

П.О. НЕКРАСОВ, докт. техн. наук, доц., НТУ «ХП»,
О.В. ПОДЛІСНА, аспірант, НТУ «ХП»,
О.П. НЕКРАСОВ, канд. техн. наук, проф., НТУ «ХП»

ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ЛІПАЗ НА ПРОЦЕС ЕНЗИМНОГО АЦИДОЛІЗУ ЖИРІВ

В роботі досліджено каталітичну дію іммобілізованих ферментних препаратів в процесі ензимного ацидолізу жирів. Результати експериментів свідчать про те, що використання ліпази з *Rhizomucor miehei* забезпечує найбільший вихід 1,3-двозамішених структурованих ліпідів. Отримані за запропонованою технологією жирові системи проявляють фізіологічні властивості і можуть бути використані як функціональні інгредієнти харчового раціону людини.

В работе исследовано каталитическое действие иммобилизованных ферментных препаратов в процессе энзимного ацидолиза жиров. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что использование липазы с *Rhizomucor miehei* обеспечивает наибольший выход 1,3-двухзамещенных структурированных липидов. Полученные по предложенной технологии жировые системы проявляют физиологические свойства и могут быть использованы как функциональные ингредиенты пищевого рациона человека.

Catalytic effects of immobilization biocatalysts on the enzymatic acidolysis of fats were investigated. Received data prove that the highest yield of 1,3-twice-substituted structured lipids can be achieved when lipase from *Rhizomucor miehei* is used. Fat systems that were obtained by given technology have physiological properties and can be used as functional ingredients of human ration.

В останні роки у зв'язку з розширенням уявлень про біологічну роль жиру в раціоні людини, одним з актуальних та пріоритетних напрямків харчового сектору є отримання та впровадження інноваційних за своїм призначенням функціональних систем, вживання яких дозволить покращити метаболічні процеси та імунні властивості організму.

Сучасною тенденцією ринку функціональних продуктів є випуск модифікованих ліпідів, які мають у своєму складі оптимально розташовані поліненасичені жирні кислоти з певною довжиною ланцюга. Завдяки такій специфічній структурі вказані жири швидше абсорбуються клітинами кишечника, але в той же час не ресинтезуються в організмі з утворенням нової молекули триацилгліцерину (ТАГ) у порівнянні з традиційними ліпідами [1].

Контролювання позиційного розподілу жирних кислот у кінцевому триацилгліцерині є головною умовою отримання бажаного продукту. І одним з

перспективних методів вирішення цієї задачі є використання ферментативних технологій синтезу структурованих ліпідів, зокрема ацидолізу.

Ферменти або ензими – біологічні речовини з унікальними фізико-хімічними властивостями, серед яких можна виділити високу каталітичну активність та селективність дії [2]. У ряді випадків в залежності від механізму дії ліпази проявляють відносну та абсолютну специфічність [3]. Велике значення цього показника обумовлено конформаційною та електростатичною компліментарністю між молекулами субстрату та ферменту і унікальною структурною організацією активного центру. Він забезпечує високу спорідненість та вибірковість перебігу однієї реакції з інших хімічних реакцій, що протікають одночасно.

Але комерційне використання ензимів обмежено рядом факторів. Так, маючи білкову природу, вони не виявляють стійкості при зберіганні, а також проявляють чутливість до теплового впливу та не можуть бути використані багаторазово через складнощі при відділенні їх від реагентів та продуктів реакції. Вирішити ці проблеми допомагає впровадження в технологію іммобілізованих ферментів.

В процесі іммобілізації фермент закріплюють на поверхні або всередині твердого носія (діатомит, хітин, церамід, іонообмінні смоли, гідрофобні мембрани), який легко відділяється з реакційної суміші після завершення ферментації. Іммобілізація на відповідних носіях підвищує сумісність ліпаз з гідрофобними середовищами та операційну стабільність при низькій концентрації води. Імовірно, це пов'язано з тим, що фермент стає більш стійким, за рахунок обмеження його здатності денатурувати при зміні рН, температури та розчинників.

Так, в процесі отримання жирних кислот з пальмового олеїну за допомогою іммобілізованого ферменту у двохфазній системі доведено, що як і розчинна, так і нерозчинна ліпази мають максимальну активність при однакових максимальних умовах (рН 6,5 – 7,5; 35 °С) [4]. Проте іммобілізована ліпаза зберігає свою активність у більш широкому діапазоні рН та характеризується більшою термічною стійкістю. В роботі [5] після 48 годин проведення реакції ацидолізу трипальмітину та олеїнової кислоти з використанням ферменту *Bacillus stearothermophilus* MC7 ступінь перетворення склав більше 50 %.

Ще однією перевагою іммобілізованих препаратів є помітне здешевлення процесів модифікації, за рахунок зниження енерговитрат та енергоресурсів. Крім того, присутність регіоспецифічного біокаталізатору у системі за-

безпечує проведення направленої модифікації жирів та отримання продукту з заданими складом, структурою, фізіологічними та фізико-хімічними властивостями.

В процесі ацидолізу сафлорової, лляної олії та олії браго низкою середньоланцюгових жирних кислот під дією іммобілізованої ліпази було отримано sn-2 та sn-1,3 структуровані ТАГ [6, 7]. Підвищення концентрації ферментного препарату в реакційному середовищі скорочувало тривалість процесу синтезу структурованих триацилгліцеринів та зменшувало міграцію ацильних груп.

В роботі [8] представлена трьохстадійна технологія модифікування двох видів олій з високим вмістом арахідонової кислоти у sn-2 положенні молекули триацилгліцерину при отриманні структурованого ліпиду, збагаченого на 1,3-каприлоїл-2-арахідоїл гліцерол. Реакції проводили з використанням іммобілізованої ліпази *Rhizopus oryzae*. В результаті експерименту були отримані раціональні умови процесу: мольне співвідношення ТАГ : кислота 1 : 2, температура 35 °С та швидкість потоку 4 мл/год. За наведених оптимальних параметрів ступінь ацидолізу першої стадії досяг 53 % та навіть після безперервного режиму тривалістю 90 діб залишався на рівні 48 %.

Але при використанні ферменту *Aspergillus flavus* в реакціях ацидолізу рослинних олій та лауринової кислоти ступінь перетворення останньої варіювався від 13 до 18 % через 20 годин тривалості процесу [9]. Реакція з бавовняною олією показала найбільший ступінь входження лауринової кислоти у молекулу ТАГ – 18 %, на відміну від соєвої та кокосової – 16 % відповідно. Результати підтверджують, що використаний фермент демонструє ацильну специфічність по відношенню до коротколанцюгових жирних кислот.

Проте на сьогодні недостатньо системних даних щодо ефективності дії іммобілізованих ензимів на вихід структурованих ліпідів в процесі ферментативного модифікування жирів.

Метою роботи було встановлення ефективності каталітичної дії представлених на вітчизняному ринку іммобілізованих ферментних препаратів Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM та Novozym 435 при отриманні 1,3-двозаміщених структурованих ліпідів методом ензимного ацидолізу.

Ферментний препарат Lipozyme RM IM – ліпаза з *Rhizomucor miehei*, що отримана бродінням генетично модифікованого мікроорганізму *Aspergillus oryzae* та адсорбована на макропористу аніонообмінну смолу [10].

Novozym 435 являє собою іммобілізований препарат термостабільної ліпази типу В з *Candida antarctica*. Вказаний фермент отримують за допомогою глибинного бродіння генетично модифікованого мікроорганізму *Aspergillus oryzae*. Твердим носієм даного препарату при іммобілізації виступає макропориста акрилова смола.

Lipozyme TL IM – триацилгліцерінова гідролаза з *Thermomyces lanuginosus*, яка є продуктом бродіння генетично модифікованого мікроорганізму з *Aspergillus oryzae*, адсорбованого на силікагелі.

Для проведення основного експерименту було використано модельну жирову систему, яка містила соняшникову олію та каприлову кислоту у мольному співвідношенні 1 : 4.

Реакції проводили при постійному перемішуванні під шаром азоту без розчинника протягом 12 годин. Температуру процесу варіювали у межах 45 – 75 °С, вміст ферменту 5 – 20 % від маси жирової суміші. Після закінчення реакції ензим відділявся від продукту шляхом фільтрації при температурі 50 °С. Реакції проведено у трьох паралелях.

У реакційній суміші регіоспецифічним методом з використанням газорідинної хроматографії встановлювали вміст 1,3-двозаміщених структурованих ліпідів. Дані аналізу жирових сумішей, отриманих з використанням вищевказаних ліполітичних іммобілізованих ферментів представлені на рис. 1 – 3.

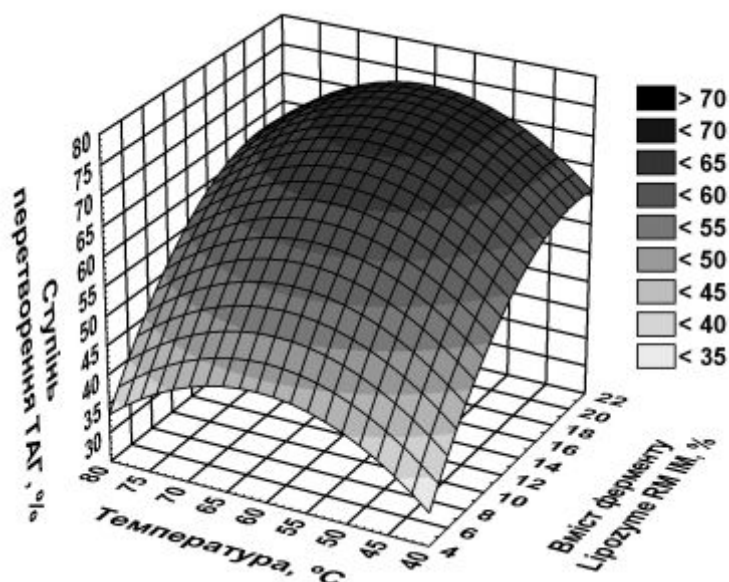


Рис. 1. Залежність ступеня перетворення триацилгліцеринів у 1,3-двозаміщені структуровані ліпіди від температури реакції та вмісту ферменту Lipozyme RM IM

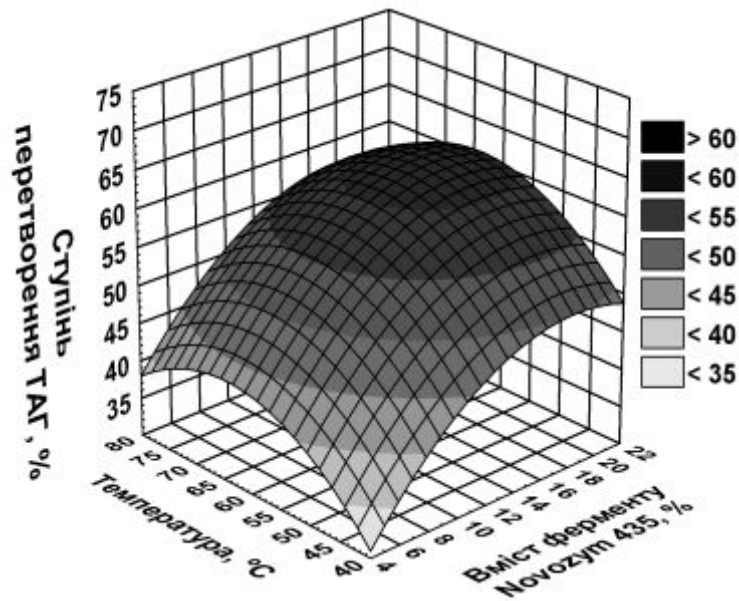


Рис. 2. Залежність ступеня перетворення триацилгліцеринів у 1,3-двозаміщені структуровані ліпіди від температури реакції та вмісту ферменту Novozym 435

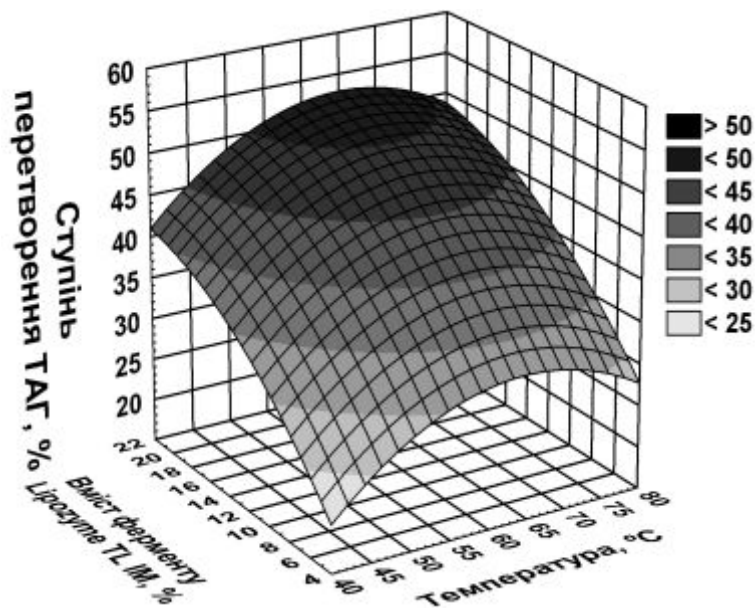


Рис. 3. Залежність ступеня перетворення триацилгліцеринів у 1,3-двозаміщені структуровані ліпіди від температури реакції та вмісту ферменту Lipozyme TL IM

Аналіз графічних даних рис. 1 свідчить про те, що при використанні Lipozyme RM IM максимальний ступінь перетворення триацилгліцеринів у 1,3-двозаміщені структуровані ліпіди досягає 73 %. При цьому раціональний температурний інтервал для ферментного препарату Lipozyme RM IM в процесі ензимного ацидолізу варіюється від 50 °С до 70 °С. В той же час ступінь

перетворення вихідних ТАГ у структуровані ліпіди при використанні ліпази з *Candida antarctica* досягає максимального значення 62 % при температурі, що варіюється в межах 55 – 70 °С (рис. 2). Дані, представлені на рис. 3, вказують на те, що максимальний ступінь перетворення триацилгліцеринів на двоазміщені структуровані ліпіди при використанні ферменту Lipozyme TL IM у середньому на 23 % менше аналогічного показника, який досягається при використанні ліпаз з *Candida antarctica* та *Rhizomucor miehei* відповідно.

Таким чином в результаті проведеної роботи було встановлено, що найбільшу каталітичну активність в процесі ферментативного ацидолізу жирів, спрямованого на отримання структурованих ліпідів, проявляє ферментний препарат Lipozyme RM IM. Використання вказаного ензиму забезпечує максимальний вихід 1,3-структурованих ліпідів у порівнянні з двома іншими досліджуваними препаратами за однакових умов проведення процесу.

Список літератури: 1. Некрасов П.О. Дослідження впливу структурованих ліпідів на перебіг процесів обміну в організмі / П.О. Некрасов, Ю.М. Плахотна, Т.В. Горбач // Вісник НТУ «ХПІ». – № 13. – 2010. – С. 163 – 173. 2. Волова Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с. 3. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология / С.Д. Варфоломеев. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 474 с. 4. Kittikun A. Continuous production of fatty acids from palm olein by immobilized lipase in a two-phase system / A. Kittikun, P. Prasertsan, C. Sungpud // JAOCS. – 2000. – Vol. 77, № 6. – P. 599 – 603. 5. Guncheva M. Acidolysis of tripalmitin with oleic acid catalyzed by a newly isolated thermostable lipase / M. Guncheva, D. Zhiryakova, N. Radchenkova and M. Kambourova // JAOCS. – 2008 – Vol. 85, № 2. – P. 129 – 132. 6. Mu H. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor / H. Mu, X. Xu, C. E. Hoy // JAOCS. – 1998. – Vol. 75, № 9. – P. 1187 – 1193. 7. Xu X. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification in a pilot continuous enzyme bed / X. Xu, S. Balchen, C.E. Hoy, J. Adler-Nissen // JAOCS. – 1998. – Vol. 75, № 11. – P.1573 - 1579. 8. Nagao T. Production of structured TAG rich in 1,3-capryloyl-2-arachidonoyl glycerol from mortierella single-cell oil / [T. Nagao, A. Kawashima, M. Sumida et al.] // JAOCS. – 2003. – Vol. 80, № 9. – P. 867 - 872. 9. Long K. Acidolysis of several vegetable oils by mycelium-bound lipase of *Aspergillus flavus* link / [K. Long, H.M. Ghazali, A. Ariff, C. Bucke] // JAOCS. – 1997. – Vol. 74, № 9. – P. 1121 – 1128. 10. Матеріали фірми «Novozymes».

Надійшла до редколегії 11.07.2011