

16.7  
300

TALLINNA POLÜTEHNILISE  
INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО  
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

СЕРИЯ А

№ 300

СБОРНИК СТАТЕЙ

ПО  
ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ  
ТЕХНОЛОГИИ XXVI

(Технология пищевых производств II)



Fr. 6.1  
TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED  
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

СЕРИЯ А

№ 300

1971

УДК 541.183.57

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

(Технология пищевых производств II)

ТАЛЛИН 1971



Ep.10203

СБОРНИК СТАТЕЙ  
ПО ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ XXVI  
(технология пищевых производств II)

Таллинский политехнический институт

Редактор К. Каск

Техн. редактор Г. Гришина

Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 12/У1 1970.

---

Сдано в набор 10/У11 1970. Подписано к печати 5/1 1971. Бумага 60x90/16. Печ. л. 5,75 + прилож. 0,5. Уч.-изд. л. 4,35. Тираж 400. МВ-00802. Зак. № 80.

Ротапринт ТПИ, Таллин, Коскла, 2/9. Цена 44 коп.

УДК 577.154.21

А.Ю.Мюхлинг, Ю.М.Канн, К.А.Каск

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНВЕРТАЗЫ  
ИЗ ПИЩЕВЫХ ДРОЖЕЙ

Сообщение I

Автолиз является классическим методом выделения ферментов, в том числе и инвертазы, из дрожжевых клеток. Из работ Вильштеттера, Сулливана и Томсона известно влияние различных клеточных ядов на автолиз дрожжей [1].

Хороших результатов достигли Сотская, Смирнов и Тихомирова [2] при автолизе пивных дрожжей в присутствии 2 – 10% толуола и 10%  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ . Интерес представляет работа Малиновского и Феодорова. При автолизе пекарских дрожжей авторы добавляли в качестве антисептика сернистый газ в виде свежеприготовленной сернистой кислоты в количестве 560 мг  $\text{SO}_2$  на 1 литр среды.

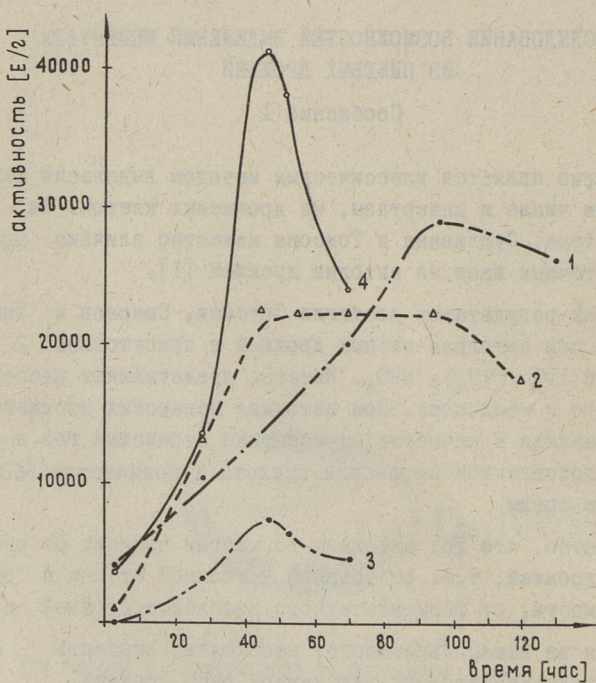
Известно, что ход автолиза во многом зависит от расы и свойств дрожжей, т.е. от толщины клеточной стенки и от ее проницаемости, от ферментативного комплекса дрожжей и т.д.

Исходя из вышеприведенного, необходимо выяснить оптимальные условия автолиза для каждой расы дрожжей.

В данной работе изучались подробно возможности выделения инвертазы из пивных дрожжей при помощи автолиза. Исходным сырьем служила чистая культура пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса XI, выращенная на пивном сусле без аэрации. Дрожжи выделялись центрифугированием и промывались трижды дистиллированной водой. Для проведения автолиза дрожжи суспендировали в воде в отношении 1:1, добавили антисеп-

тика и провели автолиз при температуре 30°C. Изучались возможности проведения автолиза при следующих условиях:

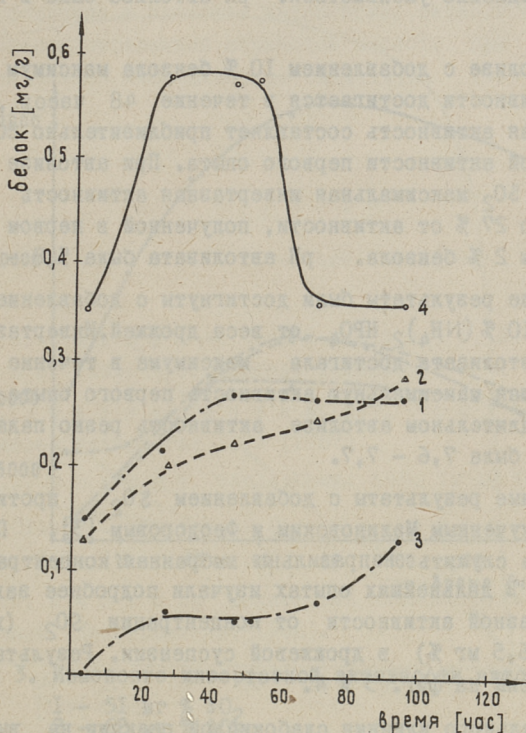
- 1) с добавлением 2 % бензола от веса дрожжей,
- 2) с добавлением 10 % бензола от веса дрожжей,
- 3) с добавлением 90 мг %  $SO_2$  от веса суспензии.
- 4) с добавлением 2 % бензола и 10%  $(NH_4)_2 HPO_4$  от веса дрожжей.



Фиг. 1. Изменение инвертазной активности автолизата

- 1 — с добавлением 2% бензола,
- 2 — с добавлением 10% бензола,
- 3 — с добавлением 90 мг%  $SO_2$ ,
- 4 — с добавлением 2% бензола<sup>2</sup> и 10%  $(NH_4)_2 HPO_4$

За ходом автолиза следили в течение 120 часов. В автолизатах определяли инвертазную активность и содержание белка. Инвертазную активность определяли по инверсии 4,6 %-го раствора сахарозы в 0,01 и ацетатном буфере при pH 4,6 и при температуре 30°C. Для определения редуцирующих сахаров использовали метод М. Сомоги [4]. Содержание белка определяли по Лоури [5].



Фиг. 2. Изменение содержания белка в автолизате

- 1 — с добавлением 2% бензола
- 2 — с добавлением 10% бензола
- 3 — с добавлением 90 мг %  $\text{SO}_2$
- 4 — с добавлением 2% бензола и 10%  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$

Результаты анализа изображены на фигурах I и 2. Изменение инвертазной активности автолизата приведено на фиг. I, изменение содержания белка в автолизате - на фиг. 2.

Из приведенных кривых явствует, что при автолизе с добавлением 2 % бензола максимальная инвертазная активность достигается в течение 90-95 часов. Активность сохраняется без существенных изменений до 100 часов и после этого срока начинает медленно уменьшаться. pH автолиза была в пределах 6,3 - 6,4.

При автолизе с добавлением 10 % бензола максимум инвертазной активности достигается в течение 48 часов, притом максимальная активность составляет приблизительно 80 % от максимальной активности первого опыта. При автолизе с добавлением  $\text{SO}_2$  максимальная инвертазная активность составляла только 27 % от активности, полученной в первом опыте с добавлением 2 % бензола. pH автолизата была 5,8 - 6,0.

Наилучшие результаты были достигнуты с добавлением 2 % бензола и 10 %  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  от веса дрожжей. Инвертазная активность автолизата достигала максимума в течение 48 часов, превышая максимальную активность первого опыта на 44%. При более длительном автолизе активность резко падала. pH автолизата была 7,6 - 7,7.

Полученные результаты с добавлением  $\text{SO}_2$  противоречат данным, полученным Малиновским и Феодоровым [3]. Причиной этого могла служить неправильно выбранная концентрация антисептика. В дальнейших опытах изучали подробнее зависимость инвертазной активности от концентрации  $\text{SO}_2$  (в пределах 56 - 96,5 мг %) в дрожжевой суспензии. Результаты опытов приведены на фиг. 3 и 4.

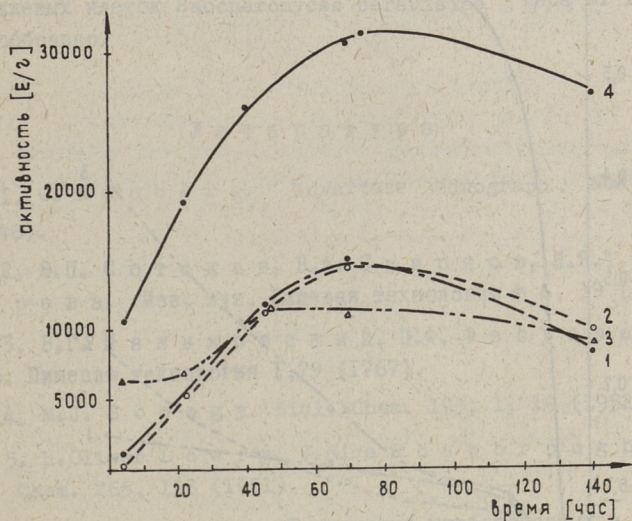
Положительного влияния слабокислой реакции на выделение инвертазы [3] нами не замечалось. Выделение инвертазы и белка по Лоури было гораздо выше при контрольном опыте (с добавлением 2% бензола), чем при добавлении различных концентраций  $\text{SO}_2$ .

Нами определялось влияние  $\text{SO}_2$  на препарат инвертазы, полученный из института "Казгипропищепром". Препарат инвертазы растворяли в воде и добавляли 56 мг %  $\text{SO}_2$ . Параллельно поставили опыт без добавления  $\text{SO}_2$ . Пробы инкубировались в



течение часа при температуре 30°C. Инвертазная активность пробы с добавлением SO<sub>2</sub> уменьшалась на 73%. Инвертазная активность контрольного опыта практически не изменялась.

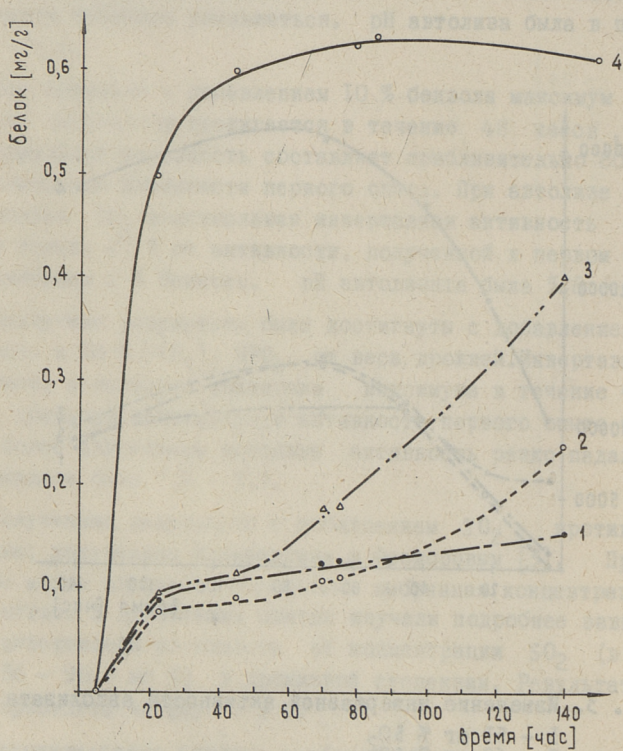
Очевидно SO<sub>2</sub> в изученных концентрациях ингибирует инвертазу. Скорость выделения инвертазы была наивысшей в опытах с добавлением (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Была достигнута наибольшая инвертазная активность автолизата.



Фиг. 3. Изменение инвертазной активности автолизата

- 1 - 51 мг % SO<sub>2</sub>
- 2 - 62 мг % SO<sub>2</sub>
- 3 - 96,5 мг % SO<sub>2</sub>
- 4 - контроль с 2% бензола

Положительный эффект  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  на автолиз дрожжей очевидно объясняется действием фосфата на внутриклеточные железосодержащие соединения, блокирование которых фосфатами снижает редокспотенциал и активирует тем внутриклеточные протеиназы дрожжей [6].



Фиг. 4. Изменение содержания белка в автолизате

- 1 — 51 мг %  $\text{SO}_2$
- 2 — 62 мг %  $\text{SO}_2$
- 3 — 96,5 мг %  $\text{SO}_2$
- 4 — контроль с 2% бензола

## Выводы

1. Изучалось влияние различных клеточных ядов на выделение инвертазы из дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* раса XI при автолизе.

2. Наилучшее выделение инвертазы из дрожжевых клеток достигалось при добавлении 2% бензола и 10%  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$  от веса дрожжей за 48 часов автолиза.

3. Добавление в качестве антисептика сернистого газа в виде свежеприготовленной сернистой кислоты, при автолизе дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* раса XI не целесообразно.

## Литература

1. C. Neuberger. Invertase Monograph. New York, (1946).
2. В.П. Сотская, В.А. Смирнов, Л.Я. Тихомирова. Изв. вуз. Пищевая технология № 6, 39 (1965).
3. В.Г. Малиновский, П.Ф. Феодоров. Изв. вуз. Пищевая технология I, 79 (1967).
4. M. J. Somogyi. Biol. Chem. 195, 1, 19 (1952).
5. H. Oliver Lowry, J. Nira Rosebrough. J. Biol. Chem. 265, 193 (1951).
6. А.М. Малков. Технология хлебопекарных и кормовых дрожжей. Пищепромиздат (1962).

A.Mühling, J. Kann, K.Kask

Untersuchung der Möglichkeiten zur Trennung  
der Invertase aus Hefezellen. I Bericht

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die verschiedenen Möglichkeiten zur Trennung der Invertase aus Hefezellen durch Autolyse wurden untersucht. Die besten Ergebnisse erhielten die Autoren bei der Autolyse der Bierhefe während 48 Stunden beim Zusatz von 2% Benzol und 10%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ .

УДК 577.154.21

А.Ю.Мюхлинг, Ю.М.Канн, К.А.Каск

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ВЫДЕЛЕНИЯ ИНВЕРТАЗЫ  
ИЗ ПИВНЫХ ДРОЖЕЙ  
Сообщение II

В нашем предыдущем сообщении [1] были приведены результаты опытов изучения процесса автолиза с целью выяснить оптимальные условия автолиза пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расы XI для выделения фермента инвертазы ( $\beta$ -фруктофуранозидазы). В то же время известно из многих исследовательских работ, что в дрожжевых клетках инвертаза существует в форме двух изоферментов [2]: один с молекулярным весом 270000, а другой 130000.

Инвертаза с большим молекулярным весом состоит из глюкопротеина, содержащего приблизительно 50% маннана и 2 - 3% глюкозамина. Предполагают, что углевод связан с белковой частью фермента ковалентно через глюкозамин. Неуманн [3] установил, что молекула большой формы инвертазы содержит 20-30 остатков маннана. Изофермент с меньшим молекулярным весом не содержит глюкозамина и почти не содержит маннана. Его молекулярный вес почти равняется весу белковой части "большого" изофермента. В то же время аминокислотный состав обеих изоферментов инвертазы не является одинаковым [2].

Установлено, что изофермент инвертазы с большим молекулярным весом локализован в структуре клеточной стенки дрожжевой клетки вне цитоплазматической мембраны (т.н. экзофермент). Изофермент инвертазы с меньшим молекулярным весом находится внутри цитоплазматической мембраны (т.н. эндофермент).

По данным Лампена [2] до 95% от инвертазы дрожжевой клетки составляет большой изофермент и приблизительно 5% изофермент с меньшим молекулярным весом.

Гаскон и Оттоленгхи [3] утверждают, что при инкубировании дрожжей в присутствии глюкозы почти не изменяется содержание изофермента инвертазы с меньшим молекулярным весом. В то же время количество большой инвертазы можно увеличить до 1000 раз. "Растворенные" ферменты внутри клетки на самом деле не растворены в цитоплазме, а являются составными компонентами мембран Органеллов [4]. Таким образом освобождение эндоферментов (в том числе и эндоинвертазы) не просто разрушение клеточной оболочки и вытекание содержимого, а процесс этот гораздо сложнее.

Из вышеприведенного вытекает, что наряду с механической деструкцией дрожжевых клеток необходимо провести лизис составных частей клетки при помощи тех ферментных систем, которые имеются в самой клетке или использовать для этой цели другие ферменты.

Для освобождения инвертазы из дрожжевых клеток использованы многие ферментные препараты.

Например, для разрушения клеточных стенок и выделения экзоинвертазы использован пищеварительный фермент улитки *Helix pomatia* [3,5,7]. Японские исследователи выделяли инвертазу из дрожжевых клеток под действием папаина [6]. Мюрбек [7] также получил хорошие результаты с папаином.

По данным Вильштеттера [8] протеолитические ферменты кроме растительного папаина не освобождают инвертазы. В то же время данные других авторов [9] не утверждают этого.

Для очистки дрожжевой инвертазы успешно использован ферментный препарат, полученный из муки бобов *Canavalia ensiformis*, который имеет  $\alpha$ -маннозидазную активность [10].

Из литературных данных вытекает, что проблема гидролиза клеточных оболочек при помощи ферментов является крайне сложной и до сих пор не существует единого подхода для решения проблемы. Полученные результаты зависят от расы и фазы роста дрожжей, от характера использованного фермента и от многих других факторов. Поэтому каждая попытка расширить исследования в данном направлении является целесообразной.

## Экспериментальная часть

В данной работе исследовано влияние некоторых протеолитических ферментов на клеточные стенки пивных дрожжей. *Saccharomyces cerevisiae* раса XI с целью выделения инвертазы. Также исследовано влияние пищеварительного фермента улитки *Helix pomatia* и яичного лизоцима.

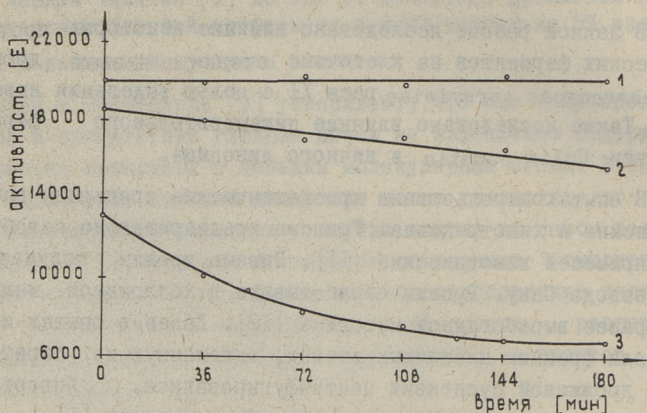
В опытах использованы кристаллические препараты папаина, трипсина и химотрипсина. Трипсин предварительно освободили от примесей химотрипсина [11]. Пивные дрожжи получали с пивзавода Саку. Дрожжи обрабатывали в коллоидной мельнице по ранее выработанной методике [12]. Далее в опытах использовали фракцию клеточных стенок, выделенную из обработанной дрожжевой суспензии центрифугированием. Инвертазную активность определяли ранее описанным методом [1]. Для определения содержания редуцирующих сахаров применяли ферроцианидный метод [13]. Содержание белка в пробах определяли по методу Лоури [14].

При работе с протеолитическими ферментами пришлось избегать соприкосновения реакционной смеси с кислородом воздуха, так как кислород воздуха является ингибитором протеолиза [11]. Опыты провели в атмосфере азота. рН термостатированной смеси автоматически придерживался рН-статом ЛПМ-60 М. Реактор был снабжен механической мешалкой.

### 1. Обработка клеточных оболочек дрожжей папаином

В первой серии опытов для разрушения клеточных стенок применяли папаин, а в качестве активатора — сероводород. Так как в литературе нам не удалось найти данных об оптимальных концентрациях этого активатора и о его влиянии на инвертазу, были поставлены предварительные опыты.

Массу клеточных стенок суспендировали в 0,1 н фосфатном буфере при рН 7,0 в соотношении 1:2 и добавили 2 н сероводорода 10, 25 и 50% от массы клеточных стенок. Температура опыта была +30°C. Результаты опытов по изменению инвертазной активности в течение 3 часов представлены на фигуре 1. Из приведенных данных вытекает, что добавление сероводорода выше 10% от массы клеточных стенок не обосо-



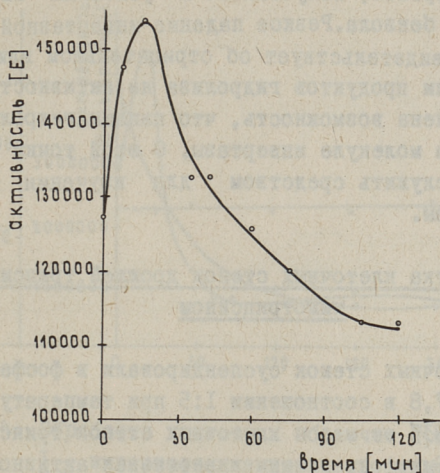
Фиг. 1. Влияние  $H_2S$  на инвертазную активность фракций клеточных стенок

- 1 - 10 % раствора  $H_2S$   
 2 - 25 % раствора  $H_2S$   
 3 - 50 % раствора  $H_2S$

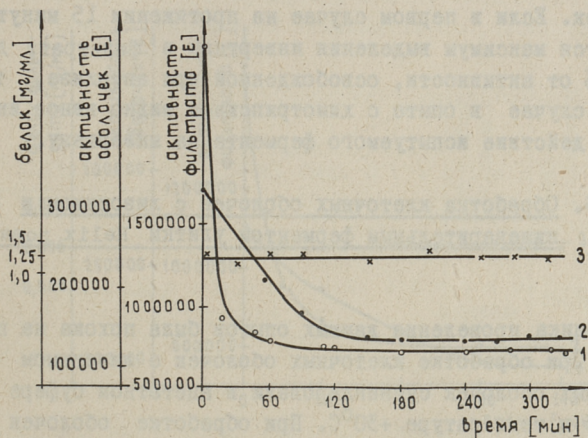
вано. Сероводород при высоких концентрациях инактивирует инвертазу. В последующих опытах добавляли 10 % 2 н-го раствора сероводорода от массы клеточных стенок. Влияние папаина на освобождение инвертазы из клеточных стенок исследовали при оптимальных для папаина [II] условиях, т.е. при  $38^{\circ}C$  и pH 7,0. Опыты были проведены в атмосфере азота. Использованный папаин был предварительно активирован инкубированием его в присутствии сероводорода в течение часа и при температуре  $+37^{\circ}C$ .

Массы клеточных стенок суспендировали в 0,1 н фосфатном буфере при pH 7,0 в отношении 1:5 и добавили активированного папаина соответственно 0,001% и 0,005% от массы клеточных стенок. При концентрации папаина 0,001% определяли только инвертазную активность фильтрата, при втором опыте были определены остаточная активность клеточных стенок и содержание белка в фильтрате. Полученные результаты изображены на фигурах 2 и 3. Количество освобожденной от клеточных стенок инвертазы составляет соответственно 50% при первом опыте и 80% при втором опыте от





Фиг. 2. Изменение инвертазной активности фильтрата при обработке клеточных оболочек с папаином



Фиг. 3. Обработка клеточных оболочек папаином  
 1 - инвертазная активность фильтрата (Е/г с.в.дрожжей); 2 - инвертазная активность оболочек Е/1г с.в.дрожжей;  
 3 - содержание белка в фильтрате мг/мл

количества инвертазы, полученного в условиях автолиза в присутствии 5% бензола. Резкое падение инвертазной активности фильтрата свидетельствует об отрицательном влиянии самого папаина или продуктов гидролиза на активность инвертазы. Не исключена возможность, что папаин гидролизует некоторые связи в молекуле инвертазы. С этой точки зрения папаин мог бы служить средством для изучения активного центра инвертазы.

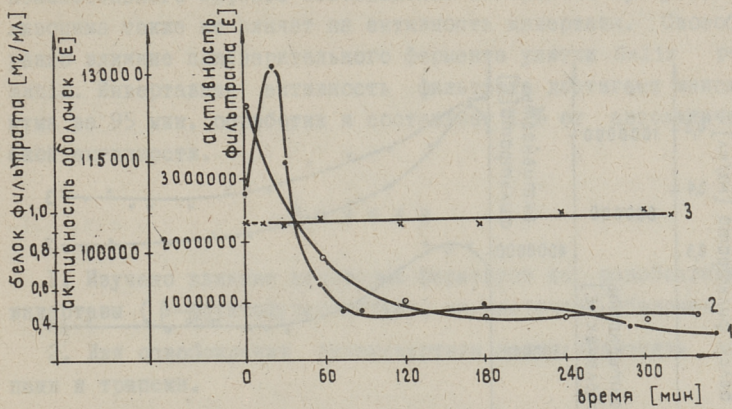
### 2. Обработка клеточных стенок дрожжей трипсином и химотрипсином

Массу клеточных стенок суспендировали в фосфатном буфере при pH 7,8 в соотношении 1:5 при температуре +37°C и добавили 0,03% от массы клеточных стенок трипсина или химотрипсина. Были определены инвертазная активность фильтрата, клеточных оболочек и содержание белка в фильтрате. Результаты опыта изображены на фигурах 4 и 5. Из приведенных результатов видна существенная разница влияния трипсина и химотрипсина на освобождение инвертазы из клеточных оболочек. Если в первом случае на протяжении 15 минут наблюдается максимум выделения инвертазы в фильтрат, достигая 87% от активности, освобожденной при автолизе, то во втором случае в опыте с химотрипсином видно явное ингибирующее действие испытуемого фермента на инвертазу.

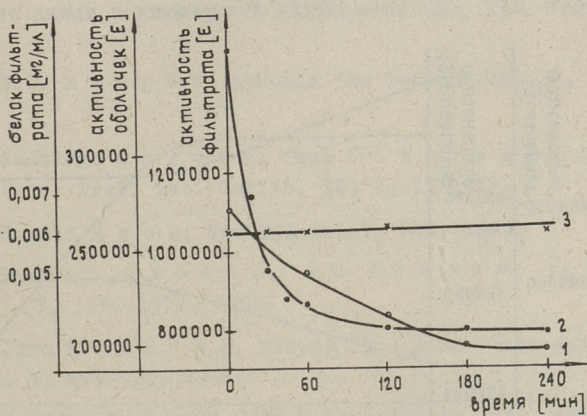
### 3. Обработка клеточных оболочек с лизоцимом и пищеварительным ферментом улитки *Helix pomatia*

Методика проведения данных опытов была похожа на предыдущие. При обработке клеточных оболочек с лизоцимом массу клеточных оболочек суспендировали в ацетатном буфере при pH 4,65 и температуре +30°C. При обработке оболочек с пищеварительным ферментом улитки *Helix pomatia* была применена 0,1 н трис-НСI-буфер при pH 7,5 и температуре +40°C. В обоих случаях добавляемое количество ферментов было 0,03% от массы клеточных стенок.

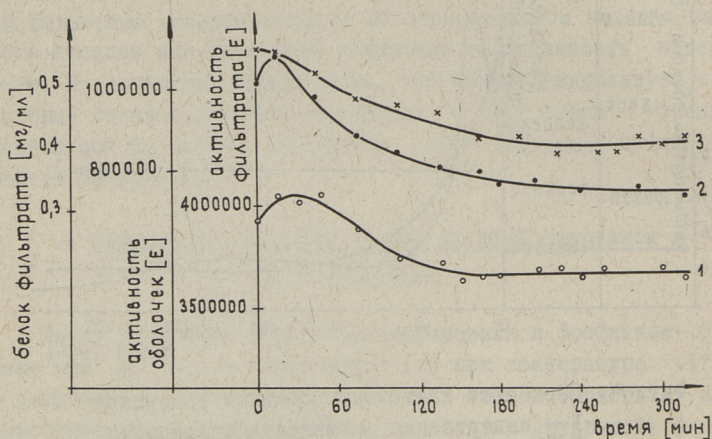
Результаты опытов изображены на фиг. 6 и 7. Основываясь на полученных данных можно заключить, что лизоцим не имеет



Фиг. 4. Обработка клеточных оболочек трипсином  
 1 - инвертазная активность фильтрата Е/1 г с.в.дрожжей; 2 - инвертазная активность оболочек Е/1 г с.в.дрожжей; 3 - содержание белка в фильтрате мг/мл.

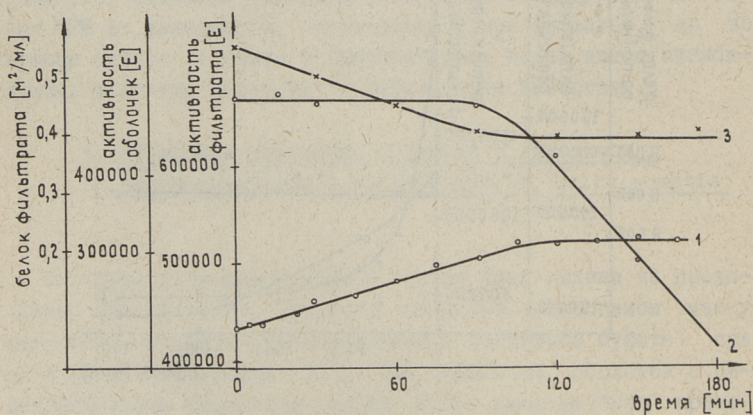


Фиг. 5. Обработка клеточных оболочек химотрипсином  
 1 - инвертазная активность фильтрата Е/1 г с.в.дрожжей; 2 - инвертазная активность оболочек Е/1 г с.в.дрожжей; 3 - содержание белка в фильтрате мг/мл



Фиг. 6. Обработка клеточных стенок лизоцимом

1 - инвертазная активность фильтрата Е/І г с.в.дрожжей; 2 - инвертазная активность клеточных оболочек Е/І г с.в. дрожжей; 3 - содержание белка в фильтрате мг/мл



Фиг. 7. Обработка клеточных стенок пищеварительным ферментом улитки *Helix pomatia*

1 - инвертазная активность фильтрата Е/І г с.в.дрожжей; 2 - инвертазная активность клеточных оболочек Е/І г с.в.дрожжей; 3 - содержание белка в фильтрате мг/мл.

положительного эффекта освобождения инвертазы. Присутствие лизоцима также не влияет на активность инвертазы. Своеобразно влияние пищеварительного фермента улитки *Helix pomatia*. Инвертазная активность фильтрата достигает максимума за 95 мин. обработки и составляет 12% от автолитической активности.

### В ы в о д ы

1. Изучено влияние некоторых ферментов на освобождение инвертазы ( $\beta$ -фруктофуранозидазы) из клеточных оболочек.

2. Для освобождения экзоинвертазы можно применять папаин и трипсин.

3. Химотрипсин, лизоцим и пищеварительный фермент улитки *Helix pomatia* в изучаемых условиях опытов не применимы с целью освобождения экзоинвертазы.

### Л и т е р а т у р а

1. А.Э. Мюхлинг, Ю.М. Канн, К.А. Каск. Сб. статей по химии и химической технологии ХХП, ТПИ, Таллин, 1968.

2. I.O. Lamren. *Antonie van Leuvenhock*, 34, 1-18, 1968.

3. Santiago Gascon, Paul Ottolenghi, *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsb.* 36, 5, 1, 1967.

4. Harold Baum, *New Scientist*, 548, 1967.

5. Santiago Gascon, J.O. Lamren, *J. Biol. Chem.* 243, 7, 1567-1572, 1968.

6. Jiro Hoshimo, Toshio Kaya, *Plant and Cell Physiol.* 5, 495-518, 1964.

7. M. Burger, E. Vason, *Nature*, 182, 1508, 1958.

8. А.З. Бару. Исследование по получению ферментных препаратов инвертина и применению их в кондитерской промышленности. Диссертация на соискание ученой степени канд. техн. наук. Харьков. 1954.

9. Yoshiki Takesue, Tsutomu Kashiwagi, J. Biochem., 65, 3, 427, 1968.
10. Britt Berggren, Arkiv för Kemi, 29, 12, 117-126, 1967.
11. Д. Нортрон, М. Кунтиц, Р. Дерриоти. Кристаллические ферменты. М. 1950.
12. Ю.М. Канн, К.А. Каск, А.И. Кестнер, А.А. Талвари, А.Э. Мюхлинг. Сб. статей по химии и химической технологии XXI, ТПИ, Таллин, 35-41, 1969.
13. П.С. Бухарев, Е.Т. Подлубная. Журнал аналит. химии У, 5, 1950.
14. H.O. Lowry, J. Biol. Chem. 265, 193, 1951.

A.Mühling, J.Kann, K.Kask

Untersuchung der Möglichkeiten zur Trennung  
der Invertase aus Hefezellen. II Bericht

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Wirkung von verschiedenen Enzymen und Enzympräparaten auf die Absonderung der Invertase aus Hefezellen wurde untersucht.

Zu diesem Zweck ließen sich unter gegebenen Versuchsbedingungen die Enzyme Papain und Trypsin verwenden.

УДК 66.097.64:577.154.21.

М.И.Креен, А.И.Кёстнер, К.А.Каск

ПОЛУЧЕНИЕ ФИКСИРОВАННОЙ ПОЛИАКРИЛАМИДНЫМ  
ГЕЛЕМ ИНВЕРТАЗЫ

В последние годы значительное внимание уделяется вопросам фиксации ферментов и других биологически активных белков нерастворимыми в воде носителями. Полученные нерастворимые препараты применяются для проведения непрерывных ферментативных процессов в виде суспензий или в колонках. Преимуществами фиксированных ферментов являются их стабильность и хорошая воспроизводимость результатов. Ферментативную реакцию можно прервать фильтрацией или центрифугированием в любой момент.

В обзорных статьях [1-4], посвященных фиксации ферментов и других биологически активных веществ, выделяются следующие методы получения нерастворимых форм белка.

а) Адсорбция на инертных носителях или синтетических ионообменных смолах [5-10].

При данном методе в качестве адсорбентов применяются активированный уголь, инфузорная земля [6], декстрановые гели "Сефадекс" Г-25, Г-50, Г-100 [5] и др. Из ионообменных смол применяют ДЭАЭ - целлюлозу для прикрепления инвертазы и ацилазы [7,9], КМ-целлюлозу в случае аспарагиназы [10] и ДЭАЭ-сефадекс - для аминоксилазы [8].

Так как при изменении условий (ионная сила, рН, добавка заряженного макромолекулярного субстрата и т.д.) может иметь место десорбция белков, то названный метод не нашел

широкого применения для получения нерастворимых ферментов.

б) Химическое связывание белков с подходящими нерастворимыми в воде носителями [11-33].

Химический метод чаще всего применяется для приготовления фиксированных ферментов. Из препаратов, полученных названным способом, фермент не выделяется в раствор ни при определении активности, ни при изменении состава среды.

Связывание белков с носителями производится по свободным amino- и карбоксильным группам, по гидроксифенилрадикалу тирозина, по свободным тиольным группам и дисульфидной связи, по алифатическим гидроксильным группам и т.д. [1,25]. Названные функциональные группы белков не должны обуславливать их биологической активности.

В качестве носителей используются нерастворимые в воде полимеры, которые имеют группировки, реагирующие с перечисленными функциональными группами.

Из природных полимеров применяют целлюлозу в виде фильтровальной бумаги [13] или в микрокристаллической форме [17], в которую введены соответствующие реактивные группы. С КМ-целлюлозой химически могут быть связаны  $\alpha$ -амилаза [12], трипсин [15], химотрипсин, рибонуклеаза [14] и другие ферменты.

Многие исследователи занимаются вопросами связывания ферментов и других биологически активных веществ с синтетическими полимерами. Применяя в качестве носителя сополимер п-амино-ДЛ-фенилаланина и Л-лейцина, Качальский и сотрудники получили и исследовали связанный трипсин [19-21], папаин [22, 26], уреазу [25] и другие ферменты. Нерастворимые производные трипсина получают также посредством связывания активного фермента с сополимером малеинового ангидрида и этилена [18]. С использованием сополимера Л-аланина и Л-глутаминовой кислоты были получены химически связанные химотрипсин [23], апираза, десоксирибонуклеаза [24] и др.

При получении целого ряда химически связанных ферментов Манеке применял полимерные изоцианатные и нитрированные сополимерные носители [27,28].

Бохненсак и др. [33] исследовали ковалентное связывание дрожжевой гексокиназы с сефадексом Г-200.



в) Шивание молекулы белка как метод для получения нерастворимых в воде ферментов применяется относительно редко [26, 29]. Метод основывается на превращении белка в нерастворимый "суперполимер" при помощи таких бифункциональных реагентов, как бис-диазобензидин или диизоцианат.

При действии глутаральдегида на растворимые трипсин, папаин и субтилизин можно получать соответствующие нерастворимые ферменты [30-32].

г) Фиксирование белка структурой геля [34-35].

Бернфельд и др. [34-36] разработали принципиально новый метод для получения нерастворимых форм ферментов и других макромолекулярных веществ.

Метод заключается в захвате растворенного макромолекулярного вещества трехмерной структурой геля синтетического полимера. Это достигается полимеризацией мономера в водном растворе биологически активного макромолекулярного вещества.

Данный метод, по сравнению с ранее описанными, имеет целый ряд преимуществ. Он характеризуется высоким выходом активности фиксированного фермента, простотой изготовления и гранулирования геля. Химической модификации фермента в данном случае не происходит. Свойства носителя можно регулировать изменением размеров пор пространственной решетки полимера.

Для фиксирования ферментов, антигенов и т.д. по этому методу до сих пор применяли преимущественно акриламид [34-41, 44], который полимеризуется в водных растворах, давая гель с хорошими механическими свойствами. Кроме того, в качестве носителей применяются гидрофобный гель Silastic [44, 45], а также крахмальный гель [42, 43].

Этим методом получен целый ряд фиксированных ферментов, из которых можно отметить трипсин [34, 37, 41, 44], химотрипсин [34, 44], папаин [34],  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазу [34], альдолазу [34, 35], эндолазу [36], лактатдегидрогеназу [37, 38], глюкозооксидазу [38-40, 45], колиэстеразу [42, 43], фиксированные антитела [34] и др.

Глюкозооксидаза, фиксированная полиакриламидным гелем, нашла практическое применение при непрерывном определении содержания глюкозы в растворах. В этих целях применяются или капиллярные колонки, наполненные фиксированной глюкозооксидазой [39], или т.н. энзимэлектроды [40].

Вопросы фиксирования ферментов и других биологически активных белков полиакриламидным гелем изучены еще недостаточно; неясными остаются такие стороны этой проблемы, как :

- оптимальные условия улавливания ферментов гелем,
- кинетика реакций фиксированных ферментов,
- сущность стабилизирующего влияния геля,
- причины потери активности в процессе фиксирования ферментов,
- использование фиксированных гелем ферментов в практике.

В настоящей работе для получения нерастворимой инвертазы применяли фиксирование нативной инвертазы полиакриламидным гелем. Целью работы было установление условий улавливания фермента гелем.

#### Экспериментальная часть

При получении фиксированной инвертазы исходили из препарата инвертазы фирмы "Мерк". Активность препарата определяли по методу Бамана [49] и она составляла 3250 Е/мл.

В качестве носителя использовали полиакриламидный гель, который изготовляли из акриламида  $N,N'$ -метилен-бис-акриламида. В опытах применяли акриламид Харьковского завода химических реактивов марки "Чистый" и  $N,N'$ -метилен-бис-акриламид, синтезированный нами по методу Магата [46] из акрилонитрила и формальдегида.

Синтез полиакриламида протекает по механизму радикальной полимеризации. В качестве катализатора применяется персульфат аммония, регулятора-  $\beta$ -диметиламинопропионитрил  $((CH_3)_2N-CH_2-CH_2-C \equiv N)$ ; фотополимеризация катализируется рибофлавином [48].

Приготовленный нами фиксированный фермент получали фотополимеризацией раствора, содержащего фермент, акриламид,

$N,N'$ -метилен-бис-акриламид, персульфат аммония,  $\beta$ -диметил-аминопропионитрил и рибофлавин.

В опытах использовались растворы следующего состава, приготовленные на основе 0,05 М ацетатного буферного раствора с рН 4,8:

акриламид	38%
$N,N'$ -метилен-бис-акриламид	2,5%
или раствор с содержанием акриламида	37%
и $N,N'$ -метилен-бис-акриламида	4%
$(CH_3)_2-N-CH_2-CH_2-C \equiv N$	5%
$(NH_4)_2S_2O_8$	5%
рибофлавин	0,01%
инвертаза	65 Е/мл.

Для приготовления геля с общим содержанием мономеров 7% и относительным содержанием сшивающего агента 10%, растворы компонентов брали в следующих количествах:

раствор акриламида	1,7 мл
" $N,N'$ -метилен-бис-акриламида	2,8 "
" инвертазы	2,3 "
" $(CH_3)_2-N-CH_2-CH_2-C \equiv N$	0,5 "
" $(NH_4)_2S_2O_8$	0,5 "
" рибофлавина	0,5 "

Объем смеси доводили до 10 миллилитров 0,05 М ацетатным буферным раствором (рН 4,8). Для получения геля с различным содержанием полимера и сшивающего агента изменяли содержание акриламида и  $N,N'$ -метилен-бис-акриламида в исходной смеси.

Так как кислород замедляет процесс полимеризации, то все растворы готовили с использованием кипяченой воды. Смесь исходных веществ насыщали азотом в течение 5-10 минут. Затем смесь интенсивно освещали люминесцентной лампой мощностью 400 вт.

Образование геля начинается через 4-10 минут, после чего освещение геля продолжали еще в течение 5 минут.

Чтобы избежать термической инактивации фермента во время полимеризации и гелеобразования, пробирка с полимеризационной смесью помещалась в холодную водяную баню.

Полученный блок геля измельчали пропусканием через медицинский шприц в первой ступени с диаметром отверстия 1 мм, во второй ступени - 0,5 мм. Из полученного материала декантированием выделяли тончайшую фракцию (до 10% от общего объема).

Измельченный гель промывали 0,05 М ацетатным буферным раствором (рН 4,8) до исчезновения активности в промывных водах.

Активность фиксированного гелем фермента определяли в колонке при 30° и рН 4,8. В качестве субстрата применяли 7% раствор сахарозы. Активность измеряли при трех разных объемных скоростях субстрата при установившемся стационарном режиме.

Для определения содержания редуцирующих веществ применяли метод Тегге [47].

Активность колонки  $A$  вычисляли по формуле

$$A = u \cdot C_p,$$

где  $u$  - скорость протекания субстрата, мл/мин,

$C_p$  - концентрация продукта, мкмоль/мл.

Активность колонки выражается в единицах мкмоль/мин, что соответствует международной единице ферментативной активности.

В работе выяснилось, что при скоростях 0,04-0,62 мин<sup>-1</sup> активность колонки не зависит от объемной скорости субстрата. Из этого следует, что активность геля лимитируется процессами, протекающими в зернах геля.

Степень гидролиза субстрата зависит от скорости субстрата  $u$ . В наших опытах степень гидролиза субстрата не превышала 25%.

Активность колонки выражается и следующим образом:

$$A = \alpha \cdot \beta \cdot A_0 = \gamma \cdot A_0,$$

где  $A_0$  - исходная активность фермента,

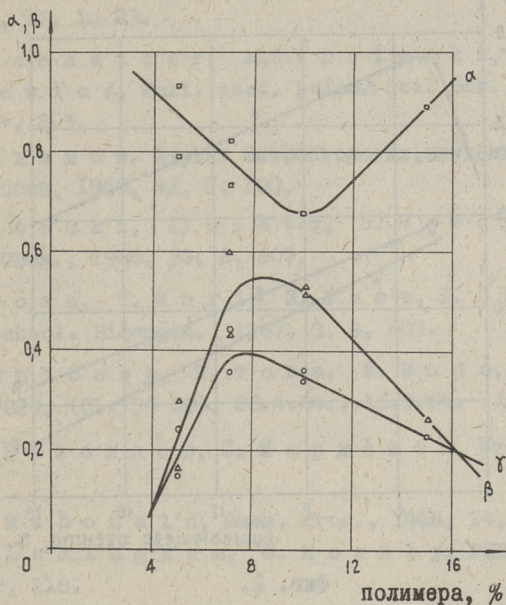
$\alpha$  - коэффициент фиксации фермента гелем, определяемый по разности,

$\beta$  - коэффициент видимой активности,

$\gamma$  - общий коэффициент активности.

Нами исследовалась зависимость названных коэффициентов от общей концентрации полимера и от относительной концентрации сшивающего агента в геле.

Результаты опытов, проведенных с изменением общей концентрации полимера в геле от 5 до 15%, приведены на фиг. I.



Фиг. I.

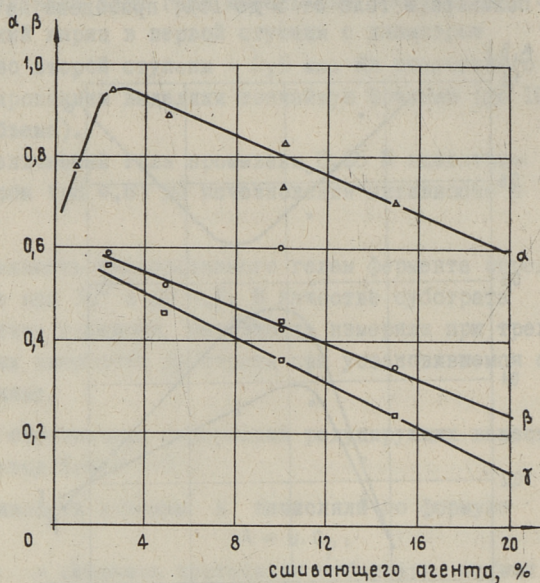
При общей концентрации полимера 7% относительную концентрацию сшивающего агента изменяли в пределах от I до 15%. Полученные зависимости приведены на фиг. 2.

Оказывается, что степень фиксирования инвертазы полиакриламидным гелем довольно высокая — 0,7–0,9. Коэффициент видимой активности фермента не превышает 0,6. Общий коэффициент активности исследованных гелей составляет 0,55.

При хранении фиксированной полиакриламидным гелем инвертазы при температуре 0 – +4°C в течение двух месяцев сохраняется 70% ферментативной активности.

### В ы в о д ы

I. Полимеризацией смеси акриламида, N,N'-метил-бис-акриламида и инвертазы в присутствии катализаторов и при



Фиг. 2.

освещении получен нерастворимый гель со стойкой инвертазной активностью.

2. Действие полученного препарата исследовано в колонках при стационарном режиме. В области объемных скоростей  $0,04-0,62 \text{ мин}^{-1}$  активность колонки не зависит от скорости протекания субстрата.

3. Показатели фиксирования фермента зависят от состава геля. Оптимальные показатели достигнуты при общей концентрации полимера 7%. Учитывая механические свойства геля, оптимальным оказалось содержание сшивающего агента 10%.

#### Л и т е р а т у р а

1. I. Silman, E. Katchalski, Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, part II, 873.

2. L. Goldstein, E. Katchalski, Z. analyt. Chem., 1968, 243, 375.

3. E. Crook, *Biochem. J.*, 1968, 107, 2, 1 P.
4. I. Chibata, T. Tosa, *Tampekushitsu Kakusan Koso*, 1966, 11, 1, 23.
5. Z. Schneider, A. Stroinski, J. Pawelkiewicz, *Bull. Acad. polon. Sci. Ser. sci. biol.*, 1968, 16, 4, 203.
6. А. А. Адамов, *Журнал Микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*, 1965, 42, 2, 100.
7. H. Suzuki, I. Ozawa, H. Maeda, *Agric. and Biol. Chem.*, 1960, 30, 8, 807.
8. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Biotechnol. Bioengin.*, 1967, 9, 4, 603.
9. I. Chibata, T. Tosa, N. Endo, *Pat. Japan*, Nr. 7829, (Cl. 36 B0), 26.4.64., 15.7.64.
10. А. Николаев, С. Мардашев, *Биохимия*, 1961, 26, 641.
11. D. McDonald, *Chem. Proc.*, 1968, 14, 8, 14.
12. W. Ledingham, W. Hornby, *FEBS-letters*, 1969, 5, 2, 118.
13. R. Wilson, G. Kay, M. Lilly, *Biochem. J.*, 1968, 109, 1, 137.
14. M. Mitz, L. Summaria, *Nature*, 1961, 189, 18, 576.
15. C. Epstein, C. Anfinson, *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 7, 2175.
16. W. Hornby, M. Lilly, E. Crook, *Biochem. J.*, 1968, 107, 5, 669.
17. S. Barker, P. Somers, R. Epton, *Carbohydrate Res.*, 1968, 8, 4, 491.
18. I. Levin, M. Pecht, L. Goldstein, E. Katchalski, *Biochemistry*, 1964, 3, 12.
19. A. Bar-Eli, E. Katchalski, *Nature*, 1960, 188, 4753.
20. A. Bar-Eli, E. Katchalski, *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 5.
21. A. Rimon, B. Alexander, E. Katchalski, *Biochemistry*, 1966, 5, 2, 792.

22. J. Cebra, D. Givol, H. Silman, E. Katchalski, J. Biol. Chem., 1961, 236, 6.
23. T. Wagner, C. Hsu, G. Kelleher, Biochem. J., 1968, 108, 5, 892.
24. A. Patel, S. Pennington, H. Brown, Biochem. et Biophys. Acta. Enzymology, 1969, 178, 3, 626.
25. E. Riesel, E. Katchalski, J. Biol. Chem., 1964, 239, 5.
26. H. Silman, M. Albu-Weissenberg, E. Katchalski, Biopolymers, 1966, 4, 4, 441.
27. G. Manecke, Pure Appl. Chem., 1962, 4, 507.
28. G. Manecke, G. Günzel, Naturwissenschaften, 1967, 54, 20, 531.
29. H. Kozava, Pat. Japan Nr. 8910 (Cl. 36 B0), 22.9.64., 26.4.67.
30. A. Habeeb, Arch. Biochem. and Biophys., 1967, 119, 264.
31. E. Jansen, A. Olson, Arch. Biochem. and Biophys., 1969, 129, 221.
32. K. Ogata, M. Ottesen, I. Svendsen, Biochem. et Biophys. Acta, 1968, 159, 2, 403.
33. R. Bohnensack, W. Augustin, E. Hofmann, Experientia, 1969, 25, 4, 348.
34. P. Bernfeld, J. Wan, Science, 1963, 142, 678.
35. P. Bernfeld, R. Bieber, P. McDonnell, Arch. Biochem. and Biophys., 1968, 127, 3, 779.
36. P. Bernfeld, R. Bieber, Arch. Biochem. and Biophys., 1969, 131, 2, 587.
37. T. Wieland, H. Determann, K. Bueinig, Z. Naturforschung, 1966, 21, 10, 1003.
38. G. Hicks, S. Updike, Anal. Chem., 1966, 38, 6, 726.
39. S. Updike, G. Hicks, Science, 1967, 158, 3795, 270.
40. S. Updike, G. Hicks, Nature, 1967, 214, 5092, 986.
41. K. Mosbach, R. Mosbach, Acta Chem. Scand., 1966, 20, 2807.



42. E. Bauman, L. Goodson, G. Guilbault, D. Kramer, Anal. Chem., 1965, 37, 11, 1378.
43. G. Guilbault, D. Kramer, Anal. Chem., 1965, 37, 1675.
44. H. Brown, A. Patel, S. Chattopadhyay, J. Biomed. Mater. Res., 1968, 2, 2, 231.
45. S. Pennington, H. Brown, A. Patel, S. Chattopadhyay, J. Biomed. Mater. Res., 1968, 2, 4, 443.
46. E. Magat, B. Faris, J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 1028.
47. G. Tegge, W. Nierle, Stärke, 1965, 17, 4.
48. H. Determann, Gel Chromatography, Springer-Verlag, New-York, Inc., 1968.
49. E. Bamann, Die Methoden der Fermentforschung, Band 2, Leipzig, 1941.

M.Kreen, A.Köstner, K. Kask

Obtaining of Invertase Entrapped into  
Polyacrylamide Gel

S u m m a r y

A review on artificially fixed enzymes has been compiled. The entrapping of invertase into polycrylamide gel has been investigated in the experimental part.

The activity of enzyme columns has been found independent on substrate velocity.

The best results both in enzymatic and mechanical properties have been obtained using a 7 p.C. gel with 10 p.C. cross links. Thus about 90 p.C. of the enzyme activity has been retained and the value of the effectiveness factor is up to 0.6.



УДК 541.183.57:577.154.22

А.И.Кёстнер, К.Э.Паппель

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ  
ФЕРМЕНТОВ НА ИОНИТАХ I

Сравнение ионитов

Культуральные растворы, получаемые при производстве ферментов глубинным способом, часто имеют низкую активность. Это вызывает необходимость концентрирования ферментов из растворов. Среди разных методов концентрирования весьма перспективным является процесс адсорбции. При помощи адсорбции возможно селективное выделение ферментов из растворов, содержащих разные примеси [1, 2]. Белки, в том числе ферменты, сорбируются на разных неорганических и органических материалах. Особенно выгодно использовать ионообменники. Адсорбционное равновесие между ними и раствором очень чувствительно к концентрации водородных ионов. Изменением pH возможно вести процесс по желанию в сторону сорбции или десорбции. Как правило, иониты довольно хорошо регенерируются.

Благодаря вышеизложенному иониты нашли в настоящее время весьма широкое применение при получении чистых ферментов в лабораториях. Обычно в этих целях используется метод хроматографии в наполненных ионитами колонках. Число публикаций, касающихся этой проблемы, весьма велико. Здесь упоминаем только некоторые обзоры [3 - 8].

В большинстве работ оптимальные условия выбираются эмпирически. Как правило, в последнее время чаще пользуются анионитами, чем катионитами. При адсорбции следует избегать экстремальных значений pH, лучше пользоваться гидрофильными ионитами и т.д.

Несмотря на широкое применение ионитов при аналитическом разделении ферментов, препаративные методы, особенно их внедрение в промышленность, разработаны далеко не полностью. До сих пор не существует количественной теории адсорбции белков на ионитах, также не разработаны промышленно применимые, экономически эффективные методы концентрирования ферментов.

В данном сборнике начинается публикация серии работ, посвященных адсорбции амилолитических ферментов на ионитах. Амилазы находят применение в разных отраслях пищевой и легкой промышленности и вопрос об усовершенствовании методов их производства весьма актуален. Кроме того, установленные в случае амилаз закономерности, по всей вероятности, могут быть распространены и на другие ферменты.

#### Экспериментальная часть

Исследовалась адсорбция амилаз из раствора препарата Оризин ПК в подходящем буфере. В растворах определялась общая амилолитическая активность по приросту соединений, восстанавливающих йод в щелочной среде. Определение проводилось при  $pH = 4,7$  и  $30^{\circ}C$ . Активность выражалась в международных единицах Е. В некоторых случаях определялось также содержание растворимого белка по Лоури.

Большинство опытов проводилось в статических условиях. В раствор фермента вводилась навеска набухшего в данном буфере ионита, смесь периодически перемешивалась. По истечении определенного срока ионит отделялся фильтрованием и определялась его амилолитическая активность.

В первой серии опытов сравнивались разные аниониты. Опыты проводились в диэтаноламиновом буфере с  $pH = 8,9$ . Объем исходного раствора 3 мл, навеска набухшего ионита 1 г, начальная активность 29,5 Е/мл, продолжительность адсорбции 1,5 час. Результаты опыта приведены в табл. I.

Приведенные результаты показывают, что амилазы сорбируются на всех испытанных анионитах. Лучше всего протекает адсорбция на Дауэкс Ix2 и на Сефадекс А-50. В условиях опыта насыщение емкости этих ионитов не достигнуто. Исходя из

более низкой цены и большей механической прочности синтетических ионитов для дальнейших опытов выбран анионит Дауэкс Ix2.

Т а б л и ц а I  
Адсорбция на разных анионитах

№ п/п	И о н и т	Конечная концентрация, Е/мл	Адсорбция Е/г
1	Amberlite IRA - 410	19,7	19,8
2	АН-I	7,5	44,0
3	IRA - 400	16,0	27,0
4	IR - 4B	20,8	17,4
5	IR - 45	11,0	37,0
6	Dowex Ix2	0	59,0
7	Dowex Ix4	18,3	22,4
8	IRA - 401	15,9	29,2
9	DEAE - Sephadex A 50	0	59,0

Для определения полной емкости ионита Дауэкс Ix2 проводился опыт в колонке. Через колонку с размерами столба ионита 10 x 104 мм (загрузка 4,46 г) со скоростью 12 мл/час пропускался раствор амилаз с активностью 30,0 Е/мл. Данные анализа вытекающего из колонки раствора приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2  
Адсорбция на колонке с ионитом Дауэкс Ix2

№ фракции	Объем фракции, мл	Суммарный объем фракции, мл	Активность фракции, Е/мл	Сумма активностей на выходе, Е
1	2	3	4	5
I-15	-	77	0	0
I6	8,6	85,6	2,5	21
I7	10,8	94,4	5,6	81
I8	10,0	104,4	8,7	168
I9	9,8	114,2	9,2	258
20	10,6	124,8	9,5	359
21	9,2	134,0	17,8	522

1	2	3	4	5
22	9,5	142,5	26,0	769
23	3,8	146,3	26,3	869

Всего в колонку вводили 4380 Е, из этого количества вышло 870 Е, раствор в колонке содержит ориентировочно 100 Е, т.е. емкость ионита была  $3410 : 4,46 = 765$  Е/г. Приведенная емкость достигнута при конечной активности 26 Е/мл. Такая высокая остаточная активность при технологическом концентрировании ферментов бессмысленна. Поэтому следующие опыты в колонках заканчивались сразу после появления активности в вытекающей жидкости. После промывки колонки буфером оказалось связанным 290 - 340 Е/г фермента. Таким образом установлено, что анионит Дауэкс Ix2 связывает значительные количества амилаз.

Кроме удовлетворительной емкости для использования ионита необходима также высокая степень десорбции.

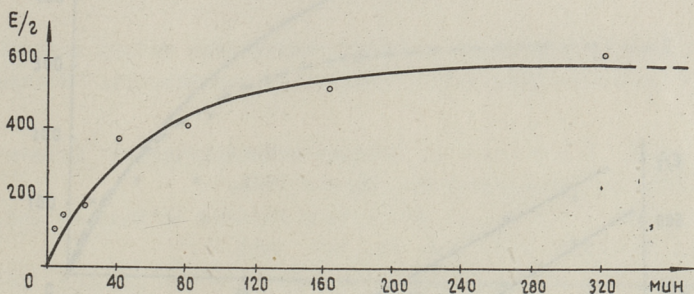
В проведенных нами опытах в качестве десорбирующего раствора использованы: ацетатный буфер pH = 3,91, диэтанол-аминовый буфер pH = 2,85, фосфат-цитратный буфер pH = 2,15-3,55, то же с прибавкой 0,1 и 1 м  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , фосфатный буфер pH = 2,4, 0,1 м HCl. Относительно лучшие результаты достигнуты применением фосфат-цитратного буфера с pH = 2,15. В этих условиях выход активности составляет 11% и выход белка 33%. В остальных случаях результаты еще хуже. Таким образом, несмотря на вполне удовлетворительную емкость, обратимость адсорбции амилаз на анионите Дауэкс Ix2 весьма низка. По этой причине исследования по адсорбции на анионитах нами прекращены.

В следующих опытах сравнивались свойства некоторых катионитов по следующим условиям: количество ионита 1 г, объем раствора 2 мл. Раствор ионита приготавливался в ацетатном буфере с pH = 3 - 5. В этих условиях испытанные катиониты КУ-2, IR-120, IRC-50 и SE-Сефадекс связывали амилазы в количестве 35-60 Е/г. При измельчении емкость ионита увеличивается. Так, например, фракция 0,25-0,5 мм ионита КУ-2 адсорбирует до 180 Е/г. При проведении десорбции луч-

шие результаты получены применением 0,1 м аммиачного буфера с  $\text{pH} = 10,5 - 11,5$ . Из катионитов КУ-2 и IRC -50 выход при десорбции составлял до 40%.

Таким образом, испытанные катиониты вполне перспективны для адсорбции ферментов. На основе проведенных нами опытов еще нельзя сделать окончательного вывода о наиболее подходящем для этих целей ионите. По некоторым теоретическим и техническим соображениям для дальнейших опытов выбран Амберлит IRC -50 (слабокислотный карбоксильный катионит с полиметакриловым скелетом). Так как емкость ионита увеличивается с уменьшением среднего диаметра зерен, была выбрана специальная форма ионита СВ 50/II (200-400 меш). Перед употреблением тончайшая фракция из ионита вымывалась. Первые опыты проводились в статических условиях при периодическом перемешивании.

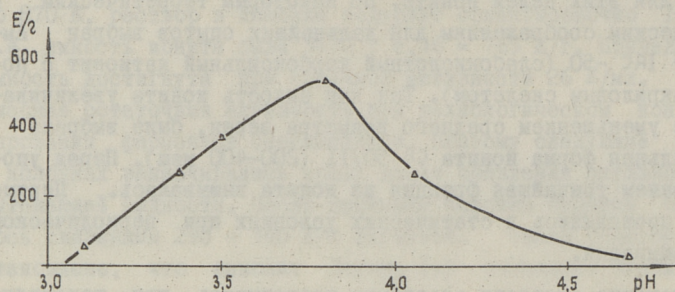
Выяснение скорости адсорбции проводилось при условиях: количество набухшего ионита 1 г; количество исходного раствора 25 мл, активность 56,6 Е/мл,  $\text{pH}=3,91$ . Полученные результаты изображены на фиг.1.



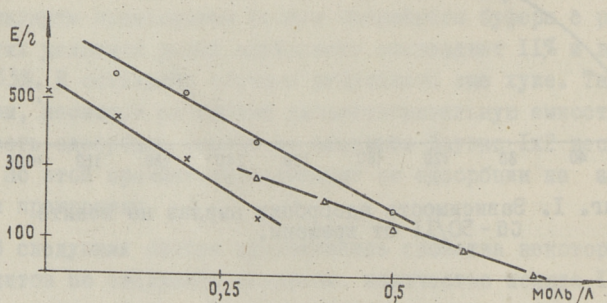
Фиг. 1. Зависимость адсорбции амилаз на ионите СВ-50/II от времени.

Очевидно, что процесс адсорбции в описанных условиях протекает весьма медленно и не заканчивается даже после 5 часов. Однако, для достижения высокого уровня насыщения достаточна длительность адсорбции в 2-3 часа.

Для исследования зависимости адсорбции от pH были подготовлены растворы ферментного препарата в 0,01 м ацетатном буфере с различными значениями pH. Соотношение ионит : раствор равнялось 1,25, длительность адсорбции 3 часа. Результаты опыта представлены на фиг. 2.



Фиг. 2. Зависимость адсорбции амилаз на ионите CG-50/II от pH раствора



Фиг. 3. Зависимость адсорбции амилаз на ионите CG-50/II от концентрации NaCl в растворе

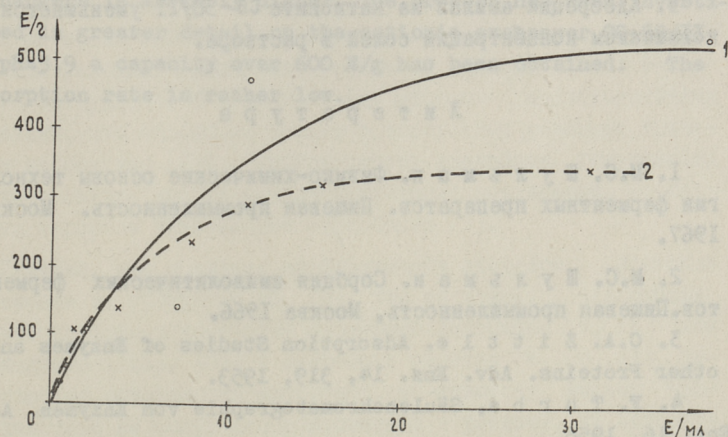


Из приведенных результатов вытекает, что значительная адсорбция возможна в пределах  $pH = 3,5 - 4,0$ . Лучшие результаты достигаются при активной кислотности около 3,8.

В идентичных условиях исследовалось влияние на адсорбцию концентрации солей. Полученные результаты изображены на фиг. 3.

Приведенные графики (фиг. 3) однозначно показывают, что с повышением концентрации хлористого натрия адсорбция уменьшается. При высоких концентрациях  $NaCl$  величина адсорбции приближается к нулю.

Для выяснения зависимости адсорбции от исходной концентрации раствора были проведены 2 опыта. В обоих случаях растворы приготавливались в 0,01 м ацетатном буфере с  $pH = 3,9$ . Соотношение ионит : раствор равнялось 1:25, длительность адсорбции 3 часа. Результаты опытов изображены на фиг. 4.



Фиг. 4. Зависимость адсорбции амилаза на ионите CG-50/II от конечной активности раствора

На фиг. 4 обнаруживаются заметные расхождения между параллельными опытами. Это обстоятельство, по всей вероятности, обусловлено расхождениями в интенсивности перемешивания. Поэтому в дальнейшем все опыты, которые описываются нами в последующих сообщениях, приведены при интенсивном механическом перемешивании.

## В ы в о д ы

1. Анионит Дауэкс Ix2 адсорбирует амилазы до 770 Е/г. В испытанных нами условиях степень десорбции очень низка и не превышает 11%.

2. Амилазы адсорбируются на КУ-2, IRC-50 и др. катионитах. При pH = 3-5 достигнута емкость ионита до 180 Е/г. В щелочной среде десорбируется до 40% активности.

3. Высокая емкость относительно амилаз обнаружена у катионита CG-50/II. При pH = 3,9 достигнута емкость свыше 600 Е/г. Значительная адсорбция возможна в пределах pH = 3,5 - 4,0.

4. Адсорбция на катионите CG-50/II протекает весьма медленно и не заканчивается в течение 5 часов.

5. Адсорбция амилаз на катионите CG-50/II уменьшается с повышением концентрации солей в растворе.

## Л и т е р а т у р а

1. М.С. Ш у л ь м а н. Физико-химические основы технологии ферментных препаратов. Пищевая промышленность. Москва 1967.

2. М.С. Ш у л ь м а н. Сорбция амилаз. Пищевая промышленность, Москва 1966.

3. С.А. Z i t t l e. Adsorption Studies of Enzymes and other Proteins. Adv. Enz. 14, 319, 1953.

4. F. T u r b a, Säulenchromatographie von Enzymen. Adv. Enz. 16, 1956.

5. C.Y.O.R. M o r r i s, P. M o r r i s. Separation Methods in Biochemistry. Pitman, London 1964.

6. Современные методы в биохимии. Медицина, Москва 1964.

7. Дж. Б е й л и. Методы химии белков. ИЛ. Москва 1965.

8. В. К е и л, З. Š o r m o v a. Laboratoriumstechnik für Biochemiker. Akad. Verlagsges., Leipzig 1965.

A.Köstner, K.Pappel

Investigations of the Adsorption of Amylolytic  
Enzymes on Ion Exchangers. Part I Comparison  
of Ion Exchangers

S u m m a r y

The adsorption of amylases from *Aspergillus oryzae* on different ion exchangers has been investigated. Some anionic exchangers have a rather high capacity, but the yield of desorption is low (up to 11%). The desorption from cationic exchangers is markedly higher. The process has been investigated in greater detail on the cationic exchanger CG-50/II. At pH=3,9 a capacity over 600 E/g has been obtained. The adsorption rate is rather low.



УДК 541.183.57:577.154.22

А.И. Кёстнер

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ  
НА ИОНИТАХ II

Кинетическая теория адсорбции

В предыдущем нашем сообщении [1] показано, что в некоторых случаях адсорбция ферментов протекает весьма медленно и в то же время зависит от концентрации ферментов в растворе. В таких условиях применение уравнений адсорбционного равновесия затруднено. К тому же очень многими исследователями доказано, что адсорбция белков в постоянных условиях протекает необратимо [2-8]. Необратимость адсорбции установлена также в случае других макромолекулярных соединений, особенно на неровной поверхности адсорбента [9].

Указано, что в случае необратимости процесса изотермы адсорбции не применимы [3, 10]. Тем не менее, адсорбция белков нередко описывается изотермой Ленгмюра [3, 11] или Фрейндлиха [2, 3]. Хотя в некоторых работах [4, 12, 13] доказывается обратимость адсорбции, по-видимому, весьма часто ферменты не могут десорбироваться в раствор, из которого протекала адсорбция. Для десорбции необходимо применять растворы со значительно измененным составом. С той же целью хроматография белков на ионитах обычно проводится в градиенте концентрации. Наряду с необратимостью процесса показано постоянство емкости адсорбента в широких пределах концентрации раствора [9].

Показано, что адсорбция белков нередко протекает весьма медленно [2, 8, 9]. Особенно медленно протекают процессы обмена на слабокислотных катионитах в водородной форме [14]

В некоторых случаях, однако, адсорбция заканчивается в течение нескольких минут [3, 4, 15].

На основе литературных данных и наших экспериментов [1] можно заключить, что адсорбция ферментов нередко протекает необратимо, с малой скоростью. Емкость ионита сравнительно мало зависит от концентрации раствора. В таких условиях количество адсорбированного фермента может быть найдено интегрированием основного кинетического дифференциального уравнения.

Из многочисленных дифференциальных уравнений кинетики ионного обмена [16] нами выбрано за основу уравнение

$$-\frac{1}{V} \frac{d\bar{Q}_A}{dt} = k \bar{C}_A C_B, \quad (1)$$

где  $\bar{Q}_A$  - насыщение ионита ионом А,  
 $\bar{C}_A$  - концентрация иона А в ионите,  
 $C_B$  - концентрация иона В в растворе,  
 $V$  - объем,  
 $t$  - время.

В наших условиях, соответственно, должно соблюдаться уравнение

$$-\frac{dB}{dt} = k\beta C, \quad (2)$$

где  $\beta$  - коэффициент ненасыщенности ионита,  
 $C$  - концентрация фермента в растворе.

Безразмерная величина  $\beta$  определяется по уравнению

$$\beta = \frac{A - A_t}{A}, \quad (3)$$

где  $A$  - полная емкость ионита,  
 $A_t$  - использованная ко времени  $t$  емкость ионита.

Целесообразно ввести величину начальной концентрации адсорбционных центров в растворе  $M$

$$M = \frac{Aq}{V}, \quad (4)$$

где  $q$  - навеска ионита,  
 $V$  - объем раствора.

Величина  $M$  выражается в единицах ферментативной активности на единицу объема. Характерной величиной оказывается

также избыток фермента в растворе В

$$B = C_0 - M, \quad (5)$$

где  $C_0$  - начальная концентрация раствора.

Очевидно, что концентрация С в какой-то момент времени выражается

$$C = B + \beta M, \quad (6)$$

Таким образом, уравнение (2) принимает вид

$$-\frac{d\beta}{dt} = k\beta(B + \beta M). \quad (7)$$

Определенный интеграл

$$-\int_0^t k dt = \int_1^{\beta} \frac{d\beta}{\beta(B + \beta M)} \quad (8)$$

дает

$$k B t = \ln \frac{\beta(M+B)}{B + \beta M} = \ln \frac{\beta C_0}{C}. \quad (9)$$

Следовательно, при адсорбции должно соблюдаться линейное уравнение

$$Y = kX, \quad (10)$$

где

$$Y = \ln \frac{\beta C_0}{C} \quad (11)$$

$$X = Bt. \quad (12)$$

Для характеристики процесса адсорбции необходимо найти значения емкости А и константы скорости к. А может быть вычислено из М по уравнению (4). Если  $B > 0$ , то кривая адсорбции во времени должна приближаться к М.

Ход адсорбции может быть описан также уравнением

$$G = \frac{M}{1 + k_m/t}, \quad (13)$$

где  $G$  - снижение концентрации в результате адсорбции,  
 $k_m$  - константа, характеризующая скорость процесса.  
Очевидно, что  $k_m$  равно времени достижения полунасыщения монита, т.е. состояния, где  $\beta = 0,5$ .

Из экспериментальных данных можно по уравнению (I3) методом наименьших квадратов вычислить значения  $M$  и  $K_m$ . На основе значений  $M$ ,  $C$  и  $C_0$  вычисляются  $B$ ,  $\beta$ ,  $X$  и  $Y$ . Применяя метод наименьших квадратов, можно найти величину константы  $k$  в уравнении (I0).

Теперь можно для любых условий адсорбции найти теоретическое значение  $\bar{Y}$ . В практике важно, главным образом, вычисленное значение  $\bar{G}$ . Из уравнений (5), (6) и (II) вытекает

$$\bar{G} = C_0 \frac{\exp \bar{Y} - 1}{\exp \bar{Y} - C_0/M}. \quad (I4)$$

Таким образом, процесс адсорбции может быть охарактеризован величинами  $A$  и  $k$ , которые вычисляются из экспериментальных данных методом наименьших квадратов. При проведении расчетов весьма полезно вычислить также статистические характеристики соответствия теории и эксперимента, найти погрешность эксперимента и т.д. Весь комплекс необходимых вычислений довольно трудоемок.

В целях облегчения вычислительной работы нами составлена программа для решения вышеизложенной задачи на электронной цифровой вычислительной машине "Минск-22". Программа составлена на алгоритмическом языке "МАЛГОЛ" [17, 18]. Методы математической статистики заимствованы из соответствующих руководств [19, 20].

Для вычислений вводятся начальные данные: номер опыта  $NUM$ , число экспериментальных точек  $N$ , начальная концентрация раствора  $C_0$ , значение соотношения объема раствора : вес ионита. Режим работы определяется параметрами  $K, L, MM, MA$ .

$K$  - определяет повторность вычислений с различными значениями  $M$ ;

$L$  - определяет уравнение вычисления  $X$ .

Кроме (I2) может быть применено уравнение

$$X = BMt. \quad (I5)$$

$MM$  определяет значение  $M$ . Если  $MM = 0$ , тогда  $M$  вычисляется по (I4).



$MA$  определяет шаг наращивания  $M$  при повторных расчетах.

Начальные данные вводятся двумя массивами - времени  $T$  и концентрации  $C$ ..

В ходе расчетов вычисляются элементы массивов величины адсорбции  $G$ ..

$$G = C_0 - C \quad (16)$$

и подсобной величины  $Z$ .

$$Z = G/T, \quad (17)$$

Уравнение

$$Z = AZ + BZ \cdot T \quad (18)$$

представляет собой линеаризацию уравнения (13).

Методом наименьших квадратов вычисляются значения  $AZ$  и  $BZ$ . Необходимая для дальнейших расчетов величина  $M$  равняется  $1/BZ$ .

Элементы массива  $\beta$  (БЕТА.),  $X$ . и  $Y$ . вычисляются по уравнениям (3), (11) и (12); методом наименьших квадратов вычисляется константа скорости  $k$  (ВУ), соответствующая уравнению (10). Параллельно вычисляются также константы уравнения

$$Y = A \cdot AY + B \cdot AY \cdot X. \quad (19)$$

На основе уравнений (10) и (18) вычисляются массивы теоретических значений  $EY$ . и  $EZ$ .. Из этих данных, по уравнению (14) или соответственно (17) и (18), вычисляются теоретические значения  $G$ ,  $EGY$ . и  $EGZ$ .. На основе полученных значений проверяется соответствие теории и эксперимента. С этой целью относительные величины  $VZ$ .,  $VY$ .,  $VGY$ . и  $VGZ$ . вычисляются по уравнению типа

$$VZ = \frac{Z}{EZ}. \quad (20)$$

Дополнительно вычисляются разницы

$$DGY = VGY - \frac{\sum VGY}{N} \quad (21)$$

и

$$DGZ = VGZ - \frac{\sum VGZ}{N}. \quad (22)$$

Все названные массивы печатаются в виде таблицы. Из статистических параметров вычисляются и печатаются следующие:

- коэффициенты корреляции между  $T$  и  $Z$  и между  $X$  и  $Y$ ;
- среднее квадратичное отклонение  $Z$  и  $Y$ ;
- $t$  - критерий Стюдента для коэффициентов регрессии  $BZ$  и  $BY$ ;
- $\chi^2$  критерии для  $EGZ$  и  $EGY$ .

Распределение значений  $VZ$ ,  $VGZ$  и  $VGZ$  вокруг единицы характеризуется средним квадратичным отклонением, средним отклонением, коэффициентом вариации и критерием  $\chi^2$ . Отклонения от нормального распределения характеризуются величинами  $\alpha_3$  и  $\alpha_4$ .

## Выводы

1. Исходя из необратимости и низкой скорости адсорбции белков, в частности ферментов на ионитах предложен метод характеристики процесса на основе кинетических соображений. За основу расчета взято уравнение

$$-\frac{d\beta}{dt} = kC\beta,$$

где  $\beta$  - коэффициент насыщенности ионита,  
 $C$  - концентрация раствора.

2. На основе вышеприведенного уравнения должно соблюдаться линейное уравнение  $X = kY$  ( $X = Bt$ ,  $Y = \ln \frac{\beta C_0}{C}$ ). Величина адсорбции  $G$  вычисляется по уравнению

$$G = C_0 \frac{\exp \bar{Y} - 1}{\exp \bar{Y} - C_0 M}.$$

3. Для проведения необходимых расчетов и статистической обработки результатов составлена программа для ЭЦВМ "Минск-22".

## Литература

1. А.И. Кёстнер, К.Э. Паппель, см. наст. сборник, стр.33.

2. W. B i l t z. Über die Adsorption von Eiweiß-Stoffen. Biochemische Zeitschrift, 23, 1910, 27.

3. C. L i t t l e. Adsorption Studies of Enzymes and other Proteins. Advances in Enzymology, XIV. Interscience, N.Y. - London, 1953, 56.

4. C.H.W. H i r s, N.H. S t e i n. Chromatographic Investigation of Pancreatic Ribonuclease. J. Biol. Chem., 200, 1953, 493.

5. N.K. B o a r d m a n, S.M. P a r t r i d g e. Separation of Neutral Proteins on Ion-Exchange Resins. Nature, 171, 1953, 4344.

6. N.K. B o a r d m a n, S.M. P a r t r i d g e. Separation of Neutral Proteins on Ion-Exchange Resins. Biochem. J., 59, 1955, 543.

7. K. S c h m i d, M.B. M a c N a i r, A.F. B u r g i. The Chromatographic Separation and Purification of Acidic Proteins on Carboxylatid Ion-Exchange Resins, 230, 1953, 853.

8. C.J.O.R. M o r r i s, P. M o r r i s. Separation Methods in Biochemistry. Pitman, London, 1964.

9. J. K o r a l, R. U l l m a n, F.R. E i r i c h. The Adsorption of Polyvinyl Acetat. J. Phys. Chem., 62, 1958, 540.

10. H. N e u r a t h, H.B. B u l l. Surface Activity of Proteins. Chem. Revs., 23, 1938, 391.

11. Е.Г. Д а в и д о в а, В.В. Р а ч и н с к и й. Сорбция белков на ионообменных целлюлозах. Прикладная биохимия и микробиология, III, 1967, 341-346.

12. А.Я. Н и к о л а е в. Хроматография белков на целлюлозонитах. Успехи химии, 36, 1963, 1087.

13. H.G. B o m a n. Chromatography of Serum and some other Proteins on an Anion-Exchange Resin. Nature, 175, 1955, 4464.

14. R. K u n i n, R.E. B a r r y. Carboxylic, Weak acid type, Cation-exchange Resin. Ind. Engn. Chem., 41, 1949, 1269.

15. W. Mc. K. M a r t i n. Electrokinetic Properties of Proteins II. Adsorption of Gliadin at Glass-Liquid Interface. J. Phys. Chem., 38, 1934, 213.

16. Ф. Г е л ь ф е р и х. Иониты, Изд. ИЛ., Москва, 1962.

17. М. К о т л и, П. Х а н к о. Программы для ЭЦВМ "Минск-22", 4, АН ЭССР. Институт кибернетики, Таллин, 1966.

18. М. К о т л и, В. В и й л, М. Р а х е н д и. Программы для ЭЦВМ "Минск-22", 5, АН ЭССР. Институт кибернетики, Таллин, 1966.

19. C. H. G o u l d e n. Methods of Statistical Analysis. Wiley, N.Y. - London, 1956.

20. R.G.D. S t e e l, J.H. T o r r i e. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw Hill, N.Y. - London, 1960.

A.Köstner

Investigations of the Adsorption of Amylolytic  
Enzymes on Ion Exchangers. Part II Kinetic  
Theory of Adsorption

S u m m a r y

A kinetic theory of the adsorption of proteins (especially enzymes) is proposed. The theory is based on the differential equation  $\frac{dR}{dt} = kBc$  ( $B$  - coefficient of unsaturation of adsorbent,  $c$  - concentration of protein,  $t$  - time,  $k$  - velocity constant). The integration of the equations shows that a linear function between  $x$  and  $y$  must exist.  
 $x = (M - c_0)t$ ,  $y = \ln \frac{Bc}{c_0}$  ( $M$  - maximum adsorption,  $c_0$  - initial concentration. A program for the electronic computer Minsk-22 is composed.

УДК 541.183.57:577.154.22

К.Э.Паппель, А.И. Кёстнер

ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ  
ФЕРМЕНТОВ НА ИОНИТАХ III

Адсорбция амилазы *Asp. oryzae* на катионите  
Амберлит CG -50/II

В предыдущих наших сообщениях показана применимость слабокислотного карбоксильного катионита Амберлит CG - 50/II для адсорбции амилаз [1], а также предложен метод математической характеристики процесса [2]. В данном сообщении изложены результаты опытов, проведенных с целью оптимизации процесса адсорбции и проверки теоретических соображений.

Экспериментальная часть

Исследовалась адсорбция амилаз из растворов препарата Оризин ПК. Растворы готовились в ацетатном буфере (0,01 м) и отделялись от нерастворимого осадка фильтрованием. pH раствора доводили до требуемой величины осторожным добавлением 0,1 и HCl. В случае опытов II и I2 в раствор прибавлялись питательные соли Чапека для исследования их влияния на ход адсорбции.

Продажный ионит освобождался от мельчайшей фракции декантированием раствора после оседания нужной фракции в течение 20 минут. Операция декантации повторялась 3 раза. Ионит хранился в сухом виде. До проведения адсорбции ионит выдерживался в соответствующем буфере не менее 12 часов и отжимался на вакуум-фильтре. Полученная масса применялась для адсорбции, в ней определялось также содержание сухих веществ. В дальнейшем все результаты пересчитаны на сухой ионит.

## Адсорбция амилазы Авр. огузае на катионите Амберлит

СБ-50/II

№ П.п.	Концентрация, Е/мл		Максимальное время, мин	Число экспе- римен- тальных точек	рН	t°	Констан- та ско- рости мл/Е.мин	Констан- та К <sub>т</sub> мин	Емкость Е/г	
	началь- ная	конеч- ная								
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	18,35	11,90	10,72	720	30	3,8	10	0,023	132	1412
2	12,75	2,02	1,45	720	30	3,8	18	0,107	48	1130
3	45,10	14,35	7,56	710	20	3,8	18	0,011	160	1877
4	13,20	2,95	0,48	480	12	3,6	10	0,060	122	1145
5	12,60	8,60	7,10	480	12	4,0	10	0,034	156	558
6	24,40	15,40	14,49	480	12	4,0	10	0,040	36	1130
7	56,60	35,30	21,94	480	12	3,8	10	0,006	256	4124
8	17,00	7,15	6,34	480	8	3,8	10	0,067	35,6	1268
9	9,64	5,07	4,51	600	12	3,8	10	0,070	71,9	739
10	3,86	0,64	-2,14	600	10	3,8	10	0,077	-	1008

Продолжение таблицы I

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
II <sup>***</sup>	4,20	0,65	-4,30	540	I2	3,8	10	0,074	-	787 <sup>**</sup>
12 <sup>***</sup>	9,70	2,27	1,85	540	I2	3,8	10	0,157	34	823 <sup>**</sup>
I3	24,00	18,00	17,20	600	I2	4,1	5,7	0,021	85	1114

\* Емкость ионита вычислена не из экспериментальных данных, а по параметру мм.

\*\* Раствор приготовлялся с прибавкой солей Чапека.

Т а б л и ц а 2

## Статистическая характеристика экспериментов

№ оп-та	Чис-ло то-чек	Кoeffициенты корреляции		Критерий $\chi^2$		Критерий Стюдента для регрессии		Квадратичное отклонение		Средняя ошибка	
		T-Z	X-Y	EGZ	EGY	T-Z	X-Y	EGZ	EGY	EGZ	EGY
I	30	0,984	0,980	2,0	11,0	17,3	29,1	0,18	0,42	0,12	0,33
2	30	0,999	0,999	2,1	8,6	111,3	31,4	0,13	0,29	0,09	0,20
3	20	0,985	0,994	5,5	9,5	24,4	27,4	0,31	0,42	0,18	0,25
4	12	0,991	0,997	0,4	0,4	23,0	20,0	0,07	0,08	0,05	0,06
5	12	0,896	0,927	1,57	2,4	6,4	4,0	0,24	0,27	0,19	0,23
6	12	0,993	0,931	0,59	2,7	26,4	4,1	0,08	0,18	0,06	0,14
7	12	0,931	0,973	2,85	3,7	8,1	6,8	0,13	0,14	0,11	0,11
8	8	0,999	0,968	0,11	1,43	58,0	4,9	0,05	0,16	0,03	0,12
9	12	0,999	0,980	0,03	0,60	68,9	7,2	0,03	0,60	0,01	0,03
10	10	0,999	0,960	0,03	1,04	60,7	4,7	0,04	0,18	0,03	0,16
11	12	0,804	0,971	1,07	1,21	4,3	5,5	0,23	0,20	0,18	0,16
12	12	0,999	0,989	0,02	0,31	90,2	9,0	0,02	0,06	0,01	0,05
13	12	0,993	0,970	0,18	1,49	25,9	5,9	0,06	0,16	0,04	0,12



Адсорбция проводилась в 50 мл стаканах при интенсивном механическом перемешивании. По истечении предусмотренного срока раствор отделялся от ионита фильтрованием. В фильтрате определялась амилолитическая активность по принятой в нашей лаборатории методике [1]. Расчеты проводились на ЭЦВМ по описанной нами программе [2]. Условия проведения опытов и результаты основных расчетов приведены в табл. I.

Данные таблицы I показывают, что теоретические соображения, изложенные нами в предыдущем сообщении, в основном подтверждаются.

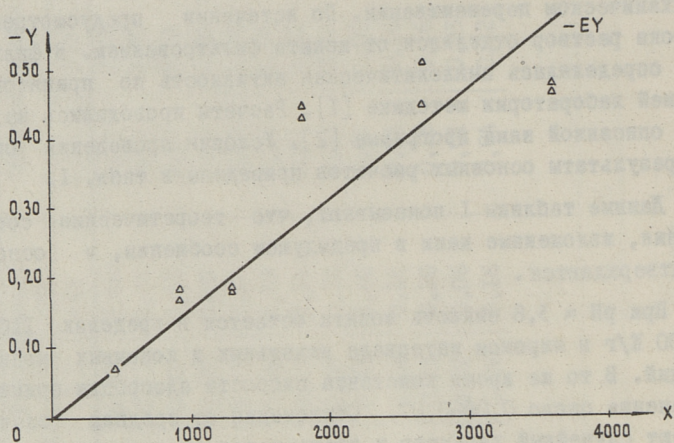
При  $pH \approx 3,8$  емкость ионита остается в пределах 1100 - 1400 Е/г в широком интервале начальных и конечных концентраций. В то же время константа скорости адсорбции принимает значение около 0,06-0,07. Отклонения от средних значений имеют случайный характер и объясняются, по-видимому, неконтролируемыми различиями в условиях опыта.

При высоких концентрациях фермента (опыт 7, а также 3), емкость ионита резко повышается, а константа скорости уменьшается. В пределах  $pH$  от 3,6 до 4,0 значения найденных величин остаются на одном и том же уровне. Прибавка солей Чапека уменьшает емкость ионита.

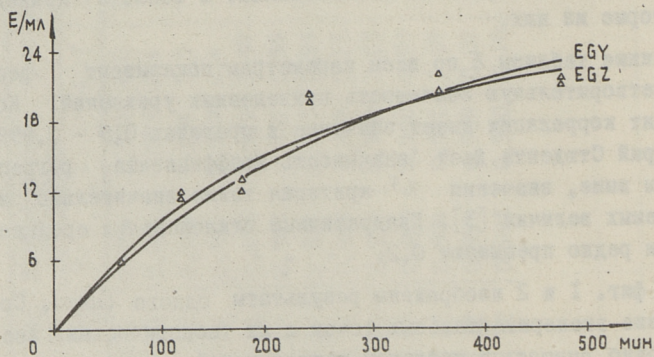
Соответствие экспериментальных данных с теорией можно охарактеризовать разными показателями. в Табл. 2 приведены некоторые из них.

Данные таблицы 2 по всем параметрам показывают весьма удовлетворительную значимость приведенных уравнений. Коэффициент корреляции имеет значение в пределах 0,9 - 0,999, критерий Стюдента дает значимость коэффициента регрессии 0,99 и выше, значения  $\chi^2$  критерия также значительно ниже требуемых величин [3]. Квадратичные отклонения и средние ошибки редко превышают 0,2.

На фиг. 1 и 2 изображены результаты одного опыта. Соответствие экспериментальных точек и их теоретических значений можно считать в пределах погрешностей опыта удовлетворительными.



Фиг. 1. Прямая регрессии  $X = Vmt$ ,  $Y = \ln \frac{B C_0}{C}$ .  
Опыт № 7



Фиг. 2. Зависимость адсорбции от времени,  
Опыт № 7

## В ы в о д ы

1. Адсорбция амилаз препарата Оризин ПК на ионите Амберлит С6-50/II соответствует кинетической теории адсорбции. Статистические показатели подтверждают высокую значимость предложенных уравнений.

2. При  $pH = 3,8$  без прибавок солей емкость ионита в широком диапазоне концентраций имеет значение около 1100 - 1200 Е-г. Константа скорости при тех же условиях составляет около 0,06-0,07 мл/Е мин.

3. При высоких концентрациях фермента емкость ионита увеличивается, а константа скорости уменьшается.

4. Прибавка солей Чапека в некоторой мере снижает емкость ионита.

## Л и т е р а т у р а

1. А.И. К ё с т н е р, К.Э. П а п п е л ь. Исследование адсорбции амилolyтических ферментов на ионитах I. См. настоящий сборник, стр. 33.

2. А.И. К ё с т н е р. Исследование адсорбции амилolyтических ферментов на ионитах II. См. настоящий сборник, стр. 43.

3. R.G.D. S t e e l, J.H. T o r r i e. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw Hill, N.Y. - London, 1960.

K.Pappel, A.Köstner

Investigations of the Adsorption of Amylolytic  
Enzymes on Ion Exchangers. Part III The Adsorption  
of Asp. Oryzae Amylase on Amberlite CG-50/II

S u m m a r y

The adsorption of amylases from a commercial Asp.oryzae preparation has been investigated. The results have been calculated in accordance to previous theoretical considerations. The experiments prove the reliability of the proposed theory. The ion exchanger has a capacity of about 1100-1200 E/g at pH=3,8. The velocity constant is about 0,06-0,07 ml/E min. At high enzyme concentrations the characteristic parameters are altered.

УДК 577.154.22:664.641.12

Т.Л. Лмеберт

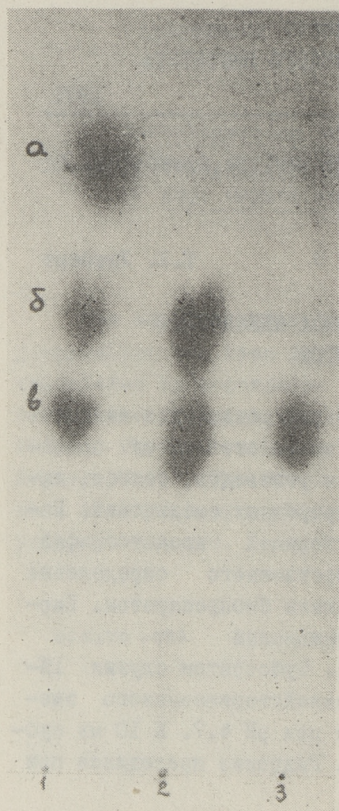
### ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА ПШЕНИЧНОГО КРАХМАЛА БИОПРЕПАРАТОМ

Хроматографию на бумаге применяют для разделения микроколичеств смеси веществ. В последнее время этот метод приобрел огромное значение в исследовании углеводов, белков, жиров, антибиотиков и многих других природных соединений. Нами использован метод одномерной восходящей хроматографии на бумаге для качественного и количественного определения продуктов гидролиза пшеничного крахмала биопрепаратом. Биопрепарат получен при глубинном выращивании *Asp. oryzae* 3-9-15 на обезжиренном молоке [1,2]. Субстратом служил 1%-ный раствор клейстеризованного и неклеysterизованного пшеничного крахмала в ацетатном буфере при pH 4,7. К 10 мл субстрата добавляли 1 мл биопрепарата. Гидролиз проводился при 50° в течение 1 и 24 часов.

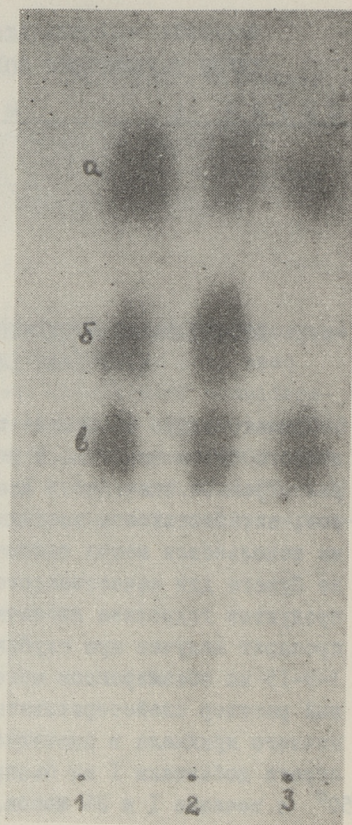
Для разделения продуктов гидролиза - углеводов - оказалась пригодной хроматографическая бумага марки Filtrak FN1. Методика хроматографирования приведена Димлером с сотрудниками [3].

Количество каждого углевода выражали в мкг/мл и в процентах от суммарного количества углеводов, определенного суммой всех углеводов в анализируемых пятнах.

Хроматограммы продуктов гидролиза приведены на фиг. 1 и 2, а полученные данные соответственно в табл. I. Из приведенных данных видно, что амилитический комплекс биопрепарата действует по-разному на клейстеризованный и неклеysterизованный крахмал. При инкубации смеси биопрепарат - субстрат



Фиг. 1. Хроматограмма продуктов гидролиза крахмала. Время гидролиза 1 час. 1 - свидетели, а - глюкоза, б - мальтоза, в - лактоза, 2 - продукты гидролиза клейстеризованного крахмала, 3 - продукты гидролиза неклеястеризованного крахмала.



Фиг. 2. Хроматограмма продуктов гидролиза крахмала. Время гидролиза 24 часа. 1 - свидетели, а - глюкоза, б - мальтоза, в - лактоза, 2 - продукты гидролиза клейстеризованного крахмала, 3 - продукты гидролиза неклеястеризованного крахмала.

в течение одного часа основным продуктом гидролиза в случае использования в качестве субстрата клейстеризованного крахмала являлась мальтоза (составляла 87% от суммарного количества продуктов гидролиза). Неклейстеризованный крахмал гидролизуеться под влиянием ферментов труднее. Так, в течение одного часа инкубации на хроматограмме не отмечалось продуктов гидролиза (см. фиг. I)

Т а б л и ц а I

Состав продуктов гидролиза пшеничного крахмала биопрепаратом

Продукты гидролиза		Субстрат-клейстеризованный крахмал		Субстрат-неклейстеризованный крахмал	
		Время гидролиза, ч			
		I	24	I	24
d-глюкоза	мкг/мл	7	84	-	73
	%	5	34	-	93
мальтоза	мкг/мл	137	145	-	-
	%	87	59	-	-
другие продукты гидролиза	мкг/мл	13	17	-	5
	%	8	7	-	7

В случае удлинения времени гидролиза до 24 ч 93% от суммарного количества продуктов гидролиза составляла глюкоза. При использовании в качестве субстрата раствора клейстеризованного крахмала в продуктах гидролиза отмечалось 34% глюкозы, 39% мальтозы и лишь 7% высших углеводов.

На хроматограммах найдено пятно "в", которое соответствовало лактозе, находившейся в биопреparate. При изучении продуктов гидролиза крахмала последнее не учтено.

### В ы в о д ы

I. Исследовался состав продуктов гидролиза пшеничного крахмала биопрепаратом хроматографированием на бумаге.

2. Показано, что амилолитический комплекс биопрепарата действует на клейстеризованный и неклейстеризованный крахмал по-разному. Установлено, что в течение 24-часовой инкубации смеси биопрепарат - субстрат основными продуктами гидролиза клейстеризованного крахмала являлись мальтоза и глюкоза, составляющие соответственно 59 и 34% от суммы всех продуктов гидролиза. Основным продуктом гидролиза не-клейстеризованного крахмала являлась глюкоза, которая составляла 93% от всех продуктов гидролиза.

### Л и т е р а т у р а

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

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

3. R.J. D i m l e r, W.C. S c h a f f e r, C.S. W i s e, C.E. R i s t, Analytical Chem. 1952, 24, 1411.

T.Liebert

### Investigation of the Wheat Starch Hydrolysis under the Action of Biopreparation

#### S u m m a r y

The content of the hydrolysis products of wheat starch with the biopreparation by means of paper chromatography has been studied.

The hydrolyzate of pasted starch consists of 34% glucose and 59% maltose, while the hydrolyzate of untreated starch consists of 93% glucose.



УДК 664.644.41:637.147

К.А.Каск, М.И.Креен

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ СГУЩЕННОГО ОБРАТА ДЛЯ  
УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ЭСТОНСКОГО СЕПИКА

Национальное хлебо-булочное изделие "Эстонский сепик", выпекаемое из пшеничной обойной муки и пшеничной муки I сорта, пользуется большой популярностью среди жителей Эстонской ССР. По пищевой ценности это изделие превосходит булочные изделия из сортовой муки, но недостатком его является быстрое черствение.

Для повышения пищевой ценности и увеличения срока сохранности сепика применяли сгущенное обезжиренное молоко и творожную сыворотку. Молочные продукты обогащают хлеб ценными белковыми и минеральными веществами, а также увеличивают сохранность.

Сыворотка, кроме того, повышает кислотность теста, ускоряя процесс брожения. Так как добавление молочных продуктов ухудшает физические свойства хлеба, в качестве дополнительных добавок применяли амилотические ферментные препараты (Аваморин ПК, Оризин ПК, биопрепарат) и аскорбиновую кислоту [1,2,3]. Для получения биопрепарата выращивали плесневой гриб *Aspergillus oryzae* 3-9-15 на обезжиренном молоке. Кроме амилотических ферментов в состав биопрепарата входит и незначительное количество протеолитических ферментов [4].

Для предотвращения протеолиза клейковины муки в тесто добавляли аскорбиновую кислоту.

Тесто изготавливали ускоренным способом. Для диспергирования жидкой фазы применяли быстроходную мешалку.

Одну третью часть муки (т.е. половину обойной муки) и все остальное сырье диспергировали во взбивалке универсальной кухонной машины (марка УКМ) в течение 2-3 мин. Тесто смешивали, добавляя остальные 2/3 части муки. Длительность брожения теста была 30 мин., а расстойки тестовых заготовок 45-60 мин. в зависимости от качества дрожжей. Выпечку проводили в электрической печи ШК-2 при температуре 230°C в течение 17-22 мин.

Анализ изделий проводили через 20 часов после выпечки. Свежесть проб определяли по набухаемости и крошковатости мякиша и органолептически.

Показатели муки	пшеничная обойная	пшеничная I-го сорта
Влажность, %	11,3	12,1
Зола, %	1,35	0,38
N x 5,68, % на абс.сух. вещ.	14,8	13,0
Сырая клейковина, %	25,6	36,0
Сжимаемость клейковины, см	15	20
Эластичность клейковины	плохая	хорошая
Газообразующая способ- ность, CO <sub>2</sub> мл	870	1150

Судя по газообразующей способности, обе муки имеют не-  
удовлетворительный углеводно-амилазный комплекс.

Показатели молочных продуктов	сгущенный обрат	сыворотка	биопре- парат
Сухие вещества, %	28,4	6,5	4,7
Белки, %	11,8	0,67	1,8
Кислотность, °Т	60	89	34
pH	-	4,4	6,1
Амилотическая активность, Ед/мл	-	-	11,0
Протеолитическая активность, Ед/мл	-	-	0,012

Использованные в настоящей работе рецептуры и полученные данные, характеризующие физические свойства проб, представлены в таблице I.

Влияние использованных добавок на качество изделия "Эстонский сепик" можно охарактеризовать следующим:

Добавка сгущенного обрата придает хлебу характерный приятный аромат и вкус. Окрашенность корки и мякиша хлеба становится интенсивней. В то же время объем хлеба уменьшается, мякиш становится более густым, с неравномерной пористостью. Черствение хлеба замедляется.

При добавлении в тесто биопрепарата интенсивность брожения теста и объемный выход хлеба увеличивается. Но протеолитические ферменты, содержащиеся в биопреparate, ослабляют клейковину муки, вследствие чего пробы часто имеют плоскую форму, крупную и неравномерную пористость. Аналогичные результаты дало применение очищенного ферментного препарата Оризин ПК.

Вкус и аромат изделий был приятный. Одновременное добавление сгущенного обрата и биопрепарата значительно замедляет черствение хлеба.

Добавление в тесто аскорбиновой кислоты с целью укрепления клейковины дало положительные результаты. Пробы приобретали хороший объем и пористость. Мякиш становился эластичным, сухим на ощупь, пористость тонкостенной.

Изготовление теста на сыворотке влияет на кислотность теста. рН теста смещается от 6,1-6,2 до 5,2-5,4. В результате изменения кислотности интенсивность жизнедеятельности дрожжей и действие амиллитических ферментов увеличивается, а действие протеолитических ферментов задерживается. Полученные пробы обладают хорошими физическими и органолептическими показателями. Особенно большой объем хлеба получили при добавлении в тесто одновременно с сывороткой ферментного препарата "Аваморин ПК". В состав этого препарата не входят протеолитические ферменты.

Одновременное применение сыворотки и сгущенного обезжиренного молока в значительной мере замедляет черствение хлеба и повышает его пищевую ценность. Обогащенный хлеб, по сравнению с контрольной пробой, содержит на 1,1% больше белков и на 48% больше лизина.

## Т а б л и ц а I

## Рецептуры и результаты анализов

Сырье и показатели	Единица	Номер пробы						
		1	2	3	4	5	6	7
Мука обойная	%	70	70	70	70	70	70	70
Мука I сорта	"	30	30	30	30	30	30	30
Дрожжи	"	5	5	5	5	5	5	5
Соль	"	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Маргарин	"	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Стушенный обрат	"	15	15	15	15	15	15	15
Сыворожка	"	-	-	-	-	58,5	58,5	58,5
Биопрепарат	"	-	8	-	8	-	-	-
Аскорбиновая кислота	"	-	-	-	0,015	-	-	-
Орizzин ПК	"	-	-	0,009	-	-	0,009	-
Аваморин ПК	"	-	-	-	-	-	-	0,05
Расстойка	мин	60	50	45	50	45	50	45
Удельный объем	см <sup>3</sup> /100г	195	208	188	250	252	226	256
Пористость	%	57	63	59	70	71	64	78
Выход хлеба	г/100 г	159,5	165	164	165	172	171	171

Производственные опыты, проведенные на Таллинском хлебокомбинате, подтверждают результаты, полученные в лаборатории.

### Л и т е р а т у р а

1. A.M. Swanson et al. Cereal Sci. Today, 1966, 11, Nr. 9, 400.

2. R.E. Manseth et al. Cereal Sci. Today, 1966, 11, Nr. 9, 400.

3. Т.Н. Ильинская. Витамины в хлебопекарной промышленности СССР и за рубежом. ЦИНТИ Пищепром., М., 1966.

4. Т.Л. Либерт. Получение биопрепарата выращиванием плесневых грибов рода *Aspergillus* глубинным способом на обезжиренном молоке. Сообщения I, II, III. Труды ТПИ, серия А, № 273, 1969, стр. 3-25.

K.Kask, M.Kreen

#### Verwendung von konzentrierter Magermilch zur Verbesserung der Qualität des estnischen Grob- weizenbrotes

#### Z u s a m m e n f a s s u n g

Zur Erhöhung des Nährwertes und Verbesserung der Haltbarkeit sind die Molke und das Magermilchkonzentrat verwendbar. Der Zusatz des Magermilchkonzentrates verbessert den Geschmack, das Aroma, das äußere Aussehen und die Haltbarkeit des Grobweizenbrotes.



УДК 939.381.3

В.А.Кросинг, К.А.Каск

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ РЫБЫ  
И ТУЗЛУКА В ПРЕСЕРВЕ "ТАЛЛИНСКИЕ КИЛЬКИ"

При созревании соленой рыбы часть азотистых веществ и жира переходит в тузлук. Обычно тузлук не употребляют в качестве пищи, и поэтому перешедшие в тузлук пищевые вещества можно считать потерянными.

Экспериментальные данные об изменении содержания отдельных свободных аминокислот в соленой рыбе [1] свидетельствуют о том, что при созревании не все дипептидные связи расщепляются с одинаковой скоростью. Следовательно, можно полагать, что потери отдельных аминокислот мяса рыбы с тузлуком неодинаковы.

С целью более полной характеристики этих потерь мы определяли аминокислотный состав азотистых веществ рыбы и тузлука в пресерве "Таллинские кильки". Для исследования использовали пресервы из рыбы осеннего лова (сент. 1968 г.) промышленной партии. Определение проводили после 7-месячного хранения продукта в промышленном холодильнике при температуре от  $-2$  до  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Характеристика пресервов: бомбажа нет, созревание по органолептическим данным - легкое перезревание, продукт слегка слипшийся, немного белого налета. Вес нетто 250 г, весовое соотношение составных частей 85/15.

Гидролиз белка проводили в автоклаве после обезжиривания пробы в 6 н соляной кислоте. Давление -  $2 \text{ кг/см}^2$ , продолжительность гидролиза - 6 часов [2]. Аминокислотный состав определяли на автоматическом анализаторе аминокислот "Хитачи".

Т а б л и ц а I

Химический анализ рыбы и тузлука

	Данные химического анализа		
	Рыба	Тузлук	Потери с тузлуком
Сух. вещ.	37,5%	23,4%	
Азот. вещ. N x 6,25	14,1%	10,9%	12,0%
Жиры по Сокслету	13,2%	2,4%	3,1%
Повар. соль	9,2%	10,8%	

Триптофан определяли в сыром образце колориметрически по окраске с п-диметиламинобензальдегидом после 20-ти часового гидролиза в 10 %-ном растворе гидроокиси калия [3].

Результаты приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Аминокислотный состав рыбы и тузлука в превэрве  
"Таллинские кильки"

Наименование аминокислот	Сод. азота аминокислот, г на 16 г азота		Потери с тузлуком, % от общего сод. данных аминокислот
	килька	тузлук	
I	2	3	4
Лизин	7,3	5,8	9,8
Гистидин	2,3	1,4	7,7
Аргинин	4,8	4,9	12,1
Асп. кислота	15,1	13,9	11,1
Треонин	5,5	4,9	10,8
Серин	4,4	3,8	10,5
Глут. к-та	20,1	15,5	9,5
Пролин	2,0	2,1	12,1
Глицин	5,3	4,8	10,8
Ананин	7,3	6,8	11,3
Валин	7,5	5,7	9,4
Метионин	2,1	1,9	11,1
Изолейцин	5,7	7,1	14,5
Лейцин	6,3	5,6	10,7
Тирозин	1,6	2,6	18,4
Фенилаланин	4,2	4,5	12,9
Триптофан	0,7	1,0	16,6



Потери вычислялись с учетом весового соотношения составных частей (85/15), содержания азотистых веществ и содержания аминокислот.

Данные свидетельствуют о том, что около 12% азотсодержащих веществ и 3% жиров переходит из мяса кильки в тузлук. Из аминокислот наибольшие потери с тузлуком наблюдаются для тирозина, триптофана, изолейцина, наименьшие для валина, глутаминовой кислоты и лизина.

### В ы в о д ы

1. Исследовались потери белков, жиров и отдельных аминокислот с тузлуком в пресерве "Таллинские кильки".

2. В созревших пресервах около 12% азотсодержащих веществ и 3% жиров переходят из мяса кильки в тузлук. Из аминокислот наибольшие потери наблюдаются для тирозина, триптофана и изолейцина, наименьшие для валина, глутаминовой кислоты и лизина.

### Л и т е р а т у р а

1. А.А. К о н н о в а. Изменение содержания свободных аминокислот при просаливании Каспийской сельди. Изв. высш. учебн. заведений. Пищ. технол., 1967, 1, стр. 47-48.

2. В.Г. Р я д ч и к о в, Н.Г. Ш а н ы г и н а. Сравнительное изучение некоторых способов гидролиза кормов. Доклады ВАСХНИП, 1968, 2, стр. 26.

3. А.И. Е р м а к о в, Н.П. Я р о ш, А.А. М и х а й л о в. О количественном определении триптофана в семенах. Прикл. биох. и микробиол., 1967, 1, стр. 107.

V.Krosing, K. Kask

Report on the Amino-acid Content of Fish and  
Brine in Canned Baltic Anchovies in Brine

S u m m a r y

The content of total nitrogen, fata and amino acids of fish and brine has been determined. The losses with brine have been calculated. About 12 per cent of nitrogen compounds, 3 per cent fats and 7.7-18,4 per cent amino-acids have passed from fish into brine after 7-months storage.

УДК 543.544:665.211

Э.Х.Сиймер, О.В.Таутс, К.Э.Мейстер

## ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА РЫБЬИХ ЖИРОВ

### Сообщение I

При исследовании жирнокислотного состава жиров методом газо-жидкостной хроматографии сложной проблемой является идентификация отдельных пиков на хроматограмме. Жиры рыб и морских млекопитающих содержат значительное количество высоконепредельных кислот, имеющих до 24 атомов углерода и до 6 двойных связей в молекуле.

Как химическим анализом, так и методом ядерного магнитного резонанса [1] твердо установлено, что почти все высшие ненасыщенные жирные кислоты имеют дивинилметановое расположение двойных связей. Несмотря на это, отдельные жирные кислоты различаются между собой не только количеством углеродных атомов и двойных связей, но и расположением последних. Обычно расположение двойных связей определяют по длине конца цепи кислоты, т.е. количеством углеродных атомов от середины последней двойной связи до конца цепи. Для большинства жирных кислот эта длина составляет 3, 6 или 9 углеродных атомов.

Газохроматографическим анализом метиловых эфиров жирных кислот обычно определяют для каждого компонента приведенный удерживаемый объем, чаще всего относительный удерживаемый объем в отношении к пальмитиновой, стеариновой или олеиновой кислоте. Очень хорошо, если имеется большой набор индивидуальных метиловых эфиров в качестве стандарта,

в таком случае идентификация отдельных жирных кислот не представляет особых затруднений. Однако часто индивидуальные соединения, особенно высоконепредельные, являются недоступными.

Множество литературных данных позволяет идентифицировать жирные кислоты по относительным удерживаемым объемам. Но последние являются величинами, зависящими от многих факторов и изменяющимися в больших пределах. Более постоянными величинами являются коэффициенты разделения, впервые примененные Акманом [2] и Хейкеном [3]. Коэффициенты разделения четырех типов имеют следующие значения:

$$\begin{array}{ll}
 \text{I} & \frac{V_{R(x,y+1,z)}}{V_{(x,y,z)}} & \text{II} & \frac{V_{R(x,y+1,z)}}{V_{R(x,y,z+3)}} \\
 \text{III} & \frac{V_{R(x,y,z)}}{V_{R(x,y,z+3)}} & \text{IV} & \frac{V_{R(x+2,y,z)}}{V_{R(x,y,z)}}
 \end{array}$$

где  $x$  - количество углеродных атомов,  
 $y$  - количество двойных связей,  
 $z$  - длина концевой цепи.

Кроме коэффициентов разделения существуют многие графические методы идентификации жирных кислот [4]. Применение при анализе двух различных по полярности колонн является желательным и позволяет твердо установить структуру большинства жирных кислот [5]. Но работа с двумя колоннами довольно неудобна и не всегда осуществима.

Хорошие результаты получают в последнее время, применяя величины ЭДЦ (эквивалентная длина связи, equivalent chain length). Под ЭДЦ подразумевают количество углеродных атомов, которое имел бы метиловый эфир гипотетической насыщенной кислоты, имеющей равный неизвестному компоненту удерживаемый объем. ЭДЦ часто находят графически по прямой гомологического ряда  $\log V_R = a + k \cdot C$ . Если известна величина  $k$  (его определяют по параметрам удерживания эфиров насыщенных кислот), и если относительные удерживаемые объемы  $V_R$  рассчитаны в отношении к компоненту (только эфиру насыщенной кислоты), имеющему  $N$  углеродных атомов, то, очевидно,

$$\text{ЭДЦ} = \frac{\log V_R}{k} + N.$$

К сожалению, величины ЭДЦ также являются непостоянными величинами и зависят от типа жидкой фазы, температуры разделения и т.д.

Г.Р. Джеймизон и Э.Х. Рейд [6] нашли, что ЭДЦ метиловых эфиров полиолефиновых кислот имеют прямую зависимость от величины ЭДЦ метиллинолената ЭДЦ<sub>18:3ω3</sub>. Ими определены константы прямых

$$\text{ЭДЦ}_x = a \cdot \text{ЭДЦ}_{18:3\omega 3} + б. \quad (1)$$

По нашему мнению, при анализе рыбьих жиров величины ЭДЦ лучше найти по ЭДЦ кислоты 20:5ω3, имеющейся в большом количестве в рыбьих жирах и легко узнаваемой в середине хроматограммы. Величины констант прямых

$$\text{ЭДЦ}_x = a \cdot \text{ЭДЦ}_{20:5\omega 3} + б, \quad (2)$$

найденных по константам Джеймизона и Рейда, приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Константы уравнения ЭДЦ<sub>x</sub> = a ЭДЦ<sub>20:5ω3</sub> + б

№ п.п	Метиловый эфир	a	б
I	2	3	4
I	18 : 3ω3	0,6588	5,008
2	18 : 3ω6	0,5975	6,022
3	18 : 4ω3	0,8287	1,639
4	20 : 2ω9	0,4334	10,985
5	20 : 2ω6	0,4262	11,367
6	20 : 3ω9	0,5995	7,657
7	20 : 3ω6	0,6028	7,790
8	20 : 3ω3	0,6495	7,127
9	20 : 4ω6	0,7372	5,095
10	20 : 4ω3	0,8893	2,155
11	22 : 4ω6	0,8340	4,892
12	22 : 5ω6	0,9493	2,617
13	22 : 5ω3	1,006	1,804
14	22 : 6ω3	1,180	-1,752

По приведенным данным можно найти эмпирические формулы, связывающие величины ЭДЦ. Одна из возможных формул является следующей:

$$\begin{aligned} \text{ЭДЦ}_{x,y,z} &= 0,92 x + 1,63 - (22 - x)^{3,5} \cdot 0,00033 - \\ &- (z - 3) 0,063 + (\text{ЭДЦ}_{20:5w3} - 20) \times \\ &\times (0,284 y^{0,79} - 0,07 \operatorname{th} \frac{z-3}{1,35}) . \end{aligned} \quad (3)$$

На электронно-вычислительной машине Минск-22 нами вычислены величины ЭДЦ для разных значений ЭДЦ<sub>20:5w3</sub> и получены таблицы, успешно применяемые при идентификации жирных кислот.

В таблице 2 приведены некоторые вычисленные значения ЭДЦ и литературные значения, найденные по экспериментальным данным и коэффициентам разделения [7] или вычисленные по уравнению (2) при ЭДЦ<sub>20:5w3</sub> = 23,00

Т а б л и ц а 2

Сравнение вычисленных значений ЭДЦ с литературными данными

№ п.п.	Метиловый эфир	Вычисл. по формуле (3)	Вычисл. по формуле (2)	Δ ЭДЦ	Вычисл. по формуле (3)	Экспериментальные данные	Δ ЭДЦ
1	2	3	4	5	6	7	8
1	I6:2w7	17,19	-	-	16,99	16,99	0
2	I6:2w6	17,25	-	-	17,05	17,01	+0,04
3	I6:2w4	17,45	-	-	17,24	17,29	-0,05
4	I6:3w6	17,81	-	-	17,52	17,49	+0,03
5	I6:3w4	18,01	-	-	17,71	17,66	+0,05
6	I6:3w3	18,21	-	-	17,88	17,83	+0,05
7	I6:4w3	18,72	-	-	18,32	18,26	+0,06
8	I8:2w9	19,03	-	-	18,83	18,85	-0,02
9	I8:2w7	19,16	-	-	18,96	18,96	0
10	I8:2w6	19,23	-	-	19,02	18,98	+0,04

1	2	3	4	5	6	7	8
11	18:2w5	19,31	-	-	19,10	19,05	+0,05
12	18:2w4	19,43	-	-	19,21	19,24	-0,03
13	18:3w6	19,78	19,76	+0,02	19,49	19,45	+0,04
14	18:3w3	20,18	20,16	+0,02	19,85	19,82	+0,03
15	18:4w3	20,70	20,70	0	20,29	20,27	+0,02
16	20:2w9	20,91	20,95	-0,04	20,71	20,82	-0,11
17	20:2w6	21,11	21,17	-0,06	20,90	21,00	-0,10
18	20:3w9	21,47	21,45	+0,02	21,18	-	-
19	20:3w6	21,66	21,65	+0,01	21,37	21,40	-0,03
20	20:3w3	22,06	22,07	-0,01	21,73	-	-
21	20:4w6	22,18	22,05	+0,13	21,81	21,73	+0,08
22	20:4w3	22,57	22,61	-0,04	22,17	22,21	-0,04
23	22:2w7	22,88	-	-	22,68	22,56	+0,12
24	22:2w6	22,95	-	-	22,75	22,95	-0,20
25	22:4w6	24,02	-	-	23,65	23,71	-0,06
26	22:5w6	24,51	24,45	+0,06	24,06	24,05	+0,01
27	22:5w3	24,91	24,94	-0,03	24,42	24,52	-0,10
28	22:6w3	25,38	25,39	-0,01	24,82	24,86	-0,04

Интересно отметить, что вычисленные по формуле (3) значения ЭДЦ сравнительно хорошо применимы также для идентификации эфиров ненасыщенных алифатических спиртов по ЭДЦ эфира спирта 20:5w3 как показало сравнение вычисленных данных с экспериментальными данными Г.Р. Джеймизона и Э.Х. Рейда [8].

Практическая идентификация жирных кислот по хроматограмме состоит в определении  $k$  по удерживаемым объемам эфиров ненасыщенных кислот, вычислении значений ЭДЦ для всех пиков и сравнении полученных значений с вычисленными табличными данными.

#### В ы в о д ы

1. На основе литературных данных найдена эмпирическая формула для вычисления эквивалентных длин связей метиловых эфиров полиненасыщенных кислот.

2. Вычисления по эмпирической формуле существенно облегчают идентификацию жирных кислот в жирах сложного состава.

## Л и т е р а т у р а

1. Хасимото Гэцутаро, Никада Кэнкити, Сина Хисако и др., Repts. Govt. Chem. Industr. Res. Inst. Tokyo, 59 Nr. 5, 221 - 227 (1964); ref РЖХ 11 p 425(1965).
2. R.G. Аскман, J. Amer. Oil Chem. Soc. 40, Nr. 10, 564 - 567 (1963).
3. J.K. Накен. J. Chrom. 23, 375 (1966).
4. J.K. Накен. Reviews of Pure and Applied Chemistry 17, 133 - 148 (1967).
5. Г. Берчфилд. Э. Сторрс. Газовая хроматография в биохимии, Изд. "Мир", Москва 1964, стр. 501
6. G.R. Jamieson, E.H. Reid. J. Chrom. 42, 304 - 310 (1969).
7. R.G. Аскман. J. Amer. Oil Chem. Soc. 40, Nr. 10, 558 - 564 (1963).
8. G.R. Jamieson, E.H. Reid. J. Chrom. 40, Nr. 1 (1969).

E.Siimer, O.Tauts, K.Meister

### Investigation of Fatty Acid Composition of Fish Oils

#### S u m m a r y

Methods of identification of fatty acid methyl esters by means of gas chromatography have been reviewed.

A formula for the calculation of equivalent chain lengths values has been proposed. Peaks on the chromatogram can be identified by comparing the experimental and calculated ECL values.



УДК 639.381.3

А.Г.Канн, Э.А.Таутс, К.А.Каск

### МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КИЛЕЧНЫХ ПРЕСЕРВОВ

В пресервах всегда имеется много живых микроорганизмов, количество которых зависит от ряда факторов: от концентрации поваренной соли, от температуры хранения, от количества и характера антисептика, от сезонности и места улова рыб, от санитарного состояния оборудования и т.д.

Очень обильной и разнообразной бывает микрофлора пресервов непосредственно после их приготовления, так как в это время в пресервах находятся все микроорганизмы попавшие туда вместе с рыбой, с пряностями, с поваренной солью, с водой и с рук рабочих.

Для многих микроорганизмов условия существования в пресервах являются неблагоприятными, они теряют свою жизнеспособность и постепенно отмирают. Другая часть, наоборот, продолжает интенсивно расти и размножаться.

Микроорганизмы, которые приспосабливаются к новым условиям жизни, образуют специфическую микрофлору пресервов.

Жизнедеятельность микроорганизмов происходит прежде всего в тузлуке, так как она является в пресервах самой благоприятной составной частью для развития микроорганизмов. Мнение некоторых авторов, согласно которому микроорганизмы не играют существенной роли при созревании пресервов [1], в настоящее время многими работами опровергнуто [2, 3].

Существенно влияет на микрофлору пресервов характер и количество антисептика. Некоторые из микроорганизмов не

чувствительны к присутствию антисептика. Таковы, например, молочнокислые бактерии и дрожжи. Общее количество микроорганизмов, активность гнилостных и газообразующих бактерий в пресервах с антисептиком всегда меньше, чем без него.

В настоящее время при изготовлении килечных пресервов пользуются бензоатом натрия в количестве 0,1%. Бензоат натрия является сравнительно безвредным антисептиком в отношении человеческого организма — только после потребления 40 г бензоата натрия появляется головная боль и тошнота. Но тем не менее бензоат натрия не является идеальным консервантом, так как он влияет на вкусовые качества и цвет продукта.

Перспективным антисептиком считают сорбиновую кислоту, предложенную впервые Годингом [4]. Сорбиновая кислота не влияет на вкус и аромат консервируемого продукта, не является токсичной, усваивается организмом человека как жирная кислота с длинной цепью. Применение сорбиновой кислоты ограничивается тем, что самой эффективной является ее недиссоциированная форма и поэтому ею можно пользоваться лишь при низких значениях pH [5]. Максимальным количеством добавляемой сорбиновой кислоты считают 0,2%.

Во многих отраслях пищевой промышленности применяется  $KNO_3$  [6], который имеет бактериостатические свойства и только после превращения в  $KNO_2$  его свойства являются бактерицидными [7]. Известно, что  $KNO_3$  применялся в качестве антисептика и при производстве килечных пресервов. Некоторые специалисты-практики советуют и в настоящее время применять  $KNO_3$  в пресервах.  $KNO_3$  вызывает отравления у человека при дозе 4 г в сутки и при однократной дозе 1 г.

В настоящей работе исследовалось влияние сорбата калия и  $KNO_3$  на микрофлору килечных пресервов. Для контроля применялись килечные пресервы с бензоатом натрия. Килечные пресервы были изготовлены в цехе № 3 Таллинского рыбокомбината в декабре 1968 г. и в мае 1969 г.

При проведении микробиологического анализа применяли только анализ тузлука, так как в литературе имеется много данных об идентичности микрофлоры самой рыбы и тузлука в пресервах [8].

Высевы тузлука проводились на следующие питательные среды:

- 1) на среды богатые белками: мясопептонный агар, мясопептонный бульон, рыбопептонный агар, рыбопептонный бульон,
- 2) на среды богатые углеводами: мясопептонный бульон с 1% глюкозой и рыбопептонный бульон с 1% глюкозой,
- 3) на среды с поваренной солью: мясопептонный агар и бульон с 10% NaCl и рыбопептонный агар и бульон с 10% NaCl.

Микроорганизмы, которые развивались на средах с поваренной солью, названы солеустойчивыми.

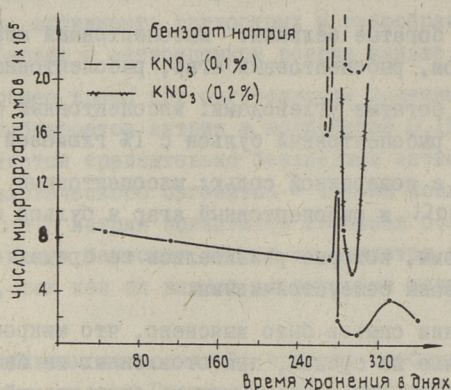
При проведении опытов было выяснено, что микроорганизмы развиваются лучше на средах, приготовленных на базе рыбной воды, чем на средах, приготовленных на базе мясной воды. Исходя из полученных данных в дальнейшем применялись только рыбные питательные среды.

При анализе тузлука определяли:

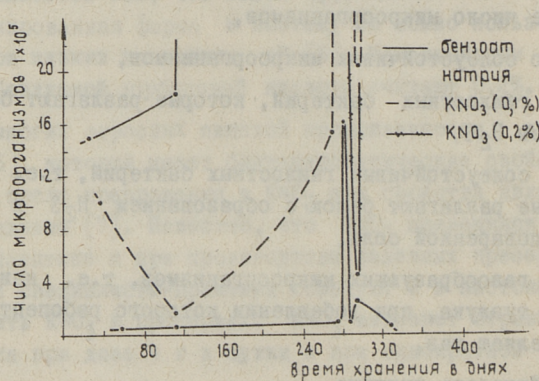
- 1) общее число микроорганизмов,
- 2) число солеустойчивых микроорганизмов,
- 3) титр гнилостных бактерий, которые разлагают белок с образованием  $H_2S$ ,
- 4) титр солеустойчивых гнилостных бактерий, т.е. бактерий, которые разлагают белок с образованием  $H_2S$  в присутствии 10% поваренной соли,
- 5) титр газообразующих микроорганизмов, т.е. наименьшее количество тузлука, при добавлении которого рыбопептонный бульон выделяет газ,
- 6) устойчивость тузлука.

На основе проведенных опытов было установлено, что во всех случаях, когда в пресервах применялся антисептик  $KNO_3$ , общее число микроорганизмов было очень высоким. Из некоторых пресервов с  $KNO_3$  не удалось по данной методике вообще определить общее число микроорганизмов (фиг. 1). Число солеустойчивых микроорганизмов оказалось также в пресервах с  $KNO_3$  сравнительно высоким (фиг. 2). Кроме этого, пресервы с  $KNO_3$  имели в большинстве случаев неприятный желтый цвет,

особенно при 0,2%  $\text{KNO}_3$  и при дегустации они получали низкую оценку по сравнению с пресервами с другими антисептиками.

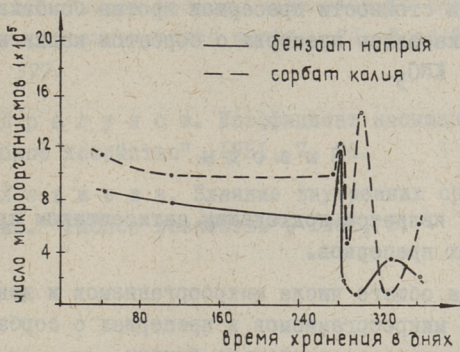


Фиг. 1. Изменение общего количества микроорганизмов из пресервов с бензоатом натрия и с  $\text{KNO}_3$ .

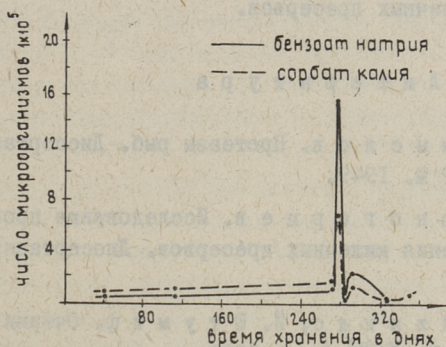


Фиг. 2. Изменение количества солеустойчивых микроорганизмов из пресервов с бензоатом натрия и с  $\text{KNO}_3$ .

При сравнении данных, полученных при анализах пресервов с сорбатом калия и бензоатом натрия выяснилось, что количество микроорганизмов в этих случаях не отличается резко (фиг. 3 и 4).



Фиг. 3. Изменение общего количества микроорганизмов из пресервов с бензоатом натрия и с сорбатом калия.



Фиг. 4. Изменение количества солеустойчивых микроорганизмов из пресервов с бензоатом натрия и с сорбатом калия.

Некоторые отличия в данных, полученных при анализе пресервов разных партий, можно объяснить обстоятельством, что эти партии были изготовлены в разные времена года, что существенно влияет на микрофлору пресервов [9].

Титр гнилостных бактерий является во всех случаях почти одинаковым. Титр солеустойчивых гнилостных бактерий в пресервах с сорбатом калия и бензоатом натрия практически

равен нулю. Выделение  $H_2S$  замечается лишь из соленого рыбопептонного бульона при анализах пресервов с  $KNO_3$ .

В отношении стойкости пресервов против бомбажа самыми устойчивыми оказались пресервы с сорбатом калия и самыми неустойчивыми с  $KNO_3$ .

#### В ы в о д ы

1.  $KNO_3$  не является подходящим антисептиком при изготовлении килечных пресервов.

2. Величина общего числа микроорганизмов и динамика изменения числа микроорганизмов в пресервах с сорбатом калия и бензоатом натрия сравнительно близки.

3. Самыми стойкими в отношении бомбажа оказались пресервы с сорбатом калия.

4. Сорбат калия является перспективным антисептиком для изготовления килечных пресервов.

#### Л и т е р а т у р а

1. А.Д. З а м ы с л о в. Протеазы рыб. Диссертация. Ин-т биохимии АН СССР М. 1949.

2. А.П. Ч е р н о г о р ц е в. Исследование процесса созревания и хранения килечных пресервов. Диссертация. Астрахань, 1959.

3. Дж., Н е й л а н д с, Й. Ш т у м п ф. Очерки по химии ферментов. Изд. И. Л. Москва, 1958.

4. J. T r o l l e r, R. O l s e n. Derivatives of Sorbic Acid as Food Preservatives, "Journal of Food Science", 1967, 32, 2, 228.

5. К. Л е м е ш е к - Х о д о р о в с к а я. Химические консерванты для пищевых продуктов. Москва, 1969.

6. М. Н и к о н о р о в. Вещества, специально добавляемые к пищевым продуктам и технические примеси. Москва, 1968.

7. J. A. P e r i g o, F. W h i t i n g, T. E. B a s h - f o r d. Observations on the inhibition of vegetative cells

of Clostridium sporogenes by nitrite which has been autoclaved in a laboratory medium, discussed in the context of Sub-lethally processed cured meats. "J. Food Technol.", 1967, 2, 4, 377.

8. А.М. Драгунов. Коэффициент насыщения при посоле рыбы "Рыбное хозяйство", 1951, 7, 56.

9. Л.С. Левиёва. Влияние внутренних органов сельди на созревание. "Рыбное хозяйство", 1962, 5.

A.Kann, E.Tauts, K.Kask

Mikrobiologische Analyse von Killopräserven

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Wirkung der verschiedenen Konservierungsmittel (wie  $\text{KNO}_3$ , Na-Benzolat und K-Sorbat) auf die Mikroflora der Präserven wurde untersucht.

Als bestes Konservierungsmittel erwies sich das K-Sorbat.





УДК 939.381.3

В.А.Кросинг, А.Г.Канн, Э.А.Таутс

ЛЕТУЧИЕ РЕДУЦИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ  
СТЕПЕНИ ПОРЧИ ПРЕСЕРВОВ КИЛЬКИ ПРЯНОГО ПОСОЛА

Летучие редуцирующие вещества (ЛРВ), ацетилметилкарбонол (АМК), диацетил, сероводород и др. являются продуктами метаболизма некоторых микроорганизмов. АМК и диацетил образуются из ацетальдегида или ацетомолочной кислоты при углеводном обмене. Но и аминокислоты, например аланин, могут превращаться в пирокислоты, которые являются промежуточными продуктами при образовании АМК [1]. Сероводород образуется в результате превращений цистеина и цистина.

Фарбер и сотрудники [1] исследовали содержание ЛРВ в рыбе и во многих видах рыбопродуктов, рассматривая их как индикатор порчи. Они нашли, что содержание ЛРВ в сырой рыбе и в консервах лучше коррелируется с органолептическими показателями, чем содержание общего летучего азота и азота триметиламина, а также сероводорода, индола, жирных кислот и карбонилсодержащих соединений. Поэтому они рекомендовали определение ЛРВ как доступный, достаточно точный метод, для оценки степени порчи рыбы и рыбопродуктов.

В данной работе была поставлена задача изучить пригодность этого метода для оценки состояния пресервов кильки пряного посола. В работе использовались пресервы пряных килек, приготовленных в промышленных условиях на Таллинском рыбокомбинате по рецептуре пресерва "Таллинские кильки". Исходный материал был подготовлен в двух вариантах: первый, контрольный — с добавлением 0,1% бензойной кислоты, второй — без консерванта для получения скоропортящегося продукта. Со-

зревание пресервов протекало 2,5 - 5 месяцев при температуре около  $0^{\circ}\text{C}$  в домашнем холодильнике.

При анализе определяли следующие показатели: содержание ЛРВ, общее количество солеустойчивых микроорганизмов и титр солеустойчивой гнилостной микрофлоры в тузлуке.

Органолептически определяли степень порчи пресервов по следующей шкале:

- 0 - доброкачественные,
- 1 - вкус нормальный, запах слегка гнилостный,
- 2 - запах и вкус гнилостные.

Содержание ЛРВ определяли по методике, описанной Фарбером и Ферро [2]. Метод заключается в том, что последовательно через исследуемую пробу и щелочной раствор перманганата калия продувают воздух. Количество улетучившихся из пробы и прореагировавших с перманганатом калия ЛРВ (в микроэквивалентах на 5 мл пробы) находят по результатам титрования азированного раствора перманганата тиосульфатом натрия после подкисления серной кислотой и добавления иодистого калия.

Количество солеустойчивых микроорганизмов определяли их высевом на соленом рыбопептонном агаре при разведении тузлука стерильным физиологическим раствором 1:1000. Количество колоний подсчитывали после 8-суточного выращивания при температуре  $30^{\circ}\text{C}$  [3].

Для определения титра гнилостных бактерий тузлук разбавляли в  $10$ ,  $10^2$  ...  $10^9$  раз стерильным физиологическим раствором и отмеряли по 1 мл полученных суспензий в 9 пробирках с рыбопептонным бульоном, получая таким путем пробы, где культивировались микроорганизмы из  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  ...  $10^{-9}$  миллилитра тузлука. Титр гнилостных микроорганизмов - наименьший объем тузлука, при высева которого в пробирке образовался сероводород. Сероводород обнаруживали при помощи увлажненных раствором уксуснокислого свинца фильтровальных бумажек [3].

Результаты опытов представлены в таблице I.

Представленные данные свидетельствуют о том, что содержание ЛРВ и общее количество микроорганизмов явно взаимо-

связаны. При содержании до  $2 \cdot 10^5$  микроорганизмов в 1 мл тузлука редуцирующая способность не превышает 30 мкг-экв на 5 мл тузлука (первый вариант). При количестве микроорганизмов выше миллиона, содержание ЛРВ значительно и достигает 80 - 120 мкг - экв/5 мл.

Т а б л и ц а I

Органолептические, химические и микробиологические показатели пресервов

Номер банки	Степень порчи	Содержание ЛРВ, мкг-экв/5 мл	Общее к-во солеустойчивых микроорганизмов, тыс. в мл	Титр солеустойчивых гнилостных бактерий, мл
I	2	3	4	5
I вариант				
1	0	23	143	$10^{-1}$
2	0	24	112	$10^{-1}$
3	0	8	17	$10^{-1}$
4	0	17	56	$10^{-1}$
5	0	7	60	0
6	0	30	90	$10^{-2}$
7	0	11	17	$10^{-1}$
8	0	8	30	$10^{-1}$
9	0	9	97	0
10	0	15	81	0
11	0	27	64	0
12	0	17	85	0
13	0	26	64	0
14	0	17		
II Вариант				
15	0	81	4318	$10^{-6}$
16	0	57	203	$10^{-5}$
17	0	94	2500	$10^{-4}$
18	I	118	6598	$10^{-5}$
19	0	37	25	$10^{-3}$
20	0	35	77	$10^{-5}$
21	0	52	34	$10^{-3}$
22	0	39	17	$10^{-2}$

Продолжение таблицы I

I	2	3	4	5
23	I	63	1666	$10^{-5}$
24	I	94	2096	$10^{-4}$
25	2	105	очень много	$10^{-6}$
26	I	98	2884	$10^{-5}$
27	2	III	2475	$10^{-9}$
28	I	120		

Отсюда можно сделать вывод, что при содержании ЛРВ до 30 мкг экв/5 мл пресервы являются доброкачественными, а при концентрации ЛРВ выше 80 мкг-экв/5 мл их следует относить к испорченным или потенциально испорченным. Из полученных данных явствует, что определением содержания ЛРВ можно обнаруживать начинающуюся порчу и обильную загрязненность пресервов микроорганизмами раньше, чем это обнаруживается органолептически (например в банках № 15 и № 17). Это подтверждается и титром гнилостных бактерий: для пресервов первого варианта титр сероводородообразователей колеблется в пределах от 0 до  $10^{-2}$  (в среднем  $10^{-1}$ ), а для пресервов с содержанием ЛРВ выше 80 мкг-экв/5 мл - от  $10^{-4}$  до  $10^{-9}$  (в среднем  $10^{-5}$ ).

#### В ы в о д ы

1. Изучена возможность оценки порчи и микробиологического состояния калькипряного посола по содержанию в тузлуке летучих редуцирующих веществ (ЛРВ).

2. При концентрации ЛРВ выше 80 мкг-экв/5 мл общее число микроорганизмов и число сероводородообразователей в продукте высокое, органолептически обнаруживаются признаки порчи. При содержании ЛРВ ниже 30 мкг-экв/5 мл пресервы являются по всем показателям доброкачественными.

## Л и т е р а т у р а

1. M.L. F i e l d s, B. S. R i c h m o n d and R.E. B a l d w i n. Food quality as determined by metabolic by-products of microorganisms, in Advances in Food Research, Ac. Press, New-York and London, 1968, 188 - 207.

2. L. F a r b e r and M. F e r r o. Volatile reducing substances and volatile nitrogen compounds in relation to spoilage in canned fish, Food Techn. 1956, 10, 303 - 304.

3. Ю.А. Р а в и ч - Щ е р б о, С.И. И в а н о в а. Практическое руководство по микробиологии производства рыбных консервов и пресервов. Изд-во "Пищ.пром." М., 1967.

V.Krosing, A.Kann, E.Tauts

### Volatile Reducing Substances (VRS) as Related to Microbial Quality of Semi-preserved in Brine

#### S u m m a r y

At the time when high bacterial count set in, there was a corresponding rise in VRS in the brine of semi-preserved sprats. VRS values greater than 80 microequivalents reduction per 5 ml brine corresponded to the number of microorganisms greater than one million and were indicative of spoilage. VRS value up to 30 indicates a good organoleptic and microbial quality.

## С о д е р ж а н и е

	Стр.
1. А.Ю. Мюхлинг, Ю.М.Канн, К.А. Каск. Исследование возможностей выделения инвертазы из пивных дрожжей. Сообщение I. . . . .	3
2. А.Ю. Мюхлинг, Ю.М.Канн, К.А. Каск. Исследование возможностей выделения инвертазы из пивных дрожжей. Сообщение II. . . . .	II
3. М.И. Креен, А.И.Кёстнер, К.А.Каск. Получение фиксированной полиакриламидным гелем инвертазы	2I
4. А.И. Кёстнер, К.Э.Паппель. Исследование адсорбции амилолитических ферментов на ионитах I. Сравнение ионитов. . . . .	33
5. А.И.Кёстнер. Исследование адсорбции амилолитических ферментов на ионитах II. Кинетическая теория адсорбции. . . . .	43
6. К.Э. Паппель, А.И.Кёстнер. Исследование адсорбции амилолитических ферментов на ионитах III. Адсорбция амилазы <i>Asp. oryzae</i> на катионите Амберлит CG-50/II . . . . .	5I
7. Т.Л. Лиеберт. Исследование продуктов гидролиза пшеничного крахмала биопрепаратом. . . . .	59
8. К.А. Каск, М.И. Креен. Об использовании сгущенного обрат для улучшения качества эстонского сепика . . . . .	63
9. В.А. Кросинг, К.А.Каск. Аминокислотный состав азотистых веществ рыбы и тузлука в пресерве "Таллинские кильки" . . . . .	69
10. Э.Х. Сиймер, О.В.Таутс, К.Э.Мейстер. Исследование жирнокислотного состава рыбьих жиров. Сообщение I. . . . .	73
11. А.Г. Канн, Э.А. Таутс, К.А.Каск. Микробиологический анализ килечных пресервов. . . . .	79
12. В.А. Кросинг, А.Г.Канн, Э.А. Таутс. Летучие редуцирующие вещества как показатель степени порчи пресервов килькипряного посола. . . . .	87





Цена 44 коп.