

волокна підвищується зі збільшенням концентрації розчину, яким проводиться обробка.

Отже, теоретично встановлено характер зміни розщепленості пенькового волокна в процесі запропонованої обробки. Визначено, що при обробці пенькового волокна за запропонованою схемою можна очікувати підвищення показника розщепленості волокна, що позитивно відіб'ється на якості волокна і сприятиме його подальшій обробці.

### Література

1. Крагельский И. В. Физические свойства луб'яного сырья / Крагельский И. В. [2-е изд. доп. и перераб.]. – М.: Государственное издание легкой промышленности, 1939. – С. 54
2. Валько В.М. Змінювання відокремлюваності волокна при витримуванні зволоженої льносоломомі без доступу повітря / В. М. Валько // Вісник технологічного університету Поділля. – 2000. – № 1. – С. 46 – 48.
3. Сидоров М. И. Общая технология переработки лубяных волокон: [учебник для сред. спец. учеб. заведений легкой промышленности] / Сидоров М. И., Храмцов В. Н., Алексеева З. Ф. – М.: Легкая индустрия, 1980. – С. 13– 15, 71.
4. Выгодский М. Я. Справочник по высшей математике / Выгодский М. Я. – М.: Изд-во физико-математической литературы, 1963. – С. 243– 496.

Надійшла 13.3.2011 р.

УДК 648.145

Л.С. СТЕПАНОВА, І.А ПІГОЛЬ  
Хмельницький національний університет

## ДІЯ ДЕНАТУРУЮЧОГО АГЕНТУ НА ПРОТЕОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ

*Проаналізовано вплив рН середовища та температури на зміну протеолітичної активності нативного і іммобілізованого пепсину, досліджено можливість тривалого використання іммобілізованого ферменту. Показано, що іммобілізований фермент, на відміну від нативного, може використовуватись в більш широкому діапазоні рН середовища без втрати активності, та при більш високих температурах.*

*The influence on the change of proteolytic activity and immobilized pepsin of pH environment and the temperature are analyzed. The possibility for continued use of immobilized enzyme is investigated. The immobilized enzyme in contradistinction to native one may be used in a wide range of pH without loss of activity and at higher temperatures are shown.*

Ключові слова: фермент, іммобілізація, протеолітична активність, субстрат, біологічний каталізатор.

### Постановка проблеми

Застосування нативних ферментів у різних галузях промисловості пов'язано з певними труднощами: висока вартість, важкість відділення від реакційного середовища, низька стабільність при зберіганні. Їх можна подолати, якщо іммобілізувати той же фермент на волокнистому носії.

Іммобілізовані ферменти у порівнянні з нативними мають ряд переваг:

- гетерогенний каталізатор легко відділяється від реакційного середовища, що дає можливість зупинити реакцію в будь-який момент, використовувати фермент повторно, а також отримувати чистий від ферменту продукт;
- ферментативний процес з використанням іммобілізованих ферментів можна проводити безперервно, регулюючи швидкість реакції та вихід продукту шляхом зміни швидкості потоку;
- модифікація ферменту цілеспрямовано змінює такі його властивості, як специфічність (особливо по відношенню до високомолекулярного субстрату), залежність каталітичної активності від рН, іонного складу та інших параметрів середовища, стабільність до денатуруючого впливу [1].

Проблема використання біологічних каталізаторів у вигляді ферментів, іммобілізованих на волокнистих носіях, в різних галузях промисловості залишається й досі відкритою. В основному це пов'язано з недостатньою кількістю проведених досліджень. Як у природі, так і на практиці при проведенні будь-яких виробничих, лабораторних та інших процесів на об'єкт дослідження виявляє вплив не один фактор, а комплекс різних факторів. Змінюючи значення цих факторів і комбінуючи їх між собою, отримують зовсім різні результати, тому необхідним при дослідженнях є вивчення взаємодії факторів між собою та об'єктом дослідження, вибір оптимального варіанту.

Крім створення стійких біокаталітичних ферментних систем, важливою задачею інженерної ензимології є вивчення фізико-хімічних властивостей даних систем і розробка наукових основ їх функціонування та використання в різних галузях народного господарства.

Дослідження показали, що фермент, закріплений на твердому носії, стає більш стійким до денатурації. У такого фермента обмежена рухливість білкового ланцюга, його вже не так просто розвернути і порушити цим його каталітично активну структуру. Крім того, носій може сильно впливати на каталітичні властивості ферменту й інколи збільшувати його активність [2].

Для отримання іммобілізованих ферментів використовується обмежена кількість як органічних, так і неорганічних носіїв. До носіїв висуваються наступні вимоги, які наведені у літературі [3]:

- висока хімічна і біологічна стійкість;
- висока хімічна міцність;
- достатня проникність для ферменту і субстратів, пористість;
- велика питома поверхня;
- можливість отримання у вигляді зручних в технологічному відношенні форм (гранул, мембран);
- легка активація;
- висока гідрофільність та невисока вартість.

Як носій для іммобілізації пепсину обрали целюлозну тканину у вигляді медичної марлі, виходячи з ряду переваг, які належать цьому природному полімеру: створення природних умов для роботи ферменту, висока гідрофільність, легкість активації, невисока вартість, доступність, нетоксичність.

Такий біокатализатор можна швидко відділити від реакційного середовища, а також можна використати для створення біореакторів, вистилаючи біологічно-активним волокном внутрішню поверхню реактора.

Для досліджень обрали пепсин, оскільки була розроблена методика його іммобілізації, але не проведене вивчення поведінки, стабільності при впливі на нього різних факторів [4].

#### Мета дослідження

- порівняти вплив денатуруючого агенту на протеолітичну активність нативного та іммобілізованого пепсину;
- дослідити стабільність іммобілізованого і нативного пепсину до дії таких факторів, як температура та рН, а також, визначити тривалість дії іммобілізованого ферменту.

#### Основний розділ

Однією із важливих вимог до нерозчинних похідних ферментів є підвищення їх стабільності, в результаті чого можна було б тривалий час використовувати препарат та проводити процеси при більш високих температурах. Це дає можливість контролювати хід та швидкість реакції, якість та вихід продукту. Стабільність ферментів, закріплених на носіях, зазвичай вивчають, піддаючи його дії таких факторів, як температура і рН-середовище, а також впливу водних обробок. Важливим також є визначення тривалості дії іммобілізованого ферменту.

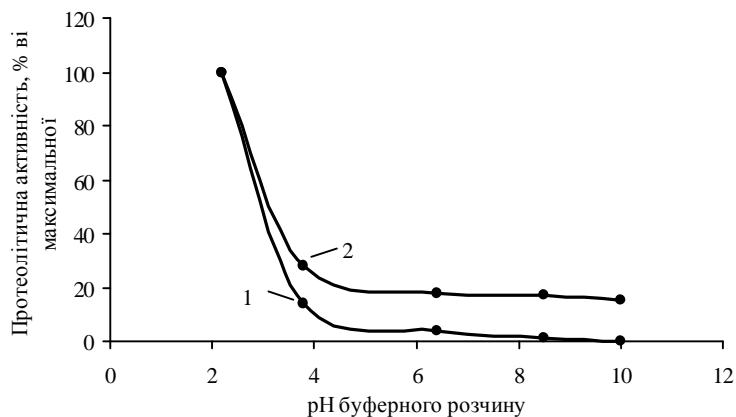


Рис. 1. Вплив рН буферного розчину на протеолітичну активність нативного (1) та іммобілізованого (2) ферментів

Дослідження стабільності ферменту до дії рН буферного розчину проводили при зміні рН від 2 до 10. Активність виражали у відсотках від максимального її значення, яке проявляється нативним та іммобілізованим ферментами. Результати досліджень представлені на рис. 1.

Після витримання нативного та іммобілізованого ферментів в буферному розчині впродовж години їх активність помітно падає, але порівняно з нативним ферментом, активність якого повністю втрачається при рН, починаючи від його значення 8, активність іммобілізованого ферменту в лужному середовищі залишається практично незмінною. Найбільше значення активності, як у нативного так і у іммобілізованого ферменту спостерігається при рН 2,2 буферного розчину, адже пепсин за своєю природою функціонує в кислому середовищі. Значне збереження активності в кислих і лужних середовищах пепсину, іммобілізованого на целюлозному волокні, зумовлене його зв'язуванням водневими і гідрофобними зв'язками, які запобігають розгортанню білкової молекули, тобто денатурації. Крім того, високе збереження активності іммобілізованого ферменту в лужному середовищі свідчить про різке зниження швидкості автолізу в результаті закріплення молекул цього ферменту на полімерному носії [5].

Для вивчення стабільності ферменту до дії підвищених температур сухий нативний фермент та волокно з іммобілізованим на його поверхні ферментом витримували у термостаті впродовж години при температурах: 20°C, 30°C, 40°C, 60°C та 80°C. Потім проводили гідроліз казеїну даними ферментами і визначали протеолітичну активність за методом Ансона. Активність виражали у відсотках від вихідної активності для ферменту закріпленого на носії та нативного ферменту.

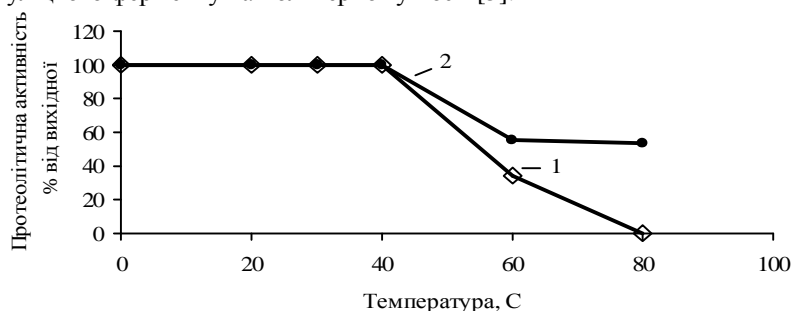


Рис. 2. Вплив температури на протеолітичну активність нативного (1) та іммобілізованого (2) ферментів

Результати досліджень представлені на рис. 2.

Як видно з рис. 2, нативний та іммобілізований ферменти при їх нагріванні впродовж години до 40 °С повністю зберігають свою активність, яка складає 100 % від вихідної. Тут фермент, як речовина, яка синтезується у живих організмах, здатен витримувати підвищення температури до 40 °С, а потім відбувається його денатурація, що зумовлює втрату активності. Але на відміну від нативного ферменту, який повністю інактивується при температурі 80 °С, фермент закріплений на волокнистому носії продовжує зберігати свою активність, яка при 80 °С становить 53 % від вихідної. Підвищення термолабільності пепсину, зв'язаного з целюлозним волокном, слід, знову ж таки, пов'язувати з конформаційними змінами молекул цього ферменту в результаті взаємодії з носієм.

Для визначення тривалості дії (експлуатаційних властивостей) ферменту, закріпленого на модифікованому акриловою кислотою целюлозному волокні, послідовно проводили реакцію гідролізу субстрату.

Зразки волокна з приєднаним до його поверхні пепсином поміщали в розчин субстрату – казеїну для проведення його ферментативного гідролізу. Було проведено 10 циклів гідролізу. Вихідну активність пепсинмістких волокон приймали за 100 %. Результати досліджень представлені на рис. 3.

Значне збереження активності ферменту, закріпленого на носії, як уже неодноразово зазначалося при поясненні впливу ряду факторів на його властивості, пояснюється тим, що завдяки іммобілізації нативна конформація молекули білка стає більш жорсткою за рахунок утворення додаткових зв'язків всередині молекули та між ферментом і субстратом. Саме жорсткість просторової структури молекули ферменту, зменшення ймовірності автолізу, стійкість його до змін рН та підвищених температур, можливість відокремлення ферменту від реакційного середовища дає змогу використовувати такий біокатализатор багаторазово без втрати його активності протягом кількох циклів, що видно з рис. 3а.

В даному випадку іммобілізований на модифікованому акриловою кислотою целюлозному волокні пепсин повністю зберігає свою активність до 7 циклів використання, після чого вона повільно починає падати, але залишається досить високою – близько 90 % на 10-му циклі використання.

Також досліджували вплив багаторазових водних обробок на якісні та кількісні характеристики іммобілізованого пепсину.

З цією метою зразки целюлозного матеріалу, що містить пепсин, витримували в 0,1 М розчині фосфатного буферу з рН 7,5 впродовж 10 хвилин (модуль ванни 100) та віджимали. Після висушування на одних зразках визначали протеолітичну активність, інші знову піддавали вологим обробкам, здійснюючи їх 10 раз. Результати досліджень представлені на рис. 3, б.

З рис. 3 б видно, що фермент, закріплений на носії, витримує до шести водних обробок без втрати активності, потім активність починає зменшуватися і після десятої водної обробки вона становить 83 %.

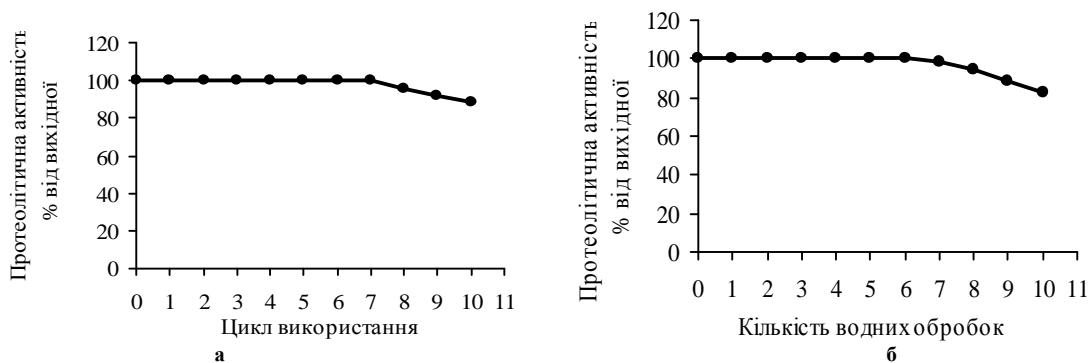


Рис. 3. Зміна протеолітичної активності іммобілізованого пепсину залежно від кількості циклів використання при гідролізі казеїном (а) та водних обробок (б)

Після кожної водної обробки біологічно-активного волокна визначали в буферному розчині кількість пепсину, що відщепився від поверхні біокатализатора, за методом Лоурі та розраховували кількість ферменту, що залишився на волокні. Одержані результати досліджень представлені на рис. 4.

Зменшення активності ферменту пов'язане з тим, що внаслідок багаторазової водної обробки зв'язки між носієм та молекулами ферменту послаблюються, тому певна кількість ферменту відщеплюється від поверхні носія, потрапляючи в буферний розчин. З рис. 4 видно, що кількість ферменту на волокнистому носії після шести водних обробок залишається незмінною, при наступних водних обробках із поверхні носія починає відщеплюватися незначна кількість ферменту, що й викликає зменшення активності останнього.

З отриманих результатів експериментальних досліджень видно, що іммобілізований фермент має більшу стійкість до зміни впливу різних факторів на відміну від нативного ферменту і проявляє при цьому значно більшу здатність до збереження активності. Важливим також є те, що фермент, закріплений на волокнистому носії, можна використовувати багаторазово без втрати активності.

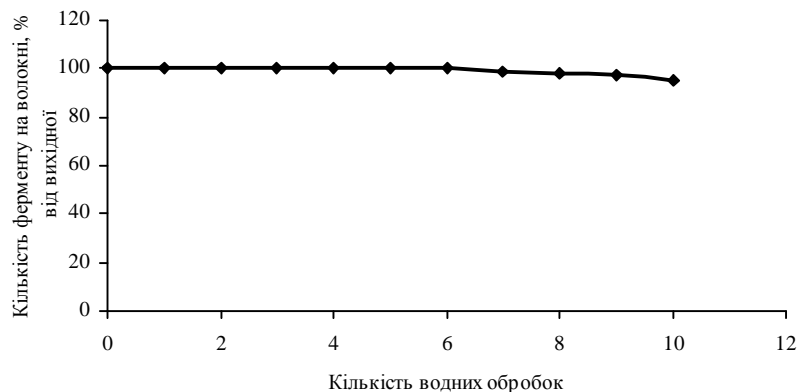


Рис. 4. Вплив водних обробок на кількість ферменту закріпленого на целюлозному носії

### Висновки

Імобілізація пепсину на волокнистому носії призводить до більшої стабільності щодо:

- температури,
- рН-середовища,
- тривалості використання (до 10 циклів) без значної зміни протеолітичної активності, як в розчинах субстрату (казеїну), так і водному середовищі.

### Література

1. Методи іммобілізації ферментів та використання біокатализаторів: перспективи іммобілізації ферментів [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://www.window.edu.ru/window/catalog/pdf/2txt/id/> (дата звернення: 04.10.2010).
2. Волков М. И. Биохимия мышечной деятельности / Волков М. И. – К.: Олимпийская литература, 2000. – 502 с.
3. Степанова Л. С. Вплив різних факторів на процес модифікації целюлозної тканини органічною кислотою / Л. С. Степанова, Ю. В. Жак // Вісник ХНУ. – 2006. – № 4. – С. 211– 215.
4. Степанова Л. С. Дослідження впливу субстрату на активність іммобілізованого пепсину / Л. С. Степанова, І. А. Піголь // Вісник ХНУ. – 2010. – № 2. – С. 240– 244.
5. Мосолов В. В. Нерастворимые ферменты, их получение, свойства и применение / В. В. Мосолов // Успехи биологической химии. – 1973. – Т. 14. – С. 146– 171.

Надійшла 18.3.2011 р.

УДК 664.8

Т.С. ЯРОШЕВИЧ

Луцький національний технічний університет

## СУЧАСНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТУВАННЯ КАРТОПЛЯНОЇ ХВОРОБИ ХЛІБА ТА ЗАСОБИ ЗАПОБІГАННЯ ЇЇ РОЗПОВСЮДЖЕННЮ

*Досліджено фактори, які впливають на виникнення й розвиток картопляної хвороби хліба. Наведено методику виявлення збудника хвороби у борошні, а також засоби раннього діагностування картопляної хвороби та шляхи запобігання розвитку хвороби з точки зору технології виготовлення хліба й додержання санітарного становища складських приміщень, обладнання, транспортних засобів.*

*The factors that influence the occurrence and development of potato diseases bread. The method of detection of causative agent in the flour, and the means of early diagnosis of potato diseases and ways to prevent disease development in terms of food production technology and observance of sanitary status of storage facilities, equipment and vehicles.*

Ключові слова: бактерія картопляна паличка, спори, картопляна хвороба, мезофільні та концентровані молочнокислі закваски, пробна випічка, якість хліба.

### Вступ

В сучасних умовах, коли вимоги до якості хлібобулочних виробів систематично зростають, питання якості борошна набуває ще більшого значення, ніж раніше [1, 2]. Особливо актуальним є питання зараження борошна бактерією *B. Subtilis ssp. Mesentericus* – картопляною паличкою, яка останніми роками створює велику проблему борошномельним підприємствам та хлібозаводам, викликаючи картопляну хворобу хліба. Бактерія картопляна паличка дуже розповсюджена у природі. Вона знаходиться у ґрунті, у повітрі, на рослинах, й на поверхні зерна.

### Постановка завдання

Проблема полягає у тому, що на більшості зернопереробних підприємств з економічних міркувань відмінили операцію миття зерна перед помелом (згідно з Правилами проведення технологічного процесу на млинах, ця операція є обов'язковою), його піддають лише зволоженню [1]. У результаті, під час