

№ 6.7  
383

TALLINNA POLYTEHNILISE  
INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО  
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 383

СБОРНИК СТАТЕЙ  
ПО  
ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ  
ТЕХНОЛОГИИ XXXVIII

(Технология пищевых производств У)



Ep.6.7

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED  
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 383

1975

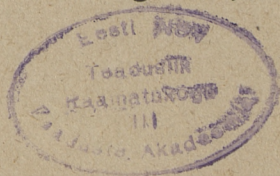
УДК 664  
557.15

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

(Технология пищевых производств У)

Таллин 1975

© ТПИ, Таллин, 1975



Э.Х. Сиймер, М.О. Мандель

### О pH-ЗАВИСИМОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

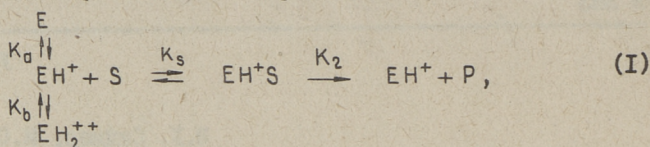
Для ферментативных реакций характерна сильная зависимость скорости их протекания от pH-среды. Как известно, при крайних значениях pH (в сильноокислой и сильнощелочной средах) происходит необратимая денатурация ферментов. При средних значениях pH-зависимость скорости ферментативной реакции (т.е. активности ферментов) обычно выражается колоколообразной кривой с одним максимумом, соответствующий которому pH называется pH-оптимумом. pH-оптимум, зависящий от структуры фермента, и в меньшей степени от природы субстрата, находится в пределах 1,8-9,0, и часто (но не всегда) близок изоэлектрической точке фермента.

Влияние pH-среды на скорость ферментативных реакций обусловлено тем, что ферменты содержат способные к ионизации группы ( $\alpha$ -карбоксыльная,  $\alpha$ -аминогруппа, карбоксыльные и аминогруппы в дикарбоновых и диаминокислотах, сульфгидрильная группа цистеина, фенольный гидроксил тирозина, амидазольное кольцо гистидина, гуанидиновая группировка аргинина и т.д.) [1], имеющие значения pH от 3 до 13 [2; с. 112]. Наибольшее значение, по-видимому, имеет характер ионизации групп активного центра и близлежащих функциональных групп.

В настоящее время pH-зависимость ферментативных реакций очень часто рассматривается, исходя из предположения, что способные к ионизации группы принадлежат непосредственно к активным центрам ферментов и участвуют в образовании фермент-субстратных комплексов. При этом ионы  $H^+$  и  $OH^-$  можно рассматривать как конкурентные ингибиторы ферментов. Предполагается, что из трех различных ионных форм фермента

(активного центра) только одна обладает каталитической активностью и эта форма преобладает при рН-оптимуме.

Описанный случай соответствует схеме



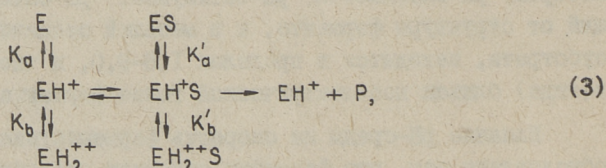
где

$$K_a = \frac{[E] \cdot [H^+]}{[EH^+]} \quad \text{и} \quad K_b = \frac{[EH^+][H^+]}{[EH_2^{++}]}$$

Стационарная скорость реакции в этом случае выражается уравнением

$$V = \frac{K_2 [E]_0 [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b}\right)} \quad (2)$$

В.А. Яковлев [2, с.109] рассматривает и более сложный случай, когда ионы водорода неконкурентно ингибируют фермент согласно схеме



где

$$K'_a = \frac{[ES][H^+]}{[EH^+S]} \quad \text{и} \quad K'_b = \frac{[EH^+S][H^+]}{[EH_2^{++}S]}$$

В этом случае уравнение скорости имеет вид:

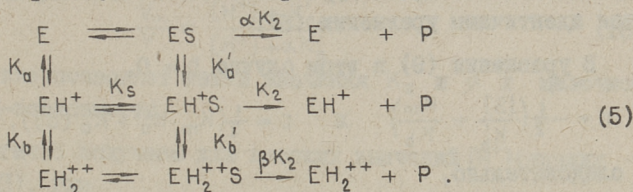
$$V = \frac{K_2 [E]_0 [S]}{K_m \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b}\right) + [S] \left(1 + \frac{K'_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b}\right)} \quad (4)$$

По экспериментальным данным можно найти значения  $K_a, K_b, K'_a, K'_b$ . Значения констант диссоциации некоторых свободных ферментов и фермент-субстратных комплексов сосредоточены, например, в краткой химической энциклопедии [3, с.418].

Мы считаем целесообразным рассматривать влияние рН на скорость ферментативных реакций в более общем виде, считая,

что происходит частичное некооперативное ингибирование с ионами водорода и гидроксидов, т.е. комплексы  $ES$  и  $EH_2^{++}S$  тоже могут быть продуктивными. Естественно, обобщенному уравнению скорости должны подчиняться все частные случаи, в том числе и рассмотренные выше случаи.

Таким образом, общая схема реакций будет иметь вид:



Стационарная скорость

$$V = K_2[EH^+S] + \alpha K_2[ES] + \beta K_2[EH_2^{++}S]. \quad (6)$$

Так как

$$[ES] = \frac{[EH^+S]K'_a}{[H^+]} \quad \text{и} \quad [EH_2^{++}S] = \frac{[EH^+S][H^+]}{K'_b}, \quad (7a)$$

$$V = K_2[EH^+S] \left( 1 + \frac{\alpha K'_a}{[H^+]} + \frac{\beta [H^+]}{K'_b} \right). \quad (7b)$$

Применяя для схемы (5) метод графов, уравнение скорости после некоторых преобразований выражается следующим образом (имеется в виду, что  $K_s \approx K_m$ ):

$$V = \frac{K_2[E]_0 \left( 1 + \frac{\alpha K'_a}{[H^+]} + \frac{\beta [H^+]}{K'_b} \right) [S]}{K_m \left( 1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K'_b} \right) + [S] \left( 1 + \frac{K'_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K'_b} \right)}. \quad (8)$$

Дифференцированием уравнения (8) можно найти значение оптимальной концентрации водородных ионов, при которой скорость ферментативных реакций максимальна,

$$[H^+]_{opt} = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}, \quad (9)$$

где

$$b = \alpha K'_a \left( \frac{K_m}{K_b} + \frac{[S]}{K'_b} \right) - \frac{\beta}{K'_b} ([S] \cdot K'_a + K_a \cdot K_m),$$

$$a = \frac{1}{2} \left[ \frac{\beta}{K'_b} (K_m + [S]) - \frac{[S]}{K'_b} + \frac{K_m}{K_b} \right],$$

$$c = \frac{1}{2} [K_m(K_a - \alpha K'_a) + K'_a [S](1 - \alpha)].$$

Рассмотрим некоторые частные случаи схемы (5) и возможности практического определения констант, входящих в уравнение (8).

1)  $\alpha = 0$ ,  $\beta = 0$ , т.е. ингибирование является полным. Легко убедиться в том, что уравнение (8) в этом случае становится идентичным уравнению (5).

В уравнении (9) в этом случае  $b = 0$ ,

$$a = -\frac{1}{2} \left( \frac{[S]}{K'_b} + \frac{K_m}{K_b} \right) \quad \text{и} \quad c = \frac{1}{2} (K_m \cdot K_a + K'_a [S]),$$

и, следовательно,

$$[H^+]_{\text{онт}}^2 = \frac{K_m K_a + K'_a [S]}{\frac{[S]}{K'_b} + \frac{K_m}{K_b}}. \quad (\text{I0})$$

Если принимать, что  $K_m \cdot K_a \ll K'_a [S]$  и  $\frac{K_m}{K_b} \ll \frac{[S]}{K'_b}$ , что в общем случае справедливо при  $K_m \ll [S]$ , то

$$[H^+]_{\text{онт}} = \sqrt{K'_a K'_b}. \quad (\text{II})$$

2)  $K'_a = 0$ ,  $K'_b = \infty$ , т.е. ингибирование является чисто конкурентным. В этом случае  $\alpha$  и  $\beta$  не имеют смысла, а уравнение (8) упрощается до уравнения (2).

В этом случае

$$[H^+]_{\text{онт}} = \sqrt{K_a K_b}. \quad (\text{I2})$$

3)  $K_a = K'_a$ ,  $K_b = K'_b$ .

Уравнение (8) упрощается до

$$V = \frac{K_2 [E]_0 [S] \left( 1 + \frac{\alpha K_a}{[H^+]} + \frac{\beta [H^+]}{K_b} \right)}{(K_m + [S]) \left( 1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b} \right)}. \quad (\text{I3})$$

В общем случае для определения констант  $K_a, K_b, K'_a, K'_b, \alpha$  и  $\beta$  нужны эксперименты в двух областях концентраций субстрата, при  $[S] \gg K_m$  и  $[S] \ll K_m$ .

При  $[S] \gg K_m$  уравнение (8) приобретает вид

$$V = \frac{K_2 [E]_0 \left( 1 + \frac{\alpha K'_a}{[H^+]} + \frac{\beta [H^+]}{K'_b} \right)}{\left( 1 + \frac{K'_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K'_b} \right)}. \quad (\text{I4})$$



При низких значениях  $[H^+]$  (при высоких значениях pH)  $\frac{[H^+]}{K'_b} \approx 0$  и, следовательно,

$$V = \frac{K_2 [E]_0 \cdot ([H^+] + \alpha K'_a)}{[H^+] + K'_a} \quad (15)$$

Обозначая через  $V_m = K_2 [E]_0$  максимальную скорость реакции, получаем

$$\frac{V_m}{V} = \frac{[H^+] + K'_a}{[H^+] + \alpha K'_a} \quad (16)$$

Это уравнение позволяет найти значения  $K'_a$  и  $\alpha$  в щелочной области pH-зависимости.

Аналогично получаем для высоких значений  $[H^+]$  (низких значений pH), где

$$\frac{V_m}{V} = \frac{K'_b + [H^+]}{K'_b + \beta [H^+]}, \quad (17)$$

откуда можно найти значения  $K'_b$  и  $\beta$ .

При очень низких концентрациях субстрата, т.е. при  $[S] \ll K_m$  уравнение (8) приобретает вид

$$V = \frac{K_2 [E]_0 [S] \left(1 + \frac{2K'_a}{[H^+]} + \frac{\beta [H^+]}{K'_b}\right)}{K_m \left(1 + \frac{K_a}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_b}\right)}, \quad (18)$$

которое также надо проанализировать отдельно в области низких и высоких pH.

## Л и т е р а т у р а

1. Химия биологически активных природных соединений. Под ред. Н.А. Преображенского и Р.П. Евстигнеевой. "Химия", М., 1970, с.231.
2. В.А. Яковлев. Кинетика ферментативного катализа. "Наука", М., 1965.
3. Краткая химическая энциклопедия, т.5, "Сов.Энци.", М., 1967.

E. Siimer, M. Mandel

On the pH-dependence of the  
Enzymatic Reactions

Summary

The general form of the kinetic equation is proposed, considering the partial noncompetitive inhibition of enzyme by the hydrogen and hydroxyl ions. The possible ways of the calculation of the equilibrium constants from the experimental data have been discussed.

УДК 577.154.25.04.002.237

К.Э. Пашпель, А.И.Кёстнер,  
А.С.Тихомирова,  
Н.А.Загустина, Е.В.Летунова

### ИММОБИЛИЗАЦИЯ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ НА НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ

Гидролиз лактозы в молочных продуктах при помощи иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы, лактазы (КФ 3.2.1.23), является перспективным при получении диетических продуктов для людей, страдающих лактазной недостаточностью, при концентрировании молока и молочной сыворотки или подготовке молочных концентратов для хранения в замороженном состоянии и т.д.

Для создания промышленных процессов гидролиза лактозы необходимо разработать эффективные методы иммобилизации  $\beta$ -галактозидазы. Способ иммобилизации  $\beta$ -галактозидазы в полиакриламидном геле описан нами ранее [1,2]. Недостатками гелевого препарата является его сжимаемость, приводящая к ухудшению гидродинамических свойств колонок при их длительной работе и недостаточная для промышленных процессов активность. С целью улучшения гидродинамических показателей колонок и достижения повышенных активностей препарата иммобилизованного фермента в данной работе изучена иммобилизация  $\beta$ -галактозидазы на неорганических носителях. Иммобилизация  $\beta$ -галактозидазы на неорганических носителях описана в литературе [3-8], но применение в этих целях отечественных кремнеземных материалов нам неизвестно. Изучение возможности иммобилизации  $\beta$ -галактозидазы на отечественных пористых стеклах и силихромах явилось целью настоящей работы.

## Материалы и методы

Работу проводили с грибной  $\beta$ -галактозидазой, выделенной в Институте биохимии им. А.Н.Баха, с активностью 250 Е/г (удельная активность 3,1 Е/мг). Активность иммобилизованного фермента определяли в реакторе перемешивания по описанной нами методике [1]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мк-моля субстрата (о-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид) или лактозы (при pH = 4,2, 30 °C за 1 мин).

В качестве носителя использовали пористое стекло и силихромы. Пористое стекло, предоставленное нам Ленинградским политехническим институтом (ЛПИ), имело диаметр пор 1000 Å, стекло, предоставленное сектором биохимии Института кибернетики АН ЭССР (ИК), имело диаметр пор 1500-1700 Å и удельную поверхность 20 м<sup>2</sup>/г. Силохромы производства опытного Горьковского завода ВНИИ НП характеризованы радиусом пор от 250 до 1000 Å и удельной поверхностью от 20 до 98 м<sup>2</sup>/г. Исследованы марки силохрома СХ-1; СХ-2; СХ-3.

Активирование пористого стекла, полученного из ЛПИ, проводилось в нашей лаборатории двумя способами. Ниже указаны условные индексы применяемых в дальнейшем партий стекла:

С-1 - обработано  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом с целью введения алифатических аминогрупп;

С-2 - обработано диизоцианатом адипиновой кислоты с целью введения изоцианатных групп.

Первым методом проводилась также активация силохрома. Пробы пористых стекол, полученные из ИК, были предварительно активированы и имели следующие группы:

С-3 - алифатическая аминогруппа,

С-4, С-5 - ароматическая аминогруппа,

С-6 - изоцианатная группа,

С-7 - изоцианатная группа с удлинителем,

С-8 - альдегидная группа.

Связывание с носителем, содержащим аминогруппы, проводилось с помощью глутарового альдегида. Для этого к ферментному раствору, приготовленному в 0,2 М ацетатном или фосфатном буфере

при указанном рН, добавляли определенное количество глутарового альдегида. В полученном растворе через 30 мин суспендировали носитель. Связывание проводилось или при температуре 4 °С или 20 °С в течение 5-24 часов. Полученные препараты многократно промывались 0,2 М ацетатным буфером рН 4,2, 1 М раствором хлористого натрия и опять буфером. В первых пяти промывных водах определяли  $\beta$ -галактозидазную активность и на основе этого вычисляли коэффициент связывания  $\alpha$ .

Иммобилизация на носителях, содержащих изоцианатные группы, проводилась аналогично, без предварительного модифицирования фермента.

### Результаты и обсуждение

Исследование иммобилизации  $\beta$ -галактозидазы на пористом стекле показало, что фермент можно успешно связывать с пористым стеклом, покрытым первичными аминогруппами. Пористое стекло, имеющее изоцианатные группы, не оправдало себя как носитель. Изучение зависимости эффективности иммобилизации от значения рН исходного ферментного раствора показало, что в частности для первого способа иммобилизации значения коэффициентов иммобилизации мало зависят от рН в пределах от 4,2 до 7,5. Результаты опытов, которые в основном проводились при этих крайних значениях рН, приведены в таблице I. Как видно из данных, высшие коэффициенты иммобилизации достигнуты при связывании с аминостеклом, покрытым ароматическими аминогруппами. Можно предполагать, что ароматические ядра как удлинительные цепи способствуют связыванию фермента с носителем при помощи группировок, не касающихся активного центра фермента. Активности иммобилизованной на аминостекле  $\beta$ -галактозидазы (СИГ) в 2-3 раза превышают значения, полученные связыванием в полиакриламидном геле. Уменьшение активности иммобилизованных в геле препаратов по сравнению с СИГ связано, кроме высокого диффузионного сопротивления в геле, с инактивацией фермента ввиду значительного теплового эффекта полимеризации. Кроме того, количество фермента, введенное в гель, ограничено из-за определенного объема ферментного раствора в полимеризационной смеси.

Т а б л и ц а I

Иммобилизация  $\beta$ -галактозидазы на пористом  
стекле

Номер об- разца стек- ла	Исходный раствор		Промыв- ные во- ды, ак- тив- ность, Е/Г	СИГ			
	pH	Е/Г		актив- ность Е/Г	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
C-1	7,5	51,6	31,0	9,5	60,0	44,2	18,5
C-3	7,5	34,1	10,9	7,8	68,0	33,5	22,8
C-4	7,5	34,1	9,9	11,1	71,0	45,9	32,6
C-5	7,5	34,1	13,0	13,3	61,6	63,4	39,0
C-8	7,5	34,1	15,0	7,1	55,9	37,4	20,9
C-3	4,2	31,8	12,7	4,6	60,0	24,3	14,6
C-4	4,2	31,8	12,1	9,6	62,0	48,5	30,0
C-5	4,2	31,8	9,6	11,0	69,2	49,6	34,6
C-8	4,2	31,8	10,5	8,0	67,0	37,5	25,2
C-2	7,5	62,6	45,6	4,0	28,5	15,9	6,5
C-6	7,5	34,1	30,5	1,3	10,7	35,7	3,8
C-7	7,5	34,1	26,0	2,4	23,8	30,0	7,1
C-6	4,2	31,8	30,3	0,4	4,8	25,1	1,3
C-7	4,2	31,8	24,8	3,3	22,0	47,2	10,4

Активность рассчитана на 1 грамм сухого носителя.

Исследование свойств СИГ показало, что значительных изменений при иммобилизации в pH и температурной зависимости не произошло. Оптимум температуры и pH для СИГ при гидролизе о-нитрофенил -  $\beta$ -D-галактопиранозида (НФГ) соответственно 65 °C и pH 4,2. Несколько повысилось значение энергии активации, которое при гидролизе НФГ равно 9,0 ккал/моль гр. (для свободного - 6,9 ккал/моль гр.). Значения кажущихся  $K_M$ , рассчитанных после линеаризации методом Лайнувера-Берка, при гидролизе НФГ, оказались равными  $0,61 \times 10^{-3} M$ , что практически отражает свойства свободного фермента. Исследована инактивация СИГ в забуференном 5 %-ном растворе лактозы при 60 °C и 70 °C. Термическая инактивация протекает в двух стадиях. Для первой стадии, где при 60 и 70 °C инактивируется соответственно 4,5 % и 35 % фермента, коэффициенты скорости инактивации не рассчитаны ввиду высокой скорости процесса, во вто-

рой стадии константа скорости инактивации  $K_2$  при 60 и 70 °C равна  $0,23 \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$  и  $4,1 \times 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ . Изучение гидролиза 10 %-ного раствора лактозы под действием СИГ показало, что в течение 64 суток активность СИГ в колонке при 50 °C уменьшалась на 42 %. Степень гидролиза лактозы в опыте была около 30–40 %.

На следующем этапе работы исследована иммобилизация  $\beta$ -галактозидазы на силохроме. Преимуществом названного материала по сравнению с изученным нами пористым стеклом является повышенная удельная поверхность. Как видно из данных, приведенных в таблице 2, при связывании  $\beta$ -галактозидазы с силохромом, значения коэффициентов иммобилизации превышают значения, полученные при связывании с пористым стеклом. Сравнение разных силохромов показало, что лучшим носителем для  $\beta$ -галактозидазы является СХ-2, имеющий радиус пор в пределах 400–900 Å и удельную поверхность  $51 \text{ м}^2/\text{г}$ . Можно предположить, что полученные пониженные коэффициенты на силохроме СХ-3, удельная поверхность которого  $98 \text{ м}^2/\text{г}$ , зависят от небольших радиусов пор носителя. При исследовании иммобилизованной на силохроме  $\beta$ -галактозидазы (СГХ) показано, что коэффициенты скорости инактивации в 5 %-ном растворе лактозы при 60 и 70 °C сравнимы с значениями, полученными для СИГ, и равны соответственно  $0,26 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$  и  $3,57 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ . Наша работа при иммобилизации  $\beta$ -галактозидазы на силохроме продолжается в направлении оптимизации процесса связывания и исследований свойств СГХ.

Т а б л и ц а 2

Иммобилизация  $\beta$ -галактозидазы на силохроме

Силохром	Активность, Е/г		СГХ				
			Активность, Е/г			$\alpha$	$\beta$
	исходного раствора	промывных вод	по НФГ	по лактозе			
СХ-1	112	27,94	42,4	21,2	84	44,8	37,8
СХ-1,5	133	32,05	57,6	24,7	82	52,8	43,4
СХ-2	112	23,94	75,7	32,6	78,6	85,7	67,6
СХ-3	112	8,69	62,7	27,4	92	60,8	56

Кроме графы 5 все активности определены на НФГ.

Иммобилизация проводилась при 20 °C в течение 5,5 часов.

Авторы выражают искреннюю благодарность Б.В. Мгедиашвили из Ленинградского политехнического института и М. Хага из

Института кибернетики АН Эстонской ССР за предоставление образцов пористых стекол.

### Л и т е р а т у р а

1. А.И. Кёстнер, К.Э. Паппель, Р.В. Фениксова, А.С. Тихомирова, Н.А. Загустина, Е.В. Летунова. Получение и свойства иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы. - "Прикл. биохим. микробиол.", 1974, т.10, № 6, с.851-856.

2. К.Э. Паппель, А.И. Кёстнер, Р.В. Фениксова, А.С.Тихомирова. Получение иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 1974, № 367, с.35-40.

3. H.H. Wee t a l l, N.B. H a v e w a l a, W.H. P i t c h e r e t a l. Preparation of immobilized lactase. Continued studies on the enzymatic hydrolysis of lactose. - "Biotechnol. Bioengn." 1974, vol. 16, pp. 689-696.

4. P.J. R o b i n s o n, P. D u n n i l l, M.D. L i l l y. Porous glass as a solid support for immobilization or affinity chromatography of enzymes. - "Biochim. Biophys.Acta" 1971, vol. 242, No. 3, pp. 659-661.

5. V.H. E d w a r d s. Chemical reaction engineering with insolubilized enzymes. - "Enz. Technol. Dig.", 1972, vol. 1, No. 1, p. 10.

6. G.P. R o y e r. Applications of immobilized enzymes to the treatment and utilization of food plant wastes. - "Enz. Technol. Dig.", 1972, vol. 1, No. 1, p. 6.

7. J.H. W o y c h i k, M.V. W o n d o l o w s k i. Lactose hydrolysis in milk and milk products by bound fungal  $\beta$ -galactosidase. - "J. Milk Food Technol." 1973, vol. 36, No. 1, pp. 31-33.

8. E.S. O k a s, W.J. H a r p e r. Activity and stability of  $\beta$ -galactosidase immobilized on porous glass. - "J. Food Sci.", 1974, vol. 39, pp. 88-93.



K. Pappel, A. K $\ddot{o}$ stner,  
A. Tikhomirova, E. Letunova,  
N. Zagustina

Immobilisation of  $\beta$ -galactosidase on  
Inorganic Carriers

Summary

A parallel has been drawn between some methods for covalent binding of  $\beta$ -galactosidase to porous silicious materials. The kinetic properties for enzyme, immobilized by means of glutaraldehyde have been investigated. Apparent  $K_M$  has been found to be equal to 0.61 mM, the optimum activity has been obtained at 65°C pH = 4.2. The thermal inactivation of preparations in lactose solutions can be described as a two-step process. The rate constants for both steps at 60°C and 70°C have been determined. The column packed with obtained preparation was applied for continuous lactose hydrolysis at 50°C and retained about 40 p.c. of activity after 2 months work.



УДК 577.15.421:66.097

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

### ТЕРМИЧЕСКАЯ ИНАКТИВАЦИЯ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ ИНВЕРТАЗЫ

В практическом применении иммобилизованных ферментов очень важна их стабильность в разных условиях. В данной работе нами изучена кинетика термической инактивации свободной и иммобилизованной инвертазы.

#### Материалы и методы

Свободная инвертаза с активностью 53000 Е/г (уд. активность 481 Е/мг) получена путем очистки на Сефадексе Г-75 препарата "Инвертин" Донецкого пивоваренного завода [1].

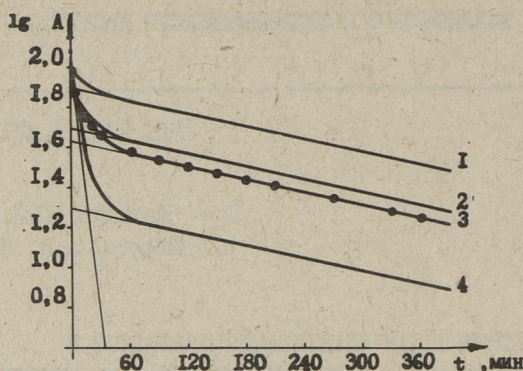
Иммобилизованная инвертаза получена бисерной фотополимеризацией смеси, состоящей из акриламида - 6,3 %, N,N'-бис-акриламида - 0,7 %, диметиламинопропионитрила - 0,25 %, надсернокислого аммония - 0,25 %, рибофлавина - 5 мг % и раствора свободной инвертазы. Методика получения препарата описана нами ранее [2].

Активность свободной и связанной инвертазы определяли по редуцирующим сахарам [3] на 7-процентном растворе сахарозы, рН-4,8 при 30 °С.

Скорость инактивации фермента определяли по снижению стандартной активности препарата после его выдержки в буфере или в растворе субстрата при 60 °С, рН 4,8.

#### Результаты и обсуждения

Изменение активности свободной инвертазы при выдержке ее в ацетатном буфере рН 4,8 при температуре 60 °С изображено на



Фиг. 1. Зависимость  $\lg A = \lg(a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t})$

при  $k_1 = 0,1 \text{ мин}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,0025 \text{ мин}^{-1}$

1.  $a_1 = 20$ ,  $a_2 = 80$

2.  $a_1 = 50$ ,  $a_2 = 50$

3.  $a_1 = 57$ ,  $a_2 = 43$

4.  $a_1 = 80$ ,  $a_2 = 20$

● - экспериментальные данные для свободной инвертазы.

Фиг. 1. Очевидно, что реакция инактивации в целом не описывается кинетикой первого порядка. Инактивация инвертазы протекает быстро в начале процесса, затем скорость инактивации уменьшается и описывается реакцией первого порядка. Данное явление, что известно также для других ферментов, обычно объясняется тем, что препараты ферментов состоят из фракций разной стабильности. По Арнольду [4] изоферменты инвертазы различаются по величине отношения полисахаридной части к белковой части в молекуле фермента. Паули и др. [5], исследуя инактивацию свободной инвертазы, рассмотрели ее, как состоящую из нескольких фракций, содержание которых в препарате равнялось

$$a_1, a_2 \dots a_n \left( \sum_{i=1}^n a_i = 100 \right).$$

Каждая фракция инактивируется по реакции первого порядка с константными инактивации соответственно  $K_1, K_2 \dots K_n$ . В этом случае активность фермента  $A$  в зависимости от времени выражается уравнением:

$$A = \sum_{i=1}^n a_i e^{-k_i t}. \quad (I)$$

Авторы принимали  $N = 5$ , не объясняя свой выбор. В литературе [6] имеются данные, что дрожжевая инвертаза содержит свыше восьми различных фракций.

По нашим данным инактивация геллинвертазы, а также и исходной свободной инвертазы хорошо описывается уравнением (I), если принимать  $N = 2$ .

$$A = a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}, \quad (2)$$

$$\lg A = \lg(a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}), \quad (3)$$

где  $A$  — количество активного фермента.

Так как экспериментальные точки (фиг. I), представленные на полулогарифмической шкале, при времени  $t > 90$  мин. практически находятся на прямой, мы считаем, что к этому времени первая фракция полностью инактивировалась и наблюдается лишь инактивация второй фракции. По экспериментальным данным легко найти величину  $k_2$ , а также  $a_1$  и  $a_2$ .  $k_2$  вычисляются по наклону прямой в области  $t > 90$  мин.,  $a_2$  по точке пересечения с осью ордината,  $a_1 = A_0 - a_2$ , где  $A_0$  — количество фермента при  $t = 0$  мин. ( $A_0 = 100\%$ ). Первая стадия инактивации в этой шкале не описывается прямой. Для этой стадии вычисляются  $k_1$  по уравнению (2), так как  $a_1$ ,  $a_2$  и  $k_2$  известны. Для свободной инвертазы в 0,05 М ацетатном буфере, рН 4,8 и при  $T = 60$  °С,  $k_1 = 0,1$  мин.<sup>-1</sup> и  $k_2 = 0,0024$  мин.<sup>-1</sup>. Теоретические кривые инактивации, вычисленные по найденным константам  $k_1$  и  $k_2$ , изображены также на фиг. I.

Учитывая, что  $k_1 \gg k_2$ , процесс инактивации достаточно хорошо описывается уже значениями  $a_1$ ,  $a_2$  и  $k_2$ . В дальнейшем даются значения только для этих величин. При этом, конечно, мы не предполагаем, что фракции  $a_1$  и  $a_2$  должны быть однородными. Однако, учитывая, линейность графика, разные изоферменты, входящие во фракцию  $a_2$ , должны иметь близкие значения констант скорости инактивации.

Известно, что присутствие субстрата (сахарозы) защищает инвертазу от термической инактивации. Для количественной оценки влияния субстрата проводились опыты определения стабильности инвертазы при 60 °С.

Результаты опытов изображены на фиг. 2.

В присутствии субстрата стабилизируются обе фракции фермента. При этом как-будто бы доля лабильной фракции за-

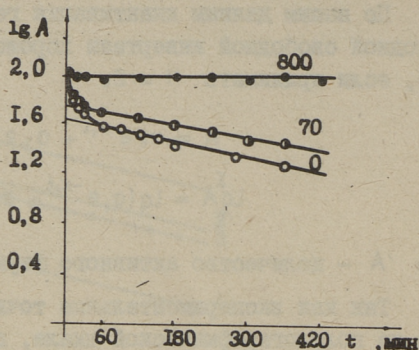
метно понижается. Если в растворе, не содержащем сахарозы, доля лабильной фракции равна 57 %, то в присутствии сахарозы ее доля уменьшается на 45 %, в растворе 70 мг/мл и на 4–5 % в растворе 800 мг/мл.

Константа скорости инактивации  $k_2$  также зависит от концентрации сахарозы. По результатам приведенных опытов найдены следующие значения:

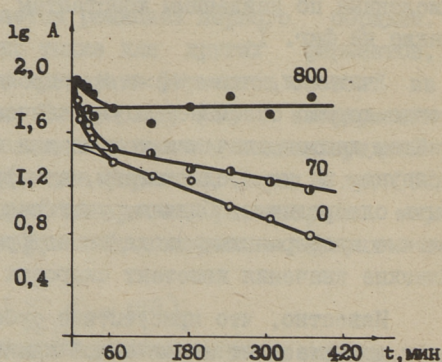
Концентрация сахарозы, мг/мл	$k_2$ , мин <sup>-1</sup>
0	0,0024
70	0,0019
800	0,0000

В растворе с концентрацией 800 мг/мл сахарозы во время опыта (продолжительность опыта 7 часов) практически не наблюдалось изменения активности геллфермента после получасового хранения раствора при 60 °С.

Термическая стабильность иммобилизованной инвертазы представлена на фиг. 3. Как видно, защитное действие субстрата наблюдается также четко, как это было характерно для свободной инвертазы. Однако, доля лабильной фракции возрастала и для концентрации сахарозы 0 и 70 мг/мл



Фиг. 2. Инактивация свободной инвертазы в растворе субстрата. Начальная активность инвертазы 54,8 Е/мл. Цифры над кривыми указывают концентрацию сахарозы в мг/мл.



Фиг. 3. Инактивация связанной инвертазы в растворе субстрата. Начальная активность геллинвертазы 35,0 Е/г. Диаметр зерен 0,25–0,5 мм. Цифры над кривыми указывают концентрацию сахарозы в мг/мл.

составляет 69 %. Константа скорости реакции инактивации  $k_2$  в концентрированном растворе сахарозы по-прежнему ничтожно мала, но ее значение для других растворов несколько возросло. В растворе без сахарозы  $k_2$  равна  $0,0044 \text{ мин}^{-1}$ , а в растворе 70 мг/мл —  $0,0022 \text{ мин}^{-1}$ . Кажется, что процесс полимеризации в некоторой мере дестабилизирует инвертазу.

### Л и т е р а т у р а

1. В.Е.Огурцова, Н.В. Батков, Д.Б. Лифшиц, Л.А. Петрова. Производство ферментного препарата инвертин на Донецком пивоваренном заводе, "Фермент. и спирт.пром-сть", 1971, № 8, с.27.

2. А.И. Кёстнер, К.А. Кивисилла, М.О.Мандель, Э.Х. Сиймер. Способ получения фермента на носителе. Заявл. 30.09.71 /21/ № I702973/28-13. Опубл. в Б.И. 1974, № 5, с. 92. М.кл. С I2 d I3/10.СССР А.С. № 414301.

3. G. T e g g e, W. N i e r l e. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker in Stärkehydrolysaten, Stärke, 1965, 17, Nr. 4, 107.

4. W.N. A r n o l d. Chromatography of a polydispersé enzyme, yeast  $\beta$ -fructofuranosidase, on DEAE-cellulose. Anal. Letters, 1969, 2, No.10, 547.

5. H. P a u l y, Ch. E g g e r t. Thermal inactivation of invertase after  $x$ -irradiation. Stud. Biophys., 1968, vol. 7, 31.

6. B. B e r g g r e n. Studies on yeast  $\beta$ -fructofuranosidase XXV. Isoenzymes of invertase, studied with isoelectric focusing. "Ark. kemi", 1970, vol. 32, No. 2, 143.

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

Thermal Inactivation of Soluble and Immobilised  
in a Polyacrylamide Gel Invertase

Summary

Invertase from yeast was purified by means of Sephadex G-75 column chromatography. Immobilised invertase was made by photo-beadpolymerisation of a mixture, containing 7 per cent acrylic monomers, purified invertase and initiators of polymerisation.

The heat inactivation at 60°C was not a first order reaction. The non-exponential inactivation curves of invertase have been calculated as sums of two exponential terms. Each exponential term represents one fraction of enzyme.

The polymerisation process causes weak heat sensitisation of invertase.

Both soluble and immobilised invertase are more stable in the presence of saccharose.



УДК 577.152:66.097.64

М.О.Мандель, Э.Э.Лепп, Т.Ю. Масинг,  
Э.Х.Сиймер, А.И.Кёстнер

### ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ ИНАКТИВАЦИИ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗЫ

Главным преимуществом иммобилизованных ферментов (ИФ) является повышенная стабильность действия их в рабочих условиях. Среди параметров, влияющих на стабильность ИФ, можно отметить температуру, рН, концентрацию эффекторов, в том числе субстрата и продуктов ферментативного процесса и др.

Хотя в последние годы достигнуты значительные успехи в получении стабильных препаратов иммобилизованной различными методами бензилпенициллинамидазы [1-4], до сих пор никем не обсуждалось и количественно не описывалось влияние среды на стабильность иммобилизованной пенициллинамидазы (ИПА).

Это неизбежно, так как ИПА широко применяется в производстве 6-аминопенициллановой кислоты [5] и перспективна в осуществлении ацилирования аминокислоты с различными ацильными остатками [6].

Нами было показано [4], что при полимеризации смеси акриламида, N,N'-метилена-бисакриламида и пенициллинамидазы (ПА), можно получить нерастворимую активную ИПА, стабильность которой оказалась выше по сравнению с нативной ПА. Однако имеющиеся в литературе данные о стабильности ИПА отличаются противоречивостью, что побудило нас детально исследовать этот вопрос. Было исследовано влияние рН и температуры на реакцию инактивации пенициллинамидазы.

#### Материалы и методы

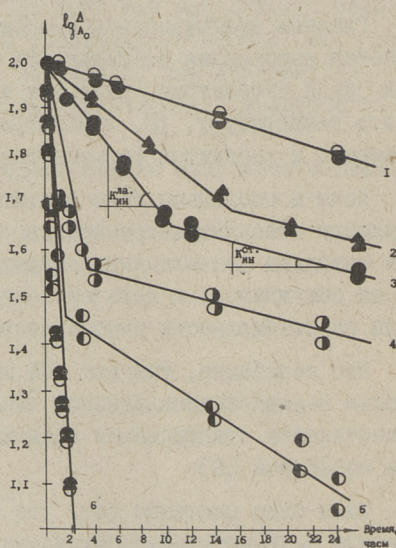
Иммобилизация ПА (полученной от Рижского завода медпрепаратов) с различной степенью очистки, проводилась по опи-

санной нами ранее методике [4] с той разницей, что вместо фотополимеризации использовалось окислительно-восстановительное инициирование в присутствии бифункциональных реагентов (глутаральдегида (ГА) и диазида винной кислоты (ДАВК)) и инициатора N,N,N',N'-метилэтилендиамина. Определение и вычисление активности [4] ИПА проводили в условиях гидролиза 17 мМ бензилпенициллина (БП) - при температуре 40 °С и рН 7,5 с автоматическим титриграфом (Дания, ТТТ-2), и выражалась в микромолях продукта в час на грамм влажного материала. Синтез диазида винной кислоты проводили по описанному методу [7].

### Результаты и обсуждение

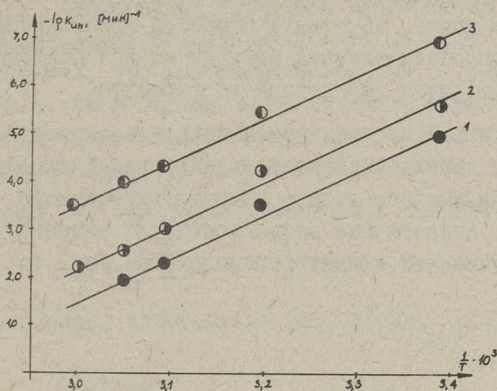
Исследование инактивации ИПА проводилось в буферных растворах с рН 3,5-9,5 при различных температурах (0 - 60°). Параллельно исследовалась инактивация нативной пенициллинамидазы.

Как видно из фиг. 1, инактивация иммобилизованного фермента протекает в двух стадиях - первоначальному быстрому снижению активности следует медленная инактивация. Это позволяет рассматривать фермент как состоящий из двух - "лабильной" и "стабильной" фракций, инактивация которых протекает по реакции первого порядка, характеризуемой константами скорости  $K_{ин}$  и  $K_{ин}^{стаб}$  соответственно.



Фиг. 1. Стабильность пенициллинамидазы /ПА/ и иммобилизованной пенициллинамидазы /ИПА/.

Условия опытов: 1 - ● ● ПА при температуре 50° и при рН 7,5; 2 - ⊙ ⊙ ИПА при температуре 40° и при рН 9,2; 3 - ● ● ИПА при температуре 40° и при рН 4,0; 4 - ● ● ИПА при температуре 50° и при рН 7,5; 5 - ● ● ИПА при температуре 60° и при рН 7,5; 6 - ● ● ПА при температуре 55° и при рН 7,5.



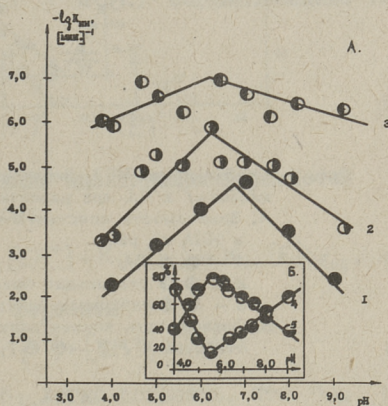
Фиг. 2. Зависимость скорости инaktivации ПА и ИПА от температуры.

1 - ●● ПА; 2 - ○○ лабильная фракция ИПА; 3 - ●● стабильная фракция ИПА.

Опыты свидетельствуют о том, что иммобилизация пенициллинамидазы вызывает значительное повышение термической стабильности ее.

Реакцию инaktivации можно рассмотреть в двух аспектах - в зависимости от температуры и от pH.

На фиг. 2 показана зависимость инaktivации свободного фермента и фракций иммобилизованного фермента при pH=7,5 в зависимости от температуры в координатах Аррениуса. Как видно из фигуры, наклоны прямых равны, что доказывает постоянство энергии активации дан-



Фиг. 3. Стабильность ИПА /модифицированной глутаральдегидом/ и ПА при различных значениях pH.

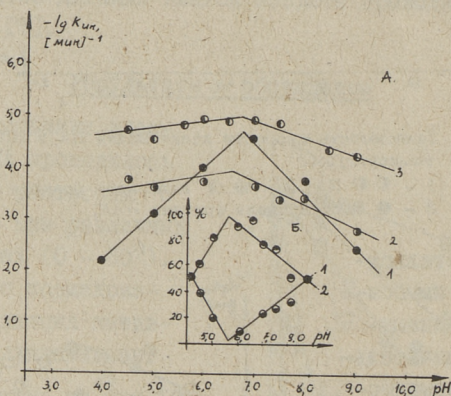
А. Зависимость константы скорости инaktivации ПА и ИПА от pH

1 - ●● ПА  
2 - ○○ лабильная фракция ИПА  
3 - ○○ стабильная фракция ИПА.

Б. Зависимость концентрации лабильной / 1 - ●● / и стабильной / 2 - ○○ / фракций ИПА от pH.

ной реакции во всех трех случаях ( $E = 41,5$  ккал/моль или  $173,8$  кДж/моль). Константа скорости инактивации стабильной фракции иммобилизованной амидазы на два порядка меньше этой же величины для нативного фермента.

На фиг. 3 изображена зависимость скорости инактивации от pH для лабильной и стабильной фракций иммобилизованного в полиакриламидном геле с помощью глутарового альдегида фермента. Аналогичные зависимости для второго препарата иммобилизованной амидазы приведены на фиг. 4.



Фиг. 4. Стабильность ИПА /модифицированной диазидом винной кислоты/ и ПА при различных значениях pH.  
 А. Зависимость константы скорости инактивации ПА и ИПА от pH.  
 1 - ●● ПА  
 2 - ○● стабильная фракция ИПА  
 3 - ●○ лабильная фракция ИПА.  
 Б. Зависимость концентрации лабильной / 1 - ●○ / и стабильной / 2 - ●● / фракций ИПА от pH.

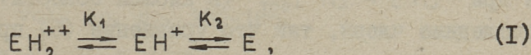
Как видно из экспериментальных данных, удельное значение (количество) стабильной фракции значительно зависит от pH (см. фиг. 3Б и 4Б) и достигает максимальной величины в диапазоне pH 5-6.

Зависимость скорости инактивации ферментов от pH можно рассматривать на основе предположения, что фермент состоит из нескольких различно протонизованных форм, причем скорость инактивации каждой формы различается.

В простейшем случае можно считать, что фермент имеет в зависимости от pH три различной протонизованной формы E,

$\text{EH}^+$  и  $\text{EH}_2^{++}$ . Аналогичная трактовка применяется при описании зависимости активности ферментов от pH [8]. Следует, однако, подчеркнуть, что рассматриваемые при инактивации формы фермента в общем случае не совпадают с формами, применяемыми при изучении зависимости скорости реакции - pH, хотя мы используем здесь те же обозначения.

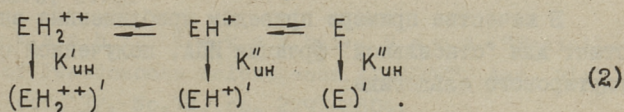
В растворах эти три формы находятся в равновесии:



где  $K_1$  и  $K_2$  являются константами равновесия протонизации, то есть

$$K_1 = \frac{[\text{EH}^+][\text{H}^+]}{[\text{EH}_2^{++}]} \quad \text{и} \quad K_2 = \frac{[\text{E}][\text{H}^+]}{[\text{EH}^+]}$$

Предполагаем, что рассматриваемые три формы фермента инактивируются необратимо по реакции первого порядка с константами скорости инактивации  $K'_{\text{UH}}$ ,  $K''_{\text{UH}}$  и  $K'''_{\text{UH}}$  образуя неактивные формы  $[\text{EH}_2^{++}]'$ ,  $[\text{EH}^+]'$  и  $[\text{E}]'$  согласно схеме (2):



Суммарная скорость реакции инактивации выражается в этом случае следующим образом:

$$V_{\text{UH}} = K'_{\text{UH}} \cdot [\text{EH}_2^{++}] + K''_{\text{UH}} [\text{EH}^+] + K'''_{\text{UH}} [\text{E}] = K_{\text{UH}} [\text{E}]_{\text{общ}}, \quad (\text{3})$$

где общая концентрация форм фермента

$$[\text{E}]_{\text{общ}} = [\text{EH}_2^{++}] + [\text{EH}^+] + [\text{E}]. \quad (\text{4})$$

Исходя из выражений  $K_1$  и  $K_2$ , легко показать, что  $K_{\text{UH}}$  выражается уравнением

$$K_{\text{UH}} = \frac{\frac{K'_{\text{UH}} [\text{H}^+]^2}{K_1 \cdot K_2} + \frac{K''_{\text{UH}} [\text{H}^+]}{K_2} + K'''_{\text{UH}}}{\frac{[\text{H}^+]^2}{K_1 \cdot K_2} + \frac{[\text{H}^+]}{K_2} + 1}, \quad (\text{5})$$

дифференцированием которого можно найти значение  $[\text{H}^+]_{\text{опт}}$ , при котором  $K_{\text{UH}}$  является минимальной:

$$[\text{H}^+]_{\text{опт}} = \frac{K_2}{K'''_{\text{UH}} - K'_{\text{UH}}} \left[ (K'_{\text{UH}} - K'''_{\text{UH}}) - \sqrt{(K'_{\text{UH}} - K'''_{\text{UH}})^2 - \frac{K_1}{K_2} (K'''_{\text{UH}} - K'_{\text{UH}}) (K'''_{\text{UH}} - K''_{\text{UH}})} \right]. \quad (\text{6})$$

При практических расчетах с применением уравнения (5) целесообразно учесть, что при  $[H^+] < [H^+]_{\text{опт}}$  (в щелочной области) можно отбрасывать первые члены в суммах числителя и знаменателя, т.е.

$$K_{\text{ун}} = \frac{K''_{\text{ун}} \cdot [H^+]}{K_2} + K'''_{\text{ун}}, \quad (7)$$

а при  $[H^+] > [H^+]_{\text{опт}}$  (в кислой области) можно отбрасывать последние члены, так что уравнение (5) принимает вид

$$K_{\text{ун}} = \frac{K'_{\text{ун}} \cdot [H^+]}{K_1 \cdot K_2} + \frac{K''_{\text{ун}}}{K_2} \cdot \frac{1}{\frac{[H^+]}{K_1 \cdot K_2} + \frac{1}{K_2}}. \quad (8)$$

Анализ экспериментальных данных отдельно в областях  $[H^+] < [H^+]_{\text{опт}}$  и  $[H^+] > [H^+]_{\text{опт}}$  согласно уравнениям (7) и (8) позволяет найти значения констант  $K'_{\text{ун}}$ ,  $K''_{\text{ун}}$ ,  $K'''_{\text{ун}}$ ,  $K_1$  и  $K_2$ , наиболее удовлетворительно соответствующие общей схеме (2) и уравнению (5).

В качестве примера приведем приближенные значения констант для "стабильной" фракции ИПА, полученной с помощью глутарового альдегида:

$$K_1 = 8 \cdot 10^{-5}, \quad K_2 = 1,35 \cdot 10^{-8}, \quad K'_{\text{ун}} = 10^{-6}, \quad K''_{\text{ун}} = 10^{-7}, \\ K'''_{\text{ун}} = 5 \cdot 10^{-7},$$

значение  $[H^+]_{\text{опт}}$  в этом случае согласно уравнению (6) получается 6,4.

Дальнейшая обработка экспериментальных данных для различных ферментов будет, наверно, показывать, является ли аналогичная трактовка реакции инактивации целесообразной и отвечает ли она действительным явлениям снижения активности фермента при различных рН и температурах среды.

#### Л и т е р а т у р а

1. D. A. Self, G. Kay, M. D. Lilly, P. Dunnill. "The conversion of benzyl penicillin to 6-aminopenicillanic acid using an insoluble derivative of penicillin amidase". Biotechnol. Bioeng., 1969, vol. 2, No. 3, p. 337.

2. W. Marconi, F. Cesere, F. Morisi, G. Pella Penna, B. Rappuoli. "Hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid by entrapped penicillin acylase". - J. Antibiot., 1973, vol. 26, No. 4, pp. 228-232.

3. W. Marconi. "Enzymes in the chemical and pharmaceutical industry", FEBS Proceedings of the ninth Meeting, Dublin, April 1973, vol. 30, pp. 139-186.

4. Г.И. Клейнер, Л.М. Елизаровская, В.Я. Штамер, А.И. Кестнер, М.О. Мандель, М.И. Креэн. "Получение и свойства бензилпенициллинацилазы иммобилизованной в полиакриламидный гель". Прикл.биохим. микробиол., 1973, № 12, I.

5. М.О. Мандель, А.И. Кестнер, Л.М. Елизаровская, Г.И. Клейнер. "Получение 6-аминопенициллановой кислоты при помощи иммобилизованной пенициллинамидазы". Тезисы I Всесоюзного симпозиума по иммоб. ферментам, Таллин, 1973, с.79.

6. Ry. Okashi, Tokashi Nara. "Penicillin Acylase of Pseudomonas melanogenum KY 3987", Agr. Biol. Chem., 1973, vol. 37, No.12, pp. 2797-2804.

7. "Органические реакции", сб. 3, Изд. иност. лит., под ред. Р.Адамс и др., М., с. 348-359.

8. Э.Х. Сиймер, М.О. Мандель. "О pH-зависимости ферментативных реакций", см. наст. сб., с. 3.

M. Mandel, E. Lepp,  
T. Masing, E. Siimer,  
A. Köstner

Investigation in the Reaction of Inactivation  
of the Immobilized Penicillinamidase

Summary

The stability of the immobilized in polyacrylamide gel penicillinamidase when using the modification with glutaraldehyde and diazide of tartaric acid has been studied. The dependence of the stability on pH and temperature has been investigated for the native and immobilized forms of the enzyme. It has been shown that the immobilized enzyme consists of two fractions with different stability. The stability of the immobilized penicillinamidase is maximum at the value of pH 5-6.



УДК 615.779.932-577.152

Г.И.Клейнер, Л.М.Елизаровская,  
М.О.Мандель, А.И.Кёстнер

ПРЕВРАЩЕНИЕ БЕНЗИЛПЕНИЦИЛЛИНА В 6-АМИНОПЕНИЦИЛЛАНОВУЮ  
КИСЛОТУ С ПОМОЩЬЮ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗЫ

Энзиматический гидролиз БП с целью промышленного получения 6-АПК может осуществляться биомассой микроорганизма, обладающего ацилазной активностью [1-6] или выделенным из нее ферментным препаратом [8,7]. Усовершенствованием этого процесса является использование нерастворимых форм фермента [9, 10].

В предыдущих работах [11, 12] нами сообщалось о получении и изучении свойств включенной в полиакриламидный гель пенициллинацилазы E.Coli. В настоящей работе рассматривается применение ИПА для получения 6-АПК.

Экспериментальная часть

При гидролизе БП использовали: препараты ИПА, полученные по [13] в виде гранул сферической формы, диаметром 0,25-0,50 мм, калиевую соль БП [17], бутилацетат технический, аммиак водный х.ч., соляную кислоту х.ч.

Гидролиз К-соли БП и выделение 6-АПК. В термостатируемый при 41° химический стакан, оборудованный мешалкой и электродами для непрерывного замера концентрации водородных ионов, помещали суспензию гранул ИПА в 5 %-ном растворе К-соли БП, содержащем 0,5 % бутилацетата. Концентрацию водородных ионов в реакционной смеси (рН 7,5 ± 0,1) поддерживали добавлением 5 %-ного раствора аммиака с помощью БАТ-12-ЛМ в комплекте с рН-метром ЛПУ-01. Для определения начальной скорости в реакторе фиксировали расход аммиака в первые 10 мин от начала гидролиза, через каждые 2-3 мин, и резуль-

тат выражали в мкмольх 6-АПК/мин·мл. По окончании реакции гранулы ИПА отделяли фильтрацией с отсасыванием. Фильтрат охлаждали до  $+5^{\circ}$ , подкисляли 20%-ным раствором  $\text{HCl}$  до  $\text{pH} = 1,6-1,8$  и экстрагировали двумя объемами бутилацетата. В экспериментах с нативным ферментом, взамен ИПА, в реакционную смесь добавляли ферментный раствор, полученный по [II] гидролизат, после подкисления и удаления выпавшего осадка фильтрацией, обрабатывали 0,5 % (вес/об) активированного угля марки "Б". Для выделения 6-АПК  $\text{pH}$  очищенного гидролизата регулировали 25 %-ным аммиаком к значению  $\text{pH}$  6-АПК. Выкристаллизовавшийся продукт отфильтровывали, промывали водой, ацетоном и сушили при  $50^{\circ}$  и 30 мм рт.ст.

Содержание 6-АПК в реакционной смеси определяли модифицированным колориметрическим методом [14] с применением полной дифференциальной фотометрии [15], что позволяло определить до 0,05-0,40 мг/мл 6-АПК в присутствии пенициллина и продуктов его распада.

Общее содержание пенициллинов, т.е. веществ, окисляемых иодом после щелочного гидролиза, подобно пенициллину, или "ядра" определяли иодометрическим методом Аличино в модификации [5].

Содержание "тиазолидинов", т.е. продуктов распада пенициллина по  $\beta$ -лактамному кольцу [5], определяли иодометрическим титрованием и рассчитывали по количеству иода, идущего на окисление без щелочного гидролиза.

Ферментная активность геля. Пробу переносили в термостатируемую ячейку с перемешиванием. Реакц. смесь: 0,6%-ный раствор К-соли БП в 0,1 М фосф.буфере  $\text{pH} = 7,5$ ;  $T = 37^{\circ}$ , время процесса 0,5 часа. Энзиматический процесс останавливали подкислением до  $\text{pH} = 2,0$  и определяли содержание 6-АПК [14]. Активность фермента выражали в  $\frac{\text{мк молях 6-АПК}}{\text{час} \cdot \text{г геля}}$  или  $\frac{\text{ф. е.}}{\text{г геля}}$ .

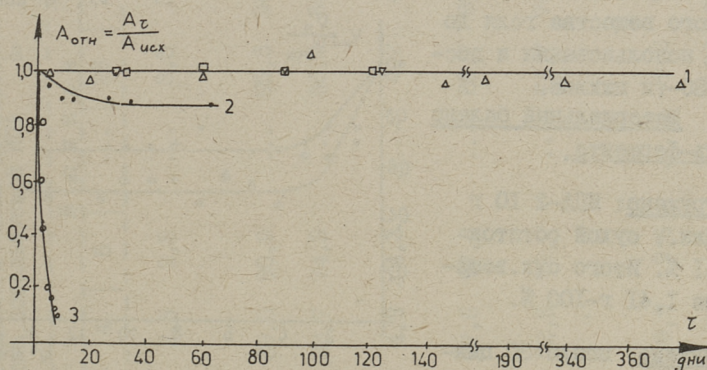
Сухой остаток ИПА определяли лиофилизацией пробы отфильтрованного и отмытого на фильтре 10-кратным количеством дист. воды препарата, на установке ЗОР I /575 (Edward High Vacuum Ltd) при остаточном давлении 0,01 мм рт.ст. до постоянного веса.

Качество готового продукта, характеризуемое по содержанию основного вещества, удельному вращению, сульфатной

золе, рН насыщенного раствора и потере в весе при высушивании, определяли по [17].

### Выводы

Стабильность образцов ИПА при хранении показана на фиг. 1. При  $+5^{\circ}$  активность геле-фермента практически не снижалась в течение года; при  $20^{\circ}$  за 2 месяца активность уменьшилась на 20 %, при  $50^{\circ}$ , период полураспада составил около 70 часов.



Фиг. 1. Стабильность ИПА в фосфатном буфере 0,1 М рН 7,5.

- 1) при  $5^{\circ}$ 
  - ∇ - ИПА-1 - 630 фе/г вл
  - - ИПА-2 - 2300 фе/г вл
  - Δ - ИПА-3 - 500 фе/г вл
- 2) при  $20^{\circ}$ 
  - - ИПА - 3
- 3) при  $50^{\circ}$ 
  - - ИПА - 3

Изменение активности ИПА при многократном использовании для гидролиза БП представлено на фиг. 2. Энзиматическая активность препаратов ИПА значительно уменьшалась во время первых 2-4 циклов. Затем скорость снижения активности замедлилась так, что на протяжении последующих 10-14 циклов разница в активности ИПА, отобранной в двух последовательных циклах, почти не улавливалась (фиг. 2а). На фиг. 2б показаны результаты оценки стабильности энзимной

активности реактора по изменению начальной скорости реакции. Характер изменения начальной скорости реакции от числа циклов такой же, как и характер изменения ферментной активности геля. Механические потери ИПА при гидролизе определяли путем сопоставления веса сухого вещества геля до его использования и после 30-ти циклов.

Материальный баланс геля-фермента.

Загружено: ИПА-2 10 г влажн., сухой остаток 14,1 %. Итого сух. вещества 1,41 г-100 %.

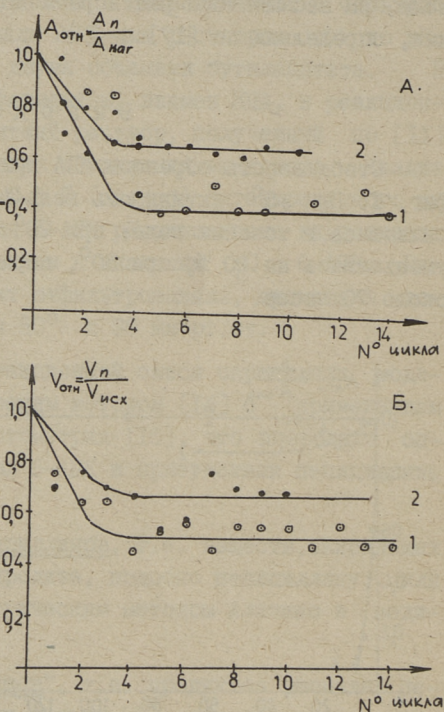
Получено: после 30 циклов 10,7 г вл, сухой остаток 10 %, Итого сух. вещества 1,07 г, 76 %.

Потери: составляют 0,34 г, 24 % от исходного количества.

Таким образом, в среднем на один цикл работы терялось около 0,8 % загруженного геля, что может объясняться измельчением за счет интенсивного перемешивания, а также потерями при переносе препарата на фильтр.

Основные показатели процесса в отдельных циклах использования ИПА приведены в таблице I.

Как видно из таблицы, выход продукта по первому циклу несколько ниже, так как здесь имеют место объемные потери за счет всасывания реакционного раствора в гель. В дальнейшем, ни один из показателей процесса гидролиза и выделения не зависел от числа циклов, в которых ранее участвовал данный ферментный препарат.



Фиг. 2. Изменение ферментной активности ИПА (а) и начальной скорости реакции гидролиза (б) при многократном использовании геля  
1 - ИПА - 1  
2 - ИПА - 2.

Характеристика отдельных циклов по технологическим показателям процесса получения 6-АПК с многократно используемой ИПА

Показатели процесса	№ Ц и К л а										
	I	2	3	4	5	...	26	27	28	29	30
Длительность гидролиза в часах	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	...	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Остаточное содержание ядер в гидролизной жидкости в % от исходного БИ	89,5	92,0	92,8	89,0	90,0	...	95,3	94,0	86,2	97,2	92,4
Мера превращения БИ в 6-АПК в %	80,1	83,5	89,0	82,7	74,3	...	86,0	84,7	84,3	91,0	87,3
Тиаволидины в гидролизной жидкости в % от исходного БИ	3,5	3,3	3,7	4,9	4,3	...	4,2	4,5	4,2	4,1	4,6
Выход при выделении 6-АПК из гидролизной жидкости в %	83,0	88,5	85,0	87,5	97,8	...	86,7	89,7	89,0	81,5	83,5
Выход готового продукта в % от исходного БИ	66,7	73,7	75,7	72,5	72,7	...	74,7	76,8	75,0	74,4	73,0
Остаток 6-АПК в матричке после выделение в % от содержания в гидролизной жидкости	11,2	8,7	7,9	9,9	9,6	...	9,2	9,7	9,0	8,2	9,1
Остаток 6-АПК в матричке в % от исходного БИ	8,97	7,27	7,00	8,18	7,11	...	7,90	8,30	7,55	7,47	7,94

Т а б л и ц а 2

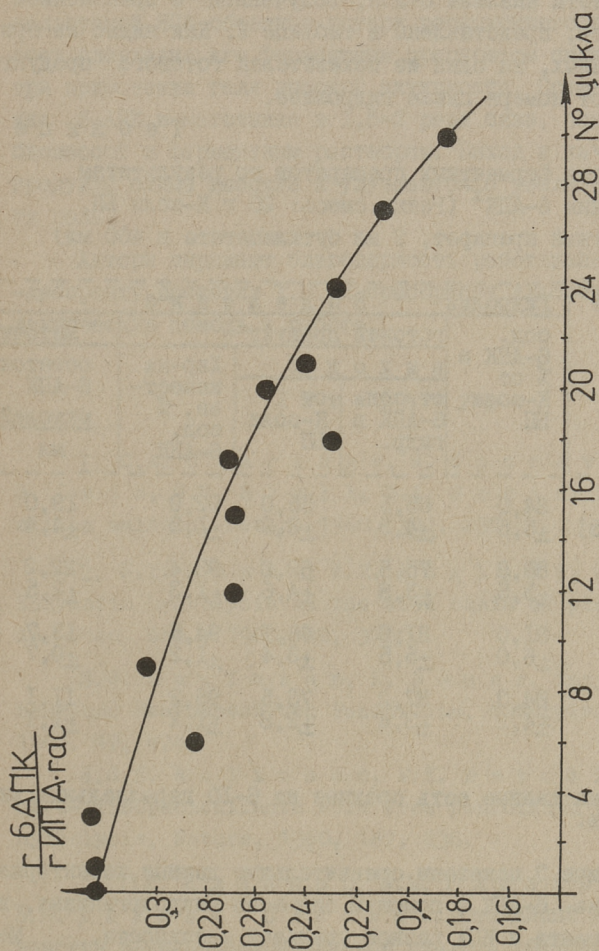
Показатели качества 6-АПК

№ цикла	Показатели качества 6-АПК										
	1	2	3	4	5	...	26	27	28	29	30
Содержание основного вещества в %	94,5	94,8	94,5	93,3	94,5	...	95,1	93,0	96,3	95,5	95,3
Удельное время в пересчете на сухое в-во [с.] <sup>25</sup> (с I %)	344	342	343	345	344	...	341	342	343	345	341
Сульфатная зола, %	0,0	0,01	0,0	0,0	0,01	...	0,0	0,0	0,01	0,0	0,0
И насыщенного раствора	3,75	3,73	3,74	3,74	3,76	...	3,75	3,76	3,77	3,78	3,78
Помера в весе при высушивании, %	0,11	0,0	0,0	0,11	0,0	...	0,0	0,11	0,0	0,0	0,0
Стойкость эмульсии в мин <sup>x</sup>	< I	< I	< I	< I	< I	...	< I	< I	< I	< I	< I
Прозрачность <sup>xx</sup>	прозр.	прозр.	прозр.	прозр.	прозр.	...	прозр.	прозр.	прозр.	прозр.	прозр.
Оптическая плотность <sup>xxx</sup>											
λ = 295 нм	0,170	0,168	0,170	0,167	0,127	...	0,137	0,135	0,155	0,120	0,137
λ = 405 нм	0,027	0,023	0,017	0,017	0,018	...	0,013	0,016	0,018	0,010	0,020
λ = 436 нм	0,018	0,015	0,012	0,012	0,013	...	0,008	0,012	0,012	0,008	0,018

<sup>x</sup> Оценивалась по времени расслаивания эмульсии, образующейся при встряхивании 7 мл 14 % раствора 6-АПК в 1 н HCl и 3 мл бутылочката в течение 1 мин.

<sup>xx</sup> Визуально оценивалась прозрачность 4 %-ного раствора 6-АПК в насыщенном растворе Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

<sup>xxx</sup> Определялось светопропускание 5 %-ного раствора 6-АПК в 0,56 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> в кювете 1 см на СФ-4.



Фиг. 3. Производительность гель-фермента при гидролизе 5 % раствора БП.

На оси абсцисс: номер цикла.

На оси ординат: количество г 6-АПК, полученное при гидролизе 5 % раствора К-соли БП в течение 1 часа 1 г геля (вл).

На фиг. 3 эффективность энзимного реактора показана в виде зависимости съема готового продукта на единицу веса ИПА в единицу времени от общей продолжительности использования ИПА.

Результаты анализа 6-АПК, полученной с применением гели-фермента, представлены в таблице 2. Как видно из приведенных данных, ни один из показателей готового продукта не зависит от номера цикла гидролиза.

Т а б л и ц а 3

Сравнение ферментных препаратов по результатам получения 6-АПК<sup>X</sup> (Реакц. смесь: 20 г К-соли БП, ферментный препарат, 2 мл бутилацетата в 400 мл)

№ III	Препарат ацилазы	Гидролиз сод. 6-АПК в % от К-соли БП	В ы д е л е н и е			
			готовый продукт		Хар-ка качест- ва, % сод. 6-АПК	Маточник остаток 6-АПК <u>мкмолей</u> мл
			в ы х о д % от сод. 6-АПК в гидр.	от К-соли БП		
1.	Биомасса E. Coli [5]	84,0 ±5,5	65,5 ±4,3	55,0 ±3,9	92,0 ±1,3	19,0 ±4,4
2.	Нативный фермент	83,3 ±3,5	75,5 ±3,8	62,8 ±4,6	93,4 ±1,3	22,2 ±2,5
3.	ИПА-1	81,0 ±6,0	81,6 ±5,5	66,1 ±3,4	94,5 ±1,2	13,7 ±0,7
4.	ИПА-2	84,3 ±4,2	87,2 ±3,4	73,5 ±2,8	95,2 ±1,2	11,1 ±1,1

<sup>X</sup> Приведенные данные есть среднее из 6-10 параллельных экспериментов.

В таблице 3 показаны сравнительные данные, характеризующие получение 6-АПК с помощью биомассы микроорганизма, нативного фермента и ИПА разной удельной активности. Мера превращения БП в 6-АПК одинакова для всех ферментных препаратов и составляет в среднем 81-84%. Основным источником потерь является процесс выделения. При работе с биомассой микроорганизма выход при выделении самый низкий. Это объясняется значительным удержанием реакционного раствора осадком отработанной биомассы, ввиду его коллоидной природы.



Обработка активированным углем также приводит к потерям. С нативным ферментом выход при выделении значительно выше, так как резко сокращаются объемные потери реакционного раствора с осадком коагулированных примесей и с уменьшенным количеством угля. При гидролизе с помощью многократно используемой ИПА объемные потери реакционного раствора за счет удержания его ферментным препаратом снижаются, особенно при применении геля высокой активности. Остаточное содержание 6-АПК в маточнике в 1,5-2 раза ниже, чем при гидролизе биомассой и ферментным раствором. Выход и качество готового продукта самые высокие и улучшаются с увеличением активности геля.

Авторы выражают благодарность работникам РЗМИ: технику-лаборанту Добкевич Т.Н. и прибористу Альбрехту Г.И. за техническую помощь в работе.

#### Л и т е р а т у р а

1. C. A. Claridge, A. Gourevitch, J. Lein, G. M. Shull, B. A. Sobin. Bacterial penicillin amidase, *Nature* 1960, 182, 237.
2. H. T. Huang, A. R. English, T. A. Seto. Enzymatic hydrolysis of the side chain of penicillins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 3790.
3. W. Kaufmann, K. Bauer. Enzymatische Spaltung und Resynthese von Penicillin, *Naturwissenschaften*, 1960, 47, 474.
4. G. N. Rolinson, F. K. Batcelor. Formation of 6-aminopenicillanic acid from penicillin by enzymatic hydrolysis, *Nature*, 1960, 187, 236.
5. Г. И. Клейнер, Л. М. Елизаровская, Б. Б. Дендзе - Плетман. Стадийный контроль производства 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). *Известия АН Латв. ССР*, 1971, 285, 4, 49.
6. Т. В. Каррингтон. Усовершенствование технологических процессов для производства 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК). *Антибиотики*, 1972, 17, 3.

7. P.S. Delin, B.A. Ekstrom, B.O.H. Sjoberg, K.H. Thelin, L.S. Nathorst-Westfelt. Process for producing a penicillin acylase composition, Brit.pat.No. 1261711, Cl. C3H3, 15 feb.1966, 3 dec.1968.

8. L.J. Heuser, C. Chiang, H. Park, C.F. Anderson. Method for the production of 6-aminopenicillanic acid, Pat. USA No. 3446705, Cl. 195-36(C07c99/14) 30.04.1967, 25.05.1969.

9. D. Dinelli. Fibre-entrapped enzymes, Proc. Biochem., 1972, 7, 8, 9.

10. W. Marconi, F. Cesere, F. Morice, F. Della Penna, B. Rappuoli. The hydrolysis of penicillin G to 6-aminopenicillanic acid by entrapped penicillin acylase, Antibiotics, 1973, 26, 4, 228.

11. А.И. Кестнер, М.И. Креэн, М.О. Мандель, Г.И. Клейнер, Л.М. Елизаровская, В.Я. Штамер. О бензилпенициллинацилазе (E.Coli), иммобилизованной в полиакриламидном геле. Микробиологическая промышленность, 1973, 108, 12, 1.

12. М.О. Мандель, А.И. Кестнер, Э.Х.Сиймер, Г.И. Клейнер, Л.М. Елизаровская, В.Я. Штамер. Получение и кинетические свойства препарата иммобилизованной бензилпенициллинацилазы. Прикладная биохимия и микробиология, 1975, 11, 2, 219.

13. А.И. Кестнер, М.О. Мандель, В.А. Кросинг, Э.Х. Сиймер, К.А. Кивисилла, К.А. Калунянц. Получение иммобилизованных в полиакриламидном геле ферментов для полупромышленных опытов. Микробиологическая промышленность, 1975, 124, 4.

14. E. Svatek. Spektrofotometricki stanoveni kyseliny 6-aminopenicilanove pomoci p-dimethylaminobenzaldehydu, Ceskoslow. farm., 1965, 14, 420.

15. А.К. Бабко, А.Г. Пилипенко. Фотометрический анализ. Общие сведения и аппаратура, 1968, "Химия", М.

16. Р. Браунли. Статистическое исследование в производстве, 1949, Изд-во иностранной литературы, М.

17. Государственная фармакопея, Г.Ф. СССР, 10 издание.

G. Kleiner, L. Elizarovskaya,  
M. Mandel, A. Köstner

Conversion of Benzyl Penicillin into 6-Amino-  
penicillanic Acid with the Help of Immobilized  
Penicillin Acylase

Summary

The immobilized preparation of benzylpenicillin acylase (EC3.5.1.11) *E. Coli* has been obtained by means of entrapment into polyacrylamide gel and has been used for 6-aminopenicillanic acid production from benzylpenicillin. The preparation can be repeatedly used for the hydrolysis of 5 % benzylpenicillin solution. After the consecutive hydrolysis cycles the extent of hydrolysis, content of penicillin degradation products, product yield and quality remained at initial level. The course of hydrolysis with the help of immobilized enzyme, native enzyme and bacterial biomass have been compared with each other and the immobilized enzyme has been proved to give the best results. The stability of immobilized enzyme at work and storage has been investigated and found to be sufficient for industrial applications.



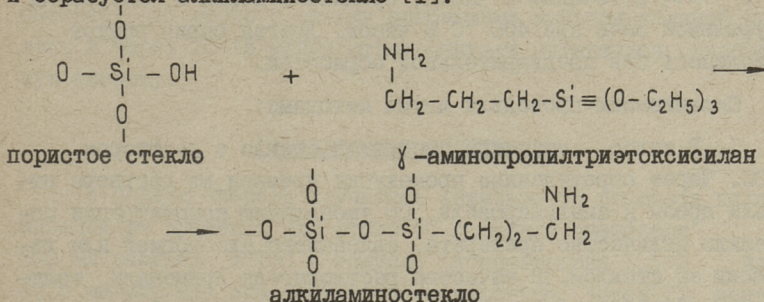
УДК 666.189.24:546.287

Х.Я. Кишпер, А.И. Кёстнер,  
Б.В. Мгедиашвили

СИЛАНИЗАЦИЯ ПОРИСТОГО СТЕКЛА  
γ-АМИНОПРОПИЛТРИЭТОКСИСИЛАНом

Пористое стекло широко пользуется носителем для иммобилизации ферментов. Перед связыванием ферментов пористое стекло обычно обрабатывают одним или несколькими реагентами для покрытия поверхности стекла с реакционноспособными группами.

Наиболее часто применяемым для обработки стекла реагентом является γ-аминопропилтриэтоксисилан (в дальнейшем АПТЭС). Под его действием протекает т.н. процесс силанизации и образуется алкиламиностекло [1]:



В дальнейших реакциях участвуют в основном аминогруппы.

Перед силанизацией стекло рекомендуется обрабатывать различными способами: нагревать в 4-молярной азотной кислоте, промывать водой и выдерживать 12 часов при температуре 400 °С [2]; кипячением в 5% HNO<sub>3</sub> и сушкой при 480 °С [3]; промыванием при 80 °С 0,2 Н азотной кислотой, дистиллированной водой и нагреванием 12 часов при 625 °С [4].

Для силанизации стекол, обработанных вышеописанными способами, обычно следует кипячение в растворе АПТЭС в толуоле. Применяется концентрация раствора от 0,1 до 10 %. Продолжительность обработки обычно 3-36 часов. Диаметр пор пористого стекла 700-1000 Å и удельная поверхность 16 м<sup>2</sup>/г. Получаемое аминостекло содержит от 30 до 90 мк-экв/г аминогрупп и больше.

Согласно патенту США [4], 96 %-ное пористое стекло (поры 950 ± 50 Å, удельная поверхность 16 м<sup>2</sup>/г) после предварительной обработки кипятят в 10 %-ном растворе АПТЭС в толуоле (100 мл раствора на 2 г стекла) в течение 12 часов и промывают ацетоном. Полученное аминостекло содержит 171 мк-экв/г аминогрупп.

### Материалы и методы

Пористое стекло было получено по методу Жданова [5] и характеризуется следующими показателями: диаметр пор 1000 Å, удельный объем  $\Pi = 0,45 \text{ см}^3/\text{г}$ , зернистость 0,3-0,5 мм.

В одной серии опытов стекло до силанизации нагревали в 0,2 N HNO<sub>3</sub> в течение 3 часов, промывали водой и нагревали в муфельной печи при 400 °С 6 часов. Другая серия опытов проводилась без предварительной обработки.

Силанизацию проводили двумя методами:

1. В колбе мешалкой смешивали стекло с раствором АПТЭС. Через определенные промежутки времени из раствора отбирали пробы и анализировали. По уменьшению концентрации определяли количество препарата, связанного адсорбцией или химически со стеклом. В качестве растворителя применяли толуол, хлороформ и ацетон. Температура была комнатной или же близкой к температуре кипения растворителя. После этого раствор сливали и стекло сушили при комнатной температуре или же начинали обратный процесс - смывание препарата со стекла растворителем с целью удаления слабо связанного со стеклом препарата или характеристики прочности связывания.

2. К стеклу прибавляли количество раствора, обеспечивающее смачивание стекла и заполнение его пор, однако не образующее слоя над стеклом. Концентрация АПТЭС-а зависела

от того, сколько препарата требовалось нанести на стекло. Роль растворителя состоит в равномерном распределении препарата. Смесь выдерживали сутки при комнатной температуре в закрытом сосуде (для предотвращения испарения) и сушили при обычной температуре или нагревали в термостате.

Концентрацию раствора препарата АПТЭС определяли потенциометрическим титрованием аминогруппы с 0,1 N соляной кислотой. При таких условиях наблюдается резкий скачок потенциала, что позволяет точно определить точку эквивалентности в водных растворах, а также в двухфазных системах с несмешивающимся с водой растворителем (толуол, хлороформ). В последнем случае раствор пипетируют в титровальный сосуд, где находится вода, так что образуется гетерогенная смесь.

Таким же образом определяли количество связанного со стеклом препарата или точное число реакционноспособных аминогрупп. Можно проводить прямое титрование, т.е. прибавлять соляную кислоту порциями к суспензии стекла с водой. После прибавления каждой порции требуется некоторое время (в пределах 5 минут) для завершения реакции, так как в гетерогенной системе диффузия значительно замедляет процесс. Определение аминогрупп обратным титрованием можно провести быстрее. Для этого к стеклу прибавляют избыток соляной кислоты и через 10-15 минут оттитровывают оставшуюся свободную кислоту.

### Результаты и обсуждение

В первую очередь изучалась зависимость процесса силинизации от времени. Для этого 60 г стекла смешивали с 200 мл раствора АПТЭС в толуоле (концентрация 1,5 % или 65,5 мк-экв/мл) при комнатной температуре. Через 10 минут определяли концентрацию раствора (получили 46,1 мк-экв/мл). Затем смесь подогревали до кипения и через определенные промежутки времени отбирали пробы (смесь стекла и раствора). По уменьшению концентрации раствора (см. табл. I) рассчитывали количество связанного со стеклом препарата (табл. I, 5-ый столбец), предполагая отсутствие потерь аминогрупп. Стекло, содержащееся в пробе, промывали 2 раза эфиром, 3 раза ацетоном и 3 раза водой и определяли аминогруппы стекла.

Анализ промывных вод показал, что в опытах нет потери аминокрупп: сумма аминокрупп, оставшихся в растворе, связанных со стеклом и содержащихся в промывных водах, равна первоначальному количеству аминокрупп. Однако, последующие опыты показали, что, в частности, при повышении температуры могут наблюдаться некоторые потери аминокрупп.

Т а б л и ц а I

Силанизация стекла

№ пп	Время с начала опыта, час	Температура, °С	Концентрация аминокрупп		
			в растворе	на стекле	на стекле после промывки
			<u>МК-ЭКВ</u> мл	<u>МК-ЭКВ</u> г	<u>МК-ЭКВ</u> г
I	2	3	4	5	6
1	0	20	65,5	-	-
2	0,17	20	46,1	63,8	
3	2	110	36,2	113,0	25
4	7	110	32,0	122,0	34
5	15	110	32,1	122,0	48

Из таблицы видно, что большая часть аминокрупп связывается уже при комнатной температуре в течение первых 10 минут. Продление кипения больше 7 часов не увеличивает количество связанных аминокрупп, однако, увеличивается число невымываемых при данном режиме аминокрупп.

Таблица 2 характеризует процесс вымывания аминокрупп с силанизированного стекла. 25 г стекла силанизировали с 150 мл раствора АПТЭС в толуоле (32 МК-ЭКВ/мл) в течение 4 часов при 90 °С. Из уменьшения концентрации установили, что со стеклом связано 88 МК-ЭКВ/г аминокрупп. После завершения реакции силанизации свободный раствор отделяли от стекла и заменяли чистым растворителем. Процесс повторяли несколько раз, перемешивая смесь в течение 10 минут. Объем заменяемого раствора был в пределах 80-100 мл. В каждом промывном растворе определялось содержание аминокрупп (табл. 2, 3-ий столбец). По найденной концентрации и отношению разбавления рассчитывалась ожидаемая концентрация промывного раствора на следующем этапе промывки (4-ый столбец). Действительная концентрация (3-ий столбец) всегда оказывалась выше расчетного, что



свидетельствует о вымывании аминогрупп со стекла. По разнице концентраций рассчитывалось количество аминогрупп, оставшееся на стекле (5-ый столбец).

Т а б л и ц а 2

Результаты промывания силанизированного стекла

№ пп	Растворитель	Содержание аминогрупп		
		в промывной жидкости МК-экв/мл	Условная в промывной жидкости МК-экв/мл	Связанное со стеклом МК-экв/г
1	2	3	4	5
0	Толуол	20,3	-	88
1	Толуол	9,3	7,2	78
2	Толуол	5,5	3,8	61
3	Ацетон	1,9	1,7	60
4	Ацетон	0,6	0,6	60
5	Вода	2,3	0,2	47
6	Вода	3,4	0,7	31
7	Вода	2,8	1,0	20
8	Вода	1,8	0,8	14
9	Вода	1,5	0,6	8
10	Вода	1,1	0,4	0

Результаты таблицы 2 и многочисленных дополнительных опытов показали, что органические растворители (толуол, хлороформ, ацетон) вымывают только некоторую часть аминогрупп. Вода действует на аминостекло гораздо сильнее и повторные промывки ею всегда приводят к полному вымыванию аминогрупп.

Известно, что умеренное нагревание увеличивает стойкость кремнеорганических покрытий. Для изучения этой возможности стабилизации силанизированное при 105 ° стекло дополнительно нагревалось при 185 ° в течение 12 часов. Вследствие этого содержание аминогрупп уменьшилось со 120 до 105 МК-экв/г, однако, остаточное содержание тех же групп после четырехкратной промывки водой увеличилось от 32 до 50 МК-экв/г. Это показывает, что описанная термическая обработка улучшает в некоторой мере свойства аминостекол.

Нагревание стекла с  $\text{HNO}_3$  до силанизации и нагревание в муфельной печи не оказывали заметного влияния на

процесс силанизации и свойства силанизованного стекла. Однако, таким образом, можно провести регенерирование и получить в первоначальном виде пористое стекло, которое в силанизованном состоянии было использовано для иммобилизации ферментов.

Опыты силанизации в растворах ацетона, хлороформа и толуола показали, что скорость процесса и количество связанных аминогрупп существенно зависят от природы растворителя.

В случае всех растворителей, кипячение существенно не увеличивает количество связанных аминогрупп, но устойчивость к вымыванию водой возрастает. Такое же влияние на силанизованное стекло наблюдается при нагревании его в термостате.

Кипячение и нагревание обуславливают потери аминогрупп. Потери относительно большие, если силанизованное стекло содержит много аминогрупп.

Вышеуказанные два метода силанизации позволяют получить стекло одинакового качества. Второй метод легче осуществим, так как он не требует механического перемещения, проводится с меньшим расходом растворителя и меньшим остатком не использованного  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисилана. Первый метод, однако, можно использовать при изучении кинетики силанизации потому, что можно отбирать пробы раствора для титрования.

Предлагаемые методы можно использовать также для обработки других кремнеземистых материалов, в частности, силиchromов. При этом соблюдаются закономерности присоединения и вымывания аминогрупп, описанные выше.

Полученные препараты силанизованных носителей успешно применены в качестве носителей при иммобилизации ферментов.

#### Л и т е р а т у р а

1. H.H. W e e t a l l. Enzymes immobilized on inorganic carriers. - "Research Development", 1971, 22, 18.
2. G. B a u m, F.B. W a r d, H.H. W e e t a l l. Stability, inhibition and reactivation of acetyl cholinesterase covalently coupled to glass, - "Biochimica et Biophysica Acta", 1972, 268, pp. 411-414.

3. R.D. M a s o n, H.H. W e e t a l l. Invertase covalently coupled to porous glass: Preparation and characterization. - "Biotechnology and Bioengineering", 1972, vol. XIV, pp.637-645.

4. R.A. M e s s i n g, H.H. W e e t a l l. Chemically coupled enzymes, 5/IX 1968, No. 757696, United States Patent Office, 7/VII 1970, USA 3, 519, 538.

5. Л.А. Нахапетян, И.И. Меняйлова, С.П. Жданов, Е.В. Каромальди. К вопросу о выборе оптимальной характеристики пористого стекла для иммобилизации ферментов. Получение и применение иммобилизованных ферментов, Тезисы докладов I Всесоюзного симпозиума, Таллин, 1974, с.17-18.

H. Kipper, A. K<sup>o</sup>stner,  
B. Mchediashvili

Treatment of Porous Glass with  
 $\gamma$ -Amino Propyl Triethoxysilane

Summary

Silanized with  $\gamma$ -amino propyl triethoxysilane porous glass having on the surface fixed reactive amino groups is known as a support for enzyme immobilization.

The treatment of porous glass with  $\gamma$ -amino propyl triethoxysilane in various solvents, such as toluene, chloroform and acetone, has been studied and two silanization procedures have been proposed. The amount of amino groups on the glass surface and in the solutions has been determined with the help of acid-base titration in water. Washing the produced preparation with solvents and water causes the elimination of the bound amino groups.



УДК 663.97/98

Ю.М. Канн, О.В. Таутс,  
Р.Э. Калве, С.Ю. Пинк

## О СОДЕРЖАНИИ НИТРОЗГАЗОВ В ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ДЫМЕ

Обнаружением канцерогенных свойств N-нитрозаминов связан особый интерес исследователей к различным нитрозирующим агентам, в том числе и к нитроэтанам.

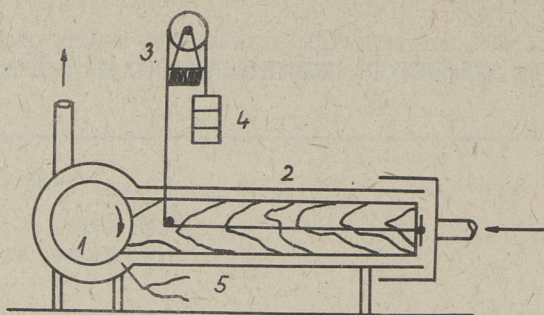
N-нитроамины легко образуются при реакции вторичных аминов с окисями азота, что может быть причиной повышенного содержания N-нитроаминов в пищевых продуктах, которые имеют контакт с нитроэтаном. Например, при копчении пищевых продуктов отмечается в них повышение остаточного содержания нитритов и нитратов [1], что по всей вероятности связано с содержанием нитроэтанов в технологическом дыме.

Так как очистка технологического дыма от нитроэтанов известными нам методами сильно меняет коптильные свойства дыма, необходимо найти возможности для уменьшения количества нитроэтанов в дыме другими путями, в том числе регулирование условий образования дыма.

Целью настоящей работы было определение содержания нитроэтанов в технологическом дыме разных типов дымогенераторов (генератор типа "Киров", коптильная установка "Квернер Брук", коптильная установка с открытым очагом и лабораторный генератор фрикционного типа).

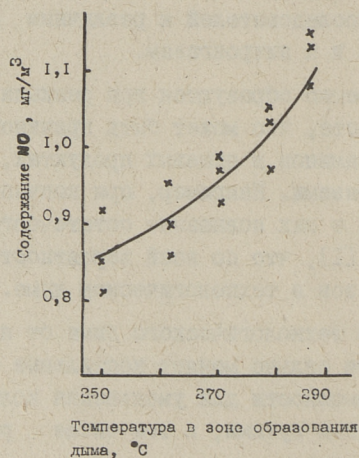
### Методы анализа

Для определения нитроэтанов применяются фотоколориметрические и спектрофотометрические методы, которые применимы для анализа в газовой фазе [2,3], а также для определения ионов  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  в растворе [4,5]. Кроме того разработаны различные газохроматографические методы [6,7,8].



Фиг. 1. Схема лабораторного фрикционного дымогенератора.

1. Гофрированный барабан 4. Нагрузка  
2. Брус 5. Термопара.  
3. Натяжной механизм



Фиг. 2.

Зависимость содержания окиси азота в дыме от температуры образования дыма.

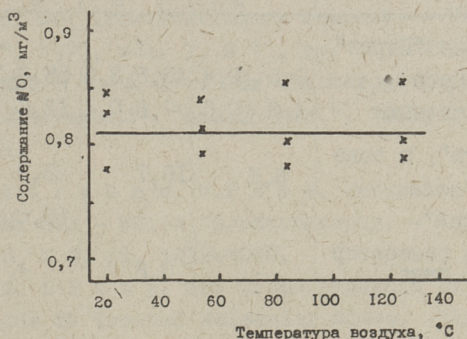
В данной работе использована разработанная нами методика [9], которая основывается на методике Салызмана [4], но модифицирована дополнительной очисткой проб дыма от примесей.

Схема сконструированного нами фрикционного дымогенератора изображена на фиг. 1. Натяжной механизм 3 прижимает брус 2 к барабану 1. Свойства дымовых газов, образующихся в результате трения могут быть варьированы изменением давле-

ния на брус и количеством воздуха, подаваемого в зону трения. Так как брус находится в горизонтальном положении, давление бруса на барабан не зависит от длины бруса.

### Результаты

На фрикционном дымогенераторе установлена зависимость содержания окиси азота от температуры образования дыма (фиг. 2) и от температуры подаваемого воздуха (фиг. 3). Повышение температуры образования дыма значительно влияет на содержание окиси азота в дыме. Температура подаваемого воздуха не влияла на содержание окиси азота.



Фиг. 3.  
Зависимость содержания окиси азота в дыме от температуры подаваемого воздуха.

Полученные данные анализа нитрогенов в технологическом дыме показали (табл. I), что содержание нитрогенов зависит от типа дымогенератора. В дыме открытого очага найдено нитрогенов в количестве  $18 \pm 1,9$  мкг/л дыма, в то время как в дыме лабораторного дымогенератора их содержание было только 0,6 мкг/л. Содержание общего азота в топливе не влияло на содержание нитрогенов.

Следовательно, при оптимизации работы фрикционного дымогенератора температура образования дыма должна быть по возможности низкой, а плотность дыма целесообразно регулировать изменением количества подаваемого воздуха.

На основе проведенной работы можно считать целесообразным применять при копчении пищевых продуктов дым фрикционных

генераторов или коптильную жидкость, так как в первом случае уровень образования нитрогенов в дыме значительно ниже, чем у других типов дымогенераторов, а в продуктах, копченых с применением коптильной жидкости, образования N-нитрозоаминов не отмечалось, как показали результаты собственных опытов.

Т а б л и ц а I

Содержание нитрогенов в технологическом дыме

Прибор генерирования дыма	NO <sub>2</sub> мкг/л	NO мкг/л	NO+NO <sub>2</sub> мкг/л	NO+NO <sub>2</sub> мкг/г дыма
I	2	3	4	5
Генератор типа "Киров" над генератором	6,3 ± 0,4	49,5 ± 3,5	55,8 ± 3,9	29,5 ± 2,0
в тоннеле копчения	4,9 ± 0,6	7,6 ± 0,4	12,6 ± 1,1	8,9 ± 0,8
"Квернер Брук", в зоне копчения	6,6	16,7	23,3	16,6
Открытый очаг	-	-	26,0 ± 2,0	18,5 ± 1,9
Лабораторный генератор фрикционного типа	-	0,8	-	-

### В ы в о д ы

1. Содержание нитрогенов в технологическом дыме зависит от типа дымогенератора. Из изученных типов дымогенераторов самым низким оказалось содержание нитрогенов в дыме, полученном в дымогенераторе фрикционного типа.

2. На содержание окиси азота в дыме фрикционного дымогенератора значительно влияет температура образования дыма.

3. Для копчения пищевых продуктов целесообразно применять фрикционный дымогенератор или коптильную жидкость (например, типа "Вахтоль").

### Л и т е р а т у р а

1. О.В. Таутс, Ю.М. Канн, К.А. Каск. О содержании нитритов и нитратов в рыбных товарах. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", Сб. статей по химии и хим. технологии, 1974, XXXVI, № 367, с. 95-100.



2. S.W. Nicksic, J.Harkins. Spectrophotometric Determination of Nitric Oxides in Auto Exhaust. - "Anal. Chem.", 1962, vol. 34, N 8, pp. 985-988.

3. G.E. Fisher, T.A.Huls. A Comparison of Phenoldisulfonic Acid, Nondispersive Infrared and Saltzman Methods for the Determination of Oxides of Nitrogen in Automobile Exhaust. - "J. Air Pollut. Control Assoc.", 1970, vol. 20, N 10, pp. 666-671.

4. B.E. Saltzman. Colorimetric Microdetermination of Nitrogen Dioxide in the Atmosphere - "Anal. Chem.", 1954, vol. 26, N 5, pp. 1949-1955.

5. M.M. Martens, L.A. Dee, J.T. Nakamura, F.C. Jaye. Improved Phenoldisulfonic Acid Method for Determination of  $\text{NO}_x$  from Stationary Sources. - "Environ. Sci. and Technol.", 1973, vol. 7, N 13, pp. 1152-1154.

6. J.M. Trowell. Gas Chromatographic Separation of Oxides of Nitrogen. - "Anal. Chem.", 1965, vol. 37, N 9, pp. 1152-1154.

7. S.A. Greene, M. Pust. Determination of Nitrogen Dioxide by Gas - Solid Chromatography. - "Anal. Chem.", 1958, vol. 20, N 6, pp. 1039-1040.

8. R.N. Dietz. Gas Chromatographic Determination of Nitric Oxide on Treated Molecular Sieve. - "Anal. Chem.", 1968, vol. 40, N 10, pp. 1576-1578.

9. J.Kann, O. Tauts, R. Kalve, T. Paalme. Determination of Nitrous Gases in Smoke. - "IARC Scientific Publications", 1974, N 9, pp. 180-182.

J. Kann, O. Tauts,  
R. Kalve, S. Pink

On the Nitrous Gases Content in  
Technological Smoke

Summary

The nitrous gases content in smoke of some industrial and laboratory generators has been studied.

It has been found that the concentration of nitrogen oxides in the smoke of the generators is from 0.8 to 50  $\mu\text{g}$  per litre and depends on the mode of smoke generation.

The nitrous gases concentration in the smoke relates proportionally to the temperature of smoke formation.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВТОРИЧНЫХ АМИНОВ В РЫБНЫХ ТОВАРАХ

Содержание вторичных аминов в рыбных товарах варьируется в больших пределах и зависит от вида рыбы, от их возраста и условий хранения. Амины образуются при бактериальном действии и вследствие энзиматических, а также неэнзиматических реакций. Амины рассматриваются как компоненты запаха рыбы, показатели порчи рыбы, предшественники образования канцерогенных нитрозаминов. Как известно, нитрозамины образуются при реакции вторичных аминов с нитритами или нитрозаминами.

Для определения вторичных аминов (ВА) предложено несколько методов, но при их применении необходимо соблюдать определенные условия, выполнение которых часто затруднено. При титровании аминов как щелочей [1] реакционная смесь не должна содержать воды или других щелочных компонентов, при применении ацилирования [2] в смеси не должны быть первичные амины или гидроксильные группы. Колориметрический метод определения ВА основан на образовании в смеси нитрозаминов и их последующем определении по методу Грисса [3].

Для выделения аминов из рыбных товаров применяются методы осаждения [4], дистилляции, экстракции [2] и т.д.

При разделении смесей аминов и их количественном определении широко применяются хроматографические методы: ионообменная хроматография [5], тонкослойная хроматография [6,7], газо-жидкостная хроматография (ГЖХ). Одной трудностью при определении ВА ГЖХ-ей является адсорбция аминов на твердом носителе. "Хвостики" у пиков можно элиминировать при использовании капиллярных колонок или при определении аминов производными. Лучшие результаты получены с применением трифтор-ацетилпроизводных [8,9].

Целью настоящей работы было определение остаточного содержания ВА в рыбных товарах и выяснение зависимости остаточного содержания ВА от технологической переработки рыбы.

На основе литературных данных [9,10,11] и собственных экспериментов нами разработана методика выделения и количественного определения ВА в рыбных товарах.

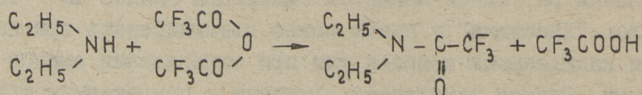
### Материалы и методы

К исследуемой пробе в количестве 50 г добавляют 100 – 150 мл дистиллированной воды и гомогенизируют в гомогенизаторе Homogenizer type 302 при скорости 6000 об/мин в течение 10 мин, при этом колбу гомогенизатора охлаждают в ледяной бане. Гомогенизат переводят количественно в колбу емкостью 250 мл и добавляют 20 мл 20 % раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков. После 15 мин добавляют дистиллированную воду до метки и центрифугируют при скорости 5000 об/мин в течение 5 мин. Для дальнейшего анализа используют полученный центрифугат.

100 мл центрифугата переносят в колбу дистилляции и собирают аппаратуру для дистилляции с водяным паром. В первый приемник вводят 10 мл 1 N HCl, во второй – 5 мл 1 N HCl. Приемники охлаждаются на ледяной бане. В дистилляционную колбу для подщелачивания центрифугата добавляют 60 мл 10 N NaOH. Дистиллята собирают около 300 мл.

Дистиллят экстрагируют 4 раза по 50 мл эфира, после чего гидрохлориды аминов высушивают под вакуумом.

Для получения трифторацетиламидов к полученным гидрохлоридам аминов добавляют 5 мл абсолютного эфира, охлаждают до температуры 5 °С, медленно добавляют ангидрид трифторуксусной кислоты и подогревают до комнатной температуры. Затем колбу оставляют стоять на один час, после чего добавляют еще 10 мл эфира. При реакции:



полученную трифторуксусную кислоту вымывают водой. Для этого смесь амидов переводят в делительную воронку и экстрагируют 3 раза по 10 мл водой. Затем проводят экстракцию с насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  до нейтральной реакции. Промывают еще раз водой и эфирный слой высушивают  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Для хроматографирования используют раствор амидов в эфире.

Для идентификации и количественного определения ВА использовали газовый хроматограф АГК-2 с пламенно-ионизационным детектором. Хроматограф снабжали дополнительной колонкой длиной 2,5 м, внутренним диаметром 4 мм. Твердым носителем применяли Chromaton N-AW-HMDS с диаметром частиц 0,16-0,20 мм. Неподвижной фазой являлся полиэтиленгликол 20 М.

Оптимальные параметры разделения:

температура колонки	80 °C
температура испарителя	190 °C
температура пламени	300 °C
скорость воздуха	300 мл/мин
скорость водорода	50 мл/мин
скорость азота	30 мл/мин

Минимальное детектирующее количество 0,1 мг/кг.

Выход диметиламина (ДМА) и диэтиламина (ДЭА) 47 %.

Для идентификации и количественного определения ДМА и ДЭА пользовались модельными веществами.

### Результаты и их обсуждение

При выборе проб исходили из рыбных товаров, полученных из нашей торговой сети и имеющих важное место в питании населения нашей республики.

Для выяснения влияния технологической обработки на остаточное содержание ВА анализировали свежую, мороженую, соленую, жареную, копченую рыбу и различные рыбные консервы.

Полученные данные приведены в таблице I.

Из полученных данных явствует, что все свежие рыбы содержат сравнительно мало ВА.

Т а б л и ц а 1

Содержание ДМА и ДЭА в рыбных товарах

Анализируемый продукт	Рыба	Салака				
		Сухое вещест., %	Содержание ВА			
			мг/кг в рыбе		мг/кг в сух.вещ.	
I	2	ДМА	ДЭА	ДМА	ДЭА	
свежая рыба	24,1	6	2	25	8	
замороженная	24,1	19	-	79	-	
соленая	39,6	21	2	53	5	
горячего копчения	32,2	26	1	81	3	
жареная	60,6	78	144	129	238	
----- Килька -----						
Таллинская,пряного посола	32,8	32	-	97	-	
Балтийская,пряного посола	35,3	11	6	31	17	
горячего копчения	32,2	13	3	40	9	
Балтийская,особого посола	43,1	50	2	116	-	
маринованная	32,7	64	108	197	330	
копченая	43,0	38	4	88	9	
----- Скумбрия -----						
замороженная	35,3	34	6	96	17	
пряного посола	41,5	10	-	24	-	
копченая	42,1	34	-	81	-	
курильская, натуральная	43,7	25	3	57	7	
натуральная в масле	28,9	55	-	190	-	
в томатном соусе	31,1	56	-	180	-	
жареная в томатном соусе	31,7	30	след.	94	след.	
----- Треска -----						
мороженая	21,2	4	1	193	14	
стояла в замороженном виде 2 недели	21,2	67	8	314	38	
соленая	52,8	72	50	136	95	
горячего копчения	28,5	28	-	98	-	

I	2	3	4	5	6
жареная	46,2	23	след.	50	след.
в томатном соусе	22,8	50	39	219	179
-----					
			Лещ		
свежий	22,4	2	-	9	-
стоял в заморож. виде 2 недели	22,4	5	-	22	-
жареный	34,4	7	-	20	-
горячего копчения	32,7	5	-	15	-

Хранение и переработка рыбы - замораживание, копчение, консервирование и т.д. повышают остаточное содержание аминов в рыбных товарах.

Например, при хранении трески в течение двух недель в замороженном виде содержание ДМА и ДЭА повышалось соответственно 16 и 8 раз.

В результате проделанной работы выяснилось, что тресковые рыбы (треска, скумбрия) содержат сравнительно много ВА-ов, содержание ВА в леще значительно ниже.

### Л и т е р а т у р а

1. J.S. F r i t z. Titration of Bases in Nonaqueous Solvents. "Anal. Chem.", 1950, 22, 1028-1029.

2. D. G i n s b u r g. Concerning Amines, London, Pergamon press, 1967.

3. E. E i s e n b r a n d, R. P r e u s s m a n n. Eine neue Methode zur kolorimetrischen Bestimmung von Nitrosaminen nach Spaltung der N-Nitrosogruppe mit Bromwasserstoff in Eisessig. "Arzneim.-Forsch.", 1970, 20, 1513-1517.

4. Н. Д. Ч е р о н и с, Т. С. М а. Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа. М., "Химия", 1973.

5. К. T s u d a, Т. M a t s u m o t o. Separation of aliphatic amines by ion exchange resin, "J. Pharm. Soc. Japan", 1947, 67, 238.

6. E. H. G r u g e r. Chromatographic Analyses of

Volatile Amines in Marine Fish. "J.Agr. and Food Chemistry", 1972, 20, 4, 781-785.

7. A.A. Boulton, S.R. Phillips, D.A. Deerdren. The Analysis of Certain Amines in Tissues and Body Fluids as their Dansyl Derivatives. "J.Chromatography", 1973, 82, 137-142.

8. M. Pailer, W.J. Hübisch. Bestimmung von primären und sekundären Aminen in Form von Amidinen mit Hilfe der Gaschromatographie auf gepackten und Kapillar-Säulen. "Monatshefte für Chemie", 1966, 97, 6, 1541-1553.

9. B. Crathorne, M.J. Saxby. The Separation and Identification of some Isomeric Alkylamines as their Trifluoroacetyl Derivatives. "J.Chromatography", 1973, 82, 373-376.

10. M. Ishidate, A. Tanimura, J. Ito, A. Sakai. Secondary Amine, Nitrite and Nitrosamines in Japanese Foods. "J.Jap. Pharm. Assoc.", 1971, 23, 12, 47-51.

11. G.B. Neerath, O. Schreiber. Investigation on amines in the human environment, Hamburg, 1973.

J. Kann, K. Raja

### Estimation of Secondary Amines in Fish Product

#### Summary

A method for identification and estimation of dimethylamine and diethylamine in the flesh of fish has been described. The results of experimental studies of secondary amines content in fresh, frozen, salted, smoked and canned fish have been presented in this paper.



УДК 664.657:664.66,019.391

А.Г.Каян, Т.Л.Либерт, Т.А.Кяллу

### УДЛИНЕНИЕ СРОКА ХРАНЕНИЯ ХЛЕБО- БУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Удлинение срока хранения хлебо-булочных изделий является важной проблемой, интересующей предприятия хлебопекарной промышленности.

В настоящее время многие хлебокомбинаты перешли на новые ускоренные технологические методы приготовления теста, применяются различные добавки, особенно молочные продукты. Однако срок хранения хлебо-булочных изделий, приготовленных различными методами и добавками, является одинаковым.

Настоящая работа посвящена изучению сохранения свежести местных булочных изделий, выработанных с применением молочных продуктов и различными методами тестоведения с целью удлинить срок хранения некоторых сортов булочных изделий.

#### Материалы и методы

Для количественной оценки степени черствения хлеба и исследования динамики этого процесса применяли два метода: определение сжимаемости мякиша на пенетрометре марки AP-4/2 [1] и определение атакуемости крахмала  $\beta$ -амилазой [2]. Эти методы оказались наиболее целесообразными для оценки степени черствения, как было установлено в нашей предыдущей работе [2]. Также проводилась органолептическая оценка продукции.

Булочные изделия выработывались на Таллинском хлебокомбинате в производственных условиях по рецептурам батонов "Сакала", "Ярве", "Вадакусай".

Изучалось влияние добавления молочных продуктов (обезжиренного сухого молока и сыворотки) и амилолитических ферментов, а также метода приготовления теста на скорость черствения батонов. Тесто приготавливали на диспергированной жидкой фазе [3] и на опаре (классическим способом).

### Результаты и обсуждение

Для выяснения влияния добавления в тесто обезжиренного сухого молока (ОСМ) и сыворотки на процесс черствения хлеба, выработанного опарным методом и ускоренным методом на диспергированной жидкой фазе (ДЖФ) были проведены опыты с различными количествами ОСМ и сыворотки.

Добавление ОСМ при опарном методе тестоведения ускоряет ухудшение реологических свойств мякши при хранении (табл. I).

Т а б л и ц а I

Определение черствения на пенетрометре, в мм

Время хранения после выпечки в часах	Добавление ОСМ в %					
	0		2,5		4,5	
	общая сжимаемость	упругость	общая сжимаемость	упругость	общая сжимаемость	упругость
2	11,6	3,0	11,2	2,9	10,2	2,8
24	4,9	1,2	4,3	1,1	3,8	1,1
28	4,7	1,2	4,0	1,0	3,6	1,0
48	3,5	1,0	2,7	0,9	2,4	0,8

Добавление сыворотки в количестве 20 кг на 100 кг муки при опарном методе несколько устраняет отрицательное действие ОСМ на сохранение свежести хлеба (таблица 2).

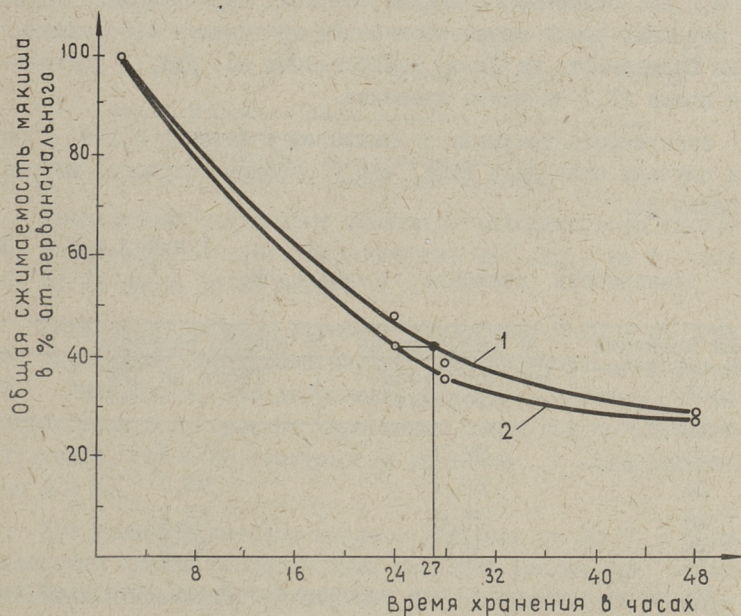
Лучшие результаты были получены с добавлением ОСМ при применении ДЖФ, так как влияние ОСМ на процесс черствения оказалось самым маленьким. Если при опарном методе с 2,5 % и 4,5 % ОСМ общая сжимаемость после 24-часового хранения составляет 43,9 и 40,4 % от первоначальной сжимаемости, то у батонов, выработанных на ДЖФ, соответствующие показатели 48,1 и 41,1 %. Добавление ОСМ в хлебо-булочные изделия с целью повышения пищевой ценности продуктов является целесообразным. На основе проведенной работы можно рекомендовать

добавление ОСМ вместо сыворотки в ДЖФ. В этом случае ОСМ мало влияет на процесс черствения хлеба.

Т а б л и ц а 2

Общая сжимаемость мякиша в %-ах от первоначальной у батонов, выработанных опарным методом

Добавление в тесто сыворотки	Время хранения хлеба после выпечки, в часах	Количество добавленного в тесто ОСМ, в %		
		0	2,5	4,5
20 кг на 100 кг муки	24	50,8	43,9	40,4
	28	47,5	36,2	38,9
	48	31,8	28,7	30,5
Без сыворотки	24	42,5	37,9	37,2
	28	40,4	35,6	25,0
	48	30,3	23,7	24,0



Фиг. 1. Изменение общей сжимаемости мякиша хлеба при хранении.  
1 - батоны, выработанные на ДЖФ.  
2 - батоны, выработанные на опаре.

Для выяснения возможностей удлинения срока реализации изделий из пшеничной муки, вырабатываемых ускоренным методом, проводили сравнительные анализы батонов "Сакала", выработанных опарным методом и на ДЖФ. В рецептуру этих батонов входит 2,5 % ОСМ и 20 % сыворотки.

При хранении батонов, выработанных опарным методом, после 24-часового хранения, являющегося сроком реализации, общая сжимаемость мякиша составляет 44 % от первоначальной (то есть от сжимаемости после 2-часового хранения после выпечки). Такая же сжимаемость от первоначальной при приготовлении теста на ДЖФ достигается после 27-часового хранения (фиг. 1). В единицах пенетрометра динамика изменения общей сжимаемости изображена на фиг. 2. Общая сжимаемость после 2-часового хранения после выпечки на 0,5 мм выше у батонов, выработанных на ДЖФ. При хранении разница несколько увеличивается в пользу батонов ДЖФ. Так, после 24-часового хранения разница составляет 0,7 мм и после 28-часового хранения 0,6 мм. Сжимаемость мякиша батонов, выработанных опарным методом, после срока реализации составляет 4,6 единиц. Такая сжимаемость батонов, выработанных на ДЖФ, достигается после 27,5-часового хранения.

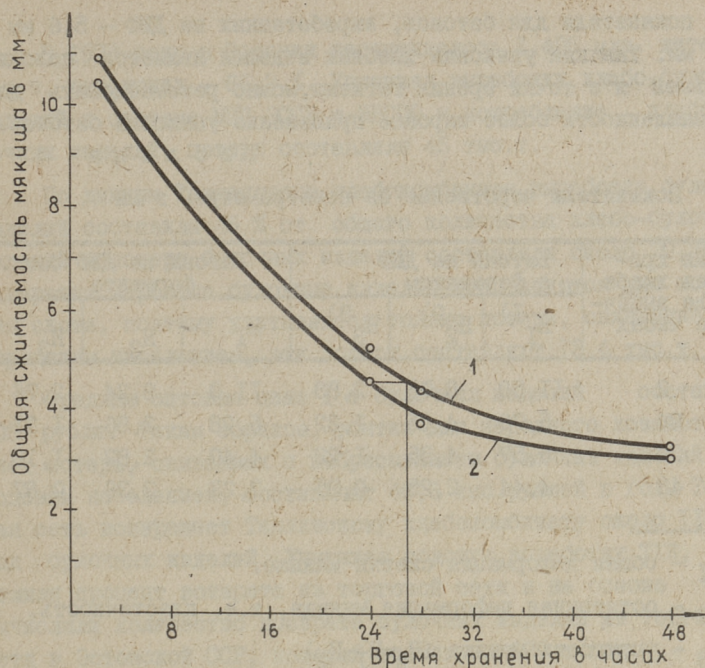
Атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой у батонов с ДЖФ во всех случаях оказалась выше, чем у батонов опарного метода (таблица 3).

Т а б л и ц а 3

Атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой

Время хранения батонов, в часах	Мг мальтозы на 1 г сухого вещества	
	опарный метод тестоведения	Тесто на ДЖФ
2	99,3	III,4
24	58,0	65,0
28	38,6	58,1
48	31,0	37,4

Таким образом, есть все основания считать, что хлеб изготовленный на ДЖФ, имеет после 27-часового хранения такие же объективные показатели степени черствения, которые имеют-ся после 24-часового хранения у хлеба, изготовленного опарным методом.



Фиг. 2. Изменение общей сжимаемости мякиша хлеба при хранении.

1 - батон, выработанный на ДЖФ.

2 - батон, выработанный на опаре.

Проведенные опыты дают основание рекомендовать удлинить срок реализации батон, выработанных на ДЖФ, на 3 часа, т.е. от 24 часов до 27 часов.

Влияние добавления фермента амилоризин П 10 х на процесс черствения хлеба было изучено при выработке батон, на ДЖФ. Выяснилось, что добавление фермента в тесто несколько замедляет процесс черствения хлеба как по сжимаемости мякиша, так и по атакуемости крахмала  $\beta$ -амилазой (таблицы 4 и 5).

При упаковке батон, после охлаждения до  $30^{\circ}\text{C}$  в полиэтиленовую пленку реологические свойства мякиша при хранении изделий несколько лучше, чем без упаковки, как у батон, выработанных на опаре, так и у батон, выработанных на ДЖФ. После 24-часового хранения общая сжимаемость мякиша у упакованных батон, выработанных на опаре 6,2 мм, у батон, выработанных без упаковки, 4,9 мм. Соответствующим

щие показатели для батонов, выработанных на ДЖФ - 5,6 мм и 6,7 мм. Так как упаковка хлебных изделий является положительной и с точки зрения гигиены, можно рекомендовать для промышленности более широкое применение упаковки батонов.

Т а б л и ц а 4

Показатели черствения на пенетрометре, в мм

Время хранения хлеба после выпечки в часах	Батоны на ДЖФ с ферментом			Батоны на ДЖФ без фермента		
	$H_1$ 1)	$H_2$ 2)	$H_3$ 3)	$H_1$	$H_2$	$H_3$
2	11,58	8,75	2,83	11,0	8,24	2,76
24	5,76	4,45	1,32	5,28	3,86	1,31
28	5,57	4,35	1,22	4,40	2,82	1,15
48	4,44	2,25	0,95	3,23	2,36	0,87

1)  $H_1$  - общая деформация сжатия мякиша.

2)  $H_2$  - остаточная деформация мякиша, т.е. пластичность.

3)  $H_3$  - упругость мякиша ( $H_3 = H_1 - H_2$ ).

Т а б л и ц а 5

Атакуемость крахмала  $\beta$ -амилазой

Время хранения в часах	Мг мальтозы на 1 г сухого вещества	
	батоны на ДЖФ с ферментом	батоны на ДЖФ без фермента
2	120	111,4
24	71,4	65,0
28	67,0	53,1
48	42,6	37,4

Был проведен ориентировочный расчет экономической эффективности удлинения срока хранения булочных изделий на 3 часа. Потери в хлебо-булочных изделиях образуются по двум причинам:

1) ввиду неиспользования населением булочных изделий в черством виде,

2) за счет возврата булочных изделий в комбинат из торговой сети с просроченными сроками реализации.

В 1973 году в Эстонии насчитывалось 1,405 млн. жителей, в т.ч. городских - 66,2 %. Учитывая выработку хлебо-булочных изделий в системе МПП ЭССР и ЭРСПО и потребление хлебо-булочных изделий, потери составляли 45 тыс.т.

По данным Таллинского хлебокомбината выработка булочных изделий составила 45 % от общего количества хлебо-булочных изделий и потери булочных изделий составляли около 20,3 тыс.т. В деревне черствые булочные изделия используются для кормления скота, поэтому учитываются только потери, связанные с городским населением, эти потери составляют 13,4 тыс.т.

Средняя оптовая цена 1 т булочных изделий составляет 303 рубля. Таким образом, убытки для народного хозяйства за счет потерь, связанных с выбрасыванием булочных изделий городским населением, составляют 40,6 тыс.рублей в год. Торговая сеть возвращает Таллинскому хлебокомбинату около 115 т в год булочных изделий. Учитывая годовую выработку ТХК, определили процент возврата из торговой сети и на основе этого вычислили количество возврата булочных изделий из торговой сети в Эстонской ССР, который составлял 620 т/год.

Производственные затраты на выработку 1 т булочных изделий из пшеничной муки высшего сорта и I сорта составляют ориентировочно 50 руб/т, поэтому от возврата булочных изделий из торговой сети убытки составляют 31 тыс.руб/год.

Итого убытки в народном хозяйстве ввиду черствения булочных изделий составляют 4091 тыс.руб/год.

Принимая среднее время хранения булочных изделий (от выпечки до потребления) 60 часов и увеличивая этот срок на 3 часа, согласно проведенным исследованиям, сохраняемость булочных изделий увеличивается на 5 %.

На основе проведенных расчетов перспективное снижение убытков в народном хозяйстве составляет 20,5 тысяч рублей в год.

#### Л и т е р а т у р а

И. Л.И. Пучкова. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства. - "Пищ.пром.", М., 1971, 190 с.

2. А.Г. К а н н, К.Э. К и в и а э д. Исследование черствения хлеба. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 367, 1974, с. 55-60.

3. И.А. Г а н з у р о в а, А.Г. К а н н, Р.Х. К я э р и, Л.О. Р а у д. Газообразование в полуфабрикатах и качество нарезных батонов. "Хлебопекарная и кондитерская промышленность", 1971, № 4.

A. Kann, T. Liebert, T. Källu

Prolongation of the Storing Time of Bread Products

Summary

The effects of different technology of doughmaking and addition of various supplements to the staling process of bread have been investigated.

The bread prepared on the basis of disperse fluid phase would stale slower, which makes possible to prolong the realisation time of bread for 3 hours.



К. А. Каск, В. А. Мандель,  
А. А. Мельдеркиви, А. Г. Канн,  
Л. А. Кульдмяэ, Т. Л. Лиеберт

### ПИЩЕВАЯ ЦЕННОСТЬ ХЛЕБО-БУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ ТАЛЛИНСКОГО ХЛЕБОКОМБИНАТА

В последнее время уделяют все более широкое внимание на соблюдение принципов рационального питания.

Как показывают исследования, общая калорийность пищи в Эстонской ССР несколько выше физиологических норм, но в то же время имеется недостаток белков, в частности, животного происхождения, витаминов и минеральных веществ [1, 2, 3].

Одним из важнейших продуктов в пищевом рационе нашей республики являются хлебо-булочные изделия, которые употребляются ежедневно в довольно больших количествах (около 300 г в сутки). Этим самым объясняется огромное значение химического состава хлебо-булочных изделий при регулировании неуровновешенности пищевого рациона [4].

В нашей республике применяются в хлебопекарной промышленности широко молочные продукты. Большой интерес представляет химический состав многих местных сортов хлебо-булочных изделий, а также общеизвестных сортов, изготовленных в конкретных условиях нашей промышленности.

#### Материалы и методы

В настоящей работе были проведены анализы 14 сортов хлебо-булочных изделий, выработанных на Таллинском хлебокомбинате.

Каждая проба составлялась из трех разных изделий данного сорта из одной выпечки, анализы проводились 3 раза из различных выпечек.

Т а б л и ц а I

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ХЛЕБО-БУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ

Показатели	ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ХЛЕБО-БУЛОЧНЫХ ИЗДЕЛИЙ													
	Застя сепия	Локторские хлебцы	Зерновой хлеб "Здоровье"	Молочный батон	Солёный батон	Батон "Сакага"	Таллинская булочка	Городской батон	Батон "Ярва"	Батон "Вада-кусаи"	Левенский хлеб	Шолоховский хлеб из ржаной солодной муки	Хлеб "Вирв"	Формовый хлеб из ржаной муки
1. Сухие вещества, %	64,8	64,2	64,4	64,0	63,9	63,2	71,7	66,3	65,6	66,3	59,2	58,9	60,7	53,0
2. Белки, %	7,3	7,0	8,0	8,1	7,7	7,4	8,1	7,3	7,7	7,4	6,4	5,5	5,4	4,9
3. Жиры, %	2,7	1,4	2,2	1,4	2,9	2,1	6,2	1,2	2,0	2,5	1,4	1,6	1,6	1,5
4. Углеводы, %	52,2	53,3	51,7	52,7	51,6	52,2	55,8	56,0	54,1	54,8	48,2	48,7	51,2	43,6
5. Клетчатка, %	0,9	0,9	1,3	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	1,1	1,2	0,7	1,0
6. Зола, %	1,7	1,6	1,2	1,7	1,5	1,2	1,4	1,5	1,6	1,4	2,1	1,9	1,8	1,9
7. Поваренная соль, %	1,2	1,2	0,6	1,3	1,2	1,0	1,2	1,3	1,2	1,1	1,3	1,2	1,2	1,2
8. Калорийность, ккал/100 г	268	260	267	264	271	267	320	271	273	279	237	233	245	214
9. Белки от общей калорийности, %	II	II	12	13	12	12	10	II	12	II	II	10	9	10,1
10. Жиры от общей калорийности	9	5	8	5	10	8	18	4	7	8	6	6	6	6,6

Содержание белков, жира, клетчатки, соли, поваренной соли и воды определяли общепринятыми и утвержденными ГОСТом методами, содержание углеводов и калорийность изделий — расчетным путем [5].

Для каждого сорта вычисляли долю белков в общей калорийности — чем выше этот показатель, тем выше питательная ценность данного сорта.

### Результаты и обсуждение

Средние результаты анализов приведены в таблице I.

На основе полученных данных выяснилось, что значение белков в общей калорийности хлебо-булочных изделий, выработанных на Таллинском хлебокомбинате, составляет 9-13 %. Этот показатель наивысший у молочного батона (13 %), самая низкая у таллинской булочки (10 %). Для изделий из ржаной муки доля белка в калорийности составляет 9-10 %.

Самое высокое значение жира в калорийности у таллинской булочки (18 %), у ржаных изделий значение жира в калорийности составляет  $\approx 6$  %.

Самым удачным в отношении пищевой ценности из проанализированных пшеничных изделий можно считать молочный батон. Следует зерновой хлеб "Здоровье", батон "Сакала" и батон "Ярва". Самая низкая пищевая ценность у таллинской булочки. Из ржаных изделий самым удачным по пищевой ценности можно считать деревенский хлеб, самая низкая пищевая ценность у подового хлеба "Виру".

### Л и т е р а т у р а

1. E. V a g a n e. Toitlustamise küsimusi Eesti NSV-s. Tallinn, 1968.

2. Э. П. В а г а н е. Некоторые особенности питания и обмена веществ у населения Эстонской ССР. Автореферат докт. дисс. 1973, Таллин, 25 с.

3. K. K a s k, A. V a s a r. Eesti NSV elanike toitumiskonstruktuur. "Nõukogude Eesti Tervishoid", 1974, nr. 1, lk. 23-25.

4. K. K a s k, A. V i r k u s. Toitlusprobleeme. "Nõukogude Eesti Tervishoid", 1971, nr. 4, lk. 259-263.

5. B. T h o m a s. Zur Kalorienberechnung von Brot.  
Getreide, Mehl und Brot, 1974, 28, Nr. 2, S. 41-44.

K. Kask, V. Mandel, A. Mõlder-  
kivi, A. Kann, L. Kuldmäe,  
T. Liebert

Calorific Value of Black and White Breads of Tallinn  
Bread Plant

Summary

In the Estonian SSR about 300 g of bread is consumed per head a day. That is why the calorific value of various sorts of black and white bread is important.

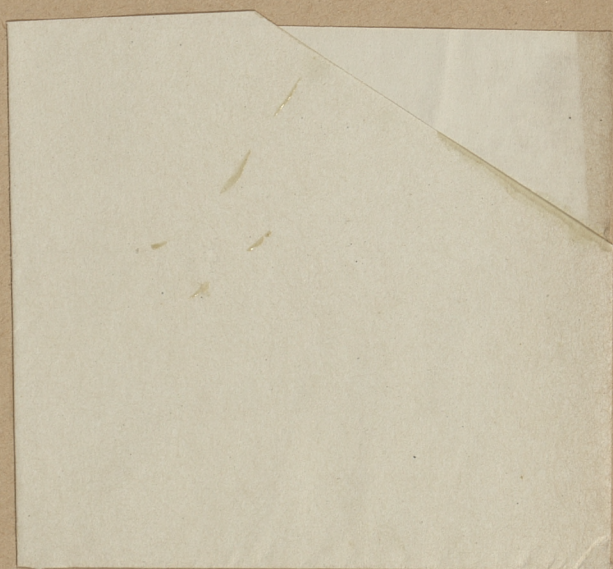
The data about the calorific value of different sorts of bread, most consumed in the Estonian SSR, are presented in this paper. Fourteen various sorts of black and white bread have been investigated. The content of proteins in these products is rather low, the fat content, however, rather high.

## С о д е р ж а н и е

1.	Э.Х.Сиймер, М.О.Мандель. О рН-зависимости ферментативных реакций . . . . .	3
2.	К.Э.Паппель, А.И.Кёстнер, А.С.Тихомирова, Н.А.Загустина, Е.В.Летунова. Иммуобилизация $\beta$ -галактозидазы на неорганических носителях. . . . .	9
3.	В.А.Кросинг, Ю.Й.Ярвет, Э.Х.Сиймер, А.И.Кёстнер. Термическая инактивация свободной и иммуобилизованной в полиакриламидный гель инвертазы	17
4.	М.О.Мандель, Э.Э.Лепп, Т.Ю.Масинг, Э.Х.Сиймер, А.И.Кёстнер. Исследование реакции инактивации иммуобилизованной пенициллинамидазы. . . . .	23
5.	Г.И.Клейнер, Л.М.Елизаровская, М.О.Мандель, А.И.Кёстнер. Превращение бензилпенициллина в 6-аминопенициллановую кислоту с помощью иммуобилизованной пенициллинацилазы. . . . .	31
6.	Х.Я.Киппер, А.И.Кёстнер, Б.В.Мгедиашвили. Силанизация пористого стекла $\gamma$ -аминопропилтриэтоксисиланом. . . . .	43
7.	Ю.М.Канн, О.В.Таутс, Р.Э.Калве, С.Ю.Пинк. О содержании нитрозгазов в технологическом дыме.	51
8.	Ю.М.Канн, К.К.Рая. Определение вторичных аминов в рыбных товарах. . . . .	57
9.	А.Г.Канн, Т.Л.Лиеберт, Т.А.Кяллу. Удлинение срока хранения хлебо-булочных изделий . . . . .	63
10.	К.А.Каск, В.А.Мандель, А.А.Мельдеркиви, А.Г.Канн, Л.А.Кульдмяэ, Т.Л.Лиеберт. Пищевая ценность хлебо-булочных изделий Таллинского хлебокомбината. . . . .	71

---

Таллинский политехнический институт. Труды ТПИ № 383. СБОРНИК СТАТЕЙ ПО ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ XXXУШ. (Технология пищевых производств У). Редактор А. Каян, Техн. редактор В. Р а н - н и к. Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 5 сент. 1975 г. Подписано к печати 11 дек. 1975 г. Бумага 60x90/16. Печ. л. 4,75 + 0,5 приложение. Уч.-изд. л. 3,9. Тираж 350. МВ-07877. Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коскла, 2/9. Зак. №841. Цена 39 коп.



Цена 39 коп.