

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛІЦЕРОЛІЗУ ЖИРІВ

На кафедрі технології жирів і бродильних виробництв в останні роки інтенсивно здійснюються роботи щодо створення технології жирів, збагачених діацилгліцеридами (ДАГ), які є основою для виробництва нового покоління олійно-жирових продуктів функціонального та лікувально-профілактичного призначення.

Перспективним способом отримання вказаних жирів є ферментативний гліцероліз жирової сировини.

Мета роботи. Було досліджено механізм та кінетику реакції, що є важним фактором при визначенні технологічних параметрів процесу ферментативного гліцеролізу в цілому.

Попередні дослідження показали, що максимальний вихід ДАГ спостерігається у випадку еквімолярного співвідношення триацилгліцеринів (ТАГ) до гліцерину. При такому співвідношенні реагентів у процесі гліцеролізу основні взаємодії будуть протікати між ТАГ і гліцерином, ДАГ і гліцерином, а також між ТАГ і моноацилгліцеридами (МАГ).

У якості модельних триацилгліцеринів (ТАГ) було обрано пальмову олію, яка у своєму складі містить найпоширеніші жирні кислоти, причому частки насичених і ненасичених ацилів практично однакові [1]. Це дозволяє переносити загальні закономірності, отримані для даної системи, на переважну більшість видів жирів, які використовуються у вітчизняній харчовій промисловості. Вміст ТАГ в олії, що застосовано, становив 97,5 %.

Спочатку для досліджень були приготовлені модельні суміші, що склалися із ТАГ, гліцерину та розчинника. У якості останнього була взята суміш н-гексана та трет-бутилового спирту в об'ємному співвідношенні 1:1. Нами було встановлено, що зазначена система розчинників забезпечує утворення гомогенної суміші субстратів. У всіх дослідженнях визначалася залежність початкової швидкості реакції від концентрації гліцерину, яка варіювалася від 0,001 моль/л до 0,1 моль/л, при різних, але усередині однієї серії експерименту постійних концентраціях ТАГ. Процес гліцеролізу виконувався при температурі 60 °С під дією ферментного препарату Novozym 435, кількість якого становила 10 % від маси субстратів.

Початкова швидкість реакції визначалася в такий спосіб. Протягом перших 15 хвилин процесу кожні 3 хвилини відбиралися проби, у яких методом високотемпературної газорідної хроматографії визначався вміст ТАГ. Аналізи здійснювались у відповідності із AOCS Official Method Cd 11b-91 [2]. Використовувався хроматограф Clarus 500 Gas Chromatography (Perkin-Elmer), оснащений полум'яно-іонізаційним детектором (ПІД). Колонка Restek Rtx-65TG, капілярна; її геометричні параметри: довжина 30 м, 0,25 мм внутрішній діаметр, 0,2 мкм товщина нерухомої фази. Стаціонарна фаза Crossbond 35 % диметил – 65 % діфенілполісілоксан. Температурна програма 80 °С (0 хв.), 10 °С/хв. до 320 °С (0 хв.), 5 °С/хв. до 360 °С (15 хв.) Температура інжектора – 320 °С, температура детектора – 370 °С. Газ-носіє – гелій. Швидкість газу-носія 3 см³/хв. Спліт 1 : 50. Витрата повітря для ПІД – 450 см³/хв., витрата водню для ПІД – 45 см³/хв. Обсяг проби, що вводився, – 0,5 мкл.

Потім будувалися залежності концентрації ТАГ від часу реакції. Усі вони мали вигляд спадаючої експоненти та описувались виразом (1):

$$C(\tau) = C_0 \cdot e^{-k \cdot \tau}, \quad (1)$$

де $C(\tau)$ – концентрація ТАГ в реакційній суміші через визначений час τ , моль/л; C_0 – початкова концентрація ТАГ, моль/л; k – константа швидкості, хв^{-1} ; τ – час реакції, хв. Визначення констант швидкості здійснювалось методом нелінійної регресії. Початкова швидкість реакцій визначалась шляхом диференціювання рівняння (1) за часом та знаходження швидкості в нульовий момент перебігу реакцій.

Отримані результати досліджень, що виконано у 2 паралелях, в графічному вигляді представлено на рис. 1.

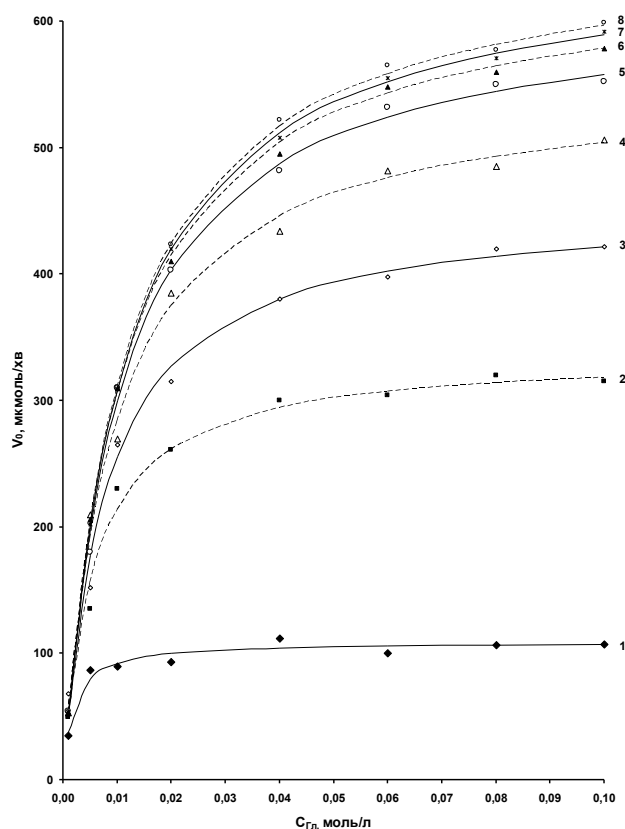


Рисунок 1 – Залежність початкової швидкості реакцій від концентрації гліцерину при фіксованих концентраціях ТАГ в межах кожної серії експериментів
 1 – $C_{ТАГ} = 0,001$ моль/л; 2 – $C_{ТАГ} = 0,005$ моль/л; 3 – $C_{ТАГ} = 0,01$ моль/л;
 4 – $C_{ТАГ} = 0,02$ моль/л; 5 – $C_{ТАГ} = 0,04$ моль/л; 6 – $C_{ТАГ} = 0,06$ моль/л; 7 – $C_{ТАГ} = 0,08$ моль/л;
 8 – $C_{ТАГ} = 0,1$ моль/л

Комп'ютерна обробка наведених результатів експериментів за допомогою пакету Statistica 9 (StatSoft, Inc.) дала змогу узагальнити вказані залежності, які в аналітичному вигляді представлені рівнянням (2), та встановити значення максимальної швидкості реакції та констант Міхаеліса ліпази типу В *Candida antarctica* для гліцерину і ТАГ.

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot C_{ТАГ} \cdot C_{Гл}}{K_{M_{Гл}} \cdot C_{ТАГ} + K_{M_{ТАГ}} \cdot C_{Гл} + C_{ТАГ} \cdot C_{Гл}}, \quad (2)$$

де v_0 – початкова швидкість реакції, мкмоль/хв; V_{\max} – максимальна швидкість реакції, мкмоль/хв; $C_{\text{ТАГ}}$ – концентрація ТАГ, моль/л; $C_{\text{ГЛ}}$ – концентрація гліцерину, моль/л; $K_{M_{\text{ГЛ}}}$ – константа Міхаеліса ліпази типу В *Candida antarctica* для гліцерину, моль/л; $K_{M_{\text{ТАГ}}}$ – константа Міхаеліса ліпази типу В *Candida antarctica* для ТАГ, моль/л.

Обчислені значення були наступними: $V_{\max} = 700$ мкмоль/хв, $K_{M_{\text{ГЛ}}} = 0,012$ моль/л, $K_{M_{\text{ТАГ}}} = 0,0054$ моль/л.

Отримана залежність (2) відповідає математичній моделі ферментативної реакції, що підпорядковується пінг-понг бі-бі механізму [3,4].

Для перевірки цього твердження було побудовано залежності $1/v_0=f(1/C_{\text{ГЛ}})$ при фіксованих концентраціях ТАГ в межах кожної серії експериментів (рис. 2).

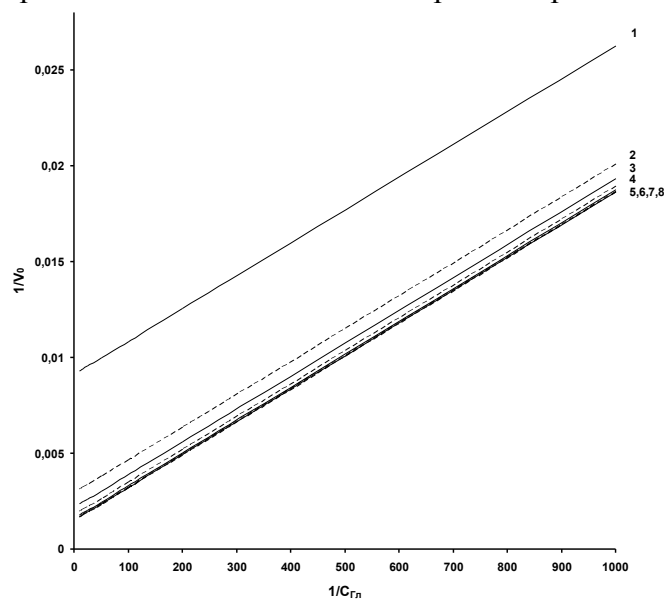


Рисунок 2 – Залежність $1/v_0=f(1/C_{\text{ГЛ}})$ при фіксованих концентраціях ТАГ в межах кожної серії експериментів

- 1 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,001$ моль/л; 2 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,005$ моль/л; 3 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,01$ моль/л;
 4 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,02$ моль/л; 5 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,04$ моль/л; 6 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,06$ моль/л; 7 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,08$ моль/л;
 8 – $C_{\text{ТАГ}} = 0,1$ моль/л;

Як можна спостерігати (рис. 2), всі залежності $1/v_0=f(1/C_{\text{ГЛ}})$ мають лінійний характер та є паралельними між собою, що додатково свідчить про відповідність ферментативної реакції ТАГ з гліцерином пінг-понг бі-бі механізму [5].

Далі готувалося 2 вида модельних сумішей, що відрізнялися від попередніх тим, що в першому – ліпідні субстрати були представлені діацилгліцеринами (ДАГ) і гліцерином, у другому – пальмовою олією (ТАГ) і моноацилгліцеринами (МАГ).

Діацилгліцерини одержували з пальмової олії за розробленою нами технологією [6] з наступним збільшенням вмісту ДАГ до 98 % мас. методом адсорбційної хроматографії в колонках, заповнених сорбентом Florisil (U.S. Silica Company, США), у відповідності із методикою, викладеною в [7].

Моноацилгліцерини отримували з відгону, який утворювався в процесі молекулярної дистиляції продуктів ферментативного гліцеролізу пальмової олії. Жирні кислоти та гліцерин відокремлювали від МАГ повторною дистиляцією. У результаті, отримані МАГ містили 98,2 % основної речовини.

За схемою, викладеною раніше, визначалися залежності початкових швидкостей реакцій від концентрацій субстратів, які як у прямих, так і у зворотних координатах, мали такий же вигляд, як і графіки, наведені на рис. 1 і 2, а в аналітичному вираженні аналогічні рівнянню (2). Це є підставою зробити висновок про те, що, як і у випадку взаємодії ТАГ з гліцерином, ферментативні реакції ДАГ з гліцерином, а також взаємодія ТАГ і МАГ підпорядковуються пінг-понг бі-бі механізму.

Обчислені значення констант Міхаеліса та максимальних швидкостей для ферментативних реакцій ДАГ з гліцерином, ТАГ з МАГ, а також раніш отримані значення для систем ТАГ з гліцерином зведені в табл. 1 і 2.

Таблиця 1 – Значення констант Міхаеліса

Субстрат	ТАГ	ДАГ	МАГ	Гліцерин
K_M , моль/л	0,0054	0,0083	0,0096	0,0120

Таблиця 2 – Значення максимальних швидкостей реакцій

Реакційна суміш	ТАГ + Гліцерин	ДАГ + Гліцерин	ТАГ + МАГ
V_{max} , МКМОЛЬ/ХВ	700	820	875

Аналіз даних, представлених у табл. 1, свідчить про те, що триацилгліцерини, для яких значення константи Міхаеліса найменше, мають найбільшу спорідненість до ліпази типу В *Candida antarctica*. Реакційна здатність у початковий момент часу вища в системі ТАГ+МАГ (табл. 2), що обумовлено емульгуючою властивістю неповного ацилгліцерину.

Таким чином, результати дослідження дають змогу запропонувати представлену на рис. 3 схему ферментативного гліцеролізу ТАГ під дією ліпази типу В *Candida antarctica*.

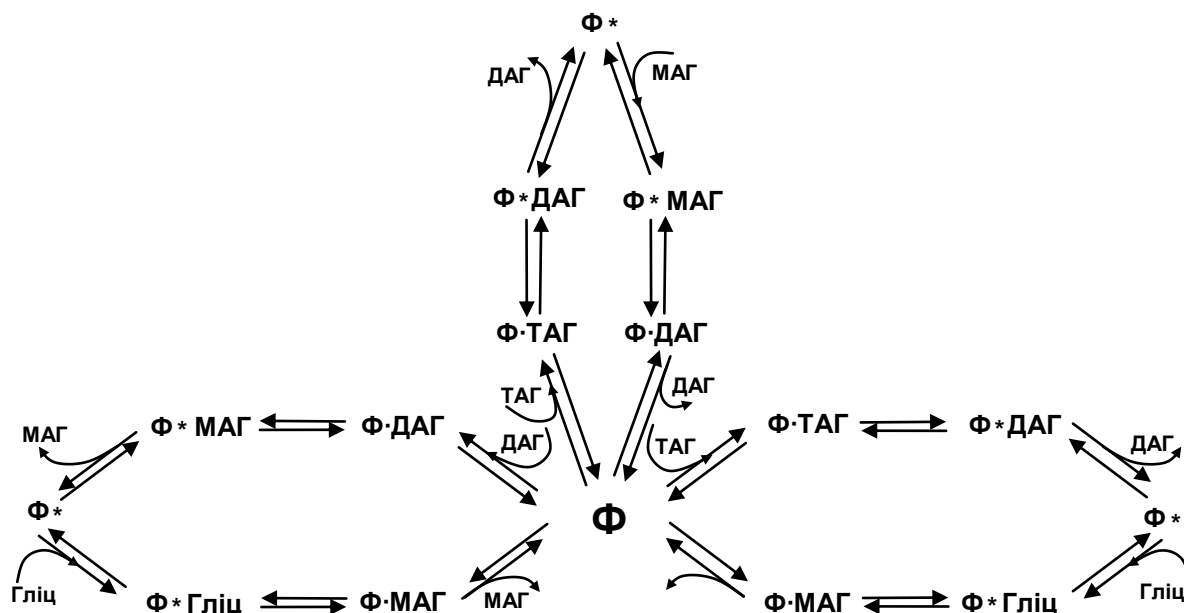
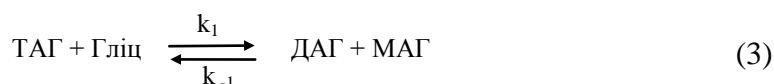


Рисунок 3 – Механізм ферментативного гліцеролізу

Ф – фермент; ТАГ – триацилгліцерин; ДАГ – діацилгліцерин;
 МАГ – моноацилгліцерин; Гліц – гліцерин; Ф·ТАГ, Ф·ДАГ, Ф·МАГ – фермент-ацилгліцеринові комплекси; Ф*ТАГ, Ф*ДАГ, Ф*МАГ, Ф*Гліц – фермент-ацильний комплекс у зв'язаній формі;
 Ф* – фермент-ацильний комплекс у вільній формі

Спочатку вільний фермент зв'язується з першим субстратом. Фермент-ацилгліцериновий комплекс, що утворюється при цьому, трансформується у фермент-ацильний комплекс у зв'язаній формі. При цьому відбувається перенесення ацильної групи від субстрату на фермент із наступним відщепленням продукту реакції. Потім фермент-ацильний комплекс, що залишився у вільній формі, зв'язується із другим субстратом з передачею на нього ацильної групи. Згодом, комплекс, що утворився, розпадається на другий продукт реакції та вільний фермент. Необхідно відзначити, що всі наведені в схемі етапи реакцій є зворотними.

Таким чином, здійснені дослідження дозволяють зробити висновок, що процес ферментативного гліцеролізу жирів обумовлен одночасним перебігом трьох реакцій:



Для знаходження констант рівноваги кожної із наведених реакції були приготовані модельні суміші ТАГ+Гліцерин, ДАГ+Гліцерин, ТАГ+МАГ. Вихідні компоненти, що брались в еквімолярному співвідношенні, розчиняли в суміші н-гексану та трет-бутилового спирту для утворення гомогенних систем. Кожна реакційна суміш містила 10 % від маси субстратів ферментного препарату Novozym 435. Ферментативні реакції проводились в 2-х паралелях при температурі 60 °С на протязі 6 годин. Кожні півгодини відбирались проби, в яких визначали вміст вихідних речовин та продуктів реакцій. Рівноважні концентрації компонентів для реакції (3) були досягнуті через три години, для реакції (4) – через дві години, для реакції (5) – через півтори години. На основі отриманих даних були розраховані значення констант рівноваги для кожної із реакційних систем:

$$K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{C_{\text{ДАГ}} \cdot C_{\text{МАГ}}}{C_{\text{ТАГ}} \cdot C_{\text{Гліц}}}; \quad K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} = \frac{C_{\text{МАГ}}^2}{C_{\text{ДАГ}} \cdot C_{\text{Гліц}}}; \quad K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}} = \frac{C_{\text{ДАГ}}^2}{C_{\text{ТАГ}} \cdot C_{\text{МАГ}}}. \quad (6)$$

Результати досліджень зведено в табл. 3.

Таблиця 3 – Вміст компонентів реакційних систем при досягненні рівноваги

Вміст при досягненні рівноваги, % мас.	Реакційна суміш		
	ТАГ + Гліцерин	ДАГ + Гліцерин	ТАГ + МАГ
ТАГ	7,0	–	18,0
ДАГ	42,2	20,1	72,3
МАГ	48,0	76,4	9,1
Гліцерин	1,1	3,0	–
Константа рівноваги	94,18	43,85	25,22

Висновки. Аналіз чисельних значень констант рівноваги свідчить про те, що в усіх системах прямі реакції перевищують зворотні, тобто спрямовані в бік отримання продуктів. Крім того, реакція (3) є домінуючою в процесі гліцеролізу жирів та має найбільший ступінь перетворення.

Література

1. О'Брайен Р. Жиры и масла. Производство, состава и свойства, применение / Р.О'Брайен; пер. с англ. 2-го изд. В. Д. Широкова, Д. А. Бабейкиной, Н.С. Селивановой, Н.В. Магды. – СПб.: Профессия, 2007. – 752 с.
2. 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.
3. Bisswanger H. Enzyme kinetics: principles and methods / H. Bisswanger. – Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002. – 260 p.
4. Frey P. A. Enzymatic reaction mechanisms / P. A. Frey, A. D. Hegeman. – USA: Oxford University Press, New York, 2007. – 848 p.
5. Taylor K.B. Enzyme kinetics and mechanisms / K.B. Taylor. – USA: Kluwer Academic Publishers, New York, 2002. – 227 p.
6. Некрасов П.О. Оптимізація процесу молекулярної дистиляції при отриманні жирів, збагачених діацилгліцеридами / П.О. Некрасов // Інтегровані технології та енергозбереження. – Харків: НТУ "ХПІ", 2009. – №3. – С. 75–81.
7. Wright A.J. The effect of minor components on milk fat crystallization / A.J. Wright, R.W. Hartel, S.S. Narine, A.G. Marangoni // JAOCS. – 2000. – Vol. 77, №5. – P. 463–475.

УДК 665:664.3

Некрасов П.А.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГЛИЦЕРОЛИЗА ЖИРОВ

В работе установлено, что ферментативный глицеролиз жиров подчиняется пинг-понг би-би механизму. Согласно разработанной схеме механизма, глицеролиз является сложным процессом, включающим три конкурентные реакции. Вычисленные константы равновесия дали возможность определить, что одна из реакций является доминирующей.

Nekrasov P.O.

ENZYMATIC FATS GLYCEROLYSIS MECHANISM INVESTIGATION

In presented work it was ascertained that enzyme-catalyzed glycerolysis of fats obeys ping-pong bi-bi mechanism. According to the mechanism scheme the glycerolysis is the complex process which involves three competitive reactions. Computed equilibrium constants gave an opportunity to establish the dominant reaction.