

4-4 МЕХАНИЗМ ВОЗДЕЙСТВИЯ УЛЬТРАЗВУКОВЫХ КОЛЕБАНИЙ НА ПРОЦЕСС ЭКСТРАКЦИИ СЫЧУЖНОГО ФЕРМЕНТА

И.А.Рогов, ИТМИИ, Москва, СССР.

Р.А.Хромова, А.А.Белусов, Г.Е.Лимонов, Л.И.Изотова, Б.А.Климова, ВНИИИ, Москва, СССР.

Изучению воздействия ультразвуковых колебаний на диффузионно-осмотические процессы посвящено большое количество работ [1,2,3]. Показано, что процессы в ультразвуковом поле протекают значительно интенсивнее, когда существующие способы воздействия на них уже менее эффективны. Институтом выполнен ряд исследований по использованию ультразвуковых колебаний для интенсификации диффузионных процессов при экстракции сычужного фермента. Разработана технология, позволяющая сократить процесс экстракции фермента с 3 суток до 1 ч. и увеличить выход препарата в 1,5 раза. Однако известно, что специфическое воздействие ультразвуковых колебаний на животные ткани и извлекаемые из них вещества, вызывает разнообразные и, в отдельных случаях, не всегда желательные физические и биохимические явления, механизм и закономерности которых определяют целесообразность и эффективность использования ультразвука для интенсификации технологических процессов. Поэтому в каждом конкретном случае при использовании ультразвуковых колебаний для биологических сред необходимо исследовать их влияние как на обрабатываемый объект, так и продукт, полученный в результате такого воздействия. Задачей исследований являлось изучение механизма воздействия ультразвуковых колебаний на ткань сычужков, а также свойств сычужного фермента. Обработке подвергали сычуги теллят 2-3-недельного возраста. Из литературных данных [4] известно, что наибольшее количество фундальных желез вырабатывающих сычужный фермент, расположено в донной части сычуга, по большей его

кривизне. Поэтому этот, наиболее характерный участок сычуга, и послужил исходным материалом для гистологических исследований при изучении механизма воздействия ультразвука на ткань сычуга. Донную часть измельчали и после набухания в течение 20 мин. в 5%-ном растворе поваренной соли подвергали озвучиванию. Для гистологических исследований отбирали пробы размером 0,5 x 1,5 см через 5, 10 и 30 мин. Аналогичные пробы в контрольных опытах отбирали через одни, двое и трое суток. Образцы фиксировали жидкостью Карнуа и ценкер-формолом по Гелли. Материал заливали в целлоидин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином и по Доминиги-Кедровскому /5/.

Анализ гистологических исследований наглядно показывает, что в первую очередь нарушается взаимосвязь между отдельными клеточными структурами, клетки желез слизистой набухают, расходятся, разрушаются (рис.1, 2), в результате чего увеличивается поверхность соприкосновения фаз. Затем происходит интенсивное разрушение самих клеток желез и соединительнотканых основ железистых образований с выходом содержимого в окружающую среду. Зимогенные гранулы не обнаруживаются (рис.3). Необходимо отметить, что после одинаковой экспозиции отчетливо проявляется специфичность воздействия ультразвука - разрушение главных, эпителиальных и добавочных клеток без структурных изменений обкладочных (рис.3).

Таким образом, действие ультразвуковых волн на клетки всесторонне: в первые 10 мин. разрушение слизистой фундальной части сычуга идет интенсивно, несколько стабилизируется к 30 мин. и приводит к необратимым изменениям, способствующим полному разрушению клеток и переходу содержимого в окружающую среду.

Характер изменений слизистой оболочки сычуга через 1, 2 и 3 суток экстракции в 10%-ном растворе поваренной соли (контроль) в значительной степени отличается от изменений, связанных с воздействием ультразвука. Если ультразвук оказывает действие на всю клетку, вырабатывающую фермент, разрушая ее, то обработка сычуга раствором поваренной соли не приводит к таким глубоким структурным изменениям. При 3-суточной экстракции (рис.4) зимогенные гранулы не выявляются, однако полностью сохраняется оболочка клеток, форма желез и соединительнотканая основа железистых образований, что дает основание предполагать о неполном извлечении фермента из ткани сырья. Вместе с тем, разрушение структуры ткани сычугов в ультразвуковом поле способствует интенсивному выходу не только энзимных начал, но и переходу в экстрагируемую среду сопутствующих белков, которые играют защитную роль в сохранении биологической активности фермента.

Для подтверждения этого предположения полученный с помощью ультразвуковой экстракции ферментный препарат очищали путем диализа, пересадения и гель-фильтрации на

колонне с сефадексом G-50 и затем лиофильного высушивания. Приготовленный 1%-ный раствор очищенного фермента подвергали (при режимах экстракции) ультразвуковому воздействию. Аналогичные исследования были проведены с препаратом, полученным по обычной технологии. Выяснилось, что при одних и тех же условиях активность предварительно очищенного раствора фермента снизилась почти в два раза уже через 5 мин. после озвучивания. Наряду с этим, озвучивание раствора фермента, в котором находились примеси других сопутствующих белков, не привело к изменению его ферментативной активности, даже после 10-минутного озвучивания. Проведены сравнительные исследования свойств препаратов, полученных по обычной технологии и ультразвуковой экстракцией. При этом между препаратами не было установлено различий по аминокислотному составу (таблица), электрофоретическим (рис.5), цвету, запаху и растворимости. Хранение препаратов в течение 2 лет не оказало влияния на указанные свойства.

Таблица
Аминокислотный состав сычужного фермента

Аминокислота	Содержание аминокислот в мкм/мг вещества	
	Фермент, полученный ультразвуковой экстракцией	Фермент, полученный по принятой технологии
1	2	3
Лизин	0,116	0,120
Гистидин	0,082	0,085
Аргинин	0,068	0,067
Цистеиновая кислота	0,006	0,005
Аскаратиновая кислота	0,129	0,131
Треонин	0,065	0,064
Серин	0,099	0,102
Глутаминовая кислота	0,135	0,145
Пролин	0,060	0,063
Глицин	0,108	0,110
Аланин	0,077	0,079
1/2 цистеин	0,030	0,027
Валин	0,047	0,046

	1	2	3
Метионин	0,013	0,013	0,013
Изолейцин	0,030	0,030	0,032
Лейцин	0,070	0,070	0,069
Тирозин	0,034	0,034	0,035
Фенилаланин	0,036	0,036	0,034

Литература.

1. Долгополов Н.М., Фридман В.М., Караваев Н.М. О воздействии ультразвуковых колебаний на диффузионные процессы, ДАН СССР, т.43, 2, 1953
2. Ларионов Н.И., Иванова О.П., Начавкин А.В. Ультразвуковая экстракция, ультразвуковая техника, 1, 1965 с.30
3. Кортнев А.В., Макарова Г.В. Воздействие ультразвуковых колебаний на диффузионные процессы в жидкости. Акустика и ультразвук, Киев, 1966
4. Berridge N.I. Enzymes and Coagulation, VI, Part 2, New-York, 1951.
5. Вайль С.С. Руководство по патологистологической технике - М.; Медгиз, 1947 г.

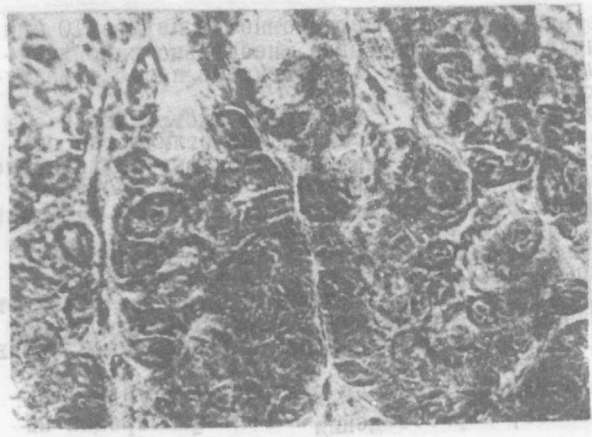


Рис.1. Общий вид слизистого слоя ткани сычугов после 5-минутного озвучивания ультразвуком

Fig. 1. Rennet mucous membrane after 5-minute sonification

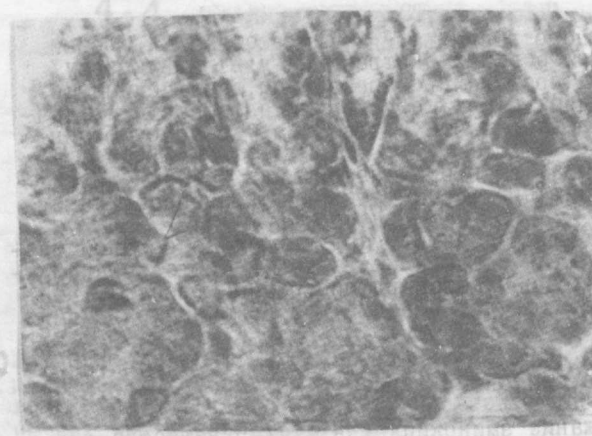


Рис.2. Общий вид слизистого слоя ткани сычугов после 10-минутного озвучивания ультразвуком

Fig. 2. Rennet mucous membrane after 10-minute sonification

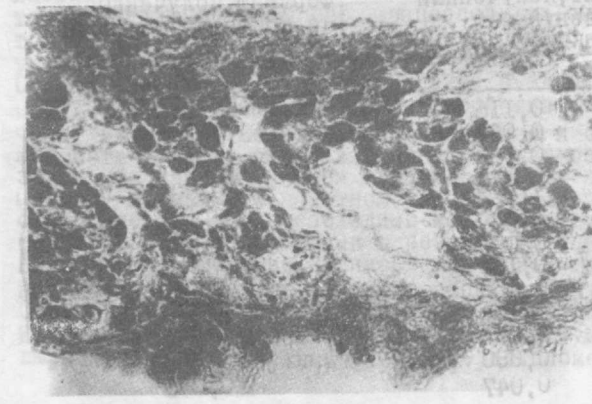


Рис.3. Общий вид слизистого слоя ткани сычугов, озвученных в течение 30 минут

Fig. 3. Rennet mucous membrane after 30-minute sonification

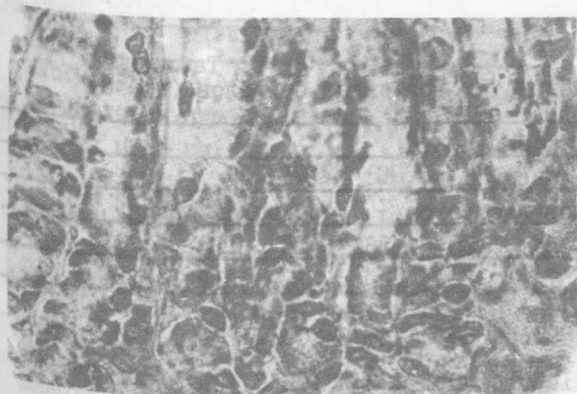


Рис.4. Общий вид слизистого слоя ткани сычужков после 72-часового воздействия на него 10%-ным раствором поваренной соли

Fig. 4. Rennet mucous membrane after 72 hours treatment with 10% NaCl solution

Рис.5. Электрофореграммы очищенных препаратов сычужного фермента:

I и IV - контроль;
 II - опытный образец после 30 мин. озвучивания;
 III - опытный образец после 10 мин. озвучивания.

Fig. 5. Electrophoregrams of purified rennin preparations:
 I & IV - test control;
 II - test sample after 30-minute sonification;
 III - test sample after 10-minute sonification.

