

p.6.7
688

688

ISSN 0136-3549
0320-3395

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI

TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО
ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

TRANSACTIONS OF TALLINN
TECHNICAL UNIVERSITY

ПРИКЛАДНЫЕ
БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ
ПРОЦЕССЫ

TALLINN 1989

688

ALUSTATUD 1937

**TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI
TOIMETISED**

**TRANSACTIONS OF TALLINN
TECHNICAL UNIVERSITY**

**ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО
ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**

УДК 577.15:66.097.3

**ПРИКЛАДНЫЕ
БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ
ПРОЦЕССЫ**

Биотехнология 1У

Под общей редакцией А.И. Кёстнера

TALLINN 1989

ТАЛЛИНСКИЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Труды ТТУ № 688

ПРИКЛАДНЫЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Биотехнология 1У

На русском языке

Редактор М. Миккал

Техн. редактор В. Ранник

Сборник утвержден коллегией Трудов ТТУ 04.04.89

Подписано к печати 30.10.89

МВ-05483

Формат 60х90/16

Печ. л. 7,0 + 0,5 приложение

Уч.-изд. л. 5,8

Тираж 300

Зак., № 586

Цена 1 руб. 20 коп.

Таллиннский технический университет,

200108 Таллинн, Академия тез, 1

Ротапринт ТТУ, 200008 Таллинн, ул. Коскла, 2/9



Таллиннский технический университет, 1989

А.И. Кёстнер, Л.А. Лихфельд, К.Ю. Куузику

УЗКОНАПРАВЛЕННАЯ МИКРОКОМПЬЮТЕРНАЯ СИСТЕМА ПОИСКА
ЛИТЕРАТУРЫ ПО ЦИКЛОДЕКСТРИНАМ

При организации научно-исследовательских и технологических работ всегда имеется необходимость проведения ретроспективного поиска информации по данному вопросу. Для создания конкретных решений, в частности, при разработке описаний изобретений требуется оперативный подбор литературы по конкретным аспектам проблемы, что невозможно с помощью общих информационных систем.

Для решения задачи оперативного узконаправленного поиска литературы нами разработана система, которая включает поиск информации с помощью обычных методов: сохранение и описание рефератов источников на бумажных носителях, применение специализированного кода для описания содержания статей и изобретений, механизированный поиск источников по этому же коду. Подобная система для инженерной энзимологии с применением просветных перфокарт описана нами ранее [1, 2].

В настоящее время единственным разумным подходом для хранения и поиска информации является применение вычислительной техники. Применение ЭВМ, однако, не устраняет целесообразности предварительной проработки и кодирования содержания первоисточников. Хранение информации в кодированном виде значительно облегчает поиск и резко сокращает необходимый объем памяти и расход труда оператора при вводе информации. Узконаправленные системы поиска информации следует создать и эксплуатировать непосредственно в научно-исследовательских лабораториях с применением персональных ЭВМ.

Задачей предпринятой нами работы было создание и внедрение такой системы на базе широко распространенных

персональных ЭВМ с операционной системой СР/М. Конкретное направление исследований, для обеспечения которых данная система создана, посвящено получению и применению циклодекстринов (ЦД). Эти своеобразные крахмалопродукты получают биотехнологическим способом и они находят широкое применение в медицине, промышленности и аналитике [3-5].

Принципы создания кода

При составлении кода целесообразно соблюдать ортогонально-иерархическую структуру системы и по возможности соблюдать мнемонические подходы при формулировке кодовых символов. Разумную структуру кода можно создать только представляя структурированно основные задачи научного направления, что в данном случае заключается в следующем.

Циклодекстрины (ЦД) являются своеобразными кольцеобразными молекулами, которые могут быть применены по принципу образования комплексов "хозяин-гость". Роль хозяина играют три вида ЦД (α , β и γ) и их производные. Наиболее часто встречаются работы, посвященные β -ЦД, который представляет собой семичленную молекулу (циклогептаамилозу). Кроме простейших представителей каждого из трех рядов ЦД широко известны их химически модифицированные производные, которые часто существенно отличаются от предшественника. Номенклатура возможных "молекул-гостей" (МГ) очень широка и число ожидаемых МГ практически неограничено.

ЦД получают из крахмала под действием специфического фермента циклодекстрингликозилтрансферазы (ЦДТ-азы), который в настоящее время коммерчески недоступен и должен быть получен на месте производства ЦД с помощью микробиологического синтеза некоторых специфических штаммов - продуцентов.

В случае образования комплексов физические и химические свойства МГ существенно меняются, спектр изменяющихся свойств довольно широкий.

ЦД как вещества и, чаще всего, комплексы ЦД с МГ находят широкое применение в практической деятельности человека. Сфера применения постоянно расширяется и связана с результатами научно-исследовательской работы.

На основе вышеизложенной общей картины исследований была сформулирована основная структура кода, которая соответствует требованию ортогональности и приведена в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Основные аспекты научных исследований по
циклодекстринам

Обозначение аспекта	С о д е р ж а н и е
A	Особые виды источников
B	Микробы, продуценты ЦТТ-азы, условия их выращивания
C	Энзимология, получение и свойства ЦТТ-азы
D	Технология конверсии крахмала в ЦД
E	Анализ, исследование свойств и структура ЦД
F	Применение ЦД
G	Особые виды и производные ЦД
H	Процесс комплексообразования, виды молекул-гостей

Т а б л и ц а 2

Примеры уточненных кодов

Код	С о д е р ж а н и е
ж /У	Общие вопросы данного аспекта
A/М	Монография
A/б	Диссертация
B/В	Бациллы
B/В _I	<i>Bacillus macerans</i>
C/Е	Энзиматические свойства ЦТТ-азы
C/ЕК	Кинетика ЦТТ-азы
D/Т	Подготовка сырья при синтезе ЦД
E/М	Молекулярная структура ЦД
F/Т	Применение ЦД в пищевой промышленности
F/М	Применение в медицине
G/А	Ацилированные ЦД
G/а	Альфа-ЦД
H/А	Комплексы с алифатическими соединениями

Для каждого аспекта составлен список уточнений, который в ходе работы пополняется. Уточнение соединяется с ко-

дом основного аспекта через знак "/". Как правило, за исключением Ж/У, код уточнения действителен только внутри данного аспекта. Примеры уточненных кодов приведены в таблице 2. В настоящее время применяется 40 устойчивых кодов.

При кодировании содержание статьи может быть отражено с одним или несколькими уточненными кодами. В качестве примера приводим следующий кодированный реферат: А/б С/ЕК С/а Н/У, который имеет следующее содержание: диссертация, посвященная кинетике образования альфа-циклодекстрина и общим проблемам комплексообразования.

Структура и реализация системы на персональной ЭВМ

Система составлена для ПЭВМ, которые применяют операционную систему CP/M. В конкретном случае система реализована на ПЭВМ Аппле-II, но может быть перенесена на другие аналогичные системы.

Из системных программ применяются интерпретатор MBASIC, программы для компилирования на языке Бейсик и текстовый редактор Wordstar. Программы для поиска информации составлены нами на языке Бейсик, для ускорения работы они применяются в компилированном виде. Для решения разнообразных задач поиска целесообразно применять несколько отдельных программ для обработки созданных файлов данных.

В систему информационных файлов входят следующие:

- 1) подсобные, которые содержат список основных файлов и информацию о системе в целом,
- 2) основные, которые содержат всю введенную информацию,
- 3) выборные, которые содержат часть информации файлов типа 2 в более компактной форме.

Файлы типов 1 и 2 создаются оператором с помощью текстового редактора, файлы типа 3 образуются программно в соответствии с запросом оператора.

Основные файлы информации составлены в порядке поступления информации и для каждой ссылки выделены 4 строки (см.

таблицу 3). Патентная информация хранится отдельно, притом структура записей слегка различается.

Основная работа с поступающей информацией заключается в следующем:

1) По подсобному файлу первых авторов проверяется возможное наличие поступающей информации. В случае наличия данного источника проверяется необходимость пополнения описания данной ссылки в основном файле. В случае отсутствия источника ему присваивается номер и ссылка вносится в конец последнего основного файла.

2) Первичная обработка файлов заключается в проверке правильной последовательности строк в основном файле и создания сжатого файла первых авторов для последующей проверки наличия источника.

Т а б л и ц а 3

Организация информации в основных файлах

Нр.	Признак	Содержание строки
1	#	номер ссылки !! авторы с инициалами (наличие неупомянутых авторов)
2	\$	международный код журнала; том, страница, год издания
2 *	\$	код страны, номер патента
3	%	код реферативного журнала; номер реферата, год издания (то же для другого РЖ)
4	*	коды содержания

3) Поиск информации из основных файлов по запросу. Запрос определяют по проверке в определенных строках одновременного наличия последовательностей байтов (стрингов). Стринги для поиска могут представлять собой коды содержания разной иерархической определенности, фамилии авторов, коды журналов и год издания. Возможны разные логические комбинации проверяемых стрингов. Выход информации осуществляется на печатном устройстве или в виде создания специализированных файлов, которые могут быть подвергнуты последующему анализу.

Применение системы

Исходный поиск литературы по данной тематике проведен на основе реферативных журналов (Chemical Abstracts, выпуски реферативного журнала "Химия") с более-менее полным охватом литературы со времени открытия ЦД в 1891 г. В каждый основной файл вносится около 200 описаний. К настоящему времени в основные файлы внесено 1800 ссылок на публикации и 600 ссылок на патенты, что составляет всего 0,5 килобайтов. Система принята к текущей эксплуатации. Содержание основных файлов пополняется, и программы для поиска усовершенствуются.

Л и т е р а т у р а

1. К ё с т н е р А.И. Система кодирования библиографических данных по ферментам на картах с краевой перфорацией // ВИНТИ; Сб. Научно-техн. инф. Серия I. № 5. 1967.

2. К ё с т н е р А.И., На х а п е т я н Л.А., Т е н н о Р.О. Система документации и поиска информации по иммобилизованным ферментам // Микробиол. пром-сть № I. 1979.

3. S z e j t l i J. Cyclodextrines and their inclusion complexes // Budapest: Akadémiai Kiado, 1989. 296 p.

4. Реферативный журнал: Физико-химическая биология и биотехнология 26Г. Биохимия, ВИНТИ.

5. Реферативный журнал: Химия. I9P. Химия и технология пищевых продуктов, поверхностно-активных материалов и душистых веществ, ВИНТИ.

A. Köstner, L. Lichfeld, K. Kuusiku

Temaatiline tsüklodekstriinide-alase teadusinfo
otsing mikroarvuti abil

Kokkuvõte

Teadusuuringuteks, eriti leiutustaotluste vormistamisel on vajalik antud teemat käsitlev põhjalik retrospektiivne infootsing ja selle läbitöötamine. Autorid on välja töötanud meetodika teaduslike algallikate kirjeldamiseks ja kodeerimiseks ning hilisemaks infootsinguks personaalarvuti abil.

Käesoleva töö ülesandeks oli infosüsteemi loomine ja juurutamine personaalarvutil, kasutades CP/M operatsioonisüsteemi. Kirjeldatavad teaduslikud publikatsioonid käsitlevad orgaaniliste ühendite - tsüklodekstriinide - saamist biotehnoloogilisel meetodil ja nende kasutamist meditsiinis, tööstuses, analüütikas.

A. Köstner, L. Lichfeld, K. Kuusiku

Computerized Information Search Concerning
Cyclodextrins

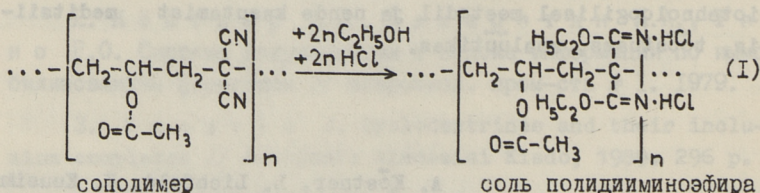
Abstract

In scientific research, especially in the patent investigation, a thorough information search and processing are needed. The authors have elaborated a method for describing and coding scientific information, and for further information search using a personal computer.

The aim was to create and apply an information system on a personal computer using the CP/M operation system. The scientific papers dealt with concern the production of organic compounds - cyclodextrins and their application in medicine, industry and analytics.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ХИМОТРИПСИНА НА ПОЛИДИИМИНОЭФИРЕ

Метиленмалондинитрил ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CN})_2$) образует с винилацетатом ($\text{CH}_3\text{COOCH}=\text{CH}_2$) сополимер, который применяется в виде пряжи с фирменным названием "дарван" [1]. Названный сополимер может быть переведен в форму соли полидидиминоэфира путем воздействия этилового спирта и сухого хлористого водорода в среде диоксана по синтезу Пиннера [2, 3]:

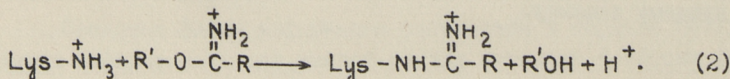


сополимер
метиленмалондинитрила с
винилацетатом

соль полидидиминоэфира

Модификация ферментов путем введения углеводных остатков, амидинирование, гуанидирование, как правило, увеличивает стабильность ферментов. Наиболее сильное влияние на стабильность оказывает модификация, связанная с изменением заряда функциональных групп. Кроме того, следует избегать модификации внутренних групп (Ш типа) фермента, используя для модификации как можно более мягкие условия (низкие температуры, минимальные концентрации органических добавок), высокой степени модификации и введения в фермент слишком объемных гидрофобных остатков [4].

При амидинировании остатков лизина сохраняются их положительные заряды:



При амидинировании лизина с помощью иминоэфиров в белок вводятся аргининоподобные группы, и рК остатков лизина после модификации увеличивается с 10,5 до 12,5. Таким образом, амидинирование белков, полностью сохраняющее их физико-химические свойства, может быть простым и удобным общим методом их стабилизации. Механизм стабилизации состоит, по-видимому, в том, что аргининоподобные остатки имеют большую, чем лизин гидрофильность, что уменьшает возможность нахождения их внутри гидрофобного ядра молекулы по сравнению с лизином. Аргининоподобные остатки увеличивают жесткость белковой глобулы, и, имея большее, чем лизин значение рК, образуют более прочные солевые связи в белке [4].

Химотрипсин (мол. масса 25 300, оптимальная каталитическая активность при pH 7,5-8,0, $pI=9$) содержит ϵ -аминогруппы лизина-36 В-цепи.

Материалы и методы

Активирование сополимера метиленмалонодинитрила винилацетатом. Исходным материалом служили волокна "дарвана", предоставленные ПО "Мистра" ЭССР. Активирование сополимера метиленмалонодинитрила винилацетатом проводили по методике получения иминоэфирного производного полиакрилонитрила [2, 3]. В результате активирования цианогруппы были переведены в иминоэфирные ($-C(=NH)-OC_2H_5$) группы.

У активированного сополимера метиленмалонодинитрила винилацетатом наблюдались в ИК-спектре при 1600-1700 cm^{-1} полосы иминогрупп ($>C=NH$).

Активированный нами сополимер метиленмалонодинитрила с винилацетатом содержит $1,6 \cdot 10^{-4}$ экв/г иминогрупп, способных реагировать с аминокруппами белков.

Определение иминогрупп активированного сополимера. Иминогруппы определяли по бисульфитному методу (модифицированный метод Гиллебранда и Пенца), основанному на гидролизе имина и определении его карбонильной составляющей в форме аддукта с бисульфитом [5].

Иммобилизация химотрипсина. Объектом иммобилизации служил химотрипсин (Е.С. 3.4.21.1), марка Б, ТУ 6-09-10-1150-76. Условия иммобилизации фермента на активированном сополимере выбраны по нашим предыдущим работам [6, 7]: темп. 5 °С, рН 9,5 (0,2 М боратный буфер), продолжительность иммобилизации – 1 час. К 25 мл раствора химотрипсина (4 мг/мл) добавляли 0,5 г активированного сополимера. Через 60 минут носитель отделяли фильтрованием и промывали два раза 50 мл 0,2 М боратного буфера (рН 9,5).

Определение рабочей стабильности иммобилизованного химотрипсина. Иммобилизованный препарат химотрипсина промывали 2%-ным раствором казеина (3X30 мл), рН 8,5, в течение 1 часа при температуре 30 °С. По остаточной активности после промывки препаратов раствором казеина оценивали рабочую стабильность.

Результаты и обсуждение

Активность иммобилизованного препарата химотрипсина составляла 2,8 мккат по казеину на 1 г сухого активированного сополимера. Для иммобилизации брали 6,0 мккат единиц активности химотрипсина. Таким образом, получен активный препарат иммобилизованного химотрипсина с коэффициентом сохранения активности 47 %. Полученный нами препарат иммобилизованного химотрипсина хранился в виде водной суспензии при температуре 4 °С и сохранял активность более 1,5 месяцев. Данные о сохранении активности иммобилизованного с помощью активированного сополимера препарата химотрипсина приведены на рисунке 1.

Рабочую стабильность иммобилизованного с помощью активированного сополимера химотрипсина оценивали по остаточной активности после промывки препаратов 2%-ным раствором казеина. По данным рисунка 2 после первого промывания иммобилизованного препарата химотрипсина 2%-ным раствором казеина (30 мл) активность уменьшается на 40 %. При дальнейших промываниях активность иммобилизованного препарата остается постоянной, достигая приблизительно 50 % от исходной активности.

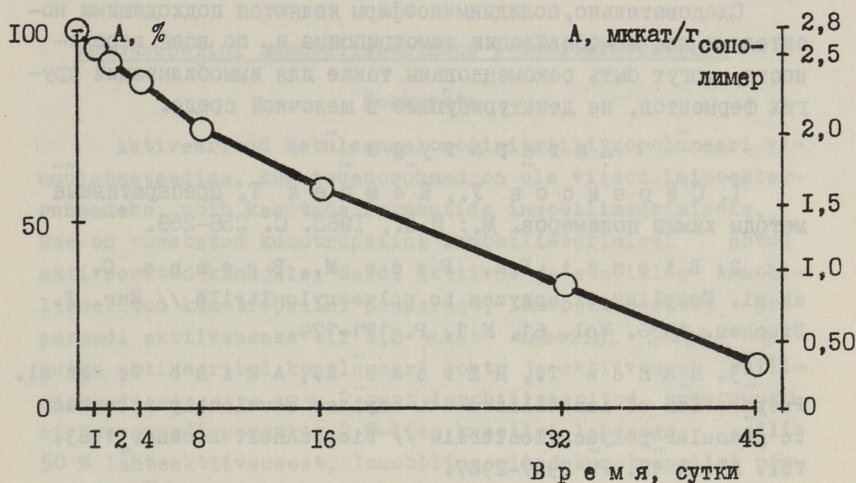


Рис. 1. Стабильность при хранении иммобилизованного с помощью активированного сополимера метиленамалодинитрила винилацетатом химотрипсина при температуре 4 °С. Исходная активность иммобилизованного препарата 2,8 мккат (по казеину) на грамм сухого активированного сополимера.

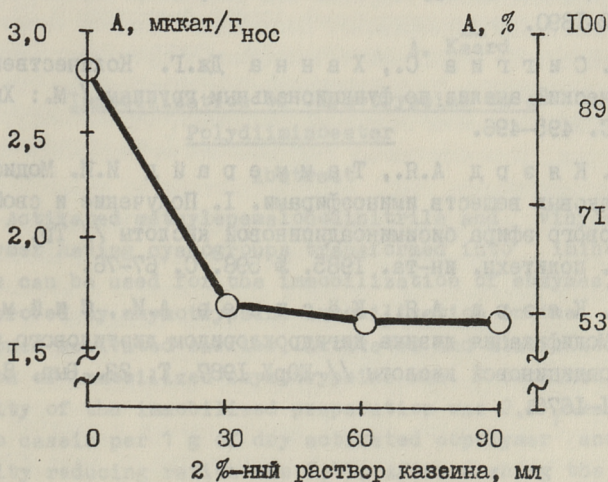


Рис. 2. Рабочая стабильность химотрипсина, иммобилизованного с помощью активированного сополимера метиленамалодинитрила винилацетатом. Промывание иммобилизованного препарата 2%-ным раствором казеина, pH 8,5 в течение 1 часа при температуре 30 °С.

Следовательно, полидиминоэфиры являются подходящими носителями для иммобилизации химотрипсина и, по всей вероятности, могут быть рекомендованы также для иммобилизации других ферментов, не денатурирующие в щелочной среде.

Л и т е р а т у р а

1. С ё р е н с о н У., К е м п е л Т. Препаративные методы химии полимеров. М.: ИЛ., 1963. С. 258-259.

2. B i o n d i P.A., P a c e M., B r e n n a O. et al. Coupling of enzymes to polyacrylonitrile // Eur. J. Biochem. 1976. Vol. 61, N 1. P. 171-174.

3. H a n d a T., H i r o s e A., A k i n o T. et al. Preparation of immobilized α -amylase covalently attached to granular polyacrylonitrile // Biotechnol. Bioeng. 1983. Vol. 25, N 12. P. 2957-2967.

4. К у т у з о в а Г.Д., У г а р о в а Н.Н., Б е р е з и н И.В. Общие закономерности изменения термостабильности белков и ферментов после химической модификации их функциональных групп // Усп. химии, 1984. Т. 53. Вып. II. С. 1852-1890.

5. С и г г и а С., Х а н н а Дж.Г. Количественный органический анализ по функциональным группам / М.: Химия, 1983. С. 495-496.

6. К я э р д А.Я., Т а м м е р а й д И.И. Модификация белковых веществ иминоэфирами. I. Получение и свойства диэтилового эфира бисиминадипиновой кислоты // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1985. № 598. С. 67-76.

7. К я э р д А.Я., К ё с т н е р А.И., С и й м е р Э.Х. Модификация лизина дигидрохлоридом диэтилового эфира дииминоадипиновой кислоты // ЖОрХ 1987. Т. 23. Вып. 8. С. 1671-1676.

Kümotrüpsiini immobiliseerimine polüdiiminoestrile

Kokkuvõte

Aktiveeritud metüleenmalonodinitriili kopolümeeri viinülatsetaadiga, kus tsüanorühmad on üle viidud iminoester-rühmadeks, võib kasutada fermentide immobiliseerimiseks. See on tõestatud kümotrüpsiini immobiliseerimisel antud aktiveeritud kandjale. Saadi aktiivne ja stabiilne immobiliseeritud kümotrüpsiini preparaas. Immobiliseeritud preparaadi aktiivsuseks oli 2,8 μ kat kaseiini järgi 1 g kuiva aktiveeritud kopolümeeri kohta ja aktiivsuse säilimiskoeffitsiendiks 47 %. Pärast immobiliseeritud kümotrüpsiini preparaadi pesemist 2 %-lise kaseiini lahusega säilis 50 % lähteaktiivsusest. Immobiliseeritud kümotrüpsiini preparaas säilitab oma aktiivsuse vesisuspensioonina temperatuuril 4 °C enam kui 1,5 kuu jooksul.

A. Kaard

Immobilization of Chymotrypsine on a
Polydiiminoester

Abstract

Activated methylenemalonodinitrile and vinylacetate copolymer having cyanogroups transformed into iminoester-groups can be used for the immobilization of enzymes. It has been proved by chymotrypsine immobilization on the above-mentioned activated carrier. Activated and stabilized preparation of immobilized chymotrypsine was obtained. The activity of the immobilized preparation was 2,8 μ kat according to casein per 1 g of dry activated copolymer and the activity reducing ration was 0,47. After washing the preparation of immobilized chymotrypsine with the 2 % solution of casein, 50 % of the initial activity remained. The preparation of immobilized chymotrypsine as a water-suspension retains its activity at the temperature of 4 °C for more than 1,5 months.

Г.Г. Калбин, Я.Я. Лаукевиц⁺

+ Институт микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латв. ССР, г. Рига

ИНВЕРСИЯ САХАРОЗЫ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ДРОЖЖЕЙ

Продукт гидролиза сахарозы - инвертный сироп - находит применение как полуфабрикат в кондитерской и консервной промышленности и в производстве безалкогольных напитков. Существуют три технологии гидролиза сахарозы [1]: кислотный гидролиз в присутствии соляной (молочной, лимонной) кислоты, последовательная обработка раствора катионитами и анионитами и ферментативный гидролиз под действием фермента β -фруктофуранозидазы (инвертазы). Последний процесс имеет ряд преимуществ по сравнению с кислотным гидролизом: во-первых, при использовании ферментов в сиропе отсутствуют побочные продукты разложения сахарозы, например, оксиметилфурфурол, во-вторых, ферментативный гидролиз легче поддается контролю, автоматизации.

Для замены альтернативных технологий биокаталитическим процессом катализатор должен характеризоваться высокой инвертазной активностью, хорошей операционной стабильностью при высоких температуре и концентрации сахарозы и низкой стоимостью. Такой катализатор может быть получен иммобилизацией дрожжевых клеток, содержащих инвертазу [2].

Нами разработан способ иммобилизации и получен новый биокатализатор с инвертазной активностью на базе иммобилизованных в геле целых дрожжевых клеток. Целью данной работы явилось исследование свойств полученного катализатора и оценка его технологической применимости.

Материалы и методы

Для иммобилизации были использованы дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (паса Р21, выделенная в институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латв.ССР). Дрожжевые клетки включали в структуру ионотропных гелей кислого полисахарида аналогично иммобилизации в альгинатные гели.

Биокатализатор представляет собой гранулированный материал с частицами сферической или неправильной формы. Размер частиц можно регулировать условиями формования геля; механические свойства гелевых частиц не уступают свойствам катализаторов, полученных на базе альгинатных гелей; среднее содержание сухих веществ во влажном катализаторе — около 20 %.

Инвертазная активность биокатализатора определялась по скорости накопления редуцирующих веществ при гидролизе сахарозы в реакторе перемешивания. Стандартными условиями определения ферментативной активности были: исходная концентрация сахарозы 7 % (0,2 моль/л), температура +30 °C, pH 4,8 (0,05 М ацетатный буфер). Редуцирующие вещества — моносахариды — определяли комплексометрически по восстановлению меди (II); за единицу ферментативной активности принято количество биокатализатора, вызывающее гидролиз I микромоля сахарозы за I минуту.

Содержание оксиметилфурфурола (ОМФ) определяли согласно [3] прямым спектрофотометрированием сиропа при 283 нм после разбавления дистиллированной водой.

Результаты и обсуждение

С целью выявления зависимости ферментативной активности частиц биокатализатора от их диаметра была проведена серия экспериментов, результаты которых приведены в табл. I. Биокатализатор во влажном состоянии содержал 10 % клеток в геле; гелевые частицы были расфракционированы просеиванием в водопроводной воде; инвертазная активность А определялась в стандартных условиях. В последней колонке таблицы приведен коэффициент сохранения активности, вычисленный как отношение выявляемой в катализаторе активности к активности того же количества клеток до иммобилизации.

Т а б л и ц а I

Выявляемая в условиях реактора перемешивания
активность катализатора

Ситовая фракция катализатора, мм	A, Е/г вл. веса параллельные опыты	Коэффициент сохранения активности
I,6 - 2,0	I53 I45	0,22
I,0 - I,6	245 2I6	0.33
0,63 - I,0	29I 284	0,4I
0,25 - 0,63	53I 606	0,80

Экспериментальные данные (табл. I) свидетельствуют о том, что выявляемая инвертазная активность сильно зависит от размера частиц биокатализатора, т.е. в условиях определения активности внутридиффузионные сопротивления являются фактором, лимитирующим скорость гидролиза сахарозы.

Иммобилизованные биокатализаторы как на основе очищенной инвертазы [4, с. 27], так и иммобилизованных дрожжевых клеток [2] имеют рН-оптимум инвертазной активности, расположенный в области кислых значений рН, причем с повышением температуры колоколообразная кривая зависимости активности от рН сужается [5, с. 89], так что уже при рН 6,0 активность катализатора составляет менее 60 % от максимальной. Между тем, с технологической точки зрения представляет интерес возможность проведения ферментативной реакции при нейтральных значениях рН - в водном растворе сахарозы. Это не только упростило бы технологическое оформление процесса гидролиза, но и исключило бы образование нежелательных побочных продуктов [2].

Мы определили рН-зависимость инвертазной активности исходных дрожжей и полученного катализатора при следующих условиях: концентрация субстрата (сахарозы) - 7 %, температура +50 °С, ситовая фракция катализатора I,0-I,6 мм. Результаты представлены в таблице 2 и на рис. I.

рН-оптимум клеточной инвертазы при иммобилизации заметно не смещается, но зависимость активности от рН на-

столько сглаживается, что подкисление сиропа как технологическая операция отпадает.

Т а б л и ц а 2

рН-зависимость инвертазной активности при 50 °С

рН	Высушенные при 37 °С дрожжи		Катализатор	
	Е/г	%	Е/г вл. веса	%
4,0	12630	96	747	89
5,0	13146	100	840	100
6,0	8314	63	789	94
7,0	2147	16	763	91
7,5	0	0	699	83

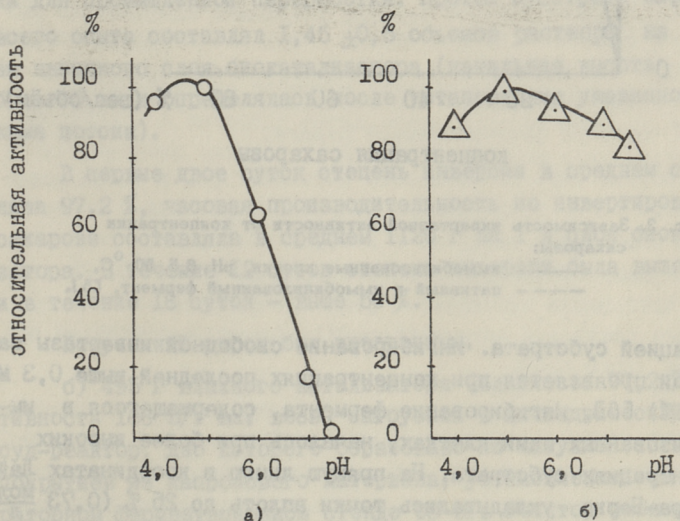


Рис. 1. Влияние рН раствора субстрата на активность катализатора:

- а) свободные дрожжевые клетки,
б) иммобилизованные дрожжи.

При рН 6,5 и повышенной температуре (+50 °С) мы определили зависимость активности катализатора от исходной концентрации сахарозы. На рис. 2 сплошной линией показана экспериментальная кривая и пунктирной — типичная зависимость скорости ферментативной реакции, ингибируемой высокой кон-

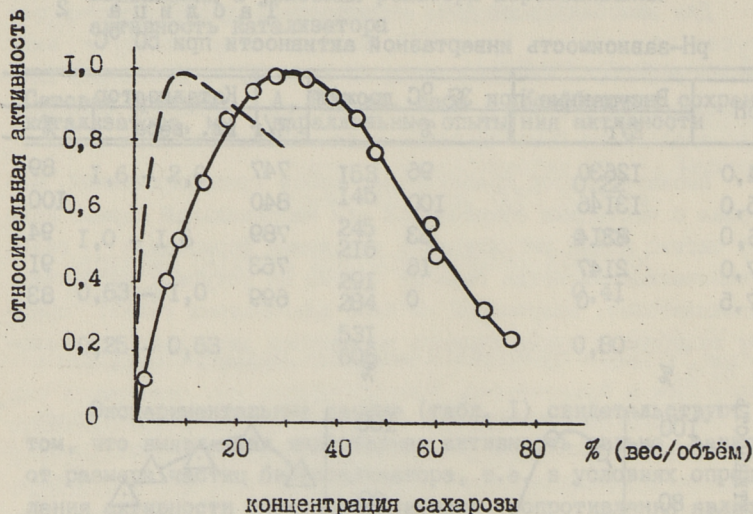


Рис. 2. Зависимость инвертазной активности от концентрации сахарозы:
 ————— иммобилизованные клетки, pH 6,5, 50 °С,
 - - - - - нативный и иммобилизованный фермент, [5].

центрацией субстрата. Ингибирование свободной инвертазы сахарозой проявляется при концентрациях последней выше 0,3 М (~10 %) [6]. Ингибирование фермента, содержащегося в иммобилизованных нами клетках, началось при более высоких концентрациях субстрата. На прямую линию в координатах Лайнуивера-Берка укладывались точки вплоть до 25 % (0,73 $\frac{\text{моль}}{\text{л}}$).

Константа ингибирования субстратом, определенная из графика в координатах концентрация субстрата — обратная величина скорости реакции (метод Диксона), равнялась ~1,5 моль/л. В литературе имеются близкие значения K_{IS} для иммобилизованной инвертазы, но наши исследования проведены при повышенных значениях pH и температуры. Кажущееся снижение ингибирования субстратом после иммобилизации фермента может быть результатом затруднения диффузии субстрата в фазу фермента, поэтому с целью уменьшения влияний на кинетику диффузионных эффектов мы проводили эксперименты с частицами катализатора фракции 0,25–0,5 мм при интенсивном перемешивании.

Технологические испытания катализатора с целью определения операционной стабильности и оценки возможной производительности процесса мы провели в проточных реакторах двух кинетических типов.

Реакторы с плотным слоем катализатора

а) 12,4 г влажного биокатализатора (содержащего 22,5 % сухого вещества и имеющего инвертазную активность 2890 Е/г сухого веса) поместили в стеклянную колонку с внутренним диаметром 26 мм. Колонка работала в камере воздушного термостата, в котором поддерживали температуру 55 ± 2 °С. С помощью перистальтического насоса в колонку подавали 60%-ный (массовые %) раствор сахарозы, приготовленный из сахара-песка для промышленной переработки. Проток субстрата в течение всего опыта составлял $1,45 \pm 0,5$ объемов раствора на 1 объем насыпного слоя биокатализатора (начальная высота слоя была 60 мм и определялась после установления указанного режима потока).

В первые двое суток степень инверсии в среднем составляла 97,2 %, часовая производительность по инвертированной сахарозе составляла в среднем 1120 г на 1 л слоя биокатализатора. В течение 12 суток степень инверсии была выше 80 % и в течение 18 суток — выше 50 %.

Полученный сироп был прозрачным.

б) 495 г влажного катализатора (влажность 77,2 %, активность 166 Е/г вл. веса) загрузили в цилиндрический сосуд-реактор, дно которого образовано из латунной сетки с покрытием из капронового материала, установленный на лабораторном ферментационном стенде ФС-5Г. Реактор имел рубашку для обогрева; система подачи раствора субстрата состояла из обогреваемого сосуда с раствором сахарозы, шлангов и перистальтического насоса.

Раствор сахарозы с температурой 56 ± 2 °С и концентрацией 65 % подавали в реактор сверху. В рубашку реактора подавали горячую воду и температуру в слое катализатора поддерживали по показаниям термометра на уровне 65 ± 1 °С. По достижении указанного температурного режима объемную скорость потока устанавливали в пределах $1,10 \pm 0,05$ л/час (в пересчете на нормальные условия). Продукт собирали снизу

реактора и вторым перистальтическим насосом отводили из установки.

Опыт продолжали 13,5 часов. Было получено 19,7 кг продукта со средней степенью инверсии 91,6 %. Средняя производительность составляла 0,56 кг инвертированной сахарозы на 1 л объема слоя биокатализатора за 1 час.

В нескольких образцах исходного раствора и продукта определяли содержание оксиметилфурфурола. Установлен процент его в пределах от $1 \cdot 10^{-5}$ до $2,7 \cdot 10^{-4}$ % с максимальным содержанием ОМФ в продукте $7,5 \cdot 10^{-4}$ %.

Реактор с перемешиванием

Партию катализатора с инвертазной активностью 487 Е/г вл. веса разделили на две части: одну поместили в закрытый сосуд и выдерживали в холодильной камере при $+4^{\circ}\text{C}$, а другую сушили на воздухе при комнатной температуре в течение 16 часов на фильтровальной бумаге.

Операционную стабильность катализаторов в обоих случаях определяли в одинаковых конусных реакторах с перемешиванием барботажем воздуха, в которые непрерывно подавали 50%-ный раствор сахарозы при температуре $56 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Среднее время пребывания субстрата в реакторе равнялось 180 минут. Загрузка реакторов катализаторами в пересчете на сухую массу была одинаковой.

В случае влажного катализатора время полужизни составило 135 часов, в случае сушеного – 290 часов. В барботажных реакторах наблюдался износ гелевых частиц, и большее время работы катализатора после перевода в форму ксерогеля объясняется его лучшими механическими свойствами.

Стабильность инвертазной активности при хранении биокатализатора исследована при различных условиях:

при хранении влажного катализатора (в растворе 0,05 М ацетатного буфера с pH 4,8, температура $+4^{\circ}\text{C}$) в течение 40 суток сохраняется 87 % активности;

при хранении в форме ксерогеля (влажность ок. 15 %) по прошествии 41 суток потери активности не обнаружено.

По описанным выше результатам можно сделать следующие выводы:

- полученный биокатализатор в значительной степени удовлетворяет требованиям, перечисленным во введении: высокая ферментативная активность, стабильность при работе в горячих концентрированных растворах сахарозы и низкая стоимость катализатора (в его составе - крупнотоннажные химические продукты),

- необходимая технологическая "доводка" для промышленного применения биокатализатора состоит только в выборе реактора, гидродинамические условия в котором учитывали бы механические свойства катализатора,

- процесс инвертирования сахарозы можно осуществлять при нейтральных значениях pH, что упрощает технологический процесс,

- образование побочных продуктов незначительно, следовательно, в качестве сырья можно использовать не только рафинированную сахарозу, но и диффузионные соки сахарных заводов.

Л и т е р а т у р а

1. Производство и использование жидкого сахара / С.А. Бренман, В.Л. Марьянчик, Н.С. Иволга и др. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. 48 с.

2. H a s a l P., V o j t i š e k V. Biocatalyst with immobilized yeast cells for sucrose inversion // 9th Int. Congr. of Chem. Engineering, Chem. Equipment Design and Automation - CHISA 87, August 30 - Sept. 4, 1987, Prague, Czechosl., Paper A6.139.

3. Е р ш о в Б.Н. Определение редуцирующих сахаров в присутствии оксиметилфурфурола // Изв. вузов. Сер. Пищевая технология, 1971. № 1. С. 156-157.

4. Иммуобилизованные клетки и ферменты. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988. 215 с.

5. К р е э н М.И. Получение и свойства инвертазы и глюкозооксидазы, фиксированных полиакриламидным гелем. Дис. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук. ТПИ. 1972. 148 с.

6. L ó p e z - S a n t i n J., S o l à C., L e -
m a J.M. Substrate and product inhibition significance in
the kinetics of sucrose hydrolysis by invertase // Biotech-
nol. Bioeng. 1982. V. 24, N 12. P. 2721-2724.

G. Kalbin, J. Laukevic

Sahharoosi inversioon immobiliseeritud pärmirakkude abil

Kokkuvõte

Kirjeldatakse uue invertaasaktiivsusega biokatalüsaatori omadusi. Biokatalüsaator saadakse pärmirakkude immobiliseerimise teel ja tema aktiivsus oleneb terakeste mõõtmetest. Maksimaalne invertaasne aktiivsus saadi 600 sahharoosi $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ katalüsaatori grammi kohta, kusjuures aktiivsus säilib neutraalse pH-ga sahharoosi lahustes.

Uurimistulemused on näidanud, et uus biokatalüsaator on kasutatav invertsiirupi saamiseks sahharoosilahuse kontsentratsioonidel 50 - 65 %, hüdrolüüsitelemperatuuril kuni 65 °C. Protsessil ei teki kõrvalprodukte ja ta on sobiv kasutamiseks toiduasinetööstuses.

G. Kalbin, J. Laukevic

Sucrose Inversion by Immobilized Yeast Cells

Abstract

Technological parameters of a new biocatalyst based on gel-entrapped *Saccharomyces cerevisiae* cells are described. Invertase activity of the biocatalyst determined in a batch stirred reactor depending on particle size is 150 - 600 μmol of sucrose $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ of wet catalyst at 30 °C, pH = 4.80 and initial substrate concentration 0.2 mole $\cdot \text{L}^{-1}$. The prepared biocatalyst has a wide pH-optimum of enzyme activity: in the range from 4.0 to 7.0 90 % of activity is left (50 °C). Applicability of the biocatalyst for concentrated sucrose solutions hydrolysis is demonstrated. The best results are attained using biocatalyst in a form of xerogel.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ
КЛЕТОК МАКА НА ПЕНОПОЛИУРЕТАНОВОМ НОСИТЕЛЕ

Высшие растения являются основным источником получения многих нужных для народного хозяйства веществ. Однако в последнее время использование растений встречается на своем пути препятствия ввиду неконтролируемой эксплуатации вплоть до истощения и уничтожения некоторых растений, а также в связи с трудностями их выращивания. В связи с этим огромное значение приобретает выращивание различных культур растительных клеток с целью получения ценных продуктов [1]. В этом смысле особенно удобно применение суспензионных культур растительных клеток. Однако выращивание суспензионной культуры растительных клеток ввиду их особой хрупкости – дело непростое, требует очень мягких условий перемешивания. Именно иммобилизация позволяет преодолеть трудности в этом плане, поскольку только иммобилизованные клетки защищены каркасом носителя, что позволяет им сохранять высокую жизнеспособность достаточно длительное время [2, 4].

Целью данной работы было исследовать ход иммобилизации клеток мака на пенополиуретан различной структуры и размеров.

Материалы и методы. Каллусную культуру клеток мака *Papaver somniferum*, любезно предоставленную лабораторией проф. Р.Г. Бутенко Института физиологии растений АН СССР, выращивали в 250 мл-х колбах, содержащих по 50 мл агаризованной среды.

Состав основной питательной среды: минеральные вещества по Мурасиге-Скугу, тиамин – 0,1 мг/л, пиридоксин – 0,5 мг/л, никотиновая кислота – 0,5 мг/л, инозитол –

100 мг/л, гидролизат казеина - 1 г/л, 2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота (2,4-Д) - 0,1 мг/л, кинетин - 0,1 мг/л, сахароза - 30 г/л, агар - 7 г/л при pH = 5,7. Культуру пассировали 1 раз в 4 недели, выращивали при 26 °C в темноте.

Иммобилизация растительных клеток в барботажных культиваторах. Носитель. Пенополиуретан (ППУ), полученный в НПО Полимерсинтез (г. Владимир). Были испытаны различные типы ППУ, отличающиеся по размеру пор и вследствие этого по плотности: ППУ 25-1,8 (крупнопористый), ППУ 28-0,8 (среднепористый), ППУ 32-0,5 (мелкопористый), ППУ 30-140 20-0,8 (среднепористый), где первая цифра означает плотность в кг/м³, а вторая - средний размер пор в мм. ППУ 30-140 обладает открытоячеистой структурой, у остальных типов ППУ часть ячеек закрыта, что можно наблюдать визуально. Частицы носителя получали разрезанием полотна пористого материала до одинакового веса с точностью до ± 1 мг, были использованы частицы носителя весом 23, 31 и 40 мг. Количество связанной биомассы измеряли после высушивания препаратов биокатализатора в течение 24 часов при 70 °C с вычитанием чистого веса частицы носителя. Коэффициент заполнения клеток вычисляли как отношение веса сухих клеток на частице носителя к весу исходной частицы носителя.

Культиваторы. Были использованы стеклянные барботажные культиваторы двух типов: круглодонной колбы и сопло-конусные культиваторы [3] объемами по 0,5 и 1 л, содержавшие по 300 и 500-600 мл среды соответственно.

Иммобилизация. Условия выращивания иммобилизованных клеток. Куски каллуса культуры *Paraver Somniferum* в количестве от 4 до 40 г по сырому весу стерильно переносили в чашку Петри, измельчали скальпелем, взвешивали и переносили в барботажный культиватор с предварительно проавтоклавируемыми пенополиуретановыми частицами носителя в количестве от 70 до 100, т.е. с общим весом от 1,6 до 4 г. Куски носителя прорастали клеточной массой и могут рассматриваться как иммобилизованный биокатализатор. Через один месяц, а к этому времени свободные клетки погибают или вымываются при смене питательной среды, биокатализатор помещали в одну из трех использованных модифициро-

ванных питательных сред. Все модифицированные среды готовились на базе среды Мурасиге-Скуга, без белка и гормонов роста, с сахарозой в концентрации 30 г/л. Это и есть состав обедненной питательной среды I (OCI). Состав OC2: микросолей нет, из 7 макросолей присутствуют только две ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2$) в обычной концентрации. Продукционная среда (ПС): из 7 макросолей присутствуют только две ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2$) в концентрации в 6,6 раз превышающей обычную, тиамин - 0,1 мг/л, пиридоксин - 0,5 мг/л, никотиновая кислота - 0,5 мг/л. Смену среды производили обычно раз в две недели, при этом забирали по 5-6 частиц носителя для анализа, из них 3 частицы носителя - для анализа на метаболическую активность клеток и 2-3 частицы носителя - для анализа на сухой вес биомассы.

Коэффициент иммобилизации вычисляли как отношение количества биомассы на носителе к количеству исходной биомассы.

Оценка метаболической (восстанавливающей) активности клеток тетразолиевым методом. Метаболическую активность клеток оценивали по появлению окраски клеток в растворе хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия вследствие его восстановления до красного формазана редуцирующими ферментами электрон-транспортной цепи митохондрий клетки. Три частицы носителя инкубировали в 0,8 % растворе хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия (ТТХ) в 50 мМ фосфатном буфере при pH = 7,5 в течение 10-18 часов при комнатной температуре. Затем три частицы с окрасившимися клетками выдерживали в 3-х мл спирта 2-3 часа, интенсивность окраски спиртового экстракта измеряли фотометрически при 485 нм, при необходимости раствор разбавляли. Метаболическая активность представлена в относительных единицах приведенной оптической плотности с учетом разбавления спиртового экстракта. Удельная метаболическая активность иммобилизованной биомассы представлена в единицах приведенной оптической плотности на мг сухого веса частицы носителя.

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов исследовали ход иммобилизации культуры на разных носителях с весом частиц 40 мг, с раз-

личным исходным инокулятом клеток, с последующей через месяц заменой полной среды на ОСІ. Все эксперименты были проведены в сопло-конусных культиваторах объемом на 300 мл питательной среды. В некоторых опытах одновременно использовались два типа носителя. Результаты приведены в таблице I.

Исходя из таблицы, можно сделать следующие выводы: Коэффициент заполнения клеток с закрытоячеистым пенополиуретановым носителем лежит в пределах от 0,12 до 0,61. Значение 0,61 является максимальным и достигается через шесть недель культивирования, в то время как для открытоячеистого носителя максимальное значение коэффициента заполнения увеличивается до 0,90 и достигается уже через две недели культивирования. На примере одного из культиваторов, в котором были частицы носителя обоих типов, показано, что через три недели их коэффициенты заполнения различаются почти в три раза. Поэтому, естественно, в дальнейшем мы использовали только открытоячеистый пенополиуретан.

Обычно при пересевах суспензионной культуры инокулят клеток по сырому весу составляет не менее 100-150 г/л. Интересно было проследить, как влияет уменьшение инокулята клеток в 4-5 раз на процесс иммобилизации. Было показано, что уменьшение инокулята в 5 раз не оказывает никакого влияния ни на коэффициент заполнения носителя клетками, ни на метаболическую активность биокатализаторов. Поэтому в наших дальнейших исследованиях количество инокулята клеток не превышало 30-40 г/л по сырому весу, что соответствует 1-1,3 г сухого веса инокулята клеток. Это количество инокулята в 3-4 раза меньше применяемых в ИФР-е количеств инокулята при пересевах суспензионной культуры мака.

В одном из культиваторов использовали крупнопористый закрытоячеистый пенополиуретан с размером пор 1,8 мм (ППУ 25-1,8), при этом коэффициент заполнения не превышал 0,50. Опыты с мелкопористым пенополиуретаном ППУ 32-0,5 с размером пор 0,5 мм показали, что клетки практически не связываются с ним. Поэтому в наших дальнейших исследованиях использовали только пенополиуретан средней пористости с размером пор 0,8 мм.

Основные характеристики биокатализаторов при культивировании клеток
в установке сопло-конусного типа

Кол-во инокул. (г/л)	Марка пено- поли.	Время культ. (нед.)	Питат. среда	Кэффци. запол- нения	Кэффци. иммобил.	Метабол. ак- тивность (отн. ед.)	Уд. метабол. активность
I	2	3	4	5	6	7	8
I32	28-0,8	2	полн.	0,16	0,49	-	-
	-	4	полн.	0,50	1,52	7,88	0,20
	-	5	ОСИ	-	-	6,57	0,16
	-	6	ОСИ	0,61	1,85	6,82	0,17
II0	25-I,8	2	полн.	0,12	0,57	1,72	0,04
	-	4	полн.	0,50	2,37	1,68	0,04
	-	6	ОСИ	0,33	1,56	6,78	0,17
70	30-140 20-0,8	2	полн.	0,90	3,00	2,44	0,06
	-	5	полн.	0,71	2,36	-	-
	-	3	полн.	0,90	3,00	-	-
	28-0,8	3	полн.	0,35	1,20	-	-
27,3	30-140 20-0,8	I	полн.	-	-	0,92	0,02

1	2	3	4	5	6	7	8
27,3	30-140 20-0,8	2	полн.	0,87	0,12	3,05	0,08
		3	OCI	0,35	3,27	1,34	0,03
27,3	30-140 20-0,8	1	полн.	-	-	0,41	0,01
		2	полн.	0,71	6,63	0,76	0,02
		3	OCI	0,25	2,33	0,60	0,02

Можно предположить, что при уменьшении диаметра частиц носителя прорастание частиц клетками и диффузия питательной среды лучше. Для проверки данного предположения была проведена серия опытов со среднепористым носителем открытоячеистой структуры, частицы которого были весом 23 мг. Результаты представлены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Основные характеристики биокатализатора при культивировании клеток в установке сопло-конусного типа

Кол-во инокул. (г/л)	Время культ. (нед.)	Питат. среда	Коэффициент заполнения	Коэффициент иммобил.	Метабол. акт-сть (отн.ед.)	Уд. метабол. актив-сть
48,3	2	полн.	-	-	0,07	0,003
	3	полн.	-	-	2,20	0,10
	4	полн.	1,0	3,35	2,81	0,12
	5	ОС2	1,5	5,03	6,10	0,27
	6	ОС2	-	-	9,13	0,40
	8	ПС	1,5	5,03	4,00	0,17

Было показано, что уменьшение веса частиц в 1,7 раза приводит к увеличению коэффициента заполнения во столько же раз по сравнению с максимальным коэффициентом заполнения, полученным для носителей, весом 40 мг в сопло-конусном культиваторе.

В последней серии опытов исследовали другую конструкцию установки для культивирования биокатализатора - барботажный культиватор типа круглодонной колбы с носителем открытоячеистой структуры, частицы носителя которого были весом в 31 мг. Результаты представлены в таблице 3.

Данные, представленные в таблице 1, были получены при культивировании биокатализатора в сопло-конусном культиваторе. Было показано, что коэффициент заполнения не зависит от количества инокулята, по крайней мере при изменении количества инокулята в 5 раз, от 27 г/л до 130 г/л и не превышает единицы (максимальное значение коэффициента заполнения - 0,90). При культивировании биокатализатора в барботажном культиваторе типа круглодонной колбы было по-

казано (таблица 3), что даже при таком небольшом инокуляте в 13,3 г/л, который в 2-10 раз меньше тех количеств инокулята, которые были использованы в сопло-конусных культиваторах, достигается высокий коэффициент заполнения. Следует отметить, что значение коэффициента заполнения, равное 1,38, превышает в 1,5 раза максимальный коэффициент заполнения клеток в сопло-конусном культиваторе при весе частицы носителя в 40 мг.

Т а б л и ц а 3

Основные характеристики биокатализатора при культивировании клеток в установке типа круглодонной колбы

Кол-во инокул. (г/л)	Время культ. (нед.)	Питател. среда	Коэффициент заполнения	Коэффициент иммобил.	Метабол. актив-ть	Уд. метабол. акт-сть
13,3	2	полн.	-	-	0,05	0,002
	3	полн.	-	-	0,75	0,03
	4	полн.	-	-	0,90	0,04
	5	полн.	0,50	5,01	2,11	0,09
	6	ОСИ	0,24	2,41	1,79	0,08
	7	ОСИ	1,38	13,83	4,87	0,21
	8	ОСИ	-	-	0,71	0,03

Таким образом, приведенные выше данные позволяют сделать вывод о том, что из двух типов барботажных культиваторов: сопло-конусного и типа круглодонной колбы, культиватор типа круглодонной колбы больше подходит для выращивания биокатализатора растительных клеток мака. Что касается веса частиц носителя и его структуры, то лучше использовать меньшие по весу частицы весом в 23 мг из открытоячеистого пенополиуретана.

Иммобилизация дает большие преимущества при выращивании суспензионной культуры клеток, поскольку только благодаря иммобилизации удается в 5-7 раз продлить жизнеспособность клеток в суспензионной культуре. Свободные клетки, не связанные с носителем, уже через две недели гибнут, в то время как связанные с носителем клетки сохраняют жизнеспособность через два, а то и три месяца культивирования.

Л и т е р а т у р а

1. R h o d e s M.J.C. et al. Potential for the production of biochemicals by plant cell cultures // New Zealand Journal of Technology. 1986. Vol. 2. P. 59-70.

2. L i n d s e y K. et al. A novel method for the immobilisation and culture of plant cells // FEBS letters. 1983. Vol. 155. P. 143-149.

3. W i l s o n G. A simple and inexpensive design of chemostat enabling a steady state growth of *Acer pseudoplatanus* cells under phosphate-limiting conditions // Ann. Bot. 1976. Vol. 40. P. 919-932.

4. А р х а н г е л ь с к а я Н.В., А б д у х и т о в а А.К. Иммуобилизация растительных клеток. I. Метод определения метаболической активности свободных и связанных клеток // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1988. № 663. С. 12-21.

Tingimuste optimeerimine moonirakkude
immobiliseerimiseks vahtpolüuretaankandjal

Kokkuvõte

Uuritigi moonirakkude immobiliseerimist erineva pooride struktuuri ja mõõtetega vahtpolüuretaanil. Erisuguse kujuga airlift-kultivaatorite võrdlemisel osutus immobiliseeritud moonirakkude kasvatamiseks kõige sobivamaks ümarapõhjaline kultivaator. Kandjaosakeste kaalu ja vahtpolüuretaani struktuuri võrdlev uurimine näitas, et paremad resultaadid saadakse 23-mg avatud pooridega vahtpolüuretaankandja kasutamisel.

A. Abdvakhitova

Optimization of Immobilization Conditions of
Poppy Plant Cells in Porous Polyurethane

Abstract

Immobilization of poppy plant cells in porous polyurethane of various structure and sizes has been investigated. It has been shown that the circle-down retort is more suitable for the cultivation of immobilized poppy plant cells than the nozzle-cone retort. By comparing the weights of particles of carrier and its structure, we can conclude that the most suitable ones are particles from open cell polyurethane with the weight less than 23 mg.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ВЫКРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛИЗОЦИМА
ИЗ ЯИЧНОГО БЕЛКА

Лизоцим (Лз) представляет собою N-ацетилмурамилгидролазу и является ферментом, способным осуществлять лизис бактериальной мембраны в широком интервале условий среды.

Основными источниками Лз являются яичный белок и молоко млекопитающих. Содержание Лз в яичном белке наиболее высоко и достигает 3 мг/мл.

В последнее время интерес к Лз в связи с его уникальными антимикробными свойствами значительно возрастает. Расширяется его применение в медицине как вещества, влияющего на функционирование иммунной системы и усиливающего действие антибиотиков [1], в пищевой промышленности в качестве натурального консервирующего средства [2], в производстве детских молочных продуктов [3]. Одним из основных потребителей Лз в настоящее время за рубежом (ФРГ, Италии, Дании, Франции, Австралии) является сыродельная промышленность. Установлено, что Лз существенно подавляет развитие маслянокислых бактерий и является эффективной добавкой, предотвращающей вспучивание твердых сыров [4, 5]. При этом он не оказывает отрицательного воздействия на процесс выработки и органолептические свойства сыра.

Постоянно расширяющаяся область применения Лз диктует разработку новых и совершенствование традиционных способов выделения фермента. В настоящее время основными способами выделения Лз являются катионообменная [2, 6, 7] и аффинная [8] хроматографии, а также кристаллизация Лз вблизи его изоэлектрической точки [9].

Цель настоящей работы состояла в том, чтобы, опираясь на известный метод выделения Лз, в частности, метод кри-

сталлизации его вблизи изоэлектрической точки, разработать основные технологические аспекты процесса получения Лз из местного сырья (белка куриных яиц) и наработать ряд опытных образцов препарата для их дальнейшего испытания в процессе сыродения.

Материалы и методы

Исходным материалом для выделения Лз служил белок куриных яиц.

Яичный белок отделяли от желтка и скорлупы, гомогенизировали до однородной по вязкости массы и подвергали центрифугированию (3000 об/мин, 5 мин). В подготовленный таким образом белок вносили требуемое количество соли и в некоторых случаях - затравку изоэлектрического Лз (0,5 мл раствора (0,01 г/мл) при pH 10-11 на 100 мл нативного белка). После этого при медленном перемешивании и температуре 4 °C раствор белка выдерживали в течение 7 дней.

По завершении стадии кристаллизации Лз отделяли путем центрифугирования (5000 об/мин, 15 мин), растворяли и вновь центрифугировали при тех же условиях. Полученный фугат подвергали лиофилизации. Он и являлся целевым продуктом - препаратом Лз из белка куриных яиц.

Активность Лз определяли по стандартной методике [10]. По сравнению с нею нами были допущены следующие изменения: объем субстрата составлял 5 мл, объем вносимого препарата - 50 мкл, длина волны при фотометрировании растворов - 440 нм.

В качестве субстрата для определения активности Лз использовали ацетоновый порошок *Micrococcus lysodeicticus*, предоставленный нам ПО "Мосмедпрепараты" им. Л.Я. Карпова (г. Москва).

Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури [11].

Измерение экстинкции проводили на фотоэлектрическом колориметре КФК-2МП.

В работе использовали реактивы со степенью чистоты "ч.д.а." и "х.ч."

Результаты и обсуждение

Так как исходный материал характеризуется достаточно высокой вязкостью, что может сказаться на процессе кристаллизации, на первом этапе работы нами было изучено влияние степени разбавления исходного яичного белка. Результаты приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Влияние степени разбавления исходного яичного белка на процесс кристаллизации Лз. Условия опытов: рН = 9,5; C_{NaCl} = 5 %; температура - 4 °С; время (τ) - 9 дней; заправка изoeлектрического Лз

№ п/п	Степень разбавления (Р)	Содержание Лз в % от исходного в надосадке
1	1	21
2	2	65
3	3	64
4	4	57
5	6	56

Данная серия экспериментов показала, что при увеличении степени разбавления яичного белка содержание активного Лз в надосадке увеличивается, а следовательно, процент его выкристаллизации понижается. Таким образом разбавление яичного белка перед кристаллизацией нецелесообразно.

Вторым фактором, влияющим на процесс кристаллизации Лз, является рН. Проведенные исследования показали, что при повышении рН с 5,0 до 10,8 содержание активного Лз в надосадке уменьшается от 63 до 49 % соответственно. Условия экспериментов были следующими: разведение - 3; C_{NaCl} = 5 %; τ = 9 суток; температура - 4 °С; заправка изoeлектрического Лз не вносилась; рН - var. При этом естественно было бы ожидать увеличения активности Лз в осадке. Однако, как оказалось, лишь при рН 9,4 (естественном значении рН белка куриного яйца) материальный баланс по активности Лз в осадке и надосадке составляет 100 %. При рН 5,0 и 10,8 в осадке обнаруживается лишь 5 и < 1 % активности Лз соответственно (вместо ожидаемых 37 и 51 %). Это свидетельствует о

частичной инактивации фермента в процессе кристаллизации. Кроме, того, если при pH 5,0 исключается неполное растворение осадка (Лз кристаллизуется в виде своего хлорида, который хорошо растворим в воде) и все уменьшение активности можно отнести на счет инактивации фермента, то при pH 10,8 причиной потери активности, на наш взгляд, является и неполная растворимость Лз. Как известно из литературных источников [9], кристаллы Лз, образовавшиеся в изоэлектрической области, относительно нерастворимы в воде.

Таким образом, наиболее благоприятным pH для процесса кристаллизации Лз с точки зрения сохранения его активности является естественный pH белка куриного яйца (9,3-9,5).

Авторы статьи [9] указывают на то, что в некоторых случаях процесс кристаллизации происходит и без инициирующего начала, однако, он нестабилен. Поэтому определенный интерес для нас представляло изучение влияния затравки изоэлектрического Лз на процесс его кристаллизации. Эксперименты этой серии проводились при следующих условиях: pH = 9,5; $C_{NaCl} = 5\%$; температура - 4 °C. В результате оказалось, что затравка изоэлектрического Лз не оказывает влияния ни на выход Лз, ни на время его кристаллизации. Во всех случаях выход Лз был постоянно устойчив - 75-80 %, время кристаллизации - 7 суток.

Анализ на содержание белка показал, что его распределение между осадком и надосадком составляет соответственно 4 и 96 %, тогда как соответствующее распределение активности Лз - 75-80 и 20-25 %. Это свидетельствует о практически полной сохранности других белков куриного яйца после отделения Лз.

Так как процесс кристаллизации идет из солевых растворов, то и целевой продукт - препарат Лз, и побочный - смесь глобулинов, овальбумина, кональбумина и других белков куриного яйца содержат большое количество соли, которая является их единственной примесью. С целью её снижения на следующем этапе работы было изучено влияние концентрации NaCl на процесс кристаллизации Лз. О количестве выпавшего в осадок Лз судили по уменьшению его активности в надосадке. Результаты этой серии экспериментов приведены на рисунке I.

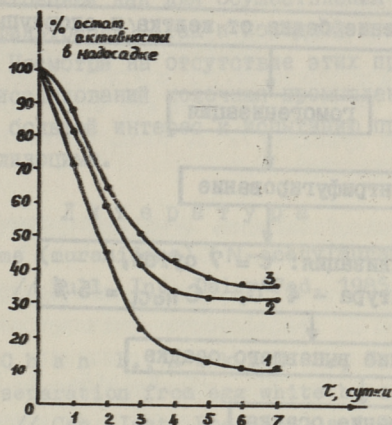
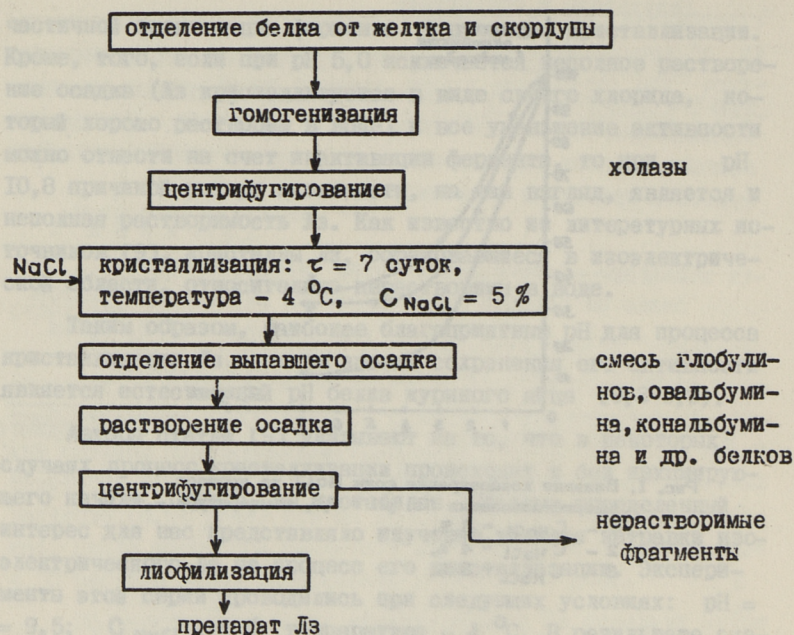


Рис. 1. Влияние концентрации соли NaCl на процесс выкристаллизации Лз: pH = 9,5, температура - 4 °C
 1 - C NaCl = 5 %,
 2 - C NaCl = 4 %,
 3 - C NaCl = 3 %.

Из представленных графиков видно, что концентрация NaCl оказывает существенное влияние на процесс кристаллизации Лз. При её уменьшении от 5 до 3 % содержание активного фермента в надосадке увеличивается от 11 до 36 %, а следовательно, количество выпавшего в осадок Лз уменьшается от 89 до 64 % соответственно. На время кристаллизации концентрация соли не оказывает влияния. Во всех случаях оно составляло 6-7 суток.

Попытка замены поваренной соли содой (NaHCO_3) не принесла желаемых результатов. NaHCO_3 не проявил преимуществ перед NaCl — ожидаемого ускорения процесса кристаллизации, о котором сообщают авторы статьи [9], не наблюдалось.

Таким образом, обобщая результаты проведенных исследований, можно предложить следующую принципиальную технологическую схему выкристаллизации Лз из белка куриных яиц:



По этой схеме были получены образцы препаратов Лз (исходный объем нативного яичного белка – 2 л), не уступающие по своей удельной активности (Е/мг белка) препаратам зарубежных фирм. Сравнительные данные приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Активность препаратов Лз

Препарат	Активность Лз	
	Е/мг препарата	Е/мг белка
Belovo (Бельгия)	10060	11114
Реактивный Лз (ФРГ)	13880	13880
Образец № 1 (ТПИ)	5172	11936
Образец № 2 (ТПИ)	5338	13016
Образец № 3 (ТПИ)	5386	10730

Полученные препараты Лз были переданы мясомолпрому республики для испытания их в сыроделии в качестве антибактерицидного вещества для подавления маслянокислого брожения, вызывающего вспучивание твердых сыров. Естественно,

при необходимости, процесс выделения Лз может быть дополнен мембранной фильтрацией как для осуществления процесса обес-соливания (диафильтрация), так и холодной стерилизации (микрофильтрация). Несмотря на отсутствие этих процессов на данном этапе исследований молочная промышленность республики проявляет большой интерес к испытанию предложенных нами препаратов лизоцима.

Л и т е р а т у р а

1. Lysozyme (muramidase) (N-acetylmuramyl hydrolase, E.C. 3.2.1.17) // Bull. Int. Dairy Fed. 1985. N 191. P. 5-7.

2. Li - Chan E., Nakai S., Sim I., Lo K.V. Lysozyme separation from egg white by cation exchange chromatography // Can. Inst. Food Sci. and Technol. I. 1985. Vol. 18, N 3, XXXVIII.

3. Детские молочные продукты, обогащенные лизоцимом: Обзорная информация. М.: АгроНИИТЭИМПИ, 1986. С. 40.

4. Carminati D., Mucchetti G., Neviani E. La germinazione di clostridium tyrobutyricum in presenza di lisozioma // Latte. 1984. Vol. 9, N 11. P. 897-900, 903-904.

5. Неберт В.К., Перфильев Г.Д. и др. Изучение возможности использования лизоцима в производстве твердых сычужных сыров // Проблемы и пути рационального использования сырья в маслоделии и сыроделии. Тез докл. 7 науч.-техн. конф., 29-30 мая, 1986, ч. I. Каунас: 1986. С. 145-146.

6. Насегawa Mineo, Kewpie K.K. Process for elution egg white lysozyme // Пат. 45I8695, США. Заявл. 23.II.82, № 443956, опубл. 2I.05.85. Приор. 29.05.82, № 57-9I879, Япония, МКИ C12 9/36.

7. Matei L. One-step desorption and purification of hen egg - white lysozyme from Amberlite CG-50 // Rev. Roum. Biochim. 1986. Vol. 23, N 1. P. 45-49.

8. Reid Lorne S., Brookside Farms, Ltd. Method for separating lysozyme from egg-white //

Пат. I22I046, Канада. Заявл. 30.05.84, № 455498, опубл. 28.04.87. МКИ C12 9/36, C08 5/00.

9. A l d e r t o n G., F a v o l d H.L. Direct crystallization of lysozyme from egg white and some crystalline salts of lysozyme // I. Biol. Chem. 1946. Vol. 164, N 1. P. 1-7.

10. Biochemia Catalogue. Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (Germany), Biochemical Department, N 15351 ELBG, 1970.

II. С к о у п с Р. Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. С. 341.

I. Kalbina, M. Friedenthal

Munavalgust lüsotsüümi kristallimise protsess

Kokkuvõte

On välja töötatud põhilised tehnoloogilised parameetrid lüsotsüümi eraldamiseks kanamuna valgust kristallimisega tema isoelektrilise täpi lähedal NaCl juuresolekul. Soovitava skeemi järgi saadud preparaadid vastavad oma eriaktiivsuselt mg valgu kohta välismaa preparaatile. Lüsotsüümi katsepartiid on üle antud ENSV liha- ja piimatööstusele nende katsetamiseks antibakteritsiidse ainega või happelise kaarimise mahasurumiseks juustu tootmisel.

I. Kalbina, M. Friedenthal

On Isolation of Egg-white Lysozyme by Cristallization

Abstract

The basic technological aspects of isolation of hen egg-white lysozyme (Ls) by crystallization near its isoelectrical point and in presence of NaCl were determined. The activities of the preparations produced according to the suggested scheme correspond to those provided by foreign companies. The experimental batch of Ls was given to the milk industry of Estonia for investigating it as antibacterial substance for prevention butyric acid fermentation in milk in cheese production. These investigations confirm the positive effect of Ls application.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ *BACILLUS MACERANS*

В наших предыдущих работах была изучена динамика биосинтеза циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТ-азы) при различных условиях культивирования *B. macerans* [1, 2]. Было предположено, что продуцирование ЦГТ-азы происходит с некоторым опозданием по сравнению с накоплением биомассы, в условиях дефицита источника углерода. Характеристике роста *B. macerans* ВКМБ-506 и выделению ферментов этим продуцентом посвящено небольшое количество исследований [3, 4, II]. В этих работах использована среда Лейн-Пирта (ЛП) [3], дающая небольшой осадок как в ходе его изготовления, так и при культивировании *B. macerans*. Образующийся осадок создает помехи при изучении роста этого продуцента. С другой стороны, практически невозможно изучение скорости роста, выхода биомассы и изучение состава биомассы *B. macerans* в средах, содержащих картофель, зерно и другие подобные продукты. Поэтому мы поставили перед собой задачу составить синтетическую среду для выращивания *B. macerans*, не дающую осадка, и разработать методику для получения чистой биомассы этого микроорганизма, необходимой для биохимических исследований и биотехнологических работ.

Материалы и методы

В работе использована культура *B. macerans* ВКМБ-506, которая хранилась в среде с картофелем в холодильнике [2]. Для приготовления посевного материала делали посевы в синтетическую среду III (см. табл. I) в 250 мл колбы, для поддержания pH в среду добавляли 1,5 % меда. Культуру выращивали в течение 3 дней при 37 °C и полученный инокулят использовали для засева в ферментер "Биостат Е" (ра-

бочий объем 4 л). Количество инокулята - 10 % от объема среды. Состав составленной нами среды IIII приведен в таблице I.

Т а б л и ц а I

Состав питательной среды IIII

Название компонента	Количество в г/л
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,000
KH_2PO_4	1,000
NaCl	0,100
Na_2SO_4	0,450
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	2,850
ZnO	0,004
Трилон Б	1,000
CaCl_2	0,300
Трилон Б	1,500
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,600
FeSO_4	0,070
Трилон Б	0,750
Глюкоза	20,000

Растворы минеральных солей готовили в трех частях с нагреванием до 80 °С до полного их растворения. Затем эти растворы сливали в емкость ферментера с добавлением глюкозы и стерилизовали при 121 °С в течение 30 минут.

При разработке синтетической среды IIII исходили из данных элементного состава биомассы микроорганизмов и картофеля, а также учитывали данные, приведенные в литературе по составу среды ЛП. В ходе разработки синтетической среды IIII было выяснено, что *B. masserans* растет достаточно хорошо в присутствии трилона Б. К составу разработанной нами среды IIII в таблице 2 приведена для сравнения рекомендованная Лейн-Пиртом среда [3].

При выращивании культуры *B. masserans* оценивали биомассу весовым методом по сухому остатку биомассы и по оптической плотности культуры при 578 нм на фотокolorиметре "Спекол" (ГДР) [8]. Потребление глюкозы измеряли по методу Тетге-Ньерле [9], уровень кислорода в ферментере регулиро-

вали на 5 % насыщения. pH среды поддерживали на уровне 6,5 с помощью 4N NaOH и 4N HNO₃. Температура выращивания 37 °C, скорость перемешивания 250 об/мин.

Т а б л и ц а 2

Питательная среда ЛП [3]

Название компонента	Количество в г/л
(NH ₄) ₂ PO ₄	5,0
(NH ₄)H ₂ PO ₄	2,0
K ₂ SO ₄	0,5
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,5
ZnO	0,004
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,015
FeCl ₂ ·4H ₂ O	0,010
(NH ₄) ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,002
Тиамин-HCl	0,002
Биотин	0,000 015
Лимонная кислота	1,3
Крахмал растворимый	6 – 30
Мальтоза	0,5

Результаты и обсуждение

Культуру *V. magerans* выращивали в ферментере в течение 70 часов, т.е. до истощения среды источником угле-
рода – глюкозы.

На рисунке 1 приведена характеристика роста культуры: сухой вес биомассы, потребление глюкозы и изменение E_h в течение культивирования.

На рисунке 2 приведены параметры роста, рассчитанные по следующим формулам на основании данных, приведенных в таблице 3.

Удельная скорость роста, μ :

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad [ч^{-1}].$$

Экономический коэффициент, y :

$$y = - \frac{dx}{ds}.$$

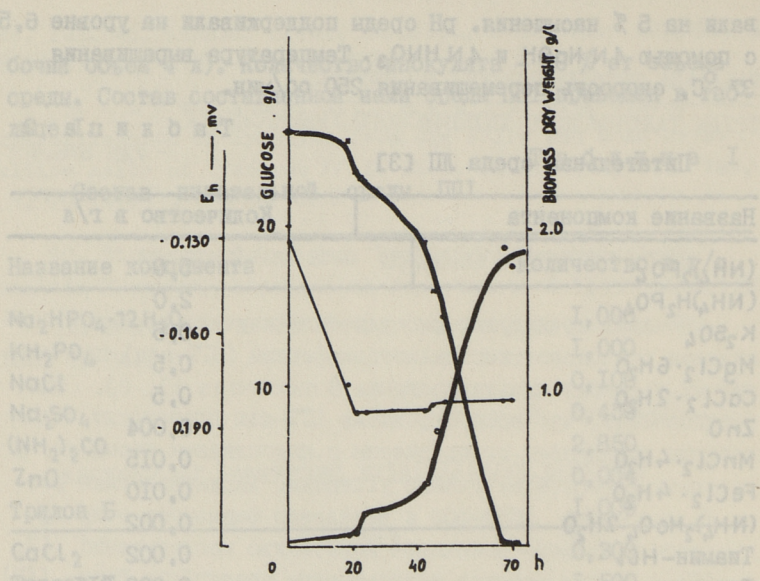


Рис. 1. Динамика роста на среде ПП1.

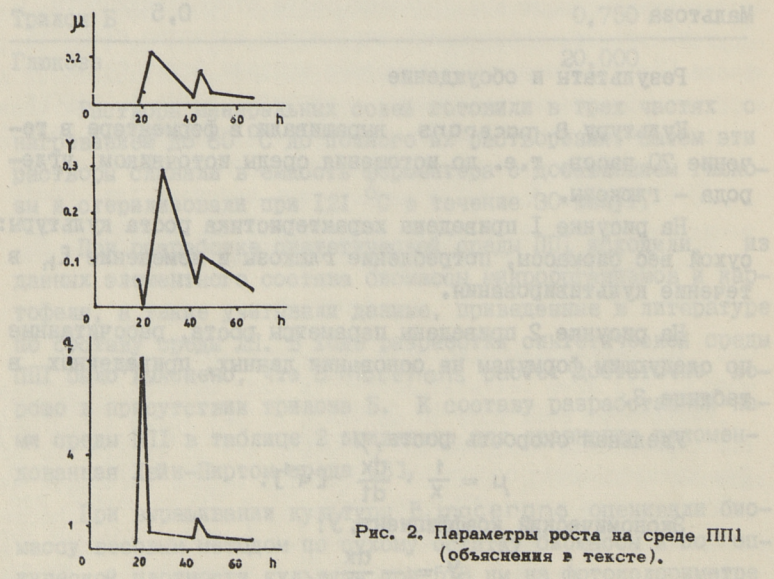


Рис. 2. Параметры роста на среде ПП1 (объяснения в тексте).

Т а б л и ц а 3

Выращивание *Bacillus masserans* ВКМВ 506 на синтетической среде III

Время, ч	Вес сухой биомассы, г/л, $\pm 0,02$	Оптическая плотность, 578 мμ	Глюкоза, г/л, $\pm 0,02$	E _h мВ	$\mu_{\frac{1}{2}}$	у	$\varphi_{\frac{1}{2}}$
0	0,06	0,11	26,13	-0,130	-	-	-
18,5	0,09	0,46	25,68	-0,175	0,016	0,06	0,266
21,0	0,10	0,52	23,69	-0,184	0,053	0,007	8,163
23,5	0,23	0,62	23,25	-0,184	0,226	0,288	0,782
42,5	0,42	1,01	19,13	-0,183	0,024	0,047	0,515
45,5	0,76	1,15	16,14	-0,182	0,149	0,113	1,320
48,5	0,92	1,20	14,47	-0,181	0,058	0,096	0,605
67,5	1,90	3,00	0	-0,180	0,027	0,067	0,400
71,0	1,78	3,44	0	-0,180	0,019	-	-

Метаболический коэффициент, q :

$$q = \frac{\mu}{Y} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} [ч^{-1}],$$

которые характеризуют соответственно μ – скорость образования биомассы, Y – образование биомассы на единицу субстрата и q – скорость потребления субстрата культурой в данный момент [5].

В течение роста культуры *V. mascerans* наблюдались пe-регибы, совпадающие по времени на кривой потребления глюкозы и на кривых, иллюстрирующих образование биомассы на единицу субстрата и потребление субстрата культурой в данный момент. На рисунке 2 четко выделяются два пика. Это можно объяснить более быстрым увеличением числа микроорганизмов в условиях синхронизированного деления. Известно, что деление становится полностью асинхронным примерно после двух генераций [5], а при объеме инокулята 10 % от объема среды образование подобных пиков вполне реально.

На основании рассчитанных параметров роста (табл. 3, рис. 2) можно также предположить, что культура *V. mascerans* имеет характер, близкий к диауксическому росту. Причина и механизм этого явления остаются пока невыясненными.

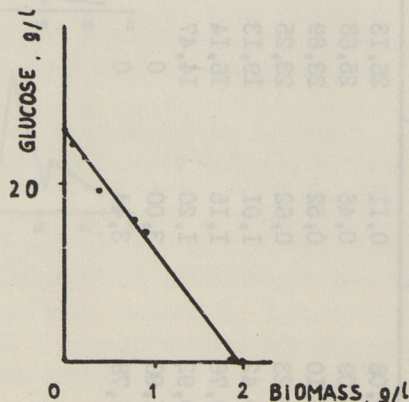


Рис. 3. Влияние концентрации глюкозы на выход биомассы.

На рисунке 3 приведена зависимость между остаточным содержанием глюкозы и полученной биомассой. Так как приведенная зависимость линейна, то можно предположить лимитацию роста субстратом — глюкозой.

Регистрация редокспотенциала (рис. 1, табл. 3) выявила скачок потенциала на 18–20 часах культивирования. Этому соответствует быстрое уменьшение концентрации глюкозы в среде и резкое увеличение концентрации биомассы.

Сравнение разных методов оценки биомассы показывает, что зависимость сухой вес биомассы/оптическая плотность не является во всей области измерения линейной. Прямая зависимость наблюдается при низких плотностях клеточной суспензии (рис. 4). Изменение на линии совпадает с быстрым размножением культуры и резким увеличением биомассы на 18–20 часов культивирования, на что может повлиять и рассеяние света.

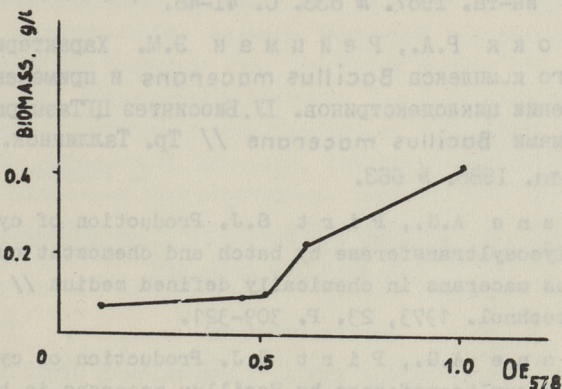


Рис. 4. Сравнение концентрации биомассы (объяснения в тексте).

Полученные результаты позволяют резюмировать, что разработанная синтетическая среда III позволяет успешно культивировать *B. macerans*. Преимущество данной среды — ее прозрачность, что позволяет оценивать рост культуры оптически, при изучении выхода биомассы отсутствие примесей позволяет избежать ошибок.

Лимитирующим фактором роста является источник углерода — глюкоза. Этот факт дает возможность регулировать рост

культуры. Косвенным методом оценки роста является и редокс-потенциал, который делает скачок перед экспоненциальной фазой.

Наиболее важным результатом при использовании предложенной среды нужно считать возможность получения чистой биомассы, необходимой для дальнейших биохимических исследований и биотехнологических разработок. Немаловажным является то обстоятельство, что среда III позволяет изучать влияние других источников углерода на синтез интересующих нас ферментов, описанных отчасти в [10].

Л и т е р а т у р а

1. П а л ь м Т.Б., В о к к Р.А., П е й п м а н Э.М., К ё с т н е р А.И. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов. I. Изучение динамики биосинтеза гликоантотрансферазного комплекса *Bacillus macerans* // Тр. Таллиннск. политехн. ин-та. 1987. № 633. С. 41-48.

2. В о к к Р.А., Р е й п м а н Э.М. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов. IV. Биосинтез ЦГТазы различными штаммами *Bacillus macerans* // Тр. Таллиннск. политехн. ин-та. 1988. № 663.

3. L a n e A.G., P i r t S.J. Production of cyclodextrin-glycosyltransferase by batch and chemostat culture of *Bacillus macerans* in chemically defined medium // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1973, 23. P. 309-321.

4. L a n e A.G., P i r t S.J. Production of cyclodextrin-glycosyltransferase by *Bacillus macerans* in batch cultures // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1971. Vol. 21, N 11. P. 330-334.

5. П е р т С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. Пер. с англ., М.: Мир; 1978. 331 с.

6. О к т я б р ь с к и й О.Н., С м и р н о в а Г.В. Редокс - потенциал как индуктор физиологического состояния бактерии в культурах с добавлением субстрата // Управл. культивир. микроорганизмов 4. Всес. конф., Пушкино, 21-23 окт. 1986. Тез. докл., Пушкино, 1986, 140 с.

7. П ш е н и ч н о в Р.А. Автоматический E_n режим регуляции развития бактериальных культур // Там же, с. 137.

8. Метаболизм микроорганизмов. Практикум / Под ред. проф. Н.С. Егорова. М.: Изд. МГУ, 1986. 256 с.

9. T e g g e G., N i e r l e W. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker in Starke Hydrolysaten // Starch/Stärke. 1965. Vol. 17, N 4. S. 107-110.

10. П е й п м а н Э.М., П а л ь м Т.Б., В о к к Р.А., К ё с т н е р А.И. Изучение индукции синтеза ЦТТ-азы *Bacillus macerans* // Биосинтез ферментов микроорганизмами. Тез. докладов IV Всес. конф., Ташкент, 19-22 сент. 1988, с. 238.

11. L a s z l o E., B a n k y B., S z e j t l i J. Vergleich der Cyclodextrin-transglykosylase - Erzeugung bei verschiedenen *Bacillus macerans* - Stämmen // Starch/Stärke. 1980. 32, N 1. S. 27-29.

Bacillus macerans'i biomassi saamismeetod

Kokkuvõte

Bacillus macerans'i kultiveerimiseks kasutatakse uut sünteetilist söödet, mis võimaldab hinnata mikroorganismi kasvuparameetreid ($\mu_{\max} = 0,226 \text{ t}^{-1}$, $Y_{\max} = 28 \%$, $q_{\max} = 8,16 \text{ t}^{-1}$). Kasvu limiteerib C-allikas. Sünteetiline sööde, mis koosneb mineraalsooladest, ei anna sadet ja on kasutatav lisanditevaba biomassi saamiseks ning edasisteks uurimusteks fermentide sekretsiooni alal.

E. Peipman, T. Palm

Eine neue Methode der Produktion der Biomasse
von *Bacillus macerans*

Zusammenfassung

Die Kultivierung des Mikroorganismus *Bacillus macerans* wird in einem neuen synthetischen Medium durchgeführt, wobei es möglich ist Wachstumsparameter auszurechnen ($\mu_{\max} = 0,226 \text{ t}^{-1}$, $Y_{\max} = 28 \%$, $q_{\max} = 8,16 \text{ t}^{-1}$). Als limitierender Faktor gilt die Kohlenstoffquelle. Synthetisches Medium, das aus Mineralsalzlösungen besteht, gibt keinen Niederschlag, und ist für's Erhalten zusätzlicher Biomasse und ihrer weiteren Nutzung verwendbar für die Untersuchung Enzymkomplexes von *Bacillus macerans*.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ

Одним из основных вопросов, определяющих эффективность производства различных циклодекстринов, является качество применяемого ферментного препарата – его активность, стабильность и степень очистки.

Возможности выделения и очистки 1,4- α -D-глюкан-4- α (1,4- α -глюкано) трансферазы КФ 2.4.1.19, продуцируемой различными штаммами р. *Bacillus*, а также культурой *Klebsiella pneumoniae*, изучены Накамурой и Хорикоши [1], Китахатой [2], Бендером [3], Яги [4] и Номото [5]. Основными методами, применяемыми авторами для получения высокоочищенной циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТ-азы), являлись адсорбция фермента на крахмале, осаждение сульфатом аммония или органическими растворителями, многократная хроматография на колонках с различными сефадексами и ДЭАЭ-целлюлозой. Кроме вышеуказанного, для выделения и очистки ЦГТ-азы описано применение метода афинной хроматографии на α -ЦД-сефарозе [6].

Исследование свойств ЦГТ-азы показало [7], что кроме циклодекстринсинтетазной и циклодекстринглюканотрансферазной активностей ферменты имеют также амилазную активность. Соотношение скоростей трансферазной и амилазной реакций определяет т.н. продуктивную активность исходного ферментного препарата [8] и тем самым является критическим параметром при оптимизации процесса получения циклодекстринов.

Исходя из вышеуказанного, целью настоящей работы являлось выделение и очистка ЦГТ-азы из выбранного нами продуцента *Bacillus macerans* ВКМБ-506 и исследование свойств полученных препаратов, в частности, влияния очистки на соотношение их амилазной и ЦГТ-азной активностей.

Материалы и методы

Работа проводилась с культуральной жидкостью B. macegans ВКМВ-506, полученной при выращивании на питательной среде, содержащей мелко нарезанный картофель [9].

ЦПТ-азная активность фермента определялась на начальной скорости синтеза β -циклодекстрина из растворимого крахмала. Концентрация циклодекстрина определялась по снижению оптической плотности раствора фенолфталейна, образующего с ним комплекс [9].

Амилазная активность ферментных препаратов определялась йодометрическим методом по начальной скорости гидролиза 1 % раствора крахмала при pH среды 6,5.

Концентрация белка в ферментных растворах определялась спектрофотометрически при 280 нм на спектрофотометре VSU-2P.

Культуральная жидкость отделялась от биомассы центрифугированием на центрофуге Janetzki K-24 при 7000 об/мин или фильтрованием на нутч-филтре.

Ультрафильтрация культуральной жидкости проводилась при $p = 4$ атм на лабораторной установке фирмы Millipore, снабженной мембраной PSAC типа Pellicon. Вакуумное упаривание культуральной жидкости проводилось на ротационной вакуумной установке при остаточном давлении $2 \cdot 10^3$ Па.

Осаждение фермента органическими растворителями осуществляли при температуре $\leq 3^\circ$ и при pH среды 6,0. В качестве органического растворителя применялись этанол и ацетон. Конечная концентрация этанола в смеси равнялась 75 %, а в случае применения ацетона — 50 %. Осаждение сульфатом аммония проводилось при этой же температуре и pH среды при концентрации осадителя до 80 % от насыщения.

Осадок фермента удаляли с помощью центрифугирования на центрифуге Janetzki K-24 при 3000 об/мин и высушивали путем лиофилизации или в вакуумном шкафу при остаточном давлении $5 \cdot 10^2$ Па. Высушенный ферментный препарат растворяли в 0.01 М ТРИС-НСI буфере и обессоливали методом диализа или гельфильтрации.

Диализ проводился против дистиллированной воды в диализных мешочках из целлофана при температуре $\leq 10^\circ$ в те-

чение 8 часов (смена диализата проводилась через 4 часа, общий объем воды - 20 л).

Гельфильтрация ферментного раствора проводилась в 0.05 М ТРИС-НСl буфере при различных значениях pH (от 7,5 до 9,0) на сефадексах Г-25, Г-75, Г-100 и на сорбентах Toyopearl HW-50 и HW-60. Хроматографический процесс осуществлялся в колонках размерами 0,9x18, 0,9x37, 1,5x36, 1,6x64 и 5x50 см.

Ионообменная хроматография ферментного раствора проводилась на ДЭАЭ-целлюлозе. При этом были использованы колонки размерами 0,5x18 и 1,6x64 см. Сорбция фермента осуществлялась при скорости потока до 60 мл/см²·ч в 0.01 М ТРИС-НСl буфере при значениях pH 7,5, 8,0, 8,5 и 9,0. Десорбция фермента проводилась путем ступенчатой элюции в градиенте NaCl от 0.2 до 2 М со скоростью не выше 30 мл/см²·ч.

Результаты и обсуждение

Исследование разных партий культуральной жидкости В. тосеганс (общий объем - 89 л) показало, что она имеет ЦТТ-азную активность от 0.04 до 0.15 Е/мл (в среднем 0.06 Е/мл), удельную активность от 0.010 до 0.028 Е/мг белка, значение pH в среднем 7,2 и содержит в значительных количествах слизистые вещества. Концентрирование такого раствора методом вакуумного упаривания или ультрафильтрации дает вязкий раствор с выходом активности в среднем 65 и 99 % соответственно. При этом нужно отметить, что скорость фильтрации с течением времени значительно снижается. В связи с этим, основное внимание было сосредоточено на осаждении ЦТТ-азы сульфатом аммония и органическими растворителями. Предварительные опыты показали, что для осаждения фермента требуется подкисление исходной культуральной жидкости до значения pH = 6,0 и концентрация сульфата аммония, этанола и ацетона соответственно не менее 70 % от насыщения, 75 и 50 %. Характерные данные исследований представлены в таблице I. Как видно из опытных данных, при осаждении сульфатом аммония достигается средняя активность ферментного препарата 22 Е/г при выходе активности 55 %, а при осаждении органическими растворителями - 40 Е/г с выходом активности

Т а б л и ц а I

Осаждение органическими растворителями и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Осадитель	кол-во	Исходный раствор			Препарат		
		А, Е/мл	Ауд, Е/мл	вес, г	А, Е/г	Ауд, Е/мл	$\gamma, \%$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70 % насыщения	4680	0.109	0.017	11.3	24.9	0.055	55
	3440	0.054	0.016	4.36	24.7	0.060	53
	5420	0.082	0.014	19.4	14.6	0.062	64
	4260	0.054	0.014	4.65	31.2	0.090	55
Этанол до 75 %	1000	0.073	0.015	1.0	44.1	0.06	60.4
	1500	0.066	0.024	1.23	37.7	0.09	48.8
	1000	0.054	0.024	0.67	40.5	0.06	50.0
Ацетон до 50 %	2250	0.055	0.011	2.58	25.8	0.095	53.8
	1000	0.087	0.019	0.93	37.7	0.048	40.0

в среднем 50 %. Удельная активность увеличивается в 4 раза. Несмотря на более высокую активность препаратов, полученных при осаждении органическими растворителями, нужно подчеркнуть преимущества применения сульфата аммония на первых этапах очистки ИТТ-азы: хорошую растворимость полученных осадков, меньшую вязкость растворов, воспроизводимость результатов, менее строгие требования к изменениям параметров процесса (осаждение и центрифугирование осадка можно проводить также при комнатной температуре).

Для удаления сульфата аммония и других низкомолекулярных веществ осажденный ферментный препарат растворяли в 0.01 М Трис-НСl буфере и подвергали диализу. Спыты показали, что диализный процесс протекает с хорошим выходом активности ($\gamma \geq 93 \%$), удельная активность фермента повышается почти в два раза. Разбавление ферментного раствора при диализе, как показали наши дальнейшие исследования, не выше, чем при гельфильтрации.

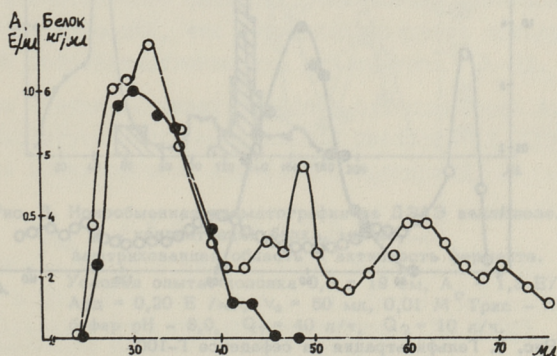


Рис. 1. Гельфильтрация на сефадексе Г-25.

○ — концентрация белка, мг/мл,

● — активность фермента, Е/мл.

Условия опыта: колонка 1,5 x 34 см, $A_0 = 2.46$ Е/мл, $A_{уд} = 0.057$ Е/мг, $v_0 = 5$ мл, 0,05 М Трис-НСl буфер pH = 7,5, $Q = 20$ мл/ч.

Исследование процесса очистки ферментного препарата на сефадексе Г-25 (рис. 1) показало, что на данном этапе достигается почти трехкратное повышение удельной активности фермента, а по сравнению с культуральной жидкостью

степень очистки его повышается приблизительно в 8 раз. Выход активности ЦТ-азы составляет в среднем 48 %. Происходит разбавление ферментного раствора в 2,5 раза.

Почти такая же картина характерна для гельфильтрации препаратов ЦТ-азы на Toyopearl HW-50, HW-60 и сефадексе Г-75, но нужно отметить более четкое разделение активной фракции от балластных белков с меньшей молекулярной массой. При гельфильтрации на сефадексе Г-75 и Toyopearl HW-60 достигается почти 5-кратное повышение удельной активности фермента, но при этом происходит также неспецифическая сорбция его на матрице, что приводит к образованию нескольких пиков с ЦТ-азной активностью, а иногда - и к значительным потерям активности. Неспецифическую сорбцию можно уменьшить добавлением метанола (5 %) или повышением ионной силы исследуемого раствора.

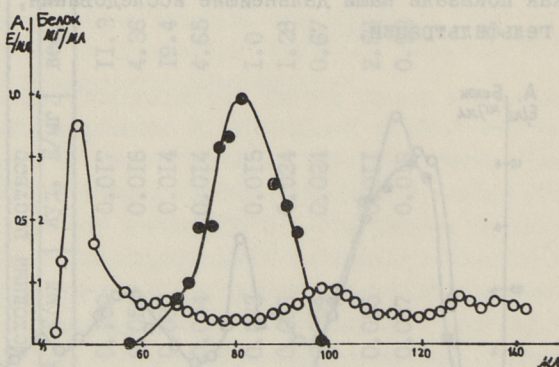


Рис. 2. Гельфильтрация на сефадексе Г-100.

○ - концентрация белка, мг/мл,
● - активность фермента, Е/мл.

Условия опыта: колонка 1,6 x 64 см, $A_0 = 2,39$ Е/мл,
 $A_{уд} = 0,105$ Е/мг, $V_0 = 4,5$ мл, 0,05 М Трис - HCl
буфер pH = 7,5, $Q = 20$ мл/ч.

При гельфильтрации препаратов ЦТ-азы на сефадексе Г-100 (рис. 2) получится четкое разделение хроматографических зон, активный белок очищается от балластных белков с более высокой молекулярной массой. При этом достигается увеличение удельной активности фермента более чем в 15 раз по сравнению с осажденным сульфатом аммония препаратом и почти

в 80 раз по сравнению с исходным культуральным раствором.

Возможность очистки ферментного препарата методом ионообменной хроматографии изучена на ДЭАЭ-целлюлозе. Сорбция ЦГТ-азы проводилась в 0,01 М ТРИС-НСl буфере при pH среды от 7,5 до 9,0, десорбция осуществлялась с помощью ступенчатой элюции в градиенте NaCl (рис. 3). Выяснилось, что наилучшее разделение ЦГТ-азной фракции от балластных достигается при pH 8,0, удельная активность фермента повышается до 6 раз, выход активности составляет в среднем 36 %.

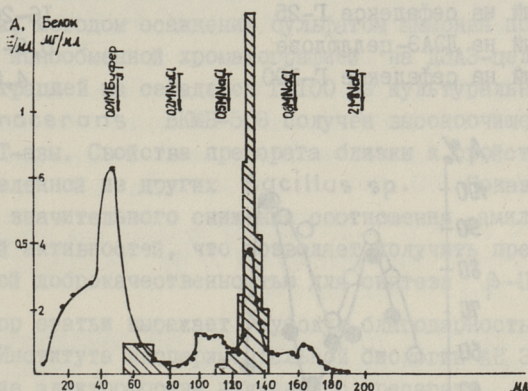


Рис. 3. Ионообменная хроматография на ДЭАЭ целлюлозе.

● — концентрация белка, мг/мл,
заштрихованная область — активность фермента.

Условия опыта: колонка 0,9 x 19 см, $A_A = 1,3$ Е/мл,
 $A_{уд} = 0,20$ Е/мг, $V_0 = 50$ мл, 0,01 М ТРИС — НСl
буфер pH — 8,0, $Q_1 = 40$ л/ч, $Q_2 = 10$ л/ч.

Исследование влияния очистки на соотношение амилазной и циклодекстринглюканотрансферазной активностей ферментного препарата ($A_A/A_{ЦГТ}$) показало (табл. 2), что в ходе очистки значение соотношения $A_A/A_{ЦГТ}$ уменьшается, т.е. увеличиваетсся доброкачественность препарата. Осаждение ЦГТ-азы сульфатом аммония и последующая очистка на ДЭАЭ-целлюлозе или сефадексе Г-100 позволяют увеличить доброкачественность более чем в 10 раз.

Очищенный ферментный препарат применяли для изучения pH, температурной и субстратной зависимости активности фер-

мента. Исследования pH-зависимости активности провели с ферментным препаратом, очищенным гельфильтрацией на сефадексе Г-100 (Ауд = 1,25 Е/мг белка).

Т а б л и ц а 2

Соотношение амилазной (A_A) и циклодекстринглюканотрансферазной ($A_{ЦТ}$) активностей

Препарат	$A_A/A_{ЦТ}$
Культуральная жидкость	52-61
Осажденный $(NH_4)_2SO_4$	18-22,6
Очищенный на сефадексе Г-25	16-20,6
Очищенный на ДЭАЭ-целлюлозе	0,5-5,0
Очищенный на сефадексе Г-100	4,8

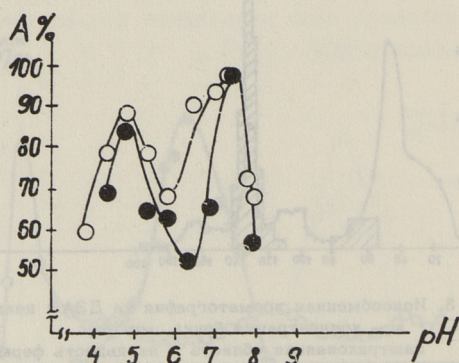


Рис. 4. pH — зависимость активности фермента.

● — неочищенный, ○ — очищенный ферментный препарат.

Опыты показали (рис. 4), что pH-зависимость активности этого фермента, как и неочищенного, имеет два максимума — при значении pH 5,0 и pH 7,5. Сохраняется соотношение активностей при разных pH. Это подтверждает наше предположение о том, что ЦТ-аза действительно проявляет сложную зависимость активности от pH, а не является смесью двух изоферментов. Изучение температурной зависимости активности очищенного фермента было проведено при температурах от 30 до

65 °C. Выяснилось, что энергия активации реакции синтеза циклодекстринов равняется 28,7 кДж/моль, температурный оптимум – 50 °C. Субстратная зависимость активности определена при температуре 30 °C и pH среды 7,5. Концентрацию субстрата – растворимого крахмала – в реакционной смеси изменяли от 2 до 45 г/л. Обработка опытных данных в координатах $[S]_0/V_0 - [S]_0$ дала значение $K_m = 3,45$ г/л, что согласуется с литературными данными для этого фермента [10].

По данным электрофореза в 7,5%-ном ПААГ-е с додецилсульфатом натрия при pH 8,5 молекулярная масса фермента составляет 60–68 тыс.

Итак, методом осаждения сульфатом аммония последующей очисткой ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе и гельфильтрацией на сефадексе Г-100 из культуральной жидкости *B. macerans* ВКМВ-506 получен высокоочищенный препарат ЦТ-азы. Свойства препарата близки к свойствам ЦТ-азы, выделенной из других *Bacillus* sp. Показана возможность значительного снижения соотношения амилазной и ЦТ-азной активностей, что позволяет получить препарат с повышенной доброкачественностью для синтеза β -ЦД.

Автор статьи выражает глубокую благодарность А. Палутеру из Института экспериментальной биологии АН ЭССР за проведение электрофореза изученного препарата.

Л и т е р а т у р а

1. Horikoshi K., Nakamura N., Matzuzawa N., Yamamoto M. Industrial production of cyclodextrins // 1. Int. Symp. on Cyclodextrins. 1981. P. 25–41.

2. Kitahata S., Tsuyama N., Okada S. Purification and some properties of cyclodextrin glycosyltransferase from a strain of *Bacillus* species // Agr. Biol. Chem. 1974. Vol. 38. P. 387–393.

3. Bender H. Cyclodextrin-Glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae*. 1. Synthese, Reinigung und Eigenschaften des Enzyms von *K. pneumoniae* M 5 al. // Arch. Microbiol. 1977. Vol. 111. P. 271–282.

4. Yagi Y., Sato M., Ishikura T. Com-

parative studies of CGT-ase from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those CGT-ases // J. Jpn. Soc. Starch Sci. 1986. Vol. 33. P. 144-151.

5. Nomoto M., Chen C-C., Shen D-C. Purification and characterization of cyclodextrin glycanotransferase from an alkalophilic bacterium of Taiwan // Agric. Biol. Chem. 1986. Vol. 50. P. 2701-2707.

6. Mäkelä M., Mattsson P., Schinina M.E., Korpela T. Purification and properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* // Biotechnol. and Applied Biochem. 1988. P. 1-14.

7. Kobayashi S., Kainuma K., Suzuki S. Purification and some properties of *Bacillus macerans* cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase // Carbohydr. Res. 1978. Vol. 61. P. 229-238.

8. Кёстнер А.И. Целевая функция при биокаталитическом получении циклодекстринов // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1988. № 663. С. 3-II.

9. Паппель К.Э., Вокк Р.А. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1987. № 633. С. 76-82.

10. De Pinto J.A., Campbell L.L. Purification and properties of the amylase of *Bacillus macerans* // Biochemistry. 1968. Vol. 7., N 1. P. 114-121.

K. Pappel

Tsüklodekstriinglukaanotransferaasi eraldamine

ja puhastamine

Kokkuvõte

Uuriti *B. macerans*'i poolt produtseeritud tsüklodekstriinglukaanotransferaasi (CGT-aasi) eraldamise ja puhastamise võimalusi. Ensüüm eraldati kulturaallahusest orgaaniliste lahustitega või $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ga sadestamisel. Saadud preparaati puhastati, kasutades geelfiltratsiooni Sephadexidel G-25, G-75, G-100, sorbentidel Toyapearl HW-50, Toyapearl HW-60 jaioonvahetuskromatograafiat DEAE-tselluloosil. Puhastamisel saavutati 80-kordne ensüümi eraktiivsuse tõus. Näidati, et on võimalik vähendada preparaatide amülaasse ja CGT-aasse aktiivsuse suhet, mis võimaldab tõsta preparaatide kvaliteeti tsüklodekstriinide sünteesil.

Uuriti puhastatud preparaatide aktiivsuse pH-, temperatuuri- ja substratsõltuvust.

K. Pappel

Separation and Purification of Cyclodextrin-glucanotransferase

Abstract

Possibilities of separation and purification of cyclodextrin-glucanotransferase produced by *B. macerans* have been studied. The enzyme was precipitated from cultural fluid with organic solvents or ammonium sulphate. The gel filtration with Sephadex G-25, G-75, G-100, Toyapearl HW-50, HW-60 and ion exchange chromatography with DEAE-cellulose have been used for purification of preparations obtained. As a result the specific activity of enzyme increased as much as 80 times if compared with initial preparations. A conclusion can be drawn that it is possible to decrease the ratio of amylase and cyclodextrin-glucanotransferase activity of the preparation which enables to improve the quality of enzyme for the cyclodextrines synthesis.

Dependence of the activity of preparations on the pH, temperature and substrate concentration has been studied too.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ ТОЛУОЛА
В β -ЦИКЛОДЕКСТРИНЕ

β -циклодекстрин (β -ЦД) получают ферментативным путем из крахмала. По одному из наиболее простых способов синтеза β -ЦД проводят при наличии толуола [1]. Однако толуол является токсическим веществом. Максимально допустимое содержание толуола в фармацевтических препаратах и, следовательно, в β -ЦД, который может быть применен в таблетках, равняется $10 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ [2]. Остаточное содержание толуола в β -ЦД должно быть под контролем. Нижеизложенная методика контроля выработана нами, так как в литературе мы не нашли достаточно чувствительной методики, которая была бы доступной для рядовых цеховых лабораторий.

Описание методики определения остаточного
содержания толуола в β -ЦД

Взвешивают 50 г β -ЦД (или другое количество β -ЦД, содержащее от 0,05 до 1 мг толуола), в 200 мл плоскодонную дистилляционную колбу, снабженную магнитной мешалкой. Приливают 90 мл горячей дистиллированной воды и 10 мл этанола. Сразу присоединяют колбу к стеклянной дистилляционной аппаратуре со стеклянными соединениями и проводят дистилляцию. Собирают три фракции по 2-3 мл в стеклянные пробирки со шлифованными горлышками, которые закрывают стеклянными пробками сразу после отнятия от дистилляционной аппаратуры. Определяют объемы фракций и профили оптической плотности против дистилляционной воды в 1 см кюветах на сканирующем спектрофотометре (например, "Спекорд УВ-ВИС", ГДР) в диапазоне волновых чисел от 50 000 до $34 000 \text{ см}^{-1}$. При

получении характерного для толуола профиля (по [3] см. рис. 1а) считают высоту пика при волновом числе около $38\,500\text{ см}^{-1}$, т.е. при длине волны около 260 нм , соответствующей оптической плотности A_{260} . Зная молекулярную массу толуола ($M = 92$) и коэффициент молярной экстинкции толуола ($\epsilon_{260} = 300$), вычисляют содержание толуола во фракциях:

$$C = \frac{A \cdot M}{\epsilon_{260}} = A \cdot 0,307\text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}.$$

Толуол, как правило, входит в первую фракцию, но когда он обнаруживается и в следующих фракциях, то его содержание вычисляют таким же способом. Затем вычисляют содержание толуола в β -ЦД

$$C = \frac{c_1 V_1 + c_2 V_2 + \dots}{G \cdot 0,75}\text{ мг}\cdot\text{кг}^{-1},$$

где $V_1, V_2, \dots$ — объемы фракций, мл;

$c_1, c_2, \dots$ — содержание толуола во фракциях, $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$;

G — количество β -ЦД в дистиляционной колбе, кг;

$0,75$ — коэффициент, который учитывает, что в среднем около 75% толуола обнаруживается в дистиillате.

Теоретические основы, результаты опытов и обсуждение

Толуол имеет характерный профиль оптической плотности в интервале длин волны от 200 до 280 нм с острыми пиками при 260 и 268 нм (волновые числа $38\,500$ и $37\,200\text{ см}^{-1}$ соответственно) [3]. Известно, что коэффициент молярной экстинкции при $\lambda = 260\text{ нм}$ ($\lg \epsilon_{260} = 2,48$ [4]). Вычисление концентрации толуола в измеряемой пробе основывается на законе Ламберта-Бера, который может быть записан следующим образом:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot d,$$

где A — оптическая плотность измеряемого раствора при данной длине волны;

ϵ — коэффициент молярной экстинкции толуола при данной длине волны;

c — концентрация толуола в измеряемом растворе в молях на литр;

d — толщина кюветы, см.

Нормальный предел оптической плотности при измерении на спектрофотометре "Спекорд" является от 0,1 до 1,4. Этим величинам соответствует концентрация толуола в измеряемом растворе от 30 до 500 мг·кг⁻¹. Так как исследуемый β -ЦД может содержать толуол только до 10 мг·кг⁻¹, то суть данной методики состоит в извлечении толуола из относительно большого количества β -ЦД (10–50 г) и получении относительно маленького количества (2–5 мл) раствора, где содержание толуола достаточно высокое для измерения, т.е. на порядок выше, чем в β -ЦД. При этом растворитель не должен иметь оптическую плотность в пределах измерения толуола.

С β -ЦД толуол образует комплексное соединение, которое при нагревании в воде разлагается [1] и освободившийся толуол дистиллируется водяным паром. Температура кипения толуола (110,6 °C) уменьшается при наличии водяного пара до 85 °C [4].

Для изучения количественности перевода толуола в дистиллят мы проводили дистилляцию и ректификацию слабых водных растворов толуола (от 2 до 37 мг·кг⁻¹). Данные приведены в таблице I, опыты I, 2, II, I2, I3 и на рисунке Iг. Потери составляли 85–100 %, хотя растворимость толуола в воде (450 мг·кг⁻¹ при 20 °C и 3750 мг·кг⁻¹ при 90 °C) является достаточной для образования гомогенного дистиллята. Потери толуола обусловлены очевидно тем, что при дистилляции, а особенно при ректификации толуол может сконцентрироваться до гетерогенного состояния (азеотроп с содержанием толуола (81 %) и воды (19 %) является гетерогенным) и улетучивается перед тем, когда снова растворяется в воде конденсата.

Необходимо было найти растворитель, в котором толуол лучше растворяется. Оказалось, что хорошие результаты можно получать в случае прибавления этанола в дистилляционную колбу. Этанол образует с толуолом и водой гетерогенный азеотроп в соотношении 37,0:51,0:12,0 с температурой кипения 74,4 °C. Кроме того, образуется гомогенный азеотроп этанол-толуол (68,0:32,0, темп. кипения 76,8 °C) и гомогенный азеотроп этанол-вода (95,5:4,5, темп. кипения 78,0 °C) [4]. Толуол растворим в этаноле в любом соотношении. Таким образом, если толуол отделяется при охлаждении паров гетеро-

Т а б л и ц а I

Дистилляция и ректификация слабых растворов
толуола в воде

№ п/п	Содер- жание толуола в исход- ном ра- створе, мг. кг ⁻¹	Объем ис- ходного раствора/ объем этанола, мл/мл	Содер- жание толуола в ди- стилля- те, мг. кг ⁻¹ *	Объем фрак- ции, мл	Общее со- держание толуола в дистилля- те в % от исходного	Темпера- тура па- ров в конце отбора фракции, °C
I	2	3	4	5	6	7
Дистилляция						
I	4	52/0	7	4,3	15	100
**2	37	50/0	I фр. 40	3,8	10	100
			II фр. II	3,9		100
3	20	50/10	170	4,6	78	90
4	20	50/5	247	3,2	79	95
5	20	50/2	180	2,2	40	98
6	20	50/1	122	2,4	29	99
7	10	22/2	39	4,7	78	90
8	4	52/5	47	4,6	92	96
9	2	102/10	36	4,7	83	94
10	1	52,5	37	3,7	92	90
Ректификация						
11	2	52/10	0	4,6	0	100
12	4	52/0	0	2,9	0	100
13	37	50/0	37	3,9	8	100
14	8	22/2	32	2,5	42	100
15	3,5	52/5	51	3,9	100	80
16	2	102/10	57	2,6	75	78
17	9	55/5	110	3,2	74	80
18	20	50/5	250	3,2	80	78

* - толуол обнаруживали только в первой фракции, если не указано иначе

** - специально исследовали кубовой остаток, в котором не обнаруживали толуола ни прямым измерением, ни в дистилляте после дистилляции при наличии этанола.

генного азеотропа, его улетучивание затруднено, так как толуол легко растворяется в окружающем этаноле, образуя конденсат в виде гомогенного раствора толуола и воды в этаноле.

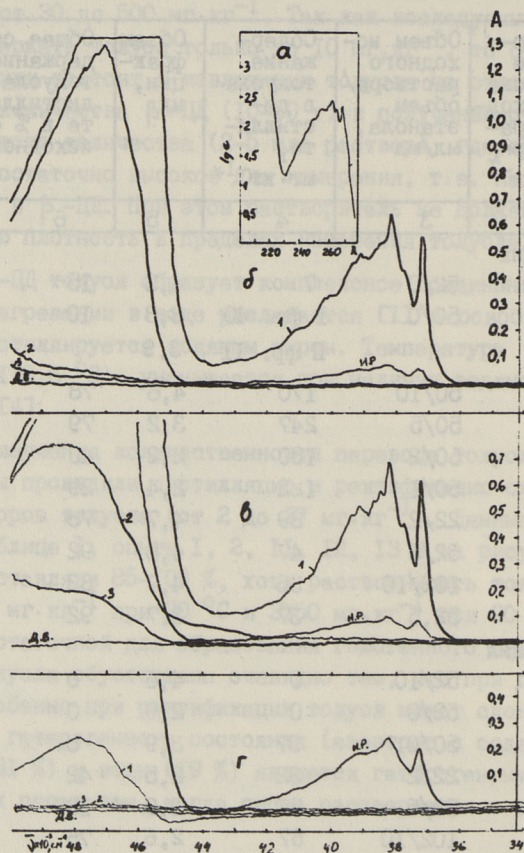


Рис. 1. а) зависимость коэффициента молярной экстинкции толуола (ϵ) от длины волны (λ) [3],
 б-г) зависимость оптической плотности от волнового числа,
 б,в) 50 мл раствора толуола в дист. воде (содержание толуола $20 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) + 5 мл этанола. Объем фракции 3,2 мл.
 б - дистилляция, в - ректификация,
 г) 2 мл раствора толуола в дист. воде (содержание толуола $96 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) + 50 мл дист. воды, ректификация.
 Номера при кривых означают номера фракций.
 ДВ - дист. вода, ИР - исходный раствор толуола.

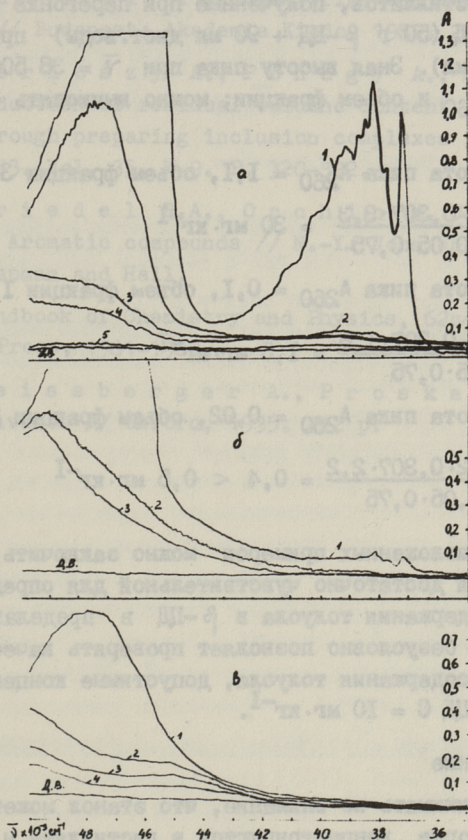


Рис. 2. Зависимость оптической плотности (A) от волнового числа ($\bar{\nu}$).

- а) 50 г β -ЦД (содержание толуола $30 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) + 90 мл дист. воды + 10 мл этанола. Объем фракции 3,3 мл.
 б) 50 г β -ЦД (содержание толуола $1,5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) + 90 мл дист. воды + 10 мл этанола. Объем фракции 1,8 мл.
 в) 50 г β -ЦД (содержание толуола ниже $0,5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) + 90 мл дист. воды + 10 мл этанола. Объем фракции 2,2 мл.

Как видно из таблицы I, опыты 4, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17 и 18, не менее 75 % от исходного толуола обнаруживается в дистилляте и именно в первых 2-3 мл, т.е. в первой фракции, если количество этанола равно 10 % от количества воды в дистилляционной колбе. Опыты 4 и 18 из таблицы I приведены соответственно на рисунках 1б и 1в.

На рисунке 2 приведены некоторые профили оптической плотности дистиллятов, полученные при перегонке водных растворов β -ИД (50 г β -ИД + 90 мл дист. воды) при наличии этанола (10 мл). Зная высоту пика при $\bar{\nu} = 38\,500\text{ см}^{-1}$ ($\lambda = 260\text{ нм}$) A_{260} и объем фракции; можно вычислять содержание толуола:

Рис. 2а: высота пика $A_{260} = 1,1$, объем фракции 3,3 мл,

$$C = \frac{1,1 \cdot 0,307 \cdot 3,3}{0,05 \cdot 0,75} = 30\text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$$

Рис. 2б: высота пика $A_{260} = 0,1$, объем фракции 1,8 мл,

$$C = \frac{0,1 \cdot 0,307 \cdot 1,8}{0,05 \cdot 0,75} = 1,5\text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$$

Рис. 2в: высота пика $A_{260} = 0,02$, объем фракции 2,2 мл,

$$C = \frac{0,02 \cdot 0,307 \cdot 2,2}{0,05 \cdot 0,75} = 0,4 < 0,5\text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$$

Из вышеизложенных примеров можно заключить, что методика является достаточно чувствительной для определения остаточного содержания толуола в β -ИД в пределах до 1–10 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ и безусловно позволяет проверять качество β -ИД в отношении содержания толуола, допустимые концентрации которого в β -ИД $C = 10\text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$.

Примечание

Надо принимать во внимание, что этанол может содержать примеси, которые концентрируются в дистилляте и увеличивают показатель оптической плотности. Для определения годности этанола для данного метода перегоняют смесь из 50 мл дист. воды и 5 мл этанола, берут фракции по 2–3 мл и определяют оптическую плотность в интервале волновых чисел от 40 000 до 34 000 см^{-1} . Если этанол содержит оптически активные примеси, надо их учитывать при расчете или провести дополнительную очистку этанола.

Очистку этанола для оптических измерений можно провести по Вейгерту [5]. К 1 л этанола прибавляют 1 г йода, выдерживают одни сутки и перегоняют. Далее обрабатывают среднюю фракцию дистиллята; прибавляют чистый порошок цинка и перегоняют для удаления следов йода. Очищенный этанол при необходимости сушат над известью и снова перегоняют.

Л и т е р а т у р а

1. S z e j t l i J. Cyclodextrins and their inclusion complexes // Budapest: Akademia Kiado, 1982. 269 p.
2. G e r l ó s z y A., P ó n a g y A., S z e j t l i J. Reduction of residual toluene content in β -cyclodextrin through preparing inclusion complexes // Starch/Stärke. 1983. Vol. 35. N 9. P. 320-322.
3. F r i e d e l R.A., O r c h i n M. Ultraviolet Spectra of Aromatic compounds // N.-Y.: John Wiley and Sons, London: Chapman and Hall.
4. Handbook of Chemistry and Physics, 62nd ed. // Florida: CPC-Press, 1981-1982.
5. W e i s s b e r g e r A., P r o s k a u e r E. Organic solvents // Oxford, 1935. 212 p.

V. Krosing, R. Vokk

Tolueeni ^{****}jaaksisalduse ^{****}maaramine β -tsüklodekstriinis

Kokkuvõte

Meetod võimaldab määrata tolueenisaldust β -tsüklodekstriinis, kui $C \geq 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Protseduur sisaldab kaks etappi:

1) tolueeni eraldamine ja kontsentreerimine β -tsüklodekstriini vesi-etanoolse lahuse aseetropseel destillatsioonil ja

2) tolueeni ^{****}maaramine destillaadis skaneeriva spektrofotomeetriga ("Specord UV-VIS", SDV).

V. Krosing, R. Vokk

Determination of Toluene in β -Cyclodextrin

Abstract

By this method one can determine the content of toluene, C, in β -cyclodextrin, if $C \geq 1 \text{ p.p.m.}$

The procedure consists of two stages:

- 1) azeotropic distillation of toluene from the solution of β -cyclodextrin in the water and ethanole mixture;
- 2) determination of concentration of toluene in the destillate by scanning spectrophotometre ("Specord", GDR).

СОЕДИНЕНИЯ ВКЛЮЧЕНИЯ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА С БЕНЗИЛОВЫМ СПИРТОМ

Циклодекстрины (ЦД) находят широкое применение в практике, в частности, в фармацевтической и пищевой промышленности [1, 2]. Основным характерным свойством ЦД следует считать их способность образовывать молекулярные комплексы, соединения включения со многими неорганическими и органическими веществами. Исследование молекулярных комплексов ЦД имеет самостоятельное теоретическое значение. В то же время оно способствует целенаправленному решению конкретных технологических задач, прежде всего связанных со стабилизацией и консервацией химических соединений. В фундаментальных работах Сейтли [3], Бендера и Комияма [4] даны основные сведения о химии ЦД и их соединений включения, а также о методах исследования образования и свойств комплексов.

До сих пор прямые термохимические методы для этой цели применялись относительно мало [5-7]. Нами показано, что проточные системы современных микрокалориметров можно успешно использовать для определения значений констант диссоциации молекулярных комплексов и изменений энтальпии комплексообразования, что позволяет также вычислять изменения свободной энергии и энтропии [8, 9]. На примере бензойной кислоты как молекулы-гостя нашло подтверждение, что для комплексов ее с α - и β -циклодекстрином (β -ЦД) преобладающим типом комплекса является 1:1, но для γ -ЦД вероятно одновременное существование в водных растворах комплексов γ -ЦД: бензойная кислота 1:1 и 1:2.

В настоящей статье приводятся результаты микрокалориметрического исследования образования соединений включения β -ЦД с бензиловым спиртом при разных значениях pH. β -ЦД

и бензиловый спирт (БС) являются практически недиссоциирующими соединениями, влияние рН на их структуру, очевидно, незначительное. Поэтому, по всей вероятности, незначительно также влияние рН на комплексообразование между β -ЦД и БС. В данной работе эта гипотеза подвергалась экспериментальной проверке.

Материалы и методы

Для опытов применялись водные растворы β -ЦД (фирма "Chinoïn", ВНР) и бензинового спирта ("ХЧ"), рН которых доводили до нужного значения с помощью HCl или NaOH. Измерения проведены на микрокалориметре ЛКБ 2277 ("Монитор биоактивности") в проточной ячейке со смешиванием (flow - mix) при 30 °С. Использовался двухканальный перистальтический насос ЛКБ-2132. Применялась суммарная проточная скорость растворов 0,00548 мл/с (19,73 мл/ч), 0,00274 мл/с на обоих каналах. Экспериментальные данные в виде комплектов зависимости отвечающего комплексообразованию теплового потока от исходных концентраций β -ЦД и бензинового спирта подлежали математической обработке по методике, описанной нами ранее [9]. Значение названного теплового потока найдено вычитанием из суммарного теплового потока значений эффектов, отвечающих разбавлению исходных растворов.

Результаты и обсуждение

Опыты проведены при трех значениях рН: 5,5 (растворы в дистиллированной воде), 2,0 (прибавление HCl) и 10,0 (прибавление NaOH).

Результаты определения тепловых эффектов комплексообразования приведены в таблице I.

Для сравнения в таблице даны также соответствующие вычисленные в ходе математической обработки величины и процентное значение β -ЦД в комплексах.

Как видно из таблицы, вычисленные по найденным величинам констант диссоциации и ΔH комплексообразования значения теплового потока близки к экспериментальным. Это означает, что выбранная модель комплексообразования, соот-

ветствующая существованию в растворах единственного комплекса с молярным соотношением компонентов 1:1, адекватно описывает экспериментальные данные и поэтому выбор более сложной модели неоправдан.

Т а б л и ц а I

Термохимическое исследование комплексов β -ЦД
с бензиловым спиртом (БС) в водных растворах
при 30 °С

рН раствора	Концентрация после разбавления, мм		Молярное соотношение БС: β -ЦД	Тепловой поток N, мкВт		β -ЦД в комплексе, %
	[C] ₀ (β_2 -ЦД)	[S] ₀ (БС)		эксп.	выч.	
I	2	3	4	5	6	7
2,0	0,646	48,6	75,2	31,5	26,3	49,4
	1,30	48,6	37,5	63	52,5	49,2
	2,58	48,6	18,8	115	104	48,9
	3,88	48,6	12,5	162,5	155	48,6
	5,17	48,6	9,40	210	205	48,2
	5,54	48,6	8,77	225	220	48,1
	5,97	48,6	8,14	230	236	48,0
	6,46	48,6	7,52	255	255	47,9
	7,76	48,6	6,26	300	304	47,6
	7,76	8,09	1,04	81	80	12,6
	7,76	12,2	1,57	116	115	17,9
	7,76	24,3	3,13	194	196	30,7
	7,76	48,6	6,26	297	304	47,6
5,5	7,67	6,42	0,84	61,5	61,4	10,6
	7,67	8,56	1,12	79,5	79,4	13,7
	7,67	11,4	1,49	101	102	17,5
	7,67	12,8	1,67	112	112	19,3
	7,67	25,7	3,35	190	191	32,8
	7,67	34,2	4,46	232	230	39,6
	7,67	51,3	6,69	290	291	50,0
10,0	1,19	51,4	43,1	51,5	42,7	54,8
	2,38	51,4	21,6	100	84,9	54,5
	2,46	51,4	29,9	115	87,6	54,5

1	2	3	4	5	6	7
	2,82	51,4	18,2	118	100	54,4
	3,28	51,4	15,7	134	116	54,3
	3,94	51,4	13,0	165	139	54,1
	4,26	51,4	12,1	203	150	54,0
	4,47	51,4	11,5	190	157	54,0
	5,12	51,4	10,0	213	179	53,8
	5,97	51,4	8,61	228	209	53,6
	9,05	51,4	5,68	315	312	52,7
	11,75	51,4	4,37	370	399	52,0
	14,09	51,4	3,65	453	473	51,4
	16,44	51,4	3,13	518	545	50,7

В сводной таблице 2 приведены данные математической обработки – значения констант диссоциации комплексов, ΔH комплексообразования и вычисленных на их базе величин ΔG и ΔS .

Т а б л и ц а 2

Значения термодинамических параметров комплексообразования и констант диссоциации для комплексов β -ЦД с бензиловым спиртом при 30 °С

рН	Константа диссоциации	ΔG		ΔH		ΔS
		$\frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$	$\frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$	$\frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$	$\frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$	$\frac{\text{Дж}}{\text{моль} \cdot \text{К}}$
2	$0,050 \pm 0,002$	$-7,6 \pm 0,2$	$-1,8 \pm 0,1$	$-15,0 \pm 0,7$	$-3,6 \pm 0,2$	-25 ± 3
5,5	$0,048 \pm 0,002$	$-7,7 \pm 0,2$	$-1,8 \pm 0,1$	$-13,8 \pm 0,7$	$-3,3 \pm 0,2$	-20 ± 2
10	$0,042 \pm 0,002$	$-8,0 \pm 0,2$	$-1,9 \pm 0,1$	$-12,9 \pm 0,6$	$-3,1 \pm 0,2$	-13 ± 1

Результаты вычислений показывают, что бензиловый спирт образует с β -ЦД в водных растворах относительно неустойчивые молекулярные комплексы с константой диссоциации 0,04–0,05 м, что соответствует изменению свободной энергии –8 кДж/моль. Комплексообразование относительно слабо зависит от рН раствора. Это неудивительно, так как струк-

туры β -ЦД и ЕС как весьма нейтральных соединений с первичными и вторичными гидроксильными группами под действием протонов и гидроксильных ионов мало изменяются. Несмотря на то, что ΔG и ΔH комплексообразования относительно слабо зависят от pH, их изменение закономерное и суммируется при расчете изменения энтропии, в результате чего в кислых средах обнаруживается больший рост упорядоченности системы.

Л и т е р а т у р а

1. Т г о р о в Н.С., К ё с т н е р А.И., В о к к Р.А. История исследования циклодекстринов, свойства и области их применения // Итоги науки и техники, ВИНТИ, Микробиология. 1988. Т. 20. С. 4-52.

2. П а л ь м Т.Б. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов. I. Изучение динамики биосинтеза глюко-трансферазного комплекса *Bacillus macerans* // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1987. № 633. С. 41-48.

3. S z e j t l i J. Cyclodextrins and their inclusion complexes // Budapest: Akadémiai Kiadó, 1982. 104 p.

4. B e n d e r M.I., K o m i y a m a M. Cyclodextrin Chemistry // Berlin: Springer Verlag, 1978. 91 p.

5. E f t i n k M.R., H a r r i s o n J.C. Calorimetric studies of p-nitrophenol binding to α - and β -cyclodextrin // Bioorg. Chem. 1981. Vol. 10. P. 388-398.

6. T a k e o K., K u g e T. Complexes of starch and related materials with organic compounds. VIII. Measurement of the heats of complex formation of cyclodextrin in aqueous solutions by microcalorimeter // Stärke. 1972. N 10. P. 331-336.

7. B i l t o n e n R.L., L a n g e r m a n N. Microcalorimetry for biological chemistry: experimental design, data analysis and interpretation // Methods in enzymology / Hins C.H.W., Timasheff S.N. New York: Academic Press. 1979. P. 287- 317.

8. S i i m e r E., K u r v i t s M., K ö s t n e r A. Thermochemical investigation of β -cyclodextrin comp-

lexes with benzoic acid and sodium benzoate // Thermochim. Acta. 1987. Vol. 116. P. 249-256.

9. Siimer E., Kurvits M. Calorimetric studies of benzoic acid - cyclodextrin inclusion complexes // Thermochim. Acta. 1988. Vol. 40. P. 161-168.

M. Kurvits, E. Siimer

β -tsüklodekstriini kompleksühendid bensüülalkoholiga

Kokkuvõte

β -tsüklodekstriini (β -CD) ja bensüülalkoholi (BA) kompleksi moodustumist vesilahustes uuriti mikrokalorimeetriliselt 30 °C juures vesilahustes. β -CD moodustab bensüülalkoholiga suhteliselt nõrga 1:1 kompleksi, vaba energia muutus - 8 kJ/mol. Uuriti dissotsiatsioonikonstandi ja termodünaamiliste parameetrite väärtuste sõltuvust pH-st ja näidati, et vastavad väärtused sõltuvad pH-st vähe.

M. Kurvits, E. Siimer

Inclusion Compounds of β -Cyclodextrin with Benzyl Alcohol

Abstract

The formation of molecular complexes between β -cyclodextrin (β -CD) and benzyl alcohol (BA) has been studied microcalorimetrically at 30 °C in water solutions. β -CD forms with BA relatively weak inclusion complexes 1:1 with the change of the free energy about -8kJ/mole. It has been shown that the dependence of the values of the dissociation constant and thermodynamic parameters on pH of solutions is not essential.

А.А. Менерт, Р.Ф. Лаас, М.И. Крезн

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПЛЕКСО-
ОБРАЗОВАНИЯ УКРОПНОГО И ЛАВРОВОГО МАСЛА
С БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

При хранении пищевых продуктов содержание вкусовых и ароматических веществ в них постоянно уменьшается и в то же время меняются в нежелательном направлении соотношения между ними. В концентрированных препаратах, т.н. эфирных маслах ароматические вещества являются еще более нестабильными. Способом, обладающим большей стабилизирующей способностью, является заключение ароматических веществ в комплексы с циклодекстринами (в дальнейшем ЦД). Уже в 1978 году Сейтли и сотр. запатентовали способ [1] получения комплекса β -ЦД с эссенцией лука путем выкристаллизации комплекса из спиртово-водного раствора. По этому т.н. раствор-раствор способу получены комплексы β -ЦД с эфирными маслами таких специй, как лук репчатый (*Allium cepa*) [2, 3], лук чеснок (*Allium sativum*) [2, 3], тимьян обыкновенный (*Thymus vulgaris*) [2, 4], укроп пахучий (*Anethum graveolens*) [2, 3, 4], тмин обыкновенный (*Carum carvi*) [2, 3], любисток аптечный (*Levisticum officinale*) [2], майоран садовый (*Majorana hortensis*) [2], горчица черная (*Brassica nigra*) [2], розмарин (*Rosmarinus officinalis*) [2], шалфей мускатный (*Salvia sclarea*) [4], мускатник душистый (*Myristica fragrans*) [4, 5], а также с синтетической малиновой эссенцией [6]. Известны также комплексы ЦД с отдельными компонентами эфирных масел или с фракциями определенной температуры кипения [7]. Комплексообразование анетолы, d-камфоры, линалолы, лимонена и других существенных компонентов многих эфирных масел с α - или β -ЦД значительно уменьшало их летучесть и фотооксидацию [8].

Несмотря на многочисленность изготовленных комплексов ЦД с вкусовыми и ароматическими веществами до сих пор довольно редко эти комплексы находят тщательную количественную характеристику. Известно, что комплекс эфирного масла лука с β -ЦД содержит 6,8 % действующего вещества [1], а в комплексе β -ЦД с синтетической эссенцией малины содержание последней составляет 8,7 % [6]. Основным способом при исследовании как нативных, так и комплексированных эфирных масел является газовая хроматография [9, 10]. Но наряду с этим для определения эфирных масел в некоторых случаях применяется более простой и быстрый спектрофотометрический способ [10].

Целью данной работы мы ставили количественную характеристику процессов образования комплексов, их стабильности и возможности выделения компонентов из комплекса с применением УФ-спектрофотометрии.

Материалы и методы

В работе использовали β -ЦД, синтезированные в лаборатории биотехнологии ТПИ и на подсобном предприятии "Биоэстрон" колхоза Куусалу, эфирное масло укропа (*Anethum graveolens* L.) и эфирное масло лавра (*Laurus nobilis* L.) - представленные нам Грузинским НИИ пищевой промышленности ГАПК СССР и укропное масло, выпущенное Хадженским эфирно-масличным совхоз-заводом.

Комплексы β -ЦД с маслами приготовили по методу раствор-раствор, описанному И. Сейтли [6]. Метод заключается в тщательном перемешивании 5,5%-ного раствора β -ЦД в спиртово-водной смеси с соотношением 1:3 и эфирного масла при температуре 50 °C и в последующей выкристаллизации комплекса при медленном охлаждении до комнатной температуры (в течение 4-4,5 часов) и в дальнейшем до нуля, и выдерживали при этом в течение 16 часов. Кристаллы отделяли фильтрованием.

Содержание эфирных масел в комплексах определяли методом УФ-спектрофотометрии, используя спектрофотометр "Spectord UV-Vis" (Carl Zeiss, Jena). При интерпретации спектров были использованы литературные данные о спектральных ха-

характеристиках типичных компонентов исследованных эфирных масел (см. табл. I).

Т а б л и ц а I

Характеристика компонентов укропного и лаврового эфирных масел (литературные данные)

Компонент	Содержание, %		$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\lg E_m$	Растворитель	Ссылка на литературу
	в укропном масле	в лавровом масле				
d-лимонен	15,6	1,7	273		этанол	[10, II]
α -Фелландрен	+	0,5	263	3,40	этанол	[10, II, I2]
β -Фелландрен	+	0,6	231	3,96	гексан	[10, II, I2]
α -Терпинен	+	0,3	262	3,55	этанол	[10, II, I2]
Мирцен	-	2,5	225	4,25	этанол	[10, II, I2]
n-Цимол	-	1,7	212	3,76		
			217	3,74		
			259	2,40		
			265	2,53		[11, I2]
			267	2,52		
			273	2,60		
Всего моно-терпенов	50,5	36,0				[10, II]
Карвон	37,9	-	235	4,28		[10, I2]
			237	3,94		[13]

При исследовании разлагаемости комплексов компоненты масел отделяли от β -ЦД методом азеотропной ректификации, разработанным в лаборатории биотехнологии ТПИ для удаления остатков толуола из β -ЦД. Около 0,1 г комплекса с содержанием эфирного масла около 11 % растворяли в 10%-ном растворе этанола и ректифицировали в лабораторной колонне высотой 55 см. Фракции по 2-3 мл собирали до температуры

кипения 99,5 °С. Содержание компонентов во фракциях определяли спектрофотометрически.

Результаты и обсуждение

По приведенной выше методике изготавливали кристаллические комплексы укропного и лаврового эфирных масел с β -ЦД, определяли их выход в отношении исходных компонентов и измеряли содержание связанного в комплексе масла.

При анализе УФ-спектра укропного масла (см. рис. 1) различали три максимума поглощения: при $\lambda = 210$ нм, $\lambda = 233$ нм и $\lambda = 273$ нм. Для количественной характеристики комплексообразования выбрали максимум при $\lambda = 233$ нм, обусловленный β -фелландреном и карвоном (табл. 1). Содержание укропного масла в комплексе с β -ЦД определяли с помощью калибровочной прямой при D_{233} , построенной на основе ряда разбавлений укропного масла.

Сравнивая УФ-спектр укропного масла в комплексе с β -ЦД (см. рис. 2) со спектром свободного укропного масла (см. рис. 1), видим их сходство. Различиями являются bathochromный сдвиг максимума от $\lambda = 233$ нм к $\lambda = 240$ нм и некоторое уменьшение обусловленного лимоненом максимума при $\lambda = 273$ нм. Можно предполагать, что произошло в какой-то мере выборочное комплексообразование отдельных компонентов. На возможность изменения соотношений между компонентами эфирных масел в ходе комплексообразования указал и Сейтли [11].

Т а б л и ц а 2

Результаты комплексообразования укропного масла с β -ЦД

№ эксперимента	Принято			Выход комплекса		Содержание укропного масла	
	β -ЦД, г	Укропного масла		г	в отн. исходных в-в, %	в извлеченном растворе, мг/мл	в комплексе, %
		г	в отн. исходных в-в, %				
1	2,0	0,2020	9,17	1,2705	57,7	0,0640	11,02
2	2,0038	0,2002	9,08	1,4987	68,0	0,0314	5,46
3	5,5207	0,5520	9,09	5,1441	87,7	0,0222	11,08

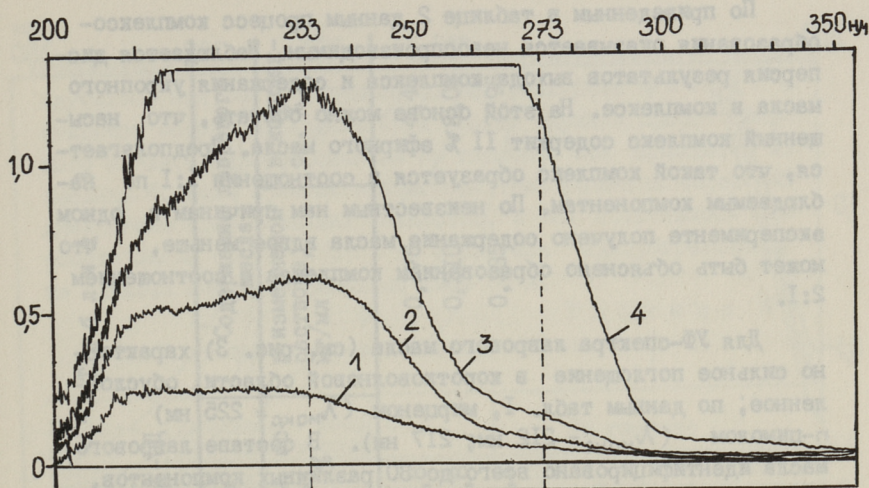


Рис. 1. УФ-спектр укропного эфирного масла. 1 - 0,0040 мг/мл, 2 - 0,0199 мг/мл, 3 - 0,0399 мг/мл, 4 - 0,3988 мг/мл, Разбавления сделаны 98%-ным этанолом.

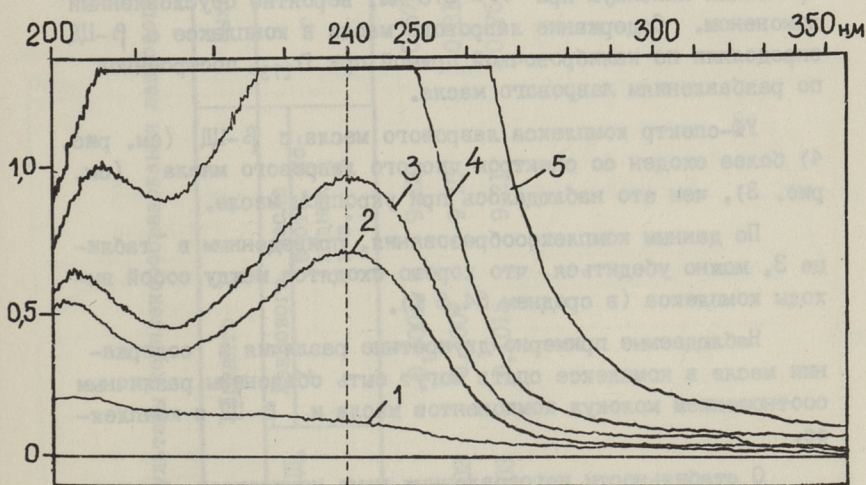


Рис. 2. УФ-спектр укропного масла в комплексе с β -ЦД. Концентрации комплекса: 1 - 0,0402 мг/мл, 2 - 0,4024 мг/мл, 3 - 0,5749 мг/мл, 4 - 1,0080 мг/мл, 5 - 4,0240 мг/мл. Растворитель этанол: вода в соотношении 1:3.

По приведенным в таблице 2 данным процесс комплексобразования оказывается невоспроизводимым. Наблюдается дисперсия результатов выхода комплекса и содержания укропного масла в комплексе. На этой основе можно считать, что насыщенный комплекс содержит 11 % эфирного масла. Предполагается, что такой комплекс образуется в соотношении 1:1 по наблюдаемым компонентам. По неизвестным нам причинам в одном эксперименте получено содержание масла вдвое меньше, что может быть объяснено образованием комплекса с соотношением 2:1.

Для УФ-спектра лаврового масла (см. рис. 3) характерно сильное поглощение в коротковолновой области, обусловленное; по данным табл. I, мирценом ($\lambda_{\text{макс}} = 225 \text{ нм}$) и п-цимолем ($\lambda_{\text{макс}} = 212 \text{ нм}; 217 \text{ нм}$). В составе лаврового масла идентифицировано всего до 30 различных компонентов, причем до 45 % приходится на долю цинеола (эквалиптола) [9, 14]. Но так как характерный для последнего максимум поглощения в спектре неразличим, для количественного определения содержания лаврового масла в комплексе с β -ЦД применяли максимум при $\lambda = 273 \text{ нм}$, вероятно обусловленный лимоненом. Содержание лаврового масла в комплексе с β -ЦД определяли по калибровочной прямой при D_{273} , построенной по разбавлениям лаврового масла.

УФ-спектр комплекса лаврового масла с β -ЦД (см. рис. 4) более сходен со спектром чистого лаврового масла (см. рис. 3), чем это наблюдалось при укропном масле.

По данным комплексобразования, приведенным в таблице 3, можно убедиться, что хорошо сходятся между собой выходы комплекса (в среднем 64,6 %).

Наблюдаемые примерно двукратные различия в содержании масла в комплексе опять могут быть объяснены различным соотношением молекул компонентов масла и β -ЦД в комплексе.

О стабильности изготовленных нами комплексов судили по содержанию эфирного масла в них после хранения комплексов в определенных условиях. Обнаружили, что эфирное масло укропа в комплексе с β -ЦД при комнатной температуре и в закрытом сосуде в течение 5,5 месяцев сохраняется сто-

Таблица 3

Результаты комплексообразования лаврового масла с β -ЦД

№ экс- перимента	Принято		Выход комплекса		Содержание лаврового масла	
	β -ЦД, г	Лаврового масла г	г	в отн. ис- ходных в-в, %	в измеряемом растворе, мг/мл	в комплек- се, %
1	1,0	0,1004	0,5704	51,8	0,176	4,40
2	1,0002	0,1007	0,8123	73,8	0,210	8,08
3	1,0003	0,1015	0,7515	68,2	0,335	7,98

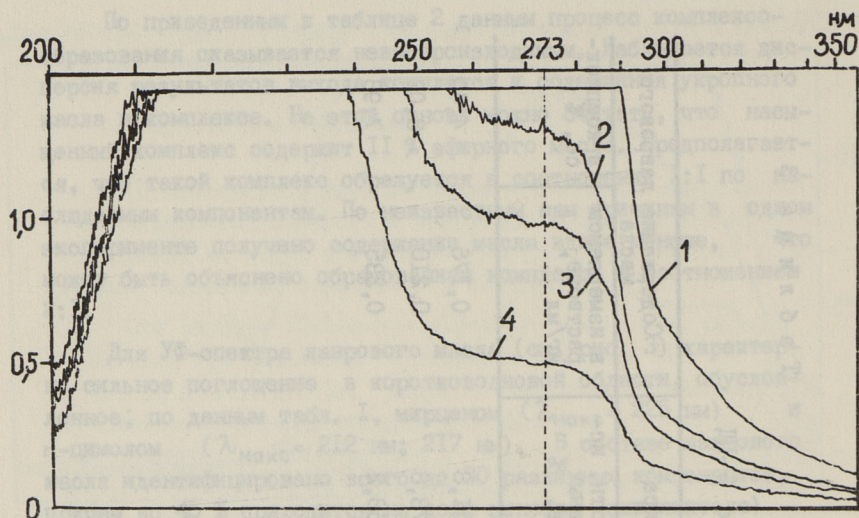


Рис. 3. УФ-спектр лаврового эфирного масла. Концентрации:
1 - 2,6040 мг/мл, 2 - 1,3020 мг/мл, 3 - 0,9469 мг/мл,
4 - 0,4735 мг/мл. Разбавления сделаны 96%-ным этано-
лом.

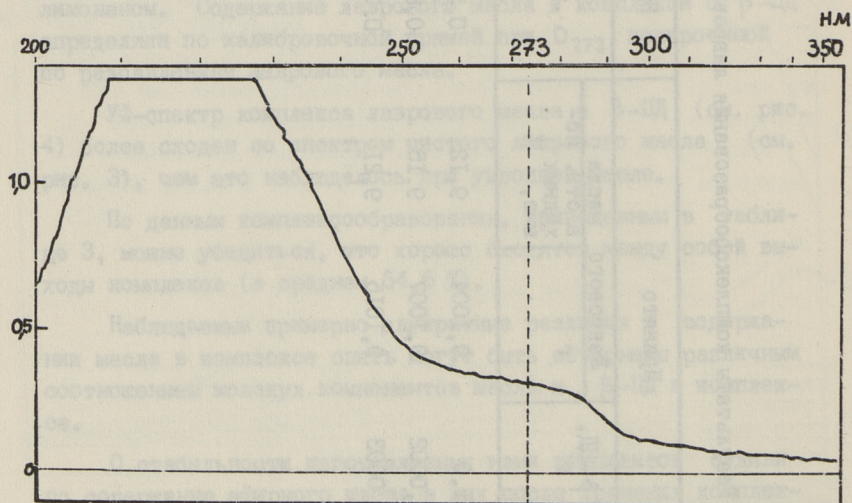


Рис. 4. УФ-спектр лаврового масла в комплексе с β -ИД.
Концентрация комплекса 4,2 мг/мл. Растворитель
этанол: вода в соотношении 1:3.

процентно. Стабильность комплекса лаврового масла с β -ЦД изучалась при 40 °С и относительной влажности $\varphi = 70\%$ в открытом сосуде. Сравнительной пробой служила проба эфирного масла, адсорбированная на глюкозе. Как выявляется из таблицы 4, даже в таких неблагоприятных условиях через 49 дней после приготовления комплекса, в нем сохранилось лаврового масла более 92 %, в то время как адсорбированного на глюкозе масла сохранилось лишь 36 %.

Т а б л и ц а 4
Стабильность комплекса лаврового масла с β -ЦД

Продолжительность хранения, сутки	Комплекс β -ЦД с лавровым маслом		На глюкозе	
	Содержание масла в комплексе, %	Сохранность в отн. исходного содержания, %	Содержание масла, %	Сохранность в отн. исходного содержания, %
0	6,3	-	6,7	-
13	-	-	5,8	86,6
14	6,6	104,8	-	-
34	6,6	104,8	6,8	101,5
42	5,8	92,1	3,5	52,2
49	5,8	92,1	2,4	35,8

Т а б л и ц а 5
Результаты азеотропной ректификации комплекса укропного масла с β -ЦД

№ фракции	Температура кипения, °С	Объем, мл	Содержание укропного масла	
			мг/мл	мг
1	76-78	2,5	-	-
2	78-79	2,8	0,0841	0,235
3	79-99,5	3,0	2,374	7,122
4	99,5	5,4	0,0225	0,122
5	99,5	6,0	0,0080	0,048
6	99,5	6,9	0,0070	0,048
7	99,5	3,5	0,0066	0,023
			7,598	

Так как при исследовании эфирных масел одним из основных способов является газовая хроматография, встанет вопрос об освобождении масла от комплекса. С такой целью

изучалось разложение комплекса β -ЦД с укропным маслом методом азеотропной ректификации. Содержание эфирного масла во фракциях определяли по максимуму поглощения при $\lambda=233$ нм, обусловленного карвоном и β -фелландреном. Результаты опыта приведены в таблице 5. Суммируя содержания укропного масла во всех фракциях, находили выход масла из комплекса, который составлял 71 % от содержащегося в комплексе масла. При этом не рассчитано масло, содержащееся в кубовом остатке. На спектре трех первых фракций, разбавленных этанолом (см. рис. 5) наблюдается и разделение отдельных компонентов.

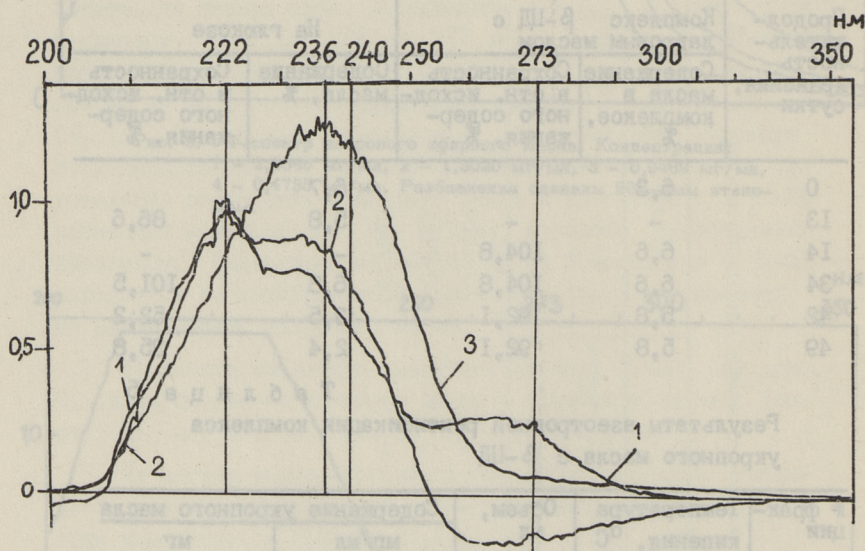


Рис. 5. УФ-спектры фракций, собранных при азеотропной ректификации комплекса укропного масла с β -ЦД. Растворитель 96%-ный этанол.

- 1 - фракция с темп. кип. 76-78 °С, разбавление 1:10,
- 2 - фракция с темп. кип. 78-79 °С, разбавление 1:2,
- 3 - фракция с темп. кип. 79-99,5 °С, разбавление 1:10.

Вышеописанное подтверждает применимость непосредственной УФ-спектрофотометрии для количественного исследования комплексов эфирных масел с β -ЦД. Комплексы β -ЦД с укропным и лавровым эфирными маслами при хранении показывают стабильность, существенно выше стабильности эфирного масла на глюкозе.

Л и т е р а т у р а

1. Pat. 868576 (Belg). Aroma and flavouring compositions containing cyclodextrin / Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára Rt. Filed 01.07.77., publ. 16.10.78.

2. Lindner K. Using cyclodextrin aroma complexes in the catering // Nahrung. 1982. Vol. 26, N 7-8. P. 675-680.

3. Lindner K., Szenté L., Szejtli J. Food flavoring with β -cyclodextrin-complexed flavor substances // Acta Aliment. 1981. Vol. 10, N 3. P. 175-186.

4. Kernoczi L., Tetenyi P., Hethelyi I., Szejtli J. Alteration of the composition of essential oils by cyclodextrin complex formation // Herba Hung. 1984. Vol. 23, N 1-2. P. 109-125.

5. Szejtli J., Szenté L., Banky - Elöd E. Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable labile flavor substances by cyclodextrins // Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 1979. Vol. 101, N 1-2. P. 27-46.

6. Pat. 174699 (Hung). Eljárás természetes eredetű és szintetikus fűszer-, aroma- és izanyagok ciclodextrin zárványkomplexei előállítására / Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára Rt., Szejtli J., Szenté L., Kolta R., Lindner K., Zilahi T., Köszegi B. - Filed 01.07.77., publ. 28.09.79., Int. Cl. C08B 37/16, A23L 1/22.

7. Pat. 7980433 (Japan Kokai). Incense / Masuda S., Ito T., Matsuda M. et al. - Filed 09.12.77., publ. 27.06.79., Int. Cl. A61K 7/46.

8. Ikeda Y., Matsumoto K., Keinhiro K., Fuwa T., Uekama K. Inclusion complexation of essential oils with α - and β -cyclodextrins // Yakugaku Zasshi. 1982. Vol. 102, N 1. P. 83-88.

9. Masada Y. Analysis of essential oils by gas chromatography and Mass Spectrometry. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1976. 334 p.

10. Szejtli J. Cyclodextrins and their inclu-

sion complexes. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1982. 296 p.

11. I k e d a R.M., S t a n l e y W.L., V a n -
n i e r S.H., S p i t t l e r E.M. The monoterpene hydro-
carbon composition of some essential oils // J. Food Scien-
ce. 1962. Vol. 27, N 5. P. 455-458.

12. Г о р я е в М., П л и в а И. Методы исследова-
ния эфирных масел. Алма-Ата. Изд-во АН Каз. ССР. 1962.
752 с.

13. S t a d l e r P.A. Gas-chromatographische Unter-
suchung der Ketone des Lavandinöls // Helv. Chim. Acta.
1960. Vol. 43, N 196. P. 1601-1612.

14. К у с т о в а С.Д. Справочник по эфирным маслам.
М.: Пищевая промышленность, 1978. 208 с.

A. Menert, R. Laas, M. Kreen

Tilli- ja loorberiõli β -tsüklodekstriiniga
komplekseerimise kvantitatiivne iseloomustus

Kokkuvõte

Uuritigi β -tsüklodekstriini komplekseerumist eeterlike tilli- ja loorberiõliga, saadud komplekside stabiilsust ja kompleksist komponentide eraldamise võimalust. On tõestatud UV-spektrofotomeetria kasutatavus sel eesmärgil. Saadud kompleksid on seisemiselt oluliselt stabiilsemad kui glükoosile adsorbeeritud eeterlikud õlid.

A. Menert, R. Laas, M. Kreen

The Quantitative Characterization of Complex
Formation of Dill and Laurel Oils with
 β -cyclodextrin

Abstract

The complex formation of β -cyclodextrin with dill weed oil (from *Anethum graveolens* L.) and with laurel leaf oil (from *Laurus nobilis* L.) has been investigated. While storing the complexes showed the stability substantially higher than that of the essential oil glucose mixture. The aroma complexes appeared to be easily decomposable by azeotropic rectification. The possibility of using the UV-spectrophotometry for analysing these processes has been verified.

ПОЛУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНА

Недостаточная растворимость циклодекстринов (ЦД) в воде во многих случаях может препятствовать их практическому применению. Особенно актуальным вопрос о растворимости становится в случае комплексов ЦД с аполярными веществами. Замена гидроксильных групп в молекулах ЦД функциональными вызывает существенные изменения в их свойствах, главным образом в растворимости и комплексообразующей способности.

Хорошо известными модификатами ЦД являются метиловые и сульфопропиловые, а также катионные производные, растворимость которых даже в несколько десятков раз может превышать растворимость нативных ЦД [1, 2, 5, 6]. В группу анионных производных ЦД относится карбоксиметиловый ЦД, обладающий высокой гидрофильностью [3, 4]. Ламмерсом [3] описана методика получения натриевой соли карбоксиметилированных α - и β -ЦД, способных образовывать водорастворимые комплексы с аполярными веществами. Синтез карбоксиметилированных ЦД осуществлялся в водной среде и изолирование продукта проводилось путем осаждения метанолом. Выход модифицированных ЦД после двукратной перекристаллизации составлял 50 % от исходного ЦД. Содержание карбоксиметильных групп в модифицированных α - и β -ЦД составляло 3-7 молей на I моль ЦД или 0,4-1,0 моля на I моль глюкозных остатков [3]. Процесс карбоксиметилирования углеводов можно провести и в неводной среде. Известен способ карбоксиметилирования крахмала в спиртовой среде в относительно мягких условиях и получения продукта с высокой гидрофильностью [10].

Целью настоящей работы было изучение возможностей карбоксиметилирования β -ЦД путем гетерофазного синтеза в

среде этанола, позволяющего отказаться от применения сильно токсичного реагента метанола и в то же время значительно повысить выход получаемого модификата β -ЦД.

Материалы и методы

β -циклодекстрин - кристаллический препарат с содержанием основного вещества не менее 98 %, изготовленный в лаборатории биотехнологии ТПИ или на подсобном предприятии "Биоэстрон" колхоза Куусалу.

Монохлоруксусная кислота - марки "ч" производства Уфимского химзавода. Этиловый спирт - ГОСТ 5964-82. Едкий натр - марки "хч", импортный, перефасовано Ленконторой химреактивов. Соляная кислота - марки "ч".

Процесс карбоксиметилирования проводился в термостатируемом реакционном сосуде, снабженном мешалкой. В сосуд измеряли определенное количество этилового спирта, в котором растворяли определенное количество гидроокиси натрия. Раствор термостатировали при заданной температуре и в нем суспендировали навеску ЦД. В течение 15-20 минут протекала щелочная активация ЦД, после чего по порциям стали добавлять монохлоруксусную кислоту (МХУ). В опытах варьировали стехиометрический коэффициент алкилирующего реагента K_R , который выражали в молях МХУ на моль глюкозных остатков в навеске ЦД. Скорость добавления МХУ должна быть медленная, чтобы не повысилась температура реакционной среды. Время синтеза учитывалось с момента добавления МХУ. После определенного времени карбоксиметилированный ЦД (КМ-ЦД) отфильтровывали и многократно (7-8 раз) промывали этиловым спиртом. Омытый препарат отфильтровывали на нутч-филт্রে и высушивали при комнатной температуре. КМ-ЦД хранили в закрытом сосуде при комнатной температуре.

Идентификацию карбоксиметильной группы в КМ-ЦД проводили ИК-спектроскопией и химическими методами. Из последних в работе использовали два способа.

Преципитационный способ, разработанный Х. Кесселом [7] для определения средней степени замещения в карбоксиметилкрахмале, основывается на преобразовании нерастворимого комп-

лекса карбоксиметильного производного углевода с ионами меди.

Спектрофотометрический способ определения средней молекулярной массы водорастворимых производных ЦД, описанный Ламмерсом и др. [3], позволяет из полученных данных вычислять среднюю степень замещения модифицированного ЦД. Способ основывается на афинности производных ЦД к ароматическим соединениям (бензойная кислота, m -хлоробензойная кислота и др.) в кислой среде, при которой эти соединения в недиссоциированной форме. Существует линейная зависимость между увеличением растворимости m -хлоробензойной кислоты (МХБ) в воде и содержанием в растворе комплексообразователя (ЦД или его водорастворимого производного). Концентрацию растворенной МХБ измеряют по максимуму поглощения при 283 нм. Доказано [3], что максимум поглощения МХБ не изменяется при комплексовании его с α - и β -ЦД или их производными.

Среднюю молекулярную массу производных ЦД вычисляют по разнице наклонов прямых, выражающих зависимость между поглощением и концентрацией ЦД (КМ-ЦД):

$$M_D = \frac{b_0}{b_D} \cdot M_0,$$

где M_0 — молекулярная масса нативного ЦД;

M_D — молекулярная масса КМ-ЦД;

b_0 — наклон изотерма взаимодействия ЦД и МХБ;

b_D — наклон изотерма взаимодействия КМ-ЦД и МХБ.

Среднюю степень замещения вычисляют по формуле

$$X_s = \frac{M_D - M_0}{7 M_{cm}},$$

где X_s — степень замещения, выраженная в молях карбоксиметильной группы на моль глюкозных остатков;

M_{cm} — молекулярная масса группы замещения (равняется 59 при форме свободной кислоты и 81 при форме натриевой соли).

Спектрофотометрические измерения проводились на спектрофотометре VSU2-P (Carl Zeiss, Jena).

Определение содержания β -ЦД в растворах проводилось способом Викмона [9].

Содержание хлорид-иона в препаратах КМ-ЦД определялось argentометрическим способом.

Результаты и обсуждение

Первоначальные опыты синтеза КМ-ЦД проводились с целью выяснения условий эксперимента, позволяющих провести гетерофазный синтез. Условиями, которые при этом имеют определенное значение, являются концентрация этанола, составляющего среду реакции, температура, способ прибавления реагентов (в кристаллическом или растворенном виде), а также плотность суспензии ЦД-этанол. Критериями, по которым руководствовались при выборе подходящих условий синтеза, были отсутствие явлений липкости или растворения кристаллов ЦД в ходе эксперимента.

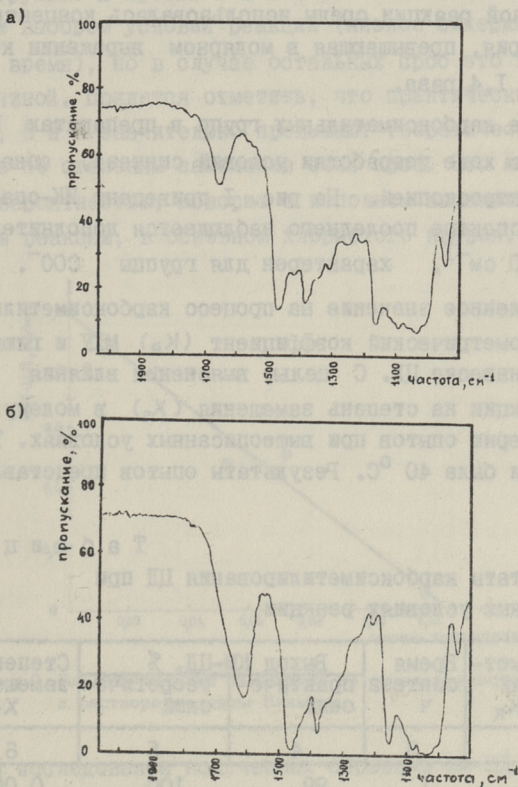


Рис. 1. ИК - спектры,
а - циклодекстрина,
б - КМ-циклодекстрина.

Выяснилось, что общее содержание воды в реакционной среде не должно превышать 10 % и этим обстоятельством определены также условия прибавления реагентов. При введении МХУ и NaOH в виде водных растворов необходимо строго соблюдать общее содержание воды в реакционной среде. При создании реакционной среды в таком случае необходимо исходить из 96%-ного этанола. Изучение влияния температуры в интервале от 20 до 75 °C показало, что подходящими можно считать температуры не выше 40 °C. Плотность суспензии ЦД-этанол около 50 г/л оказалась подходящей для проведения синтеза.

Для создания необходимой для реакции карбоксиметилирования щелочной среды использовалась концентрация гидроокиси натрия, превышающая в молярном выражении концентрацию МХУ в 1,4 раза.

Наличие карбоксиметильных групп в препаратах КМ-ЦД, полученных в ходе разработки условий синтеза, обнаруживалось ИК-спектроскопией. На рис. I приведены ИК-спектры ЦД и КМ-ЦД. В спектре последнего наблюдается дополнительный пик при 1630 см^{-1} , характерен для группы COO^- .

Определенное значение на процесс карбоксиметилирования имеет стехиометрический коэффициент (K_R) МХУ и глюкозных остатков в навеске ЦД. С целью выяснения влияния K_R и времени реакции на степень замещения (χ_s) в молекуле ЦД проводили серию опытов при вышеописанных условиях. Температура реакции была 40 °C. Результаты опытов представлены в таблице I.

Т а б л и ц а I
Результаты карбоксиметилирования ЦД при
различных условиях реакции

№ про- бы	Стехиомет- рический коэф. K_R	Время синтеза ч	Выход КМ-ЦД, %		Степень замещения * χ_s
			практиче- ский	теоретиче- ский	
I	2	3	4	5	6
1	0,34	I	99	100	0,006
2	0,50	I	100	100	0,006
3	2,02	I	101	102	0,041

I	2	3	4	5	6
4	2,02	4	I29	I03	0,068
5	2,02	7	I39	I05	0,092
6	3,00	7	I50	I06	0,120

* Расчет теоретического выхода проводили по уравнению

$$\left(1 + \frac{7 \cdot X_s \cdot M_{cm}}{M_0}\right) \cdot 100.$$

По данным таблицы I можно убедиться, что в образцах модифицированного ЦД обнаружено низкое содержание карбоксиметильной группы. В пробах № I и 2 это может быть обусловлено неудачным выбором условий реакции (низкое содержание МХУ, короткое время), но в случае остальных проб это не может быть причиной. Придется отметить, что практические выходы проб № 4, 5 и 6 значительно превышают теоретические выходы, найденные по степеням замещения этих проб. Это явление, с большой вероятностью, говорит о неполном вымывании побочных продуктов реакции, в основном хлористого натрия.

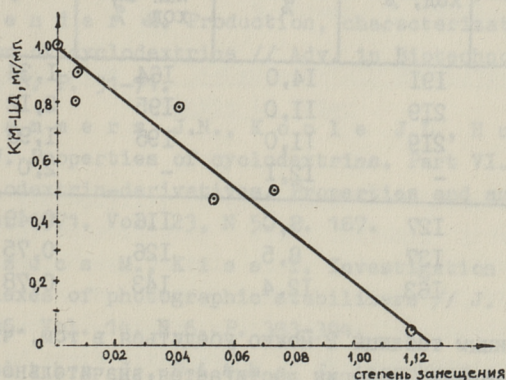


Рис. 2. Влияние степени замещения на определяемость КМ-ЦД в растворе методом Викмона.

При исследовании полученных образцов КМ-ЦД выяснилось, что замещение гидроксильных групп карбоксиметильными, которые дают молекуле ЦД анионные свойства, существенно уменьшает комплексообразование с фенолфталеином, молекула ко-

торого в окрашенном состоянии также имеет отрицательный заряд. На рис. 2 приведена зависимость обнаруживаемого методом Викмона содержания КМ-ЦД в растворе от средней степени замещения данного препарата. Из всех образцов КМ-ЦД были изготовлены растворы концентрацией 1,0 мг/мл. Таким образом, выяснилось, что для определения содержания КМ-ЦД в растворе метод Викмона не применим.

С целью повышения степени замещения проводили опытные серии карбоксиметилирования ЦД продолжительностью 19 часов при стехиометрических коэффициентах алкилирующего реагента и глюкозных остатках $K_R = 2$ и $K_R = 3$. В то же время увеличили кратность промывки КМ-ЦД, чтобы избавиться от побочных продуктов реакции. Для определения содержания карбоксиметильных групп использовался спектрофотометрический способ. Результаты приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Результаты карбоксиметилирования ЦД

Стехиометрический коэф. K_R	Время, ч	Практический выход, %	Содержание NaCl, %	Корригированный выход, %	X_s	Теорет. выход, %
3	4	191	14,0	164	1,34	167
	8	219	11,0	195	2,12	206
	12	219	11,0	195	1,90	195
	19	-	12,1	-	2,0	200
2	2	127	8,0	116	0,49	120
	4	137	8,5	126	0,75	137
	19	163	12,4	143	0,78	139

По данным таблицы 2 можно убедиться в том, что при выбранных условиях реакции достигается значительное замещение гидроксильных групп карбоксиметильными остатками. При значении стехиометрического коэффициента алкилирующего реагента $K_R = 3$ степень замещения уже к восьмому часу реакции достигает предельное значение, т.е. в каждом остатке глюкозы замещено, в среднем, две гидроксильные группы. Можно предполагать, что в этих условиях реагируют все первичные гидроксильные группы, но по стерическим причинам, из

вторичных гидроксильных групп алкилируется только половина. При значении стехиометрического коэффициента алкилирующего реагента $K_R = 2$ максимальная степень замещения приближается к 0,8. Несмотря на многократную промывку с этанолом во всех образцах КМ-ЦД содержится значительное количество хлористого натрия, которое в некоторых случаях может ограничивать применение полученного модификата. Методика требует доработки в направлении очистки препарата КМ-ЦД. Довольно хорошее совпадение теоретического и практического скорректированного выходов КМ-ЦД показывают, что спектрофотометрический способ определения содержания карбоксиметильной группы дает достоверные результаты.

Таким образом, можно подытожить, что карбоксиметильные производные β -циклодекстрина успешно можно синтезировать способом гетерофазного синтеза, проводимого в среде этанола. Способ позволяет получить модифицированный β -ЦД с высокой степенью замещения в мягких условиях синтеза.

Л и т е р а т у р а

1. S z e j t l i J. Cyclodextrines and their inclusion complexes // Budapest: Akadémiai Kiadó, 1982. 296 p.
2. B e n d e r H. Production, characterization and application of cyclodextrins // Adv. in Biotechnol. Proc. 1986. Vol. 6. P. 31-71.
3. L a m m e r s J.N., K o o l e J.L., H u r k - m a n s J. Properties of cyclodextrins. Part VI. Water-soluble cyclodextrin-derivatives. Properties and analysis // Die Stärke. 1971. Vol. 23, N 5. P. 167.
4. S z u c s M., K i s s I. Investigation of inclusion complexes of photographic stabilizers // J. Inf. Rec. Mater. 1986. Vol. 14, N 6. P. 383-394.
5. P i t h a J., P i t h a J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients // J. Pharm. Sci., 1985. Vol. 74, N 9. P. 987-990.
7. M u e l l e r B.W., B r a u n s U. Cyclodextrin ethers as solubilizers. Enzymic degradation // Pharm. Ind. 1986. Vol. 48, N 11. P. 1427-1429.

6. K e s s e l H. Determination of the functional group and the average degree of substitution of CMS // Starch. 1985. Vol. 37, N 10. P. 334-336.

8. W i e d e n h o f N., T r i e l i n g R.G. Properties of cyclodextrins. Part V. Inclusion isotherms and kinetics of inclusion of benzoic acid and m-chlorobenzoic acid on β -E25 cyclodextrin-epichlorhydrin resin // Die Stärke. 1971. Vol. 23, N 4. P. 129-132.

9. V i k m o n M. Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of cyclodextrins // I. Int. Symp. on Cyclodextrins. Budapest. 1981. P. 69-75.

10. К о в а л е н к о М.С., К н я г и н и ч е в М.И., А л е к с е е в Н.Г., Ж и ж и н В.И. // Сб. тр. научно-техн. конф. Ленинградского технол. ин-та холодильной промышленности. Л., 1970.

β -tsüklodekstriini veeslahustuvate derivaatide saamine

Kokkuvõte

Tsüklodekstriinide hüdrofiilsust on võimalik suurendada molekulis sisalduvate hüdroksüülrühmade osalise asendamise teel karboksümetüülrühmadega. Käesolevas töös töötati välja β -tsüklodekstriini karboksümetüleerimise tingimused heterofaassel sünteesil etanooli keskkonnas. Et vältida tekkiva karboksümetüleeritud tsüklodekstriini lahustumist protsessis, ei tohi veesisaldus reaktsioonikeskkonnas ületada 10 %. Sobivate katsetingimuste juures on võimalik tsüklodekstriini molekuli igas glükoosi jäägis asendada karboksümetüülrühmaga kuni kaks hüdroksüüli. Näidati, et anioonsete omaduste andmine β -tsüklodekstriinile takistab aluselises keskkonnas tema komplekseerumist fenoolftaleiiniga.

M. Kreen, T. Randla, M. Übner

Preparation of β -Cyclodextrin Derivatives
Soluble in Water

Abstract

The hydrophylicity of cyclodextrins can be considerably increased by substituting some hydroxyl groups by carboxymethyl ones. In this paper the preparation of β -cyclodextrin carboxymethylether is described. The preparation is performed by means of heterogeneous synthesis in ethanol. In order to avoid dissolution of the carboxymethylether of cyclodextrin the water content of the reaction mixture must not exceed 10 %. The method permits to prepare the carboxymethyl derivatives of β -cyclodextrin, containing up to two carboxymethyl groups per glucose unit in the cyclodextrin molecule. It was demonstrated that the synthesized anionic derivative of β -cyclodextrin did not form inclusion compounds with phenolphthalein in alkali solution.

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДОРОДНОГО
СУБСТРАТА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Углеводороды и химические продукты из нефтяного сырья относятся к перспективным источникам углерода и энергии для крупнотоннажной микробиологической промышленности [1, 2]. Углеводороды представляют интерес с экономической точки зрения, поскольку имеют высокий коэффициент конверсии при направленном синтезе некоторых видов микроорганизмов.

Метод газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором позволяет определить с высокой степенью точности содержание углеводородов в нефтепродуктах [3].

Цель настоящей работы – разработка условий газохроматографического анализа непрерывного ряда алифатических углеводородов – гомологов (n-алканов и I-алкенов) в диапазоне углеродных чисел C_8 – C_{30} .

Материалы и методы

Использовали четыре существенно различающихся по своему количественному составу смесей углеводородов гомологов: I (C_8 – C_{14}); II, III (C_{11} – C_{18}) и IV (C_{11} – C_{24}). Искусственные смеси из чистых углеводородов составлены таким образом, чтобы они имели оптимальные составы и свойства с точки зрения перспективного микробиологического синтеза: в соотношениях алканы – алкены I:I (образцы I, II, IV) и с некоторым преобладанием насыщенных углеводородов (образец III). Состав этих смесей приведен в таблице.

Работа выполнена на хроматографе Хром-5 с пламенно-ионизационным детектором. Учитывая относительно высокие температуры кипения анализируемых образцов (120–420 °C) для

их разделения были использованы короткие стальные колонки 3 м x 3 мм, заполненные твердым носителем инертном NDMCS (зернением 0,315-0,40 мм) с 10 % ПЭГ 20 М. Расход газа-носителя гелия, водорода и воздуха 60, 60 и 450 мл/мин соответственно. Температура колонки, испарителя и детектора изменялась в соответствии с температурой кипения анализируемых веществ. Кондиционирование колонки осуществляли в токе гелия в режиме постепенного ступенчатого повышения температуры до 200 °C (6 часов). Определение углеводородов проводили в режиме программирования температуры от 80 до 160 °C со скоростью 0,5-2 град/мин. Для улучшения воспроизводимости результатов при хроматографическом анализе высококипящих соединений ($C > 18$), уменьшения погрешности измерения площадей малых пиков стадия нагревания в интервалах 160-180 °C состояла из изотермических участков, причем продолжительность изотермической обработки составляла 1 час при 160 и 180 °C. Температура испарителя превышала на 30 °C температуру детектора ($t_{исп.} 100-250$ °C). В зависимости от состава исследуемых конденсатов объем пробы варьировали от 0,6 до 1,0 мкл. Растворителем служил хлороформ.

Правильность идентификации углеводородов подтверждена на основе сопоставления времен удерживания (или положения пиков) по хроматограммам эталонных и n-алканов и 1-алкенов (для хроматографии, Реахим, СССР) и анализируемых смесей. Анализ проводят многократно (3-4 раза): без стандарта и с добавкой в хроматографируемую пробу эталонных углеводородов, заметно различающихся по длине молекулярной цепи. Это позволяет во всех случаях точно определить местоположение пика того или иного соединения на хроматограмме и показывать, что в выходящей из колонки паре углеводородов алкан - алкен (одного C) первым регистрируется n-алкан. Количественный анализ проводили методом внутренней нормализации по площадям пиков (среднее по 2-3 измерениям) без применения коэффициентов чувствительности [4].

Воспроизводимость основных хроматографических параметров оценивали по стандартным отклонениям площадей (высот) пиков, которые рассчитывали на основании 4-5 парал-

лельных экспериментов. В качестве тестовых веществ использовали октан, нонен, додекан, додецен. Средняя относительная погрешность определения для легких углеводородов (C_8-C_{14}) около 2 %, высококипящих углеводородов – 5 %.

Результаты и обсуждение

Оценено влияние на хроматографическое определение компонентов смесей углеводородов некоторых факторов: типа твердого носителя, химической природы неподвижной жидкой фазы (НЖФ) и ее концентрации, температуры термостата колонки.

Что касается исследования углеводородов с использованием различных твердых носителей и НЖФ (полиэтиленгликоль-сукцината; инертон АW DMCS с 4 % апиэзона; хроматона NAW HMDS с 4 % ПЭГ 20 М хроматона NAW HMDS с 15 % ДС-550), то хроматографировать их в виде дискретных узких и симметричных пиков не удалось. На рис. 1а представлена типичная хроматограмма смесей непрерывного ряда углеводородов – гомологов (n-алканы – 1-алкены) с указанными выше сорбентами. Рисунок 1 позволяет сравнить порядок элюирования и эффективность разделения веществ на колонках с различающимися по полярности НЖФ с одинаковым твердым носителем и температурным режимом колонки. В дальнейшем, используя в качестве твердого носителя инертон АW DMCS с 10 % ПЭГ 20 М, на образцах I–III (рис. 1б, 2) удалось получить отдельные пики насыщенных и ненасыщенных углеводородов – гомологов, добиться полной ликвидации хвостов пиков всех исследуемых компонентов и свести к минимуму размывание хроматографических зон при общей небольшой продолжительности определений (50–80 мин.)

Т а б л и ц а
Фракционный состав углеводородов (%)

Соединение	Образец			
	I	II	III	IV
I	2	3	4	5
C8 H18	2,14			
C8 H16	4,93			
C9 H20	5,13			

I	2	3	4	5
C9 H18	9,24			
C10 H22	5,99	0,62	4,08	
C10 H20	17,75	0,77	3,97	
C11 H24	9,38	1,74	1,41	1,49
C11 H22	15,75	2,45	1,50	2,20
C12 H26	6,65	3,10	3,31	2,08
C12 H24	8,34	4,80	3,11	2,15
C13 H28	4,65	5,47	5,25	1,96
C13 H26	4,63	4,95	5,70	3,66
C14 H30	1,83	6,14	6,90	2,99
C14 H28	2,48	7,67	7,91	5,18
C15 H32	0,82	9,00	7,09	2,93
C15 H30	0,87	12,28	7,81	4,23
C16 H34		7,24	6,39	5,22
C16 H32		4,93	5,97	3,52
C17 H36		5,88	5,49	3,38
C17 H34		6,94	4,55	3,92
C18 H38		3,88	3,36	4,97
C18 H36		4,48	3,45	6,24
C19 H40		2,07	2,25	3,67
C19 H38		2,37	2,21	3,37
C20 H42		1,01	1,63	3,21
C20 H40		2,20	1,10	4,34
C21 H44		0,32	2,76	4,16
C21 H42		0,72	1,85	2,40
C22 H46				4,81
C22 H44				3,31
C23 H48				3,78
C23 H46				5,13
C24 H50				2,11
C24 H48				3,60

Отметим также, что любое изменение химического состава (длины углеродного скелета, соотношения n -алканы; i -алкены) исходной смеси углеводородов немедленно регистрируется на хроматограмме конденсата (рис. 2). Для сравнения на рис. 3 приведены хроматограммы исследованной смеси n -алканов (C_{13} - C_{20}). Пригодность разрабатываемого

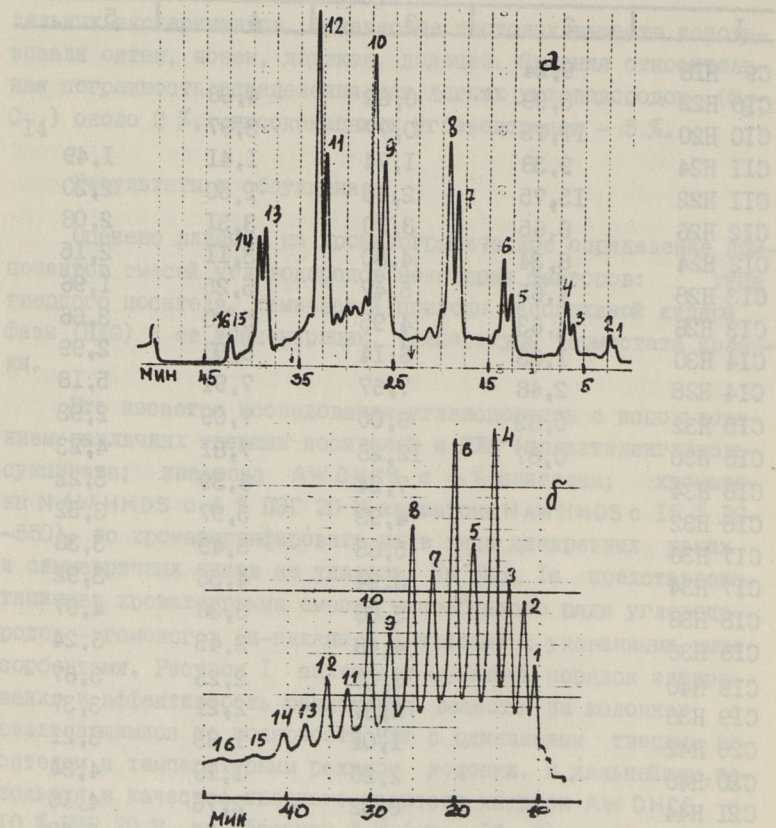


Рис. 1. Хроматограммы смеси углеводородов 1 (C_8-C_{14}). Носитель - инертон с 4 % анизола L (а) и с 10 % δ -ПЭГ 20М (б), программирование температуры от 80 до 200 °C со скоростью 2 град-мин: 1 - октан, 2 - октен, 3 - нонан, 4 - нонен, 5 - декан, 6 - децен, 7 - ундекан, 8 - ундецен, 9 - додекан, 10 - додецен, 11 - тридекан, 12 - тридецен, 13 - тетрадекан, 14 - тетрадецен, 15 - пентадекан, 16 - пентадецен.

метода газохроматографического анализа убедительно демонстрируют данные по фракционированию сложной многокомпонентной органической смеси IY ($C_{11}-C_{24}$), непрерывного ряда высших углеводородов (табл.).

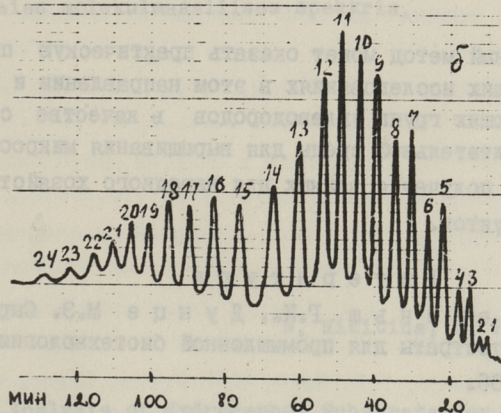
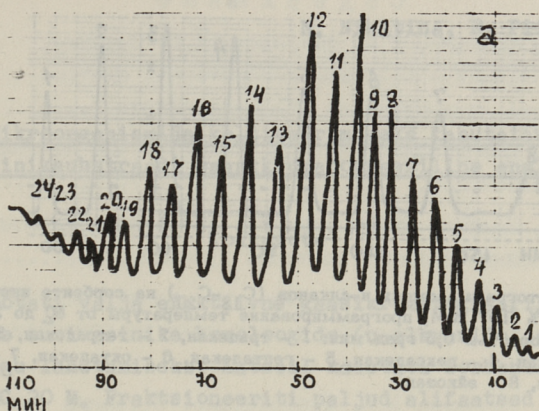


Рис. 2. Хроматограммы смеси углеводородов 11 ($C_{11}-C_{18}$) (а) и смеси 111 ($C_{11}-C_{18}$) после частичной деолефинизации (б) на сорбенте инертной с 10 % ПЭГ 20М, программирование температуры от 100 до 200 °С со скоростью 2 град/мин: 1 - декан, 2 - децен, 3 - ундекан, 4 - ундецен, 5 - додекан, 6 - додецен, 7 - тридекан, 8 - тридецен, 9 - тетрадекан, 10 - тетрадецен, 11 - пентадекан, 12 - пентадецен, 13 - гексадекан, 14 - гексадецен, 15 - гептадекан, 16 - гептадецен, 17 - октадекан, 18 - октадецен, 19 - нонадекан, 20 - нонадецен, 21 - эйкозан, 22 - эйкоцен, 23 - генэйкозан, 24 - генэйкоцен.

Таким образом оценена пригодность газохроматографического метода - в разработанных условиях разделения - для характеристики непрерывного ряда углеводородов - гомологов, имеющих существенно различающийся количественный состав

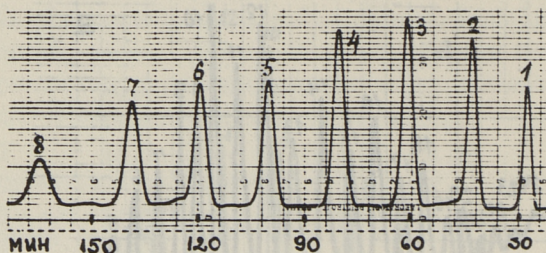


Рис. 3. Хроматограмма смеси n -алканов ($C_{13}-C_{30}$) на сорбенте инертон с 10 % ПЭГ 20М, программирование температуры от 80 до 220 °С со скоростью 0,5 град/мин: 1 - тридекан, 2 - тетрадекан, 3 - пентадекан, 4 - гексадекан, 5 - гептадекан, 6 - октадекан, 7 - нонадекан, 8 - эйкозан.

C_8-C_{30} . Данный метод может оказать практическую помощь при дальнейших исследованиях в этом направлении и выборе соответствующих групп углеводородов в качестве составной части питательной среды для выращивания микроорганизмов с целью получения важных для народного хозяйства вторичных продуктов.

Л и т е р а т у р а

1. Л и е п и н ь ш Г.К., Д у н ц е М.Э. Сырье и питательные субстраты для промышленной биотехнологии. Рига : Зинатне, 1986.

2. А.с. 294492 (СССР). Способ получения белково-жировой массы. Михалева В.В. и др. Опубл. в ЕИ № 38, 1983.

3. В и г д е р г а у з М.С. Газовая хроматография как метод исследования нефти. М.: Наука, 1973. С. 101-103, 256.

4. К л е щ е в а М.С., З а в ь я л о в Ю.М., К о р ж о в а И.Т. Газохроматографический анализ в производстве полимеризационных пластмасс. Л.: Химия, 1978.

N. Nikitina, E. Piiraja

Mikroorganismide kultiveerimiseks kasutatava
süsivesiniksubstraadi gaasikromatograafiline analüüs

Kokkuvõte

Töötati välja efektiivne gaasikromatograafiline meetod kõrgemate süsivesinike homologide (n-alkaanide ja 1-alkeenide) segu lahutamiseks. Katseil kasutati sorbenti inerton -10 % PEG 20 M. Fraksioneeriti paljud alifaatsed süsivesinikud laias molekulmassilises spektris.

N. Nikitina, E. Piiraja

GC Analysis of Hydrocarbon Substrate for the
Cultivation of Microorganisms

Abstract

An effective GC method for the separation of the mixtures of higher aliphatic hydrocarbons (n-alkanes, 1-alkenes) has been developed. Sorbent system "Inerton"-10 % PEG 20M has been used. This system enabled to fractionate the mixtures with widely varying molecular-weight distribution.

С о д е р ж а н и е

1.	А.И. Кёстнер, Л.А. Лихфельд, К.Ю. Куузику. Узконаправленная микрокомпьютерная система поиска литературы по циклодекстринам.....	3
2.	А.Я. Кяэрд. Иммуобилизация химотрипсина на поли-дииминозафире.....	10
3.	Г.Г. Калбин, Я.Я. Лаукевиц. Инверсия сахарозы иммобилизованными клетками дрожжей	16
4.	А.К. Абдвахитова. Оптимизация условий иммобилизации растительных клеток мака на пенополиуретановом носителе.....	25
5.	И.В. Калбина, М.К. Фриеденталь. Изучение процесса выкристаллизации лизоцима из яичного белка.....	35
6.	Э.М. Пейпман, Т.Б. Пальм. Метод получения биомассы <i>Bacillus macerans</i>	43
7.	К.Э. Паппель. Выделение и очистка циклодекстринглюканотрансферазы.....	53
8.	В.А. Кросинг, Р.А. Вокк. Определение остаточного содержания толуола в β -циклодекстрине...	64
9.	М.А. Курвитс, Э.Х. Сиймер. Соединения включения β -циклодекстрина с бензиловым спиртом..	73
10.	А.А. Менерт, Р.Ф. Лаас, М.И. Креэн. Количественная характеристика комплексообразования укропного и лаврового масла с бета-циклодекстрином.....	79
11.	М.И. Креэн, Т.Э. Раадла, М.Э. Юбнер. Получение водорастворимых производных бета-циклодекстрина	92
12.	Н.П. Никитина, Э.К. Пийроя. Газохроматографический анализ углеводородного субстрата для культивирования микроорганизмов.....	102

ПРИКЛАДНЫЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Биотехнология IV

УДК 681.3.004.14 : 547.458.68

Узконаправленная микрокомпьютерная система поиска литературы по циклодекстринам. Кёстнер А.И., Лихфельд Л.А., Куузику К.Ю. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 3-9.

Для создания конкретных научных решений, в частности, при разработке описаний изобретений, требуется ретроспективный поиск информации по данному вопросу. Нами разработана система предварительной проработки и кодирования содержания первоисточников и поиска с применением персональной ЭВМ. Задачей предпринятой работы было создание и внедрение такой системы на базе широко распространенных персональных ЭВМ с операционной системой CP/M. Конкретное направление посвящено получению и применению циклодекстринов, которые находят широкое применение в медицине, промышленности и аналитике.

Таблиц - 3, библиографических наименований - 5.

УДК 547.298.2 : 547.96

Иммобилизация химотрипсина на полидииминоэфире.

Кяэрд А.Я. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 10-15.

Показано, что активированный сополимер метиленамалонодинитрила с винилацетатом, где цианогруппы переведены в иминоэфирные группы, может быть применен для иммобилизации ферментов, что доказано на примере химотрипсина. Получен активный и стабильный препарат иммобилизованного химотрипсина. Активность и коэффициент сохранения активности иммобилизованного препарата составляли 2,8 мккат по

казеину на 1 г сухого активированного сополимера и 47 % соответственно. После промывки иммобилизованного препарата химотрипсина 2%-ным раствором казеина остаточная активность составляет 50 % от исходной. Препарат иммобилизованного химотрипсина сохранял активность более 1,5 месяцев при хранении в виде водной суспензии при 4 °С.

Рисунков - 2, библиографических наименований - 7.

УДК 577.32.004:664.14

Инверсия сахарозы иммобилизованными клетками дрожжей.

Калбин Г.Г., Лаукевиц Я.Я. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 16-24.

Описаны технологические параметры нового биокатализатора с инвертазной активностью на базе включенных в гель клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Ферментативная активность катализатора зависит от размера его частиц и составляет 150-600 мкмоль сахарозы мин⁻¹. г⁻¹ вл. веса катализатора при 30 °С, pH = 4,80 и начальной концентрации субстрата 0,2 моль/л. Полученный биокатализатор имеет широкий рН-оптимум активности: 90 % активности сохраняется в интервале pH 4,0-7,0 при 50 °С. Показана применимость биокатализатора для гидролиза растворов сахарозы с концентрацией 50-65 % при температуре до 65 °С. Наилучшие результаты получены при использовании катализатора в форме ксерогеля.

Таблиц - 2, рисунков - 2, библиографических наименований - 6.

УДК 57.086.835.004.14

Оптимизация условий иммобилизации растительных клеток мака на пенополиуретановом носителе.

Абдвахитова А.К. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 25-34.

Исследован ход иммобилизации клеток мака на пенополиуретан различной структуры и размеров. Показано, что из двух типов эрлифтовых культиваторов: сопло-конусного и типа круглодонной колбы, культиватор типа круглодонной колбы больше подходит для выращивания иммобилизованных растительных кле-

ток мака. Что касается веса частиц носителя и структуры пенополиуретана, то из рассмотренных нами лучше использовать меньшие по весу частицы носителя в 23 мг из открытоячеистого пенополиуретана.

Таблиц - 3, библиографических наименований - 4.

УДК 577.152:35:637.482

Изучение процесса выкристаллизации лизоцима из яичного белка. Калбина И.В., Фриеденталь М.К. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 35-43.

Разработаны основные технологические аспекты выделения лизоцима (Лз) из белка куриных яиц методом кристаллизации вблизи его изоэлектрической точки в присутствии NaCl. Получаемый по предложенной схеме препарат Лз по своей удельной активности (Е/мг белка) не уступает препаратам зарубежных фирм. Опытные партии препаратов Лз были переданы мясо-молочной промышленности республики для испытания в качестве антибактерицидного вещества для подавления маслянокислого брожения в процессе сыроделия. Испытания подтвердили положительный эффект добавки Лз.

Таблиц - 2, рисунков - 1, библиографических наименований - 11.

УДК 576.8

Метод получения биомассы *Bacillus macerans*. Пейпман Э.М., Пальм Т.Б. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 43-52.

Микроорганизм *Bacillus macerans* культивируют в новой синтетической среде, которая позволяет оценивать параметры роста ($\mu_{\max} = 0,226 \text{ ч}^{-1}$, $y_{\max} = 28 \%$, $q_{\max} = 8,16 \text{ г}^{-1}$). Лимитирующим фактором является источник углерода. Синтетическая среда, состоящая из минеральных солей, не дает осадка и позволяет получить чистую биомассу, применяемую для дальнейших работ при изучении индукции ферментного комплекса *Bacillus macerans*.

Таблиц - 3, рисунков - 4, библиографических наименований - 11.

УДК 577.15.022:577.152.24 + 547.548.61

Выделение и очистка циклодекстринглюканотрансферазы. Паппель К.Э. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 53-63.

Изучены методы получения и очистки циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТ-азы) из *B. macerans*. Фермент выделен из культуральной жидкости путем осаждения $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ или органическими растворителями. Полученный препарат очищен путем гельфильтрации на сефадексах Г-25, Г-75, Г-100, на сорбентах *Toyopearl* / NW-50, NW-60 и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе. Достигнуто 80-кратное повышение удельной активности фермента. Показана возможность значительного снижения соотношения амилазной и ЦГТ-азной активностей препаратов, что позволяет повысить доброкачественность их для синтеза циклодекстринов.

Таблиц - 2, рисунков - 4, библиографических наименований - 10.

УДК 547.533 : 547.458.68

Определение остаточного содержания толуола в β -циклодекстрине. Кросинг В.А., Вокк Р.А. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 64-72.

Разработан метод определения содержания толуола в β -циклодекстрине при его содержании $1 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ и выше.

Методика определения состоит из двух этапов:

1) извлечение и концентрирование толуола, содержащегося в образце β -циклодекстрина методом азеотропной дистилляции раствора β -циклодекстрина в смеси воды и этилового спирта;

2) определение толуола в дистилляте с помощью сканирующего спектрофотометра.

Таблиц - 1, рисунков - 2, библиографических наименований - 5.

УДК 541.49:547.458.68+547.568.1

Соединения включения β -циклодекстрина с бензиловым спиртом. Курвитс М.А., Сиймер Э.Х. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 73-78.

Проведено микрокалориметрическое исследование образования молекулярных комплексов между β -циклодекстрином (β -ЦД) и бензиловым спиртом (БС) при 30 °С в водных растворах. β -ЦД образует с БС относительно слабые комплексы включения 1:1 с изменением свободной энергии около - 8 $\frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$.

Показано, что зависимость значений констант диссоциации и термодинамических параметров от рН является несущественной.

Таблиц - 2, библиографических наименований - 9.

УДК 547.68:668.52

Количественная характеристика комплексообразования укропного и лаврового масла с бета-циклодекстрином. Менерт А.А., Лаас Р.Ф., Креэн М.И. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 79-91.

Изучали образование комплексов бета-циклодекстрина с укропным и лавровым эфирными маслами, их стабильность и возможность выделения компонентов из комплекса. Доказана применимость УФ-спектрофотометрии для этой цели. При хранении полученные комплексы показывают стабильность существенно выше стабильности эфирного масла на глюкозе.

Таблиц - 5, рисунков - 5, библиографических наименований - 14.

УДК 547.68.547.29

Получение водорастворимых производных бета-циклодекстрина. Креэн М.И., Рандла Т.Э., Юбнер М.Э. - Труды Таллиннского технического университета. 1989, № 688, с. 92-101.

Частичное замещение гидроксильных групп карбоксиметильными вызывает существенное повышение гидрофильности циклодекстринов. В рамках настоящей работы разрабатывали усло-

вия карбоксиметилирования β -циклодекстрина путем гетеро-
фазного синтеза в среде этанола. Чтобы предотвратить раст-
ворение синтезируемого карбоксиметилированного циклодекст-
рина в ходе синтеза содержание воды в среде реакции не
должно превышать 10 %. При подходящих условиях реакции мож-
но получить производные циклодекстрина, содержащие в сред-
нем два карбоксиметильных остатка на каждый остаток глюко-
зы. Было показано, что включение анионных карбоксиметиль-
ных групп существенно уменьшает комплексобразование β -цик-
лодекстрина с фенолфталеином в щелочной среде.

Таблиц - 2, рисунков - 2, библиографических наименований - 10.

УДК 547.21:543.544

Газохроматографический анализ углеводородного
субстрата для культивирования микроорганизмов.

Никитина Н.П., Пийроя Э.К. - Труды Таллиннского
технического университета. 1989, № 688, с. 102-109.

Разработаны условия эффективного газохроматографиче-
ского разделения углеводородов - гомологов (n - алканы -
- I - алкены). Экспериментальные данные получены с исполь-
зованием сорбента "Инертон" с 10 % ПЭГ 20М. Расфракциони-
рован ряд алифатических углеводородов широкого спектра мо-
лекулярных масс.

Таблиц - I, рисунков - 3, библиографических наименований - 4.

Цена руб. 1.20

EESTI AKADEEMILINE RAAMATUKOGU



1 0200 00082455 1