

Er 6.7  
633

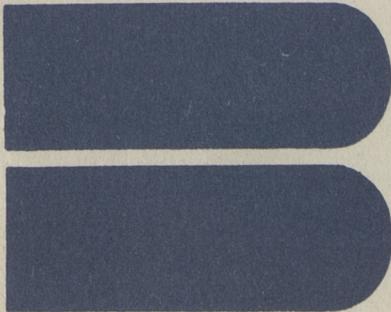
ISSN 0136-3549  
0320-3395

TALLINNA  
POLÜTEHNILISE INSTITUUDI  
TOIMETISED  
633

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО  
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО  
ИНСТИТУТА

**ТРИ**  
**'87**

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ  
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ





633

**ТР  
'87**

**TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED**

**ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА**

УДК 577.15:66.097.3

**ХАРАКТЕРИСТИКА  
ДЕЙСТВИЯ  
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ**

**Биотехнология 11**

**Под общей редакцией А.И. Кёстнера**

**Таллин 1987**

# С о д е р ж а н и е

1.	А.И. Кестнер, Э.А. Эббер. Программы для оптимизации биокаталитических процессов. Сообщение III. Первичная обработка результатов микрокалориметрических экспериментов.....	3
2.	М.А. Курвитс, Э.Х. Сиймер. Исследование мутаротации моносахаридов микрокалориметрическим методом.	15
3.	Г.Г. Калбин. Исследование кинетики действия иммобилизованных клеток. П. Измерение и расчет кинетических параметров иммобилизованных клеток дрожжей.....	26
4.	В.А. Кросинг. Характеристика ферментного комплекса и применение его при получении циклодекстринов. III. Предварительная обработка крахмала как сырья для синтеза циклодекстринов. ....	35
5.	Т.Б. Пальм, Р.А. Вокк, Э.М. Пейшман, А.И. Кестнер. Характеристика ферментного комплекса <i>Bacillus macerans</i> и применение его при получении циклодекстринов. I. Изучение динамики биосинтеза глюкозотрансферазного комплекса <i>Bacillus macerans</i>	41
6.	М.К. Фриеденталь, А.В. Игнат, А.В. Кропачев. Калориметрическое исследование нативности препарата сывороточного альбумина.....	49
7.	М.К. Фриеденталь, А.В. Игнат. Пенообразующая способность белков подсырной сыворотки. ....	57
8.	К.Э. Паппель, Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус. Гидролиз лактозы в барботажном биокаталитическом реакторе....	67
9.	К.Э. Паппель, Р.А. Вокк. Характеристика ферментного комплекса <i>Bacillus macerans</i> и применение его при получении циклодекстринов. II. Выделение и основные свойства циклодекстринглюкозотрансферазы.....	76

ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
Труды ТПИ № 833

## ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Биотехнология 11

На русском языке

Отв. ред. М.Миккал, Техн. ред. А.Андриевская

Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 17.04.87

Подписано к печати 23.06.87

МВ-06828

Формат 60x90/16

Печ. л. 6,0+0,5 приложение

Уч.-изд. л. 5,2

Тираж 300

Зак. № 285

Цена 80 коп.

Таллинский политехнический институт,

200108, Таллин, Эхитаяте тез, 5

Ротап rint ТПИ, 200006, Таллин, ул. Коскла, 2/9

Кр 6.7. 833



ПРОГРАММЫ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ  
ПРОЦЕССОВ. СООБЩЕНИЕ III. ПЕРВИЧНАЯ ОБРАБОТКА  
РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

В наших предыдущих работах [1, 2] разработан подход к оптимизации технологических биокаталитических процессов путем анализа кинетико-экономического уравнения, описывающего целевую функцию процесса. Этот подход может быть применен не только для биокаталитических процессов, но и для оптимизации процессов микробиологического синтеза. Одной из основных составных частей рассматриваемого кинетико-экономического уравнения для оптимизации процессов является функция продуктивности, количественно описывающая зависимость интенсивности процесса от характеристик катализатора, концентрации и степени превращения субстрата. Необходимые значения параметров, входящих в основное уравнение, определяются экспериментально.

Одним из удобных методов непрерывного наблюдения за процессами микробиологического синтеза является калориметрическое исследование. Для полного описания биосинтетических процессов необходимо наряду с результатами калориметрических исследований определить также изменение химического состава среды, количество образованной биомассы, количество жизнеспособных (метаболически активных) микроорганизмов. Для предварительной характеристики процессов микробиологического синтеза, т.е. для количественного описания изменения интенсивности процесса от времени достаточно использовать только результаты микрокалориметрических экспериментов. В ряде работ [3, 4] описаны результаты микрокалориметрических исследований ферментационных процессов. Однако до сих пор не разработано единого подхода для количественного описания подобных кривых, в част-

ности, решения обратной задачи, т.е. выявление формы основного уравнения, проведение дискриминации между отдельными моделями и расчета значений и доверительных границ для параметров, характеризующих данную модель. Очевидно, что один и тот же процесс может быть описан разными альтернативными математическими моделями.

В настоящей статье предложен комплекс программ для математической обработки результатов микрокалориметрических опытов. Решение поставленной задачи проводилось поэтапно. Первый этап включает запись экспериментальных данных на магнитный носитель информации и предварительную обработку данных с записью промежуточных результатов. На втором этапе осуществляется поиск формы уравнения и его параметризация. Для получения экспериментальных кривых проводились калориметрические опыты в анаэробных условиях с микроорганизмом *Bac. macerans*. Эта культура является источником многих ферментов, которые могут быть применены для целенаправленной трансформации крахмала, в том числе для получения циклодестринов.

#### Математическая модель

Процесс развития микроорганизмов в замкнутой системе сопровождается комплексом химических реакций, приростом микроорганизмов и последующим их отмиранием. Полное описание такой системы является сложной задачей и возможно только на основе большого экспериментального материала. С целью разработки обоснованного подхода к первичной обработке результатов калориметрических экспериментов целесообразно исходить из упрощенной модели процесса.

Как известно, многие энзиматические реакции ингибируются продуктами. Для многих ферментов кинетика глубокой конверсии субстрата может быть описана уравнением:

$$u_d = \frac{V_m \cdot (1-x)}{1 + A_1 \cdot x + A_2 \cdot x^2}, \quad (I)$$

где  $V_m$  - максимальная скорость превращения субстрата при данной начальной концентрации субстрата, моль на единицу массы каталитически активного вещества;  
 $x$  - степень превращения субстрата;

$u_a$  - скорость при достигнутой степени конверсии.

Во время развития культуры количество активной биомассы непрерывно меняется и суммарная скорость расхода субстрата равняется

$$u_s = N \cdot u_a, \quad (2)$$

где  $N$  - количество активной (жизнеспособной) биомассы.

Предполагалось, что скорость прироста биомассы пропорциональна расходу субстрата

$$\frac{dN_1}{d\tau} = u_G = k_G \cdot u_s, \quad (3)$$

где  $k_G$  - коэффициент пропорциональности роста.

Предполагалось, что в случае анаэробных процессов степень включения массы в микроорганизмы незначительна и почти весь субстрат превращается в низкомолекулярный продукт катаболизма, т.е. действительно уравнение

$$-\frac{dS}{d\tau} \approx \frac{dP}{d\tau}. \quad (4)$$

В этом случае степень конверсии субстрата описывается как

$$x = \frac{S_0 - S}{S_0}, \quad (5)$$

где  $S_0$  - начальная концентрация субстрата;

$S$  - текущая концентрация субстрата.

Одновременно с накоплением продукта ускоряется процесс отмирания микроорганизмов. Предполагалось, что при заданных исходных условиях скорость этого процесса гиперболически увеличивается с увеличением степени превращения и описывается уравнением

$$-\frac{dN_2}{d\tau} = -u_D = N \frac{k_D \cdot x}{A_3 + x}, \quad (6)$$

где  $k_D$  - коэффициент пропорциональности отмирания.

Следовательно, суммарная скорость изменения количества активной биомассы равняется

$$\frac{dN}{d\tau} = u_G - u_D = N \cdot F(x), \quad (7)$$

где функция  $F(x)$  определяется как

$$F(x) = \frac{k_G \cdot V_M \cdot (1-x)}{1 + A_1 \cdot x - A_2 \cdot x^2} - \frac{k_D \cdot x}{A_3 + x}. \quad (8)$$

Чтобы увязать вышеприведенные закономерности с наблюдаемыми тепловыми эффектами, предполагалось, что реакция отмирания микроорганизмов протекает без существенного теплового изменения энтальпии, а реакции (2) и (3) экзотермичны с молярным изменением энтальпии  $Q_S$  и  $Q_G$ . Следовательно, общая тепловая мощность системы определяется

$$W = u_S \cdot Q_S + u_S \cdot K_G \cdot Q_G. \quad (9)$$

Из вышеизложенного вытекает, что

$$\frac{dW}{dt} = Q_T \cdot \frac{dN}{dt}, \quad (10)$$

где  $Q_T = Q_S + K_G \cdot Q_G$  - суммарный коэффициент изменения энтальпии.

С другой стороны, суммарное количество расходуемого субстрата определяется интегралом

$$P = S_0 - S = \int_0^{\tau} u_S d\tau. \quad (11)$$

Исходя из (6) и (8), получили

$$S_0 - S = \frac{1}{Q_T} \int_0^{\tau} W d\tau. \quad (12)$$

Из вышеприведенного следует, что при обработке экспериментальных результатов целесообразно провести анализ зависимостей между тепловой мощностью, ее первой производной и интегральным изменением энтальпии. При испытании нескольких вариантов количественного описания калориметрических опытов, при дискриминации и параметризации уравнений для описания кинетики глубокой конверсии целесообразно первичную обработку данных, т.е. их интегрирование и дифференцирование проводить один раз и записать полученные промежуточные результаты на магнитный носитель. Файлы данных можно в последующем использовать многократно.

При численном дифференцировании экспериментальных кривых целесообразно их предварительно сглаживать. Хотя сглаживание кривых приводит к некоторым искажениям, оно необходимо во избежание случайных "всплесков" на кривой производных.

Для сглаживания кривых применялся метод кубических сплайнов. Основная программа для расчета заимствована из [5], модифицирована в одномерную форму и приспособлена к

повторному расчету по обрабатываемой кривой. Степень сглаживания определялась шагом  $M$ . При  $M=0$  все экспериментальные точки принимались как узлы и расчет по кривой проводился только один раз. В случае  $M=1,2$  в качестве узлов выбирались экспериментальные точки через  $M$ . Расчет по кривой проводился  $M+1$  раз. Полученная сглаженная кривая представлялась как среднее арифметическое от узловых и интерполированных точек.

### Пакет программ для расчета

Для первичной обработки и графического изображения экспериментальных данных, а также для предварительной проверки адекватности рассматриваемых моделей был создан пакет программ. Общая функциональная схема пакета приведена на рис. I.

Основные программы созданного пакета выполняют следующие функции.

Программа CALFILE применялась для записи данных о проведенном опыте и координат экспериментальных точек. Программа создавала файл типа \*.PRI.

Программа CALGEN создавала такие же файлы \*.PRI по модели, описанной уравнениями (I-II). По оси времени задавалось 100 точек, расчет по кривой проводился линейно по производной текущей точке. Рассчитанные кривые до записи изображались на дисплее, что позволяло провести первоначальную проверку соответствия модели и его коэффициентов реальным экспериментам.

Программа CALPRI проводила сглаживание исходных точек методом кубических сплайнов, и образовывала файлы с обозначением \*.SEC, которые содержат для каждой точки значения аргумента, функции, ее производной и интеграла. Для каждого произвольно подобранного значения шага обработки  $M$  создается отдельный файл этого типа. Файлы этого типа были предусмотрены для использования программой CALMOD для проверки адекватности моделей и расчета их коэффициентов методом наименьших квадратов. Эта программа будет описана авторами в последующих сообщениях.

Программа CALSCO предусматриваясь для графической обработки полученных файлов типа \*.SEC. Выходом этой программы являлись изображения на экране дисплея и файлы на специальном языке графопостроителя с обозначением \*.PLO. Эти файлы с помощью стандартной программы PIP выводятся на графопостроителе.

Программы составлены на языке Бейсик для операционной системы CP/M.

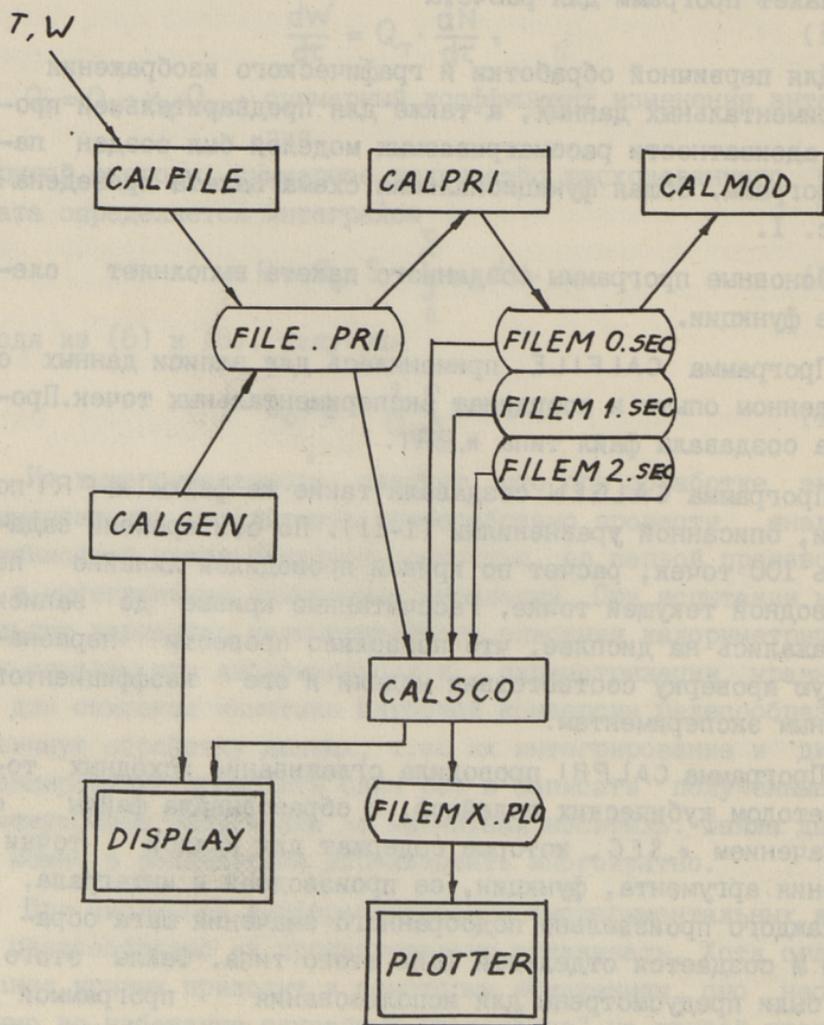


Рис. 1. Функциональная схема пакета программ:

- отдельные программы,  - файлы,
- устройства для графического изображения.

## Экспериментальная часть

Калориметрические опыты проводились на мониторе био-активности ЛКБ 2277 в герметически закрытых стеклянных ампулах объемом 3 мл. Исследовалась культура *Vac.macerans*. Посевной материал выращивали на питательной среде, содержащей 15 % мелконарезанного картофеля и 1,5 % мела для поддержания рН в водопроводной воде при 37 °С в течение 42-78 часов.

В опытах применяли ту же питательную среду, которую предварительно отфильтровывали, разливали по ампулам и стерилизовали при 1 атм в течение 20 минут. Посевной материал добавляли в ампулы со стерилизованной питательной средой в соотношении 10:1. Ампулу для контрольного измерительного цилиндра заполняли равным объемом опытной питательной среды. Затем ампулы герметически закрывали, опускали в калориметр и проводили наблюдения за тепловыделением культуры. В ходе реакций проводилась запись величины теплового потока  $W$ .

В экспериментах изменяли объем питательной среды от 1 до 2 мл и соответственно количество посевного материала (0,1-0,2 мл). Опыты проводились с различным содержанием сахаров и количеством от (0,1-0,2 мл)  $\beta$ -циклодекстринов в среде. Исследовали различные штаммы культуры *Vac.macerans*. Продолжительность одного опыта 48-50 часов.

Всего проведено 30 отдельных экспериментов и получено 60 термограмм.

В данной работе на рис. 3, 4, 5 в качестве примера рассмотрена кривая, полученная с помощью микрокалориметрии при изучении развития культуры *Vac.macerans* (0,2 мл) штамма ВКМВ-0302 на среде (1,8 мл) вышеописанного состава при 30 °С.

## Результаты и обсуждения

Для проверки принципиальной адекватности предложенной модели была использована программа CALGEN с разными формальными комплектами характерных коэффициентов. Для описания кинетики основной реакции было принято  $A_1=5$  и  $A_2=-5$ , что соответствовало умеренно сильному ингибированию продуктами. Коэффициент  $A_3$  подбирали равным 0,2, что соответствовало довольно сильному токсическому эффекту про-

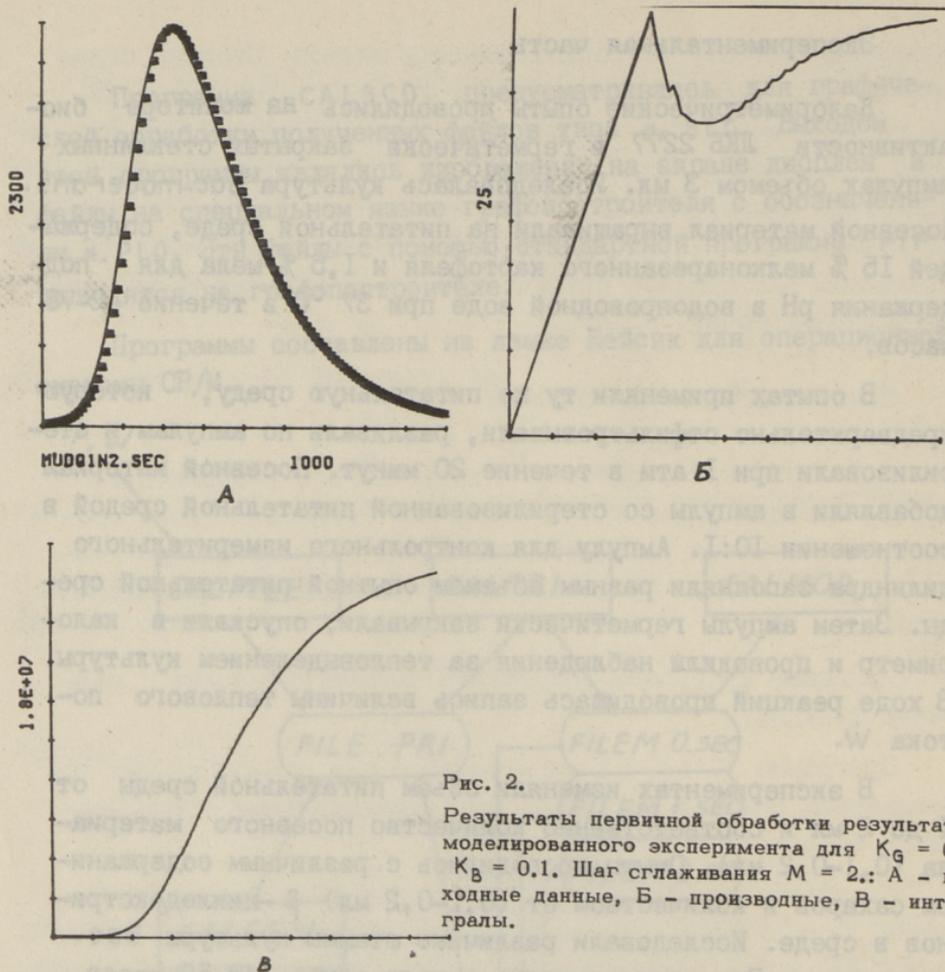


Рис. 2. Результаты первичной обработки результатов моделированного эксперимента для  $K_G = 0.3$ ,  $K_B = 0.1$ . Шаг сглаживания  $M = 2$ . А - исходные данные, Б - производные, В - интегралы.

дукта. Шкала времени равнялась 1000 единиц. Максимальная скорость  $-V_M = 1$ , начальная концентрация субстрата 10000 единиц, начальная концентрация биомассы 1 единица. Тепловой эффект  $Q_T$  принимали равным 10. При этих стандартизованных коэффициентах форма модельной кривой в основном зависела от коэффициентов  $K_G$  и  $K_D$  (см. табл. I).

Таблица I

Основные характеристики результатов моделированных экспериментов

Номер	1	2	3
Коэффициент роста	0,3	0,5	0,3
Коэффициент отмирания	0,1	0,1	0,2
Максимальное количество биомассы	780	2000	43
Конечное количество биомассы	82	20	5
Максимальная мощность	2200	4300	1800
Конечная степень превращения	0,84	0,99	0,51

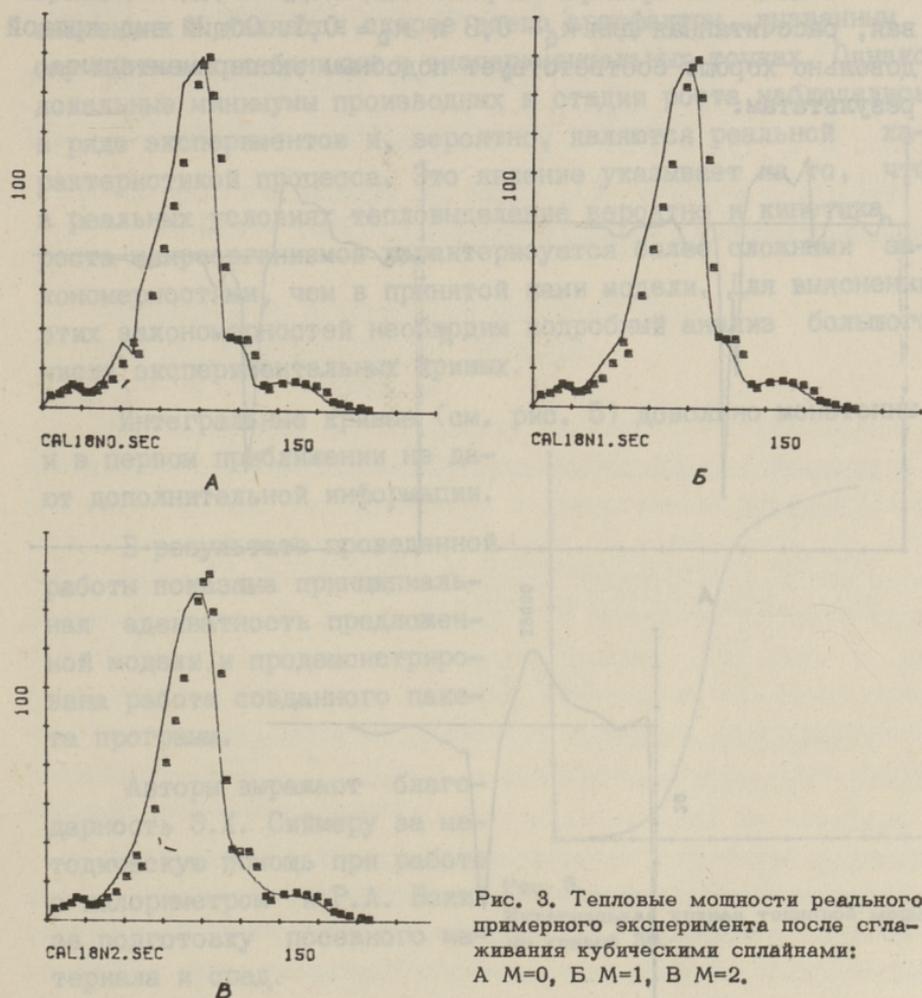


Рис. 3. Тепловые мощности реального примерного эксперимента после сглаживания кубическими сплайнами: А  $M=0$ , Б  $M=1$ , В  $M=2$ .

Данные, приведенные в табл. I, показывают, что ход характерных показателей, рассчитанных по предложенной модели существенно зависит от значений, характеризующих рост и отмирание микроорганизмов. Важно отметить, что подобные кривые могут быть получены при совершенно разном ходе процесса. Например, в экспериментах I и 3 достигаются близкие значения максимальной тепловой мощности, несмотря на то, что максимальные количества биомассы существенно различаются. Этот факт еще раз предостерегает от переоценки возможностей однозначного решения обратной задачи и показывает, что для полной характеристики процесса необходимо кроме термограмм использовать также непосредственные микробиологические и химические характеристики исследуемой системы.

В качестве примера на рис. 2 приведена модельная кривая, рассчитанная для  $\kappa_G = 0,3$  и  $\kappa_D = 0,1$ . Общий вид кривой довольно хорошо соответствует подобным экспериментальным результатам.

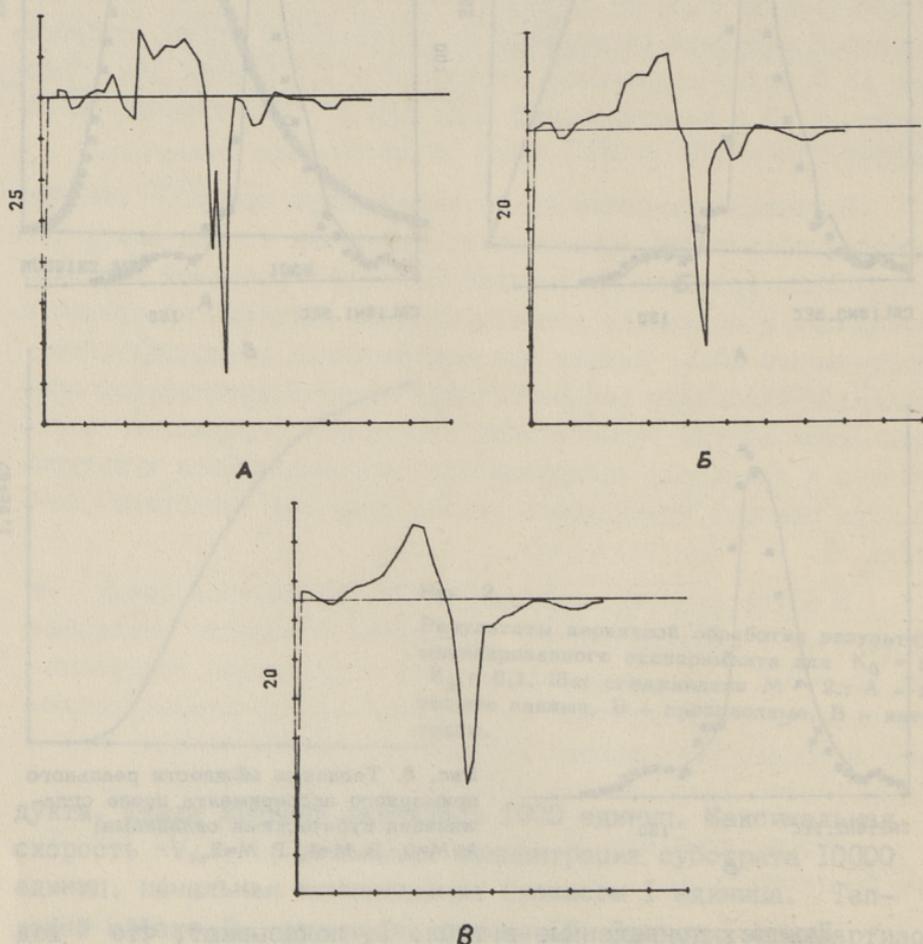


Рис. 4. Производные тепловой мощности, рассчитанные по кривым рис. 3.

Созданным пакетом программ обрабатывался целый ряд реально полученных калориметрических кривых. На рис. 3 приведены графики сглаженных данных для значений  $M = 0,1$  и  $2$ . Хотя на некоторых участках кривой обнаруживаются некоторые систематические отклонения от экспериментальных точек, однако все сглаженные кривые довольно хорошо соответствуют эксперименту.

Большие различия обнаруживаются на графиках, которые изображают временную зависимость производных теплового по-

тока. По-видимому, неровной ход графиков при меньших значениях  $M$  является скорее всего артефактом, вызванным случайными колебаниями в экспериментальных точках. Однако локальные минимумы производных в стадии роста наблюдались в ряде экспериментов и, вероятно, являются реальной характеристикой процесса. Это явление указывает на то, что в реальных условиях тепловыделение вероятно и кинетика роста микроорганизмов характеризуется более сложными закономерностями, чем в принятой нами модели. Для выяснения этих закономерностей необходим подробный анализ большого числа экспериментальных кривых.

Интегральные кривые (см. рис. 5) довольно монотонны и в первом приближении не дают дополнительной информации.

В результате проведенной работы показана принципиальная адекватность предложенной модели и продемонстрирована работа созданного пакета программ.

Авторы выражают благодарность Э.Х. Сиймеру за методическую помощь при работе с калориметром и Р.А. Вокк за подготовку посевного материала и сред.

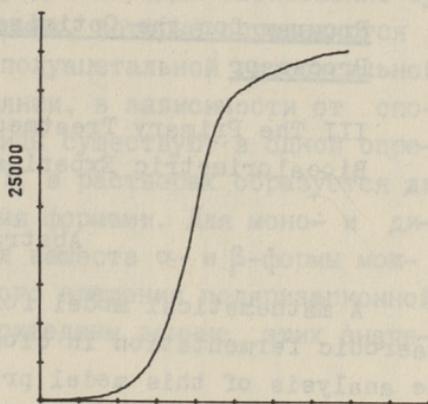


Рис. 5.  
Интегральная кривая тепловой мощности по кривой 3В.

### Л и т е р а т у р а

1. Кёстнер А.И., Роос И. Программы для оптимизации биокаталитических процессов. I. Оптимизация симплексным методом // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1985. - № 598. - С. 3-7.

2. Кёстнер А.И., Роос И. Программы для оптимизации биокаталитических процессов. II. Оптимизация процесса гидролиза лактозы в молочной сыворотке // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1986. - № 622.

3. Платонов Л.Л. и др. Микробиология. - 1970.-  
Т. 39. - № I. - С. 47-53.

4. Веезер А.Е., Сноудхру В.З. // Pract.  
- 1980. - V. 29. - N 6. - P. 504-508.

5. Роджерс Д., Адамс Дж. Математические основы  
машинной графики.-М.: Машиностроение, 1980. - 239 с.

A. Köstner, E. Ebber

Program for the Optimization of Biocatalytic  
Processor

III The Primary Treatment of the Results of  
Biocalorimetric Experiments

Abstract

A mathematical model for the heat production by anaerobic fermentation in closed system has been proposed. The analysis of this model proves the necessity to calculate the first derivatives and integrals of heat production at the first step treatment of experimental data. A block of programs has been compiled for the primary treatment. The initial data are saved on diskettes and then smoothed by means of Q-spline procedure and new files consisting of smoothed values, derivatives and integrals have been generated and saved on diskettes. A program for generating primary files according to proposed model and program for graphic representation have been included in the block. The programs have been realized in the CP/M operating system. As an example, the calorimetric experiments with *Bacillus macerans* have been described.

ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАРОТАЦИИ МОНОСАХАРИДОВ  
МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Моносахаридам и большинству дисахаридам свойственно существование в двух изомерных формах, которые определяются пространственным расположением полуацетальной гидроксильной группы. В кристаллическом состоянии, в зависимости от способа получения кристаллов сахарады существуют в одной определенной форме ( $\alpha$ - или  $\beta$ -формах), в растворах образуется динамическое равновесие между двумя формами. Для моно- и дисахаридов как оптически активных веществ  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы можно различать по значению удельного вращения поляризационной плоскости  $[\alpha]_D^{20}$ . В таблице I приведены данные этих значений для некоторых сахаров.

Как известно, скорость перехода  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм в равновесное состояние в растворах, т.е. скорость реакции мутаротации зависит от температуры и pH [7], причем в щелочных растворах равновесие достигается очень быстро, а для кислых сред существует значение pH, при котором скорость мутаротации минимальна. Эта реакция является типичной мономолекулярной реакцией, реакцией первого порядка.

Изменение энтальпии реакции мутаротации относительно мало и его прямое измерение калориметрическим методом затруднительно. Несмотря на это, уже почти 50 лет тому назад Стуртеванту и др. удалось микрокалориметрическим методом получить весьма достоверное значение  $\Delta H$  для реакции мутаротации глюкозы  $5 \times 10^{-5}$  н соляной кислоте при 25 °C, равное  $676 \pm 38$  Дж/моль [8].

Нами показано, что современные микрокалориметры, имеющие проточные измерительные ячейки, можно успешно использовать для изучения кинетики реакций, в том числе даже относительно быстрых. В последнем случае обязательно прово-

Удельное вращение  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм моно- и дисахаридов при длине волны D

Вещество	Удельное вращение $[\alpha]_D^{20}$				Литература
	$\alpha$ -форма		$\beta$ -форма		
	2	3	3	4	
I					5
D - Глюкоза	-	-	-	+52,5 + 0,025 d (d = I-18 г/100 г)	I
	+109,6	+20,5		+52,3	2
	+112,2	+18,9		+52,7	3, 4
	+112	+18,7		+52,7	5
D - Галактоза	-	-	-	+83,9 + 0,078 d - 0,21 t (d = 4-36 г/100 г, t = 10-30 °C)	I
	-	-	-	+81	2
	+150,7	-	-	+81,1	3
	-	+54,4	-	+80,5	3, 5
D - Фруктоза	-	-	-	-88,5 - 0,145 d (d = 2,6-18,6 г/100 г)	I
	-	-	-	-93	2
	-63,6	-133,5	-	-92 + -93	3

Продолжение табл. I

I	2	3	4	5	
D - Лактоза	-	-	+52,4 + 0,072 x (20 - t) +55,3	1	
	+90	+34,9	+52,3 + +55,3	2	
	+83,5 + +85 для моногид- рата				3
	+86	+35			5
	Сахароза	-	-	+66,412 + 0,01267 d -0,000376 d <sup>2</sup> (d = 0-50 г/100 г)	1
			+66,53	3	
			+66,5	4	
			+66,55	6	
Мальтоза	+173	+111,7	+130,4	3	
			+137	2	



дить корригирование термограмм на основе уравнения Тиана [9]. Методика корригирования за последние годы тщательно разработана шведскими исследователями [10].

Нами также использован термохимический метод для исследования кинетики реакции гидролиза дисахаридов с помощью гомогенного катализа ферментами [11]. В этих реакциях суммарное изменение энтальпии, очевидно, включает в себя также  $\Delta H$  реакции мутаротации образующихся моносахаридов, что в принципе осложняет кинетическую интерпретацию термохимических кривых (зависимостей теплового потока от времени).

Целью настоящей работы являлось определение значений констант скорости мутаротации некоторых моносахаридов микрокалориметрическим методом с целью дальнейшего использования получаемых величин для корригирования термохимических кривых ферментативного гидролиза дисахаридов. Кроме этого, определение  $\Delta H$  реакций мутаротации использовалось для уточнения величин эффективного объема проточных измерительных ячеек (flow mix, flow through) микрокалориметра ЛКБ-2277, которые в некоторой степени зависят от скорости протока жидкости.

### Материалы и методы

Для исследований использовались  $\alpha$ -глюкоза и  $\alpha$ -галактоза марки "Ч", фруктоза финской фирмы "Суомен Согери". Растворы моносахаридов концентрацией 0,4–5,8 М готовились в 0,05 М ацетатном и фосфатном буферах с pH 4,0 и 6,0 соответственно и в соляной кислоте (pH 4,0). Измерения проведены при 25 и 30 °C.

Термохимические исследования проведены в проточной системе (flow through) микрокалориметра ЛКБ 2277. Растворы моносахаридов готовились в термостатированном реакторе объемом 60 мл, снабженном магнитной мешалкой, откуда раствор непосредственно после растворения сахара с помощью перистальтического насоса ЛКБ 2132 объемной скоростью 10 или 20 мл/ч ( $2,78 \times 10^{-3}$  или  $5,56 \times 10^{-3}$  мл/с) подавался в измерительную ячейку комбинированного цилиндра микрокалориметра. Полученные на ленте самопишущего потен-

пиометра кривые "тепловой поток - время" корригировались на основе уравнения Тиана согласно методике, описанной нами ранее [12].

Корригированные кривые соответствуют функции скорости реакции первого порядка

$$N = N_0 \cdot e^{-k_{\text{мут}} \cdot t}, \quad (1)$$

где  $N$  - тепловой поток в микроватах в момент  $t$ ;

$N_0$  - тепловой поток в начале опыта (при  $t = 0$ );

$k_{\text{мут}}$  - суммарная константа скорости мутаротации,  $\text{мин}^{-1}$ ;

$t$  - время, мин.

Методом линейной регрессии из логарифмической функции

$$\ln N = A - B \cdot t \quad (2)$$

или

$$\ln N = \ln N_0 - k_{\text{мут}} \cdot t \quad (3)$$

найлены значения  $A$  и  $B$  ( $k_{\text{мут}}$ ).

Общий тепловой эффект реакции равен интегралу

$$dQ = e^A \cdot \int_0^{\infty} e^{-Bt} dt. \quad (4)$$

тождественному уравнению (1), и имеет значение

$$Q = \frac{e^A}{B} \quad [\text{Дж}], \quad (5)$$

Если известен тепловой эффект реакции мутаротации  $q$  [Дж/моль], может быть найдено количество молей  $M$  моносахарида, непрерывно находящихся в измерительной ячейке и подвергающихся измерению:

$$M = \frac{Q}{q}, \quad (6)$$

и через концентрацию раствора может быть вычислен эффективный объем измерительной ячейки микрокалориметра.

## Результаты и обсуждение

Проведено около 40 опытов исследования мутаротации  $\alpha$ -глюкозы,  $\alpha$ -галактозы и  $\beta$ -фруктозы при двух температурах  $-25$  и  $30$  °C, при двух значениях pH - 4,0 и 6,85. Все полученные кривые после корригирования хорошо описываются экспоненциальной функцией, коэффициент корреляции при линейной регрессии, согласно уравнению (2), выше 0,999 во всех опытах мутаротации глюкозы и выше 0,985 для быстрых реакций

(мутаротация фруктозы, мутаротация галактозы при pH 6,85).

Типичные экспериментальные кривые приведены на рис. 1.

Для использованных трех моносахаридов переход  $\alpha$ -формы в  $\beta$ -форму связан с выделением тепла, и, очевидно, обратное структурное изменение связано с поглощением тепла.

Основные результаты измерений сосредоточены в таблице 2. Доверительные границы средних величин даны с достоверностью 95 %.

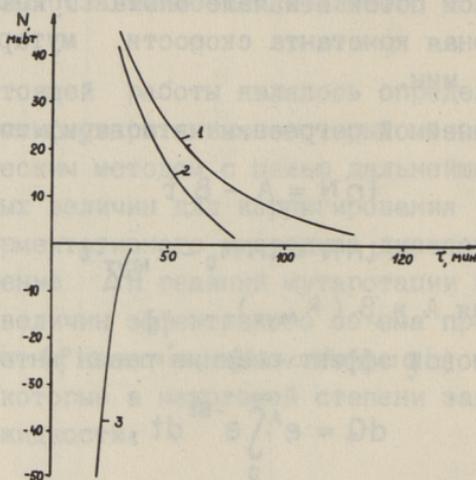


Рис. 1. Корректированные кривые теплового потока при мутаротации моносахаридов, pH 4, 25 °C:

- 1 -  $\alpha$ -глюкоза 0,686 М,  
2 -  $\alpha$ -галактоза 0,515 М,  
3 -  $\beta$ -фруктоза 0,659 М.

Т а б л и ц а 2

Значения констант скорости мутаротации моносахаридов

Моносахарид	pH раствора	Темп., °C	Кол-во опытов	$k_{\text{мут}}, \text{мин}^{-1}$
$\alpha$ -глюкоза	4,0	25	9	$0,0264 \pm 0,0010$
$\alpha$ -глюкоза	6,85	25	3	$0,156 \pm 0,026$
$\alpha$ -глюкоза	4,0	30	13	$0,040 \pm 0,001$
$\alpha$ -галактоза	4,0	25	3	$0,060 \pm 0,004$
$\alpha$ -галактоза	6,85	25	3	$0,15 \pm 0,01$
$\beta$ -фруктоза	4,0	25	6	$0,223 \pm 0,009$

Как видно из таблицы, при рН 4,0 реакция мутаротации галактозы и, в частности, фруктозы протекает значительно быстрее, чем мутаротация глюкозы. Величины констант скорости хорошо согласуются с литературными данными [7], хотя найденная нами величина для галактозы превышает значение, найденное ранее [13]. Повышение рН от 4,0 до 6,85 значительно ускоряет мутаротацию, в частности, в случае глюкозы (около 6 раз).

Для каждого опыта вычислено общее изменение энтальпии (тепловой эффект) в ходе мутаротации в объеме измерительной ячейки, согласно уравнению (5), абсолютные значения которых находились в пределах 0,15–1,4 Дж. Величины теплового эффекта реакции мутаротации  $\alpha$ -глюкозы использованы для вычисления значения эффективного объема измерительной ячейки. Использовано значение теплового эффекта реакции 676 Дж/моль, определенное Стуртевантом [8].

Найдено, что эффективный объем проточной ячейки равен  $0,55 \pm 0,06$  мл при скорости потока 10 мл/ч и  $0,52 \pm 0,02$  мл при скорости 20 мл/ч. Значение этих величин необходимо для некоторых термохимических измерений, например, при оптимизации условий определения начальных скоростей ферментативных реакций [14].

Нами ранее подробно изучена кинетика ферментативного гидролиза лактозы [15]. Очевидно, суммарный тепловой эффект данной реакции включает в себя тепловые эффекты расщепления связи между  $\beta$ -галактозой и глюкозой и мутаротации образующихся моносахаридов. Так как для протекания мутаротации требуется время, в реакционной смеси в любой момент времени нарушено равновесие между  $\alpha$ - и  $\beta$ -формами моносахаридов. Неучет данного явления может вызывать погрешности при кинетической интерпретации термохимических кривых. Это особенно может иметь место при изучении кинетики гидролиза лактозы, так как суммарный тепловой эффект реакции мал и равен около 1 кДж/моль.

Из поляриметрических данных исследования равновесных концентраций  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм лактозы и глюкозы можно сделать вывод, что освобождающаяся при гидролизе глюкоза уже находится практически в равновесном состоянии. Следовательно, основные структурные изменения в растворе после гидролиза

лактозы связаны с переходом  $\beta$ -галактозы в равновесную смесь  $\beta$ - и  $\alpha$ -форм.

Из литературных данных вытекает, что в водных растворах преобладает  $\beta$ -форма, относительное содержание которой равно 72,5 % (см. табл. I).

Учитывая температурную зависимость суммарной константы мутаротации галактозы [13], и значение ее при 25 °C 0,060 мин<sup>-1</sup> (см. табл. 2), ее значение при 30 °C можно оценить 0,09 мин<sup>-1</sup>. Типичные калориметрические опыты полного гидролиза лактозы в ампулах в нашей лаборатории имели длительность порядка 2000 мин (30 часов и более) и проводились при 30 °C. На основе этих данных проведены расчеты для выяснения временной зависимости содержания аномерных форм галактозы в реакционной смеси при ферментативном гидролизе лактозы.

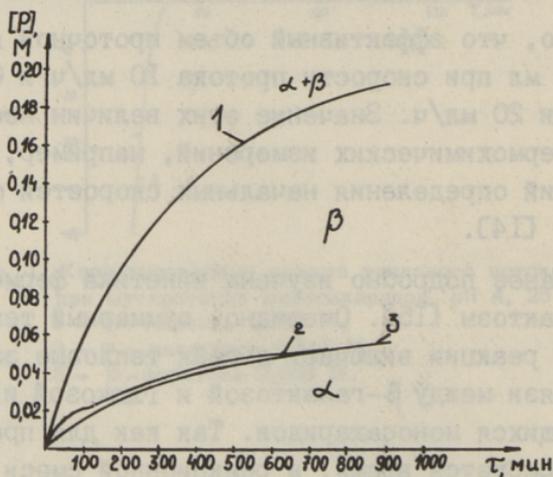


Рис. 2. Содержание  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм галактозы в реакционной смеси при ферментативном гидролизе 0,2 М раствора лактозы при 30 °C, pH 4,0:  
 1 — общее содержание галактозы (сумма  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм),  
 2 — фактическое содержание  $\alpha$ -галактозы в реакционной смеси,  
 3 — содержание  $\alpha$ -галактозы после достижения равновесия.

В качестве примера на рис. 2 приведены типичные результаты вычислений, в данном случае для реакции гидролиза лактозы с начальной концентрацией ее 0,2 М.

Как видно из рисунка, в начале опыта наблюдается значительное отклонение содержания  $\beta$ -галактозы от ее равно-

весной концентрации, а с повышением степени концентрации субстрата выше 0,4 это расхождение становится незначительным. Согласно нашим экспериментальным данным, тепловой эффект перехода I моля  $\alpha$ -галактозы в равновесную смесь, учитывая значение константы равновесия 0,47 [13], равно около - 0,5 кДж/моль. Суммарный тепловой эффект гидролиза лактозы по нашим данным составляет I кДж/моль. Следовательно, расщепление глюкозидной связи между  $\beta$ -галактозой и глюкозой связано с тепловым эффектом порядка +1,5 кДж/моль. Так как в начальной стадии гидролиза лактозы в термохимических исследованиях мутаротация  $\beta$ -галактозы не успеет приблизиться к равновесному состоянию, в этот период регистрируются повышенные значения теплового потока. Это значит, что при кинетической интерпретации термохимических кривых, при которой принимается, что тепловой поток пропорционален скорости гидролиза, в начальной стадии гидролиза наблюдается повышенная скорость гидролиза, значение которой в принципе надо корригировать.

Расчеты показывают, что при медленном гидролизе лактозы (длительность опытов 30 часов и более) в ампульной системе микрокалориметра ЛКБ-2277 погрешность за счет неучета неполной мутаротации галактозы не превышает 2 %. (При этом необходимо иметь в виду, что в опытах с ампулами первые 50-60 мин реакции неизбежно не подлежат измерению, и соответствующую этому периоду часть термохимической кривой всегда необходимо реставрировать экстраполяцией. Как видно из рис. 2 именно в этот период наблюдается самое резкое отклонение концентраций  $\alpha$ - и  $\beta$ -форм галактозы от равновесных.)

Поэтому, чтобы избежать сложной процедуры корригирования термохимических кривых для реакций, связанных с мутаротацией продуктов, исследования по полной конверсии субстрата калориметрическим методом желательнее проводить как можно медленнее. Естественно, это не касается реакций, проводимых в щелочной среде, так как в этом случае скорость мутаротации на несколько порядков превышает скорость химической реакции.

Наконец необходимо отметить, что затронутая проблема гораздо меньше касается реакций, в которых изменение энтальпии велико по сравнению с относительно небольшим изменением энтальпии реакции мутаротации.

## Л и т е р а т у р а

- I. Handbook of Chemistry and Physics II. - Cleveland, Ohio, 1955, P. 2760.
2. К а р р е р П. Курс органической химии. - Л.: Гос. научно-техн. изд. хим. лит. - 1960. - С. 441-442.
3. Краткая химическая энциклопедия, т. I-5. - М.: Советская энциклопедия, 1961-1967.
4. Л е н и н д ж е р А. Биохимия. - М.: Мир, 1974. - С. 259.
5. Химический энциклопедический словарь. - М.: Советская энциклопедия, 1983. - 792 с.
6. Практические работы по физической химии / Под ред. К.П. Мищенко, А.А. Равдела. - Л.: Химия, 1967. - с. 234.
7. Гулюк Н.Г. Исследование кинетики мутаротации глюкозных растворов // Сах. пром-сть. - 1979. - № 3. - С. 51-53.
8. S t u r t e v a n t J.M. Calorimetric investigations of organic reactions I. Apparatus and method. The inversion of sucrose and the decomposition of diacetone alcohol // J. Am. Chem. Soc. - 1937. - 59.-P. 1528-1537.
9. К а л ь в е Э., П р а т А. Микрокалориметрия. - М.: Изд. иностр. лит., 1963. - 477 с.
10. R a n d z i o S.L., S u u r k u u s k J. Interpretation of calorimetric thermograms and their dynamic corrections // Biological microcalorimetry. London: Academic Press Inc. 1980. - P. 311-341.
- II. М е н е р т А.А., Р у з е М.А., С и й м е р Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение IV. Исследование гидролиза дисахаридов // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1981. - № 510, - С. 3-13.
12. К ä ä r d A., S i i m e r E., K ö s t n e r A. A kinetic study of the reaction between diethyl ester of bisiminoadipic acid and beta-alanine by the thermochemical method // Science Tools. - 1986. - 33. - N 2. - P. 24-26.
13. F l a s h e l E., R a e t z E., R e n k e n A.

The kinetics of lactose hydrolysis for the  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus niger* // *Biotechn. and Bioeng.* - 1982. - 24. - P. 2499-2518.

14. Курвитс М., Сиимер Е. Application of microcalorimetry for analysing initial rates of enzymatic reactions // *Thermochimica Acta.* - 1986. - 103, - P. 297-303.

15. Курвитс М.А., Сиимер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение X. Кинетика гидролиза лактозы с помощью  $\beta$ -галактозидазы из *Penicillium canescens* // Тр. Таллинск. политехн. ин-та - 1986. - № 622, - С. 15-23.

E. Siimer, M. Kurvits

Investigation of the Mutarotation of  
Monosaccharides by Microcalorimetry

Abstract

In the reactions of disaccharides hydrolysis the change of enthalpy includes the change of enthalpy of the mutarotation of forming monosaccharides as well. The flow-mix system of microcalorimeter LKB 2277 has been used for the investigation of the monosaccharides mutarotation reaction. The values of rate constants of mutarotation of some monosaccharides have been found by microcalorimetry in order to correct thermochemical curves of the enzymatic disaccharides hydrolysis. The effective volumes of measuring cells of microcalorimeter LKB 2277 flow-systems (flow-mix, flow-through) haven been determined at different flow rates.

## ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ДЕЙСТВИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК.

## П. ИЗМЕРЕНИЕ И РАСЧЕТ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Иммобилизованные метаболически активные клетки микроорганизмов могут быть использованы в различных областях науки и техники: для трансформации и биосинтеза различных органических соединений: аминокислот и других органических кислот, антибиотиков, стероидов, углеводов и углеводородов, кофакторов и ферментов, пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеотидов и нуклеозидов; в пивоварении и виноделии; для очистки сточных и природных вод от загрязнений; для извлечения металлов из сточных вод; для ассимиляции солнечной энергии; для изготовления водородных топливных элементов; в азотфиксации; в аналитических целях при изготовлении электродов. Кинетика действия иммобилизованных клеток как гетерогенного катализатора включает относительно медленные стадии массопереноса, количественная характеристика которых необходима для описания процесса.

Кислород является критическим субстратом в клеточном метаболизме, он очень быстро исчерпывается микроорганизмами ввиду низкой растворимости в водных растворах. Поэтому изучение кинетики дыхания иммобилизованных клеток необходимо для характеристики этого вида биокатализаторов в первую очередь.

Целью настоящей работы является изучение дыхательной активности клеток *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных путем включения в полисахаридные гели, в различных макрокинетических условиях и в сравнении со свободными клетками.

## Материалы и методы

Микроорганизм, среда и условия культуры. Клетки *Saccharomyces cerevisiae* (раса XI-8) были получены с Сакусского экспериментального пивзавода и сохранялись в холодильнике при 4 °С. Новые партии клеток поставлялись каждые три недели. В качестве питательной среды в эксперименте был использован свежеприготовленный 5%-ный раствор сахарозы в дистиллированной воде, в одной серии опытов - предварительно проавтоклавируемый.

Подготовка клеток к иммобилизации. Перед иммобилизацией клетки отделяли центрифугированием при 2,5 тыс. об/мин в течение четырех минут. Питательную среду декантировали, и клетки сразу же использовали для иммобилизации.

Условия иммобилизации и хранения. Биокатализаторы были получены дисперсионным гелеобразованием полисахаридов, в частности - альгината натрия (НПО "Биохимреактив") в органическом растворителе [1] с применением раствора карбоната кальция. После тщательной промывки частиц геля водопроводной водой катализатор был фракционирован, взвешен и использовался в эксперименте. Хранили катализатор в 5%-ном водном растворе сахарозы при 4 °С.

Фракционирование и определение веса катализаторов. Фракционирование частиц геля было проведено с помощью калиброванных сит в водопроводной воде. Получены фракции 0,5 - 0,63 мм, 0,63-1,0 мм, 1,0-1,5 мм и 2,5-3,0 мм. Вес фракций был определен после удаления промывной воды путем помещения частиц тонким слоем на фильтровальную бумагу.

Экспериментальная установка. Эксперименты проводились на установке с замкнутой рециркуляцией питательной среды через реактор с перемешиванием и ячейки для измерения  $pO_2$ , pH и Eh[2]. Для уменьшения износа частиц катализатора в реакторе была установлена шнековая мешалка. Обработка экспериментальных данных проведена с помощью микроЭВМ "Электроника Д 3-28".

## Результаты и обсуждение

Изучение влияния макрокинетических условий на дыхательную активность клеток *Saccharomyces cerevisiae* было начато с постановки экспериментов со свободными клетками. Известно, что скорость потребления кислорода  $\dot{V}_{O_2}$  в суспензии дрожжей, в которой массовая концентрация клеток составляет  $X$  г/см<sup>3</sup>, выражается уравнением

$$\dot{V}_{O_2} = \frac{V_m \cdot C}{K_m + C} \quad [г\ O_2 / \text{час} \cdot \text{см}^3], \quad (I)$$

где  $V_m = q_{\max} X$  и  $C$  обозначает концентрацию растворенного кислорода [3].

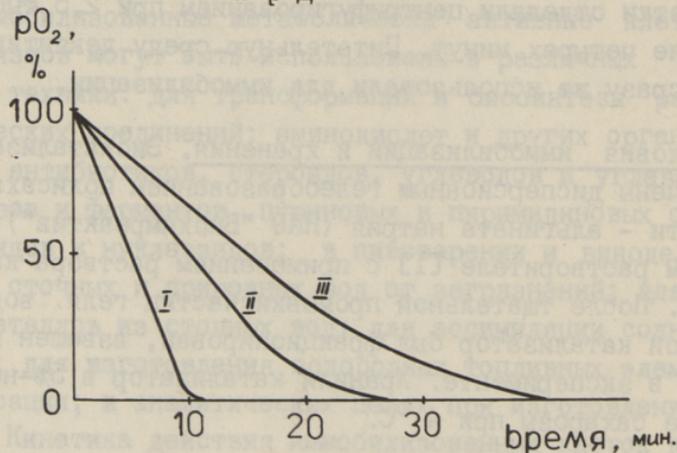


Рис. 1. Потребление растворенного кислорода нативными клетками *Saccharomyces cerevisiae*:  
 I - 1,0 г клеток (вл. вес),  
 II - 0,5 г клеток (вл. вес),  
 III - 0,33 г клеток (вл. вес).

На рис. I показаны временные зависимости концентрации растворенного кислорода после помещения навески клеток в насыщенную воздухом среду. Линейное уменьшение концентрации растворенного кислорода свидетельствует о том, что константа  $K_m$  при описании кривой уравнением (I) имеет очень низкое значение. Величина  $K_m$ , определенная при концентрациях растворенного кислорода, не превышающих 25 % от насыщения, составила  $5,71 \cdot 10^{-3}$  мм  $O_2$ .

Из рис. I видно также, что наклон начального участка кривой пропорционален начальному количеству клеток в системе (плотности культуры). Начальную удельную скорость потребления растворенного кислорода (на грамм влажного ве-

са клеток) мы определили на уровне  $4,0 \pm 0,9$  мг  $O_2$ /час-г клеток (доверительная вероятность 0,95). С целью повышения точности и обеспечения воспроизводимости дальнейшие эксперименты были проведены, по возможности, при одинаковом начальном количестве клеток.

С иммобилизованными в гель клетками *Sacch. cerevisiae* было проведено 6 серий опытов для определения зависимостей скорости потребления растворенного кислорода  $\dot{V}_{O_2}$  от диаметра частиц катализатора  $d$ , концентрации клеток в геле  $\ell$ , концентрации геля  $C_r$ , температуры  $t$ , концентрации сахарозы в питательной среде  $C_s$  и скорости вращения мешалки в реакторе  $N$ . Исходный вектор планирования эксперимента имел следующие координаты:  $d = 0,5-0,63$  мм (ситовая фракция)  $\ell = 25\%$ ,  $C_r = 8\%$ ,  $t = 30^\circ C$ ,  $C_s = 5,0\%$ ,  $N = 500$  об/мин. Серии экспериментов проводились с последовательным изменением каждой координаты при фиксировании остальных в исходном (стандартом) состоянии.

Известно, что кривая зависимости скорости потребления растворенного кислорода микроорганизмами от его концентрации имеет различную форму в различных макрокинетических условиях [4, с. 134]. Поэтому в качестве параметра  $\dot{V}_{O_2}$  мы взяли начальную скорость потребления растворенного кислорода из насыщенной воздухом среды. Функции  $\dot{V}_{O_2} = f(x)$  приведены в виде графиков на рис. 2, 3.

Из графиков рис. 2 видно, что в исследованном диапазоне функции  $\dot{V}_{O_2} = f(d)$  и  $\dot{V}_{O_2} = f(\ell)$  монотонны, и эффект диаметра частиц катализатора проявляется больше, чем эффект загрузки клеток, что объясняется теорией гетерогенного катализа. В соответствии с этой теорией [напр. 5, с. 41] фактор интенсивности для частицы катализатора есть функция модуля Тиле, который, в свою очередь, для сферической частицы пропорционален диаметру частицы и квадратному корню из скорости реакции на единицу объема носителя:

$$\varphi = \alpha \sqrt{\frac{v}{C_0 D}}, \quad (2)$$

т.е. в этом частном случае - квадратному корню из загрузки клеток ( $\varphi$  - модуль Тиле;  $\alpha$  - размер частицы;  $C_0$  - концентрация реагирующего вещества в объеме;  $D$  - его коэффициент диффузии в частице катализатора).

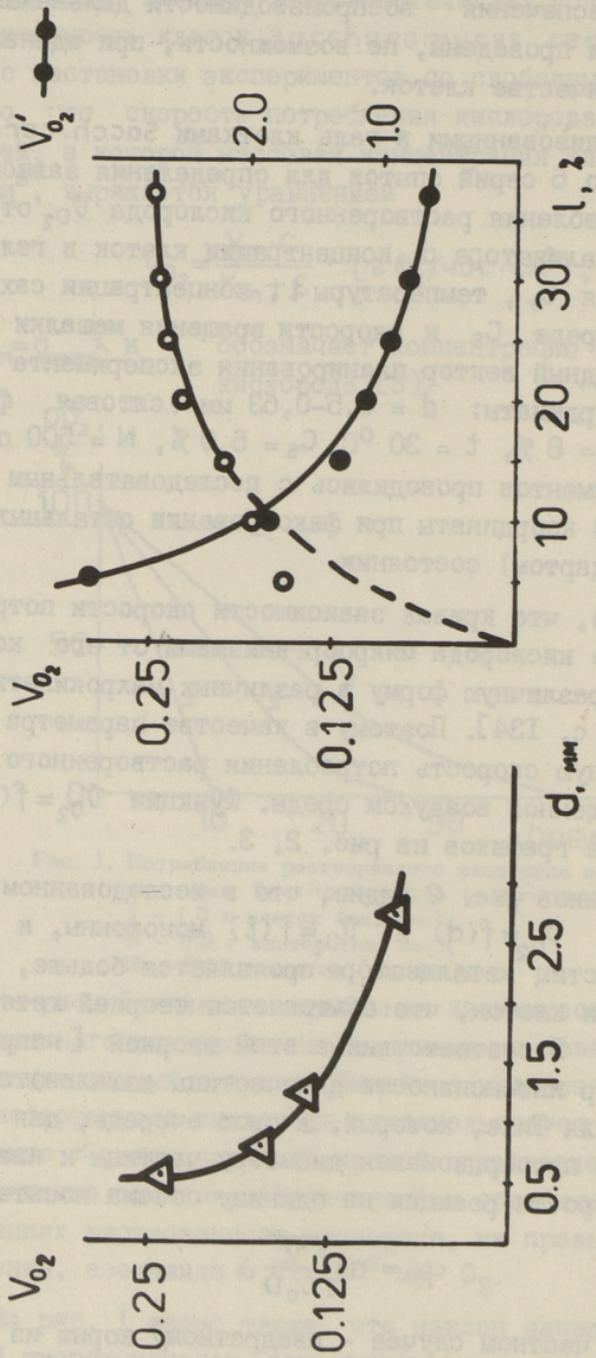


Рис. 2. Влияние диаметра частиц (а) и загрузки клеток (б) на скорость дыхания:  $[V_{O_2}] = \text{мг } O_2/\text{час}\cdot\text{г катализатора}$ ,  $[V'_{O_2}] = \text{мг } O_2/\text{час}\cdot\text{г клеток}$ .

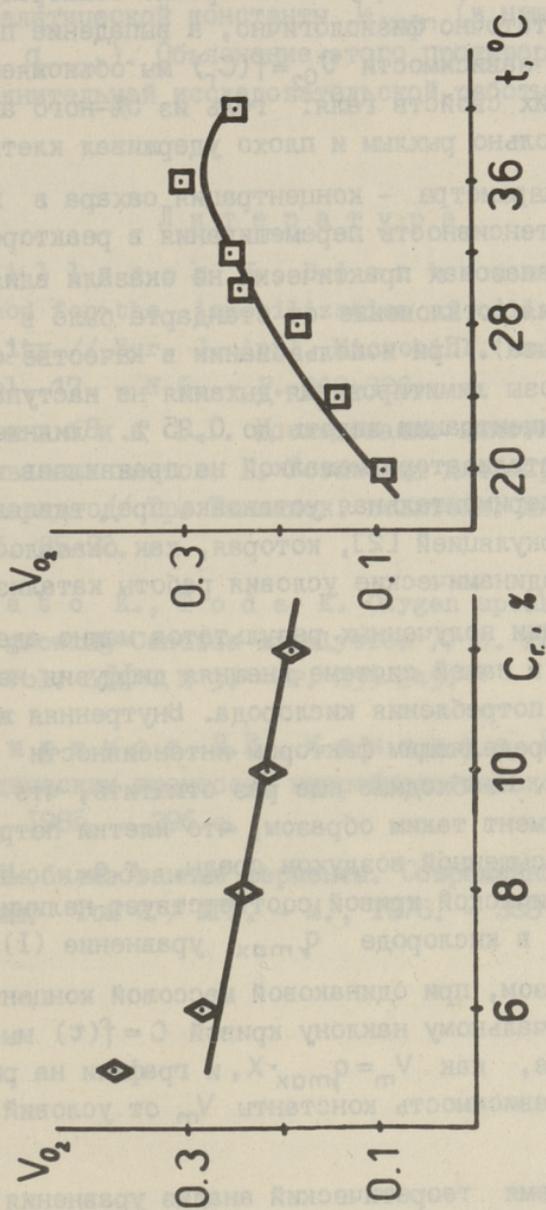


Рис. 3. Зависимости скорости дыхания от концентрации геля (а) и от температуры (б).  
 $[V_{O_2}] = \text{мг } O_2/\text{час} \cdot \text{г катализатора}$ .

Приведенные на рис. 3 результаты экспериментов с варьированием исходной концентрации альгината натрия  $C_r$  и температуры показывают, что температурная зависимость скорости дыхания имеет максимум в интервале температур 36 - 39 °С, что достаточно физиологично, а выпадение первой точки из линейной зависимости  $V_{O_2} = f(C_r)$  мы объясняем влиянием механических свойств геля: гель из 5%-ного альгината натрия был довольно рыхлым и плохо удерживал клетки.

Еще два параметра - концентрация сахара в питательной среде и интенсивность перемешивания в реакторе - в исследованных диапазонах практически не оказали влияния на скорость дыхания (отклонение от стандарта было в пределах погрешности опыта). При использовании в качестве субстрата раствора сахарозы лимитирования дыхания не наступает при снижении ее концентрации вплоть до 0,25 %. Влияние перемешивания слоя катализатора мешалкой не проявилось в связи с тем, что экспериментальная установка представляла собой систему с рециркуляцией [2], которая, как оказалось, и определяла гидродинамические условия работы катализатора.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в нашей системе внешняя диффузия не лимитировала процесс потребления кислорода. Внутренняя же диффузия явилась определяющим фактором интенсивности дыхания (см. рис. 2, 3). Необходимо еще раз отметить, что мы поставили эксперимент таким образом, что клетки потребляли кислород из насыщенной воздухом среды, т.е. начальный наклон параметрической кривой соответствует нелимитированной потребности в кислороде  $q_{max}$  уравнение (I).

Таким образом, при одинаковой массовой концентрации клеток  $X$  по начальному наклону кривой  $C = f(\tau)$  мы определяли не что иное, как  $V_m = q_{max} \cdot X$ , и графики на рис. 2, 3 характеризуют зависимость константы  $V_m$  от условий экспериментов.

В то же время теоретический анализ уравнения материального баланса

$$D \cdot \frac{d^2 C}{dx^2} = \frac{k'_{кам} [E]_m \cdot C}{K'_m + C}, \quad (3)$$

которое фактически отражает равенство диффузионного потока

через единицу поверхности, определяемого вторым законом Фика, и скорости ферментативной реакции, подчиняющейся уравнению Михаэлиса-Ментен, приводит [5, с. 38] к выводу, что внутренняя диффузия никак не сказывается на эффективной величине каталитической константы  $k'_{\text{кат}}$  (в нашем случае - константы  $q_{\text{max}}$ ). Объяснение этого противоречия возможно после дополнительной исследовательской работы.

## Л и т е р а т у р а

1. Nil l s s o n K., B i r n b a u m S. e. a. A general method for the immobilization of cells with preserved viability // Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol. - 1983. - Vol. 17. - N 6. - P. 319-326.
2. К а л б и н Г.Г. Исследование кинетики действия иммобилизованных клеток. I. Установка для определения потребления кислорода // Тр. Таллинск. политехн. ин-та, - 1986 - № 622. - С. 85-92.
3. S a t o K., T o d a K. Oxygen uptake rate of immobilized growing *Candida lipolytica* // J. Ferment. Technol. - 1983. - Vol. 61. - N 3. - P. 239-245.
4. Б и р ю к о в В.В., К а н т е р е И.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. - М.: Наука, 1985. - 296 с.
5. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы. Том 2 / МГУ. - М., 1976. - 358 с.

Investigation of Immobilized Cells Kinetics

## II Measurement and Calculation of Kinetic Parameters of Immobilized Yeast Cells

## Abstract

The apparent kinetic parameters of immobilized yeast cells depend on inter- and intraphase mass transfer resistance. The experimentally found kinetic parameters at variation of the biocatalyst bead diameters and of apparent quantity of modified Thiele modulus, which indicated the degree of intradiffusional limitation, were measured.

В. А. Кросинг

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ.

## III. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА КРАХМАЛА КАК СЫРЬЯ ДЛЯ СИНТЕЗА ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

Крахмал представляет собой полимер глюкозы, который имеет два типа связей,  $\alpha$  1-4 глюкозидные и  $\alpha$  1-6 глюкозидные. Первые образуют длинные цепи амилозы, вторые обуславливают разветвление, то есть, образование амилопектина. Картофельный крахмал содержит 23 % амилозы (средняя длина цепи - 3000 единиц) и 67 % амилопектина (содержит в среднем 3000 глюкозных единиц, средняя длина цепей - 24 единиц), молекулярный вес этих веществ равняется в среднем  $5 \times 10^5$ , [1, 2].

Цепи с  $\alpha$  1-4 глюкозидными связями являются субстратом циклодекстрин-глюкозил-трансферазы (ЦГТ) (E.C.2.4.1.19). Этот фермент катализирует 1,4- $\alpha$ -D-глюкопиранозилтрансферазную реакцию, при которой обрывок 1,4- $\alpha$ -D-глюкопиранозной цепи транспортируется через гидроксильную группу при C<sub>1</sub> к гидроксильной группе C<sub>4</sub> акцептора. Если акцептором является нередуцирующий конец того же обрывка, то образуется циклодекстрин (ЦД). Однако акцепторами бывают и внешние цепи амилопектина. Имеет место т.н. диспропорционирование, вследствие чего при высокой концентрации обе - укороченная цепь амилозы и амилопектин, имеющий удлиненные внешние цепи, ретроградируются и теряют растворимость [1].

Заметная ретроградация имеет место при концентрации крахмала выше 5 %. При концентрации выше 8 % ЦД можно получить практически лишь после уменьшения вязкости до 4000 сР (при 70 °C) [3]. При этом надо учитывать, что крахмал должен быть гидролизован минимально, так как короткие пептиды, олигосахариды и особенно моно- и дисаха-

риды подавляют скорость реакции. Кривая выхода пиклодекстринов от глубины гидролиза имеет максимум. Считается нецелесообразным гидролизовать крахмал до глубины не выше  $D.E. = 10$  [3].

Мацузава и др. [4] получили снижение вязкости 15%-ного крахмального клейстера до 500 сР (при 60 °С) при  $D.E. = 2$ . Они применяли ЦГТ из культуры селектированной им бактерии *Bacillus sp.* № 38-2.

Нами исследовалось снижение вязкости крахмальных клейстеров: бактериальный  $\alpha$ -амилазный и сырой ЦГТ из бактерий.

### Материалы и методы

В работе использовались:

- картофельный крахмал,
- амилосубтилин 10 х производства Микробиопрома,
- сырая ЦГТ в виде культуральной жидкости *Bac. manganans* или осажденная ацетоном.

Вязкость растворов,  $\eta$ , определяли при 70 °С вискозиметром Гепплера по времени падения шарика в исследуемом растворе.

Декстрозный эквивалент,  $D.E.$ , определяли как процент содержания редуцирующих сахаров, перечисленных на глюкозу, от исходного содержания крахмала. Редуцирующие сахара определяли методом Тегге и Нирлэ [5] по восстановлению меди.

Активность  $\alpha$ -амилазы определяли методом Бернфельда [6], по скорости образования редуцирующих сахаров в 1%-ном растворе крахмала при рН 6,9 и температуре 25 °С.

Активность ЦГТ определяли по скорости образования  $\beta$ -ЦД в 1%-ном растворе растворимого крахмала при рН 6,7 и температуре 45 °С [7].

### Результаты

Для выяснения зависимости вязкости от концентрации картофельного крахмала изготовили ряд клейстеров и определили их вязкость при температуре 70 °С. Как видно из рис. 1, вязкость резко повышается при увеличении содержания крахмала в клейстере.

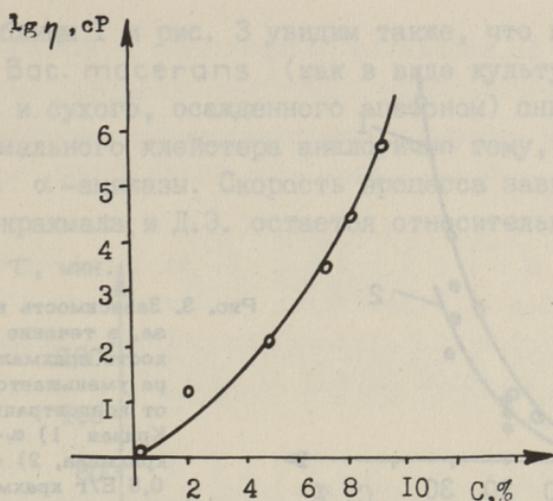


Рис. 1. Зависимость вязкости раствора картофельного крахмала от его концентрации при температуре 70 °С.

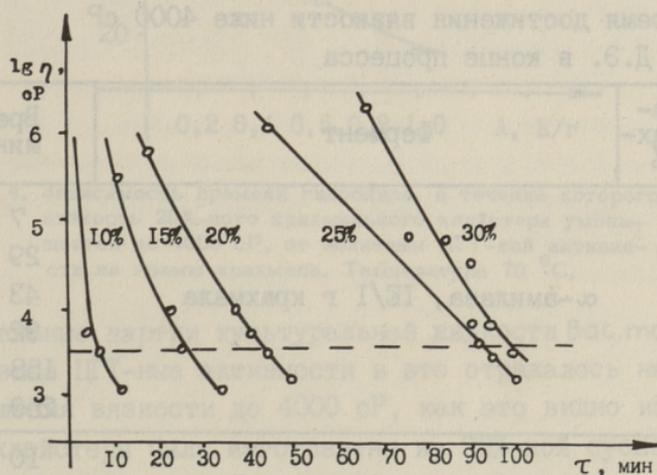


Рис. 2. Зависимость вязкости крахмальных растворов от времени ферментативного гидролиза, при температуре 70 °С. Фермент-бактериальная α-амилаза, 1Е на 1г крахмала. --- η = 4000 сР.

Для исследования понижения вязкости клейстера при помощи бактериальной α-амилазы изготовили при 70 °С клейстеры крахмала в 10 мм растворе хлористого кальция с содержанием α-амилазы 1 Е на 1 г крахмала. Клейстеры выдерживали в цилиндрических сосудах с водяной рубашкой при 70 °С и по падающему шарик определяли приблизительные вязкости, пока вязкость не снижалась до 4000 сР. Результаты приведены на рис. 2.

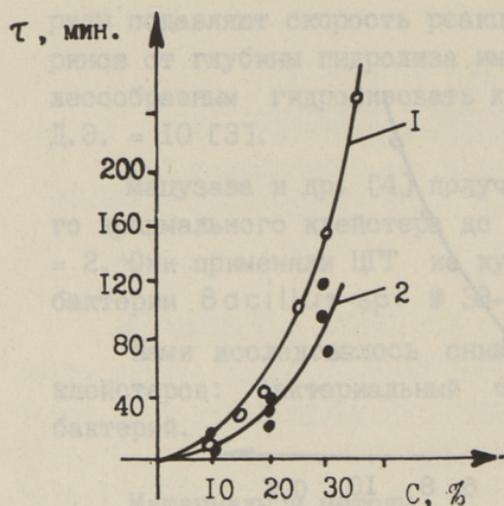


Рис. 3. Зависимость времени гидролиза, в течение которого вязкость крахмального клейстера уменьшается до 4000 сР, от концентрации субстрата. Кривая 1)  $\alpha$ -амилаза, 1Е/г крахмала, 2) сырая ЦГТ, 0,5 Е/г крахмала. Температура 70 °С.

Т а б л и ц а I

Время достижения вязкости ниже 4000 сР  
и Д.Э. в конце процесса

Содержание крахмала, %	Фермент	Время мин	Д.Э.
10	$\alpha$ -амилаза, 1Е/1 г крахмала	7	1,5
15		29	3,3
20		43	2,1
25		92	2,3
30		158	9,2
35		250	8,0
10	сырая ЦГТ, 05Е/1 г крахмала культуральная жидкость	10	1,8
20		32	2,6
30		105	2,6
30		100	3,9
20	сырая ЦГТ, 05Е/1 г крахмала осажденная ацетоном	41	4,2
20		40	4,6
30		97	7,9

Как видно,  $\alpha$ -амилаза при 70 °С быстро снижает вязкость крахмального клейстера.

Время достижения вязкости ниже 4000 сР зависит от концентрации клейстера. Это представлено и на рис. 3.

Из таблицы I и рис. 3 увидим также, что при помощи сырой ЦТ *Vas. masegans* (как в виде культуральной жидкости, так и сухого, осажденного ацетоном) снижается вязкость крахмального клейстера аналогично тому, как это идет при помощи  $\alpha$ -амилазы. Скорость процесса зависит от концентрации крахмала, и Д.Э. остается относительно низким.

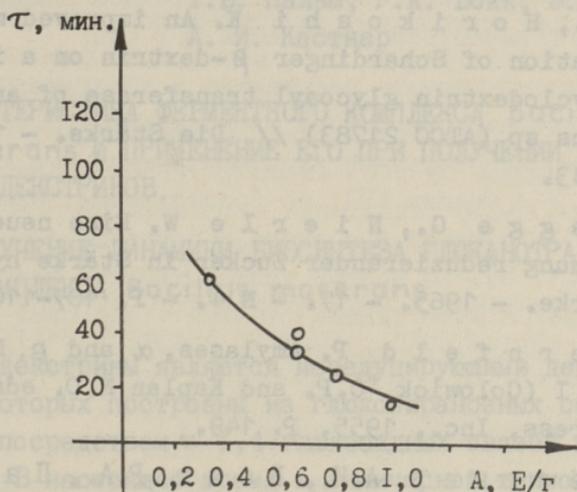


Рис. 4. Зависимость времени гидролиза, в течение которого вязкость 20%-ного крахмального клейстера уменьшается до 4000 сР, от величины ЦТ-ной активности на грамм крахмала. Температура 70 °С.

Отдельные партии культуральной жидкости *Vas. masegans* имели разные ЦТ-ные активности и это отражалось на времени уменьшения вязкости до 4000 сР, как это видно из рис. 4, где все клейстеры были изготовлены из 20%-ной суспензии крахмала в культуральной жидкости, но активности культуральных жидкостей были разные.

В итоге можно сказать, что как амилосубтилин IOx, так и сырая ЦТ *Vas. masegans* эффективно снижают вязкость IO - 30%-ного крахмального клейстера.

### Л и т е р а т у р а

1. B e n d e r H. Enzymology of cyclodextrins // Proceedings of the First International Symposium on Cyclodextrins. - Budapest, 1981. - P. 77-87.
2. M u s i l J., N o v a k o v u O., K u n z K.

Biochemistry in schematic perspective. - Prague: Avicenum, 1977. - 182 p.

3. S z e j t l J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. - Budapest: Akadémiái Kiádo, 1982. - 296 p.

4. M a t z u z a w a M., K a w a n o M., N a k a m u r a N., H o r i k o s h i K. An improved method for the preparation of Schardinger  $\beta$ -dextrin on a industrial scale by cyclodextrin glycosyl transferase of an alkalophilic Bacillus sp (ATCC 21783) // Die Stärke. - 1975. - N 12. - P. 410-413.

5. T e g g e G., N i e r l e W. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker in Stärke hydrolysaten // Die Stärke. - 1965. - 17. - N 4. - P. 107-110.

6. B e r n f e l d P. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ , Methods in Enzymology I (Colowick C.P. and Kaplan N.O. eds) New York: Academic Press, Inc., 1955, P. 149.

7. К ё с т н е р А.И., В о к к Р.А., П а п п е л ь К.Э., П е й п м а н Э.М. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикл. биохим. и микробиол., 1987 (в печати).

V. Krosing

Characterization and Application of Enzyme  
Complex for Obtaining Cyclodextrins

III Liquefaction of Starch as Raw Material for  
Cyclodextrin Synthesis

Abstract

The 10 - 30 % potato starch suspensions were liquified at 70 °C (up to viscosity below 4000 cP) by the crude enzyme of Bac. macerans and bacterial  $\alpha$ -amylase, amylosubtiline 10x, without deep saccharification (average D.E. < 5).

Т.Б. Пальм, Р.А. Вокк, Э.М. Пейпман  
А. И. Кестнер

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА *Bacillus macerans* И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ.

### I. ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОСИНТЕЗА ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗНОГО КОМПЛЕКСА *Bacillus macerans*

Циклодекстрины являются нередуцирующими декстринами, молекулы которых построены из глюкопиранозных остатков, образующих посредством  $\alpha$ -1,4-глюкозидных связей циклическую структуру. В настоящее время в химической технологии занимаются тремя различными видами циклодекстринов —  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринами, состоящими соответственно из 6, 7 или 8 глюкопиранозных остатков. В центре молекулы циклодекстринов находится гидрофобное пространство глубиной 0,7 нм и шириной в зависимости от количества составляющих молекулу глюкопиранозных остатков 0,57, 0,78 или 0,95 нм. Поэтому в полярной среде (в частности, в водном растворе) циклодекстрины могут успешно комплексоваться с молекулами с относительно малой полярностью и имеющими подходящие размеры [1]. Так как подобное комплексообразование в первую очередь стабилизирует многие соединения вследствие их инкапсулирования во внутреннюю полость циклодекстринов, эти соединения и представляют немалый интерес для химической технологии [1, 2]. В нашей стране производство циклодекстринов пока не налажено.

Циклодекстрины являются природными соединениями, образующимися в результате жизнедеятельности некоторых микроорганизмов из крахмала. Так, многие микроорганизмы, принадлежащие к *gen. Bacillus*, а также к другим таксонам, при росте на среде, богатой крахмалом, продуцируют энзим-циклодекстринглюканотрансферазу (ЦГТ) (КФ.2.4.1.19),

катализирующий синтез циклодекстринов из амилопектина [2]. Энзимный катализ является и в настоящее время самым выгодным путем технологического получения циклодекстринов. По этой причине качество энзимного препарата ЦТТ остается определяющим в успехе производства этих соединений. Но так как выработка ЦТТ происходит путем микробиологического синтеза, то успех производства циклодекстринов определяется в конечном итоге качеством продуцента ЦТТ [3].

Когда исследователи, работающие в лабораториях 40-50 лет назад, использовали штаммы - продуценты ЦТТ, требующие для достижения максимальной активности энзима в культуральной жидкости 2-3 недели [2], то "современным технологическим штаммам" требуется для этого в периодическом процессе 10-96 часов [4, 5]. Но подбор технологически пригодных продуцентов является кропотливой работой - японским исследователям потребовалось для подбора двух штаммов, пригодных для технологии как продуцентов ЦТТ, изолировать и исследовать 300 штаммов алкалофильных бактерий [6].

Практически все "современные промышленные продуценты" ЦТТ принадлежат к *gen. Bacillus* (*B. macerans*, реже *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium* и др.). В качестве энзимного препарата для производства циклодекстринов используют культуральную жидкость или осажденную из нее белковую фракцию с ЦТТ-активностью [2, 3, 4, 5]. Для характеристики продуктивности продуцентов ЦТТ приводятся данные о том, что в промышленности достаточно продукции ферментера емкостью 1000 л для получения до 7 тонн циклодекстринов [2]. Продуценты ЦТТ культивируют в периодическом процессе, в своем большинстве они являются алкалофилами, имеющими интервал температуры для выращивания 30-48 °C, чаще 37-40 °C. Хотя представители указанных видов *gen. Bacillus* являются в основном факультативными анаэробами, ускорение роста культур - продуцентов ЦТТ - обычно наблюдается в аэробных условиях [2, 4, 5, 6].

Лабораторные продуценты ЦТТ выращивали до применения в промышленности на кусочках картофеля, жидкая же среда состояла из кусочков картофеля в воде с добавкой  $\text{CaCO}_3$  для поддержания pH в щелочной или нейтральной области [2]. Используемые в настоящее время штаммы - продуценты ЦТТ - для промышленной технологии выращивают на питательных средах,

содержащих в качестве источника углерода растворимый крахмал (1,2-2,0 %), вытяжку из зерен (около 5 %), в качестве источников азота и фосфора - экстракт дрожевой, соли аммония и фосфорной кислоты, а также микроэлементы [3, 4, 5]. В технологических целях дополнительные ростовые факторы не применяются. Крахмалу, содержащемуся в среде, и циклодекстринам, синтезируемым в процессе культивирования микроорганизмов, отводится роль индукторов синтеза ЦГТ [7].

В литературе отмечается, что продукция ЦГТ возникает пропорционально росту культуры [5], но высказывается мнение и о том, что биосинтез происходит более усиленно в условиях истощения источника углерода [8].

Хотя составы питательных сред и физико-химические параметры культивирования штаммов - продуцентов ЦГТ, используемых в технологии, отличаются мало, именно эти небольшие отличия являются специфичными для каждого отдельного штамма и могут сильно влиять на продукцию ЦГТ. Поэтому необходимо для получения максимальной продукции ЦГТ тщательно оптимизировать условия культивирования штамма-продуцента.

Целью настоящей работы было изучение динамики биосинтеза гликозилтрансферазного комплекса при различных условиях культивирования *Bacillus macerans*.

### Материалы и методы

В работе использовали культуру *B. macerans* штамм ВКМВ-506. Культуру выращивали в питательной среде, содержащей 15 % мелко нарезанного (для опытов в колбах) или натертого картофеля в водопроводной воде. Питательные среды стерилизовали в автоклаве при 1 атм в течение 1 часа. Для выращивания микроорганизмов в колбах использовали питательные среды, в которые перед стерилизацией было добавлено 1,5 % мела для поддержания pH.

Для засева использовали 2-4-дневную культуру *Bacillus macerans*, выращенную на той же среде (10 мл инокулята на 100 мл питательной среды).

Опытную культуру выращивали в колбах емкостью 200 мл (100 мл питательной среды) и ферментере емкостью 5 л (ра-

бочий объем 4 л) "Биостат Е" (производство ФРГ) без аэрации. При выращивании культуры в ферментере поддерживали pH с помощью растворов едкого натра и соляной кислоты 6,5-6,7, скорость перемешивания культуры 190 об/мин. Температура выращивания культуры 37 и 45 °С, время выращивания 150-240 часов. Пробы извлекали в стерильных условиях через определенный интервал времени и непосредственно подвергали анализу.

Для определения содержания циклодекстринов использовали метод с фенолфталейном [9], активность фермента ЦТ определяли по упрощенному методу [10].

### Результаты и обсуждение

Результаты опытов по изучению динамики биосинтеза циклодекстрингликозилтрансферазного комплекса представлены на рисунках 1 и 2.

Можно отметить, что активность фермента в культуральной жидкости выше у культуры, выращенной при 37 °С, причем максимальная активность фермента проявляется на 6-8 день культивирования. Как видно по рис. 1, активность фермента у культуры, выращенной при 45°, достигает максимума несколько раньше, что, по-видимому, связано с влиянием повышенной температуры на скорость роста культуры, причем после достижения максимума активность фермента в культуральной жидкости быстро падает. Вероятно, это связано с инактивацией фермента при 45 °С.

Содержание циклодекстринов в культуральной жидкости резко возрастает за первые 24-72 часа культивирования бактерий. В этот период роста культуры не обнаруживается значительной активности фермента. Затем содержание циклодекстринов резко падает, что совпадает по времени с повышением активности фермента в культуральной жидкости. Содержание циклодекстринов оставалось на уровне 0,2-0,35 мкэкв/мл до конца наблюдения.

Как показано на рис. 2, активность ЦТ в опыте, проведенном в ферментере, несколько ниже по сравнению с результатами, полученными в опытах в колбах (соответственно 0,12 мкэкв·мл/мин и 0,17 мкэкв·мл/мин при 37 °С или 0,145 мкэкв·мл/мин при 45 °С).

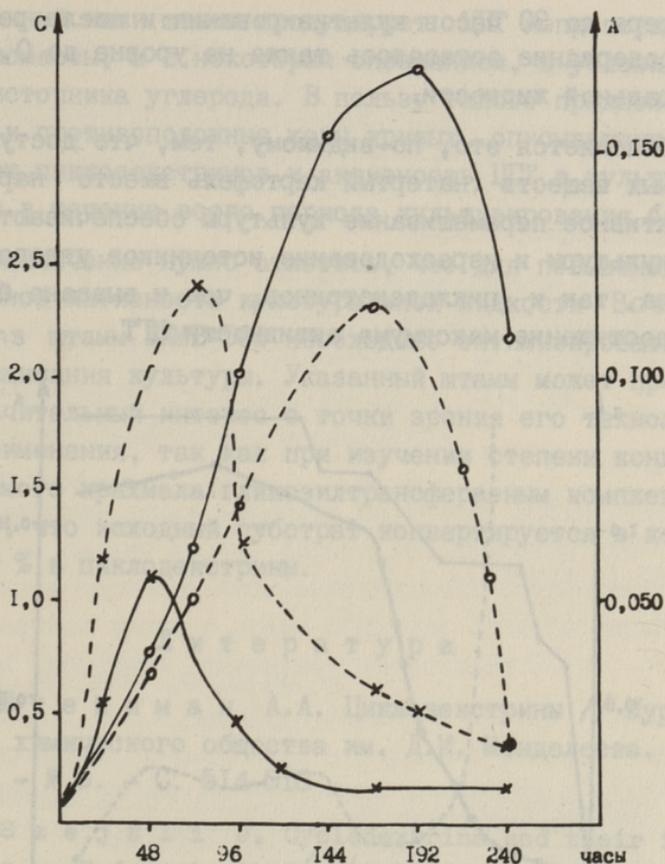


Рис. 1. Динамика содержания циклодекстринов и проявления активности ЦГТ в культуральной жидкости в ходе культивирования *B. pasteurii* штамм ВКМВ-506 в колбах при различных температурах:

x—x - содержание циклодекстринов в мкгв·мл, темп. 37 °С,

x—x - содержание циклодекстринов в мкгв·мл, темп. 45 °С,

o—o - активность ЦГТ в мкгв·мл/мин, темп. 37 °С,

o—o - активность ЦГТ в мкгв·мл/мин, темп. 45 °С.

Более низкое значение активности ЦГТ, полученной на ферментационной установке, компенсируется лучшей стабильностью энзимного препарата и главным образом более быстрым достижением области максимальной активности ЦГТ в культуральной жидкости - за 85 часов культивирования.

Некоторые различия наблюдались и в содержании циклодекстринов в ходе культивирования бацилл в колбах и ферментере. Высокое содержание циклодекстринов наблюдалось в

ферментере до 30 часов культивирования и после резкого спада их содержание оставалось также на уровне до 0,3 мкэкв·мл культуральной жидкости.

Объясняется это, по-видимому, тем, что доступность питательных веществ (натертый картофель вместо нарезанного) плюс активное перемешивание культуры обеспечивают ускорение роста культуры и израсходование источников углерода — как крахмала, так и циклодекстринов, чем и вызвано более быстрое достижение максимума активности ЦТ.

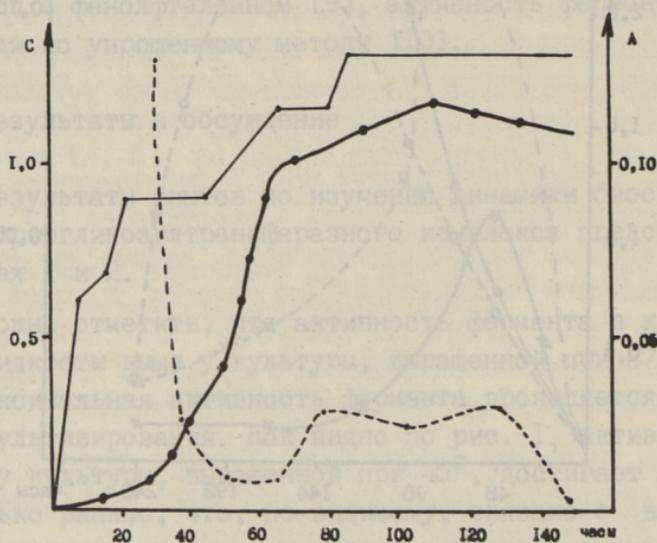


Рис. 2. Динамика содержания циклодекстринов и проявления активности ЦТ в культуральной жидкости, расход "титранта" в ходе культивирования *B. macerans* штамм ВКМВ-506 в ферментере при 37 °С:

- - содержание циклодекстринов в мкэкв·мл,
- - активность ЦТ в мкэкв·мл/мин,
- - динамика расхода титранта /NaOH/.

На рис. 2 приведена также кривая расхода титранта — раствора едкого натра, описывающая по существу продукцию кислоты культурой *B. macerans*. По рис. 2 видно, что в течение опыта за 150 часов мы наблюдали три "периода титрования", механизм подобного периодического потребления титранта остается пока неясным.

Если предположить, что продукция ЦТ культурой *B. macerans* кислоты связана с потреблением источника углерода и ростом самой культуры, то нужно отметить, что ис-

пользованный нами штамм продуцирует ЦТ непропорционально росту биомассы, а с некоторым опозданием, в условиях дефицита источника углерода. В пользу такого предположения говорят и противоположные ходы кривых, описывающих концентрацию циклодекстринов и активность ЦТ в культуральной жидкости в течение всего периода культивирования бактерий.

В заключение нужно отметить, что для повышения ферментативной активности культуральной жидкости *Bacillus macerans* штамм ВКМВ-506 необходимо оптимизировать условия выращивания культуры. Указанный штамм может представлять значительный интерес с точки зрения его технологического применения, так как при изучении степени конверсии растворимого крахмала гликозилтрансферазным комплексом выяснилось, что исходный субстрат конвертируется в количестве 70-80 % в циклодекстрины.

#### Л и т е р а т у р а

1. Ш т е й н м а н А.А. Циклодекстрины // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. - 1985. - Т. 30. - № 5. - С. 514-518
2. S z e j t l i J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. - Budapest: Akadémiai Kiadó, 1982. - P. 296.
3. H o r i k o s h i K. Production on industrial application of  $\beta$ -cyclodextrins // Process Biochemistry. - 1979. - Vol. 5. - P. 26-30.
4. H o r i k o s h i K., A n d o T., Y o s h i d a K., N a k a m u r a W. Production of cyclodextrin. UK Patent No. 1459654, 1974.
5. H o k s e H., K a p e r F., W i j n k e m a J.T. Process for the manufacture of cyclodextrin. - US Patent No. 4477568, 1984.
6. N o m o t o M., S h e w D.C., C h e n I.J., Y e n T.M., L i a o C.W., Y a n g C.P. Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic bacteria of Taiwan // Agr. Biol. Chem. - 1984. - Vol. 48. - N 5. - P. 1337-1338.
7. B e n d e r H. Cyclodextrin-glucanotransferase von *Klebsiella pneumonia*. 1. Synthese, Reinigung und Eigen-

schaften des Enzym von K.pneumonia M 5 al. // Arch. Mikrobiol. - 1977. - Vol. 3. - P. 271-282.

8. P i r t S.J., L a n e A.G., B o n d R.P. Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrin-Glykosyltransferase // Offenlegungsschrift 2361878. Den Haag/Niederland.

9. V i k m o n M. Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of cyclodextrins // 1. Int. Symp. on Cyclodextrins. - Budapest, 1981. - P. 69-74.

10. К ё с т н е р А.И., В о к к Р.А., П а п п е л ь К.Э., П е й п м а н Э.М. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикл. биохимия и микробиология. 1987 (в печати).

T. Palm, R. Vokk, E. Peipman,  
A. Köstner

Characterization and Application of Enzyme  
Complex for Obtaining Cyclodextrins

I Study of the Biosynthesis of Cyclodextringlucano-  
transferase Complex by Bacillus macerans

Abstract

The article presents the results of a study of the biosynthesis of cyclodextringlucanotransferase (CGT) complex by Bacillus macerans BKMB-506 cultivated in different conditions.

It appears that the optimum temperature for biosynthesis CGT is 37 °C. The maximum activity of enzyme is obtained by cultivating the microorganisms in anaerobical conditions with stirring for 85 hours. For obtaining the maximum activity of CGT without stirring another 44 hours was needed, but the maximum activity of CGT is higher.

The role of carbon source in biosynthesis of CGT is discussed.

УДК 547.962.3:536.628.3

М.К. Фриеденталь, А.В. Игнат,  
А.В. КропачевКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАТИВНОСТИ  
ПРЕПАРАТА СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА

В настоящее время вещества белкового происхождения, в частности из плазмы крови, широко используются для изучения механизма переноса низкомолекулярных соединений в комплексе с белками крови с целью создания средств терапии при отравлении организма ядовитыми веществами [1].

Известно, что в процессе переноса кровью большинство низкомолекулярных соединений, обладающих физиологической активностью, вступает во временные комплексы с белками плазмы. Наиболее универсальными комплексообразующими свойствами отличается сывороточный альбумин, молекулы которого способны обратимо фиксировать вещества самого различного химического строения.

Обратимая фиксация лиганда осуществляется особыми участками молекулы белка – связывающими центрами – и требует во многих случаях полного соответствия третичной структуры белка для распознавания чужеродных соединений белком и адаптации к взаимодействию с ними. Поэтому, можно предположить, что выявление роли конформационных явлений молекулы альбумина при создании эффективных связей между белком и ядом составляет особый аспект проблемы.

В связи с этим, на наш взгляд, большой интерес представляет поиск наиболее эффективного метода характеристики препаратов сывороточного альбумина по нативности. Ранее нами [2] нативность альбумина исследовалась по методу жидкостной хроматографии. При этом было показано, что нативность имеющихся препаратов может изменяться в широких пределах, хотя это никак не отражается в технических условиях на препараты при выпуске их из производства.

В данной работе нативность белка изучалась методом дифференциальной сканирующей калориметрии, позволяющей определить теплоту денатурации, температурный интервал, температуру денатурации и характеризовать препараты по их нативности.

### Материалы и методы

В качестве белкового препарата использовали альбумин из сыворотки человеческой крови, полученный по методу Кону и представленный станцией переливания крови при Минздраве ЭССР. Альбумин растворяли в 0,05 М Трис-НСI буфере с pH 8,05. Концентрация альбумина в растворе составляла 5 %.

Проба раствора в количестве 30 мкл, отмеренная микрошприцем, помещалась в покрытую лаком алюминиевую капсулу. Капсула герметично закрывалась.

Тепловую денатурацию раствора белка и калориметрические измерения проводили на термическом анализаторе фирмы Du Pont (США), модель I090. Раствор белка в капсуле нагревали до заданной температуры денатурации и выдерживали требуемое время (от 2 до 60 мин). Далее пробу охлаждали до 20 °С. Время охлаждения составляло не более 5 мин. Затем проводили сканирование по температуре со скоростью 10 град/мин. Температура программировалась в интервале температур 35–90 °С. В сравнительной калориметрической ампуле находилась 30 мкл буферного раствора, не содержащего белка.

Высокая воспроизводимость базовой линии при работе с концентрированными растворами белка (из-за малого объема раствора) позволяет на данном калориметре зарегистрировать изменение теплоемкости при переходе белка из нативного состояния в денатурированное. На термограмме фиксировали  $t_n$  - температуру начала теплопоглощения,  $t_{мин}$  - температуру максимума теплопоглощения и  $\Delta H$  - величину изменения энтальпии. Все параметры термограммы вычислялись автоматически на ЭВМ. Каждый опыт повторялся 3–5 раз. Результаты экспериментов обрабатывались по методам математической статистики.

### Результаты исследований

Общий вид термограммы тепловой денатурации раствора альбумина показан на рис. 1. Тепловой эффект денатурации

концентрированных растворов глобулярных белков, регистрируемый калориметром, является суммой двух величин: эндотермического эффекта разрушения внутримолекулярных связей нативного состояния при денатурации и экзотермического эффекта образования новых беспорядочных связей между молекулами при агрегации.

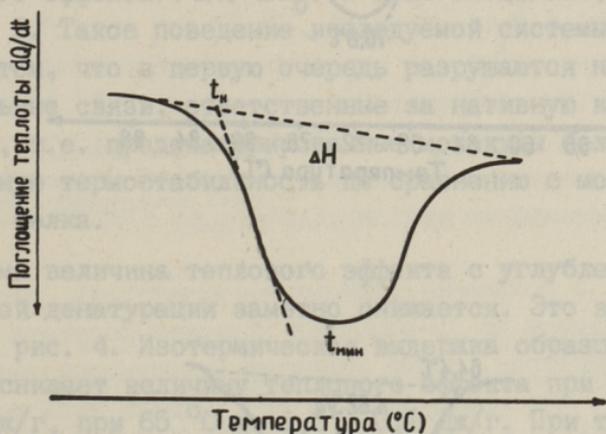


Рис. 1. Термограмма тепловой денатурации раствора сывороточного альбумина в 0,05 М Трис-НС1 буфере с рН = 8,05.

Наличие агрегации сильно усложняет калориметрическое исследование. Процесс агрегации, в явном виде проявляющийся после денатурации, начинается одновременно с ней, что и приводит к понижению суммарного теплового эффекта  $\Delta H$ . Влияние агрегации тем сильнее, чем ниже скорость нагревания. По данным [3] для исключения агрегации из суммарного теплового эффекта необходимо провести калориметрический эксперимент быстро, со скоростью сканирования 10 град/мин. Исходя из этого, мы предполагали, что в выбранных условиях одной серии экспериментов величина  $\Delta H$  прямо пропорциональна количеству связей, определяющих нативное состояние белка.

На рис. 2 показано, что интенсивное поглощение тепла, связанное с денатурацией сывороточного альбумина, происходит в области температур 60–75 °С. Воспроизводимость измерения величин теплового эффекта при сканировании раствора сывороточного альбумина составляла

$$\Delta H_0 = 9,0 \pm 0,6 \text{ Дж/г.}$$

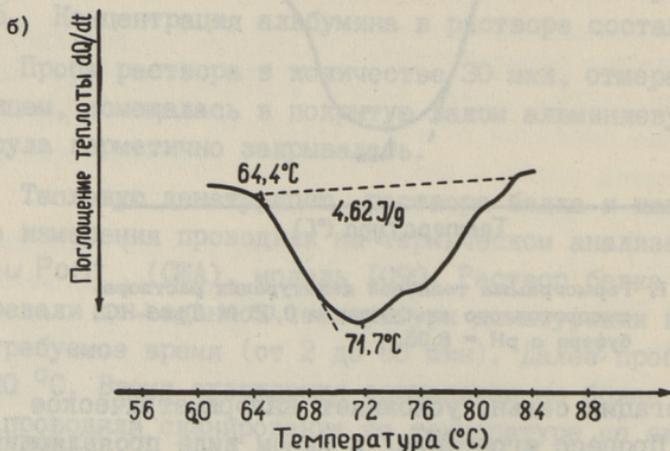
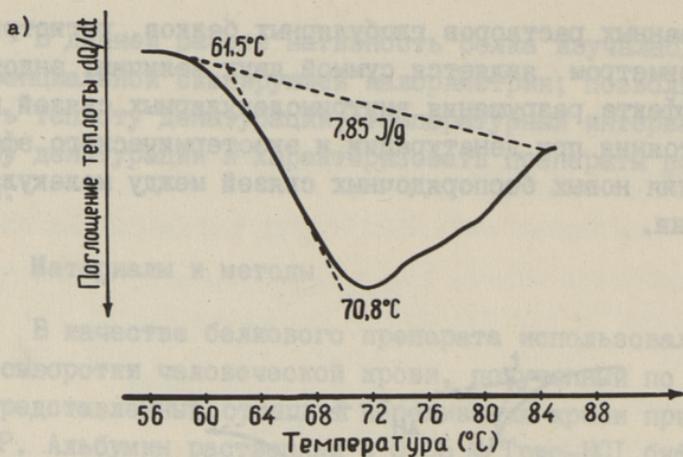


Рис. 2. Термограмма сывороточного альбумина:

- а) изотермическая выдержка в течение 2 мин при 60 °C,  
 б) изотермическая выдержка в течение 30 мин при 60 °C.

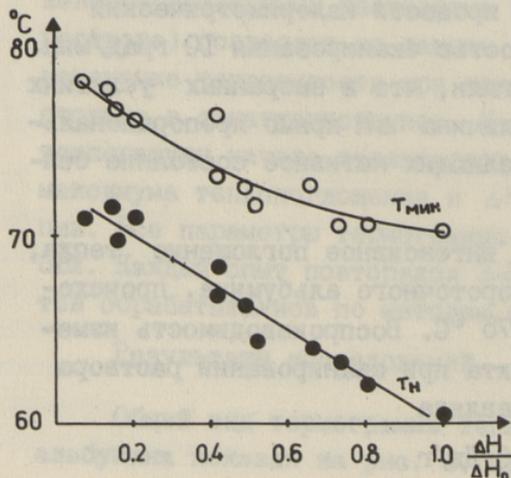


Рис. 3.

Зависимость температуры начала теплопоглощения ( $T_{\text{н}}$ ) и температуры максимума теплопоглощения ( $T_{\text{мин}}$ ) от доли нативности белка в растворе.

По мере снижения нативности белка, за счет увеличения температуры и времени изотермической выдержки раствора перед сканированием, весь тепловой эффект смещается в сторону более высоких температур. Это выражается в увеличении  $t_H$  и  $t_{мин} = t_{ген}$  с ростом степени термообработки. При этом наблюдается неплохая корреляция между относительной величиной теплового эффекта ( $\Delta H / \Delta H_0$ ) и этим смещением, что показано на рис. 3. Такое поведение исследуемой системы можно объяснить тем, что в первую очередь разрушаются наиболее термолабильные связи, ответственные за нативную конформацию молекул, т.е. проденатурированные молекулы белка проявляют повышенную термостабильность по сравнению с молекулами нативного белка.

Сама величина теплового эффекта с углублением предварительной денатурации заметно снижается. Это явление отражено на рис. 4. Изотермическая выдержка образца в течение 60 мин снижает величину теплового эффекта при 55 °С до  $6,2 \pm 0,4$  Дж/г, при 65 °С до  $1,3 \pm 0,1$  Дж/г. При температуре 75 °С изотермическая выдержка в течение 10 мин приводила к полному исчезновению теплового эффекта.

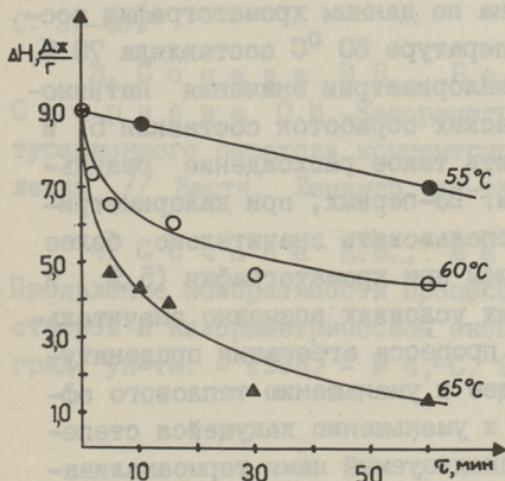


Рис. 4. Зависимость теплового эффекта от температуры и продолжительности тепловой денатурации.

Если принимать допущение о прямой связи теплового эффекта с числом нативных молекул белка в растворе, то нативность препарата в процентах можно определять как

$$N = \frac{\Delta H}{\Delta H_0} \times 100, \%$$

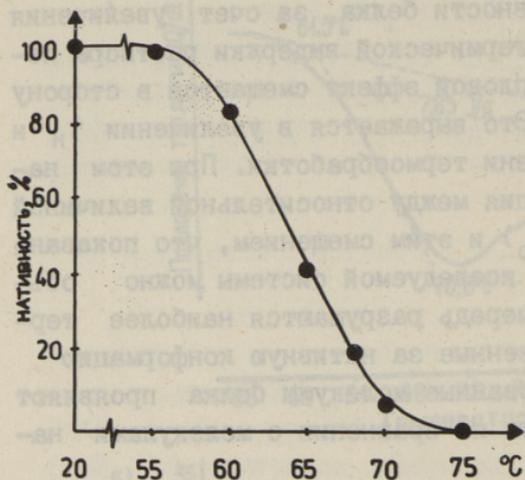


Рис. 5.

Нативность альбумина в зависимости от температуры тепловой денатурации в течение 10 мин.

На рис. 5 показана зависимость нативности, рассчитанной таким образом от 10-минутной выдержки раствора при различных температурах. Общий характер зависимости имеет ту же тенденцию, что наблюдалась в [2]. Однако числовые значения нативности, рассчитанные по данным хроматографии, отличаются от значений, полученных по данным калориметрии.

Так, нативность альбумина по данным хроматографии после 30 мин обработки при температуре 60 °C составляла 70 %, при 65 °C — 45 %. По данным калориметрии значения нативности после таких же изотермических обработок составили 51 и 16 %, соответственно. Объяснить такое расхождение результатов можно следующим образом. Во-первых, при калориметрических измерениях пришлось использовать значительно более концентрированные растворы, чем при хроматографии (5 % и 0,1 %, соответственно). В этих условиях возможно значительное увеличение интенсивности процесса агрегации проденатурированных молекул, приводящее к уменьшению теплового эффекта  $\Delta H$ , следовательно, и к уменьшению кажущейся степени нативности. К сожалению, используемый нами термоанализатор не позволяет работать с большими объемами проб, что могло бы позволить регистрировать термограммы растворов такой же концентрации, как и в хроматографических исследованиях. Во-вторых, не исключено, что одним источником ошибок может быть неправильный выбор базовой линии при калориметрии, что, как известно [4], является одной из основных проблем метода.

На основании полученных результатов можно заключить, что при тепловой необратимой денатурации сывороточного альбумина в области температур 60–75 °С наблюдается интенсивное поглощение тепла. Эндотермический максимум имеет тенденцию смещаться в сторону более высоких температур и увеличивается по мере возрастания степени денатурации. Полное исчезновение теплового эффекта наблюдалось после 10 мин обработки раствора при 75 °С. Относительная величина  $\Delta H$  может быть использована в качестве характеристики нативности препарата. Однако для получения характеристик, сравнимых с результатами хроматографических испытаний, необходимо использовать либо более чувствительный калориметр, либо калориметр с большими по объему рабочими ампулами.

### Л и т е р а т у р а

1. Л у й к А.И., Л у к я н ч у к В.Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. – М.: Медицина, 1984. – 221 с.
2. Ф р и е д е н т а л ь М., И г н а т А. Хроматографическое изучение процесса денатурации сывороточного альбумина // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. – 1986. – № 622. – С. 37–46.
3. С о ч а в а И.В., Б е л о п о л ь с к а я Т.В., С м и р н о в а О.И. Калориметрическое исследование денатурационного перехода концентрированных растворов рибонуклеазы // Вестн. Ленингр. ун-та. – 1984. – № 22. – С. 17–26.
4. С о ч а в а И.В., Б е л о п о л ь с к а я Т.В. Проявление необратимости процесса денатурации белковых растворов в калориметрическом эксперименте // Вестн. Ленинград. ун-та. – 1984. – № 4. – С. 99–103.

M. Friedenthal, A. Ignat,  
A. Kropachov

Investigation of Serum Albumin  
Nativity by Calorimetry

Abstract

The proteins nativity was investigated by differential scanning calorimetry (DSC). 5 % solution of blood serum albumin in 0,05 M Tris-HCl buffer with pH 8.05 (one sample - 30  $\mu$ l) and Du Pont DSC equipment was used. The scanning speed was 10 deg/min at the temperature interval 35-90 °C.

The heat absorption has been found to take place at the temperature interval 60-75 °C and to disappear after 10 min thermal treatment at 75 °C. The possibility to value the nativity of proteins on the basis of calorimetric data was suggested.

ПЕНООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ БЕЛКОВ ПОДСЫРНОЙ  
СЫВОРОТКИ

## Введение

С развитием мембранной технологии стало возможным разделение компонентов молочной сыворотки в белковую и низкомолекулярную фракции. Обе фракции являются ценными с точки зрения их функциональности и широкого круга применения [1-3]. На современных предприятиях переработки молочной сыворотки сыворотку сгущают методом обратного осмоса до содержания сухих веществ около 20 %, белковую и лактозную фракции разделяют методом ультрафильтрации. Лактозную фракцию направляют на дальнейшее производство молочного сахара-рафинада или с помощью иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы расщепляют на глюкозу и галактозу. Полученный гидролизат либо служит питательной средой при производстве пекарских и кормовых дрожжей, либо используется для производства заменителя сахара - глюкозо-галактозного сиропа. Белковую фракцию высушивают. Сухой продукт, содержащий в среднем 35-65 % белка, может найти самое разнообразное применение в пищевой промышленности.

Многими авторами [4-8] показана перспективность применения белков подсырной сыворотки в качестве пенообразователей в пищевых композициях.

Белки, являясь поверхностно-активными веществами, способны создавать адсорбционный слой на межфазной поверхности: воздух-жидкость. На поверхности раздела полипептидная цепь белковой молекулы располагается горизонтально, а боковые цепи, являющиеся остатками сложных аминокислот, и обуславливающие поверхностную активность белковых молекул, ориентируются по общеизвестному принципу: гидрофобные

группы к воздуху, а гидрофильные участки погружены в водную фазу. Вследствие этого при интенсивном перемешивании белковых растворов образуется пена. Качество пены зависит от вида белковой молекулы, степени разветвления и концентрации белка, рН среды и других факторов.

Исходя из этого, перед настоящей работой была поставлена задача охарактеризовать белки подсырной сыворотки по их пенообразующим свойствам в целях разработки препаратов - заменителей яичного белка в кондитерской промышленности.

### Материалы и методы

Исследования проводились с использованием концентрата сывороточных белков (КСБ), выпускаемого Выпускским комбинатом молокопродуктов. Химический состав КСБ определяли по стандартным методикам, принятым для молочных продуктов. Белок - по методу Кьелдаля, жир - кислотным методом, лактоза - после гидролиза  $\beta$ -галактозидазой по глюкозо-оксидазному методу, зола - озолением при температуре 550 °С

Микрофильтрация КСБ для отделения липопротеидов осуществлялась на установке "Миллипор" (США) с диаметром мембраны 90 мм. В качестве фильтрующих элементов использовались мембраны "Владипор" (СССР) типа МФА-А со средним диаметром пор 1,0 мкм. КСБ растворяли до концентрации 10 % в дистиллированной воде, процесс микрофильтрации оценивался по скорости фильтрации и остаточному содержанию жира в фильтрате. Рабочее давление - 0,3 МПа, температура 20 °С. Микрофильтрованные растворы подвергались лиофильной сушке.

Пенообразующие свойства МКСБ характеризовались по объему образовавшейся пены  $V_n$ , времени вытекания первой капли жидкости  $\tau_1$  после совершения процесса вспенивания и количеству жидкости (дренажа)  $w$  после 30 и 60-минутной выдержки пены в статических условиях. Опыты проводились на установке, представленной на рис. 1.

В градуированный стакан помещали 50 мл 10 %-ного раствора МКСБ и взбивали в течение 15 мин при скорости вращения мешалки 3600 об/мин, которая проверялась стробоско-

пическим тахометром. После осуществления процесса взбивания фиксировали объем образованной пены  $V_n$ . Затем открывали кран на дне сосуда и автоматически определяли время выпадания первой капли  $\tau_1$  с помощью управляемого счетчика капель. Количество дренажа  $w_{30}$  и  $w_{60}$  измеряли мерным цилиндром.

Опыты по пенообразованию яичного белка проводились с яичным белком из свежих яиц.

### Результаты и обсуждение

Пригодность промышленного КСБ для пенообразования определяется, в первую очередь, химическим составом препарата КСБ. По данным [9] для проявления пенообразующих свойств препараты КСБ должны содержать менее 1% жира по сухому веществу. Исходя из этого, была проведена серия опытов по отделению жира с помощью метода микрофльтрации. Метод очень перспективный, позволяет одновременно с липопротеидами удалить также микроорганизмы, повышая тем самым качество белкового продукта [10].

В таблице I приведены данные по химическому составу КСБ и МКСБ.

Т а б л и ц а I

Средний химический состав препаратов КСМ и МКСБ, %

Состав	КСБ	МКСБ
1. Сухие вещества	94-95	100
2. Белок	58-59	65-66
3. Жир	7,5-9,0	<1,0
4. Лактоза	24-25	29-30
5. Зола	3,0-5,0	3,8-4,4

КСБ - концентрат сывороточных белков, выпускаемый Выруским комбинатом молпродуктов.

МКСБ - микрофльтрованный препарат концентрата сывороточных белков.

Из табл. I следует, что препараты МКСБ по содержанию жира соответствуют рекомендованным в литературе препаратам.

Для оценки пенообразующих свойств белков использовались следующие критерии:

1. Пенообразующая способность раствора  $V_n$  - это количество пены, выражаемое ее объемом (в мл), которая образуется из постоянного объема раствора при соблюдении определенных условий в течение данного времени,

2. Кратность пены  $\beta$  представляет собой отношение объема пены  $V_n$  к объему раствора  $V_p$ , пошедшего на ее образование,

3. Стабильность (устойчивость) пены - ее способность сохранять общий объем, дисперсный состав и препятствовать истечению жидкости (синерезису).

Результаты этих опытов показали (табл. 2), что препараты МКСБ отличаются хорошей пенообразующей способностью, но низкой стабильностью пены. Интересным оказался и факт, что стабильность пены не зависит от рН среды.

Т а б л и ц а 2

Пенообразующие свойства белков

	Наименование препарата	Пенообразующая способность		Стабильность пены $\tau_1$ , мин
		$V_n$	$\beta$	
1.	КСБ	150	3,0	крайне нестабильная
2.	МКСБ	450	9,0	3,5-4,0
3.	Яичный белок I)	350	7,0	6,0-7,0

I) из свежих яиц, рН = 7,6, 10,6 % белка [III].

Здесь, однако, сразу следует отметить, что процесс пенообразования сложен из-за совместного влияния многочисленных физико-химических, физико-технических и других факторов. Закономерности, которыми характеризуется процесс образования пены, существенно зависят от условий проведения конкретного технологического процесса или эксперимента. Множество переменных параметров, влияние которых не всегда поддается учету, практически исключает возможность строгого математического описания протекающих процессов.

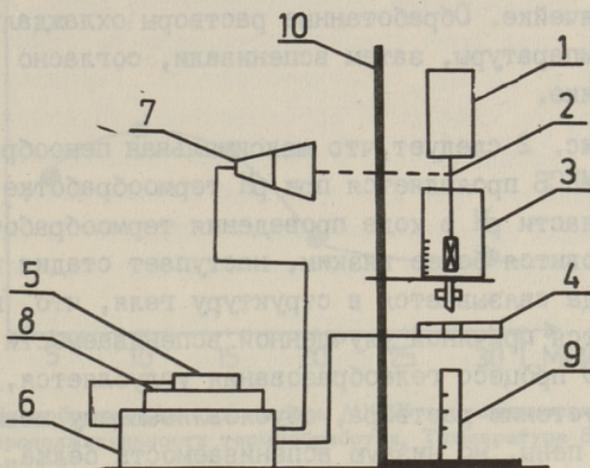


Рис. 1. Схема устройства для исследования пенообразующих свойств белковых растворов:  
 1 - мотор М 25 (ГДР); 2 - мешалка; 3 - градуированный сосуд; 4 - фотоэлемент; 5 - секундомер; 6 - счетчик капель; 7 - стробоскопическая лампа; 8 - тахометр; 9 - мерный цилиндр; 10 - штатив.

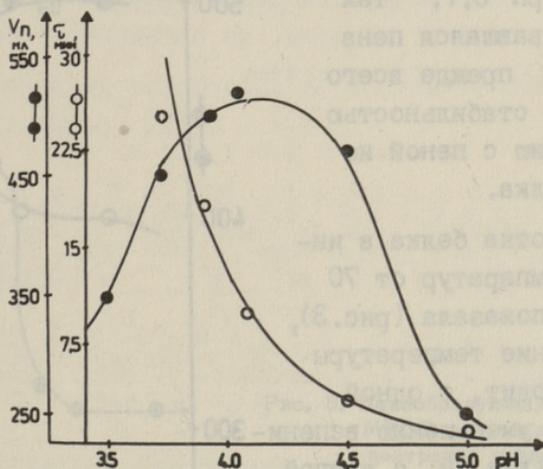


Рис. 2. Пенообразующие свойства МКСБ в зависимости от рН среды при термообработке. Температура 80 °С, длительность обработки 15 мин.

В некоторых работах указывается на возрастание вспениваемости белковых растворов после тепловой обработки, а также на рост стабильности пены с увеличением продолжительности нагревания белковой среды [12-14]. Исходя из этого нами исследовалось влияние термообработки, в частности рН, температуры и продолжительности обработки на вспениваемость МКСБ. Термообработка проводилась в 100 см<sup>3</sup> термоста-

тируемой ячейке. Обработанные растворы охлаждали до комнатной температуры, затем вспенивали, согласно вышеописанной методике.

Из рис. 2 следует, что максимальная пенообразующая способность МКСБ проявляется при рН термообработке 3,9-4,1. В данной области рН в ходе проведения термообработки раствор МКСБ становится более вязким, наступает стадия гелеобразования. Вода связывается в структуру геля, что, не исключено, является причиной улучшенной вспениваемости белка. Ниже рН 4,0 процесс гелеобразования углубляется, что приводит к загустению раствора, обуславливающему повышенную стабильность пены, но низкую вспениваемость белка. При повышенных значениях рН вязкость раствора заметно уменьшается, что, по-видимому, препятствует получению пены с достаточной вспениваемостью и стабильностью.

В дальнейших опытах термообработка проводилась при рН 3,7, так как образовавшаяся пена отличается прежде всего повышенной стабильностью по сравнению с пеной из яичного белка.

Обработка белка в интервале температур от 70 до 85 °С показала (рис. 3), что повышение температуры среды приводит, с одной стороны, к уменьшению вспениваемости белка, и, с другой — к увеличению стабильности пены.

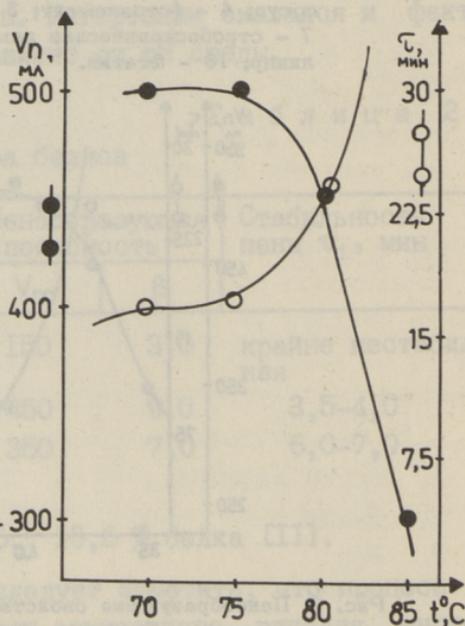


Рис. 3. Пенообразующие свойства МКСБ в зависимости от температуры среды. рН 3,7, длительность обработки 15 мин.

При изучении влияния продолжительности термообработки при 80 °С на пенообразующие свойства МКСБ (рис. 4) выяснилось, что максимальную вспениваемость раствор имеет после 10-15 мин обработки белка, причем и стабильность пены достаточно высока.  $V_{\text{п}}$  для 10 мин выдержки составляла в среднем 475-500 мл ( $\tau_1 = 16-17$  мин) по сравнению

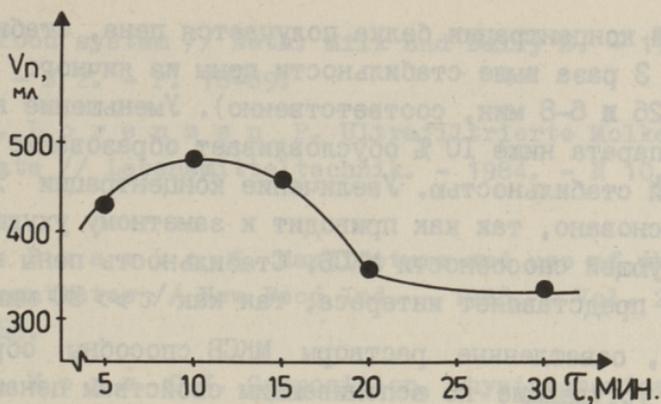


Рис. 4. Пенообразующая способность МКСБ в зависимости от продолжительности термообработки. Температура 80 °С, рН 3,7.

с  $V_{п} = 460-480$  мл ( $\tau_1 = 25-26$  мин) для 15-минутной обработки. Более длительные времена термообработки приводят к загустению белкового раствора, в результате чего уменьшается  $V_{п}$ , а стабильность пены, как и предполагалось, увеличивается ( $\omega_{60} < 0,1$  мл).

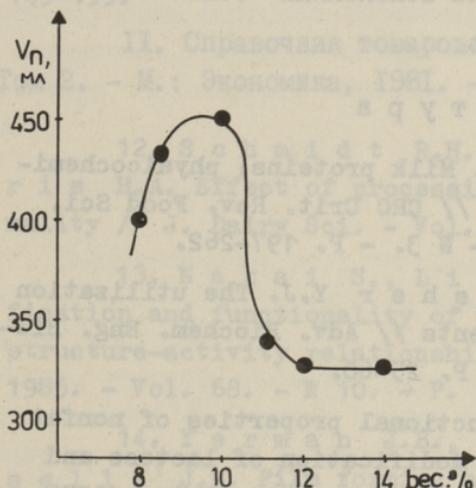


Рис. 5. Пенообразующая способность МКСБ в зависимости от концентрации препарата. Температура 80 °С, рН 3,7 и длительность обработки 15 мин.

В последующем изучалась зависимость пенообразующих свойств МКСБ от концентрации препарата в растворе (рис. 5).

Как показано на рис. 5 препарат МКСБ проявляет максимальное пенообразование при концентрации 10 г/100 г раствора, что соответствует концентрации около 7 % белка.

При данной концентрации белка получается пена, стабильность которой в 3 раза выше стабильности пены из яичного белка ( $\tau_1 = 25-26$  и  $6-8$  мин, соответственно). Уменьшение концентрации препарата ниже 10 % обуславливает образование пены с пониженной стабильностью. Увеличение концентрации  $>10$  % тоже не обосновано, так как приводит к заметному ухудшению пенообразующей способности МКСБ. Стабильность пены в данном случае не представляет интереса, так как  $\tau \gg 30$  мин.

Итак, осветленные растворы МКСБ способны образовать пены, не уступающие по вспенивающим свойствам пенам из яичного белка. Для получения стойкой пены из МКСБ рекомендуется провести предварительную обработку белка при температуре  $70-80$  °C и pH  $3,7-4,0$  в течение  $10-15$  мин. Термообработка белка приводит к образованию гелевой структуры и повышению вязкости раствора, обуславливающих стойкость пены. Желательная концентрация  $9-10$  г МКСБ/100 г раствора.

Для окончательной апробации пен из МКСБ необходимо изучить возможное влияние ингредиентов, предусмотренных рецептурами кондитерских изделий, на вспененный белок и качество готового пищевого продукта.

#### Л и т е р а т у р а

1. K i n s e l l a J.E. Milk proteins: physicochemical and functional properties // CRC Crit. Rev. Food Sci. and Nutr. - 1984. - Vol. 21. - N 3. - P. 197-262.
2. K o s a r i c N., A s h e r Y.J. The utilization of cheese whey and its components // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. - 1985. - Vol. 32. - P. 25-60.
3. M o d l e r H.W. Functional properties of nonfat dairy ingredients - a review. Modification of lactose and products containing whey proteins // J. Dairy Sci. - 1985. - Vol. 68. - N 9. - P. 2206-2214.
4. B o e r R. de, W i t J.N., H i d d i n k J. Processing of whey by means of membranes and some application of whey protein concentrate // J. Soc. Dairy Technol. - 1977. - Vol. 30. - N 2. - P. 112-120.
5. W i t J.N. de. Functional properties of whey pro-

tein in food system // Neth. Milk and Dairy J. - 1984. - Vol. 38. - N 2. - P. 78-89.

6. Lorenzen P. Ultrafiltrierte Molkenprotein-konzentrate // Lebensmitteltechnik. - 1984. - N 10. - P. 514-515.

7. Dosako S. Manufacture and use of whey protein concentrates // New Food Ind. - 1985. - Vol. 27. - N 4. - P. 60-68.

8. Morr C.V. Composition, physicochemical and functional properties of reference whey protein concentrates // J. Food Sci. - 1985. - Vol. 50. - N 5. - P. 1406-1411, 1421.

9. Physico-chemical aspects of dehydrated protein-rich milk products // Proceedings of IDF symposium, 1983, - Helsingor-Denmark: Conference Centre Loskolew, 1983.

10. Hanemaier J.H. Microfiltration in whey processing // Desalination. - 1985. - Vol. 53. - P. 143-155.

II. Справочник товароведов продовольственных товаров. Том 2. - М.: Экономика, 1981. - 375 с.

12. Schmidt R.H., Packard V.S., Morris H.A. Effect of processing on whey protein functionality // J. Dairy Sci. - Vol. 68. - N 11. - P. 2723-2733.

13. Nakai S., Li-Chan E. Structure modification and functionality of whey proteins: quantitative structure-activity relationship approach // J. Dairy Sci. - 1985. - Vol. 68. - N 10. - P. 2763-2772.

14. Yerman J.B., O'Neill T.E., Kinsella J.E. Film forming and foaming behavior of food proteins // J. Amer. Oil Chem. Soc. - 1985. - Vol. 62. N 9. - P. 1358-1366.

The Foaming Properties of Milk Whey Proteins

Abstract

The foaming properties of milk whey proteins unfatted by microfiltration were investigated.

The dependence of overrunning and stability on thermal treatment (temperature and durability of treatment), pH and concentration of protein solution have been studied. It has been found that the conditions of treatment to get the best foam were: temperature 70-80 °C, pH 3.7-4.0, the durability of thermal treatment 10-15 min. The concentration was 9 - 10/100 g solution.

К.Э. Паппель, Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус

## ГИДРОЛИЗ ЛАКТОЗЫ В БАРБОТАЖНОМ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОМ РЕАКТОРЕ

Основными вопросами, определяющими внедрение процесса гидролиза лактозы в промышленности, являются: получение биокатализатора с достаточной активностью и стабильностью, выяснение кинетических параметров названного процесса и создание его аппаратурного оформления. Получение иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы, исследование ее свойств и изучение кинетических параметров процесса исследованы в наших предыдущих работах [1-6]. Целью настоящей работы явилось изучение вопросов аппаратурного оформления процесса, в частности, исследование применимости биокаталитического реактора барботажного типа для проведения гидролиза лактозы.

## Материалы и методы

Биокатализатор получен связыванием  $\beta$ -галактозидазы из *Penicillium canescens* с помощью глутарового альдегида на силихроме СХ - I.5, С-80 или органоминеральном носителе, разработанном на кафедре органической и биологической химии ТПИ. Опытные партии иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы на основе органоминерального носителя и силихроме СХ-I.5 изготовлены сотрудниками ТПИ, а на основе силихроме С-80 совместно с сотрудниками ВНИИБиотехнологии. Препараты имели начальную активность по лактозе от 170 до 292 ед на г сухого препарата.

В качестве субстрата применяли водные растворы молочного сахара-сырца (ОСТ 4963-85) или молочную сыворотку, содержащих лактозу от 5 до 15 %. Регулирование pH среды проводили с помощью 1 М раствора уксусной кислоты или молочной кислоты.

Процесс гидролиза лактозы осуществлен в биокаталитическом реакторе БКР-5, разработанном в ТПИ. Реактор является колонным аппаратом с интенсивным перемешиванием катализатора воздухом и состоит из 4 ступеней (9). Для обеспечения питания реактора исходным раствором при заданной температуре, измерения количества подаваемого субстрата, питания аппарата воздухом, термостатирования всех секций аппарата и для отбора проб гидролизата и катализатора в процессе работы создана установка, схема которой представлена на рис. 1. Субстрат из термостата (2) поступает в верхнюю

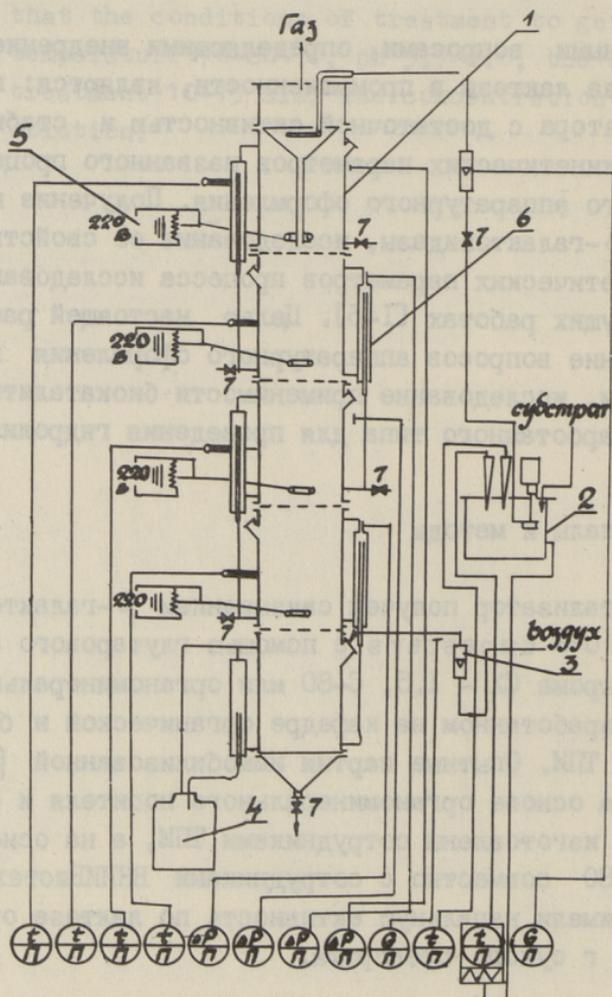


Рис. 1. Схема установки гидролиза лактозы в барботажном биокаталитическом реакторе:

- 1 - барботажный биокаталитический реактор БКР-5;
- 2 - термостат; 3 - патрубок подвода газа; 4 - сборник гидролизата; 5 - автотрансформатор; 6 - переливное устройство; 7 - кран.

секцию аппарата, взаимодействует определенное время с катализатором, находящимся в псевдооживленном слое и через переливное устройство (6) поступает в следующую секцию. Время пребывания субстрата на каждой ступени можно регулировать путем изменения объема жидкости на ней при помощи уровня переливной трубки. Замену катализатора можно проводить по секциям через соответствующие краны (7) или его движением вдоль колонны вниз после прекращения подачи воздуха и соединения потрубка (3) с атмосферой.

Процесс гидролиза лактозы проводился при температуре  $40 \pm 1$  °C и pH среды 4.5–4.6. Ход реакции гидролиза оценивался по содержанию глюкозы в исследуемой смеси, концентрацию которой определяли глюкозо-оксидазным методом [7]. Активность биокатализатора определялась в стандартных условиях по начальной скорости расщепления лактозы до глюкозы и галактозы [7]. За единицу активности принималось количество препарата, катализирующее гидролиз 1 мкмоль субстрата при 30 °C и оптимальном pH среды за 1 мин.

Концентрация лактозы определялась по содержанию глюкозы, образующейся после полного гидролиза лактозы с помощью  $\beta$ -галактозидазы.

Степень конверсии лактозы вычислялась как соотношение концентрации глюкозы в данный момент к максимально возможному содержанию ее в растворе при полном расщеплении лактозы.

## Результаты и обсуждение

Исследовано влияние сывороточных белков на эффективность работы реактора. Для этого в качестве субстрата использована творожная сыворотка, содержащая 0,9 % белка, 4,5 % лактозы, 0,7 % минеральных веществ, 0,4 % жира и 0,6 % т.н. казеиновой смеси. Гидролиз лактозы проводили иммобилизованной на силикохроме СХ-1.5  $\beta$ -галактозидазой с активностью 170 Е на г сухого препарата. Общее количество катализатора в реакторе – 2,5 кг, расход субстрата в ходе эксперимента варьировали от 16 до 60 л в час. Опыты показали, что вследствие интенсивного вспенивания сыворотки катализатор начинает транспортироваться с ни-

железащей тарелки на вышележащую, переливные устройства забиваются пеной, и жидкость накапливается в сепараторе. Кроме этого отмечено, что после 10 часов работы реактора имеет место частичное закупоривание переливных устройств аппарата белками сыворотки. С целью устранения названных недостатков исследована возможность применения олеиновой кислоты в качестве пеногасителя и влияние предварительной фильтрации молочной сыворотки на эффективность работы реактора. Выяснилось, что предварительная фильтрация сыворотки через лавсановую ткань и добавление 0,01 % олеиновой кислоты обеспечивают непрерывную работу аппарата. Учитывая это, в дальнейшей работе использована предварительно отфильтрованная сыворотка, куда в качестве пеногасителя добавлено 0,01 % олеиновой кислоты. В последующем были изучены кинетические характеристики аппарата. Для этого определена степень конверсии лактозы в каждой ступени реактора при нагрузке аппарата по субстрату 30 л/ч. Гидролиз проведен иммобилизованной на силихроме  $\beta$ -галактозидазой с активностью 261 Е (на г сухого препарата). Общее количество катализатора в реакторе - 2,6 кг. Содержание лактозы в молочной сыворотке равнялось 4,2 %. Продолжительность опыта 4 часа. При этом через 30 мин на каждой ступени реактора определялось содержание глюкозы, на основе чего вычислялась степень конверсии субстрата. Сравнение результатов эксперимента (табл. I) со степенями конверсии, рассчитанными исходя из тех же исходных данных по обобщенному кинетическому уравнению, разработанному Сиймером с сотрудниками [8], показало соответствие теоретических положений действительной кинетической характеристике реактора.

Т а б л и ц а I

Степень гидролиза лактозы в БКР-5 по  
экспериментальным и расчетным данным

Ступень реактора	Степень конверсии	
	расчетное значение	среднее экспериментальное значение
1	0,214	0,255
2	0,365	0,385
3	0,481	0,460
4	0,575	0,560

Учитывая вышеизложенное, кинетику гидролиза лактозы в каждой ступени реактора можно описать уравнением (I), представленным нами ранее [5].

$$V_{\text{отк}} = \frac{1-x}{1 + \frac{0,11}{[S]_0} + (0,85 + 5,7 [S]_0) x - 5,7 [S]_0 x^2}, \quad (I)$$

где  $V_{\text{отк}}$  - относительная скорость реакции в данной ступени реактора;

$[S]_0$  - начальная концентрация лактозы, моль/л;

$x$  - степень конверсии субстрата.

Адекватность описания кинетики гидролиза лактозы по уравнению (I) с процессом в реакторе позволяет осуществлять математическое моделирование процесса в аппаратах типа БКР-5. Используя предложенную нами методику расчета гидродинамических параметров таких аппаратов [10, 11], имеем возможность их проектирования для любой заданной производительности.

С целью выяснения возможностей увеличения производительности реактора изучен гидролиз 15%-ного раствора лактозы. Повышение концентрации в исходном растворе от 5 до 15 % по данным лабораторных исследований [1, 5] повышает стабильность препарата и, с другой стороны, увеличивает пропускную способность аппарата при тех же его габаритах. Испытания проведены с иммобилизованной на органоминеральном носителе  $\beta$ -галактозидазой с исходной активностью 292 Е (на г препарата). Растворы лактозы приготовлены из технического препарата лактозы (т.н. сахара-сырца) в водопроводной воде, рН раствора доведен до рН - 4,6 1 М раствором уксусной кислоты. Испытание реактора осуществлено при расходе субстрата 15 л/ч. Всего обработано 110 кг раствора лактозы. Как видно из опытных данных (табл. 2) достигаемая степень конверсии субстрата превышала 75 %. Снижения активности катализатора в ходе работы не обнаружено. Испытания подтвердили целесообразность применения субстратных растворов с исходной концентрацией лактозы 15 %.

Испытания биокаталитического реактора в полупромышленных условиях проведены в Түрийском экспериментальном отделении КТБ Мясомолпрома ГАПК ЭССР и на Вырусском комбинате молпродуктов. В качестве катализатора при экспериментах в

Т а б л и ц а 2

Гидролиз 15%-ного раствора лактозы

Время работы часов	№ ступени реактора	Содержание глюкозы, мг/мл	Степень конверсии <sup>x</sup>
1	1	19	
	2	28,4	
	3	46,4	
	4	49,6	67,9
2	1	26,6	
	2	38,0	
	3	52,8	
	4	55,6	76,2
3	1	26,4	
	2	38,4	
	3	50,4	
	4	55,4	75,9
4	1	27,2	
	2	40,4	
	3	50,4	
	4	55,6	76,2
5	1	28,2	
	2	44,8	
	3	54,4	
	4	57,2	78,4
6	1	27,6	
	2	44,8	
	3	52,0	
	4	57,6	78,9
7,5	1	26,4	
	2	44,0	
	3	52,0	
	4	57,4	78,0

<sup>x</sup> - содержание глюкозы при степени конверсии 100 % равняется 73 мг/мл.

Тюрийском отделении использована иммобилизованная на органо-минеральном носителе  $\beta$ -галактозидаза с исходной активностью 292 ед на г, а на Вьрусском комбинате молпродуктов

иммобилизованная на сиохроме С-80  $\beta$ -галактозидаза с активностью 230 Е на г. Общее количество катализатора в реакторе равнялось соответственно 4,4 и 4,3 кг. Эффективность работы реактора исследовали как при гидролизе 15%-ного раствора технической лактозы в воде, так и при гидролизе лактозы в молочной сыворотке, в которую добавлена техническая лактоза до общей концентрации ее в растворе 15%. По химическому составу использованные растворы имитируют промежуточные продукты производства молочного сахара на Выруском комбинате: вторую мелассу и концентрат гиперфилтрации. Нагрузка аппарата по субстрату устанавливалась в зависимости от достигаемой степени конверсии и изменялась в пределах от 8 до 16 л/час. В общей сложности обработано 1500 кг субстрата. Опыты подтвердили применимость реактора для обработки исследуемых субстратов. Достижимая степень конверсии лактозы равнялась 70-77%.

Таким образом, испытания реактора БКР-5 доказали применимость его при гидролизе лактозы иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазой как в чистых растворах лактозы, так и в предварительно обработанных растворах молочной сыворотки.

#### Л и т е р а т у р а

1. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И. Количественная характеристика гидролиза лактозы иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазой // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1977. - № 424. - С. 19-28.

2. Паппель К.Э., Теаро Э.Н., Уус Э.Г. Получение сухой молочной сыворотки с пониженным содержанием лактозы // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1980. - № 499. - С. 83-93.

3. Сиймер Э.Х., Паппель К.Э. Особенности гидролиза концентрированных растворов лактозы // Тезисы докладов УП Всесоюзной конференции по химии и биохимии углеводов. - Пущино, 1982. - С. 24.

4. Паппель К.Э., Лайдсаар Р.Б. Изучение стабильности  $\beta$ -галактозидазы // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1982. - № 526. - С. 13-23.

5. Паппель К.Э., Лайдсаар Р.Б. Свойства иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1985. - № 598. - С. 99-106.

6. Кёстнер А.И., Паппель К.Э., Уус Э.Г., Теаро Э.Н. Биокаталитическая конверсия лактозы молочной сыворотки // Тезисы докладов У Всесоюзного биохимического съезда. - Киев, 1986. - Ч. 3. - С. 339.

7. Щербухин В.А., Миронова Л.И., Кондырева А.В., Грюнер В.С. Определение глюкозы в патоке глюкозооксидазным методом с использованием ферроцианида калия // Прикладная биохимия и микробиология. - 1970. - Т. 6. - № 4. - С. 467.

8. Siimer E. Generalized rate equation for one-substrate enzymatic reactions // Biotechn. and Bioeng., - 1978. - 20. - P. 1853-1864.

9. Теаро Э.Н., Уус Э.Г., Кёстнер А.И. Промышленные биокаталитические реакторы для процессов с иммобилизованными ферментами // Антибиотики и медицинская биотехнология. - 1986. - № 2. - С. II2-II7.

10. Теаро Э.Н., Пикков А.Н., Уус Э.Г. Барботажный метод интенсификации биокаталитических процессов // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1983. - № 552. - С. 101-106.

11. Теаро Э.Н., Уус Э.Г., Каппо Ю.В. Гидродинамика трехфазного псевдооживленного слоя в узком барботажном канале // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. - 1982. - № 526. - С. 79-85.

K. Pappel, E. Tearo,  
E. Uus

Hydrolysis of Lactose in the Barbotage  
Biocatalytic Reactor

Abstract

A process of hydrolysis of lactose in the barbotage biocatalytic reactor BKR-5, elaborated in Tallinn Technical University, has been studied.

Solutions containing from 5 to 15 % of lactose were passed at the pH - 4.5 and at the temperature 40 °C through the biocatalytic module where the hydrolysis process in the presence of *Aspergillus niger*  $\beta$ -galactosidase, immobilized on mineral or organomineral carriers, was carried out. 70-77 % conversion of lactose into glucose and galactose at the flow rates of 13-15 litres of substrate per hour was obtained.

From experiments a conclusion can be drawn that the BKR-5 type apparatus is quite suitable for carrying out the lactose hydrolysis process.

К.Э. Паппель, Р.А. Вокк

## ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА *Bacillus macerans* И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ.

### П. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ЦИКЛОДЕКСТРИН-ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ

Основными параметрами, определяющими эффективность применения ферментного препарата, являются его температурная и рН-зависимость активности, кинетика реакций и стабильность катализатора в условиях эксплуатации. Свойства ферментного препарата определяются продуцентом фермента, а также условиями культивирования и могут варьироваться в широких пределах. Характеристика циклодекстрин-глюканотрансфераз, применяемых в настоящее время для получения циклодекстринов в Венгрии и Японии, приведена в работах Цейтли [1] и Накамуры [2].

Целью настоящей работы явилось изучение основных свойств циклодекстрин-глюканотрансферазы, выделенной из культуральной жидкости *B. macerans*, и выяснение возможностей применения ее для получения  $\beta$ -циклодекстрина.

#### Материалы и методы

Работа проводилась с культуральной жидкостью *B. macerans*, условия получения которой описаны в статье Пальма и сотр. (см. наст. сб. с. 41-48).

Активность фермента определялась по начальной скорости синтеза  $\beta$ -циклодекстрина, образующегося при расщеплении растворимого крахмала. Концентрация циклодекстрина определялась с помощью фенолфталеина, образующего комплекс с циклодекстрином [3].

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

Осаждение фермента органическими растворителями проводилось при температуре  $\leq 3^\circ$  и при pH среды 5,4. В качестве органического растворителя применялись этанол и ацетон. Конечная концентрация этанола в смеси равнялась 70 %, а в случае применения ацетона – 50 %. Осадок фермента удаляли с помощью центрифугирования на центрифуге Janetzki K-24 при 3000 об/мин и высушивали в вакуумном шкафу при остаточном давлении  $5 \cdot 10^2$  Па.

Очистка методом гельфильтрации проводилась на сефадексе Г-75 при скорости потока 0,4 мл/мин. Диаметр колонки 0,9 см, высота слоя сефадекса – 30 см.

Обработка данных кинетических исследований проводилась на микроЭВМ по линейной регрессии в измененных координатах Хейна.

## Результаты и обсуждение

При изучении возможностей концентрирования культуральной жидкости, содержащей фермент, сравнена эффективность использования двух методов – вакуумного упаривания и ультрафильтрации. Типичные данные опытов представлены в табл. I. Оказалось, что концентрирование культуральной жидкости целесообразно провести методом ультрафильтрации. Этот метод обеспечивает полное сохранение активности фермента. При вакуумном упаривании происходит значительная инактивация фермента, выход активности составляет 66 %. В дальнейшей работе использован концентрат культуральной жидкости, полученный ультрафильтрацией.

Изучение возможностей очистки полученного концентрата показало, что оба исследуемых метода – осаждение органическими растворителями и гельфильтрация дают возможность повышать удельную активность фермента соответственно в 3,7 и 4,8 раза. Выход активности фермента при осаждении органическими растворителями составляет в среднем

90 % (табл. 2). Гельфильтрация ферментного раствора связана с разбавлением его и по сравнению с осаждением органическими растворителями менее технологична. Проведение процесса требует применения импортных материалов. В связи с этим в дальнейшей работе для очистки концентрата культуральной жидкости применялось осаждение фермента органическими растворителями.

Т а б л и ц а 1

Концентрирование культуральной жидкости

№	Метод	Активность исходного раствора		Активность концентрата		
		Е/мл	Е	Е/мл	Е	выход, %

1.	Вакуумное упаривание	0,095	205	0,234	135	66
2.	Ультрафильтрация	0,053	10,6	0,234	10,6	100

Т а б л и ц а 2

Очистка ферментного раствора

№	Осадитель	Исходный раствор			Очищенный препарат			
		активность		$A_{уд}$	активность		$A_{уд}$	выход активности, %
		Е/мл	Е	Е/мг белка	Е/л	Е		

1.	Этанол	0,234	135	0,014	54,9	120,2	0,052	89,2
2.	Ацетон	0,195	96,6	-	32,6	91,8	-	95,0

Полученный вышеописанным методом препарат применяли для изучения рН-, температурной и субстратной зависимости активности фермента, а также для определения его температурной стабильности.

Зависимость активности фермента от рН среды определяли в интервале значений рН от 4,0 до 10,0. При этом использовали следующие буферные системы или растворы: рН 4,0-5,8 - Na ацетат-уксусная кислота или 0,1 М раствор HCl; рН 5,8-8,0 -  $Na_2HPO_4$ - $NaH_2PO_4$  или соответственно 0,1 М раствор HCl или 0,1 М раствор NaOH; рН 8,0 - 10,0 - глицин-NaOH или диэтанолламин-HCl или 0,1 М раствор NaOH. Опыты показали (рис. 1), что рН-зависимость активности фермента имеет два максимума - при значении рН 5,0 и рН 7,5 соответственно. Активность фермента при рН 5,0 составляет 80 % от его

активности при pH 7,5, что соответствует данным Хорикоши и сотр. [4], полученным при исследовании свойств фермента из *Bacillus sp.* (ATCC - 21783). Сравнение значений активности фермента, определенных в присутствии ацетатного иона и без него при pH среды от 4,0 до 5,8, показало, что активность фермента ниже в присутствии ацетатного иона (рис. 1).

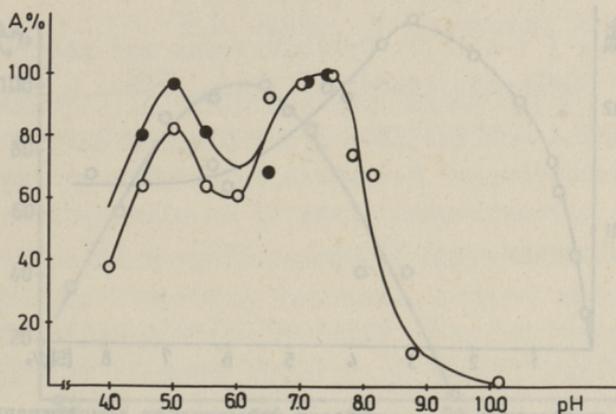


Рис. 1. pH-зависимость активности фермента:  
 ●—● регулирование pH реакционной смеси  
 0,1М раствором HCl или NaOH;  
 ○—○ регулирование pH смеси буферными  
 растворами (см. материалы и методы).

Определение содержания циклодекстрина с помощью фенолфталеина в присутствии ацетатного иона показало, что в данной системе этот ион не влияет на значения определения. Следовательно, ацетатный ион влияет на скорость реакции, катализируемой циклодекстринглюканотрансферазой. Проверка данных pH-зависимости активности в пределах pH среды от 6,0 до 10,0 (при регулировании pH среды 0,1 М раствором NaOH или HCl соответственно) не приводило к изменениям в значениях активности фермента. Исходя из данных pH-зависимости активности фермента и учитывая, что по данным литературы [2, 4] стабильность его значительно снижается при pH среды < 5,8 и pH > 9,0, дальнейшая работа с ферментом проведена при pH среды, равным 7,5.

Зависимость активности фермента от концентрации субстрата (растворимого крахмала) изучена при содержании его в реакционной смеси от 1,3 до 8,3 г/л. Оказалось (рис. 2), что при повышении концентрации субстрата выше 3,5 г/л

скорость реакции синтеза уменьшается. Можно предполагать, что в ходе реакции образуется комплекс между молекулами субстрата и фермента -  $ES_2$ , что приводит к снижению скорости реакции синтеза. Обработка опытных данных в координатах  $V/[S]_0 = f([S]_0)$  дала значение  $K_M = 5,95$  г/л.

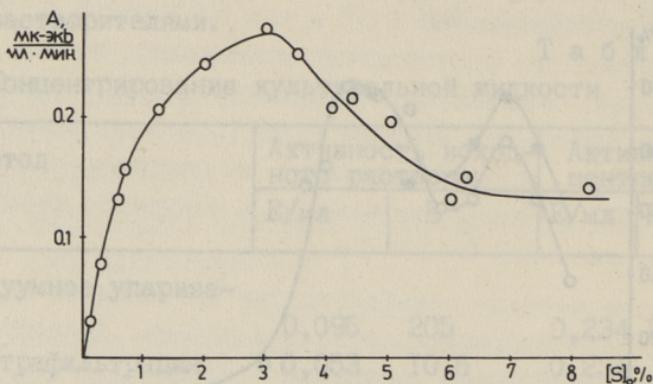


Рис. 2. Зависимость активности фермента от концентрации субстрата.

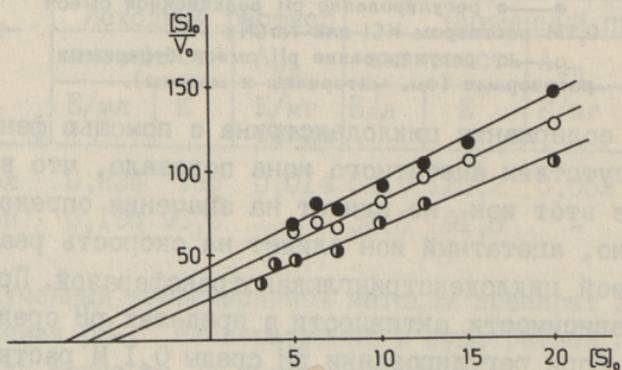


Рис. 3. Зависимость активности фермента от исходной концентрации циклодекстрина.

Исходная концентрация циклодекстрина:

●—● 0,2 г/л; ○—○ 0,1 г/л; ●—● 0 г/л.

Изучение влияния концентрации продукта -  $\beta$ -циклодекстрина на скорость реакции показало, что при синтезе происходит сильное ингибирование продуктом реакции (рис.3). Как видно из опытных данных, ингибирование является смешанным.

Зависимость активности фермента от температуры определена при исходной концентрации растворимого крахмала 30 г/л

и pH среды 7,5. Выяснилось (рис. 4), что максимальная скорость реакции наблюдается при температуре 50 °С, что согласуется с данными Накамуры и соавт. [2]. При дальнейшем повышении температуры проявляется инактивация фермента под влиянием температуры. Энергия активации реакции синтеза циклодекстрина равняется 29,3 кДж/моль.

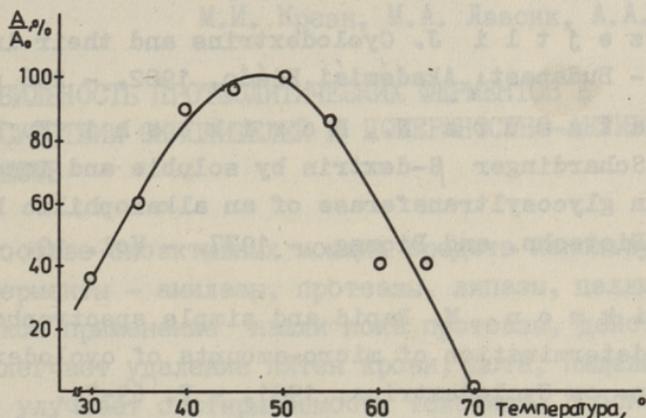


Рис. 4. Зависимость активности фермента от температуры.

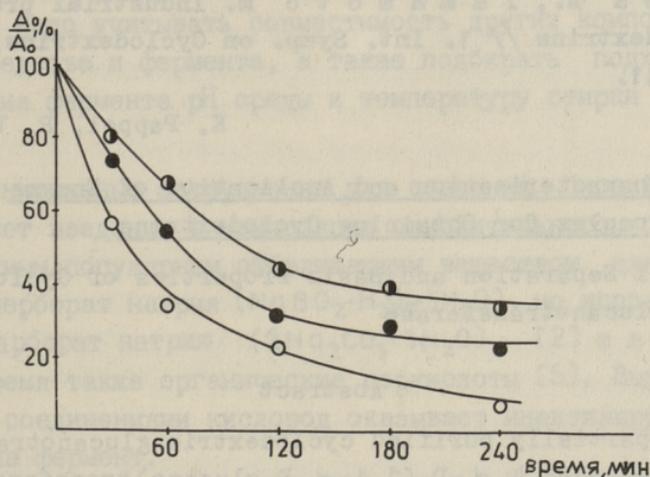


Рис. 5. Стабильность фермента в 0,05М фосфатном буфере:  
 ○—○ 40°; ●—● 45°; ○—○ 50°.

Термостабильность фермента изучена в интервале температур от 40 до 50 °С в 0,05 М растворе фосфатного буфера. Выяснилось (рис. 5), что при повышении температуры реакции от 40 до 50 °С скорость реакции инактивации повышается почти в 4 раза (значения константы инактивации  $K_{ин}$  соответственно  $2,2 \cdot 10^{-3}$  и  $9,2 \cdot 10^{-3}$  мин<sup>-1</sup>).

Таким образом, исследуемый нами ферментный препарат циклодекстрин-глюканотрансферазы не отличается от тех же препаратов *Bacillus* sp., применяемых при синтезе циклодекстринов. Исходя из опытных данных, процесс циклизации целесообразно провести при pH 7,5 и температуре 40 °C.

### Л и т е р а т у р а

1. S z e j t l i J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. - Budapest: Akadémiai Kiadó, 1982. - 296 p.
2. N a k a m u r a N., H o r i k o s h i K. Production of Schardinger  $\beta$ -dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. // Biotechn. and Bioeng. - 1977. - Vol. 19. - P. 87-99.
3. V i k m o n M. Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of cyclodextrins // 1. Int. Symp. on Cyclodextrins, 1981. - P. 69-74.
4. H o r i k o s h i K., N a k a m u r a N., M a t z u z a w a N., Y a m a m o t o M. Industrial production of cyclodextrins // 1. Int. Symp. on Cyclodextrins, 1981. - P. 25-41.

K. Pappel, R. Vokk

#### Characterization and Application of Enzyme Complex for Obtaining Cyclodextrins

#### II Separation and Basic Properties of Cyclodextrin-Glucanotransferase

#### Abstract

A. partially purified cyclodextrin glucanotransferase (1,4- $\alpha$ -D-glucan 4,  $\alpha$ -D-(1,4- $\alpha$ -D-glucano)transferase, EC 2.4.1.19) was obtained from the culture broth of a strain of *Bacillus macerans* by purification methods including precipitation with organic solvents and gel filtration on Sephadex G-75. Several properties such as effects of pH and temperature on activity of partially purified enzyme were studied. The effect of temperature on stability of this enzyme preparation in 0,05M phosphate buffer was also determined.

М.И. Креэн, М.А. Лаасик, А.А. Менерт

СТАБИЛЬНОСТЬ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В  
ПРИСУТСТВИИ ОКИСЛИТЕЛЕЙ И ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ  
ВЕЩЕСТВ

В составе биоактивных моющих средств используются различные ферменты - амилазы, протеазы, липазы, целлюлазы. Самое широкое применение нашли пока протеазы, действие которых облегчает удаление пятен крови, пота, пищевых продуктов и улучшает отстирываемость текстиля. В основном в синтетических моющих средствах (СМС) используются щелочные протеазы из *Bac. subtilis*. При включении ферментов в СМС всегда надо учитывать совместимость других компонентов моющего средства и фермента, а также подбирать подходящие для действия фермента рН среды и температуру стирки [1, 2, 3].

Дополнительные затруднения для создания биоактивных СМС вызывает введение в композицию окислительного отбеливателя. Самым популярным отбеливающим веществом для СМС является перборат натрия ( $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), но используется и перкарбонат натрия ( $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) [2] и в последнее время также органические перкислоты [5]. Выделяемый этими соединениями кислород оказывает инактивирующее действие на фермент.

С целью повышения эффективности действия биоактивных СМС огромную работу проводят по повышению стабильности ферментов. Можно различать следующие основные направления:

- включение дополнительных стабилизирующих добавок в композицию СМС [1, 6, 7, 8];

- изготовление специального гранулированного ферментного комплекса, содержащего защищающие фермент компоненты

(крахмал, декстрины, неорганические соли, полиэтиленгликоль и др.) [9-12];

- гранулирование и стабилизация отбеливателя [8, 13, 14].

Перечисленные выше способы используются либо отдельно, либо комбинированно друг с другом, в зависимости от поставленной цели. Введение одной или нескольких стабилизирующих добавок в СМС очень часто находит применение при создании жидких СМС, в которых труднее всего сохранить ферментативную активность. Включение стабилизирующих фермент добавок в порошковые СМС также способствует положительному эффекту по сохранению активности фермента в процессе стирки. В лучших образцах биоактивных СМС, содержащих окислительный отбеливатель, протеазы сохраняют около 60 % от исходной активности после 60-минутной выдержки при 40 °C [4].

Включение фермента в гранулы различного состава в первую очередь преследует цель лучшего сохранения его активности при хранении СМС [11, 12]. Но введенные при этом стабилизирующие вещества (полиолы, неорганические соли и др.) могут оказывать положительное влияние и при работе фермента (при стирке). При стабилизации отбеливателей обычно достигается одновременно две цели - при хранении моющего средства отбеливатель не разлагается и сохраняет высокий уровень активного кислорода и, в то же время, фермент существенно не инактивируется [13]. Одновременно с отбеливателем в капсулы или гранулы иногда включают и восстановители (предпочтительно сульфиты), защищающие фермент от действия отбеливателя, особенно в начальном периоде работы [2].

Целью настоящей работы было изучение стабильности щелочных протеаз в составе модельных образцов СМС, содержащих окислительный отбеливатель перборат натрия, и выяснение стабилизирующего эффекта различных добавок и модификаторов на щелочную протеазу из *Bac. subtilis* при вышеприведенных условиях.

Объектом исследования была щелочная протеаза из *Bac. subtilis* (протосубтилин), выпускаемая в гранулированном виде Ладыжинским заводом ферментных препаратов, имеющая протеолитическую активность 12–13 мккат/г. Использовали также алкалазу и эсперазу – щелочных протеаз, выпускаемых фирмой "Novo Industry", имеющих активность 33 мккат/г и 13 мккат/г соответственно.

В качестве окисляющего отбеливателя использовали перборат натрия ( $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) отечественного производства, содержащий 8,06 % активного кислорода и мелкогранулярный препарат, импортированный из Финляндии, содержащий 8,35 % активного кислорода. Оба образца были предоставлены нам ПОБХ "Флора".

Для создания модельных образцов биоактивного моющего средства использовали композицию СМС, содержащую 15 % анионных поверхностно-активных веществ (сульфонол, синта-мид-5), 28 % триполифосфата натрия и другие облигаторные компоненты. Композиция составлена и предоставлена нам ПОБХ "Флора".

В качестве стабилизирующих добавок исследовали: полиэтиленгликоли (ПЭГ) разной молекулярной массы (300, 1000, 2000 и 4000) производства фирмы "Schuchardt", декстрины кукурузного крахмала, полученные кислотным гидролизом, предоставленные нам химкомбинатом ЭРСПО "Орто", а также натрий тетраборнокислый (бура), борную кислоту и кальций хлористый безводный – все марки "ч".

Протеолитическую активность протеаз определяли при 40 °С и рН 10,5 на 2%-ном растворе казеината натрия. Активность вычисляли по увеличению содержания тирозина в неосаждаемых ТХУ кислотой продуктах гидролиза. Содержание тирозина определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 278$  нм. Активность выражали в микрокаталах (мккат) на 1 г фермента. Определение активности протеаз в составе модельных образцов СМС проводили в тех же условиях, используя раствор СМС 25 г/л. Так как в образцах СМС содержался 1 % фермента, то концентрация фермента в исследуемых растворах составляла 0,25 г/л. Активность выражали в нанокаталах (нкат) на 1 г СМС или на 1 мл раствора СМС.

Рабочую стабильность протеаз определяли по сохранению активности при 40 °С в течение 60 минут.

Стабильность при хранении определяли по сохранению активности протеаз в условиях ускоренного старения - при 37 °С,  $\varphi = 70-80\%$ . Одну неделю хранения при таком режиме уравнивают на три месяца в нормальных складских условиях [19].

Влияние стабилизаторов на сохранение активности протосубтилина выяснили либо путем их включения в композицию модельного СМС, либо путем предварительного модифицирования ферментного препарата с их помощью. В случае последнего варианта из стабилизатора изготовляли раствор определенной концентрации и добавляли к препарату протосубтилина в количестве, увлажняющем материал (2-3 мл на 10 г). Затем массу тщательно перемешивали, гранулировали путем растирания через сито и высушивали при комнатной температуре. Иногда увлажненную массу вначале высушивали и затем гранулировали.

При стабилизации (гранулировании) пербората натрия использовали такую же методику.

Содержание активного кислорода ( $O_2$ ) в перборате натрия определяли по методике [20].

## Результаты и обсуждение

В первую очередь нами исследовалась чувствительность протосубтилина в отношении компонентов СМС и пербората натрия. Для этого определяли сохранение активности протосубтилина в рабочих условиях (рабочую стабильность). На рис. 1 приведены кривые инактивации протосубтилина в разных средах. Можно убедиться в том, что компоненты моющего средства оказывают на протосубтилин сильное инактивирующее действие и в течение часа сохраняется около 22 % от исходной активности фермента. Включение в состав СМС 15 % отбеливателя вызывает еще дополнительную инактивацию фермента - сохраняется только 12 % от исходной активности.

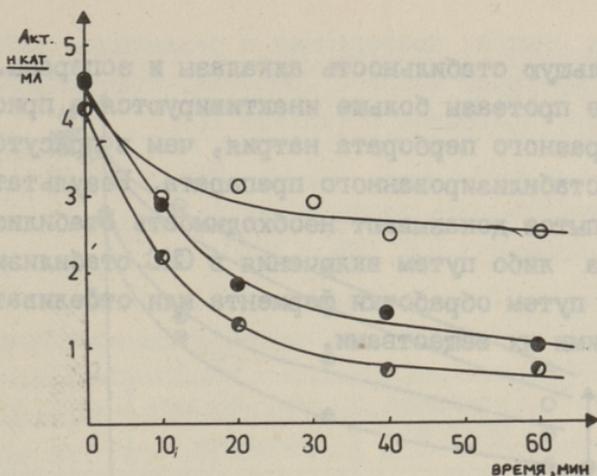


Рис. 1. Сохранение активности протосубтилина при 40 °С в разных средах. ○ - карбонатный буфер pH 10,5, ● - среда СМС, ○ - среда СМС, содержащего перборат натрия.

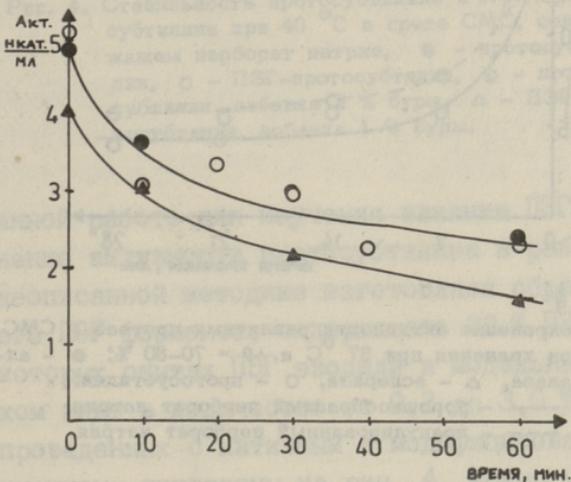


Рис. 2. Сохранение активности алкалазы и эсперазы при 40 °С в разных средах. ○ - алкалаза в буфере pH 10,5, ● - алкалаза в среде СМС, содержащего перборат натрия, ▲ - эспераза в той же среде.

Для сравнения исследовали инактивацию протеаз фирмы "Novo Ind." в тех же условиях. По результатам, приведенным на рис. 2, видно, что в среде СМС, содержащего дополнительно 15 % пербората натрия, сохраняется соответственно 50 и 40 % от исходной активности алкалазы и эсперазы. Сравнение сохранения активности протосубтилина, алкалазы и эсперазы проведено также в условиях хранения СМС (37 °С, φ = 70-80 %). Результаты, приведенные на рис. 3, убедительно

доказывают большую стабильность алкалазы и эсперазы. Видно также, что все протеазы больше инактивируются в присутствии порошкообразного пербората натрия, чем в присутствии гранулярного стабилизированного препарата. Результаты вышеприведенных опытов доказывают необходимость стабилизации протосубтилина либо путем включения в СМС стабилизирующих добавок, либо путем обработки фермента или отбеливателя стабилизирующими их веществами.

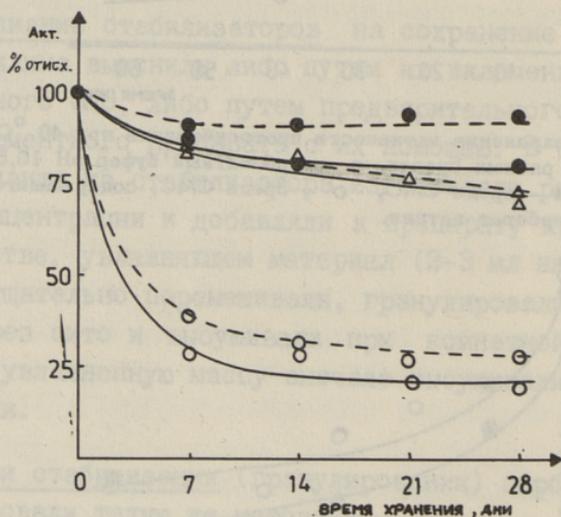


Рис. 3. Сохранение активности различных протеаз в СМС при хранении при 37 °С и  $\varphi = 70-80\%$ : ● — алкалаза, Δ — эспераза, ○ — протосубтилин. — порошкообразный перборат натрия, --- гранулированный перборат натрия.

При модификации ферментов широкое применение нашли полиэтиленгликоли (ПЭГ) с различной молекулярной массой и их производные [15, 16]. Чаще всего используют ПЭГ молекулярной массой от 2000 до 6000. Предполагают, что стабилизирующий эффект ПЭГ заключается в том, что белок, обработанный с гидрофильным ПЭГ, придерживает молекулы воды на своей поверхности и тем самым оказывается защищенным от инактивирующего действия органических растворителей и других веществ, содержащих аполярные радикалы [15]. Известно также, что ПЭГ нашел применение в качестве стабилизатора в биоактивных СМС [9, 17]. Иногда в состав жидкого СМС входит пропиленгликоль [1].

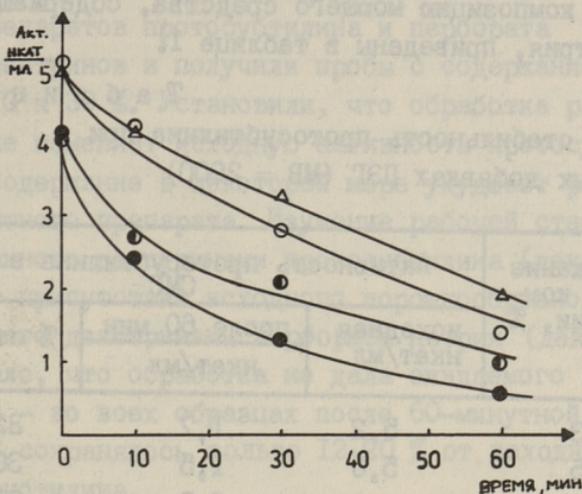


Рис. 4. Стабильность протосубтилина и ПЭГ-протосубтилина при 40 °C в среде СМС, содержащем перборат натрия, ● - протосубтилин, ○ - ПЭГ-протосубтилин, ⊙ - протосубтилин, добавка 2 % буры, Δ - ПЭГ-протосубтилин, добавка 1 % буры.

В данной работе для изучения влияния ПЭГ ( $M_n = 2000$ ) на сохранение активности протосубтилина в рабочих условиях по вышеописанной методике изготавливали образец модифицированного ПЭГ фермента, содержащего 33 % ПЭГ. Кроме того, в некоторых опытах ПЭГ вводили в модельные образцы СМС в сухом виде в количестве от 0,3 до 3,0 %. Результаты опытов, проведенных с нативным и модифицированным ПЭГ протосубтилином, приведены на рис. 4. Можно убедиться, что в результате обработки ПЭГ наблюдается примерно 20%-ное повышение исходной активности фермента в среде СМС. Значительно улучшается сохранение активности фермента - ПЭГ - протосубтилин сохраняет после 60-минутной выдержки при 40 °C около 30 % от исходной активности, в то время, когда в сравнительной пробе сохраняется только 15 % активности. Оказывается, что обработка протосубтилина ПЭГ не только элиминирует дополнительную инактивацию фермента, вызванную отбеливателем, а в некоторой мере даже уменьшает инактивацию, вызванную компонентами СМС. Сохранение активности протосубтилина в растворе СМС, не содержащем отбеливатель 20-25 % (см. рис. I).

Результаты опытов, проведенных с различными добавками сухого ПЭГ в композицию моющего средства, содержащего 15 % пербората натрия, приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Рабочая стабильность протосубтилина при различных добавках ПЭГ (МВ = 2000)

№ пробы	Содержание ПЭГ в композиции, %	Активность протосубтилина в растворе СМС		
		исходная нкат/мл	после 60 мин	% от исх.
			нкат/мл	
1	0,3	5,2	1,7	32,7
2	0,5	5,0	1,5	30,0
3	1,0	4,0	1,5	37,5
4	3,0	2,8	0,9	28,5
5	-	4,0	0,5	12,5

По данным таблицы I можно убедиться в положительном эффекте добавки ПЭГ на рабочую стабильность протосубтилина. После 60-минутной выдержки при 40 °С сохраняется больше 30 % активности фермента. В тех же условиях проведены также опыты с 0,5%-ной добавкой сухого ПЭГ различной молекулярной массой (300, 1000, 2000, 4000). Защищающий эффект всех рассмотренных ПЭГ оказался близким - сохранялось 27-39 % от исходной активности фермента.

Для выяснения влияния ПЭГ на сохранение активности протосубтилина в условиях ускоренного старения были составлены модельные образцы СМС, содержащие ПЭГ-протосубтилин и немодифицированный протосубтилин с добавкой сухого ПЭГ в количестве 1% от модельного СМС. Выяснилось, что во всех образцах к 14-му дню хранения протосубтилин сохранял около 30 % от исходной активности и, таким образом, стабилизирующего эффекта ПЭГ в условиях хранения обнаружить не удалось.

Известно, что в составе комплексных гранулированных ферментных препаратов, пригодных для использования в порошковых моющих средствах, иногда применяют растворимый крахмал или декстрины [9] как полигидроксисоединения, оказывающие стабилизирующее влияние. Нами изучалось влияние декстринов кукурузного крахмала на рабочую стабильность

протосубтилина. Для этого вышеописанным способом провели обработку препаратов протосубтилина и пербората натрия раствором декстринов и получили пробы с содержанием декстринов 5, 10 и 30 %. Установили, что обработка раствором декстринов не изменяет исходную активность протосубтилина, но 30%-ное содержание в некоторой мере ухудшает растворимость ферментного препарата. Изучение рабочей стабильности модифицированного декстринами протосубтилина (декс-протосубтилин) в присутствии исходного порошкообразного и модифицированного декстринами пербората натрия (декс-перборат) показало, что обработка не дала ожидаемого защищающего эффекта - во всех образцах после 60-минутной выдержки при 40 °С сохранялось только 12-20 % от исходной активности протосубтилина.

Обработанные декстринами протосубтилин и перборат натрия включили в модельные образцы СМС для изучения стабильности фермента в условиях ускоренного старения. В образцах содержалось 1 % фермента и 15 % отбеливателя в пересчете на соответствующее исходное вещество.

Приведенные в таблице 2 данные убеждают в стабилизирующем влиянии декстринов на протосубтилин. Очень хорошо сохранялась активность протосубтилина в пробах 4 и 5, в состав которых входили модифицированные декстринами протосубтилин и перборат натрия. Хорошее сохранение активности протосубтилина наблюдалось и в пробе 3, но из-за высокого содержания декстринов ферментный препарат оказался плохо растворимым. Таким образом, обработка либо фермента, либо отбеливателя декстринами значительно замедляет инактивацию протосубтилина в процессе хранения, хотя в рабочих условиях фермента положительного эффекта не обнаружено.

Соединения бора как стабилизаторы протеаз часто вводятся в композиции мощных средств [3, 13, 18]. С целью достижения более выразительного стабилизирующего эффекта, соединения бора в СМС вводятся одновременно с другими добавками [18]. Нами исследовалось влияние натрия тетраборнокислого (буры) и борной кислоты на активность протосубтилина в режиме работы и хранения. При этом влияние буры

нами изучалось на рабочую стабильность как исходного препарата протосубтилина, так и ПЭГ-протосубтилина (содержание ПЭГ 33 %). Результаты опытов представлены на рис. 4. Стабилизирующее влияние буры хорошо выявляется в случае немодифицированного протосубтилина – после 60 минут сохраняется больше 27 % от исходной активности фермента. В случае ПЭГ-протосубтилина положительный эффект буры менее заметен, но благодаря суммарному эффекту ПЭГ и буры в образце СМС сохраняется 40 % от исходной активности протосубтилина. Варьирование содержания буры в СМС от I до 5 % показало, что оптимальной является добавка I %.

Т а б л и ц а 2

Влияние декстринов на сохранение протеолитической активности в СМС при 37 °С и  $\varphi = 70-80\%$ .

№ пробы	Характеристика добавок	Активность, нкат/г СМС			
		исходный	7-й день	14-й день	сохранение % от исх.
1	протосубт. + декс(5)перборат	113	100	53	46,9
2	протосубт. + декс(10)перборат	160	126	100	62,5
3.	протосубт. + декс(30)перборат	160	120	126	78,7
4	декс(10)протосубт. + декс(10)перборат	139	120	113	81,3
5	декс(5)протосубт. + декс(5)перборат	126	126	100	79,4
6	протосубт. + перборат (сравнение)	100	37	33	33

Примечание: цифра обозначает содержание декстрина в препарате в %.

Борную кислоту добавляли в модельную СМС, содержащую 15 % отбеливателя вместе с хлористым кальцием. Основываясь на литературных данных [18] использовали 2%-ную добавку борной кислоты, а хлористый кальций вводили в СМС от 0,25 до 1 %. Результаты, характеризующие рабочую стабильность протосубтилина при вышеприведенных добавках, приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Рабочая стабильность протосубтилина в СМС  
в присутствии борной кислоты и хлористого кальция

№ пробы	Добавки и их содержание в СМС	Активность протосубтилина в растворе СМС			
		исходная нкат/ми	после 60 мин		
			нкат/мл	% от исх.	
1	2 % $H_3BO_3$ + 1 % $CaCl_2$	4,5	1,8	42,2	
2	2 % $H_3BO_3$ + 0,75 % $CaCl_2$	3,3	1,7	51,5	
3	2 % $H_3BO_3$ + 0,5 % $CaCl_2$	3,6	1,7	47,2	
4	2 % $H_3BO_3$ + 0,25 % $CaCl_2$	4,1	1,8	43,9	
5	без добавок	3,5	0,5	14,3	

По данным таблицы 3 можно убедиться, что одновременное включение в СМС хлористого кальция и борной кислоты в рабочих условиях оказывает значительный стабилизирующий эффект на протосубтилин.

Изменение содержания хлористого кальция в рассматриваемой области мало влияет на сохранение активности протосубтилина. Во всех пробах после 60 минут сохраняется больше 40 % от исходной активности фермента. Полученные нами данные подтверждают положение, о том, что борная кислота или другие соединения бора, освобождающие в растворе  $H_3BO_3$ , вместе с ионами кальция образуют структуру, стабилизирующую нативную конформацию белка [18].

Подытоживая вышеприведенное, можно сказать, что с целью стабилизации протосубтилина в среде, содержащей поверхностно-активные вещества и окислительный отбеливатель, эффективным оказывается комбинированный способ. Одновременно со стабилизированием (гранулированием) пербората натрия, защищающем протосубтилин в режиме хранения СМС, надо включить в композицию добавки, стабилизирующие фермент в режиме работы.

#### Л и т е р а т у р а

1. K r a v e t z L., G u i n K.F. Effect of surfactant structure on stability of enzymes formulated into

laundry liquids // J. Am. Oil Chem. Soc. - 1985. - Vol. 62. - N 5. - P. 943.

2. G o z l e r P. Enzyme und ihre Verwendung in Waschmitteln // Wäscher. - und Reinig.-Prax. - 1985. - Vol. 34. - N 12. - S. 9.

3. D a v i d s o h n A., M i l w i d s k y B.M. Synthetic detergents. - London, 1972.

4. V a n E e J.H., V e r s c h o o r G.J. Lower wash temperatures and detergent proteases // Comunicaciones presentadas a las XVIII Jornadas del comité español de la detergencia; Marzo, 1986.

5. K u z e l P., L i e s e r Th., D a n k o w s k i M. Diperoxydodecandisäure (DPDDA) - neues Bleichenmittel für den Waschprozeß bei niedrigen Temperaturen // Seifen, Öle, Fette, Wäsche. - 1985. - Bd. 111. - N 15-1. - S. 448.

6. A.c. 707955 (СССР). Способ получения гранулированного порошкообразного ферментсодержащего мощного средства/ ВНИ и ПИ Хим. пром.; Авт. изобрет. Л.И. Бавика, Т.Е. Зингер, Н.И. Ирлинская. - Заявл. 04.04.77. № 2471790/23-04, опубли. 5.01.80, МКИ C11D II/02.

7. A.c. 929703 (СССР). Способ получения гранулированного ферментсодержащего мощного средства / ВНИ и ПИ Хим. пром., Авт. изобрет. Г.Е. Зингер, Н.И. Ирлинская, Л.И. Бавика. - Заявл. 9.07.80 № 2954758/23-04, опубли. 23.05.82, МКИ C11D II/02, C11D 3/386.

8. Pat. 4421664 (USA). Compatible enzyme and oxidant bleaches containing cleaning composition / Economics Lab.; Anderson C.R., Oakes T.R. - Filed 18.06.82 N 389617, publ. 26.11.75., Int. cl. C11D 3/386, 17/00.

9. Pat. 3344104A1 (ФРГ). Zur Verwendung in pulverförmigen Waschmitteln geeignete Enzymzubereitung. / Henkel KGaA.; Witthaus M., Pawelczyk H., Weiss A.C. - Anmeldet. 07.12.83. N P3344104. offenl. 13.06.85., Kl. C12N 11/14, C11D3/388.

10. Pat. 4482630 (USA). Siliconate-coated enzyme. / Colgate-Palmolive Co., Allen E., Dillarstone A., Reul A. - Filed 21.11.83. N 554094, publ. 13.11.84., Int. Cl. C11D 17/06.

11. Pat. 85168385 (Japan Kokai). Production of granules containing enzymes as cleansing agents. / Showa Denko K.K.; Nishinaka M., Jijma H. - Filed 09.02.84, publ. 31.08.85, Int. Cl. C12N 9/98.

12. Pat. 1415301 (GB). Enzyme-containing granule. Duncan A.H., Potter R.E. - Filed 18.11.71 N 53579/71, publ. 13.11.75., Int. Cl. C11D 3/386, 17/00.

13. Pat. 59194000 (Japan Kokai). Bleaching detergent compositions / Kao Corp.; Filed 18.04.83., publ. 02.11.84., Int. Cl. C11D 7/54.

14. Pat. 8584398 (Japan Kokai). Bleaching agents for laundry detergents / Nippon Clement K.K. Filed 15.10.83., publ. 13.05.85, Int. Cl. C11D 3/395.

15. T a k a n a s h i K., N i s h i m u r a H., Y o s h i m o t o T., O n a d a M. Polyethylene glycol-modified enzymes trap water on their surface and exert enzymic activity in organic solvents // Biotechnol. Lett. - 1984. - Vol. 6. - N 12. - P. 765.

16. A b u c h o v s k i A., D a v i s F.F. Preparation and properties of polyethylene glycol-trypsin adducts // BBA. - 1979. - Vol. 579. - N 1. - P. 41.

17. Pat. 4272396 (USA). Enzyme-containing detergent composition. / Lion Fat and Oil Co.; Kazuaki Fukano, Ry-nichi Nakagawa. - Filed 20.11.79, publ. 9.06.84., Int. cl. C11D 3/386, 7/42.

18. Pat. 4537706 (USA). Liquid detergent containing boric acid to stabilize enzymes. / The Procter and Gamble Co., Severson R.G. - Filed 14.05.84. N 609944, publ. 27.08.85., Int. Cl. cC11D 1/14, 7/42.

19. А р о н и к Б.М., Р и й к у р и с А.В., Б р о н ф м а н Э.Е. Ароматизация синтетических моющих средств с энзимами. Экспресс-информ. // Хим. промышленность. - Сер. Промышленность товаров бытовой химии. - Вып. 9. - 1984. - С. 1-6.

20. ТУ-6-09-2508-72. Натрий надборноокислый четырехводный (перборат натрия). Введены 01.01.73

M. Kreen, M. Laasik,  
A. Menert

Stability of Proteolytic Enzymes in the  
Presence of Oxygen-Releasing Compounds  
and Surfactants

Abstract

The stability of alkaline protease of *Bac. subtilis* in operating and storage conditions in detergent media in the presence of oxygen-releasing agent - sodium perborate - was investigated. In comparison, the stability of "Novo Ind." proteases Alcalase and Esperase in the same conditions was studied and it was found that their stability is considerably higher. Possibilities for increasing the stability of alkaline protease from *Bac. subtilis* by means of several additives and modifiers were investigated.

It was established that if we treat the bleaching agent - sodium perborate - with modifiers as polyethylene-glycol or dextrans and simultaneously introduce calcium chloride and boric compounds into the detergent, it results in considerable stabilization of alkaline protease of *Bac. subtilis*.

№ 633

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

БИОТЕХНОЛОГИЯ II

УДК 536.54:577.15.062

Программы для оптимизации биокаталитических процессов. Сообщение III. Первичная обработка результатов микрокалориметрических экспериментов.

Кёстнер А.И., Эббер Э.А. - Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 3-14.

Предложена математическая модель тепловыделения для анаэробной ферментации в закрытых системах. Анализ этой модели подтвердил необходимость вычисления первой производной и интегралов тепловыделения на первом этапе обработки экспериментальных данных. Для первичной обработки составлен блок программ. Начальные данные записывались на магнитный носитель и затем проводили их сглаживание методом кубических сплайнов. В блок программ были включены программы для получения начальных файлов соответственно по предложенной модели и программы для графического изображения результатов. Программы реализованы в CP/M операционной системе.

Для примера описана кривая, полученная калориметрически в анаэробных условиях с микроорганизмом *Vac. pasteurianus*.

Рисунков - 5, таблиц - I, библиографических наименований - 5.

УДК 541.653.3:547.455

Исследование мутаротации моносахаридов микрокалориметрическим методом. Курвитс М.А., Сиймер Э.Х. - Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 15-25.

В реакциях гидролиза дисахаридов суммарное изменение энтальпии включает в себя также изменение энтальпии реакции мутаротации образующихся моносахаридов. Для исследования мутаротации моносахаридов использовали проточную си-

7099

стему микрокалориметра ЛКБ 2277. Определены значения констант скорости мутаротации некоторых моносахаридов микрокалориметрическим методом с целью дальнейшего использования полученных величин для корригирования термохимических кривых ферментативного гидролиза дисахаридов. Уточнены величины эффективного объема проточных измерительных ячеек (flow mix, flow through) микрокалориметра ЛКБ-2277 при различных проточных скоростях.

Рисунков - 2, таблиц - 2, библиографических наименований - 15.

УДК 579.24:576.8.095.25

Исследование кинетики действия иммобилизованных клеток. II. Измерение и расчет кинетических параметров иммобилизованных клеток дрожжей.

Калбин Г.Г. - Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 26-34.

Величины кажущихся кинетических параметров иммобилизованных клеток дрожжей существенно зависят от внешнего и внутреннего диффузионных сопротивлений. Найденные экспериментально значения кажущихся кинетических параметров определены при варьировании размеров частиц геля, содержащего иммобилизованные клетки, и кажущейся величины модифицированного модуля Тиле, показывающего степень внутридиффузионного лимитирования.

Рисунков - 3, библиографических наименований - 5.

УДК 547.457.6,577 152.24

Характеристика ферментного комплекса и применение его при получении циклодекстринов.

III. Предварительная обработка крахмала как сырья для синтеза циклодекстринов. Кросинг В.А. - Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 35-40.

Вязкость 10-30% крахмальных клейстеров уменьшали обработкой при 70 °С амилосубтилином IOX или сырой циклодекстринтрансферазой Вас. masegans. Уменьшение вязкости до 4000 сР происходит без глубокого осахаривания (Д.Э. < 5).

Рисунков - 4, таблиц - I, библиографических наименований - 7.

Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов. I. Изучение динамики биосинтеза глюканотрансферазного комплекса *Bacillus macerans*  
Пальм Т.Б., Вокк Р.А., Пейпман Э.М., Кестнер А.И.  
– Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 41–48.

В настоящей работе изучается динамика биосинтеза гликозилтрансферазного комплекса, применяемого для получения циклодекстринов культурой *Bacillus macerans* штамм ВКМВ–506 при различных условиях выращивания.

Выяснено, что активность фермента выше при температуре выращивания культуры в 37<sup>0</sup>. При культивировании бактерий в ферментере без аэрации с перемешиванием активность фермента достигает максимума уже за 85 часов, в то время, как при выращивании культуры в колбах для этого потребовалось 144 часа и более. Обсуждается роль источника углерода в процессе роста культуры и динамике биосинтеза гликозилтрансферазного комплекса.

Рисунков – 2, библиографических наименований – 10.

УДК 547.962.3:536.628.3

Калориметрическое исследование нативности препарата сывороточного альбумина. Фриеденталь М.К., Игнат А.В., Кропочев А.В. – Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 49–56.

Изучали нативность белка методом дифференциальной сканирующей калориметрии на примере альбумина, полученного по методу Кону и представленного станцией переливания крови при Минздраве ЭССР. Использовали 5%-ный раствор альбумина в 0,05 М Трис-НСI буфере с рН 8,05 в количестве одной пробы 30 мкл и ДСК фирмы Du-Pont. Сканировали по температуре со скоростью 10 град/мин, в интервале температур 35–90 °С.

Установлено, что при тепловой необратимой денатурации альбумина в области температур 60–75 °С наблюдается интенсивное поглощение тепла. Эндотермический максимум имеет тенденцию смещаться в сторону более высоких температур и увеличивается по мере возрастания степени денатурации. Полное исчезновение теплового эффекта наблюдалось после 10 минут обработки раствора при 75 °С.

Предложено использовать тепловые эффекты для характеристики относительной нативности белковых препаратов.

Рисунков – 5, библиографических наименований – 4.

УДК 637.344.8:637.48

Пенообразующая способность белков подсырной сыворотки. Фриеденталь М.К., Игнат А.В. – Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 57–66.

Исследовали пенообразующие свойства белков подсырной сыворотки с целью разработать препараты заменителей яичного белка в кондитерской промышленности. В качестве сырья использовали обезжиренный микрофилтрацией концентрат сывороточных белков (МКСБ) выпускаемый Выруским комбинатом молпродуктов (ЭССР). Пенообразующие свойства (пенообразующая способность раствора, кратность и стабильность пены) оценивали в зависимости от термообработки (температуры и продолжительности обработки), pH среды и концентрации раствора. Установлено, что для получения стойкой пены из раствора МКСБ необходимо провести его предварительную обработку при температуре 70–80 °С и pH 3,7–4,0 в течение 10–15 мин. Термообработка белка приводит к образованию гелевой структуры и повышению вязкости раствора, обуславливающих стойкость пены. Желательная концентрация 9–10 г МКСБ/100 г раствора.

Рисунков – 5, таблиц – 2, библиографических наименований – 14.

УДК 66.023.23:577.154.25

Гидролиз лактозы в барботажном биокаталитическом реакторе. Паппель К.Э., Теаро Э.Н., Уус Э.Г. - Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 67-75.

Изучен процесс гидролиза лактозы в молочной сыворотке в барботажном биокаталитическом реакторе БКР-5. Гидролиз осуществлен с помощью иммобилизованной на минеральных и органо-минеральных носителях грибной  $\beta$ -галактозидазой при концентрациях субстрата от 5 до 15 % и расходе 13-15 л/ч. Гидролиз проведен при температуре 40° и pH среды 4,5-4,6. Достигаемая степень конверсии субстрата 70-77 %.

Показана применимость реактора ВКР-5 для проведения процесса гидролиза лактозы с помощью иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы.

Рисунков - I, таблиц - 2, библиографических наименований - II.

УДК 577.15.022:577.152.24+547.458.61

Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов. П. Выделение и основные свойства циклодекстринглюканотрансферазы. Паппель К.Э., Вокк Р.А. - Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 76-82.

Изучены свойства I,4- $\alpha$ -D-глюкан-4- $\alpha$ -D-(I,4- $\alpha$ -D-глюкано) трансферазы из *B. macerans*. Культуральная жидкость фермента концентрирована путем ультрафильтрации на мембранах типа Pellicon. Концентрат очищен путем осаждения органическими растворителями. Исследованы pH-, температурная и субстратная зависимость активности полученного препарата. Определена температурная стабильность фермента в 0,05 М растворе фосфатного буфера.

Рисунков - 5, таблиц - 4, библиографических наименований - 4.

Стабильность протеолитических ферментов в присутствии окислителей и поверхностно-активных веществ. Креэн М.И., Лаасик М.А., Менерт А.А. - Труды Таллинского политехнического института, 1987, № 633, с. 83-96

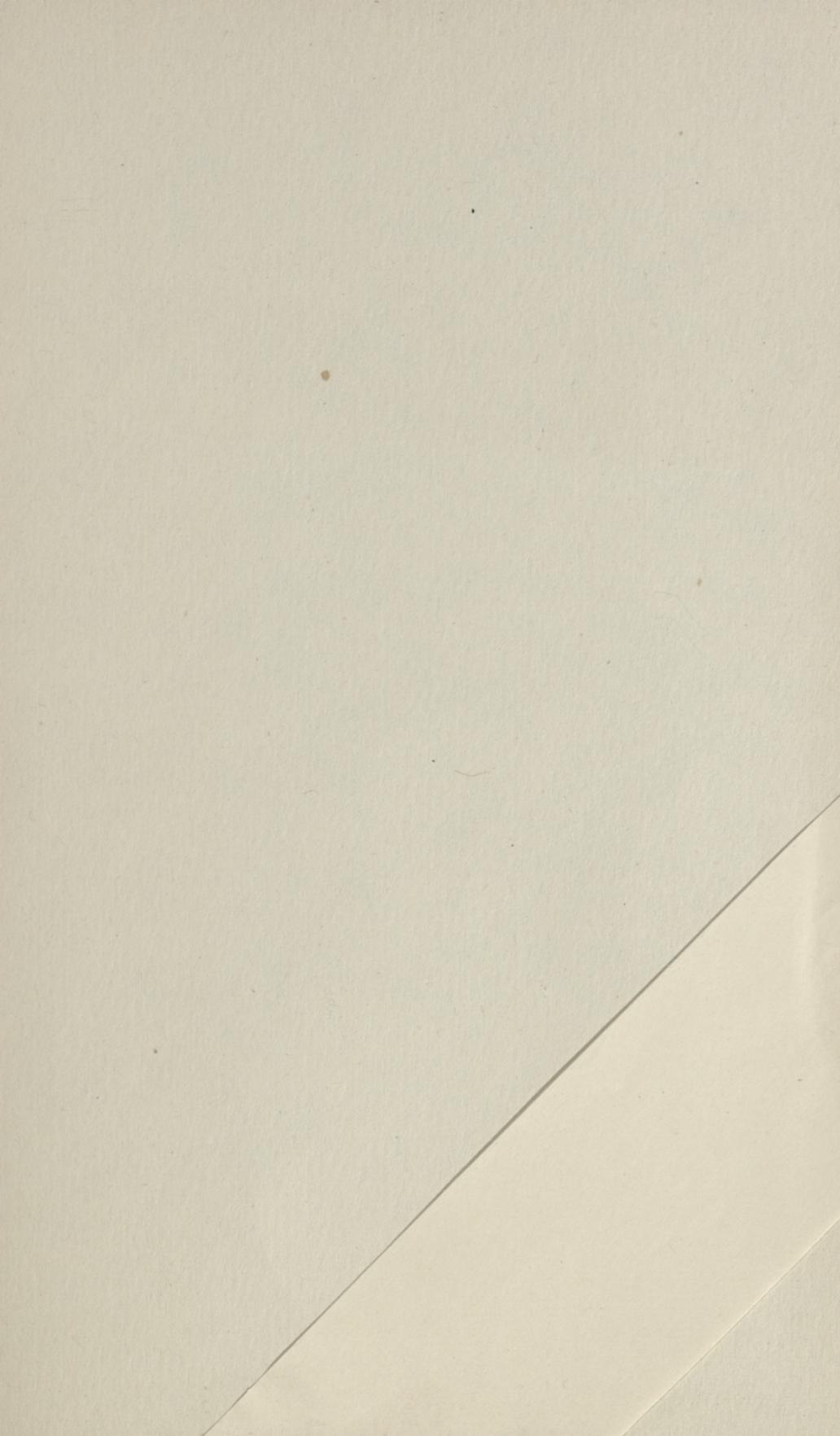
Изучали стабильность отечественной щелочной протеазы из *Bac. subtilis* (протосубтилина) в различных средах и сравнивали со стабильностью щелочных протеаз фирмы "Ново" в тех же условиях. Обнаружили сильную инактивацию протосубтилина под действием окислительного отбеливателя пербората натрия и поверхностно-активных веществ, используемых в составе синтетических моющих средств.

Изучали различные пути повышения стабильности протосубтилина в моющих средствах, содержащих перборат натрия. Выяснили, что при стабилизации протосубтилина эффективным оказывается комбинированный способ, включающий модификацию окислителя и введение в композицию соединений бора и кальция хлористого.

Рисунков - 4, таблиц - 3, библиографических наименований - 20.







Цена 80 коп.