

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ ПРОЦЕСУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО АЦИДОЛІЗУ ЖИРІВ

Вступ. На сьогодні однією з основних задач розвитку агрокомплексу України, базовою галуззю якого виступає оліно-жирова промисловість, є виробництво і впровадження соціально значущих жирних продуктів.

Як відомо, жири в організмі людини виконують роль будівельного матеріалу для кліткових мембран та є джерелом енергії для забезпечення процесів життєдіяльності. В той же час, внаслідок дефіциту одного чи декількох корисних компонентів, жоден з природних ліпідів за своїм жирнокислотним складом не є ідеально фізіологічно повноцінним продуктом.

У зв'язку з цим постає реальна потреба у розробці нових та вдосконаленні вже існуючих технологій модифікування рослинних олій. Дані технології дозволяють отримувати функціональні жири з високою харчовою і біологічною цінністю та оптимальним сполученням жирних кислот. Використання вказаних функціональних жирів в повсякденному раціоні людини може вирішити проблему підвищення рівня збалансованого харчування населення, а також нормалізацію ліпідного обміну, порушення якого спричиняє виникнення таких захворювань як атеросклероз, ішемічна хвороба серця, ожиріння, гепатит та ін.

Інноваційним продуктом нового покоління у категорії спеціальних жирів у наш час постають так звані структуровані ліпіди (СТЛ), які за своєю хімічною будовою представляють собою триацилгліцерини (ТАГ), в яких жирні кислоти розташовані у специфічному положенні гліцеринового скелету [1]. Саме природа жирної кислоти та її позиція у молекулі ТАГ визначає функціональні та фізичні властивості, метаболічний шлях і ефективність структурованого ліпиду.

Довжина ланцюга середньоланцюгових жирних кислот варіюється від $C_{6:0}$ до $C_{12:0}$. Швидкість метаболізму вказаних кислот дорівнюється до швидкості метаболізму глюкози в організмі без відкладення жиру у жирових депо, внаслідок низької швидкості переетерифікації в триацилгліцерини.

Довголанцюгові жирні кислоти (від $C_{14:0}$ до $C_{24:0}$) перешкоджають потраплянню хіломікронів у загальну систему циркуляції крові, шляхом блокування кишкових клітин – місця локалізації хіломікронів. Існує декілька типів доголанцюгових жирних кислот. ω -6 та ω -3 кислоти не синтезуються в організмі людини і позиціонуються як есенціальні. Вони інгібують біосинтез ейкозаноїдів в тканині та мають протизапальну дію. Дієта з вмістом ω -3 кислот підвищує синтез ліпопротеїдів високої щільності, знижуючи при цьому концентрацію ліпопротеїдів низької та дуже низької щільності. ω -9 жирні кислоти сприяють зниженню концентрації холестерину в організмі.

Серед відомих методів модифікування ліпідів, ферментативні реакції мають низку переваг перед традиційними хімічними процесами: більш м'які умови, висока каталітична ефективність та селективність каталізатору. В наш час ферментативний ацидоліз є одним з найбільш придатних методів модифікації жирів.

В процесі ацидолізу риб'ячого жиру та каприлової кислоти з використанням 1,3 специфічної ліпази з *Rhizomucor miehei* було отримано структуровані ліпіди, збагачені ω -3 поліненасиченими жирними кислотами (ейкоза- та докозапентаєнова кислоти) у позиції sn-2 триацилгліцеринового скелету [2]. При рівноважному стані реакції склад СТЛ наступний: каприлова кислота – 57 %, ейкозапентаєнова – 5,1 %, докозапентаєнова – 10,0 % та пальмітинова кислота – 6,3 %.

В роботі [3] пропонується синтез 1,3-діолеоїлу-2-пальмітогліцерину методом ферментативного ацидолізу трипальмітину з олеїновою кислотою. У якості біокаталізатору використовується ліпаза ІМ-60 з *Mucor miehei*. Жирокислотний аналіз продукту показав 90,7 % пальмітинової та 9,3 моль% олеїнової кислоти у sn-2 положенні ТАГ. При цьому 74 моль% вихідного триацилгліцерину перетворилося на 1,3-діолеоїл-2-пальмітогліцерин.

В той же час при модифікуванні олії каноли, що має підвищений вміст лауринової кислоти, методом біокаталітичного ацидолізу з ейкозапентаєновою кислотою були отримані оптимальні параметри процесу, які забезпечують максимальний вихід структурованих ліпідів 66,9 %: мольне співвідношення 1:3, час реакції 36 годин, вміст ферменту 4 %, температура 45 °C [4]. Швидкість реакції при цьому зростала при збільшенні температури від 35 °C до 45 °C.

Мета досліджень. Мета даної роботи полягала у визначенні оптимальних параметрів процесу ензимного ацидолізу жирів за критерієм максимального виходу двозаміщених структурованих ліпідів.

Експериментальна частина. Поставлену задачу було реалізовано шляхом попереднього планування експерименту з використанням методики поверхні відклику. Для математичного опису досліджуваного процесу було обрано функцію відклику, яка представляє собою поліном другого ступеня:

$$Y = b_0 + b_1 \cdot t + b_{11} \cdot t^2 + b_2 \cdot e + b_{22} \cdot e^2 + b_3 \cdot m + b_{33} \cdot m^2 + b_4 \cdot \tau + b_{44} \cdot \tau^2 + b_{12} \cdot t \cdot e + b_{13} \cdot t \cdot m + b_{14} \cdot t \cdot \tau + b_{23} \cdot e \cdot m + b_{24} \cdot e \cdot \tau + b_{34} \cdot m \cdot \tau, \quad (1)$$

де Y – ступінь перетворення вихідних триацилгліцеринів у двозаміщені структуровані ліпіди (СП), %; t – температура реакції, °C; e – вміст ферменту, %; m – мольне співвідношення жирна кислота:триацилгліцерини; τ – час реакції, год; b_0 – константа; $b_1, b_{11}, b_2, b_{22}, b_3, b_{33}, b_4, b_{44}, b_{12}, b_{13}, b_{14}, b_{23}, b_{24}, b_{34}$ – коефіцієнти для кожного елементу полінома.

В роботі використано центральне композиційне рототабельне планування. Перевагою вказаного виду планування є забезпечення передбачення вихідної величини з похибкою, яка залежить лише від відстані точки факторного простору до центру експерименту, що дозволяє прогнозувати з однаковою точністю значення функції відклику.

Субстратами модельної системи для проведення основного експерименту було обрано соняшникову олію, яка є джерелом ненасичених жирних кислот, та середньоланцюгову каприлову кислоту ($C_{8:0}$), що виступала донором ацилів. Каталіз здійснювався за допомогою ліпази з *Rhizomucor miehei*, вибір якої було обумовлено результатами попередніх експериментів. Реакції проводили при постійному перемішуванні під шаром азоту без розчинника. Температура процесу варіювалася у межах 30-80 °C, вміст ферменту 1–20 % (від маси жирової суміші), мольне співвідношення кислота:жир 2:1–10:1, час реакції 1–24 год. Після закінчення процесу ензим відділяли від продукту шляхом фільтрації при температурі 50 °C. Реакції проведено у двох паралелях.

Ліпідний склад проб аналізувався методом високотемпературної газорідинної хроматографії у відповідності із AOCS Official Method Cd 11b-91 [5]. Використовувався хроматограф Clarus 500 Gas Chromatography (Perkin-Elmer) з полум'яно-іонізаційним детектором (ПД). Колонка Restek Rtx-65TG, капілярна; її геометричні параметри: довжина 30 м, 0,25 мм внутрішній діаметр, 0,2 мкм товщина нерухомої фази. Стационарна фаза Crossbond 35 % диметил – 65 % діфенилполісилоксан. Температурна програма 80 °C (0 хв.), 10 °C/хв. до 320 °C (0 хв.), 5 °C/хв. до 360 °C (15 хв.) Температура інжектора – 320 °C, температура детектора – 370 °C. Газ-носієй – гелій. Швидкість газу-носія 3 см³/хв. Спліт 1:50. витрата повітря для ПД – 450 см³/хв., витрата водню для ПД – 45 см³/хв. Обсяг проби, що вводився, – 0,5 мкл.

Матриця планування та отримані експериментальні дані щодо ступеня перетворення вихідних ТАГ представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Матриця планування

№	Температура реакції, t		Вміст ферменту, E		Мольне співвідношення ЖК:ТАГ, m		Час реакції, τ		СП (Y), %
	Значення		Значення		Значення		Значення		
	Код.	Реальне, °C	Код.	Реальне, %	Код.	Реальне	Код.	Реальне, год	
1	-1	70	-1	16,15	-1	8,38	-1	6,0	60,7
2	-1	70	-1	16,15	+1	3,60	-1	6,0	52,8
3	-1	70	+1	4,85	-1	8,38	1	20,0	59,9
4	-1	40	+1	16,15	+1	3,60	1	20,0	63,1
5	+1	70	-1	4,85	-1	3,60	1	20,0	56,6
6	+1	40	-1	4,85	+1	8,38	-1	6,0	43,5
7	+1	40	+1	16,15	-1	8,38	1	20,0	71,3
8	+1	40	+1	4,85	+1	3,60	-1	6,0	22,5
9	-1,682	30	0	10,5	0	6,00	0	12,5	53,3
10	+1,682	80	0	10,5	0	6,00	0	12,5	55,2
11	0	55	-1,682	1,00	0	6,00	0	12,5	37,4
12	0	55	+1,682	20,00	0	6,00	0	12,5	79,4
13	0	55	0	10,50	-1,682	2,00	0	12,5	51,4
14	0	55	0	10,50	+1,682	10,00	0	12,5	69,5
15	0	55	0	10,50	0	6,00	-1,682	1,0	42,7
16	0	55	0	10,50	0	6,00	1,682	24,0	76,1
17	0	55	0	10,50	0	6,00	0	12,5	68,9
18	0	55	0	10,50	0	6,00	0	12,5	68,8

Статистичний аналіз експериментальних даних було проведено за допомогою пакета Statistica 9 (StatSoft, Inc.).

В результаті було отримано рівняння моделі, що описує факторний простір залежності ступеня перетворення від температури, вмісту ферменту, мольного співвідношення субстратів та часу реакції:

$$Y = -102,539 + 2,289 \cdot t - 0,024 \cdot t^2 + 4,267 \cdot e - 0,102 \cdot e^2 + 13,682 \cdot m - 0,541 \cdot m^2 + 2,705 \cdot \tau - 0,071 \cdot \tau^2 + 0,021 \cdot t \cdot e - 0,051 \cdot t \cdot m + 0,037 \cdot t \cdot \tau - 0,047 \cdot e \cdot m - 0,067 \cdot e \cdot \tau - 0,132 \cdot m \cdot \tau \quad (2)$$

Для перевірки значущості коефіцієнтів регресії було побудовано діаграму Парето, яку представлено на рис. 1 (L – лінійний ефект, Q – квадратичний ефект).

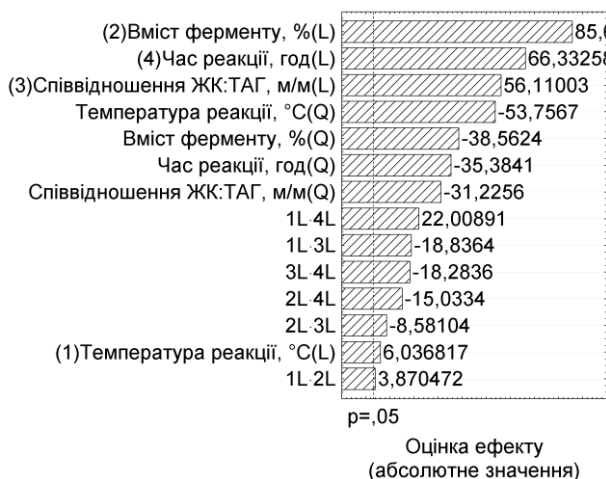


Рисунок 1 – Діаграма Парето

Таблиця 2 – Дисперсійний аналіз моделі

Фактор	Сума квадратів, SS	Ступінь свободи, df	Середнє значення квадрата, MS	F-критерій	Рівень значущості, p
(1) Температура реакції, °C (L)	4,160	1	4,1598	36,443	0,0075
Температура реакції, °C (Q)	329,855	1	329,8545	2889,780	0,0009
(2) Вміст ферменту, % (L)	838,215	1	838,2148	7343,408	0,0001
Вміст ферменту, % (Q)	169,740	1	169,7405	1487,058	0,0031
(3) Мольне співвідношення ЖК:ТАГ (L)	359,367	1	359,3675	3148,336	0,0006
Мольне співвідношення ЖК:ТАГ (Q)	111,296	1	111,2958	975,037	0,0039
(4) Час реакції, год (L)	502,240	1	502,2402	4400,011	0,0003
Час реакції, год (Q)	142,914	1	142,9139	1252,036	0,0025
1L · 2L	1,710	1	1,7100	14,981	0,0072
1L · 3L	40,500	1	40,5000	354,811	0,0058
1L · 4L	55,291	1	55,2911	484,392	0,0045
2L · 3L	8,405	1	8,4050	73,634	0,0078
2L · 4L	25,797	1	25,7972	226,003	0,0065
3L · 4L	38,158	1	38,1578	334,292	0,0051
Похибка	0,342	3	0,1141		
Загальна сума квадратів	3591,909	17			
Коефіцієнт кореляції R ² =0,9930					

На діаграмі Парето (рис. 1) представлені стандартизовані коефіцієнти, які відсортовано за абсолютним значенням. Згідно наведеним даним усі ефекти та їх взаємодії є значимими для даного процесу, а

лінійні ефекти вмісту ферменту, часу реакції та мольного співвідношення мають найбільший вплив на ступінь перетворення вихідних ТАГ у двозаміщені структуровані ліпіди в процесі ферментативного ацидлізу.

Аналіз моделі (2) дозволив встановити оптимальні параметри досліджуваного процесу, які забезпечують максимальний ступінь перетворення вихідних триацилгліцеринів у двозаміщені структуровані ліпіди, а саме: температура – 65 °С, вміст ферментного препарату Lipozyme RM IM – 17,4 %, мольне співвідношення жир:кислота – 1:6, час процесу – 21,8 години.

З метою дослідження основних закономірностей впливу предикторів на протікання процесу в цілому було побудовано поверхні відклику, які відображають залежність ступеня перетворення триацилгліцеринів у двозаміщені структуровані ліпіди від кожної пари параметрів при фіксованих в оптимумі значеннях інших двох (рис. 2–4).

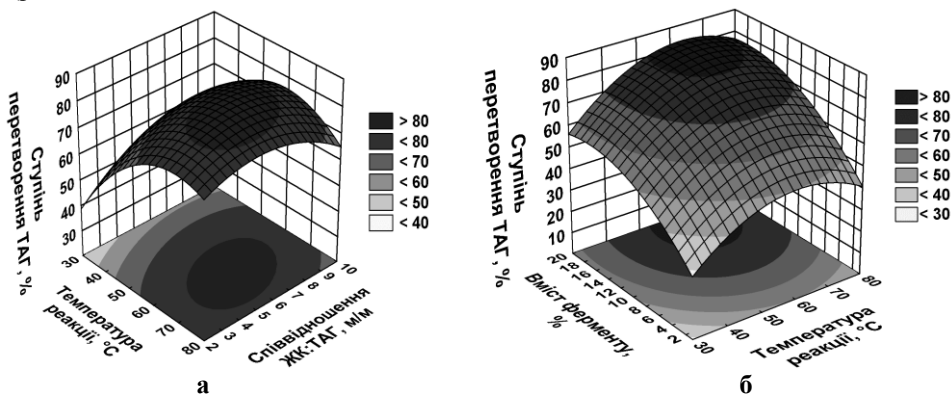


Рисунок 2 – Залежність ступеня перетворення триацилгліцеринів від: а) температури реакції та мольного співвідношення ЖК:ТАГ; б) температури реакції та вмісту ферменту

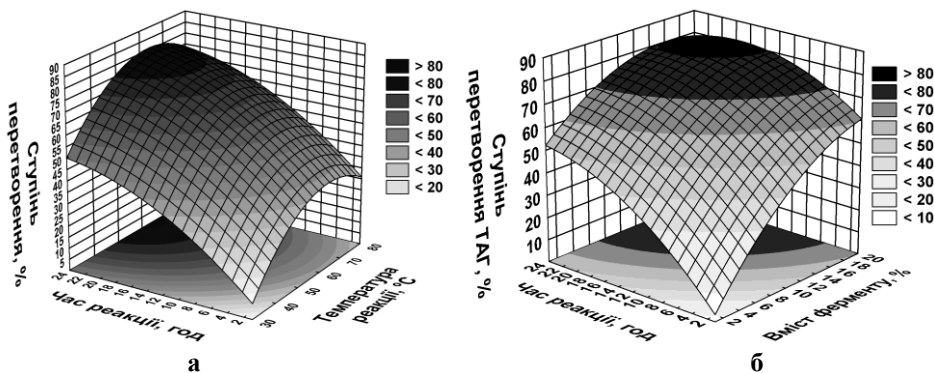


Рисунок 3 – Залежність ступеня перетворення триацилгліцеринів від: а) часу реакції та температури реакції; б) часу реакції та вмісту ферменту

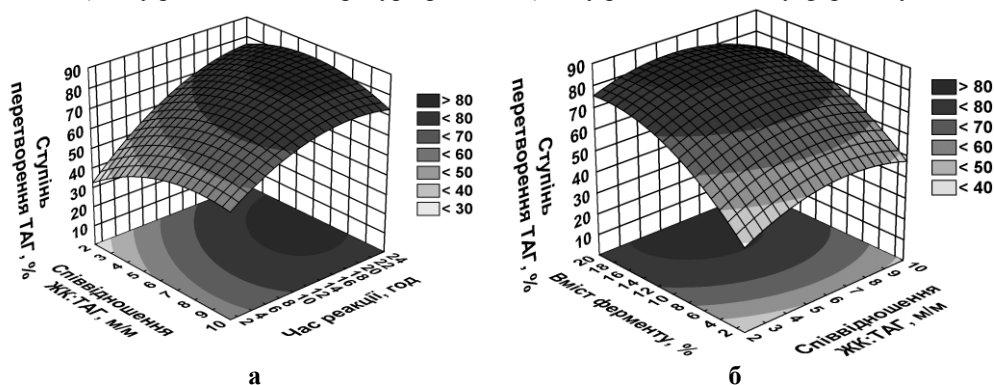


Рисунок 4 – Залежність ступеня перетворення триацилгліцеринів від: а) мольного співвідношення ЖК:ТАГ та часу реакції; б) мольного співвідношення ЖК:ТАГ та вмісту ферменту

Згідно графічним даним, представленим на рис. 2а, 2б та 3б, ступінь перетворення триацилгліцеринів у двозаміщені структуровані ліпіди досягає максимального значення – 82,3 % при температурі 65 °С, яка є оптимальною для даного процесу. При подальшому збільшенні температури спостерігається зменшення вказаного показника за рахунок зниження активності ліпази, що пов'язано з її термолабільністю внаслідок зміни конформації та часткової денатурації. Слід відзначити, що вплив кількості ферменту є найбільш значимим параметром процесу (рис. 2б, 3б та 4б) і його оптимальна концентрація складає близько 17 %. Цей висновок узгоджується з даними, представленими на рисунку 1.

Аналіз поверхонь відклику, зображених на рис. 2а, 3а та 3б показує, що найбільший ступінь перетворення триацилгліцеринів спостерігається при мольному співвідношенні субстратів 6:1. Але при надлишку кислоти у системі відбувається зниження каталітичної активності ліпази, внаслідок її закиснення, що призводить до зменшення виходу кінцевого продукту.

При збільшенні тривалості ацидолізу жирів ступінь перетворення триацилгліцеринів зростає (рис. 3а, 3б та 4а). Рівноважний стан у системі досягається за 21,8 години ведення процесу, після чого концентрація двозаміщених структурованих ліпідів практично не змінюється.

Висновки. Методами математичного моделювання щодо ферментативного ацидолізу жирів встановлено оптимальні параметри, які забезпечують максимальний вихід двозаміщених структурованих ліпідів. Досліджено внесок кожного з предикторів на перебіг процесу в цілому.

Література

1. Osborn H.T. Structured lipids – novel fats with medical, nutraceutical, and food applications / H.T. Osborn, C.C. Akoh // Food science and food safety. – 2002.–Vol. 1, № 3. – P. 110–120.
2. Camacho Paeza B. Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics / B. Camacho Paeza, A. Robles Medina, F. Camacho Rubio, P. Gonzalez Moreno E. Molina Grima // Chemical Engineering Science. –2002.–Vol. 57, № 8. –P. 1237–1249.
3. Ming-Lung Ch. Synthesis of the structured lipid 1,3-Dioleoyl-2-palmitoylglycerol from palm oil / Ch. Ming-Lung, V. Shaik Ramjan, L. Jih-Yao, J. Yi-Hsu // JAOCS.–2004.–Vol. 81, №6. – P. 525–532.
4. Hamam F. Lipase-assisted acidolysis of high-laurate canola oil with eicosapentaenoic acid // F. Hamam, J. Daun, F. Shahidi / JAOCS.–2005.–Vol. 82, №12. –P. 875–879.
5. AOCS. In: Firestone D, editor. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 5th ed. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society (AOCS), 2003.

УДК 665:664.3

Некрасов П.А., Подлесная Е.В.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА ФЕРМЕНТАТИВНОГО АЦИДОЛИЗА ЖИРОВ

В статье рассмотрены вопросы, связанные с исследованием влияния таких параметров как температура, содержание фермента, мольное соотношение субстратов и время реакции на выход двузамещенных структурированных липидов в технологии ферментативного ацидолиза подсолнечного масла и каприловой кислоты. В результате экспериментов установлены оптимальные условия и получена математическая модель, позволяющая прогнозировать выход двузамещенных структурированных липидов в зависимости от основных параметров процесса.

Nekrasov P.O., Podlisna O.V.

OPTIMIZATION OF PROCESS PARAMETERS IN ENZYMATIC ACIDOLYSIS OF FATS

The article deals with issues related to the investigation of the influence of such parameters as temperature, enzyme load, molar ratio of substrates and reaction time on yield of twice-substituted structured lipids in enzymatic acidolysis of sunflower oil and caprylic acid. Optimal conditions and mathematic model, that allow us to predict the yield of twice-substituted structured lipids depending on critical process conditions were obtained.