

УДК 676.017:543.645.4

П.А. Тупин, Д.Г. Чухчин, О.М. Соколов

Тупин Павел Алексеевич родился в 1984 г., окончил в 2005 г. Архангельский государственный технический университет, аспирант кафедры биотехнологии, ассистент кафедры биомедицинской техники АГТУ. Имеет 1 печатную работу в области биотехнологии в ЦБП, программирования микроконтроллеров.



Чухчин Дмитрий Германович родился в 1971 г., окончил в 1993 г. Архангельский лесотехнический институт, кандидат технических наук, доцент кафедры биотехнологии Архангельского государственного технического университета. Имеет более 60 печатных работ в области химической переработки древесины.



Соколов Олег Михайлович родился в 1936 г., окончил в 1960 г. Ленинградский технологический институт ЦБП, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, президент Архангельского государственного технического университета, академик Международной академии наук, РИА, РАЕН, Академии проблем качества РФ, чл.-кор. МИА, заслуженный деятель науки РФ. Имеет около 200 научных трудов в области исследования процессов сульфатной варки, изучения свойств и применения технических лигнинов.



КРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ЦБП

Показана возможность использования криоскопического метода для определения активности гидролитических ферментов, применяемых в ЦБП; разработана методика криоскопического определения активности амилазы.

Ключевые слова: криоскопия, гидролитические ферменты, активность, амилаза.

За последнее десятилетие применение ферментов в ЦБП существенно возросло. К настоящему времени круг их расширился и включает несколько классов ферментов. Кроме того, в результате проведенных научно-исследовательских работ удалось получить ферментные препараты, эффективно работающие в конкретных технологических условиях процессов ЦБП: амилазы – удаление чернил, роспуск массы; ксиланазы – улучшение отбелки крафт-целлюлозы, размол; целлюлазы – удаление чернил, улучшение обезвоживания, модификация поверхности, размол; липазы – удаление смолы при средних и высоких температурах; эстеразы – предотвращение налипания; протеазы – удаление слизи.

В последние годы был достигнут заметный прогресс в использовании и других классов ферментов, например таких, которые разрушают пектин, – для контроля заряда и переработки анионных отходов; оксидоредук-

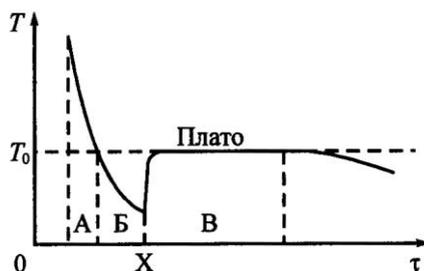
таз/лакказ – для повышения прочности ДВП и подобных продуктов. При переработке макулатуры ферменты в основном применяют для удаления чернил и крахмала, улучшения обезвоживания и контроля липкости [3].

Известно несколько методов определения активности ферментов: химические (метод концевых групп), термодинамические (криоскопический, эбулиоскопический), молекулярно-кинетические (вискозиметрический, метод диффузии, ультрацентрифугирование), оптические (колориметрический, спектрофлуориметрический, спектрофотометрический), манометрический (когда в исследуемых реакциях один из компонентов находится в газообразном состоянии). Большинство из этих методов требуют сложной процедуры пробоподготовки, использования дорогостоящих реактивов и сложного оборудования, характеризуются большой продолжительностью анализа. Кроме того, среды, в которых работают ферменты ЦБП (высокая оптическая плотность, вязкость), не позволяют применять для определения активности многие вышеперечисленные методы. Этих недостатков лишен криоскопический метод, основанный на измерении понижения температуры замерзания раствора по сравнению с температурой замерзания чистого растворителя.

Понижение температуры замерзания, соответствующее растворению 1 моля вещества в 1000 г растворителя, есть величина постоянная для данного растворителя. Она называется криоскопической константой растворителя. Для воды она равна 1,86 °С. Такое значение константы является относительно низким и требует прецизионного измерения температуры растворов малой концентрации.

Наиболее быстрым и точным способом измерения точки замерзания раствора является его охлаждение на несколько градусов ниже теоретической температуры замерзания (образец остается жидким), а затем механическое инициирование кристаллизации (например, легким постукиванием по стенкам пробирки). Высвобождающееся при росте кристаллов тепло поднимает температуру образца (смесь кристаллов и жидкости) до температуры замерзания данного раствора. Чувствительный термистор зонда прибора измеряет температуру пробы, контролирует степень переохлаждения, инициирование замерзания и измеряет температуру замерзания. За температуру кристаллизации принимают температуру, соответствующую горизонтальному участку на кривых охлаждения (рис. 1) [1].

Рис. 1. Зависимость температуры раствора T от времени τ при переохлаждении и последующей перекристаллизации: А – зона охлаждения раствора до температуры кристаллизации T_0 ; Б – зона переохлаждения раствора; Х – точка начала кристаллизации; В – зона завершения кристаллизации



Точность измерения температуры замерзания зависит в первую очередь от способа ее измерения. В лабораторной практике при проведении единичных измерений используют термометр Бекмана с ценой деления 0,01 °С, что недостаточно для проведения высокоточных и быстрых измерений. Поэтому перспективным является применение полупроводниковых датчиков и датчиков RTD, полученных методом напыления металлов (платина, медь).

В настоящее время фирмы-изготовители предлагают широкий ряд моделей криоскопов, практически не отличающихся возможностями и техническими характеристиками. Приборы позволяют определять массовую долю добавленной воды в заготавливаемом молоке, эффективные (осмотические) концентрации биологических жидкостей и водных растворов, а также температуру замерзания, соответствующую этим концентрациям [2].

Количественно активность фермента определяют по скорости протекания каталитической реакции. Ход реакции нелинеен во времени. Это может быть вызвано недостатком субстрата, ингибированием фермента, разрушением фермента при изменении рН среды, сорбцией фермента на субстрат. Поэтому следует определять начальную скорость реакции. За единицу активности фермента принимают такое его количество, которое катализирует превращение 1 моля субстрата за 1 мин. Для расчета расхода фермента общую активность выражают на единицу либо объема, либо массы.

Для измерения скорости ферментативной реакции необходимо подобрать буфер, который не тормозил бы исследуемую активность и обеспечивал рН раствора, близким к оптимальной для данного фермента. Реакцию проводят при температуре, лежащей в диапазоне 25 ... 90 °С.

При протекании ферментативной гидролитической реакции увеличивается число молекул, вследствие чего происходит понижение температуры замерзания раствора. Для определения скорости процесса криоскопическим методом из зоны реакции необходимо через некоторые интервалы времени производить отбор пробы и измерять температуру ее кристаллизации. При этом желательно, чтобы объем пробы был незначителен по сравнению с объемом реактора. Также для проведения экспресс-анализов стоит сократить продолжительность измерения, которая зависит от объема пробы, производительности холодильной установки, используемого алгоритма охлаждения. Получение достоверных результатов напрямую зависит от числа точек на графике – числа пробоотборов.

Созданная нами криоскопическая установка в целом отвечает этим требованиям. Продолжительность измерения (прокачивание – замораживание – оттаивание) – 3 мин; объем пробы – около 2,5 мл, что составляет не более 2,5 % от общего объема реактора (100 мл). Главным преимуществом прибора является полуавтоматический режим работы, так как процесс измерения может занимать несколько часов. Широкий диапазон регистрируемых температур и высокая точность обусловлены применением современного

24-разрядного аналого-цифрового преобразователя [4]. Основные технические данные криоскопической установки:

Диапазон измерения температуры замерзания.....	0,000 ... –15,000 °С
Абсолютная погрешность.....	± 0,001 °С
Объем пробы.....	2,5 мл
Продолжительность одного измерения.....	3 мин
Диапазон термостатирования пробы.....	25 ... 90 °С
Точность поддержания температуры термостатом.....	± 0,5 °С
Напряжение питающей сети.....	(220 ± 15) В
Частота питающей сети.....	50 Гц
Потребляемая мощность.....	≤ 150 В·А
Габаритные размеры	500×230×230 мм
Масса (без ПК и насоса)	3 кг

Принципиальная схема измерения температуры замерзания приведена на рис. 2. После оттаивания предыдущей пробы включается насос, который прокачивает жидкость из химического реактора через металлическую трубку, закрепленную на холодильнике. После прокачивания начинается охлаждение пробы в трубке термoeлектрическим элементом Пельтье. Для того, чтобы кристаллизация не была спонтанной, а происходила при переохлаждении пробы на несколько градусов ниже теоретической температуры замерзания, используют механическое инициирование процесса. Устройство инициализации представляет собой стальной шарик на упругой подвеске с осевым расположением в металлической трубке с

Рис. 2. Принципиальная схема измерения температуры замерзания: 1 – сигнал от термодатчика в компьютер, 2 – металлическая трубка с пробой, 3 – термодатчик, 4, 7 – устройство инициализации кристаллизации, 5 – к насосу, 6 – блокировка потока жидкости, 8 – управление устройством инициализации кристаллизации из компьютера, 9 – элемент Пельтье, 10 – трубка отбора жидкости для анализа, 11 – термостатируемая реакционная ячейка, 12 – магнитная мешалка, 13 – термостат

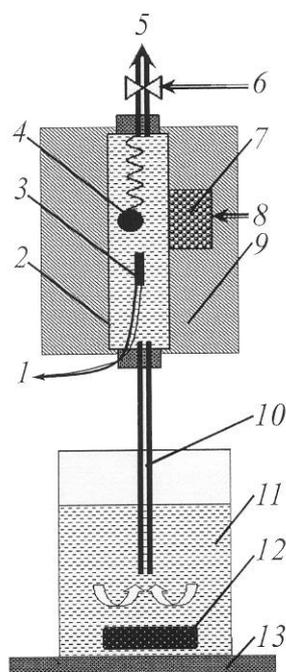
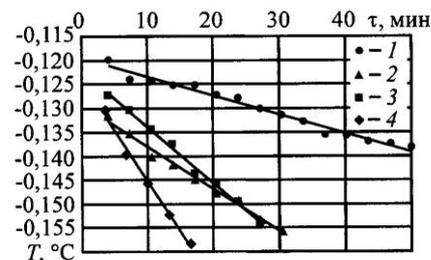


Рис. 3. Зависимость температуры кристаллизации T раствора крахмала от времени τ при различном объеме V вносимого фермента: 1 – $V = 1$ мкл; 2 – 2; 3 – 3; 4 – 5 мкл



пробой. При достижении необходимой температуры компьютер подает импульсы на электромагнит, охватывающий трубку. При соударении шарика со стенкой трубки происходит образование центров кристаллизации, далее начинается лавинообразный процесс замерзания всего объема пробы. Выделяющееся при кристаллизации тепло поднимает температуру пробы до так называемого плато (см. рис. 1), которое и соответствует температуре замерзания раствора. После превращения всего объема жидкости в лед температура начинает опускаться. Охлаждение отключают, и после полного оттаивания цикл повторяют.

Для реализации полуавтоматического режима управление прибором осуществляют с помощью ПК. Интерфейс компьютерной программы CRIO реализует режим «виртуального прибора», отображая на мониторе ПК состояние всех узлов и происходящие с реальным прибором процессы.

Созданная криоскопическая установка опробована для измерения активности амилазы. Уравнение ферментативного гидролиза крахмала с образованием глюкозы выглядит следующим образом:



Использовали 3 %-й раствор крахмала, в термостате поддерживали температуру 40 °С. После термостабилизации к 100 мл субстрата добавляли требуемое количество фермента и запускали автоматический процесс пробоотбора и измерения.

На графике (рис. 3) изображены четыре зависимости температуры замерзания раствора крахмала с различным объемом вносимого фермента от времени.

На рис. 4 приведена зависимость скорости реакции w , рассчитанной на основе предыдущих графиков (отношение тангенса угла наклона прямой к криоскопической константе воды), от объема внесенного фермента. Из уравнения корреляционной прямой ($w = 0,2232x_2$; $R^2 = 0,99629$) следует, что активность амилазы равна 0,204 ммоль/(мин·мкл). Коэффициент достоверности аппроксимации равен 0,998, и зависимость экстраполируется в 0.

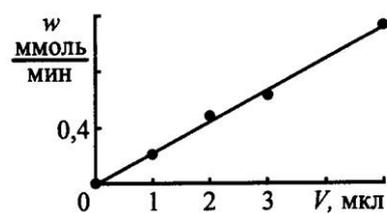


Рис. 4. Зависимость скорости реакции от объема V вносимого фермента амилазы

Это свидетельствует о хорошей воспроизводимости и достоверности результатов, полученных на изготовленной криоскопической установке.

Следует добавить, что установка позволяет проводить любые исследования, связанные с изменением концентрации веществ в растворе (химические реакции, процессы растворения, сорбции и т.п.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 30562–97 (ИСО 5764 – 87). Молоко. Определение точки замерзания. Термисторный криоскопический метод [Текст]. – Введ. 1999.01.07. – Минск.: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии, сертификации, 1999. – 8 с.
2. Осмометры-криоскопы термоэлектрические типа МТ-5 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.bourestnik.spb.ru/>. – 01.05.05.
3. Петерсен, Х.Х. Применение ферментов в технологии переработки макулатуры [Текст] / Х.Х. Петерсен // Науч. тр. 7-й Междунар. науч.-техн. конф. «Современные научные основы и инновационные технологии бумажно-картонных материалов с использованием вторичного волокна из макулатуры». – Караваево, 2006. – С. 31–34.
4. AD7714 3V/5V, CMOS, 500 mA Signal Conditioning ADC [Текст]. – Analog Devices, 1998. – 40 p.

Архангельский государственный
технический университет

Поступила 07.05.07

P.A. Tupin, D.G. Chukhchin, O.M. Sokolov

Cryoscopic Method for Determining Enzyme Activity in Pulp-and-paper Production

The possibility of applying cryoscopic method for determining the hydrolytic enzymes activity used in pulp-and-paper production is shown. The technique for cryoscopic determining the amylase activity is developed.