном из черной аронии и хеноменеса, значительно падает в обоих процессах.

В таблице 2 приведены дополнительные данные по винам, приведенным в таблице I, и данные по пробам, подвергающимся термической обработке.

Для термической обработки вин и виноматериалов пробы, герметически закупоренных в поллитровые бутылки, помещали в термостат. Заполненный воздухом объем составлял 60 мл на 1 литр вина. После термической обработки пробы проанализировались и сравнивались с необработанными. Определялось изменение органолептических свойств, общее содержание кислот, содержание летучих кислот и сложных эфиров, а для некоторых проб также содержание летучих альдегидов. Соответствующие данные приведены в таблицах 3 и 4.

Термическая обработка рябинового вина в общем вызывает его затемнение, положительно влияя на цвет вина. Образующийся осадок легко отфильтровывается. Окраска вин из аронии значительно не изменится при термической обработке.

При оптимальном режиме термической обработки улучшается вкус и аромат вина, но в неодинаковой степени для всех партий. Лучшие результаты получены вином II при 50 °C после 30-суточного нагревания. Только в одном случае (вино IV, со-

державшее мало кислот и много сахара) качество вина снизилось. Более длительное нагревание придает вину неприятный привкус карамели.

Термической обработке можно подвергать или виноматериал, или кондиционированное вино, причем в результатах различия не заметны. Опыты показали, что нагревание вызывает увеличение содержания летучих сложных эфиров и уменьшение количества как нелетучих, так и летучих кислот.

В специальных опытах исследовалось влияние воздуха на количество вина при его нагревании. Если в сосуде было воздуха до 100 мл на литр вина, его влияние было незаметное. Однако присутствие больших количеств воздуха является причиной возникновения неприятного привкуса и исчезновения характерного для вина специфического приятного аромата.

В ы в о д ы

Термическая обработка — нагревание плодово-ягодных вин позволяет придавать им новые вкусовые и ароматные оттенки и улучшать их качество. Нагревание позволяет значительно сократить продолжительность выдержки вина, что особенно важно для медленно созревающего рябинового вина. Ориентировочно можно считать оптимальными условиями термической обработки режим выдержки при 50 °C в течение одного месяца или при 65 °C в течение 10–15 суток. Для каждой конкретной партии вина следует оптимальный режим определять экспериментально.

Измерялось содержание летучих и нелетучих кислот и др. соединений при термической обработке вин, а также при сборивании мезги и приготовлении вина и выяснились основные закономерности изменения их содержания.

1973
H. Kipper

Heat Treatment of Ashberry Wines
=====

Summary

The influence of heat treatment of red and black ashberry wines on their aroma and taste components has been investigated. The content of volatile and non-volatile acids, volatile esters and aldehydes during the thermal maturation has been determined. As a result of heat treatment of above-mentioned wines acceleration of maturation and enhancing of taste and aroma has been obtained.

УДК 664.64.016.7

К.А.Каск, Р.Е.Трейманн, Т.Л.Лиеберт

О ПИТАТЕЛЬНОЙ ЦЕННОСТИ ХЛЕБО-БУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Пищевой рацион населения Эстонской ССР неуравновешен вследствие широкого потребления рафинированных и богатых жирами пищевых продуктов [1,2]. Калорий потребляют на 10 % больше физиологической потребности, но недостает полноценных белков и минеральных солей, особенно витаминов.

Важнейшими пищевыми продуктами в пищевом рационе населения являются хлебобулочные изделия, которые покрывают 31,8 % от суточной калорийности, от этого хлеб 75 %. Кроме калорий хлеб должен удовлетворять значительную часть потребности в белках, минеральных солях и витаминах группы В.

При размолоте пшеницы в сортовую муку теряются 72 - 84% витаминов группы В, содержащиеся в зернах. Потери минеральных солей и микроэлементов составляют 40-88,5 % [3]. Хотя сортовая мука сохраняется лучше и хлеб из нее вкуснее, чем хлеб из простой муки, большое потребление хлеба из сортовой муки является одной из причин в образовании неуравновешенного пищевого рациона населения. Питательную ценность хлеба снижают и добавляемые в тесто рафинированные пищевые продукты, как сахар и маргарин.

Для повышения питательной ценности хлебо-булочных изделий в Эстонской ССР добавляют в тесто обезжиренные молочные продукты.

Обрат, творог, сухой обрат и сгущенный обрат повышают в хлебе содержание белков, минеральных солей и витаминов, а также повышают качество белков. Сыворотка повышает в основном содержание минеральных солей и витаминов в хлебе и ускоряет брожение теста.

При оценке питательной ценности хлеба необходимо учитывать действительную структуру питания населения. В условиях Эстонской ССР, где пищевой рацион населения содержит избыток калорий, следует питательную ценность хлеба оценивать тем выше, чем больше доля белковых калорий и меньше доля жировых калорий в общей калорийности хлеба. Для более совершенной оценки питательной ценности необходимо определить содержание в хлебе всех питательных веществ и результаты выразить на 1000 или 100 ккал, а также следует определить аминокислотный состав белков.

Для оценки питательной ценности основных сортов хлеба, выпекаемых в Эстонской ССР, определяли в них содержание белков и аминокислотный состав последних, из минеральных солей определяли содержание кальция, магния и железа, из витаминов содержание витаминов B_1 , B_2 и РР.

Амино-кислотный состав белков определяли на автоматическом анализаторе аминокислот "Kumazu".

Для определения кальция, магния и железа пробы хлеба озоляли прокаливанием в присутствии серной кислоты; содержание минеральных элементов определяли методом тонкослойной хроматографии [4]. Для определения витаминов B_1 , B_2 и РР пользовались колориметрическим методом [4,5].

Средняя потребность в калориях и важнейших пищевых веществах населения Эстонской ССР рассчитана на основании физиологических норм пищи [6]. На основании анализов были рассчитаны калорийности разных сортов хлеба и было найдено, какая доля от суточной потребности в пищевых веществах покрывается хлебом в количестве 1000 ккал.

В таблице 3 приведены питательные ценности основных сортов хлеба, выпекаемых в Эстонской ССР. Несмотря на то, что используемые для выпечки хлеба партии муки разные (ржаная мука содержит белков 7,3-11,0 %, пшеничная мука - 11,2-14,1%), питательная ценность хлеба оказывается тем выше, чем ниже сорт муки, чем меньше содержит рецептура маргарина и сахара, а больше молочных продуктов.

Из сортов ржаного хлеба имеет хороший вкус и высокую питательную ценность "сельский хлеб", выпекаемый из обойной муки с добавкой сыворотки. Из сортов хлеба, выпекаемых

из пшеничной муки, можно рекомендовать "Эстонский сепик", булку "Сакала" и простой батон. Питательную ценность со- лёного батона и "Таллинской булочки" снижает высокое со- держание маргарина в рецептуре.

Т а б л и ц а I

Рецептура некоторых сортов ржаного хлеба,
выпекаемого в Эстонской ССР

	Ржаной хлеб из обойной муки	Ржаной хлеб из обдир- ной муки	Сельский хлеб с творожной сыворо- ткой	Риж- ский хлеб	Хлеб "Виру"
Ржаная обойная мука	100,0	-	100,0	-	-
Ржаная обдирная мука	-	100,0	-	-	10,0
Пеклеванная мука	-	-	-	85,0	65,0
Пшеничная мука I с.	-	-	-	10,0	20,0
Солодовая мука (белая)	-	-	-	5,0	5,0
Солод красный	-	-	1,0	-	-
Поваренная соль	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Дрожжи	0,06	0,06	0,1	0,2	1,0
Сироп	-	-	-	5,0	5,0
Тмин	-	-	0,7	0,4	0,4
Сыворотка	-	-	20,0	-	20,0
Выход	64,0	146,0	150,0	133,0	134,0

Для повышения питательной ценности ржаного хлеба целе- сообразно добавлять в тесто из побочных продуктов молочной промышленности 20-30 кг сыворотки, а в тесто булок 20 - 30 кг сыворотки и 2-3 кг сухого обрата или соответствующее количество сгущенного обрата [7]. В тесто маленьких булок, выпекаемых из пшеничной муки высшего сорта, рекомендуется добавлять 20 кг сыворотки, 6 % сухого обрата или 20 кг сгу- щенного обрата и амилолитический ферментный препарат.

При добавлении молочных продуктов в хлебе повышается питательная ценность белков, так как содержание в них не- заменимых аминокислот, особенно лизина, повышается на 3 -

Т а б л и ц а 2

Рецептуры основных сортов буллок, выпекаемых в Эстонской ССР,
кг/100 кг муки

	"Эстон- ский сешик"	Простой батон	Булка "Ярве"	Подмсков- ная булка	Солёный батон	Булка "Сакала"	Таллинская булочка
Пшеничная обойная мука	70,0						
Пшеничная мука 1с.	30,0	100,0	100,0				
Пшеничная мука в.с.				100,0	100,0	100,0	100,0
Поваренная соль	2,5	1,3	1,5	1,5	1,5	2,0	1,8
Дрожжи	2,0	1,0	3,0	1,5	3,0	3,0	4,0
Маргарин	3,5		1,0	3,0	6,0		6,0
Сахар			3,0	6,0	1,0	2,5	2,0
Молоко							20,0
Сыворотка		20,0	20,0		20,0	20,0	
Порошок обрата			2,0		2,5	3,0	
В ы х о д	147,0	136,0	135,0	137,0	136,0	142	126,0

Питательная ценность основных сортов хлебо-булочных изделий,
выпекаемых в Эстонской ССР

Название хлеба	Калорий- ность ккал/100г	От калорийности, %		1000 ккал хлеба удовлетворяет (покрывает) от суточной потребности, %				
		белки	жиры	V _I	V ₂	PP	Ca	
физиологическая потреб- ность	2730	12-14	26-30	1,67 мг	2,22 мг	18,0 мг	0,40 мг	470 мг
Ржаной хлеб из обойной муки	211	8,9	4,6	36	13	16	8	42
Ржаной хлеб из обдирной муки	238	8,1	4,6	30	11	18	8	27
Сельский хлеб с творож- ной сывороткой	234	9,6	5,1	48	31	27	18	47
Рижский хлеб	278	8,0	3,1	30	10	18	8	23
Хлеб "Вигу"	249	8,1	3,3	32	14	19	12	30
Эстонский сепик	261	11,5	12,1	54	18	69	11	37
Простой багет	264	10,9	2,8	32	13	36	9	24
Соленый багет	297	10,1	13,0	12	9	30	10	14
Булка "Ярве"	287	10,0	5,8	21	20	32	15	18
Подмосковная булка	294	9,5	7,8	16	11	26	8	13
Булка "Сакала"	236	13,4	3,1	18	15	35	21	15
Таллинская булочка	287	9,6	14,1	13	13	31	10	13

8 %. Добавление молочных продуктов улучшает также сохранность хлеба, особенно при применении совместно с аминолитическим ферментным препаратом и позволяет уменьшать в рецептуре количества маргарина и сахара.

В ы в о д ы

Исследовали питательную ценность основных сортов хлеба, выпекаемых в Эстонской ССР, определяя их калорийность, содержание витаминов и минеральных солей, а также аминокислотный состав белков.

Дана методика для оценки питательной ценности хлеба по расчету на основании химического состава, какую долю от суточной физиологической потребности в пище покрывает 1000 ккал хлеба.

В Эстонской ССР, где пищевой рацион населения неуравновешен и содержит избыток калорий, рекомендуется потреблять больше хлебобулочных изделий из обойной муки и для повышения питательной ценности добавлять в ржаной хлеб 20-30 кг сыворотки, в хлеб из пшеничной муки 20-30 кг сыворотки и 2-6 кг сухого обрат или соответствующее количество ступенчатого обрат и уменьшать содержание маргарина и сахара в рецептуре.

Л и т е р а т у р а

1. Э.П. Вагане, М.Э. Саава. Материалы ХУП научной конференции Института питания АМН СССР. М., 1971, стр. 29.
2. K. Kask, A. Virkus. Nõukogude Eesti Tervishoid 1971, nr. 4, 259-263.
3. H. A. Schroeder. Amer. J. Clin. Nutr. 1971, nr. 5, 24, 262-273.
4. Х.О. Вильбокс, П.Ф. Раудсепп. Применение денситометрического определения железа, кальция и магния в анализе хлебобулочных изделий. Труды Таллинского политехнического института, серия А, № 319, 1972, стр. 121-125.

5. F. G s t i r n e r. Chemisch-physikalische Vitaminbestimmungsmethoden. F.Enke Verlag, Stuttgart, 1965, S. 77-85.

6. Рекомендуемые величины физиологических потребностей в пищевых веществах и энергии. № 755-68, 16.04.1968.

7. М.И. К р е е н, Т.Л. Л и е б е р т, К.А. К а с к. Применение побочных продуктов молочной промышленности в хлебопечении. Труды Таллинского политехнического института, серия А, № 273, 1969, стр. 49-57.

K.A.Kask, R.E.Treimann, T.L.Liebert

Über die Nährwerte der Backwaren

Zusammenfassung

Es wurde der Nährwert der wichtigsten in der Estnischen SSR gebackenen Brotsorten untersucht. Als analytische Kennzeichen wurden der Kaloriengehalt, der Gehalt an Vitaminen und Mineralsalzen und gleichfalls die Zusammensetzung der Aminosäuren im Eiweiß bestimmt. Von den Autoren wurde eine Methodik ausgearbeitet, um den Nährwert des Brotes zu schätzen. Ausgehend von der chemischen Zusammensetzung des Brotes ist ausgerechnet worden, ein wie großer Teil der täglich physiologisch lebensnotwendigen Nährstoffe durch eine 1000 kcal entsprechende Brotmenge befriedigt werden kann. Empfehlungen zur Bereicherung der Brotsorten mit Nebenprodukten der Molkereindustrie werden gegeben.

УДК 664.654.3:637.344

Т.Л. Лиеберт

ВЛИЯНИЕ ДОБАВКИ СЫВОРОТКИ И БИОПРЕПАРАТА НА СВОЙСТВА ТЕСТА И ХЛЕБА

В связи с первостепенной ролью ферментов в процессе тестоведения большое значение приобретает направленное регулирование ферментативных процессов, протекающих при выпечке хлеба. Для эффективного использования каждого нового ферментного препарата в хлебопечении необходимо проследить накопление редуцирующих сахаров при тестоведении, определить влияние препарата на физические свойства теста и провести пробные лабораторные выпечки.

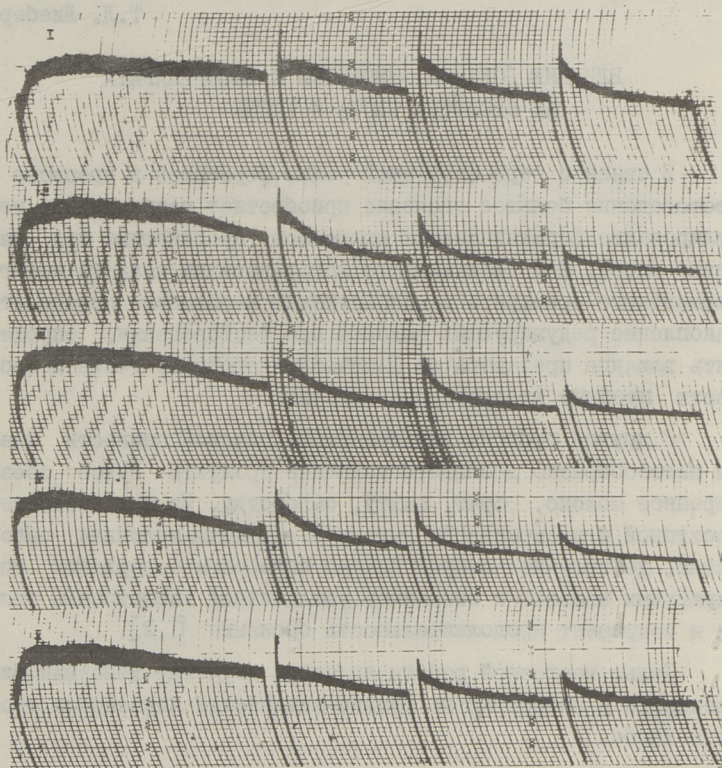
С другой стороны для повышения пищевой ценности хлеба целесообразно добавлять молочные продукты: сухое обезжиренное молоко, обрат, пахту, сыворотку. Из них наиболее доступной и экономически выгодной является молочная сыворотка, добавление которой помимо повышения содержания минеральных веществ и витаминов увеличивает кислотность теста и сокращает продолжительность брожения [1,2].

Целью настоящей работы являлось изучение действия биопрепарата и сыворотки на физико-химические показатели теста и хлеба.

Биопрепарат получен при глубинном выращивании *Aspergillus oryzae* 3-9-15 на сыворотке и имел амилолитическую активность - 4500 АЕ/100 г и протеолитическую активность - 10 ПЕ/100 г [3].

Экспериментальная часть

При исследовании применяли пшеничную муку I-го сорта со следующими показателями: влажность - 13,5 %, зольность - 0,72 %, газообразующая способность - 1380 мл CO_2 , сахарообразующая способность - 201 мг мальтозы на 10 г, сырая клейковина - 39 %, водопоглотительная способность - 68 %.



Фиг. 1. Влияние добавки сыворотки и биопрепарата на физические свойства теста.

1 - контроль, II - добавлено 20 % сыворотки, III - добавлено 25 % сыворотки, IV - добавлено 30 % сыворотки, V - добавлен биопрепарат.

Изменения физических свойств теста под действием биопрепарата и сыворотки определяли на валориграфе, причем длительность первого замеса составляла 20 мин., после чего тесто оставили стоять 40 мин. Второй замес длился 10 мин., стоянка 50 мин. Последнюю операцию повторяли 3 раза.

Сыворотку добавляли в тесто 20, 25, 30 % от веса муки, биопрепарат — 100 амилोलитических единиц (АЕ) и 0,20 протеолитических единиц (ПЕ) на 100 г муки.

Из фиг. I явствует, что добавка сыворотки заметно ухудшает физические свойства теста. Так в конце I-го замеса разжижение теста при контроле составляло 55 валориметрических единиц (ВЕ), а при добавлении 20–30 % сыворотки соответственно 130–145 ВЕ. В конце 4-го замеса консистенция контрольного теста составляла 330 ВЕ, а при добавке сыворотки соответственно 235–240 ВЕ. Упругость контрольного теста в том же моменте была 20 ВЕ, а при добавке сыворотки — 10–15 ВЕ.

При оценке теста по валориметрическому числу видно, что контрольное тесто имело валориметрическое число через 12 минут после начала разжижения теста — 68, тесто с 20 % сыворотки — 61, тесто 25 % сыворотки 59 и тесто с 30 % сыворотки — 53.

Действие биопрепарата на физические свойства теста (фиг. I) слабее выражено, чем действие сыворотки. Так валориметрическое число снизилось при добавке биопрепарата по сравнению с контролем на 3 единицы. Несколько сильнее выражено действие биопрепарата на разжижение теста. Так в конце 4-го замеса консистенция теста с биопрепаратом составляла 265 ВЕ.

Из приведенных данных видно, что добавление биопрепарата и сыворотки заметно ухудшает физические свойства теста. Однако общеизвестен факт, что добавление в тесто амилолитических ферментных препаратов повышает интенсивность газообразования, а добавление сыворотки повышает кислотность теста. Поэтому целесообразно провести пробные лабораторные выпечки для выяснения влияния сыворотки и биопрепарата на качество хлеба. Выпечку хлеба производили ускоренным методом.

Из приведенных в таблице I данных явствует, что добавление сыворотки и биопрепарата влияет положительно на качество хлеба. Особенно ярко это выражено при совместном добав-

лении сыворотки, в случае чего пористость хлеба повышается от 6,4 до 8,5 % по сравнению с контролем (опыт I).

На основе вышеприведенного для повышения качественных показателей хлеба можно посоветовать добавить в тесто 20 – 30 % сыворотки и биопрепарат (100 АЕ и 0,20 ПЕ на 100 г муки).

Т а б л и ц а I

Влияние добавки сыворотки и биопрепарата
на качество хлеба

Исходные вещества и показатели	О п ы т ы							
	I	2	3	4	5	6	7	8
Мука, %	100	100	100	100	100	100	100	100
Дрожжи, %	5	5	5	5	5	5	5	5
Сыворотка, %	–	–	20	20	25	25	30	30
Соль, %	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Биопрепарат, 100 АЕ и 0,2 ПЕ на 100 г муки	–	+	–	+	–	+	–	+
Пористость, %	74,9	78,2	75,2	81,3	76,4	82,4	77,9	83,4
Объем, мл/100 г	258	302	260	314	267	320	270	332

В ы в о д ы

1. Исследовалось влияние добавки сыворотки и биопрепарата на физико-химические показатели теста и хлеба.

2. Показано, что добавление сыворотки и биопрепарата заметно ухудшает физические свойства теста – тесто сильно разжижается и упругость теста падает. Несмотря на последнее при добавке биопрепарата и сыворотки качественные показатели хлеба – объем и пористость – улучшаются.

Л и т е р а т у р а

И. И. М. Р о й т е р, В. И. Д р о б о т, Н. А. Ч у м а – ч е н к о. Исследование технологии переработки молочной сыворотки в хлебопечении, ЦНИИТЭИпищепром, М., 1970.

2. Р.В. Кузьминский, В.А. Патт, В.В. Щербатенко, Л.Ф. Столярова. Пути повышения биологической ценности хлебобулочных изделий ЦНИИТЭИпищепром, М., 1970.

3. Т.Л. Лиеберт, К.А. Каск. Получение биопрепарата выращиванием плесневых грибов рода *Aspergillus* на обезжиренном молоке и сыворотке. Труды Таллинского политехнического института, серия А, № 273, 1969, стр. 3-25.

T. Liebert

The Effect of Addition of Whey und Biopreparation
to the Dough and Bread Quality

Summary

The effect of addition of whey and biopreparation to the wheat dough and bread has been studied.

The addition of whey and biopreparation impair the physical properties of dough, but in spite of that the qualitative indices of bread improve.

УДК 577.152:637.344

А.Г. Канн, Т.Л. Лиеберт, К.К. Рая

ПОЛУЧЕНИЕ БИОПРЕПАРАТА КУЛЬТИВИРОВАНИЕМ
ГРИБА *Aspergillus oryzae* НА МОЛОЧНОЙ
СЫВОРОТКЕ

Различные ферментные препараты все шире применяются в народном хозяйстве. При производстве ферментных препаратов трудной задачей является выделение ферментов из культуральной жидкости. Поэтому является целесообразным применение в качестве ферментного препарата непосредственно культуральной жидкости.

С другой стороны в Эстонской ССР имеется хорошо развитая молочная промышленность, отходом которой являются молочная сыворотка, обезжиренное молоко, пахта и др., которые могут быть успешно применены в качестве питательной среды при культивировании микроорганизмов.

Исходя из вышеизложенного, в нашей лаборатории была исследована возможность применения обезжиренного молока [1, 2] и в настоящей работе применение молочной сыворотки при культивировании *Aspergillus oryzae* 3-9-15 глубинным способом с целью получения культуральной жидкости с амилалитической или протеолитической активностью. Фильтрат культуральной жидкости был нами условно назван биопрепаратом.

Экспериментальная часть

Чистые культуры микроорганизмов выращивались на агаре. Посевным материалом служила суспензия конидий в количестве 3 мл на 100 мл среды (содержащая около $22 \cdot 10^6$ конидий).

Среда разливалась по 100 мл в колбы Эрленмейера емкостью 750 мл и стерилизовалась в автоклаве под давлением 0,6 ати в течение 30 минут.

Выращивание гриба проводилось на качалке при 280 $\frac{об}{мин}$ и при температуре 28–30 °С. Культивирование проводилось двумя ступенями. Мицелий, полученный в первой ступени, применяли в качестве посевного материала во второй ступени.

По окончании выращивания определяли вес мицелия, активность амилолитических и протеолитических ферментов [I] и α -амилазы [3], pH среды.

Исходя из результатов ранее проведенной работы [I] применяли гриб *Asp. oryzae* 3-9-I5. В первой ступени в качестве питательной среды служило пивное сусло ($\alpha = 1,03$) с добавлением 10 % вытяжки из солодовых ростков. Во второй ступени применяли молочную сыворотку.

При культивировании *Asp. oryzae* 3-9-I5 на молочной сыворотке при естественной кислотности (pH = 4,65) синтез ферментов был низкий. При нейтрализации молочной сыворотки насыщенным раствором бикарбоната натрия активность ферментов возросла (таблица I)

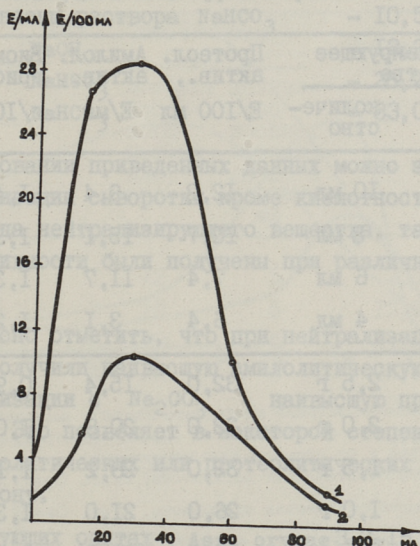
Т а б л и ц а I

Культивирование *Asp. oryzae* 3-9-I5 на
молочной сыворотке I

Количество насыщенного раствора $NaHCO_3$ добавленного к 100 мл молочной сыворотки	Протеолитическая активность, Е/100 мл	Амилолитическая активность, Е/мл	Биомасса гриба, г/100 мл
90	1,2	2,1	0,23
60	6,1	10,2	0,27
30	10,3	28,6	0,52
15	5,5	26,8	0,92
0	1,5	4,0	1,27

I Количество посевного материала из I ступени во вторую – 5 мл. Время культивирования во второй ступени 72 часа.

Наивысшая протеолитическая активность была получена в среде из 100 мл сыворотки с добавкой 30 мл насыщенного раствора бикарбоната натрия. При увеличении или уменьшении количества насыщенного раствора активности уменьшились (фиг.1).



Фиг. 1. Динамика изменения протеолитической и амилолитической активности в зависимости от количества добавленной NaHCO_3

- 1 — амилолитическая активность, Е/мл
2 — протеолитическая активность, Е/100 мл

Далее было исследовано влияние ряда других нейтрализующих веществ на активность ферментов. Полученные результаты приведены в таблице 2. При сравнении амилолитических активностей при применении разных количеств различных нейтрализующих веществ они могут быть поставлены в следующий ряд по повышению амилолитической активности:

1,0 г CaCO_3	— 10,0 Е/мл
8,0 мл NaOH	— 15,1 Е/мл
1,5 г Na_2CO_3	— 28,2 Е/мл
30 мл насыщ. раствора NaHCO_3	— 28,6 Е/мл
2,0 г NaHCO_3	— 36,0 Е/мл

Таблица 2

Культивирование *Asp. oryzae* 3-9-15 на сыворотке
с различными нейтрализующими веществами

№ опыта	Нейтрализующее вещество		Протеол. актив., Е/100 мл	Амилол. актив., Е/мл	Биомасса гриба, г/100 мл	рН
	название	количе- ство				
I	NaOH	10 мл	12,2	9,4	1,48	8,6
2		8 мл	10,7	15,1	1,34	8,9 ²
3		6 мл	7,4	11,7	1,33	8,8
4		4 мл	6,4	3,1	1,28	8,7
5	Na ₂ CO ₃	2,5 г	32,0	15,4	0,94	8,6
6		2,0 г	33,0	20,8	1,00	8,7
7		1,5 г	32,0	28,2	1,10	8,8
8		1,0 г	26,0	21,0	1,37	8,8
9		0,5 г	12,5	20,0	1,24	8,9
10	CaCO ₃	3,0 г	4,8	7,6	4,34	8,3
11		2,0 г	4,3	7,9	3,48	8,3
12		1,0 г	4,9	10,0	3,43	8,3
13		0,5 г	1,6	6,0	2,02	8,3
14	NaHCO ₃	4,0 г	8,5	4,2	0,26	9,4
15		3,0 г	28,0	24,5	0,75	8,9
16		2,0 г	25,0	36,0	0,91	9,0
17		1,0 г	20,0	28,4	1,21	8,9
18		0,3 г	7,0	9,7	1,33	8,8
19	насыщ.раств. NaHCO ₃	90 мл	1,9	2,1	0,18	9,7
20		60 мл	7,0	10,2	0,30	9,2
21		30 мл	10,5	28,6	0,74	8,9
22		15 мл	7,6	26,8	0,97	8,9
23		10 мл	7,0	24,5	1,23	8,9

По повышении протеолитической активности исследование вещества имеют следующую последовательность:

2,0 г CaCO_3	- 5,3 Е/мл
30 мл насыщ.раствора NaHCO_3	- 10,5 Е/мл
10 мл NaOH	- 12,2 Е/100 мл
3,0 г NaHCO_3	- 28,2 Е/100 мл
2,0 г NaHCO_3	- 33,0 Е/100 мл

На основании приведенных данных можно заключить, что при нейтрализации сыворотки кроме кислотности имеет значение и природа нейтрализующего вещества, так как максимальные активности были получены при различных величинах рН.

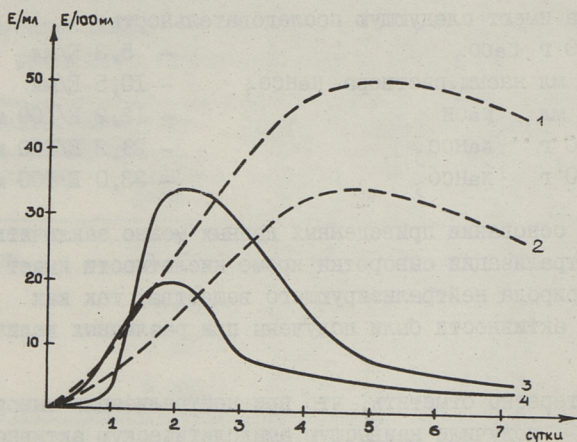
Интересно отметить, что при нейтрализации сыворотки с NaHCO_3 получили наивысшую амилолитическую активность и при нейтрализации с Na_2CO_3 наивысшую протеолитическую активность. Это позволяет в некоторой степени регулировать синтез амилолитических или протеолитических ферментов в нужную сторону.

В следующих опытах *Asp. oryzae* 3-9-15 культивировали на сыворотке с 2 % Na_2CO_3 или с 2 % NaHCO_3 в течение 168 часов (фиг. 2).

Из приведенных данных явствует, что амилолитическая активность имеет максимальную величину после 5-дневного выращивания, при этом максимальная активность с Na_2CO_3 - 33,6 Е/мл и с NaHCO_3 - 50,5 Е/мл. Активности α -амилазы соответственно 11,5 Е/мл и 18,4 Е/мл. В момент максимальной амилолитической активности протеолитическая активность уже сравнительно низкая. Протеолитическая активность достигает максимума после 2-суточного культивирования как с Na_2CO_3 так и с NaHCO_3 . При этом с Na_2CO_3 протеолитическая активность - 33,8 Е/100 мл, с NaHCO_3 - 19,5 Е/100 мл.

При двухступенчатом культивировании ферментативная активность культуральной жидкости зависит от количества и возраста посевного материала [4,5]. Засев необходимо провести в конце конструктивной фазы развития гриба, что может быть определено опытным путем. Для выяснения этих факторов гриб выращивался в первой ступени различное время (от 12 до 96 часов). Время культивирования во второй ступени для получения

протеолитической активности 48 часов и для амилалитической активности - 120 часов.



Фиг. 2. Динамика изменения протеолитической и амилалитической активности в зависимости от природы нейтрализующего вещества и от времени культивирования

- 1 — амилалитическая активность, Е/мл. Среда с NaHCO_3
- 2 — амилалитическая активность, Е/мл. Среда с Na_2CO_3
- 3 — протеолитическая активность, Е/100 мл. Среда с Na_2CO_3
- 4 — протеолитическая активность, Е/100 мл. Среда с NaHCO_3 .

Полученные данные приведены в таблицах 3 и 4.

Оптимальным возрастом посевного мицелия при синтезе амилалитических и протеолитических ферментов является 20–24 часа.

Данные о влиянии количества посевного материала на синтез протеолитических ферментов приведены в таблице 5.

Из приведенных данных видно, что оптимальным количеством посевного материала при синтезе ферментов было 5 мл.

На рост микроорганизмов и на синтез ими ферментов влияет аэрация питательной среды. При выращивании микроорганизмов на качалке кроме аэрации достигается также равномерное распределение питательных веществ в среде и быстрое отделение продуктов метаболизма с оболочки клетки. При культивировании микроорганизмов в колбах на качалке интенсивность аэра-

Т а б л и ц а 3

Влияние различного возраста посевного материала
на биосинтез протеолитических ферментов

Питательная среда		№ опы-та	Питательная среда		Протеол. акт., Е/100 мл	рН	Био-масса гриба, г/100мл
I ступень	II ступень		возраст посе-вого матери-ала, час.	количе-ство посе-ва во II ступени, мл			
12,5 % пив.сусло и 10 % вытяжка из солод. ростк. в соотношении 9:1	Молочная сыворотка (на 100 мл сыворотки добавлено 2 г Na_2CO_3)	1	12	5	2,5	9,4	0,06
		2	16	5	17,2	8,6	0,47
		3	20	5	21,0	8,4	0,76
		4	24	5	16,9	8,5	0,55
		5	48	5	12,0	8,6	0,50
		6	72	5	5,6	8,7	0,45
		7	96	5	5,9	8,9	0,54

Т а б л и ц а 4

Влияние различного возраста посевного материала
на биосинтез амилалитических ферментов

Питательная среда		№ опы-та	Питательная среда		Амил. акт., Е/мл	Акт. α -ам., Е/мл	рН	Био-масса гриба г 100мл
I ступень	II ступень		возраст посе-вого матери-ала, час.	количе-ство посе-ва во II ступени, мл				
12,5 % пив.сусло и 10 % вытяжка из солод. ростк. в соотношении 9:1	Молочная сыворотка (на 100 мл сыворотки добавлено 2 г NaHCO_3)	1	12	5	35,7	14,7	9,2	0,72
		2	16	5	37,5	15,4	9,2	0,61
		3	20	5	39,7	15,8	8,8	1,20
		4	24	5	40,4	16,5	8,7	1,03
		5	48	5	29,0	9,7	8,6	1,08
		6	72	5	25,0	7,8	9,0	0,95
		7	96	5	24,2	7,1	9,0	0,57

Зависимость протеолитической активности от
количества посевного материала

Питательная среда		Питательная среда I ступени		Протеол. актив-ность, Е/100 мл	pH	Биомасса гриба, г/100 мл
I ступень	II ступень	возраст посев-ного ма-териала, час.	количест-во посевн. материала во II ступ., мл			
12,5 % сусло и 10 % вытяжка из солодовых ростков в соотношении 9:1	Молочная сыворотка (на 100 мл сыворотки добавлено 2 г Na_2CO_3)	20	I	18,0	8,7	0,33
		20	2	30,2	8,8	0,41
		20	5	35,2	8,8	0,64
		20	10	32,2	8,9	0,75
		20	15	31,3	8,8	0,88
		20	20	31,0	8,3	0,98

ции зависит от числа оборотов качалки в минуту, от конструктивных особенностей качалки и от количества культуральной жидкости в колбах.

Выращивание проводилось в колбах емкостью 750 мл, причем количество культуральной жидкости варьировалось от 100 до 400 мл.

Из приведенных данных в таблице 6 явствует, что максимальная ферментативная активность достигается при применении 100 мл питательной среды.

В ы в о д ы

1. Показано, что при выращивании *Aspergillus oryzae* 3-9-15 на нейтрализированной сыворотке можно получить препарат с амилолитической и протеолитической активностями.

2. Максимальная амилолитическая активность достигается при нейтрализации сыворотки с NaHCO_3 в количестве 2 г/100 мл.

Т а б л и ц а 6

Влияние азотации на биосинтез ферментов

Питательная среда А		Питательная среда Б		Количество посевного материала, мл	Питательная среда А		Питательная среда Б	
Количе- ство, мл	Na ₂ CO ₃ г	Количе- ство, мл	NaHCO ₃ г		Протеол. акт., Е/100 мл	Амилол. акт., Е/мл	Амилол. актив., Е/мл	Протеол. актив., Е/100 мл

100	2	100	2	5	28,1	14,4	29,2	0,0
200	4	200	4	10	20,7	12,2	24,5	4,8
300	6	300	6	15	6,5	5,4	17,3	5,2
400	8	400	8	20	1,6	3,0	8,7	6,3

3. Максимальная протеолитическая активность достигается при нейтрализации сыворотки с Na_2CO_3 в количестве 2 г/100 мл.

4. Оптимальным количеством посевного материала является 5 % от объема питательной среды, оптимальным возрастом посевного материала 20-24 часа, оптимальным объемом питательной среды в 750 мл колбах - 100 мл.

5. Максимальная протеолитическая активность достигается после 2-суточного культивирования, а максимальная амилалитическая активность после 5-суточного культивирования, что позволяет производить биопрепарат преимущественно с желаемой активностью.

Л и т е р а т у р а

1. Т.Л. Л и е б е р т, К.А. К а с к, А.И. К ё с т - н е р. Труды ТПИ, серия А, № 273, 1969, стр. 3.

2. Т.Л. Л и е б е р т, К.А. К а с к. Труды ТПИ, серия А, № 273, 1969, стр. 13.

3. Временная инструкция по определению амилалитической активности ферментных материалов. ВНИИФС, М., 1965.

4. Л.А. Х е р с о н о в а, А.Л. М а л ь ч е н к о. Ферментная и спиртовая промышленность, №1, 1967, стр. 10.

5. А.П. С м и р н о в а, З.Э. Б е к к е р, Труды ВНИИСЛП, № 3, 1954, стр. 82.

A. Kann, T. Liebert, K. Raja

Getting of Biopreparation by Cultivating
Mould Fungs - Asp. oryzae - in Milk Whey

Summary

Utilization of whey for submerged cultivation of *Aspergillus oryzae* 3-9-15 in purpose of getting the solution with proteolytic and amylolytic activity is investigated. Maximum of amylolytic activity was obtained when milk whey was neutralized with NaHCO_3 and cultivating lasted 5 days. Proteolytic activity was the highest when Na_2CO_3 was used for milk whey neutralization and cultivation time was 2 days.

УДК 577.152:637.344

А.Г. Канн, К.К. Рая

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ДОБАВОК НА СИНТЕЗ
АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ *Asp. oryzae*
3-9-15 НА МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

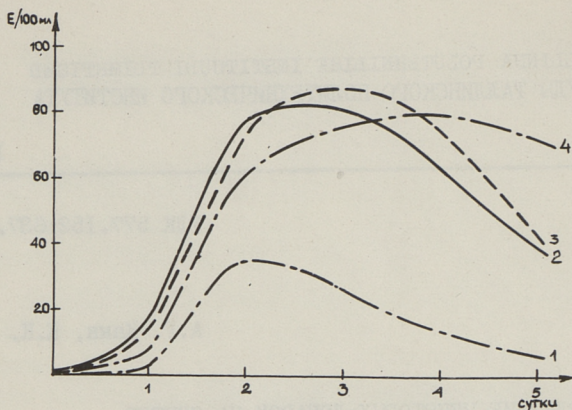
Синтез различных ферментов микроорганизмами зависит от состава питательной среды и от условий культивирования.

Обильная аэрация и перемешивание культуральной среды служат условиями интенсивного обмена веществ при культивировании аэробных микроорганизмов. Клетки микроорганизмов потребляют только растворенный в воде кислород. Растворимость кислорода в воде невелика, но ее можно увеличить добавлением в питательную среду поверхностно-активных веществ или пеногасителей, например олеиновую кислоту. Олеиновая кислота является для микроорганизмов также источником углерода.

В наших нижеописанных опытах изучалось влияние олеиновой кислоты на синтез ферментов при глубинном выращивании гриба *Asp. oryzae* 3-9-15 на молочной сыворотке. Питательной средой на первой ступени служило пивное сусло с прибавлением 10 % вытяжки из солодовых ростков. При засеве в 100 мл питательной среды вносилось 3 мл суспензии конидий (содержащих около $22 \cdot 10^6$ конидий).

Методики выращивания и определение исследуемых показателей описаны в предыдущей статье [1].

Олеиновую кислоту добавляли к питательным средам до стерилизации в количестве от 0,7 до 1,2 % от объема сыворотки. Культивирование проводилось в течение 120 часов



Фиг. 1. Зависимость протеолитической активности от концентрации олеиновой кислоты в среде и от времени культивирования
 1 — протеолитическая активность, E/100 мл. Среда без олеиновой кислоты.
 2 — протеолитическая активность, E/100 мл в среде 0,7 % олеиновой кислоты.
 3 — протеолитическая активность, E/100 мл в среде 1,0 % олеиновой кислоты.
 4 — протеолитическая активность, E/100 мл в среде 1,2 % олеиновой кислоты.

(фиг. 1). Протеолитическая активность достигала максимума в среде с 1 % олеиновой кислоты после 72 часового культивирования, т.е. максимальная активность достигается медленнее, чем в среднем без олеиновой кислоты. Амилолитическая активность в среде с олеиновой кислотой оказалась ниже, чем в контрольной среде без олеиновой кислоты (табл. 1).

Различные источники углерода имеют разное влияние на синтез амилолитических ферментов грибом *Aspergillus oryzae* 3-9-15 [2]. Большое значение имеют и источники азота в питательной среде, а также концентрация источников углерода и азота. Введение в питательную среду веществ, являющихся субстратами для действия ферментов или продуктами гидролиза субстрата, приводят к резкому усилению синтеза ферментов. Индукторами для образования амилазы являются мальтоза, декстрины и крахмал.

Т а б л и ц а I

Влияние олеиновой кислоты на биосинтез
амилолитических ферментов

№ опы- та	Состав среды II ступени			Результаты анализа			
	молоч- ная сыво- ротка мл	NaHCO_3 г	олеино- вая кислота, %	амилол. актив., Е/мл	α -амил., Е/мл	pH	биомас- са гри- ба, Е/100мл
1	100	2	-	45,7	16,2	9,1	0,95
2	100	2	0,1	40,0	17,9	9,1	1,21
3	100	2	0,5	37,6	12,4	9,1	1,48
4	100	2	1,0	35,6	9,2	9,1	1,65

В наших опытах (табл. 2) для изменения соотношения источников углерода и азота в питательную среду, состоящую из сыворотки, добавляли разные количества воды, а в качестве индукторов — растворимый крахмал и пшеничную муку.

Из опытов I-4 (табл. 2) видно, что добавление в среду растворимого крахмала стимулирует синтез амилолитических ферментов, который достигает максимума при добавлении 2 г крахмала на 100 мл молочной сыворотки.

Разбавление сыворотки с водой влияет на синтез амилолитических ферментов. Наивысшая активность амилолитических ферментов наблюдается при культивировании *Aspergillus oryzae*

3-9-15 на среде, состоящей из 80 мл сыворотки и 20 мл воды с добавлением 1 г растворимого крахмала и 2 г NaHCO_3

Результаты опытов с добавлением пшеничной муки II сорта приведены в таблице 3.

Максимальная амилолитическая активность — 55,8 Е/мл и активность α -амилазы — 21,5 Е/мл достигается в среде со следующим составом: 80 мл молочной сыворотки, 20 мл воды, 1 г пшеничной муки, 2 г NaHCO_3 .

Из экономических расчетов себестоимости биопрепарата выяснилось, что пивное сусло, которое являлось основным компонентом среды I ступени, составляет 52 % из расходов на сырье. Кроме того, для транспорта и хранения пивного сусла

Влияние растворимого крахмала на амилалитическую активность

№ опыта	Состав среды II ступени					Результаты анализов			
	крахмал, г	молочная сы-воротка, мл	вода, мл	NaHCO ₃ г	амилол. актив., Е/мл	актив. α-ам., Е/мл	pH	биомасса гриба, г/100 мл	
I	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	-	100	-	2	42,4	14,4	9,1	1,10	
2	1,0	100	-	2	49,2	18,7	9,2	1,00	
3	2,0	100	-	2	51,8	19,0	9,1	1,55	
4	5,0	100	-	2	40,9	13,5	9,0	2,09	
5	-	80	20	2	44,6	16,5	9,3	0,72	
6	1,0	80	20	2	60,2	22,0	9,4	0,92	
7	2,0	80	20	2	55,7	19,4	9,3	1,11	
8	5,0	80	20	2	42,0	13,4	8,9	2,04	

Продолжение таблицы 2

I	2	3	4	5	6	7	8	9
9	-	70	30	2	35,4	12,9	9,2	0,71
10	1,0	70	30	2	57,0	17,8	9,2	0,82
11	2,0	70	30	2	44,2	14,1	9,1	1,00
12	5,0	70	30	2	31,9	9,8	8,9	1,72
13	-	50	50	2	31,0	17,5	9,2	0,52
14	1,0	50	50	2	32,5	20,1	9,2	0,68
15	2,0	50	50	2	31,0	18,3	8,9	0,95
16	5,0	50	50	2	25,6	15,6	8,8	1,36

Влияние пшеничной муки II сорта на амилитическую
активность

№ опыта	Состав среды II ступени				Результаты анализов				
	пшенич. мука г	молочная сыворог- ка, мл	вода мл	NaHCO ₃ г	амил. актив., Е/мл	актив. α -ам., Е/мл	pH	биомасса гриба, г/100 мл	
I	2	3	4	5	6	7	8	9	
I	-	100	-	2	42,4	14,4	9,1	1,10	
2	1,0	100	-	2	48,4	15,6	9,1	1,30	
3	2,0	100	-	2	48,8	15,7	9,2	1,50	
4	5,0	100	-	2	38,0	12,3	9,2	3,01	
5	-	80	20	2	35,4	13,7	9,2	0,74	
6	1,0	80	20	2	55,8	21,5	9,2	1,34	
7	2,0	80	20	2	47,0	19,5	9,2	1,35	
8	5,0	80	20	2	43,6	16,8	9,3	2,64	

Продолжение таблицы 3

I	2	3	4	5	6	7	8	9
9	-	70	30	2	37,8	13,1	9,2	0,62
10	1,0	70	30	2	51,4	20,5	9,2	1,08
11	2,0	70	30	2	46,2	16,4	9,1	1,52
12	5,0	70	30	2	30,2	11,5	9,0	2,56
13	-	50	50	2	24,6	10,6	9,2	0,39
14	1,0	50	50	2	45,2	17,8	9,2	0,79
15	2,0	50	50	2	48,8	19,3	9,2	1,08
16	5,0	50	50	2	31,8	12,6	9,1	2,35

необходимо специальное оборудование. Целесообразно применять и в первой ступени культивирования молочную сыворотку, которая является основным компонентом среды II ступени. Так как молочная сыворотка не содержит всех питательных веществ, необходимых для быстрого развития микроорганизмов — что особенно важно при накоплении посевного материала — сыворотку целесообразно обогащать разными добавками.

Результаты влияния добавок муки и вытяжки из солодовых ростков в молочную сыворотку приведены в таблице 4.

Т а б л и ц а 4

Влияние пшеничной муки и вытяжки из солодовых
ростков на амилолитическую активность

№ опыта	Добавки к 100 мл молочной сыворотки		Амилолитическая активность, Е/мл
	мука, г	вытяжка из со- лодовых ростков, мл	
I		2,0	9,0
2	0,5		17,6
3	1,0		21,0
4	2,0		38,0
5	3,0		36,2
6	0,5	2,0	26,6
7	1,0	2,0	35,6
8	2,0	2,0	39,8
9	3,0	2,0	37,2

В среде, которая состоит лишь из молочной сыворотки и NaHCO_3 , амилолитическая активность остается низкой — 9 Е/мл. При добавлении в среду муки амилолитическая активность возрастает ~ в 4 раза. Максимальная амилолитическая активность достигается при добавлении в среду 2 % пшеничной муки и 2 % вытяжки из солодовых ростков.

Динамика биосинтеза ферментов

Исследуемая величина	Время культивирования, в часах											
	48				72				96			
	Питательные среды											
	П	И	П	И	П	И	П	И	П	И	П	И
№	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Амилон. актив. Е/мл	1,9	10,7	1,8	2,2	21,9	36,0	12,7	23,4	40,0	55,6	25,2	52,4
									35,6	59,2	16,8	51,7
									25,6	51,2	15,2	50,8
									24,4	50,4	14,8	46,8
Актив. -ам. Е/мл	1,2	4,7	0,4	1,9	8,3	11,4	4,0	7,4	11,3	17,3	6,1	12,7
									12,4	17,3	6,2	16,9
									10,3	17,3	5,6	16,3
									5,9	15,4	1,7	15,1
Протеол. актив., Е/100 мл	5,5	13,8	5,5	2,8	47,7	42,5	41,4	27,2	35,9	77,3	26,2	55,7
									30,4	66,2	16,6	28,5
									27,6	33,1	11,0	18,6
									15,9	21,2	9,2	13,3
Непосред. реакц. сахара. %	3,4	3,6	3,4	3,2	2,5	2,7	2,9	2,3	2,2	2,5	2,5	2,0
									1,9	2,4	2,2	1,9
									1,8	2,1	1,8	1,7
									1,9	1,7	1,9	1,7
pH	9,0	8,6	8,8	8,6	8,8	8,9	9,0	8,9	8,8	9,3	8,9	9,1
									9,1	9,3	8,6	9,1
									9,2	9,0	9,0	9,1
									9,4	9,3		

Названную среду применяли при выяснении динамики биосинтеза амилаз в зависимости от времени выращивания.

Полученные данные приведены в таблице 5. В таблице применены следующие обозначения:

- I-1 Одноступенчатое культивирование, среда: молочная сыворотка и NaHCO_3 ,
- I-2 одноступенчатое культивирование, среда: молочная сыворотка, NaHCO_3 , 2 % пшеничной муки, 2 % вытяжки из солодовых ростков,
- II-1 двухступенчатое культивирование, среда: молочная сыворотка и NaHCO_3 ,
- II-2 двухступенчатое культивирование, среда: молочная сыворотка, NaHCO_3 , 2 % пшеничной муки, 2 % вытяжки из солодовых ростков.

Из приведенных данных явствует, что амилалитическая активность значительно выше в среде с добавками (пшеничной муки и вытяжки из солодовых ростков). Амилалитическая активность достигает максимума на четвертый день культивирования. Определяли также активность α -амилазы биопрепарата, которая оказалась наивысшей на четвертый день культивирования в средах с добавками. В средах без добавок (муки и вытяжки из солодовых ростков) активности были низкими.

В ы в о д ы

1. Добавление в среду олеиновой кислоты способствует синтезу протеолитических ферментов в культуральной жидкости. Оптимальное количество олеиновой кислоты в среде — 1,0 мл на 100 мл среды.

2. Добавление в среду растворимого крахмала способствует синтезу амилалитических ферментов. Оптимальное количество крахмала — 2 %.

3. Пивное сусло в I ступени культивирования может быть заменено более дешевой средой следующего состава: молочная сыворотка, 2 % NaHCO_3 , 2 % пшеничной муки, 2 % 10 %-ной вытяжки из солодовых ростков.

Л и т е р а т у р а

1. К.А. К а с к, А.Г. К а н н, Т.Л. Л и е б е р т, К.К. Р а я. Получение биопрепарата культивированием гриба *Aspergillus oryzae* на молочной сыворотке. См. наст. сб. стр. 65-75.

2. Е.А. Д в а ц а т о в а, Г.И. К о м а р о в а, П.А. С о б о л е в а, Труды ВНИИФСП, № 17, 1967, стр. 3.

A. Kann, K. Raja

Effect of Some Additions on the Synthesis of
Amylolytic and Proteolytic Enzymes by Culti-
vating Aspergillus oryzae 3-9-15 in Milk Whey

Summary

The addition of 1 p.c. oleic acid into the nutrient medium prepared on the base of milk whey is favourable to synthesis of proteolytic enzymes. The addition of 2 p.c. soluble starch into the nutrient medium is favourable to synthesis of amylolytic enzymes. The optimum nutrient medium consists of milk whey, 2 p.c. NaHCO_3 , 2 p.c. wheat-flour and 2 p.c. extract of malt shoot.

УДК 577.15.152

К.Э.Паппель, А.И.Кёстнер, К.А.Каск

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТАТИВНОГО КОМПЛЕКСА БИОПРЕПАРАТА

Глубинная культура плесневого гриба *Asp.oryzae* на молочной сыворотке дает биопрепарат, который может быть применен в пищевой промышленности как ферментный препарат [1]. В зависимости от условий выращивания можно получить протеолитический или амилалитический препарат.

При внедрении названного препарата было бы целесообразно знать его основные кинетические характеристики. В данной работе исследована зависимость активности биопрепарата от концентрации субстрата и от условий проведения реакции.

Методы и материалы

Биопрепараты были приготовлены согласно ранее описанной методике [1] и представлены нам К.К. Рая. Препараты очищались от балластной взвеси центрифугированием. Протеолитический препарат упаривали в вакууме 5 раз. Отделение ферментов от низкомолекулярных веществ проводили хроматографией на колонке с размерами 30 x 870 мм, наполненной сефадексом Г-25. Гельфльтрация прошла без заметных потерь активности и позволила уменьшить концентрацию балластных веществ в 17 раз в случае протеолитического и в 5 раз в случае амилалитического препарата. Очищенные растворы хранились в замороженном виде при -15°C . Общую амилалитическую активность определяли при 30°C на 1 % растворе растворимого крахмала в ацетатном буфере с $\text{pH} = 4,7$ по приросту редуцирующих веществ. Редуцирующие вещества определялись йодометрически. Активность выражалась в международных единицах, т.е. в мкмоль/мин. Протеолитическую активность оп-

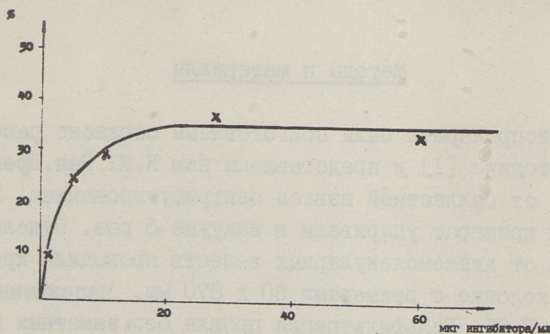
ределяли на 2 % казеине при $\text{pH} = 7,8$ по приросту растворимых в трихлоруксусной кислоте веществ, дающих окраску методом Лоури.

α - Амилазную активность определяли по стандартной методике [2].

При определении протеолитической активности выяснилось, что в начальном периоде реакции продукты гидролиза накапливаются нелинейно. Поэтому скорость реакции определяли начиная с 10 минут после начала гидролиза.

Результаты и обсуждение

Исследование протеолитического препарата показало, что оптимум его активности лежит в пределах pH от 7 до 9. Наряду с этим обнаружена еще некоторая активность при pH 3-4. Все последующие определения проведены при $\text{pH} = 7,8$. Значение K_m препарата относительно казеина равно примерно 0,5 %. В пределах 1-4 % активность не зависит от концентрации казеина.

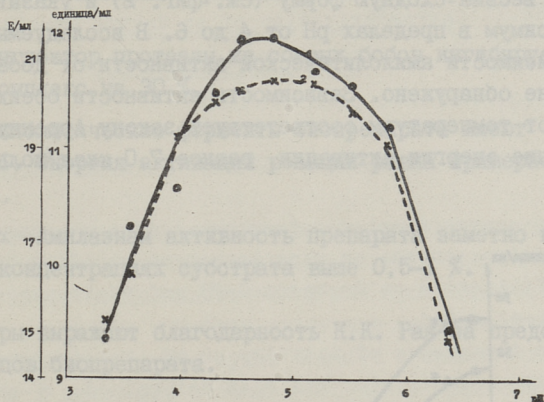


Фиг. 1. Ингибирование протеолитического комплекса ингибитором грисина.

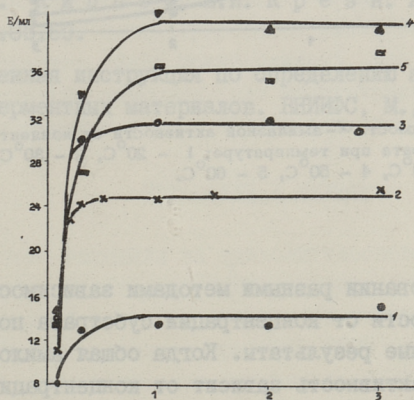
В пределах температуры от 20 до 50 °C максимальная активность подчиняется закону Аррениуса и имеет энергию активации 13,9 ккал-моль. Исследуемый протеазный комплекс чувствителен к действию ингибитора протеаз из соевых бобов

(производство фирмы "Реанал"). Зависимость протеолитической активности от концентрации ингибитора приведена на фиг. I.

Можно сделать вывод, что ингибитор действует только на некоторые компоненты комплекса и не позволяет полностью ингибировать весь комплекс.



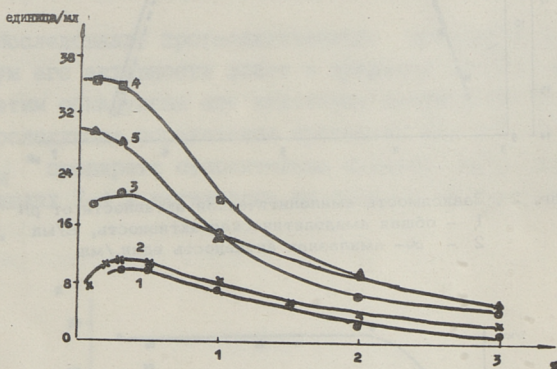
Фиг. 2. Зависимость амилолитической активности от рН
1 - общая амилолитическая активность, Е/мл
2 - α -амилазная активность, единица/мл



Фиг. 3. Зависимость общей амилолитической активности от концентрации субстрата при температуре 1 - 20°C, 2 - 30°C, 3 - 40°C, 4 - 50°C, 5 - 60°C.

При продолжительном действии препарата на казеин достигнута глубина гидролиза, равная 81 %. Этот факт подтверждает довольно широкую специфичность комплекса.

Зависимость обеих форм амилалитической активности от pH имеет весьма сходную форму (см. фиг. 2) и указывает на один максимум в пределах pH от 4 до 6. В исследуемых условиях зависимости амилалитической активности от добавок ионов кальция не обнаружено. Зависимость активности обеих форм амилазы от температуры соответствует закону Аррениуса и дает значение энергии активации, равное 7,0 ккал/моль.



Фиг. 4. Зависимость α -амилазной активности от концентрации субстрата при температуре: 1 - 20°C, 2 - 30°C, 3 - 40°C, 4 - 50°C, 5 - 60°C.

При исследовании разными методами зависимости амилалитической активности от концентрации субстрата получены совершенно различные результаты. Когда общая амилалитическая (сахарогенная) активность зависит от концентрации крахмала согласно закону Михаэлиса-Ментена (см. фиг. 3, то в случае α -амилазной активности обнаружено заметное торможение при высоких концентрациях субстрата (см. фиг. 4). Выяснить механизм процесса ингибирования нам не удалось.

Выводы

1. Протеолитический комплекс биопрепарата имеет оптимум pH в пределах 7-9. K_M относительно казеина лежит около 0,5 %. Энергия активации реакции равна примерно 13,9 $\frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$.

2. Ингибитор протеазы из соевых бобов ингибирует протеазный комплекс на 30 %.

3. Амилолитические ферменты биопрепарата имеют оптимум pH при 4-6. Энергия активации реакции равна примерно 7,0 ккал/моль.

4. α -Амилазная активность препарата заметно понижается при концентрациях субстрата выше 0,5-1 %.

Авторы выражают благодарность К.К. Рая за предоставление образцов биопрепарата.

Литература

1. К.А. Каск, Т.Л. Лиеберт, К.К. Рая, А.Г. Канн, Х.Я. Киппер, М.И. Креэн. Авт.свид. СССР № 320528, 30.05.69.

2. Временная инструкция по определению амилолитической активности ферментных материалов. ВНИИЭС, М., 1965 г.

K. Pappel, A. Köstner, K. Kask

Characterization of an Enzyme Complex
from a Biopreparation

Summary

The enzyme complexes from two different submerged cultures of *Asp. oryzae* on whey have been purified by means of gel filtration on Sephadex G-25 and their properties have been investigated.

The dependence of activity on pH, temperature and substrate concentration has been determined. α -amylase activity exhibited remarkable decrease at higher substrate concentrations, while saccharogenic amylases and proteases showed normal behaviour. The proteases are sensitive to soy-bean trypsin inhibitor.

УДК 577.151.52:002.235

К.Э.Пашель, А.И.Кёстнер, К.А.Каск

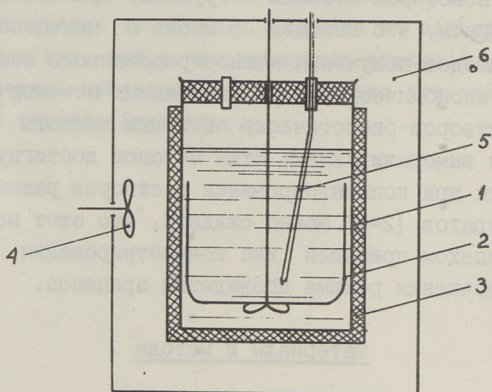
КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ БИОПРЕПАРАТА ВЫМОРАЖИВАНИЕМ

Биопрепарат, полученный выращиванием плесневого гриба *Asp. oryzae* на молочных отходах, может с успехом применяться в качестве амилолитической или протеолитической добавки для улучшения качества хлеба или мясопродуктов [1]. Однако низкое содержание сухих веществ и сравнительно малая активность в некоторой степени затрудняют применение этого ценного препарата, что наводит на мысль о целесообразности разработки методов получения концентрированного биопрепарата. Одним из экономических и перспективных методов концентрирования растворов биологически активных веществ является удаление воды вымораживанием. Этим методом достигнуты хорошие результаты при концентрировании растворов разных ферментных препаратов [2-5]. Можно ожидать, что этот метод может быть с успехом применен для концентрирования биопрепарата после уточнения режима проведения процесса.

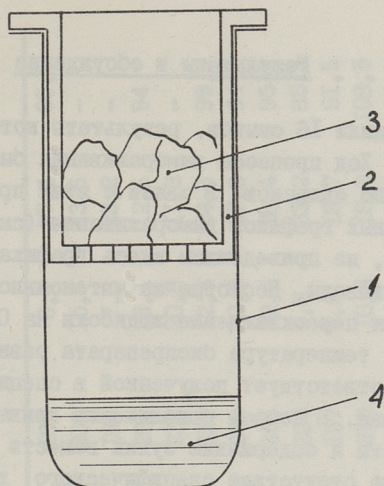
Материалы и методы

При работе исходили из амилолитического и протеолитического биопрепаратов, получение которых опубликовано ранее [1]. Исходный препарат очищали от взвешенных балластных веществ центрифугированием при 3000-3500 оборотов/мин. Центрифугат имел амилолитическую активность 30-40 Е/мл или протеолитическую активность 0,29-0,31 Е/мл. Амилолитическую и протеолитическую активности определяли по обычным методам [6]. Содержание сухих веществ определяли при помощи интерферометра ИТР-2 по калибровочным кривым. Процесс вымораживания проводили в установке, изображенной на фиг.1.

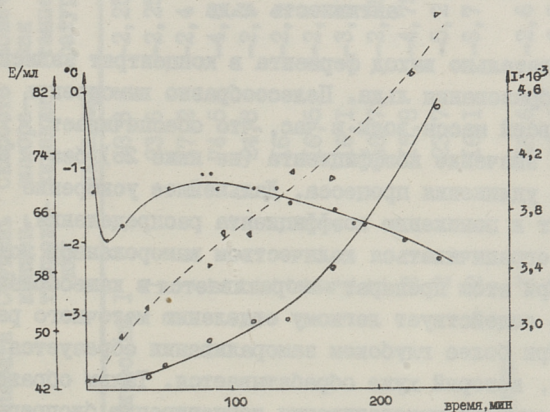
Вся установка помещалась в холодильной камере с температурой -22°C . В снабженный быстроходной якорной мешалкой 2 стакан 1 наливали концентрируемую жидкость и пускали в ход мешалку. Интенсивность теплопередачи регулировали изменением толщины теплоизоляции 3 и при помощи вентилятора 4. Температуру раствора измеряли термопарой 5. Через определенные промежутки времени из раствора брали пробы для определения сухих веществ и ферментативной активности в них. Сразу после окончания вымораживания концентрированный маточный раствор отделяли от кристаллов льда центрифугированием в специальном предварительно охлажденном сосуде (см. фиг. 2) при помощи рефрижераторной центрифуги ЦЛР -I при 2500 об/мин. Полученный концентрат и расплав льда подвергали анализу. Соединенные концентраты использовали после отделения выпавшего осадка для проведения второй степени концентрирования по вышеописанной методике.



Фиг. 1. Установка концентрирования путем вымораживания воды.
1 - стакан, 2 - якорная мешалка, 3 - теплоизоляция,
4 - вентилятор, 5 - термопара, 6 - камера с температурой воздуха -22°C .



Фиг. 2. Стакан для разделения льда и маточного раствора.
1 - сосуд для центрифугирования, 2 - цилиндр с перфорированным дном.



Фиг. 3. Ход концентрирования амилолитического препарата (опыт № 3 по табл. 1). ●—● температура, ○—○ амилолитическая активность, ▼—▼ показание интерферометра.

Результаты и обсуждение

Всего проводили 16 опытов, результаты которых приведены в таблице I. Ход процесса вымораживания был во всех опытах принципиально одинаков. В связи с этим приводим только один из полученных графиков вымораживания (см. фиг. 3). По фиг. 3 и другим, не приведенным здесь графикам, можно сделать следующие выводы. Несмотря на интенсивное перемешивание, наблюдается переохлаждение жидкости на 0,5 градуса. Криоскопическая температура биопрепарата равна примерно $-1,5^{\circ}\text{C}$, что соответствует полученной в специальных определениях величине. В первом приближении кривые ферментативной активности и содержания сухих веществ совпадают, что указывает на отсутствие специфического концентрирования. Этот вывод подтверждается при анализе данных, приведенных в сводной подытоживающей таблице I.

Из этой таблицы вытекает, что процесс протекает без существенных потерь активности. Коэффициент распределения K , который выражается через

$$K = \frac{\text{активность концентрата}}{\text{активность льда}},$$

и следовательно выход фермента в концентрат зависит от скорости образования льда. Целесообразно выморозить около 16 - 17 % всей массы воды в час, что обеспечивает довольно высокое значение коэффициента (не ниже 25) без необоснованного удлинения процесса. Дальнейшее ускорение процесса приводит к понижению коэффициента распределения. Рекомендуется ограничиваться количеством вымороженной воды до 65 %. При этом препарат замораживается в кашеобразную массу, что содействует легкому отделению маточного раствора и льда. При более глубоком замораживании образуется комковатый лед, который хуже обрабатывается. Таким образом на первой ступени вымораживания концентрацию биопрепарата можно увеличить в 2,5-3 раза.

Результаты второй ступени концентрирования приведены в таблице I (опыты 10-12, 16). Ход этих опытов был принципиально такой же, как на первой ступени. Конечно, криоскопическая температура оказалась ниже той же величины исходно-

Концентрирование биопрепарата вымораживанием

№ п.п.	Вид препарата	Ступень концен-трирова-ния	Скорость вымора-живания % льда/час	Конеч-ная темпе-ратура	Количество %		Активность исходной жидкости	Кoeffици-ент рас-преде-ления	Выход актив-ности	
					исходной жидкости	льда				
1	Амлолитический	I	13,8	-2,25	40	51,7	180	6,7	27,4	90,5
2	"	I	23,6	-2,25	40,6	52,4	206	15,6	13,6	-
3	"	I	17,2	-2,4	39,4	56,9	188	7,8	23,2	-
4,	"	I	74,5	-4,0	32,1	65,6	292	23,1	12,6	94
5	"	I	24,8	-2,9	30,4	61,3	238	20,8	11,3	-
6	"	I	16	-2,9	32,2	63,6	310	12,6	24,6	99,9
7	"	I	16,5	-2,7	33,7	63	248	10,0	27,8	94
8	"	I	16,1	-3,2	26,9	70,7	355	12,5	28,4	95,2
9	"	I	16,7	-2,35	37,6	60	232	6,8	33,2	85,5
10	"	2	15,8	-4,75	58,3	36,7	157	8,8	18,7	91,5
11	"	2	23,7	-5,2	53,7	41,0	210	10,8	18,9	109,5
12	"	2	16,1	-6,7	46,6	46,7	193	13,3	14,5	91,2
13	Протеолитиче-ский	I	16,6	-2,6	40,8	57,7	220	5,2	42,2	90,4
14	"	I	16,4	-3,8	30,4	67,6	390	8,8	42,2	109,5
15	"	I	16,7	-3,2	35,4	61,7	329	9,7	32,2	106,5
16	"	2	14,9	-2,8	48,7	39,6	186	7,2	25,6	90,4

го препарата и равнялась примерно $-3,2^{\circ}\text{C}$. Коэффициент распределения, выход и коэффициент концентрирования оказываются немного ниже тех же величин на первой ступени. Несмотря на это, за две ступени можно с хорошим выходом (около 30 %) повысить концентрацию биопрепарата в 5-6 раз.

В ы в о д ы

1. Вымораживание воды при непрерывном перемешивании позволяет неспецифически концентрировать биопрепарат, полученный выращиванием гриба *Asp. oryzae* на молочных отходах. На первой ступени достигается концентрирование в 2,5-3 раза без заметных потерь активности.

2. Вымораживание воды рекомендуется проводить со скоростью около 16 % воды в час до содержания льда не более 65 %. При этом достигается коэффициент распределения не ниже 25.

3. Двухступенчатым вымораживанием можно повысить концентрацию биопрепарата в 5-6 раз при выходе активности 90 %.

Л и т е р а т у р а

1. К.А. Каск, Т.Л. Лиеберт, К.К. Рая, А.Г. Канн, Х.Я. Киппер, М.И. Креэн. Авт.свид. СССР, № 320528, 30.05.69.

2. И.Я. Веселов, Я.Д. Типограф, И.Я. Юркова. Изв. высш. уч. зав. Пищевая технология, 1962, №2, стр. 24.

3. А.И. Веселов. Прикл. биохим. микроб., 1967, № 3, стр. 329.

4. Э.В. Кольцова, А.И. Веселов. Изв.высш. уч. зав. Пищевая технология, 1969, № 3, стр. 73.

5. U. N e b e r. Cryobiology, 1968, 5, 3, 188.

6. К.Э. Паппель, А.И. Кёстнер, К.А.Каск См. наст. сб. стр. 89-90.

K. Pappel, A. Köstner, K. Kask

Concentrating a Biopreparation by Means
of Freezing

Summary

Enzymatically active biopreparation produced by means of submerged cultivation of *Asp. oryzae* on dairy by-products has been concentrated by freezing off water from it.

During the first step of freezing unselective concentration 2.5-3 times without significant losses has been obtained. The two-step process allows to concentrate the biopreparation 5 - 6 times.

УДК 637.52:661.55

Ю.М.Канн, О.В. Таутс
А.А.Сууртхаль, М.А.Хунт

О СОДЕРЖАНИИ НИТРИТОВ В МЯСНЫХ ТОВАРАХ И ВОЗМОЖНОСТИ ОКРАШИВАНИЯ МЯСНОГО ФАРИША

Одними из вредных примесей, которые могут встречаться в пищевых продуктах, являются нитриты и нитраты.

По мнению некоторых авторов [1], нитраты сами не являются вредными для организма. Лишь после восстановительных реакций нитраты могут *in vitro* или *in vivo* перейти в нитриты. Последние являются токсичными для организма.

Установлено [2], что доза нитрита в количестве $60 \div 100$ мг/кг для человека смертельная, $15 \div 30$ мг/кг вызывает тяжелое отравление, $7 \div 15$ мг/кг вызывает признаки легкого отравления у взрослого человека.

Известно, что нитриты реагируют со вторичными аминами и образуют N-нитрозосоединения. Большинство из последних являются сильными канцерогенами.

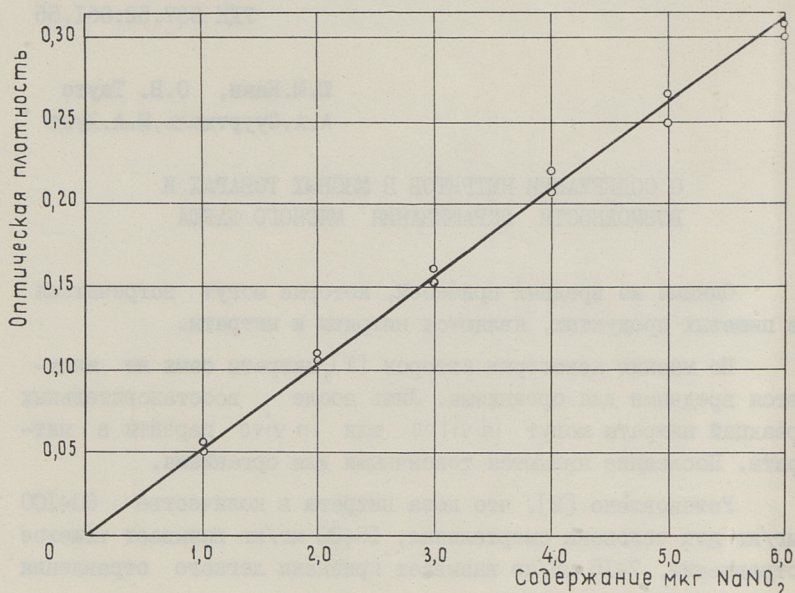
При изготовлении многих пищевых продуктов добавляют нитраты и нитриты с одной стороны для получения желаемого цвета и с другой стороны для удлинения срока хранения.

По техническому условию РТУ ЭССР 760-69 допускается содержание нитрита в мясных изделиях 10 мг на 100 г продукта. Содержание нитрата не нормируется.

Целью настоящей работы было определение содержания нитритов в некоторых мясных изделиях и изучение возможностей замены нитрита при окрашивании мясных изделий другими веществами.

Для определения нитритов в мясных изделиях использовали методику Стойя [3].

Калибровочная кривая определения нитритов приведена на фиг. I.



Фиг. 1. Калибровочная кривая нитрита.

В данной работе было проведено определение нитритов в 70 пробах мясных изделий. Результаты анализа приведены в таблице I.

В мясном фарше не обнаружили содержания нитритов.

Приведенные в таблице I данные показывают, что в основном содержание нитритов в мясных товарах ниже допустимых норм. В то же время видно влияние технологической переработки на содержание нитритов в мясных продуктах.

Для исследования возможностей окрашивания мясных товаров были проведены опыты с нитритом натрия, аскорбиновой

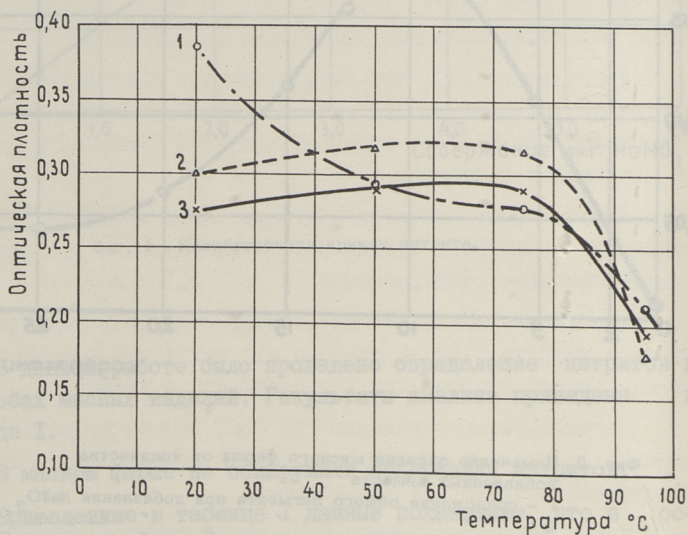


кислотой и витамином РР. При количественном определении содержания NO-пигмента и общего пигмента использовали методику, предложенную Соловьевым [4]. Данные анализа изображены на фиг. 2 и 3.

Т а б л и ц а I

Содержание нитритов в различных мясных товарах

Наименование	Содержание NaNO_2 в мг на 100 г продукта			Количество проб
	среднее	наивысшее	наименьшее	
Вареная колбаса	7,69	11,16	4,86	17
Сосиски и сардельки	7,72	11,42	5,44	8
Полукопченая колбаса	3,31	5,77	0,77	21
Копченая колбаса	2,95	3,71	1,43	6
Копченое мясо	4,99	7,99	1,29	18



Фиг. 3. Изменение окраски мясного фарша в зависимости от температуры

1 - мясной фарш без добавок

2 - добавлено 5 мг% витамина РР

3 - добавлено 5 мг% витамина С

Из приведенных кривых явствует, что содержание общего пигмента в мясе при добавлении нитрита доходит почти до постоянной величины уже при добавлении 5 мг % нитрита. Из этого следует, что допускаемая в настоящее время норма добавления нитрита в мясные товары превышает необходимые дозы.

Из фиг. 2 видно, что добавление аскорбиновой кислоты $I \div 300$ мг % не влияет на окраску мяса.

Максимальное содержание общего пигмента при добавлении витамина PP достигается при $5 \div 10$ мг % витамина PP. Окраска улучшается по сравнению с мясом без добавок, но остается слабее, по сравнению с окраской, полученной при добавлении NaNO_2 .

Кривые температурной зависимости окраски мяса при добавлении аскорбиновой кислоты и витамина PP приведены на фиг. 3. Из фигуры видно, что добавление витаминов C и PP в температурном интервале $50 \div 80$ °C имеет положительный эффект.

В ы в о д ы

1. Содержание нитрита в анализируемых мясных товарах не превышает принятых в настоящее время норм.

2. Содержание общего пигмента достигает максимальной величины уже при добавлении 5 мг % NaNO_2 , что позволяет уменьшить норму добавления почти в два раза.

3. Добавление аскорбиновой кислоты заметно не влияет на окраску мясных изделий.

4. Для окраски мясных изделий можно добавлять витамин PP в количестве $5 \div 10$ мг %. Полученная окраска остается слабее, чем при использовании NaNO_2 .

5. Наилучший эффект окрашивания мясного фарша при добавлении витамина PP достигается в интервале температур $50 \div 80$ °C.

Л и т е р а т у р а

1. М.Я. Р о о м а. О содержании нитритов и нитратов в пищевых продуктах. Сб. докладов УП научной конференции, Таллин, 1970.

2. С.П. Мясников. Влияние нитритов и нитратов колбасных изделий на метгемоглобинообразование. Автореферат диссертации, Ленинград, 1965.

3. N. von Stoya. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 65, 5, 144-147. 1969.

4. В.И. Соловьев и др. Новые методы технико-химического контроля в колбасном производстве. ЦИНТИ Пищепром. Москва, 1961.

J.Kann, A.Suurthal, O.Tauts, M.Hunt

Über das Enthalten von Nitrit in Fleischwaren
und über die Möglichkeiten der Färbung von
Hackfleisch

Zusammenfassung

In 70 Fleischproben ist das Enthalten von Nitrit bestimmt. Die Analysen haben gezeigt, daß der Nitritgehalt in den analysierten Proben nicht höher war als gesetzmäßig vorgesehen ist.

Die Möglichkeiten zur Färbung von Hackfleisch wurden untersucht. Die Autoren geben ihre Empfehlung zur Ersatzung von NaNO_2 mit Vitamin PP in Mengen 5-10mg%.

УДК 664.94I.3I:6I4.3

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

ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ НИТРОЗАМИНОВ В ПИЩЕВЫХ
ПРОДУКТАХ

Сообщение I

В последнее время во многих лабораториях мира большое внимание уделяют одной группе химических канцерогенов N – нитрозаминам, которые могут легко синтезироваться из вторичных аминов и нитритов или нитрозгазов в различных технологических процессах и даже в самом организме.

В основном обзоре Магээ и Барнеса [I] рассмотрены вопросы химии канцерогенных нитрозосоединений, паталогические изменения, индуцируемые этими соединениями, их мутагенное действие и метаболизм как в целом организме, так и в тканевых препаратах.

Известно, что пища всегда содержит вторичные амины и во многих случаях также нитриты или контактирует с нитрозгазами. Вторичные амины содержат также многие лекарства. Из этого следует, что существует потенциальная возможность образования нитрозосоединений в пищевых продуктах и в желудочном соке. В литературе имеются сведения о том, что кормление овец обработанной селитрой рыбной муки вызвало развитие острых некрозов печени [2].

Нет сомнения в том, что N –нитрозосоединения представляют собой серьезную опасность для людей. Случай с циклином является хорошим примером того, какое значение имеет тщательное исследование пищевых продуктов на содержание N –нитрозосоединений с помощью высокочувствительных аналитических методов.

При определении нитрозаминов успешно использованы различные методы, как поларография [3, 4, 5], колориметрия

[6], ультрафиолетовая спектроскопия [7-II], тонкослойная хроматография [12], инфракрасная спектроскопия [13,14], газовая хроматография [15-21], масс-спектрометрия в сочетании с газовой хроматографией [22] и т.д.

На втором совещении по нитрозосоединениям в Гейдельберге [23] подчеркивалось, что самым перспективным методом определения нитрозоаминов в пищевых продуктах можно считать хромато-масс-спектрометрию.

Если разделение модельных смесей летучих алифатических N-нитрозосоединений не представляет трудностей с аналитической стороны, то определение их в пищевых продуктах является сравнительно сложной проблемой с двух точек зрения:

- 1) селективное выделение нитрозоаминов из пищевых продуктов с большим выходом и
- 2) количественное аналитическое определение отдельных нитрозоаминов.

По данным многих исследователей содержание нитрозоаминов в различных пищевых продуктах варьируется в пределах $0 \div 50$ микрограмм на кг. Лишь в отдельных случаях обнаружены более высокие концентрации. Поэтому выбранный метод анализа должен обладать очень высокой чувствительностью. Большинство из лабораторий мира применяют пока для анализа N-нитрозосоединений метод газовой хроматографии.

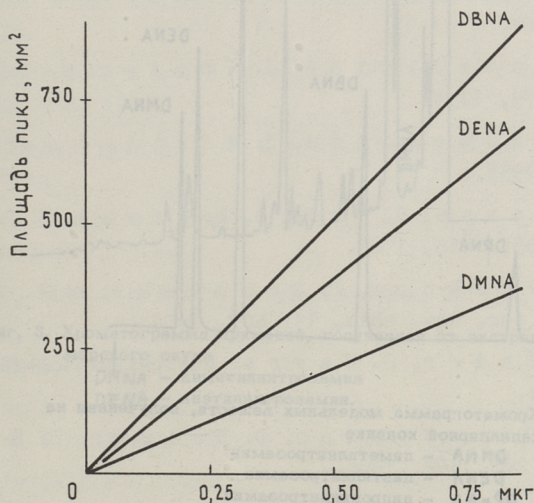
В литературе имеется много сведений о применяемых колонках и об условиях разделения нитрозоаминов при помощи газовой хроматографии. В качестве жидкой фазы применяли Carbowax 1540 [24], Ucon LB 550 X [25], PEG 4000 [26], DEGA [27] и силиконовое масло [28]. Длина колонок варьируется от 1,5 до 6 м [24,27]. Некоторые авторы применяли и капиллярную колонку [25].

При анализе N-нитрозосоединений обычно применяют прямое хроматографирование их, но хороших результатов разделения достигли и при окислении нитрозоаминов до соответствующих нитраминаов [29] или их восстановление до гидразинов [30]. При детектировании N-нитрозосоединений общепринятым является применение пламенно-ионизационного детектора. Недостатком последнего является его относительно низкая чув-

ствительность к N-соединениям. Применение детектора электронного захвата тоже не имеет особой перспективы в связи с коротким линейным динамическим диапазоном [31]. Более чувствительными к N-соединениям являются термоионный детектор [32] и кондуктометрический детектор Коулсона [31].

Авторы настоящей статьи исследовали возможности определения отдельных летучих нитрозаминов при помощи газовой хроматографии.

При определении оптимальных параметров разделения лучших результатов достигли с наполнительными колонками, длина - 3,6 м, 5 % PEG 20000 на Chromaton N-AW HMDS 0,16±0,2 мм. В качестве хроматографа служил Chrom-3I, с пламенно-ионизационным детектором.



Фиг. 1. Калибровочные кривые N-нитроаминов

DMNA - диметилнитрозамин

DENA - диэтилнитрозамин

DBNA - дибутилнитрозамин.

Параметры разделения:

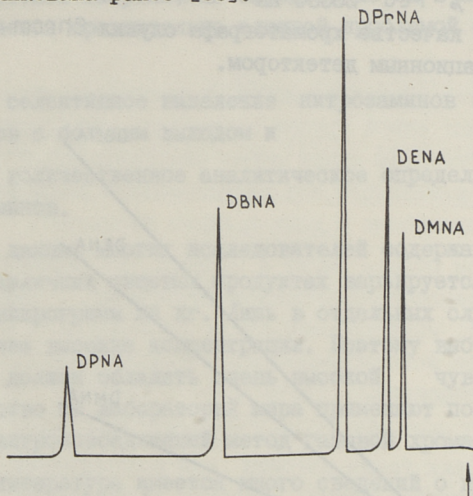
Температура колонки - 110 °C

Температура испарителя - 230 °C

скорость потока газа-носителя — 60 мл/мин,
скорость потока воздуха 300 мл/мин,
скорость потока водорода 30 мл/мин.

Калибровочные кривые определения отдельных нитрозаминов приведены на фиг. 1. Минимально детектирующим количеством оказался $0,1 \div 0,25$ микрограмм нитрозаминов.

При хроматографическом разделении проб, полученных из рыб горячего копчения показано, что имеющиеся примеси не позволяют четкого разделения и количественного определения индивидуальных нитрозаминов. Методика подготовки проб для анализа опубликована ранее [33].



Фиг. 2. Хроматограмма модельных веществ, полученная на капиллярной колонке

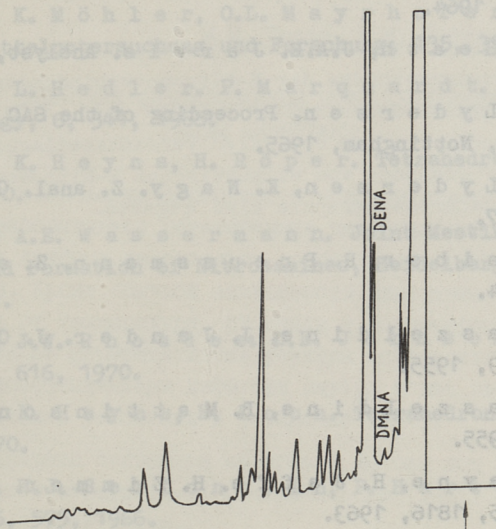
DMNA — диметилнитрозамин
DENA — диэтилнитрозамин
DPnNA — дипропилнитрозамин
DBNA — дибутилнитрозамин
DPNA — дипентилнитрозамин

Авторы применили для разделения нитрозаминов капиллярную колонку длиной 50 м. Параметры разделения были следующими:

жидкая фаза: полиэтиленгликоль 4000,
температура колонки: 145 °C,
температура испарителя: 230 °C,

скорость He : 1 мл/мин.

На фиг. 2 приведена хроматограмма разделения модельных веществ. На фиг. 3 – типичная хроматограмма пробы, полученной из окуня горячего копчения. На хроматограмме отмечены предполагаемые нитрозамины, идентифицированы по удерживаемому объему.



Фиг. 3. Хроматограмма примесей, полученная от экстракта морского окуня

DMNA – диметилнитрозамин
DENA – диэтилнитрозамин.

Выводы

1. Для определения нитрозаминов в пищевых продуктах самыми перспективными являются хроматографические методы в сочетании со спектроскопическими методами.

2. Систему из капиллярной колонки в сочетании с пламенно-ионизационным детектором можно успешно принять для определения N-нитрозаминов.

Л и т е р а т у р а

1. J.M. Barnes, P.N. Magee. British J. Industr. Med. 11, 167, 1954.
2. F. Ender, C. Havre, A. Helgebostad, N. Koppang, R. Madsen, L. Ceh. Naturwissenschaften, 51, 637, 1964.
3. D.F. Heath, J.A.E. Jarvis. Analyst, 80, 613, 1955.
4. D.L. Lydersen. Proceeding of the SAC Conference, p. 398, Nottingham, 1965.
5. D.L. Lydersen, K. Nagy. Z. anal. Chem., 230, 277, 1967.
6. D. Daiber, R. Preussmann, Z. anal. Chem., 206, 344, 1964.
7. R. Haszeldine, J. Jander. J. Chem. Phys., 23, 979, 1955.
8. R. Haszeldine, B. Mattinson. J. Chem. Soc., 4172, 1955.
9. E. Layne, H. Jaffe. H. Zimmer. J. Am. Chem. Soc., 85, 1816, 1963.
10. M. Piskorz, T. Urbanski. Bull. Acad. Polon Sci., ser. sci. chim. 11, 607, 1963.
11. F. Ender, G. Havre. Naturwissenschaften, 51, 637, 1964.
12. R. Preussmann, D. Daiber. H. Hany. Nature, 201, 502, 1964.
13. J. Grimes, R. Hannis, A. Huggard. J. Chem. Soc., A-1, 266. 1964.
14. K. Möhler, O. Mayrhofer. Z. Lebensmitteluntersuchung und Forschung, 135, 313, 1968.
15. G. Neurath et al. Beiträge zur Tabakforschung, 3, 251, 1965.
16. O.L. Mayrhofer. K. Möhler. Z. Lebensmitteluntersuchung und Forschung, 134, 246, 1967.

17. W.J. Serfontein, J.H. Smit. Nature, 214, 169, 1967.
18. E. Krölller. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 63, 303, 1968.
19. H.J. Petrowitz. Arzneimittel-Forschung, 18, 1486, 1968.
20. K. Möhler, O.L. Mayrhofer. Deutsche Lebensmitteluntersuchung und Forschung, 135, 313, 1968.
21. L. Hedler. P. Marguardt. Food Cosmetic Toxicology, 6, 341, 1968.
22. K. Heyns, H. Röper. Tetrahedron Letters, 10, 737, 1970.
23. A.E. Wassermann. Joint Meeting on the Analysis and Formation of Nitrosamines, Heidelberg, 13-15 October 1971.
24. J.W. Rhoades. D.E. Johnson. J. Chromatogr. 8, 616, 1970.
25. K. Heyns, H. Koch. Tetrahedron Letters, 10, 741, 1970.
26. W.J. Serfontein, P. Harter. Cancer Res., 26, 575, 1966.
27. M.J. Saxby. Anal. Letters, 3, 397, 1970.
28. H.J. Petrowitz. Arzneimittel-Forschung, 18, 1486, 1968.
29. J. Althorpe, D.A. Goddard, D.J. Sissons. G.M. Telling. J. Chromatogr. 53, 371, 1970.
30. G. Neurath, B. Pirnmann, M. Dünge. Chem. Ber., 97, 1631, 1964.
31. В.Г. Березкин, В.С. Татаринский. Газо-хром. методы анализа примесей, Наука, М., стр. 67, 1970.
32. W.A. Aue, C.W. Gehrke, R.C. Tindle, D.L. Stalling, C.D. Ruyle. J. Gas Chromatogr. 5, 381, 1967.
33. 2 Всесоюзная конференция по остаточному содержанию пестицидов. Сб. докладов. Таллин, 1971.

Über die Bestimmung von N-Nitrosoverbindungen

in Lebensmitteln

Zusammenfassung

Die Autoren geben eine Literaturübersicht über die wichtigsten Bestimmungsmethoden der N-Nitrosoverbindungen. Die Gaschromatographie-Maßspektrometrie wird als Zukunftsmethode bezeichnet. Die optimalen Versuchsbedingungen für die analytische Trennung von aliphatischen N-Nitrosoverbindungen durch Gaschromatographie sind gegeben.

УДК 66.097.64:577.154.21

М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск

КИНЕТИКА ФИКСИРОВАННОЙ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫМ ГЕЛЕМ ИНВЕРТАЗЫ

При связывании ферментов с водонерастворимыми носителями образуются гетерогенные катализаторы, кинетика действия которых значительно осложняется процессами массопередачи. Кроме обычной зависимости кинетических констант фермента от температуры, pH среды и концентрации субстрата гетерогенные ферментативные реакции определяются радиусом зерен, коэффициентами диффузии внутри и вне зерен и гидродинамическими условиями в установке [1-4].

Препараты связанной инвертазы до сих пор получали методами физического [5-8] и химического [9-11] связывания фермента с носителями.

В некоторых случаях в результате связывания инвертазы обнаруживался сдвиг оптимума pH или изменение формы кривой зависимости активности от pH [7, 10, 11].

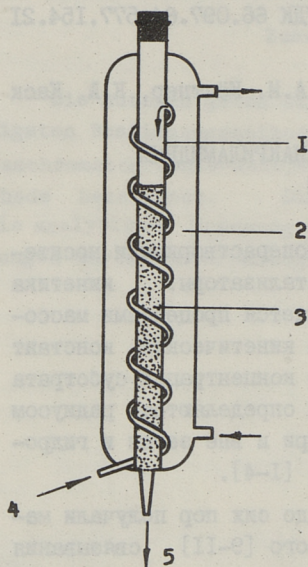
Однако до сих пор кинетика действия нерастворимых производных инвертазы детально не изучена.

Нами ранее показано [12], что при полимеризации смеси акриламида, N,N'-метилден-бис-акриламида и инвертазы получается нерастворимый гель со стойкой инвертазной активностью. В данном сообщении изложены результаты опытов, проведенных для изучения основных закономерностей кинетики связанной в гель инвертазы.

Экспериментальная часть

В проведенных опытах применяли лиофилизированный препарат фиксированной в полиакриламидный гель инвертазы фирмы "Мерк". Гель содержал 7 % полимера с относительным

содержанием сшивок 10 %. Активность препарата достигала 50 % от активности свободного фермента и не уменьшалась при лиофилизационной сушке. До употребления гельфермент набухал до часа в ацетатном буферном растворе.



Фиг. 1.

Колонка для определения активности связанных ферментов. 1 - колонка, 2 - водяная рубашка, 3 - гельфермент, 4 - вход субстрата, 5 - выход продукта.

Активность связанной инвертазы определялась в специальных колонках (см. фиг. I) с водяной термостатируемой рубашкой при постоянной температуре. Линейный градиент субстрата, эффиктора или pH создавался при помощи обычной двух-сосудной системы. Фракции собирались по времени. По объемам фракций и по содержанию в них инвертного сахара вычисляли активность гельфермента по формуле

$$A = \frac{i \cdot V}{t \cdot q}, |E/\Gamma|, \quad (I)$$

где i - содержание инвертного сахара, мкмоль/мл,
 V - объем фракции, мл,
 t - время сбора фракции, мин.,
 q - навеска геля в колонке, г.

Активность выражалась в международных единицах [Е].

Активность свободной инвертазы определялась на 7 %-ном растворе сахарозы в 0,05 М ацетатном буфере при pH 4,8. Температура определения активности 30 °C.

Содержание восстанавливающих сахаров определяли комплексометрическим методом Тетге и Нирле [13].

Определение малых количеств глюкозы проводили биохимическим методом, используя комплект реактивов ТС-M-III фирмы Boehringer & Soehne GmbH.

Содержание меди определяли дитиокарбаматным методом [14]. Так как определение сахаров проводилось титрованием медью, то в случае добавки меди в исследуемый раствор, рассчитывалась необходимая поправка.

Содержание анилина определяли косвенно, прибавляя к исходному раствору анилина определенное количество хлористого натрия. Так как все остальные растворы не содержали заметных количеств хлоридов, то найденное аргентометрически содержание Cl^- позволило по пропорциональности вычислить концентрацию анилина.

Математическую обработку опытных данных проводили на ЭВМ "Минск-22", применяя программу универсальной линейной регрессии, составленную для обработки данных как функции одного переменного. При помощи программы рассчитывалась прямая регрессии между исходными или преобразованными величинами.

При преобразовании переменных, например, уравнение Михаэлиса-Ментена

$$y = \frac{V \cdot x}{K_m + x}$$

линеаризуется введением $z = \frac{x}{y}$ и приобретает вид $z = a + bx$, причем $V = \frac{1}{b}$, $K_m = \frac{a}{b}$.

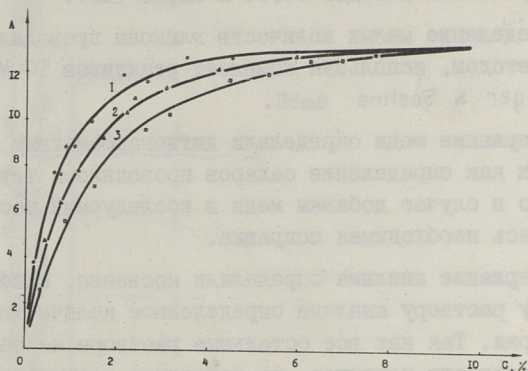
Результаты и обсуждение

Зависимость активности от концентрации субстрата

Активность связанной инвертазы определялась при 30 °C в градиенте концентрации сахарозы в ацетатном буферном растворе pH 4,8, 0,05 М.

Для сравнения определялась активность свободного фермента при разных концентрациях сахарозы.

Обработка результатов на ЭВМ показала, что в обоих случаях экспериментальные данные хорошо подчиняются уравнению Михаэлиса-Ментена.



Фиг. 2. Зависимость активности гелинвертазы от концентрации субстрата. Диаметр зёрен геля 1 - 0,25–0,5 мм, 2 - 0,5–1,0 мм, 3 - 1,3 мм.

Значение K_M для свободного фермента оказалось равным 29,2 мМ, что хорошо согласуется с литературными данными [16, 17, 18]. Видимое значение K_M гелинвертазы определялось при разных размерах зёрен. На фиг. 2 приведена зависимость выявляемой активности от концентрации субстрата при работе в колонке с зёрнами различного диаметра.

Обработкой результатов на ЭВМ найденные значения K_M и максимальные скорости V_{max} для разных фракций геля приведены в таблице I.

По данным таблицы I можно сделать вывод, что видимое значение K_M связанной инвертазы зависит от размеров зёрен геля, увеличиваясь с ростом диаметра зерна, что согласуется с теоретическими предпосылками [15].

Для уточнения значения K_M связанной инвертазы активность гелифермента со средним диаметром зёрен 0,5–1,0 мм определялась при низких концентрациях сахарозы (0–1 %). Содержание редуцирующих сахаров в этом случае определяли биохимическим методом.

Т а б л и ц а I

Значения K_M и $V_{\max}$ для свободной и связанной инвертазы

Фермент	K_M , мм	$\frac{K_M \text{ связ.}}{K_M \text{ своб.}}$	$V_{\max}$ Е/г
Свободная инвертаза	29,2	1,0	15,2
Гельинвертаза 0,25-0,5 мм	19,6	0,67	7,6
То же, 0,5-1,0 мм	27,9	0,96	7,6
То же, 1,3 мм	44,2	1,51	7,8

Результаты обрабатывались на ЭВМ. Значение K_M оказалось равным 26,2 мм, значение $V_{\max}$ - 7,5 Е/г, что хорошо согласуется с данными первого опыта (см. табл. I).

Так как при малых размерах зерен геля видимое K_M должно приближаться к своему истинному значению, то результаты таблицы I наводят на мысль, что связывание в гель уменьшает K_M инвертазы. Этот вывод можно объяснить или влиянием полимерных цепей на коэффициент активности субстрата [I9] или гипотетическими изменениями в конформации фермента.

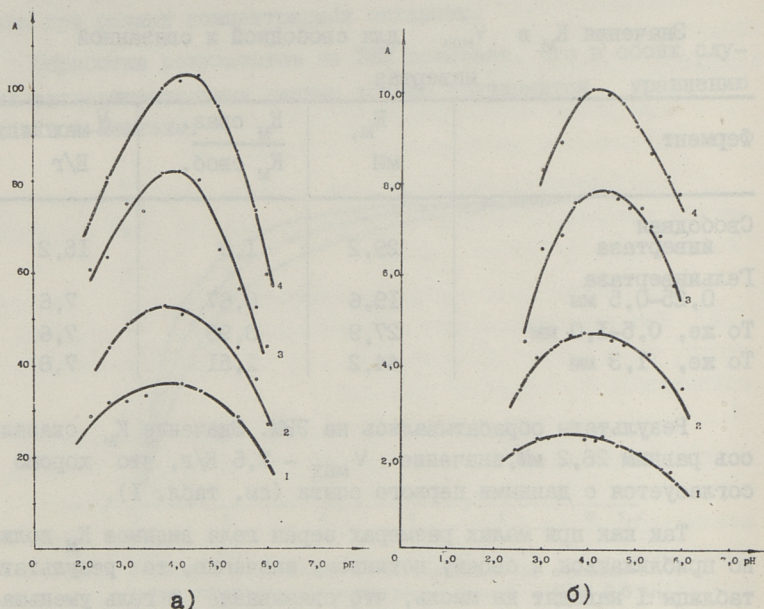
Зависимость активности от pH

Активность связанной инвертазы определялась в колонке В в градиенте pH. Для элиминирования спонтанного гидролиза сахарозы при низких значениях pH параллельно испытуемой устанавливали холостую колонку.

Градиент pH образовывали смешиванием 0,05 М буферных растворов Na_2HPO_4 - лимонная кислота с pH 2,2 и 6,0, в которых изготавливались 7 %-ные растворы сахарозы.

Для сравнения определяли зависимость активности от pH для свободного фермента. Результаты опытов приведены на фиг. 3. Из них составлена таблица 2.

Результаты показывают, что обе формы инвертазы имеют одинаковые оптимум pH и вид кривой pH-активность.



Фиг. 3. Зависимость активности от pH.
 а - свободная инвертаза,
 б - связанная инвертаза.
 1 - 20°C, 2 - 30°C, 3 - 40°C,
 4 - 50°C.

Т а б л и ц а 2

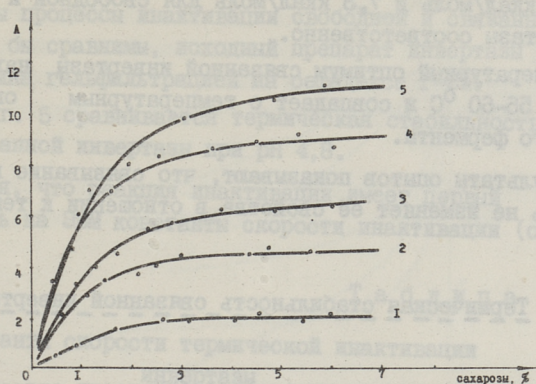
Чувствительность свободной и связанной
 инвертазы к изменениям pH.

Темпе- ратура °C	Интервалы pH, при которой сохраняется активность на			
	100 - 90 %		100 - 80 %	
	свободная	связанная	свободная	связанная
20	2,05	2,00	2,40	2,80
30	1,90	2,05	2,75	2,95
40	1,75	1,95	2,65	2,60
50	1,70	1,85	2,27	2,75

Зависимость активности от температуры

Активность связанной инвертазы определялась в колонке, работающей в режиме градиента концентрации при температурах

5, 20, 30, 40 и 50 °С. Полученные данные приведены на фиг.4



Фиг. 4. Зависимость активности связанной инвертазы от температуры.
1 - 5°C, 2 - 20°C, 3 - 30°C, 4 - 40°C, 5 - 50°C.

Из них вычисляли методом наименьших квадратов кинетические показатели, которые приведены в таблице 3. По ним можно заключить, что K_M связанной инвертазы не зависит от температуры.

Т а б л и ц а 3

Значения видимой K_M связанной инвертазы
при разных температурах

Температура, °С	K_M , мм	V_{max} , Е/г
5	22,8	2,0
20	23,9	5,4
30	27,9	7,5
40	19,2	10,2
50	26,3	14,1

Для сравнения определялись K_M и активность свободного фермента при температурах 5, 10, 20, 30, 40 и 50 °С.

По полученным данным можно сказать, что K_M свободной инвертазы не зависит от температуры в исследованных пределах.

По прямым в координатах Аррениуса $\ln A - 1/T$ найденные значения энергии активации оказались рав-

ными 7,5 ккал/моль и 7,3 ккал/моль для свободной и связанной инвертазы соответственно.

Температурный оптимум связанной инвертазы находится в пределах 55–60 °С и совпадает с температурным оптимумом свободного фермента.

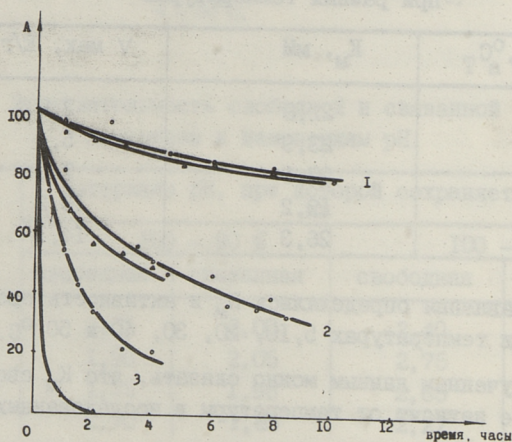
Результаты опытов показывают, что связывание инвертазы в гель не изменяет её свойства в отношении к температуре.

Термическая стабильность связанной инвертазы

Для определения термической стабильности связанной инвертазы наблюдали за изменением активности колонки при непрерывной работе последней при 55, 60, 65°С.

Параллельно проводились опыты с раствором свободной инвертазы, используя 100^x разбавление исходного препарата.

Так как инвертаза фирмы "Мерк" консервирована в глицерине, то стабилизирующий эффект последнего при 60 °С даже в таком разбавлении весьма заметен, но в процессе измельчения и промывания связанная инвертаза очищается от глицерина.



Фиг. 5. Термическая стабильность инвертазы.
1 — 55°С, 2 — 60°С, 3 — 65°С,
—Δ—Δ— свободная инвертаза,
—○—○— связанная инвертаза.

Чтобы процессы инаktivации свободной и связанной инвертазы были бы сравнимы, исходный препарат инвертазы очищали от глицерина гельфильтрацией на сефадексе Г-25.

На фиг. 5 сравнивается термическая стабильность свободной и связанной инвертазы при pH 4,8.

Считая, что реакция инаktivации имеет первый порядок, вычислялись на ЭВМ константы скорости инаktivации (см. таблицу 4).

Т а б л и ц а 4

Константы скорости термической инаktivации
инвертазы

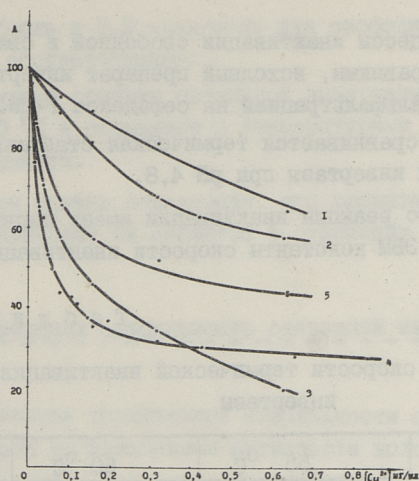
Показатель	55 °C		60 °C		65 °C	
	своб.	связ.	своб.	связ.	своб.	связ.
Константа скорости, час ⁻¹	0,025	0,029	0,187	0,124	5,484	0,426
Погрешность, %	3,1	2,8	7,8	8,4	-	12,0
Корреляция	0,904	0,975	0,950	0,970	0,964	0,973

Как кривые на фиг. 5, так и данные таблицы 4 показывают, что при температуре 60 °C и выше появляется некоторое стабилизирующее действие связывания. Кроме того выяснилось, что кинетика термической инаktivации свободной и связанной инвертаз довольно хорошо описывается уравнением I-го порядка.

Ингибирование связанной инвертазы

Исследовали ингибирование обеих форм инвертазы известными по литературе ингибиторами - ионами меди и анилином.

Активность связанного фермента определяли в колонке в градиенте концентрации ингибиторов. Ингибирование свободной инвертазы определяли по отдельным опытам. Во всех опытах субстратом служил 7 %-ный раствор сахарозы pH 4,8.



Фиг. 6. Ингибирование инвертазы ионами меди.

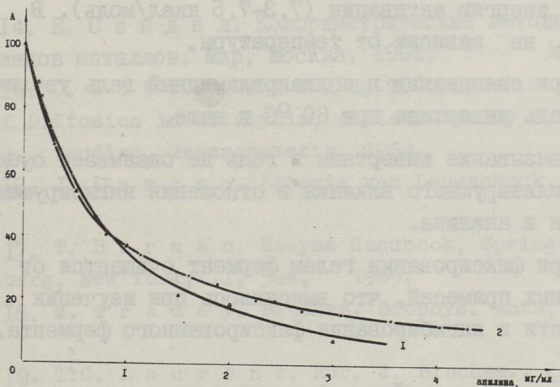
- 1 - свободная инвертаза фирмы "Мерк",
- 2 - " " " " очищенная
гельхроматографией на Сефадексе Г-25,
- 3 - свободная инвертаза фирмы "Мерк", очищенная
гельхроматографией на Сефадексе Г-75,
- 4 - связанная инвертаза,
- 5 - свободная инвертаза фирмы "Серва".

Результаты, приведенные на фиг. 6, показывают, что инвертаза фирмы "Мерк" содержит вещества, защищающие фермент от ингибирования медью. Эти вещества отделяются гельфильтрацией, а также промывкой фиксированного в полиакриламидный гель фермента. Полученными данными доказывается эффект очищения фермента в процессе получения фиксированной формы.

В примененных нами пределах концентрации меди связанная инвертаза сохраняет около 30 % исходной активности. По форме кривой ингибирования можно предположить, что часть связанной инвертазы оказывается недоступной для действия меди.

Реактивацией ингибированного гелфермента 0,1 М раствором трилона Б восстанавливается около 50 % от исходной активности фермента. Вторичное ингибирование ионами меди протекает вполне аналогично ингибированию исходного материала.

Ингибирование свободной и связанной форм инвертаз анилином протекает без существенных различий (см. фиг.7).



Фиг. 7. Ингибирование инвертазы анилином.

- 1 — свободная инвертаза,
- 2 — связанная инвертаза.

В ы в о д ы

1. Зависимость активности геллинвертазы от концентрации субстрата описывается уравнением Михаэлиса-Ментена. Значение видимой K_M связанной инвертазы зависит от диаметра зерен и повышается с увеличением диаметра зерна. Видимая K_M тонкозернистой геллинвертазы (0,25–0,5 мм) в 1,5 раза ниже K_M свободной инвертазы.

2. Обе формы инвертазы имеют одинаковые оптимум pH и форму кривой pH-активности.

3. Обе формы инвертазы имеют одинаковый температурный оптимум и энергию активации (7,3–7,5 ккал/моль). В обоих случаях K_M не зависит от температуры.

4. При связывании в полиакриламидный гель увеличивает-ся стойкость инвертазы при 60 °C и выше.

5. Связывание инвертазы в гель не оказывает существенного стабилизирующего влияния в отношении ингибирующего действия меди и анилина.

6. При фиксировании гелем фермент очищается от низкомолекулярных примесей, что выяснилось при изучении термостабильности и ингибирования фиксированного фермента.

Л и т е р а т у р а

1. G. K a y, M. L i l l y. Biochem. Biophys. Acta, Enzymol., 198, 2, 276, 1970.

2. R. G o l d m a n, O. K e d e m, E. K a t c h a l s k i. Biochem., 10, 1, 165, 1971.

3. R. G o l d m a n, O. K e d e m, E. K a t c h a l s k i. Biochem. 7, 12, 4518, 1968.

4. P. S u n d a r a m, A. T w e e d a l e, K. L a i d l e r. Can. J. Chem., 48, 10, 1498, 1970.

5. J. N e l s o n, E. G r i f f i n. J. Am. Chem. Soc., 38, 1109, 1916.

6. J. N e l s o n, H i t c h c o c k. J. Am. Chem. Soc., 1956, 43, 1921.

7. H. S u z u k i, Y. O z a w a, H. M a e d a. Agric. Biol. Chem., 30, 8, 807, 1966.

8. D. Johnson, A. Ciegler. Arch. Biochem. Biophys., 130, 1-2, 384, 1969.
9. G. Manescke, S. Singer. Makromol. Chem., 39, 13, 1960.
10. H. Filipusson, W. Hornby. Biochem. J., 120, 1, 215, 1970.
11. P. Monsan, G. Durand. FEBS Letters, 16, 1, 39, 1971.
12. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. Труды ТПИ, серия А, 1971, № 300, стр. 21.
13. G. Tegge, W. Nierle. Stärke, 17, 4, 1965.
14. Е. Сендел. Колориметрические методы определения следов металлов. Мир, Москва, 1964.
15. C. Satterfield, T. Sherwood. The Role of Diffusion in Catalysis, Addison-Wesley Publishing Co. Inc., Redding, Massachusetts, 1963.
16. J. Lampren. Antonie van Leuwenhock, 34, 1, 1968.
17. T. Barman. Enzyme Handbook, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, II, 584, 1969.
18. M. Tracey. Biochem. Biophys. Acta, 22, 147, 1963.
19. T.C. Laurent. Eur. J. Biochem., 21, 4, 498, 1971.

Авторы выражают благодарность Х.Кальмла за проведение части экспериментальной работы.

Экспериментальная часть

В опытах применяли препараты СТИ с 7 % -ным содержанием полимера (связан 10 %). Получение гелей и определение активности проводилось по ранее описанной методике [3].

По нашим данным [4] лиофилизационная сушка не снижает активности СТИ, но учитывая высокую стоимость этого процесса было бы целесообразно хранить СТИ в виде суспензии.

Выяснение подходящей среды для длительного хранения СТИ было первой задачей настоящей работы.

K. Kreen, A. Köstner, K. Kask

Kinetics of Invertase Entrapped into
Polyacrylamide Gel

Summary

The kinetics of entrapped invertase corresponds to Michaelis-Menten's law. However, the apparent value of K_m increases with the radius of gel particles. For the finest fraction K_m is about 0.6 of the value of soluble invertase.

There was no difference in the influence of pH, temperature, Cu^{++} and aniline on the activity of both forms of enzymes.

The heat stability at 60°C has been increased due to entrapping. The procedure of entrapping causes purification of enzyme from low molecular weight impurities.

УДК 66.097.64:577.154.21

М.И.Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск

ПРИМЕНЕНИЕ СВЯЗАННОЙ ИНВЕРТАЗЫ ДЛЯ
ГИДРОЛИЗА САХАРОЗЫ

Для практических целей особый интерес представляют стойкость препаратов связанной инвертазы и их применимость для гидролиза концентрированных растворов сахарозы. Сузуки и др. [1] провели гидролиз сахарозы при помощи адсорбированной на ДЭАЭ-целлюлозу инвертазы в виде суспензии. После 10-кратного использования фермент сохранял 50 % от исходной активности. Джонсон и др. [2] гидролизовали раствор сахарозы в колонке, заполненной связанными ЭКТЭОЛА-целлюлозой спорами плесневых грибов *Aspergillus* и *Penicillium*. Им достигалась 50 %-ная глубина гидролиза, но из-за повышенной вязкости гидролиз растворов сахарозы с концентрацией более 0,2 М оказался невозможным.

В наших предыдущих статьях [3, 4] приведены методика получения связанной в полиакриламидный гель инвертазы (СТИ) и некоторые кинетические параметры полученного препарата. В настоящей работе исследуются стабильность и применимость СТИ.

Экспериментальная часть

В опытах применяли препараты СТИ с 7 %-ным содержанием полимера (сшивок 10 %). Получение гелей и определение активности проводились по ранее описанной методике [3].

По нашим данным [4] лиофилизационная сушка не снижает активности СТИ, но учитывая высокую стоимость этого процесса было бы целесообразно хранить СТИ в виде суспензии.

Выяснение подходящей среды для длительного хранения СТИ было первой задачей настоящей работы.

Измельченный гель активностью 5,2 Е/г суспендировали в разных растворах и хранили при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени из суспензии брали пробу геля и измеряли ее активность в колонке с 7 %-ным раствором сахарозы. Полученные результаты приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Стойкость СГИ в разных средах

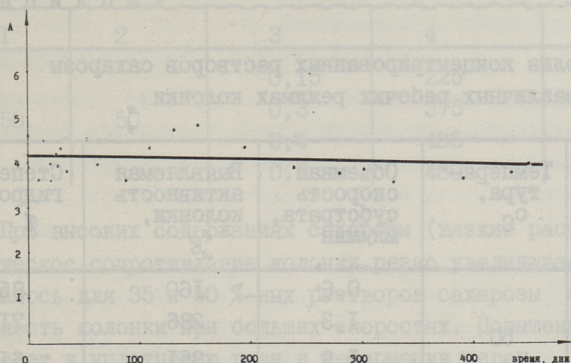
С р е д а	Активность СГИ, Е/г						Длительность со- хранения, дни
	исходная	33	62	99	147	342	
Ацетатный буфер, 0,05 М, рН 4,8	5,2	4,7	4,6	2,3	0,2	0	
Насыщенный раствор сахарозы, рН 4,8	5,2	5,2	5,3	6,0	5,2	3,0	
Глицерин-вода в соотношении 1:1	5,2	4,7	4,5	5,5	4,9	4,7	
Глицерин	5,2	0,6	0,2	0	0	0	

Данные таблицы показывают, что разбавленный глицерин и раствор сахарозы являются хорошими стабилизаторами СГИ и позволяют хранить СГИ длительное время в набухшем виде. В ацетатном буфере СГИ инактивируется в течение 3-4 месяцев.

Для проверки сохранения активности СГИ в условиях непрерывного гидролиза сахарозы провели длительный опыт.

Опыт провели в колонке при 30 °С, применяя СГИ в количестве 3,5 г. Через колонку непрерывно пропускали 7 %-ный раствор сахарозы в ацетатном буфере рН 4,8 со скоростью 0,03-0,3 мл/мин. Активность колонки измерялась периодически по объему проходившего раствора сахарозы и содержанию в нем редуцирующих сахаров.

Результаты опыта, изображенные на фиг. I, показывают, что активность СГИ сохраняется в этих условиях очень хорошо.



Фиг. 1. Активность колонки с гелинвертазой при длительной работе.

Так как при примененных объемных скоростях активность колонки заметно зависит от скорости субстрата, а в течение всего опыта не удалось сохранить постоянную скорость, то найденные значения активности колонки в некоторой степени колеблются.

При общей продолжительности опыта 449 дней активность СГИ снизилась не более чем на 10 %. Через колонку пропущено 40,5 л раствора сахарозы и получено 143 г инвертного сахара на единицу активности СГИ.

Гидролиз концентрированных растворов сахарозы при помощи СГИ изучен в колонке и в реакторе.

В первую очередь опыты проводились в колонке с размерами 130x22 мм. Применялась гелинвертаза активностью 80 Е/г и средним диаметром зерен 0,5–1,0 мм. В колонке содержалось 16,5 г геля.

Исследовалась зависимость кинетики гидролиза от объемной скорости субстрата, начальной концентрации субстрата и температуры.

Опыты проведены со ступенчатым изменением рабочего режима с проверкой установления стационарности после каждого изменения режима. Гидролиз проведен с разными растворами сахарозы при pH 4,8 и температуре 30 °C и 50 °C. Кроме того, 35 %-ный раствор сахарозы гидролизovali при разных температурах. Результаты опытов внесены в таблицу 2.

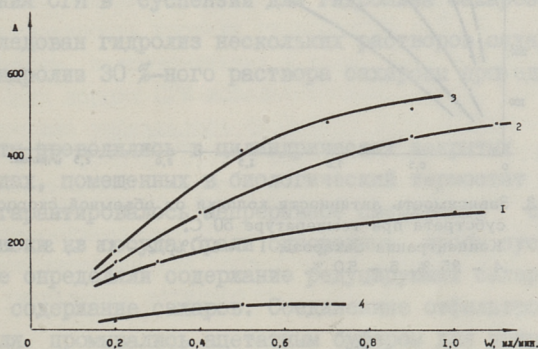
Т а б л и ц а 2

Гидролиз концентрированных растворов сахарозы
при различных рабочих режимах колонки

Начальная концентр. сахарозы, %	Темпера- тура, °C	Объемная скорость субстрата, мл/мин	Выявляемая активность колонки, Е	Степень гидролиза, %
10	50	0,6	160	85
		1,3	286	71
		1,9	351	61
		2,5	371	50
15	50	0,6	208	75
		1,3	366	60
		1,9	413	48
		2,1	433	45
25	50	0,2	122	77
		0,6	314	68
		1,1	410	47
		1,3	419	42
35	30	0,2	129	55
		0,3	160	45
		0,8	249	30
		1,0	273	26
35	40	0,2	160	68
		0,4	276	54
		0,9	450	41
		1,1	478	37
35	50	0,2	183	79
		0,5	419	67
		0,7	480	61
		0,9	506	54
35	60	0,2	21	11
		0,5	58	10
		0,6	59	9
		0,7	61	8

I	2	3	4	5
		0,15	225	84
50	50	0,3	375	64
		0,4	485	58
		0,5	480	27

При высоких содержаниях сахарозы (вязкие растворы) гидравлическое сопротивление колонки резко увеличивается. Так не удалось для 35 и 50 %-ных растворов сахарозы определить активность колонки при больших скоростях. Повышение давления ведет к уплотнению геля и деформации зерен.



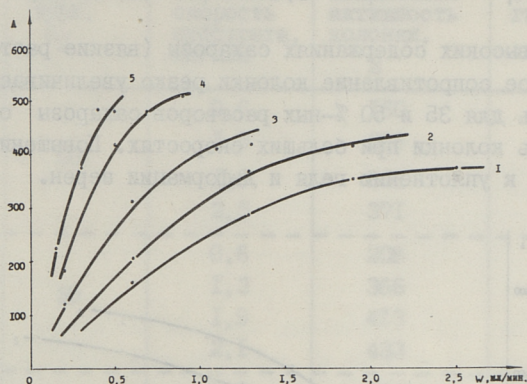
Фиг. 2. Активность колонки с гелинвертазой при разных температурах.
1 - 30°C, 2 - 40°C, 3 - 50°C, 4 - 60°C.

По результатам опыта, приведенным в таблице 2 и на фиг. 2, наивысшую активность колонка имеет при 50 °C. Длительная работа при 60 °C приведет, по-видимому, к термической инактивации фермента.

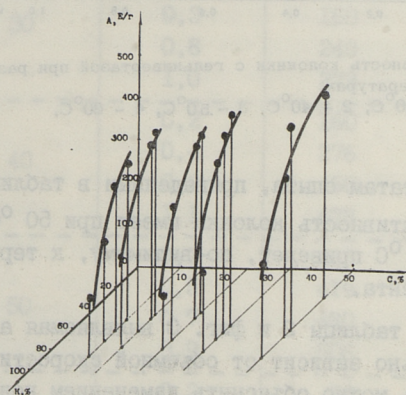
По данным таблицы 2 и фиг. 3 выявляемая активность колонки значительно зависит от объемной скорости субстрата. Эту зависимость можно объяснить изменением контактного времени. При более высокой объемной скорости время контакта сокращается, а средняя концентрация субстрата в колонке повышается, что и ведет к увеличению выявляемой активности колонки. Так как определение контактного времени затруднено,

то в данной серии опытов придется охарактеризовать работу колонки косвенными зависимостями.

На фиг. 4 изображена зависимость выявляемой активности от концентрации сахарозы и степени гидролиза (конверсии). Степень гидролиза является функцией контактного времени, а последнее, в свою очередь, функцией объемной скорости субстрата.



Фиг. 3. Зависимость активности колонки от объемной скорости субстрата при температуре 50°C .
Концентрация сахарозы 1 - 10 %, 2 - 15 %, 3 - 25 %, 4 - 35 %, 5 - 50 %.



Фиг. 4. Зависимость активности колонки с гелинвертазой от концентрации сахарозы и степени конверсии.

Из фиг. 4 видно, что эффективность колонки возрастает с увеличением концентрации сахарозы в растворе и с уменьшением времени контакта (степени конверсии).

На основе проведенных опытов можно сказать, что гидролиз концентрированных растворов сахарозы в колонке со СГИ вполне осуществим, но высокое гидравлическое сопротивление может стать препятствием при успешном использовании более длинных колонок.

Учитывая вышесказанное, в дальнейшем опыты проводились в реакторах с непрерывным перемешиванием суспензии, состоящей из раствора сахарозы и гелинвертазы. Целью следующих опытов было выяснение возможностей повторного использования СГИ в суспензии для гидролиза сахарозы.

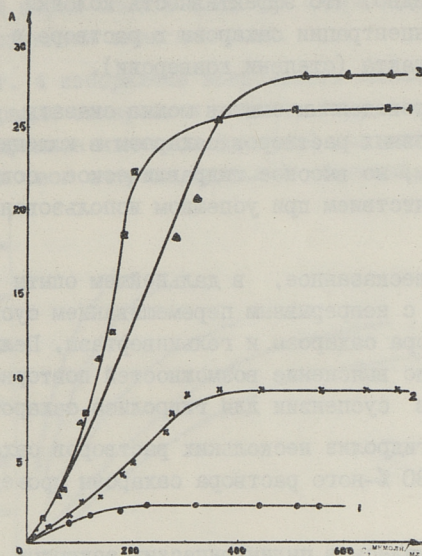
Исследован гидролиз нескольких растворов сахарозы при 50 °С. Гидролиз 30 %-ного раствора сахарозы проведен при 30 °С.

Опыты проводились в цилиндрических закрытых реакционных сосудах, помещенных в биологический термостат на качалку, чем гарантировалось непрерывное смешивание суспензии. Периодически из сосуда брали однородные пробы суспензии. В фильтрате определяли содержание редуцирующих сахаров, а также общее содержание сахаров. Соединенные отфильтрованные образцы геля промывались ацетатным буфером для устранения сахаров и применялись для проведения следующего опыта. Все повторные опыты проводились одинаковым соотношением СГИ к раствору сахарозы.

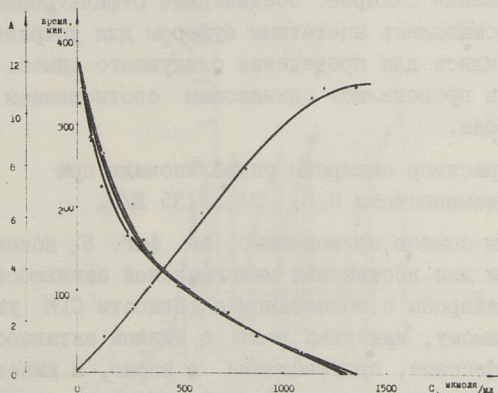
30 %-ный раствор сахарозы гидролизovali при помощи трех гелей с активностями 8,5, 34 и 135 Е/г.

Результаты опытов, приведенные на фиг. 5, показывают, что необходимая для достижения максимальной активности СГИ концентрация сахарозы с повышением активности СГИ увеличивается. По-видимому, кинетика геля с низкой активностью лимитируется процессами, протекающими в зерне, а кинетика геля с высокой активностью — диффузией субстрата в зерно геля.

Результаты трехкратного применения СГИ для гидролиза 50 %-ного раствора сахарозы при 50 °С приведены на фиг. 6.



Фиг. 5. Гидролиз 30%-ного раствора сахарозы с гелинвертазой активностью 1 - 8,5 Е/г, 2 - 34 Е/г, 3 - 135 Е/г, 4 - гидролиз свободной инвертазой.



Фиг. 6. Гидролиз 50%-ного раствора сахарозы с гелинвертазой.

Максимальная активность геля выявляется при концентрациях сахарозы выше 1000 мкмоль/мл. Это объясняется высокой активностью геля и уменьшением константы диффузии из-за повышенной вязкости раствора.

Аналогично протекает и гидролиз насыщенного раствора сахарозы.

Вид кривых активность-концентрация субстрата при опытах в реакторе значительно отличается от типичных кривых Михаэлиса-Ментена. Это явление не вполне понятно. Торможение скорости реакции при низких концентрациях сахарозы может быть обусловлено высоким содержанием глюкозы и фруктозы или уменьшением содержания воды в реакционной смеси.

С целью приближения условий опыта к реальным требованиям промышленности провели гидролиз 30 и 70 %-ного раствора сахарозы, приготовленных в воде, а не в буферном растворе. Одна порция СГИ использовалась 10 раз, причем степень гидролиза уменьшалась от 1,0 до 0,94 в случае 30%-ного раствора и от 0,88 до 0,75 в случае 70 %-ного субстрата.

Итак, проведение ферментативного гидролиза в реакторах вполне осуществимо. Одна порция геля может быть многократно использована для проведения гидролиза без существенного уменьшения активности.

В ы в о д ы

1. Препараты СГИ стабильны при комнатной температуре в разбавленном глицерине или в растворе сахарозы.

2. Активность СГИ очень хорошо сохраняется при длительном контакте с субстратом. В течение 449-дневной длительной работы активность СГИ снизилась не более 10 %.

3. Гидролиз концентрированных растворов сахарозы в колонке с СГИ вполне осуществим. Эффективность колонки зависит от концентрации раствора сахарозы и времени контакта. Однако высокая вязкость концентрированных растворов сахарозы препятствует успешному использованию колонок.

4. СГИ пригоден для проведения гидролиза концентрированных растворов сахарозы в реакторах. При 10-кратном ис-

пользовании одной порции СТИ степень конверсии 70 %-ного раствора сахарозы уменьшалась от 0,88 до 0,75.

Л и т е р а т у р а

1. H. Suzuki, Y. Ozawa, H. Maeda. Agric. Biol. Chem., 30, 8, 807, 1966.

2. D. Johnson, A. Ciegler. Arch. Biochem. Biophys., 130, 1-2, 384, 1969.

3. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. Труды ТПИ, серия А, 1971, № 300, стр. 21.

4. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. См. наст. сборник стр. II7.

Авторы выражают благодарность М. Симм за проведение части экспериментальной работы.

M. Kreen, A. Köstner, K. Kask

Application of Immobilized Invertase for Sucrose Hydrolysis

Summary

The preparations of invertase entrapped into polyacrylamide gel have been used for sucrose hydrolysis in laboratory conditions.

An entrapped invertase column retained 90 p.c. of its activity after acting continuously during 449 days at 30°C. The enzyme column retained its activity well also at temperatures up to 50°C. The application of columns for the hydrolysis of concentrated (30 p.c. and 50 p.c.) sucrose solutions is hindered by high viscosities and the resulting high flow resistance. The batch process has been used for such solutions.

On account of the mass transfer resistance the apparent K_m value of entrapped enzyme has been increased, especially in the case of higher gel activities.

УДК 577.15.154.21.025.3:535.217

ФОТОИНАКТИВАЦИЯ ИНВЕРТАЗЫ РИБОФЛАВИНОМ

К.А. Кивисилла, М.И. Креэн, А.И. Кёстнер

При иммобилизации инвертазы, КФ 3.2.I.26, путем полимеризации акриламида и N,N'-метилен-бис-акриламида в её растворе всегда наблюдается снижение ферментативной активности [I]. Это явление можно объяснить или частичной инактивацией фермента под действием атаки свободных радикалов или экранированием активного центра полимерными цепями.

С целью проверки этих гипотез в данной работе исследовано поведение инвертазы при освещении в растворе рибофлавина в отсутствие акрильных мономеров.

Методы и материалы

В работе применялись:

Инвертаза производства фирмы "Serva" активностью 123000 Е/г. Содержание белка в препарате 340 мг/г.

Рибофлавин производства фирмы "Fluka AG Buchs SG" марки "чистый".

Все растворы готовились в ацетатном буфере с pH 4,8. Раствор инвертазы имел активность 170 Е/мл.

Активность инвертазы определялась по ранее описанной методике и выражалась в международных единицах Е [I].

Спектры снимались при помощи "Specord UV-Vis" в кварцевых кюветах толщиной 10 мм. Хроматографический анализ проводили на колонке размерами 8x350 мм, наполненной сефадексом Г-25. Смеси освещались люминесцентной лампой мощностью 400 Вт с расстояния 10 см.

Результаты и обсуждение

В первую очередь исследовалось снижение активности инвертазы после освещения в присутствии рибофлавина, варьируя концентрацию рибофлавина и продолжительность освещения. Результаты проведенных двух серий опытов приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Фотохимическая инаktivация инвертазы

Продолжительность освещения, мин.	Концентрация рибофлавина, мкг/мл	Активность инвертазы, % от исходной
I5	I5	3,0
I5	7,5	29,8
I5	3,7	65,3
I5	I,9	78,3
I5	0,9	93,0
5	IO	47,6
IO	IO	20,8
I5	IO	9,0
30	IO	0

Данные таблицы I явно показывают, что в данных условиях протекает зависимость от концентрации рибофлавина и от продолжительности освещения фотоинаktivация. Для количественного описания процесса предположим, что концентрация свободных радикалов пропорциональна концентрации рибофлавина и реакция протекает относительно инвертазы по первому порядку, т.е. соблюдается уравнение (I)

$$- \frac{dJ}{dt} = k \cdot J \cdot r, \quad (I)$$

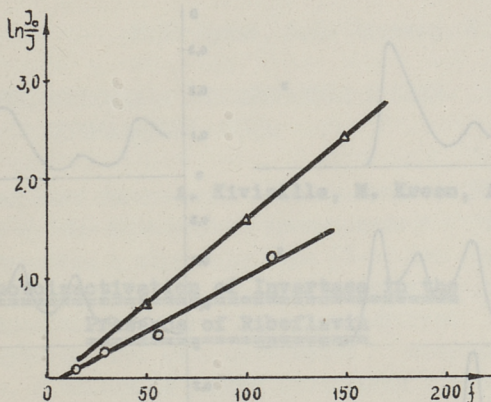
где J — активность инвертазы,
 r — концентрация рибофлавина,
 t — время,
 k — константа, включающая условия освещения и константу скорости реакции.

Заменяя $f = r \cdot t$ и интегрируя, получаем уравнение

(2)

$$\ln \frac{J_0}{J} = k \cdot f. \quad (2)$$

Преобразованные согласно уравнению (2) данные изображены на фиг. 1.



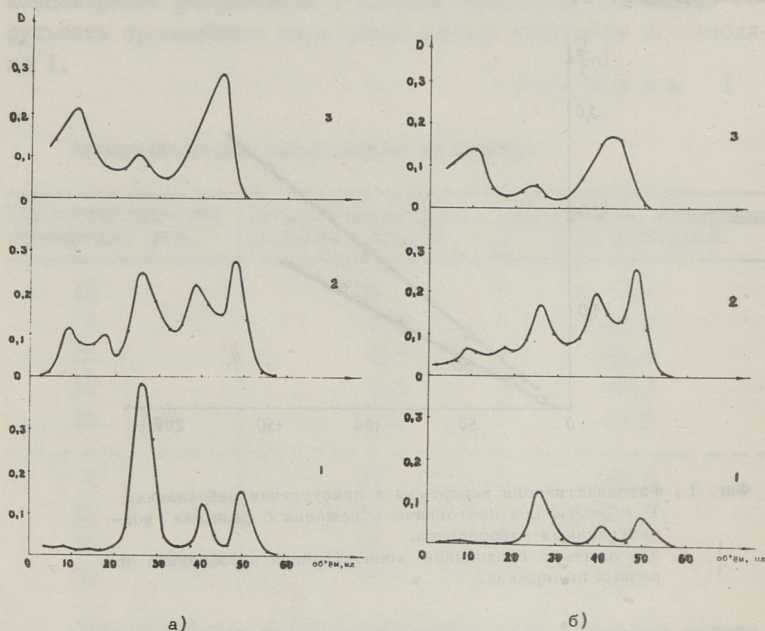
Фиг. 1. Фотоинаktivация инвертазы в присутствии рибофлавина.
1 - опыты при постоянном освещении с разными концентрациями рибофлавина,
2 - опыты с постоянной концентрацией рибофлавина при разных выдержках.

По фиг. 1 видно, что экспериментальные точки довольно хорошо налагаются на прямые и таким образом указывают на правдоподобность уравнения (1). Однако различия в условиях освещения приводят к разнице в значениях k для первой и второй серии опытов.

Можно предположить, что в данных условиях могут образоваться продукты присоединения рибофлавина и инвертазы. Для проверки этого предположения проведен хроматографический анализ раствора, содержащего 170 Е/мл инвертазы и 100 мкг/мл рибофлавина, до и после освещения в течение 15 минут. Проведен также хроматографический анализ раствора рибофлавина. Оптические плотности полученных фракций изображены на фиг. 2.

По фиг. 2 можно видеть, что использованный рибофлавин содержит не менее 3 компонентов. Концентрация некоторых из них при освещении заметно уменьшается, но в то же время образуется пик высокомолекулярных соединений с характерным

для рибофлавина поглощением. Появление такого пика с большой вероятностью указывает на образование продукта присоединения инвертазы с рибофлавином.



Фиг. 2. Хроматограммы смеси рибофлавина и инвертазы.

1 - рибофлавин,

2 - смесь до освещения,

3 - смесь после освещения,

Оптические плотности при 265 нм /а/ и 350 нм /б/.

Выводы

1. Освещение смеси инвертазы и рибофлавина приводит к инаktivации первой. Кинетика реакции инаktivации в первом приближении имеет первый порядок относительно инвертазы. Константа скорости пропорциональна концентрации рибофлавина.

2. Хроматографией на сефадексе Г-25 показано, что при освещении образуется продукт присоединения инвертазы с рибофлавином.

Л и т е р а т у р а

И. М.И. Креэн, А.И. Кестнер, К.А. Каск.
Труды ТПИ, серия А, Таллин, № 300, 1971, стр. 21.

A. Kivisilla, M. Kreen, A. Kõstner

Photoinactivation of Invertase in the Presence of Riboflavin

Summary

Illuminating a solution of riboflavin and invertase causes inactivation of the latter. Inactivation is the first order reaction and its rate constant is proportional to riboflavin concentration.

Chromatographic and UV-spectrophotometric investigation of mixtures before and after illumination indicates that an addition reaction takes place during inactivation. Similar reactions are possible during the entrapping process of invertase and other enzymes into polyacrylamide gel.

М.И. Крезн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск

ГЛЮКОЗООКСИДАЗА ФИКСИРОВАННАЯ В ПОЛИ- АКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ

Нерастворимые производные глюкозооксидазы (КФ I.I.3.4) до сих пор получены ковалентным связыванием с носителями [1, 2], заключением в структуру геля [3-5] или поперечной сшивкой молекул фермента [6, 7]. Хотя связывание глюкозооксидазы в полиакриламидный гель уже в литературе описано, свойства получаемых при этом материалов охарактеризованы недостаточно. В настоящей работе уточняются условия получения связанной в полиакриламидный гель глюкозооксидазы (СГТ) и приводятся некоторые ее кинетические и прикладные характеристики.

Методы и материалы

Приготовление исходных реактивов и получение геля проводилось по описанной нами методике [14] с той разницей, что растворителем служил ацетатный буфер с pH 5,8. Применялись препараты глюкозооксидазы фирмы "Aleman". Один из образцов содержал некоторое количество каталазы, в другом каталазная активность практически не обнаруживалась.

Активность свободной глюкозооксидазы определялась измерением концентрации образовавшейся перекиси водорода или по расходу кислорода в ходе реакции. Активность выражалась в мкмоль H_2O_2 /мин. или мкмоль O_2 /мин. соответственно.

Концентрация H_2O_2 в растворах определялась модифицированным методом Мидлтона [8, 9].

Содержание кислорода измерялось электрохимическим анализатором кислорода УТ-6803. Прибор работает по принципу измерения тока ионизации кислорода, диффундирующего к индикаторному электроду датчика через полупроницаемую мембрану.

Активность СГТ определялась по двум способам – колочным и суспензионным. Пользовались специальной колонкой с термостатируемой водяной рубашкой. Субстратом служил 3 % раствор глюкозы в ацетатном буфере с pH 5,8, насыщенный воздухом или кислородом.

Если колонка с гелферментом имела способность разлагать H_2O_2 , при том скорость разложения в течение опыта возрастала, то перед и после опыта определялась каталазная активность колонки пропусканием через нее раствора H_2O_2 определенной концентрации. Каталазную активность колонки для каждого момента определили линейной интерполяцией. Коррекцию активности колонки СГТ проводили на ЭВМ.

Активность СГТ $|A|$ вычисляли по объемам фракций и содержанию в них перекиси водорода по формуле (I)

$$A = \frac{p \cdot V}{t \cdot g} |E/\Gamma|, \quad (I)$$

где p – содержание H_2O_2 , мкмоль/мл,
 V – объем фракции, мл,
 t – время сбора фракции, мин.,
 g – навеска геля в колонке, г.

Предварительные опыты показали постоянство активности колонки при объемных скоростях 0,15–0,45 мин⁻¹.

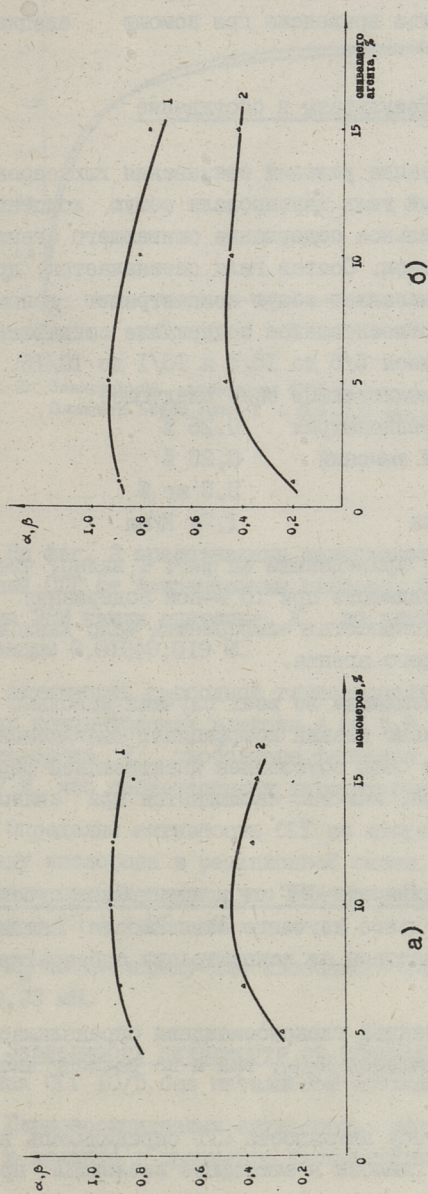
Активность колонки с СГТ выражается и по формуле (2)

$$A = \alpha \cdot \beta \cdot A_0 = \gamma \cdot A_0, \quad (2)$$

где A_0 – активность свободного фермента, Е,
 α – коэффициент фиксирования фермента гелем, определяемый по промывочным водам,
 β – коэффициент видимой активности,
 γ – общий коэффициент активности.

По второму способу активность СГТ определялась по уменьшению содержания кислорода. Гельфермент суспендировали в 3 %-ном растворе глюкозы с pH 5,8, насыщенном кислородом. Содержание кислорода определяли электрохимическим анализатором кислорода. Из полученной интегральной кривой вычисляли активность геля цифровым дифференцированием.

Математическую обработку данных проводили методом наименьших квадратов по описанной нами ранее методике [10].



Фиг 1. Связывание глюкозооксидазы в полиакриламидный гель при
а) - разных концентрациях мономеров,
б) - разных концентрациях сшивающего агента.
1 - коэффициент фиксации фермента α ,
2 - коэффициент видимой активности фермента β .

Той же программой в необходимых случаях проведено цифровое дифференцирование кривых.

Коррекция содержания перекиси водорода для колонок с каталазной активностью проведена при помощи специальной программы.

Результаты и обсуждение

С целью оптимизации условий связывания глюкозооксидазы в полиакриламидный гель варьировали общую концентрацию мономеров и относительное содержание сшивающего агента в полимеризационной смеси. Состав геля обозначается дробью, числитель которой указывает общую концентрацию мономеров %, а знаменатель — относительное содержание сшивающего агента. Изучались смеси 5/5 до 15/5 и 10/1 до 10/15. Содержание остальных компонентов было следующее:

β -диметиламинопропионитрил	0,25 %
надсернокислый аммоний	0,25 %
рибофлавин	0,5 мг %
глюкозооксидаза	1,74 Е/мл

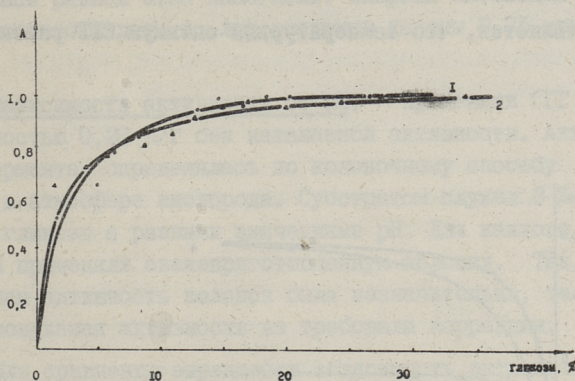
По результатам, приведенным на фиг. I, видно, что СГТ имеет наибольшую активность при 10 %-ном содержании мономеров. Выявляемая активность гелфермента мало зависит от концентрации сшивающего агента.

Коэффициент связывания во всех случаях довольно высок (до 0,93). Относительно низкий коэффициент выявляемой активности (0,5) может быть обусловлен инактивацией фермента в процессе связывания, как это наблюдается при связывании инвертазы (II).

Зависимость активности СГТ от концентрации субстратов.
Проводилось сравнительное изучение зависимости активности обеих форм глюкозооксидазы от концентрации субстратов, т.е. глюкозы и кислорода.

Активность связанной глюкозооксидазы определялась как по количеству образующейся H_2O_2 , так и по расходу кислорода.

По первому способу активность СГТ определялась в градиенте концентрации глюкозы в атмосфере кислорода при pH 5,8 и 30°C.



Фиг. 2. Зависимость активности СГТ от концентрации субстрата. Диаметр зёрен геля 1 - 0,5-1,0 мм, 2 - >1,0 мм.

На фиг. 2 представлена зависимость активности двух фракций СГТ от концентрации глюкозы. Обработкой результатов на ЭВМ нашли значение K_M по глюкозе, который оказался равным 0,016-0,019 М.

Активность свободной глюкозооксидазы определялась на разных концентрациях глюкозы с рН 5,8 при 30 °С в атмосфере кислорода. K_M свободного фермента по глюкозе равнялся 0,027 М, что соответствует литературным данным [12].

Определяя активность СГТ по второму способу, т.е. по расходу кислорода в реакционной смеси, и обрабатывая результаты на ЭВМ, нашли, что значение K_M по кислороду равняется 0,75 ÷ 1,05 мМ.

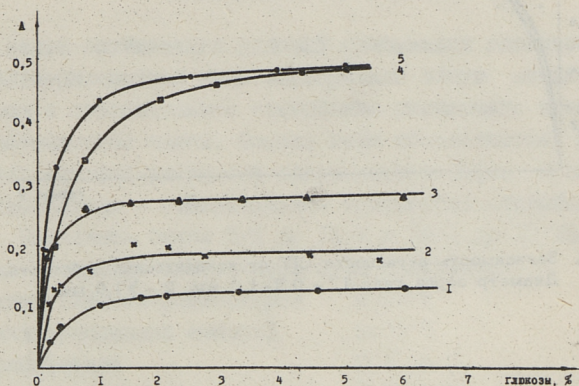
K_M по кислороду для свободного фермента оказался равным 0,23 мМ.

Зависимость активности от температуры. В опытах применялся СГТ 10/5 без каталазной активности.

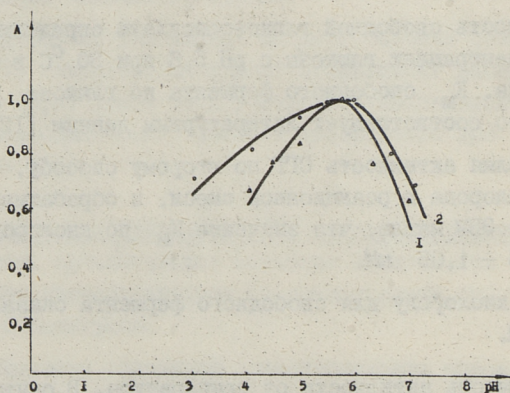
Глюкозооксидазная активность гельфермента определялась в колонке в градиенте концентрации глюкозы в буфере с

pH 5,8 при температурах 5, 20, 30, 40 и 50 °C в атмосфере воздуха. Полученные данные приведены на фиг. 3.

Выявляется, что температурный оптимум СГГ равен 40 – 50 °C.



Фиг. 3. Зависимость активности СГГ от температуры.
1 – 5°C, 2 – 20°C, 3 – 30°C, 4 – 40°C, 5 – 50°C.



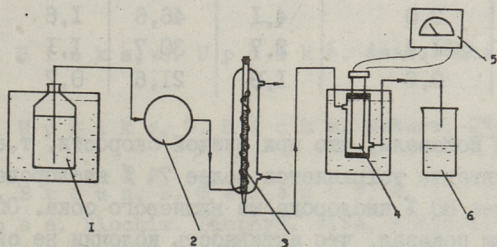
Фиг. 4. Зависимость активности от pH.
1 – свободная глюкозооксидаза,
2 – связанная — " — "

По тем же опытным данным нашли энергию активации, что оказалась равной 6,68 ккал/моль. Энергия активации свободной глюкозооксидазы по литературным данным 9,75 ккал/моль [13].

Зависимость активности от pH. Применяли СГТ 7/10 с активностью 0,28 Е/г без каталазной активности. Активность геля фермента определялась по колоночному способу при 30 °С в атмосфере кислорода. Субстратом служил 3 %-ный раствор глюкозы с разными значениями pH. Для каждого значения pH применяли свежеприготовленную колонку. Так как каталитическая активность колонок была незначительна, то их глюкозооксидазная активность не требовала коррекции.

Для сравнения определяли зависимость активности свободного фермента от pH. Результаты, приведенные на фиг. 4, показывают, что обе формы глюкозооксидазы имеют максимальную активность при pH 5,8, но можно заметить некоторое расширение pH-кривой в случае связанного фермента.

Применимость СГТ для устранения кислорода из соков.



Фиг. 5. Схема опытной установки для устранения кислорода из соков при помощи СГТ.

1 - исходный сок, 2 - перистальтический насос, 3 - колонка с СГТ, 4 - анализатор кислорода, 5 - измерительный прибор, 6 - обработанный сок.

Опыты проводились в колонке размерами 16х70 мм при 30 °С с СГТ активностью 0,2 Е/г. Применялись натуральный яблочный сок с pH 3,6 и вишневый сок с сахаром с pH 3,5. До

применения в колонке соки фильтровали через диатомит. На фиг. 5 приведена схема опытной установки.

Результаты, полученные при устранении кислорода из соков при помощи СГТ, приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Устранение кислорода из соков при помощи связанной глюкозооксидазы

Сок	Скорость мл/мин	Насыщенный O_2		Насыщенный возду- хом	
		остаточный кис- лород		остаточный кисло- род	
		мг/л	%	мг/л	%
Яблочный	Исходный	15,4	200	4,7	100
	2,5	3,1	52,6	2,3	49,0
	1,5	5,4	35,0	1,6	34,0
	0,7	3,7	24,0	1,1	23,4
	Исходный	8,8	100	3,8	100
Вишневый	2,0	4,1	46,6	1,6	42,2
	1,4	2,7	30,7	1,1	29,3
	0,6	1,9	21,6	0,7	18,4
	Исходный	8,8	100	3,8	100

Опыты показали, что при низкой скорости, т.е. при длительном контакте устраняется более 74 % кислорода из яблочного и более 80 % кислорода из вишневого сока. Опыт с вишневым соком показал, что активность колонки не снижается после 9-часовой непрерывной работы.

В ы в о д ы

1. Подходящим носителем для фиксации глюкозооксидазы является полиакриламидный гель с общим содержанием мономеров 10 % и относительным содержанием сшивающего агента не менее 5 %.

2. Фиксирование гелем глюкозооксидазы изменяет значение K_m по глюкозе от 0,027 М на 0,016–0,019 М. K_m по кислороду сдвигается от 0,23 мм на 0,75–1,05 мм.

3. Температурный оптимум гелфермента находится в пределах 40–50 °C. Энергия активации фиксированной гелем глюкозооксидазы равна 6,68 ккал/моль.

4. Оптимум pH свободной и фиксированной глюкозооксидазы совпадает, но кривая pH – активность фиксированного фермента в некоторой степени расширяется.

5. Показана возможность устранения растворенного кислорода из яблочного и вишневого соков при помощи связанной глюкозооксидазы.

Авторы выражают благодарность А. Керстна и А. Корн за проведение части экспериментальной работы.

Л и т е р а т у р а

1. H. Weetall, L. Hersh. Biochim. Biophys. Acta, Enzymol. 206, 54, 1970.

2. W. Hornby, H. Filipusson, A. McDonald. FEBS Letters, 2, 1, 8, 1970.

3. S. Updike, G. Hicks. Science, 158, 3798, 270, 1967.

4. G. Hicks, S. Updike. Anal. Chem., 38, 6, 726, 1966.

5. S. Updike, G. Hicks. Nature, 214, 5092, 986, 1967.

6. G. Broun, E. Selegny, S. Avrameas, D. Thomas. Biochim. Biophys. Acta, Enzymol., 185, 1, 260, 1969.

7. E. Selegny, S. Avrameas, G. Broun, D. Thomas. C. r. Acad. Sci., G266, 19, 1431, 1968.

8. J. Middleton, W. Griffiths. Brit. Med. J., 1, 1525, 1957.

9. J. Middleton. Clin. Chim. Acta, 22, 3, 433, 1968.

10. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. См. наст. сб. стр. II7.

II. К.А. Кивисилла, М.И. Креэн, А.И. Кёстнер. См. наст. сб. стр. I4I.

I2. B. S w o b o d a, V. M a s s e y. J. Biol. Chem., 240, 2209, 1965.

I3. Q. G i b s o n, B. S w o b o d a. V. M a s s e y. J. Biol. Chem., 239, 3927, 1964.

I4. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. Труды ТПИ, серия А, № 300, Таллин, 1971, стр. 21.

M. Kreen, A. Kõstner, K. Kask

Glucose Oxidase Entrapped into
=====

Polyacrylamide Gel
=====

Summary

The highest activity yield of glucose oxidase (0.5) has been obtained using the 10 p.c. gel with 5 p.c. of crosslinks. No changes in temperature dependence and in the pH optimum have been noticed between the free and entrapped forms of glucose oxidase.

However, the K_m value for glucose decreased from 0.027 M to 0.016 - 0.019 M and K_m value for oxygen increased from 0.23 mM to 0.75 - 1.05 mM.

Entrapped glucose oxydase has been successfully used for deoxygenating of juices in laboratory conditions.

УДК 577.15:541.127.2

А.И. Кёстнер

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ I

(Кинетика зерна с однородным распределением ферментативной активности)

В последнее время в энзимологии уделяется все более растущее внимание иммобилизованным ферментам. Этим материалам посвящен ряд обзоров [1-5], в которых подчеркивается их перспективность при проведении биохимических реакций. Однако всесторонняя количественная интерпретация экспериментальных данных по видимой кинетике иммобилизованных ферментов, а также проектирование разных установок для их применения невозможны без количественного описания их кинетики. В настоящем и последующих сообщениях нами сделана попытка создать математические модели подобных материалов.

При создании модели мы основываемся на следующих предположениях: рассматриваются материалы с однородным распределением ферментативной активности в них; рассматриваемые материалы имеют форму сферических гранул; концентрация раствора и условия массопередач не изменяются от точки к точке поверхности зерна.

Концентрация субстрата в таких материалах подчиняется следующему основному дифференциальному уравнению:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left(\frac{d^2 c}{d r^2} + \frac{2}{r} \frac{dc}{dr} \right) - f(c), \quad (I)$$

где c — концентрация субстрата,
 r — расстояние от центра зерна,
 D — коэффициент диффузии субстрата в зерне,
 $f(c)$ — скорость исчезновения субстрата в единице объема.

В первом приближении вводим следующие дополнительные предположения:

1) кинетика фермента в материале соответствует кинетике Михаэлиса - Ментена,

2) зерно рассматривается в стационарных условиях, т.е.
 $\frac{\partial c}{\partial t} = 0$.

Таким образом (1) принимает форму

$$\frac{d^2c}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dc}{dr} = \frac{v_m \cdot c}{D(c + k_m)}, \quad (2)$$

где v_m - скорость исчезновения субстрата при бесконечной концентрации последнего,

k_m - значение константы Михаэлиса иммобилизованного фермента.

В данном сообщении мы дополнительно допускаем, что нам известна концентрация субстрата c_s на самой поверхности зерна, т.е. не рассматривается массопередача от раствора к зерну. При таких предположениях уравнение (2) необходимо решить в граничных условиях:

$$\frac{dc}{dr} = 0 \quad \text{при} \quad r = 0, \quad (3)$$

$$c = c_s \quad \text{при} \quad r = R, \quad (4)$$

где R - радиус зерна.

Можно показать, что уравнение (2) даже в этих простейших граничных условиях не решается, что вызывает необходимость прибегать к цифровым методам.

Очевидно, что практически измеряемая активность A или продуктивность зерна определяется уравнением

$$A = 4\pi R^2 D \left(\frac{dc}{dr} \right)_{r=R}. \quad (5)$$

Активность к единице объема зерна A_E равняется

$$A_E = \frac{A}{\frac{4}{3}\pi R^3} = \frac{3D}{R} \left(\frac{dc}{dr} \right)_{r=R}. \quad (6)$$

Эффективность зерна η определяем как отношение

$$\eta = \frac{A_E}{V_M} = \frac{3D}{R V_M} \left(\frac{dc}{dr} \right)_{r=R} \quad (7)$$

Таким образом, все интересующие нас характерные величины линейны в отношении градиента концентрации субстрата на поверхностном слое зерна.

При решении уравнения (2) удобно ввести понятие безразмерной концентрации $x = \frac{c}{K_M}$ и характеризовать любое зерно безразмерным модулем λ , определяемого аналогично модулю Тиле [6]

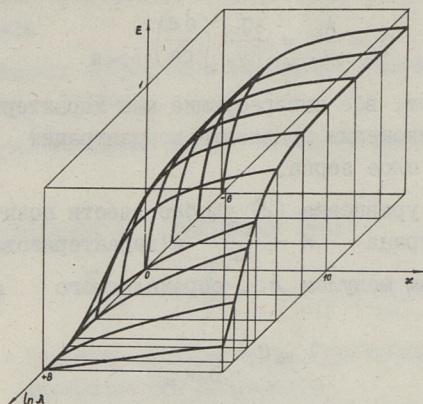
$$\lambda = R^2 \frac{V}{D \cdot K_M} \quad (8)$$

Для полуэмпирической характеристики решений уравнения (2) в первую очередь вычисляли значения эффективности η согласно уравнению (7) для различных значений x и λ . С этой целью составлена программа для решения уравнения (2) методом Рунге - Кутты. Программа составлена на алгоритмическом языке Мэлгол для ЭВМ "Минск-22". На основе полученных многочисленных отдельных решений составлена фиг. I. В приведенной модели кинетика любого зерна описывается линией разреза поверхности c , соответствующей η/x плоскостью. Анализ полученных кривых $\eta = \varphi(x)$ показал несколько неожиданно, что для любых значений λ эта зависимость описывается уравнением двухпараметрического гиперболоида.

$$\eta = \frac{x}{K_r + x} \quad (9)$$

Обозначаем определяемое в эксперименте значение "константы Михаэлиса" зерна K_G . В этом случае K_r соответствует отношению K_G к истинному значению "константы Михаэлиса" K_M иммобилизованного фермента.

Характеризующая зёрна величина K_r зависит от модуля λ . При низких значениях λ величина K_r приближается к единице, т.е. кинетика зерна совпадает с кинетикой находящегося в нем фермента. Так как модуль λ пропорционален квадрату радиуса зерна и активности зерна, то предельное уменьшение радиуса или ферментативной активности позволяет непосредственно измерить действительную кинетику исследуемого материала. С увеличением модуля λ константа K_r увеличивается, что вызывает видимое увеличение "константы Ми-



Фиг. 1. Зависимость активности сферического зерна ферментного геля от концентрации при разных значениях модуля $\lambda = R^2 \frac{V_m}{D \cdot K_m}$.

хаэлиса", ферментативно активного материала. Для всех исследуемых нами значений λ (от 0,001 до 3000) эту зависимость можно в первом приближении характеризовать уравнением прямой

$$K_r = 1,03 + 0,0187\lambda. \quad (10)$$

Коэффициент корреляции при этом составляет 0,999 и остаточная дисперсия 0,22. Более точно та же зависимость описывается полиномом 4 степени (остаточная дисперсия 0,03).

В ы в о д ы

1. На основе цифрового решения дифференциального уравнения кинетики сферического однородного ферментативно-активного зерна в условиях отсутствия сопротивления массопередачи показано, что для любого конкретного вида такого материала его кинетика описывается уравнением типа Михаэлиса-Ментена.

2. Значение "константы Михаэлиса" K_g зависит только от безразмерного модуля $\lambda = R^2 \frac{V_m}{D K_m}$.

3. При малых значениях λ , величина k_r совпадает с действительным значением k_m .

4. Для всех исследованных значений $\lambda \leq 3000$ зависимость $\frac{k_G}{k_M}$ от λ выражается как $k_r = 1,03 + 0,0187 \lambda$. Для низких значений $\lambda \leq 30$ та же зависимость хорошо выражается уравнением

$$k_r = 1,04 + 0,027 \lambda, \quad (II)$$

что дает остаточную дисперсию равную 0,013.

Л и т е р а т у р а

1. J.H. Silman, E. Katchalsky. Ann.Rev. Bioch., 35 II, 873, 1966.
2. L. Goldstein. E. Katchalsky. J. Anal. Chem., 243, 375, 1968.
3. A.S. Lindsay. J. Macromol. Sci., C3, 1, 1969.
4. J. Gryszkiewicz. Folia Biologica, 19, 119, 1971.
5. G.J.H. Melrose. Rev. Pure and Appl. Chem., 21, June, 83, 1971.
6. E.W. Thiele. Ind. Eng. Chem., 31, 916, 1939.
7. J.D.A. Murray. Math. Biosci., 2, 379, 1968.
8. G.R. Gavalas. Nonlinear Differential Equations of Chemical Reaction Tracts, Springer, 1968.
9. H.B. Keller. Numerical Methods for Two Point Boundary Value Problems, Blaisdell Publ. Co., Mass., Toronto, 1968.

A. Köstner

Mathematic Models of Kinetics of Immobilized Enzymes

I. The Kinetics of a Microsphere with

Homogenous Enzymatic Activity

Summary

The kinetics of spherical particles without mass transfer resistance under stationary conditions has been considered. For the Michaelis-Menten kinetics the main differential equation can not be solved analytically. A program for Minsk-22 computer has been compiled to solve the main equation numerically. Materials, mentioned above can be characterized by means of the modulus $\lambda = R^2 \frac{V_m}{D \cdot K_m}$.

For each λ the numerical solutions fit the Michaelis-Menten equation, but the apparent K_m increases almost linearly with the increase of λ .

УДК 577.15:541.127.2

Э.Х. Сиймер, А.И. Кёстнер

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ II

(Кинетика установок с ферментным гелем
с учетом массопередачи)

В нашем предыдущем сообщении [I] рассматривалась кинетика зерна ферментативного активного геля.

Практическое применение сферических гранул для проведения ферментативных реакций возможно в установках периодического или непрерывного действия. В первом случае можно применять реакторы, заполненные суспензией сферических зерен ферментативно активного геля в растворе субстрата. После окончания реакций гель отделяется фильтрацией или центрифугированием и может быть снова применен для проведения процесса. Типичной непрерывной установкой является колонка, заполненная гелем, через который непрерывно пропускается раствор субстрата. В обоих случаях реакционная смесь представляет собой двухфазную систему, содержащую определенное количество зерен ферментативного геля. Кинетика ферментативных реакций в обоих случаях определяется, с одной стороны, кинетикой зерна и, с другой стороны, скоростью массообмена.

Рассмотрим выражения этих скоростей в единице объема установки.

Приводим следующие обозначения:

- C — концентрация субстрата в растворе,
- C_s — концентрация субстрата на поверхности зерна,
- β — коэффициент массопередачи,
- F — поверхность фазового контакта в единице объема установки,

E — активность ферментного геля,
 K_r — видимое значение константы Михаэлиса для зерна,
 α — степень заполнения (соотношение объема геля к общему объему).

Скорость массопередачи v_1 пропорциональна разнице концентрации субстрата в растворе и на поверхности зерна:

$$v_1 = \beta \cdot F \cdot (c - c_s). \quad (1)$$

Скорость ферментативной реакции в зерне v_2 , как показано в (1), выражается формулой, близкой формуле Михаэлиса-Ментена:

$$v_2 = \frac{E \cdot c_s \cdot \alpha}{K_r + c_s}. \quad (2)$$

В случае стационарности $v_1 = v_2$. Когда сферические зерна имеют гармонический средний радиус R , то

$$F = 3 \cdot \frac{\alpha}{R}. \quad (3)$$

Вводя величину $\varkappa$, имеющую размерность концентрации

$$\varkappa = \frac{E \cdot R}{3\beta}, \quad (4)$$

можно из равенства (формулы (1) и (2)) $v_1 = v_2$ найти выражение для c_s :

$$c_s = \frac{1}{2} \left[(c - \varkappa - K_r) + \sqrt{(c - \varkappa - K_r)^2 + 4c \cdot K_r} \right]. \quad (5)$$

Поскольку при работе установки со связанными ферментами концентрация субстрата непрерывно изменяется, для определения кинетики установки, т.е. зависимости между временем контакта и концентрацией субстрата (или продуктов реакции) надо найти удобное для интегрирования уравнение.

Вводя некоторые упрощения, можно показать, что время контакта τ зависит от концентрации субстрата следующим образом (начальная и конечная концентрации субстрата выражены через c_0 и c_L):

$$\tau = \frac{\alpha \cdot R}{(1 - \alpha) \cdot 3\beta} \int_{c_0}^{c_L} \frac{dc}{c - c_s}, \quad (6)$$

где c_s — выражается формулой (5).

Так как уравнение (6) аналитически не интегрируется, нами составлена программа для ЭВМ "Минск-22" и найдены цифровые решения уравнения при различных режимах установки. Интегрирование проводится вычислителем при помощи стандартной процедуры SIMPSON, итеративно изменяя C_1 до достижения заданного значения τ .

По результатам вычислений можно охарактеризовать два предельного случая:

1) при работе с интенсивной массопередачей (субстрат низкой молекулярной массы, повышенная температура, большая удельная поверхность зерен) и с гелем низкой активности скорость реакции лимитируется скоростью ферментативной реакции в геле, так как C_s приближается к C . В этом случае эффективность фермента приближается к единице и скорость реакции пропорциональна действительной активности геля.

Данному режиму подчиняются системы с $\frac{x_c}{C} < 0,1$.

2) при работе с гелем высокой активностью и низкой скоростью массопередачи величина C_s приближается к нулю и скорость реакции лимитируется скоростью массообмена. В этом случае скорость реакции практически не зависит от активности геля, так как последний работает с малым к.п.д.

Данный режим соблюдается при $\frac{x_c}{C} > 10$, если соотношение $\frac{K_r}{C}$ меньше 1.

В практической работе на установках со связанным ферментом, конечно, имеется некоторый промежуточный режим. Придется, однако, отметить, что использование связанных ферментов является более перспективным для субстратов умеренной молекулярной массы, так как диффузия молекул больших размеров затруднена.

Проведенные нами опыты по инверсии сахарозы показали, что экспериментальные и расчетные данные в общем сравнимы. Однако применение цифровых решений уравнения (6) неудобно, так как значения многих параметров точно не определяемы и нужно иметь очень большое количество цифровых решений.

Более удобным для интерпретации экспериментальных данных кажется путь создания полуэмпирической модели кинетики. С этой целью попробуем представить подынтегральную

функцию в эмпирической, удобно интегрируемой форме, применяя в качестве переменных безразмерные величины $\frac{K_r}{C}$ и $\frac{x}{C}$.

Уравнение (6) можно преобразовать в вид

$$\tau = \frac{\alpha}{(1-\alpha) \cdot E} \int_{c_0}^{c_L} \frac{x}{C - c_s} dc. \quad (7)$$

Из ряда возможных эмпирических формул для подынтегральной функции уравнения (7), найденных на ЭВМ при помощи специальной программы, представим одну довольно простую, гарантирующую вычисление времени контакта с погрешностью не более 5 %, если $\frac{x}{C} > 1$:

$$\frac{x}{C - c_s} = 0,1906 + 1,1772 \frac{K_r}{C} + \frac{x}{C}. \quad (8)$$

Интегрированием уравнения (7) получаем в этом случае:

$$\tau = \frac{\alpha}{(1-\alpha) \cdot E} \left[0,1906 (c_L - c_0) + (1,1772 K_r + x) \ln \frac{c_0}{c_L} \right]. \quad (9)$$

Для $\frac{x}{C} \leq 1$ аналогичное уравнение имеет более сложный вид.

При помощи эмпирических формул возможно на ЭВМ быстро вычислять зависимости между τ и C . С другой стороны, сопоставляя экспериментальные данные с вычисленными цифровыми решениями, окажется возможным найти реально существующие параметры K_r и x и тем самым количественно оценить влияние массообмена на кинетику связанных в гель ферментов.

В ы в о д ы

1. Разработана математическая модель кинетики ферментативно активного геля в установках, заполненных с сферическими гранулами ферментного геля.

2. Показано влияние скорости ферментативной реакции и скорости массопередачи на общую кинетику установок с ферментами пролонгированного действия. При значениях $\frac{x}{C} < 0,1$ скорость реакции лимитируется скоростью ферментативной реакции в зернах, при $\frac{x}{C} > 10$ — скоростью массообмена.

3. Приведена эмпирическая формула в качестве решения основного дифференциального уравнения.

Л и т е р а т у р а

I. А.И. Кёстнер. См. наст.сборник, стр. 157.

1. В.А. Кроссман, Н.Р. Вольдра. О содер-
жении воды в жидк.сольной смеси 3
2. В.А. Кроссман, Н.А. Каск. Активность
протектических ферментов Е. Siimer, A. Köstner 3
3. В.А. Кроссман, Н.А. Каск. Ускорение
Mathematic Models of Kinetics of Immobilized Enzymes 15
===== 15
II. The Kinetics of Devices with Entrapped Enzymes
===== 21
Considering Mass Transfer 21
===== 21

Summary

The kinetics of spherical particles with enzymatic activity considering mass transfer resistance has been modelled by means of numerical integration of the equation for steady-state conditions. From the numerical solutions an approximate equation has been derived as a model for the kinetics of above-mentioned systems.

Содержание

	Стр.
1. В.А. Кросинг, И.Р. Велд্রে. О содержании жира в мясе балтийской кильки	3
2. В.А. Кросинг, К.А. Каск. Активность протеолитических ферментов балтийской кильки .	9
3. В.А. Кросинг, К.А. Каск. Ускорение созревания пресервов из балтийской кильки I .	15
4. В.А. Кросинг, К.А. Каск, А.Г. Канн. Ускорение созревания пресервов из балтийской кильки II.	21
5. А.Э. Эрин, Ю.М. Канн, К.А. Каск. Использование препаратов инвертазы при приготовлении помадных конфет.	29
6. Х.Я. Киппер. Термическая обработка ягодных вин.	41
7. К.А. Каск, Р.Э. Трейманн, Т.Л. Лиеберт. О питательной ценности хлебобулочных изделий.	51
8. Т.Л. Лиеберт. Влияние добавки сыворотки и биопрепарата на свойства теста и хлеба . . .	59
9. А.Г. Канн, Т.Л. Лиеберт, К.К. Рая. Получение биопрепарата культивированием гриба <i>Asp. oryzae</i> на молочной сыворотке.	65
10. А.Г. Канн, К.К. Рая. Влияние некоторых добавок на синтез амилалитических и протеолитических ферментов при выращивании <i>Asp. oryzae</i> 3-9-15 на молочной сыворотке.	77
11. К.Э. Паппель, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. Характеристика ферментативного комплекса биопрепарата.	89
12. К.Э. Паппель, А.И. Кёстнер, К.А. Каск. Концентрирование биопрепарата вымыванием.	95

13. Ю.М. Канн, О.В. Таутс, А.А. Суур-
тхаль, М.А. Хунт. О содержании ни-
тритов в мясных товарах и возможности окра-
шивания мясного фарша. I03
14. Ю.М. Канн, К.А. Каск, О.В. Таутс,
К.К. Рая. Об определении нитрозаминов в пи-
щевых продуктах. I09
15. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А.Каск
Кинетика фиксированной полиакриламидным гелем
инвертазы. II7
16. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А.Каск.
Применение связанной инвертазы для гидролиза
сахарозы. I3I
17. К.А. Кивисилла, М.И. Креэн, А.И.
Кёстнер. Фотоинаktivация инвертазы рибо-
флавином. I4I
18. М.И. Креэн, А.И. Кёстнер, К.А.Каск
Глюкозооксидаза фиксированная в полиакриламид-
ный гель. I47
19. А.И. Кёстнер. Математическое моделирова-
ние кинетики иммобилизованных ферментов I (Ки-
нетика зерна с однородным распределением фер-
ментативной активности). I57
20. Э.Х. Сиймер, А.И. Кёстнер. Матема-
тическое моделирование кинетики иммобилизован-
ных ферментов II. (Кинетика установок с фермен-
тным гелем с учетом массопередачи). I63

СБОРНИК СТАТЕЙ ПО ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ XXXI
(Технология пищевых производств III)

Таллинский политехнический институт. Редактор А.К а н н.

Техн. редактор Г. Г р и ш и н а.

Сборник утвержден коллегией Т р у д о в ТПИ 17/У 1973.

Подписано к печати 11/У1 1973. Бумага 60х90/16. Печ.л. 10,75+прилож.0,75.
Учетно-изд. л. 8,62. Тираж 350. МВ-06626. Зак. №364. Ротапринт ТПИ,
Таллин, ул. Коскла, 2/9. Ц е н а 86 коп .

Цена 86 коп.