

Полученные зависимости можно использовать при расчётах параметров проектируемых вибрационных грохотов.

**Список литературы:** 1. Блехман И.И. Вибрационное перемещение / И.И. Блехман, Г.Ю. Джанелидзе. – М.: Наука, 1964. – 410 с. 2. Вибрации в технике: В 6 т. / Под ред. Э.Э. Лавендела. – М.: Машиностроение, 1981. – Т. 4: Вибрационные процессы и машины. – 509 с.

*Поступила в редколлегию 15.09.09*

УДК 665:664.3:577.152.31

**П.О. НЕКРАСОВ**, канд. техн. наук, НТУ «ХПИ»

## **ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ ЕТЕРИФІКАЦІЇ**

В роботі встановлено, що ферментативна етерифікація жирних кислот гліцерином підлягає невідповідному бі-бі механізму. Приведена схема механізму показує, що етерифікація є складним процесом, який включає три конкурентні реакції. Обчислено константи ферментативної кінетики для ліпази *Rhizomucor miehei*.

In presented work it was ascertained that enzyme-catalyzed esterification of fatty acids and glycerol obeys bi-bi mechanism, involving formation of a ternary complex. According to the mechanism scheme the esterification is the complex process which involves three competitive reactions. The enzymatic kinetic constants for lipase *Rhizomucor miehei* were obtained.

У сучасному світі з кожним роком зростає число людей з надлишковою вагою, що приводить до ризику появи різних захворювань: серцево-судинних, зокрема ішемічної хвороби серця, атеросклерозу, порушення вуглеводного обміну, функції органів дихання, ураження печінки і так далі [1, 2].

Використання жирів, збагачених діацилгліцерином, у харчових продуктах сприяє виключенню процесу ожиріння за рахунок того, що діацилгліцерин засвоюється організмом людини та витрачаються в якості джерела енергії без ефекту ресинтезу [3 – 7].

У цей час найбільш перспективними технологіями одержання жирів, збагачених діацилгліцерином, є ферментативні процеси гліцеролізу та етерифікації жирової сировини [8 – 11].

Метою представленої роботи стало вивчення механізму ферментативної етерифікації, яке необхідно для розуміння та пояснення процесу в цілому, що необхідно для подальшої оптимізації його параметрів, спрямованих на максимальний вихід діацилгліцеринів.

Попередні дослідження показали, що найбільш ефективним катализатором реакції етерифікації жирних кислот (ЖК) гліцерином є фермент Lipozyme RM IM («Novozymes», Данія).

Вказаний препарат являє собою іммобілізовану мікробну ліпазу *Rhizomucor miehei*, яку отримано за допомогою глибинного бродіння генетично модифікованого мікроорганізму *Aspergillus oryzae*. Ліпаза являє собою білок з одиночним поліпептидним ланцюгом, що містить 269 амінокислотних залишків. Її активний центр складається з каталітичної тріади Ser144, His257 і Asp203 [12]. Як носій, що використано для іммобілізації, застосовано макропористу аніонообмінну смолу. Важливою особливістю Lipozyme RM IM є те, що він, поряд з високою каталітичною активністю, має sn-1,3-позиційну специфічність. Це обумовлює переважний синтез фізіологічно активних 1,3-діацилгліцеринів.

Об'єктом для дослідження механізму процесу етерифікації була обрана найбільш доступна гексадеканова (пальмітинова) кислота. Нами було встановлено, що у випадку використання як вихідних субстратів для етерифікації лінолевої, олеїнової, пальмітинової та стеаринової кислот початкові швидкості їх взаємодії із гліцерином під дією ферменту Lipozyme RM IM відрізнялися не більш, ніж на 3 %. Тому загальні закономірності процесу ферментативної етерифікації, визначені для однієї з кислот, можуть бути використані й для інших.

Спочатку для досліджень були приготовлені модельні суміші, що склалися із пальмітинової кислоти, гліцерину та розчинника. У якості останнього була взята суміш н-гексана та трет-бутилового спирту в об'ємному співвідношенні 1 : 1. 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 ЖК. Процес етерифікації здійснювався при температурі 60 °С під дією ферментного препарату Lipozyme RM IM, кількість якого становила 10 % від маси субстратів. Дослідження виконували у 2-х паралелях.

Протягом перших 15 хвилин процесу кожні 3 хвилини відбиралися проби, у яких методом високотемпературної газорідинної хроматографії визначався вміст пальмітинової кислоти. Аналізи здійснювались у відповідності із AOCS Official Method Cd 11b-91 [13]. Потім будувалися залежності концентрації ЖК від часу реакції та методом нелінійної регресії знаходились їх емпіричні рівняння. Початкова швидкість реакцій визначалась шляхом диференціювання вказаних рівнянь та знаходження швидкості в нульовий момент перебігу реакцій.

Комп'ютерна обробка результатів експериментів за допомогою пакету Statistica 9 (StatSoft, Inc.) дала змогу узагальнити отримані залежності, які в аналітичному вигляді представлені рівнянням (1):

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot C_{\text{ЖК}} \cdot C_{\text{ГЛ}}}{K_{\text{ДЖК}} \cdot K_{\text{МГЛ}} + K_{\text{МГЛ}} \cdot C_{\text{ЖК}} + K_{\text{МЖК}} \cdot C_{\text{ГЛ}} + C_{\text{ЖК}} \cdot C_{\text{ГЛ}}}, \quad (1)$$

де  $v_0$  – початкова швидкість реакції, мкмоль/хв;  $V_{\max}$  – максимальна швидкість реакції, мкмоль/хв;  $C_{\text{ЖК}}$  – концентрація ЖК, моль/л;  $C_{\text{ГЛ}}$  – концентрація гліцерину, моль/л;  $K_{\text{ДЖК}}$  – константа дисоціації комплексу фермент-жирна кислота, моль/л;  $K_{\text{МГЛ}}$  – константа Міхаеліса ліпази *Rhizomucor miehei* для гліцерину, моль/л;  $K_{\text{МЖК}}$  – константа Міхаеліса ліпази *Rhizomucor miehei* для жирної кислоти, моль/л.

Обчислені значення параметрів рівняння (1) були наступними:  $V_{\max} = 980$  мкмоль/хв,  $K_{\text{ДЖК}} = 0,0079$  моль/л,  $K_{\text{МГЛ}} = 0,0190$  моль/л,  $K_{\text{МЖК}} = 0,0083$  моль/л.

Отримана залежність (1) відповідає математичній моделі ферментативної реакції, що, згідно номенклатури Келланда, підлягає неупорядкованому бі-бі механізму [14,15].

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

Як можна спостерігати (рис. 1), всі залежності  $1/v_0 = f(1/C_{\text{ГЛ}})$  мають лінійний характер та перетинаються між собою у другому квадранті.

Крім того, точка перетину знаходиться на осі абсцис.

Це свідчить, по-перше, про те, що жирна кислота та гліцерин не перешкоджають один одному зв'язуватись з ферментом, а по-друге, їх зв'язування з ферментом відбувається раніше, ніж починають відщеплюватись продукти реакції [16, 17].

Методом газорідинної хроматографії було встановлено, що в процесі естерифікації в реакційній суміші утворюються моноацилгліцерини (МАГ), діацилгліцерини (ДАГ), триацилгліцерини (ТАГ) і вода.

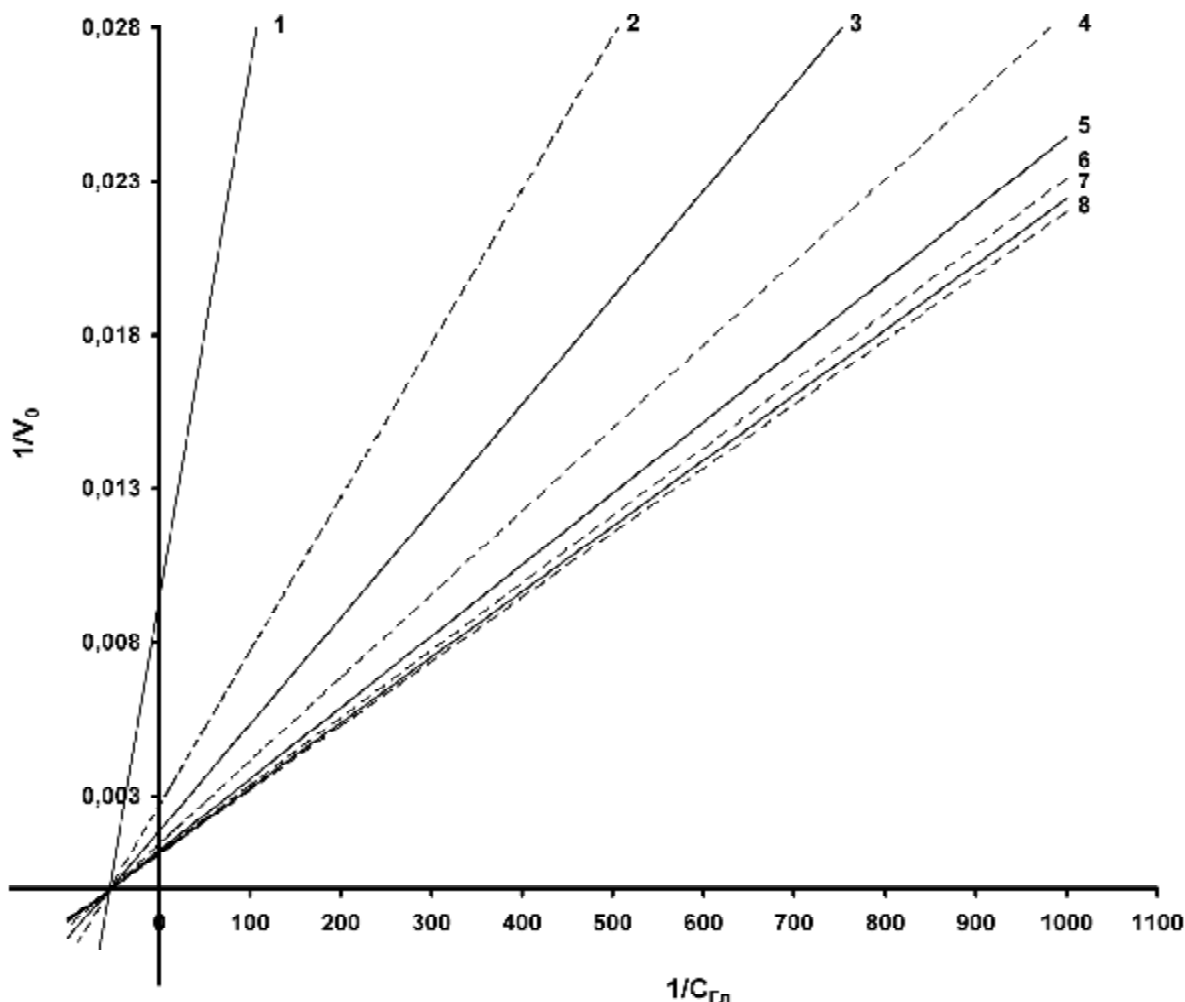


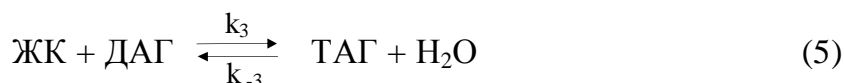
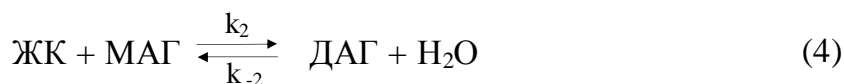
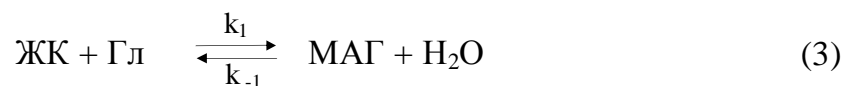
Рис. 1. Залежність  $1/v_0=f(1/C_{Гл})$  при фіксованих концентраціях ЖК в межах кожної серії експериментів:

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

Таким чином, під дією ферменту протікає складна реакція, яка описується загальним рівнянням:



Наведений вираз (2) є сукупністю наступних оборотніх реакцій:



Враховуючи 1,3-специфічність використовуваного ферменту реакція (5) протікає припустимо внаслідок ізомеризації частини 1,3-ДАГ в 1,2(2,3)-ДАГ за рахунок міграції ацилів.

Для вивчення повного механізму процесу ферментативної естерифікації додатково були проведені дослідження із взаємодії пальмітинової кислоти з МАГ і ДАГ.

Для цього були приготовлені відповідні модельні суміші, що склалися із зазначених субстратів і розчинника.

У дослідженнях визначалися залежності початкових швидкостей реакцій від концентрацій відповідно МАГ і ДАГ, які варіювалися від 0,001 моль/л до 0,1 моль/л, при різних, але усередині однієї серії експерименту постійних концентраціях ЖК.

У графічному виді в зворотніх координатах вказані залежності мали такий же вигляд, як і графіки, наведені на рис. 1, а в аналітичному вираженні були аналогічні рівнянню (1).

Це є підставою зробити висновок про те, що, як і у випадку взаємодії ЖК з гліцерином, ферментативні реакції ЖК з ДАГ і МАГ відповідають не-порядкованому бі-бі механізму.

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

Таблиця 1

Значення констант Міхаеліса

Субстрат	ЖК	Гліцерин	МАГ	ДАГ
$K_M$ , моль/л	0,0083	0,0190	0,0275	0,0328

Значення максимальних швидкостей реакцій

Реакційна суміш	ЖК + Гліцерин	ЖК + МАГ	ЖК + ДАГ
$V_{\max}$ , МКМоль/хв	980	1030	1010

Аналіз даних, представлених у табл. 1, свідчить про те, що жирна кислота, для якої значення константи Міхаеліса найменше, мають найбільшу спорідненість до ліпази *Rhizomucor miehei*. Реакційна здатність у початковий момент часу вища в системі ЖК+МАГ (табл. 2), що обумовлено високою емульгуючою властивістю неповного ацилгліцерину.

Таким чином, результати дослідження дали змогу запропонувати представлену на рис. 2 загальну схему етерифікації жирної кислоти гліцерином під дією ліпази *Rhizomucor miehei*.

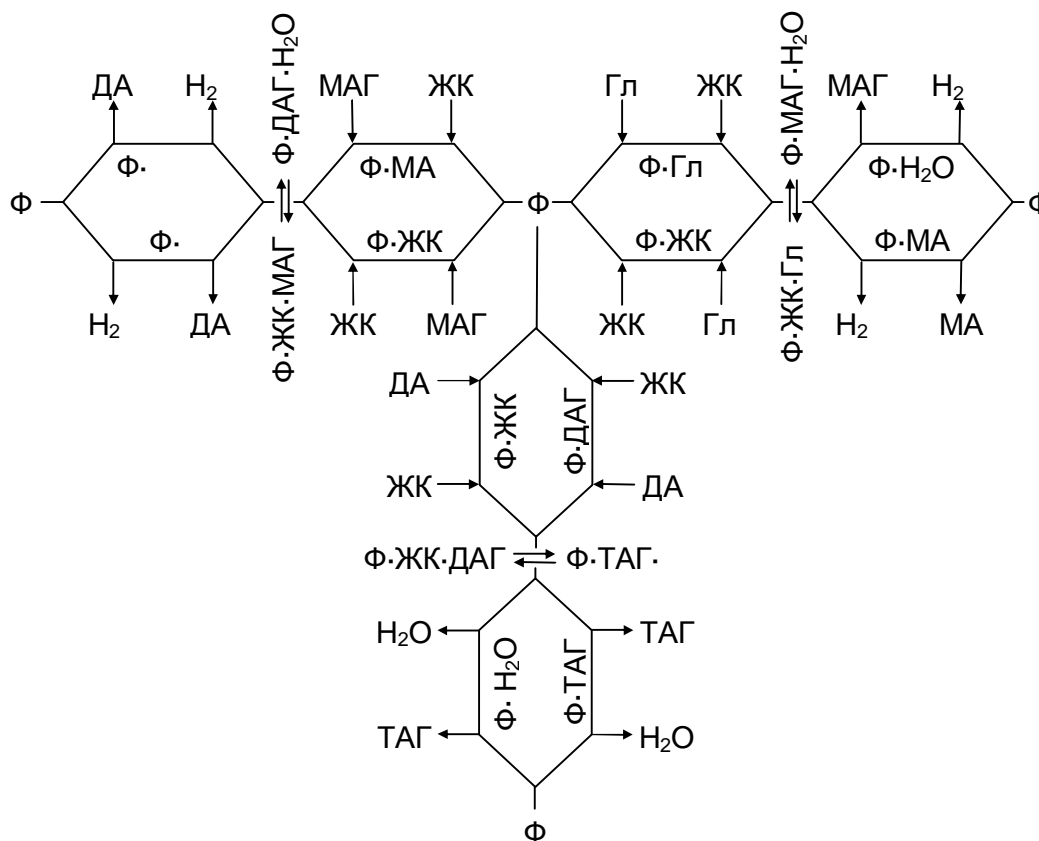


Рис. 2. Механізм ферментативної етерифікації:

Ф – фермент; ЖК – жирна кислота; Гл – гліцерин; МАГ – моноацилгліцерин;  
ДАГ – діацилгліцерин; ТАГ – триацилгліцерин.

У наведеній на рис. 2 схемі два субстрати (ЖК і Гл, ЖК і МАГ, ЖК і ДАГ) зв'язуються з ферментом (Ф) з формуванням тернарних комплексів

(Ф·ЖК·Гл, Ф·ЖК·МАГ, Ф·ЖК·ДАГ). Далі зазначені комплекси трансформуються (відповідно у Ф·МАГ·Н<sub>2</sub>О, Ф·ДАГ·Н<sub>2</sub>О, Ф·ТАГ·Н<sub>2</sub>О) з утворенням продуктів реакції, які потім відщеплюються у вільній формі. Необхідно відзначити, що всі наведені в схемі етапи реакцій є зворотними.

Таким чином, складено цілісну картину механізму ферментативної етерифікації, визначено константи ферментативної кінетики ліпази *Rhizomucor miehei* для всіх субстратів процесу. Результати проведених досліджень дають можливість оптимізувати параметри технології біокаталітичної етерифікації, які забезпечують максимальний вихід діацилгліцеринів.

**Список літератури:** **1.** *Bray G.* Handbook of obesity: clinical applications / *G. Bray, Cl. Bouchard.* – [3-rd ed.]. – Informa Healthcare Inc., USA, 2008. – 659 p. **2.** *Östman J.* Treating and Preventing Obesity / *J. Östman, M. Britton, E. Jonsson.* – WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany, 2004. **3.** *Akoh C.C.* Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology / *Casimir C. Akoh, David B. Min.* – [3-rd ed.]. – CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 2008. – 914 p. **4.** *Hidekatsu Y.* Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome / [*Y. Hidekatsu, Y. Tomono, K. Ito and oth.*] // *Nutrition Journal.* – 2007. – Vol. 43, № 2. – P. 382 – 385. **5.** *Flickinger B.D.* Nutritional characteristics of DAG oil / *B.D. Flickinger, N. Matsuo* // *Lipids.* – 2003. – Vol. 38. – P. 129 – 132. **6.** *Matsuo N.* Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods / *N. Matsuo* // *Food Sci. Technol. Res.* – 2004. – Vol. 10, № 2. – P. 103 – 110. **7.** *Saito S.* Dietary 1,3-diacylglycerol protects against diet-induced obesity and insulin resistance / *S. Saito, A. Hernandez-Ono, H. N. Ginsberg* // *Metabolism Clinical and Experimental.* – 2007. – Vol. 56, № 11. – P. 1566 – 1575. **8.** *Некрасов П.О.* Реологічні характеристики жирових продуктів, збагачених діацилгліцеринами / *П.О. Некрасов, Н.В. Решетняк* // Інтегровані технології та енергозбереження. – 2007.– № 4. – С. 82 – 86. **9.** *Некрасов П.О.* Дослідження кінетики ферментативної етерифікації / *П.О. Некрасов, Н.В. Решетняк, Н.Г. Катасонова* // Вісник НТУ "ХПІ". – 2007. – № 9. – С. 129 – 132. **10.** *Некрасов П.О.* Оптимізація процесу молекулярної дистиляції при отриманні жирів, збагачених діацилгліцеринами / *П.О. Некрасов* // Інтегровані технології та енергозбереження. – 2009.– № 3. – С. 75 – 81. **11.** *Некрасов П.О.* Кінетика кристалізації жирів, збагачених діацилгліцеринами / *П.О. Некрасов, Я.М. Таратун, Ю.М. Плахотна, О.В. Подлісна* // Наукові праці ОНАХТ. – Одеса, 2009. – № 36, Т. 2 – С. 207 – 212. **12.** *Polaina J.* Industrial enzymes: structure, function and applications / *Julio Polaina, Andrew P. MacCabe.* – Springer: The Netherlands, 2007. – 641 с. **13.** *Firestone D.* AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society // *D. Firestone.* – [5th ed.]. – Champaign, IL: American Oil Chemists' Society (AOCS), 2003. **14.** *Biszwanger H.* Enzyme kinetics: principles and methods / *H. Biszwanger.* – WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2002. – 260 p. **15.** *Frey P.A.* Enzymatic reaction mechanisms / *P.A. Frey, A.D. Hegeman.* – USA: Oxford University Press, New York, 2007. – 848 p. **16.** *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики: пер. с англ. / *Т. Келети.* – М.: Мир, 1990. – 350 с. **17.** *Taylor K.B.* Enzyme kinetics and mechanisms / *K.B. Taylor.* – USA: Kluwer Academic Publishers, New York, 2002. – 227 p.

Надійшла до редколегії 03.12.09