

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
“ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

Некрасов Павло Олександрович

УДК 665.383:577.152.31

ФЕРМЕНТНА ТЕХНОЛОГІЯ МОДИФІКУВАННЯ ЖИРІВ

Спеціальність 05.18.06 - технологія жирів, ефірних масел і парфумерно-косметичних продуктів

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Харків – 2004

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі технології жирів Національного технічного університету “Харківський політехнічний інститут” Міністерства освіти і науки України, м. Харків

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор
Гладкий Федір Федорович,
Національний технічний університет “Харківський політехнічний інститут”, завідувач кафедри технології жирів НТУ “ХПІ”

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, професор
Мельников Костянтин Олексійович,
Дніпропетровський державний аграрний університет, професор кафедри хімії

кандидат технічних наук
Гаврилов Геннадій Васильович
Український науково-дослідний інститут олії та жирів,
м. Харків, завідувач сектором

Провідна установа: **Національний університет харчових технологій** Міністерства освіти і науки України, м. Київ

Захист відбудеться “ 03 ” червня 2004 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради **Д64.050.05** Національного технічного університету “Харківський політехнічний інститут” за адресою: 61002, м. Харків, вул. Фрунзе, 21.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного технічного університету “Харківський політехнічний інститут”.

Автореферат розісланий “ 30 ” квітня 2004 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Тимченко В.К.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми На українському ринку жирів склалася проблемна ситуація. Так, наявності достатніх обсягів власних жирів і олій, вітчизняні виробники змушені закуповувати кондитерські жири та жири для виробництва маргарину у зарубіжних постачальників, до того ж не завжди за вигідними цінами. Ті способи, якими в нашій промисловості намагаються вирішити дану проблему, зокрема хімічна переетерифікація, досить складні і не дозволяють одержати жири, будова ацилгліцеринів яких відповідає природним жирам. Впровадження в олій-но-жирову промисловість ферментної технології дозволить отримати жири, схожі за структурою ацилгліцеринів на натуральні, і вивільнити Україну від зайвого імпорту. Ця технологія відрізняється простотою реалізації та відносно невеликою енергоємністю.

Стримуючими факторами до втілення цієї технології на промисловому рівні є ще недостатня вивченість процесу та технологічних нюансів використання біокатализаторів, а також відсутність апробованих рецептур вихідних сумішей. Тому виникла необхідність у доскональному дослідженні поведінки ферментних препаратів, знаходженні оптимальних умов їх дії при модифікуванні характерної для українських підприємств сировини та отриманні рекомендацій стосовно вихідних рецептур.

У той же час існує проблема однозначного прогнозування властивостей ферментно модифікованих жирів в залежності від компонентів вихідної сировини. Тому є доцільним напівемпіричний підхід, який передбачає вивчення впливу різноманітних факторів на конкретні властивості реальних продуктів, математичний опис і подальше моделювання з метою удосконалення відповідних параметрів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами Дисертаційна робота пов'язана з науково-дослідною тематикою кафедри технології жирів НТУ “ХП” щодо застосування ферментних технологій в олійно-жировій галузі. Дослідження здійснювались в рамках держбюджетної роботи “Створення наукових основ нової енергозберігаючої технології одержання аналогів масла какао з використанням вітчизняної сировини” (план прикладних робіт МОН України) та госпдоговору “Методика виконання вимірювань “Визначення переетерифікаційної активності іммобілізованих ліпаз” (ТОВ “Новоконтакт”, м. Київ; НТУ “ХП”, м. Харків).

Мета і задачі дослідження Метою дисертаційної роботи є розроблення науково обгрунтованої ферментної технології модифікування жирів.

У зв'язку з цим було поставлено задачі:

– визначити теоретичні та прикладні аспекти застосування ферментних препаратів для модифікування жирової сировини;

- визначати умови використання ферментів для модифікування жирів різного складу;
- отримати математичні описи залежності складу і властивостей продуктів ферментної реакції від вихідної сировини;
- розробити ефективні методи очистки кінцевих продуктів та оперативної оцінки глибини ферментної реакції;
- розробити рецептури модифікованих жирів, що відповідають сучасним вимогам вітчизняної промисловості.

Об'єкт дослідження – ферментна технологія модифікування жирів.

Предмет дослідження – характеристики ферментів, склад, органолептичні, фізико-хімічні і технологічні властивості отриманих модифікованих жирів.

Методи дослідження – вміст твердого жиру при різних температурах вимірювався методом імпульсного ЯМР; жирнокислотний склад ацилгліцеринів встановлювався методом газової хроматографії метилових ефірів; ацилгліцериновий склад продуктів та вихідних речовин — методами газової, тонкошарової та високоефективної рідинної хроматографії; фізико-хімічні та органолептичні властивості жирів визначались за стандартними методиками.

Наукова новизна одержаних результатів

- вперше доведена підпорядкованість дії ферменту, продуцентом якого є мікроорганізм *Candida antarctica*, кінетиці Міхаеліса-Ментен та знайдені відповідні кінетичні константи;
- вперше визначені раціональні умови дії ферментного препарату Новозім 398 при гідролізі рослинних жирів;
- встановлені раціональні умови використання ферментного препарату Ліпозим TL IM при переестерифікації;
- досліджена кінетика дії ферменту Ліпозим TL IM та визначена її математична модель;
- вперше визначено кількісні залежності складу та властивостей продуктів ферментної переестерифікації від складу вихідної сировини.

Практичне значення одержаних результатів Розроблено технологію модифікування жирів за допомогою ферментів. Запропоновано новий метод експрес-оцінки глибини перетворення продуктів ферментної реакції. Розроблено методи видалення вільних жирних кислот із продуктів ферментної переестерифікації та ацидолізу. Створено рецептури вихідних сумішей для отримання ферментно переестерифікованих жирів з заданими технологічними характеристиками.

Розроблена технологія пройшла апробацію на збудованій дослідній установці та промислові випробування на Вінницькому та Одеському олійно-жирових комбінатах; вироблено 250 тон модифікованих жирів. Економічний ефект від її впровадження дорівнює більш ніж 50 грн/т.

Особистий внесок здобувача Конкретна участь Некрасова П.О. полягає у постановці науково-дослідних задач та їх реалізації при розробці ферментної технології модифікування жирів. Здобувачем здійснено планування та проведення експериментів щодо ферментних гідролізу, ацидолізу та переетерифікації жирів; виконано теоретичний аналіз та обґрунтування отриманих результатів, формулювання висновків. Ним самостійно відпрацьовано технологічний процес модифікування жирів методом ферментної переетерифікації та доведено його до рівня промислових випробувань.

Апробація результатів дисертації Результати дисертаційної роботи були представлені на VIII Міжнародній науково-технічній конференції “Информационные технологии: наука, техника, образование, здоровье” MicroCAD-2000, IX Міжнародній науково-практичній конференції “Наука і соціальні проблеми суспільства: людина, техніка, технологія, довкілля” MicroCAD-2001, X та XI науково-практичних конференціях “Інформаційні технології: наука, техніка, освіта, здоров'я” MicroCAD-2002, MicroCAD-2003 (м. Харків, 2000, 2001, 2002, 2003 рр.), III Всеукраїнській науково-технічній конференції “Сучасні проблеми хімії та технології жирів, масел та допоміжних матеріалів: Олійно-жирова промисловість на порозі нового тисячоліття” (м. Харків, 2002р.), Першій обласній конференції молодих науковців “Тобі Харківщино – пошук молодих” (м. Харків, 2002р.), I Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Біотехнологія. Освіта. Наука” (м. Київ, 2003 р.), Міжнародному науково-технічному семінарі “Ферментні технології модифікування жирів” (м. Харків, 2003р.), Другій міжнародній конференції “Масложировая промышленность Украины: состояние, перспективы, технологии” (м. Київ, 2003 р.).

Публікації Результати дисертації опубліковано у 6 статтях, 1 тезах всеукраїнської конференції.

Структура і обсяг дисертації Дисертація складається із вступу, 5 розділів, висновків та 2 додатків. Повний обсяг дисертації 124 сторінки; з них 22 ілюстрації по тексту, 13 ілюстрацій на 5 сторінках; 19 таблиць; 2 додатки на 7 сторінках, список використаних джерел із 100 найменувань на 11 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність роботи, визначено мету і задачі дослідження, визначено наукову новизну та практичну значущість роботи.

У першому розділі “Огляд літератури і вибір напрямків досліджень” наведено аналітичний огляд науково-технічної інформації закордонних та вітчизняних авторів із фізико-хімічних основ ферментної технології перетворення жирів. Розглянуто ліпази, що використовуються в біотехнології жирів, джерела їх одержання та властивості. Детально проаналізовано особливості

технологій гідролізу, переетерифікації та ацидолізу жирів за участю ферментів. Показано, що на цей час біокаталітичні технології, а в особливості ферментна переетерифікація, вийшли на етап широкого впровадження в олійно-жирову промисловість. Це стало можливим за рахунок ефективних способів іммобілізації ферментів, що дозволяють підвищити їхні показники як з технологічної, так і з економічної точок зору. Наведено актуальні тенденції в технології жирів щодо отримання модифікованих жирів: основні шляхи, їх переваги та недоліки, проблеми транс-ізомерів. На основі аналізу літературних джерел визначено основні напрямки досліджень.

У другому розділі “Методи дослідження ферментів та жирів” наведено загальний план робіт з отримання модифікованих жирів за допомогою ферментів, перелік речовин, що використовувалися у роботі, методи дослідження ферментних препаратів, вихідної сировини і одержаних продуктів.

Метод визначення гідролітичної активності ліполітичних ферментів базується на гідролізі оливкової олії під дією ліпази з подальшим визначенням кількості жирних кислот, що утворилися, титрометричним способом.

Температуру плавлення та твердість вихідної жирової сировини та продуктів визначали згідно ГОСТ 976-81, вологість – за ГОСТ 11812-66, кислотні та перекісні числа – відповідно за ГОСТ 5476-80 та ГОСТ 26593-85. Вміст твердого жиру при різних температурах знаходився за допомогою імпульсного ядерного магнітного резонансу (ЯМР). Даний метод визначає, який відсоток ядер водню (протонів) у досліджуваному зразку належить твердій фазі. Принцип аналізу заснований на вимірі загасання сигналів магнітної індукції від протонів жиру, що знаходиться в рідкій і твердій фазах. Вимірювання здійснювалось на імпульсному ЯМР спектрометрі Minispec mq40 (виробник – фірма Bruker).

Жирнокислотний склад визначали шляхом отримання метилових ефірів досліджуваних вихідних жирів та продуктів реакцій і наступного їх аналізу на газовому хроматографі “Хром 5” виробництва Чехії. У якості зовнішніх стандартів використовували метилові ефіри жирних кислот фірми “Merck”. Визначення кількісного вмісту моногліцеридів у гідролізованій олії здійснювалось газохроматографічним методом на хроматографі GC-14B виробництва фірми Shimadzu (Японія). Ацилгліцериновий склад жирів аналізувався шляхом тонкошарової (на пластинах “Silufol - 254”, Чехія) та високоефективної рідинної хроматографії. Рідинний хроматограф Waters 2690 виробництва США, що було застосовано, був обладнаний рефрактометричним детектором; використовувався сорбент LiChrosorb C18 з розміром часток 5 мкм і діаметром пір 100 Å, рухома фаза складалась з суміші метиленхлориду та ацетонітрилу для хроматографії. Як стандарти використовували ацилгліцерини виробництва фірми “Sigma”.

Показано доцільність використання математичного планування експерименту.

У третьому розділі “Дослідження ферментного гідролізу та ацидолізу жирів” були здійснені експерименти щодо вивчення дії ферментів рослинного та мікробного походжень в реакціях гідролізу та ацидолізу жирів.

Доведено забезпечення достатньої глибини реакції ліпазою рослинного походження – ферментом з насіння рицини – при отриманні технічних жирних кислот методом ферментного гідролізу та визначено властивості отриманих продуктів. Якщо порівнювати рослинні та мікробні ферменти, то перевагою перших є відносно проста технологія їх отримання. З іншого боку, другі більш пристосовані щодо різноманітних технологічних умов та привабливіші для підприємств з точки зору зручності використання. Тому було досліджено гідролітичну активність ряду ензимних препаратів мікробного походження вітчизняного і зарубіжного виробництва (ВО “Ензим”, м. Ладижин та фірма Novozymes, Данія). Дана їх порівняльна характеристика. За даними експерименту, що представлені в табл. 1, найбільшу активність має ферментний препарат Новозім 398, який більш ніж в 30 разів ефективніший у зрівнянні з кращим із вітчизняних аналогів.

Таблиця 1

Ліполітична активність досліджуваних ферментних препаратів

Назва ферментного препарату	Продуцент	Значення активності
Ліполактин І	Oospora lactis	52500 од/г
Ліполактин ІІ	Oospora lactis	15550 од/г
Ліполактин ІІІ	Oospora lactis	1710 од/г
Новозім 398	Candida antarctica	1722250 од/см ³
Новозім 868	Candida antarctica	28920 од/см ³

Подальші дослідження були спрямовані на визначення раціональних умов (температури та рН) дії ферментного препарату Новозім 398 при модифікуванні вітчизняної сировини. Усі випробування було здійснено у двох паралелях. Для експерименту було використано українську соняшникову олію “Олейна”. Ступінь перетворення визначався по зміні кислотного числа продуктів реакцій. При знаходженні температурного оптимуму температура проведення реакції варіювалась від 15°C до 55°C з кроком 5°C. Результати дослідження наведені на рис. 1.

Рис. 1. Залежність ступеня перетворення при гідролізі від температури

Як свідчать дані на рис. 1, максимальні значення КЧ спостерігаються в інтервалі 30°C–40°C. Для уточнення температурного діапазону було здійснено додаткові реакції гідролізу відповідно при температурах 32°C, 34°C, 36°C та 38°C. Їх результати дали змогу зробити висновок, що оптимальною температурою гідролізу рослинних олій при участі ферменту Новозім 398 є 36°C–38°C. При знайденій раціональній температурі по описаній вище методиці було здійснено експеримент щодо визначення раціональних значень рН. Значення рН змінювались від 5 до 11. Отримані дані представлені на рис. 2. Вони свідчать, що найбільший ступінь перетворення

спостерігається при значеннях рН 7–9. В цьому проміжку значення КЧ продуктів гідролізу майже співпадають.

Рис. 2. Залежність ступеня перетворення при гідролізі від рН

Важливими характеристиками ферментних препаратів є максимальна швидкість реакції і константа Міхаеліса, тому що ці величини кількісно визначають активність ферменту і ступінь його спорідненості із субстратом. Дані здійснених експериментів щодо їх знаходження для ферменту Новозім 398 (рис. 3), свідчать, що залежність швидкості реакції v від вихідної концентрації субстрату (оливкової олії) S має вигляд гіперболи.

Рис. 3. Залежність швидкості реакції від вихідної концентрації субстрату

Тобто дія ферментного препарату Новозім 398 підпорядковується кінетиці Міхаеліса-Ментен і до каталізованої їм реакції може бути застосовано класичне рівняння Міхаеліса-Ментен:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_M + S}, \quad (1)$$

де v – швидкість реакції, мкмоль/хв; V_{\max} – максимальна швидкість реакції, мкмоль/хв; K_M – константа Міхаеліса, моль/л; S – концентрація субстрату, моль/л.

Для визначення константи Міхаеліса та максимальної швидкості реакції за експериментальними даними була застосована комп'ютерна обробка інформації методом нелінійної регресії за допомогою програмного пакету MATLAB (виробник – фірма The MathWorks, Inc.). Обчислені значення були наступними: $K_M = 7,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $V_{\max} = 50$ мкмоль/хв.

Наступні експерименти щодо дослідження ферментного ацидолізу вітчизняної сировини довели можливість синтезу за його допомогою ацилгліцеринів заданого складу. Для цих досліджень як біокаталізатор було застосовано 1,3-специфічний іммобілізований на макропористій аніонообмінній смолі ферментний препарат Ліпозім RM ІМ (продуцент – Rhizomucor miehei), що виробляється фірмою Novozymes, Данія. Здійснювався ацидоліз вітчизняних звичайної та високоолеїнової соняшникових олій пальмітиною та стеариною кислотами в різних співвідношеннях в періодичних та безперервних умовах. Жирнокислотний склад цільових продуктів ацидолізу, а також вихідних соняшникових олій було проаналізовано за допомогою газової хроматографії. Отримані дані наведені в табл. 2 та 3.

Таблиця 2.

Жирнокислотний склад вихідної соняшnikової олії та продуктів ацидолізу
(періодичний спосіб)

Кислота	Вміст у зразках, що досліджувалися, %			
	Соняшникова олія	Продукт ацидолізу S	Продукт ацидолізу сумішшю S та P	Продукт ацидолізу P
C ₁₆	8,2	3,5	40,4	73,8
C ₁₈	5,2	69,0	47,4	3,9
C _{18:1}	28,6	14,5	7,0	8,0
C _{18:2}	55,3	11,2	5,1	14,1
інші	до 100			

Таблиця 3.

Жирнокислотний склад високоолеїнової соняшникової олії та продукту ацидолізу (безперервний спосіб)

Кислота	Вміст у зразках, що досліджувалися, %	
	Соняшникова олія	Продукт ацидолізу сумішшю P та S
C ₁₆	4,0	23,3
C ₁₈	3,5	37,1
C _{18:1}	66,8	39,1
C _{18:2}	25,8	0,6

Аналізуючи дані вищенаведених таблиць, можна зробити висновок, що у продуктах ацидолізу в складі ацилгліцеринів помітно зріс вміст жирних кислот, ацили яких вводилися в крайні положення ацилгліцеринів.

У четвертому розділі “Дослідження ферментної переетерифікації жирів” приведені дані експериментів, здійснення яких було необхідним для впровадження цього процесу в промисловість.

Спочатку була доведена ефективність дії іммобілізованих ліполітичних ферментів при переетерифікації жирової сировини. Для цього була здійснена переетерифікація суміші високоолеїнової соняшникової олії та високоплавкої фракції пальмового стеарину. Реакція здійснювалась під каталітичною дією препарату іммобілізованої ліпази Ліпозим RM IM. Цільову фракцію (температура плавлення – 50,8 °C) виділяли з реакційної суміші кристалізацією з ацетону в інтервалі температур 3–20 °C. Жирнокислотний склад вихідної сировини та цільового продукту переетерифікації, що визначався газохроматографічним методом, наведено на рис.5.

Рис. 5. Жирнокислотний склад вихідних речовин та продукту реакції

Дані рис.5 свідчать про перерозподіл ацилів жирних кислот у продукті переетерифікації. Співвідношення ацилів насичених і ненасичених кислот у цільовому продукті становить приблизно 2:1, тоді як у високоплавкій фракції вихідної суміші (пальмовий стеарин) це співвідношення дорівнює 5,5:1. Таким чином, іммобілізований ферментний препарат Ліпозим RM IM забезпечує обмін ацилами між складовими жирової суміші.

Новітня розробка фірми Novozymes, фермент Ліпозим TL ІМ (продуцент – *Thermomyces lanuginosus*), позбавлена головної вади препарату Ліпозим RM ІМ – досить великої вартості. Це зумовлено застосуванням при виготовленні цього ферменту ефективної, але в той же час менш дорогої технології іммобілізації на силікатному носії. Тому усі подальші дослідження щодо ферментної переестерифікації жирів здійснювались з застосуванням Ліпозим TL ІМ.

Далі була визначена раціональна температура дії ферментного препарату Ліпозим TL ІМ. Як субстрат була використана суміш пальмового стеарину та рафінованої дезодорованої соняшникової олії “Олейна” у співвідношенні 1:1 (за вагою). Вміст іммобілізованого ферменту Ліпозим TL ІМ дорівнював 8% від маси жирів. Температура проведення реакції варіювалась від 50°C до 85°C з кроком 5°C. Ступінь перетворення встановлювався по зміні вмісту твердого жиру при 20°C (ДВТЖ), який визначався методом ЯМР. Випробування було здійснено у двох паралелях. Час реакції дорівнював 3 годинам. Результати експерименту надані в графічній формі на рис. 6. Як свідчать дані рис. 6, раціональним інтервалом температур для проведення реакції переестерифікації є 65–75°C, в якому спостерігається найбільший ступінь перетворення.

Рис. 6. Залежність ступеня перетворення від температури (час реакції — 3 години)

Проведено дослідження щодо визначення раціонального вмісту іммобілізованого ферменту Ліпозим TL ІМ при переестерифікації жирів. Вміст ферменту варіювався від 1% до 20% від сумарної маси ацилгліцеринів – модельної суміші тристеарина і тримиристина. Реакція здійснювалася при 70°C протягом 6 годин в атмосфері азоту при постійному перемішуванні. Щогодини відбиралися проби, що далі аналізувалися методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Комплексний аналіз здійснених досліджень показав, що раціональна кількість іммобілізованого ферменту в періодичних умовах проведення реакції становить 10% від маси жирової суміші.

Досліджено кінетику дії ферменту Ліпозим TL ІМ. Застосовувався субстрат, що складався із суміші повністю гідрованої та рідкої соєвих олій. Кожні 15 хвилин відбиралися проби, які далі аналізувалися за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії. Кінетика реакції досліджувалася по зміні вмісту тристеарину – головної складової вихідної повністю гідрованої соєвої олії. Обробка отриманих хроматограм приведена на рис. 7. Залежність має вигляд експоненти.

Рис. 7. Зміна концентрації тристеарину в реакційній суміші

Загальне рівняння моделі:

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}, \quad (2)$$

де $C(t)$ – концентрація тристеарину в реакційній суміші через визначений час t , моль/л; C_0 – початкова концентрація тристеарину, моль/л; k – константа швидкості, хв.⁻¹; t – час реакції, хв.

Визначення константи швидкості здійснювалось методом нелінійної регресії. Обчислене значення було наступним: $k = 0,0212 \text{ хв}^{-1}$. Початкова швидкість реакції визначалась шляхом диференціювання рівняння (2) за часом та знаходження швидкості в нульовий момент часу реакції: $v_0 = 0,002854 \text{ моль/хв}$.

Для вивчення можливості багаторазового використання ферменту було здійснено низку переетерифікацій суміші пальмового стеарину та кокосового масла. Ступінь перетворення контролювався за допомогою методу імпульсного ЯМР. Отримані показники представлено в табл. 4.

Таблиця 4.

Вміст твердого жиру у вихідній суміші та продуктах переетерифікації

Об'єкт аналізу	Вміст твердих жирів, %				
	10°C	20°C	25°C	30°C	35°C
Вихідна суміш жирів ($t_{пл}=42,8^\circ\text{C}$)	58,5	30,5	25,9	19,4	12,3
1-ше завантаження ($t_{пл}=35,1^\circ\text{C}$)	51,2	25,6	19,1	11,8	4,9
2-ге завантаження ($t_{пл}=36,3^\circ\text{C}$)	52,3	29,2	22,5	13,9	6,4
3-тє завантаження ($t_{пл}=37,0^\circ\text{C}$)	52,9	32,0	24,3	14,1	7,3
4-те завантаження ($t_{пл}=37,0^\circ\text{C}$)	53,0	32,7	24,6	14,4	7,2
5-те завантаження ($t_{пл}=37,0^\circ\text{C}$)	53,1	32,8	24,9	14,4	7,3
6-те завантаження ($t_{пл}=37,2^\circ\text{C}$)	53,3	34,5	25,0	14,6	7,4
7-ме завантаження ($t_{пл}=37,2^\circ\text{C}$)	53,4	34,6	25,2	14,8	7,6
8-ме завантаження ($t_{пл}=37,2^\circ\text{C}$)	53,3	34,6	25,4	14,8	7,5
9-те завантаження ($t_{пл}=37,2^\circ\text{C}$)	53,7	35,1	25,3	14,6	7,8
10-те завантаження ($t_{пл}=37,2^\circ\text{C}$)	53,5	35,7	25,2	14,5	7,7

Дані табл. 4 свідчать, що технологічні характеристики продуктів реакції майже ідентичні на всіх циклах проведення експерименту, що доводить можливість багаторазового використання ферменту Ліпозим TL ІМ для переетерифікації жирів.

Проведено дослідження щодо прогнозування складу продукту ферментної переетерифікації. Для цього було здійснено переетерифікацію модельної еквімолярної суміші тристеарина (3S) і тримиристина (3M) за допомогою ферментного препарату Ліпозим TL ІМ. Результати експерименту зведені в табл. 5 (умовні позначення продуктів реакції: 2M1S – ацилгліцерин, що має два ацила $C_{14:0}$ і один – $C_{18:0}$, а 1M2S – ацилгліцерин, що має два ацила $C_{18:0}$ і один – $C_{14:0}$).

Таблиця 5.

Співвідношення компонентів в реакційній суміші, мольні частки

Час реакції, години	3M	2M1S	1M2S	3S
0,00	0,50	0,00	0,00	0,50
1,00	0,25	0,28	0,26	0,22
2,00	0,17	0,34	0,33	0,16

3,00	0,14	0,37	0,37	0,13
4,00	0,13	0,37	0,38	0,13
5,00	0,12	0,37	0,38	0,13
6,00	0,12	0,38	0,38	0,12

Аналіз приведених в табл. 5 даних свідчить, що при досягненні рівноваги молярне співвідношення різних ацилгліцеринів може бути виражено наступною формулою (3):

$$(A+B)^3 = GA^3 + 3GA^2B + 3GAB^2 + GB^3 = 1, \quad (3)$$

де А і В – мольні частки кислот;

Г – ацилгліцерини відповідних кислот;

окремі члени рівняння являють собою кількості ацилгліцеринів, які виражені в мольних частках.

Отримане рівняння (3) добре співвідноситься з розрахунковими формулами для реакцій переетерифікації при використанні хімічних каталізаторів.

Для вивчення залежності властивостей продукту від жирнокислотного складу вихідної сировини було застосовано математичний метод планування експерименту – симплекс-решітчасті плани Шеффе. Здійснювались переетерифікації сумішей саломасу марки 6, оливкової та соняшникової олій у різних співвідношеннях. Головними в представлених компонентах є неспецифічні відповідно насичена (C_{18:0}), мононенасичена (C_{18:1}) та діненасичена (C_{18:2}) кислоти. Це дало можливість з певної мірою похибки кількісно оцінити вплив насиченості ацилів на функції відгуку, у якості яких були використані характеристики продуктів переетерифікації: температура плавлення, твердість за Камінським при 15°C та вміст твердого жиру при температурі 20°C за методом ЯМР. На основі плану експерименту для кожної з функцій відгуку були знайдені рівняння поліномів (4-6).

$$T = -17 \cdot X_1 + 56,6 \cdot X_2 - 3 \cdot X_3 + 85,28 \cdot X_1 \cdot X_2 + 52,6 \cdot X_2 \cdot X_3 + 102,83 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot (X_1 - X_2) + 0,45 \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot (X_1 - X_3) - 70,65 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot (X_2 - X_3) + 177,53 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3, \quad (4)$$

$$ТВК = 950 \cdot X_2 - 1536,98 \cdot X_1 \cdot X_2 - 1194,98 \cdot X_2 \cdot X_3 + 402,08 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot (X_1 - X_2) + 110,93 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot (X_2 - X_3) + 372,15 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3, \quad (5)$$

$$ВТЖ = 100 \cdot X_2 - 148,77 \cdot X_1 \cdot X_2 - 118,94 \cdot X_2 \cdot X_3 + 78,66 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot (X_1 - X_2) - 38,84 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot (X_2 - X_3) + 101,57 \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3, \quad (6)$$

де Т, ТВК і ВТЖ – відповідно температура плавлення, твердість та вміст твердого жиру при 20°C; X₁, X₂, X₃ – масові частки відповідно соняшникової олії, саломасу марки 6 та оливкової олії (в контексті експерименту – жирів, збагачених відповідно діненасиченими, насиченими та

мононенасиченими кислотами). Перевірка рівнянь (4–6) в контрольних точках показала, що вони адекватні експерименту. Діаграми, що були побудовані за отриманими рівняннями, наведено на рис. 8–10.

Рис. 8. Температура плавлення

Рис. 9. Твердість при 15°C

Рис. 10. Вміст твердого жиру при 20°C

Отримані за експериментальними даними поліноміальні залежності (4–6) та діаграми (рис. 8–10) дають змогу підібрати рецептури переетерифікованих жирів, які будуть мати бажані для виробника властивості.

В п'ятому розділі “Розробка ферментної технології модифікованих жирів” попередньо було розроблено методики очистки продукту реакції від жирних кислот.

В першій методиці пропонується спосіб розділення суміші жиру і жирних кислот шляхом перекристалізації продуктів ацидолізу з етилового спирту. На основі досліджень було встановлено, що оптимальне співвідношення спирт : суміш є 5:1. На кожному етапі перекристалізацій визначалися значення КЧ отриманого продукту. Результати експериментів приведені в табл. 6.

Таблиця 6.

Кислотні числа продукту ацидолізу

Перекристалізація	КЧ жирової фази, мг КОН / г
0	71,97
1	18,06
2	3,60
3	0,95
4	0,42

Як свідчать дані табл. 6, вміст жирної кислоти за наведеною технологією ефективно знижується і на 4-тій перекристалізації КЧ досягає значення 0,42 мг КОН / г, що відповідає приблизно 0,2% від маси суміші.

У випадку менших вихідних значень КЧ продукту реакції, як це спостерігається при ферментній переетерифікації, пропонується друга методика очистки від вільних жирних кислот за допомогою їх нейтралізації 5% водно-спирто-гліцериним розчином КОН. Лужний розчин до продукту додавався поступово при постійному перемішуванні при температурі 60°C. Потім температура підвищувалась до 70°C і протягом 3 годин з постійним перемішуванням здійснювалась власне нейтралізація. Потім перемішування відключалось, і суміш відстоювалась протягом 1

години при 70°C. Нижній шар – соапсток – видалявся. Після цього продукт неодноразово промивався водно-спирто-гліцериним розчином. Коли аналіз жиру показував відсутність мила, продукт промивався гліцериним з метою видалення залишків вологи.

За даними здійснених експериментів при початкових КЧ 5,5–6,5 мг КОН/г кінцеві значення КЧ знаходились в межах 0,3 мг КОН / г, тобто вміст вільних жирних кислот в продуктах ферментної переестерифікації знижався майже у 20 разів у порівнянні з вихідними значеннями.

Далі в цьому ж розділі пропонується оцінка вмісту твердої фази в жирі шляхом використання його здатності розсіювати монохроматичне випромінювання у видимій області спектра. Дослідження виконано з продуктами ферментної переестерифікації саломасу марки 5 і рафінованої дезодорованої соняшникової олії, в яких методом ЯМР попередньо було визначено вміст твердої фази при 20°C. Для виміру світлопропускання на спектрофотометрі СФ-10 зразки жиру поміщали між покривними стеклами і після витримки протягом години при температурі 20°C вимірювали коефіцієнт світлопропускання від 0 до 100%.

Як свідчать приведені на рис. 11 дані, коефіцієнт світлопропускання (середнє арифметичне паралельних вимірювань) зразку при довжині хвилі 600 нм зменшується пропорційно вмісту твердої фази в жирі при 20°C, що дозволяє оцінювати, після відповідного градування, кількість твердої фази в жирі по розсіюванню монохроматичного світла.

Рис. 11. Залежність світлопропускання від вмісту твердої фази

На основі здійснених досліджень проведена апробація процесу періодичної ферментної переестерифікації жирів, для чого була розроблена технологічна схема дослідно-експериментального виробництва, що представлена на рис. 12. Згідно з цією схемою було створено та змонтовано дослідну установку з ферментної технології модифікування жирів в науково-технічному та учбовому центрі (НТУЦ) Національного технічного університету “ХПІ”.

Рис. 12. Технологічна схема дослідно-експериментального виробництва модифікованих жирів

Для підтвердження ефективності розроблених технологічних і технічних рішень на дослідній установці за допомогою ферментної переестерифікації була вироблена дослідно-промислова партія замітника молочного жиру у кількості 200 кг на основі вітчизняної сировини згідно з розробленою в роботі рецептурою.

На Вінницькому та Одеському олійно-жирових комбінатах було проведено промислові випробування безперервної ферментної переестерифікації жирів, де було виготовлено 250 тон модифікованих жирів.

Метою випробувань було відпрацювання технологічних режимів та уточнення складу вихідних продуктів для одержання переетерифікованих жирів, що використовуються у виробництві маргарину та кондитерських виробів.

Розроблену для випробувань схему наведено на рис. 13.

Рис. 13. Схема безперервної переетерифікації жирів при промислових випробуваннях

Було застосовано реактор з нерухомим шаром ферменту, опорою для якого служить щільний екран. Для підтримки постійної температури теплоізолюваний реактор має електричну систему обігріву. Реактор і фермент для випробувань було надано фірмою Novozymes, Данія.

При випробуваннях вихідна суміш із ємності для сировини Є1 насосом Н через фільтр Ф1 подавалась у реактор Р через патрубок у його верхній частині. В міру проходження через шар ферменту суміш піддавалась переетерифікації і через патрубок у нижній частині реактора виходив вже готовий продукт, який через фільтр Ф2 потрапляв до ємності для продукту Є2, з якого він далі подавався на дезодорацію.

Уся сировина відповідала вимогам до рафінованих відбілених жирів. Робоча температура для переетерифікації знаходилась в межах від 65°C до 70°C.

У продуктах контролювалися значення кислотного числа, температури плавлення, твердості за Камінським при 15°C та вмісту твердого жиру за методом ЯМР при 10°C, 15°C, 20°C, 25°C та 30°C.

У результаті промислових випробувань встановлено можливість одержання модифікованих жирів із заданими властивостями шляхом ферментної переетерифікації.

Висока якість і відмінні показники отриманого за ферментною технологією замінника молочного жиру були засвідчені на дегустаціях, що проходили в рамках міжнародної виставки “Праздник масла и сыра - 2003” у Москві та 3-ої міжнародної спеціалізованої виставки “Масла и жиры” у Санкт-Петербурзі. Даний продукт був відзначений медалями й одержав високі характеристики від фахівців олійно-жирової і молочної промисловості.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена рішенням науково-практичної задачі побудування науково обґрунтованої ферментної технології модифікування жирів, що дає змогу отримати жири, схожі за структурою ацилгліцеринів на натуральні.

По результатам досліджень зроблені наступні висновки.

1. За результатами теоретичних і експериментальних досліджень вперше визначено кінетичні константи ферменту, продуцентом якого є мікроорганізм *Candida antarctica*, та знайдені раціональні умови його дії при модифікуванні рослинних жирів.

2. Підтверджено можливість використання ферментного препарату Ліпозим RM IM для модифікування рослинних жирів шляхом ацидолізу.

3. Знайдено раціональні умови використання ферментного препарату Ліпозим TL IM для модифікування жирів різного складу шляхом переетерифікації. Визначено математичну модель залежності ступеня перетворення вихідного компонента від часу.

4. Отримано математичні описи залежності складу і властивостей продуктів ферментної реакції від вихідної сировини.

5. Розроблено новий спосіб видалення жирних кислот із продуктів реакції переетерифікації та ацидолізу.

6. Встановлено зв'язок між розсіюванням жирами, що отверджено, монохроматичного випромінювання і масовою часткою в них твердої фази. На цій підставі запропоновано новий метод експрес-контролю процесу переетерифікації.

7. Розроблено вихідні рецептури для отримання ферментно переетерифікованих жирів.

8. У результаті дослідно-промислових і промислових випробувань встановлено можливість одержання модифікованих жирів із заданими властивостями шляхом ферментної переетерифікації. За новою технологією на Вінницькому та Одеському олійно-жирових комбінатах вироблено 250 тон переетерифікованих жирів. Економічний ефект від її впровадження дорівнює більш ніж 50 грн/т.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гладкий Ф.Ф., Чумак О.П., Гасюк Л.В., Некрасов П.О. Енергозберігаюча технологія одержання технічних ненасичених жирних кислот // Вісник Харківського державного політехнічного університету. – Харків: ХДПУ, 2000.– Вип. 98.– С. 16–18.

Здобувачем проведено експериментальні дослідження щодо одержання ненасичених жирних кислот шляхом гідролізу олії за допомогою ферменту рослинного походження, проаналізовано результати.

2. Гладкий Ф.Ф., Зінченко О.А., Богодіст О.Ю., Некрасов П.О.. Порівняльна характеристика активності ферментативних препаратів // Вісник Національного технічного університету “ХПІ”. – Харків: НТУ “ХПІ”, 2001.– №3. – С. 33–36.

Здобувачем визначено мету і напрямки дослідження, здійснено експерименти щодо ферментного гідролізу рослинних олій, виконано аналіз отриманих даних.

3. Гладкий Ф.Ф., Некрасов П.О., Гасюк Л.В. Перетворення жирів шляхом ферментативного ацидолізу // Вісник Національного технічного університету “ХПІ”. – Харків: НТУ “ХПІ”, 2002. – №9, т.2. – С. 39–42.

Здобувачем сплановано експеримент, здійснено дослідження щодо доведення можливості синтезу ацилгліцеринів заданого складу шляхом ферментного ацидолізу.

4. Некрасов П.О., Гладкий Ф.Ф. Одержання замітника молочного жиру за допомогою ферментативної переестерифікації // Вісник Національного технічного університету “ХПІ”. – Харків: НТУ “ХПІ”, 2003. – №11, т.2. – С. 70–73.

Здобувачем визначено напрямки дослідження, проведено низку експериментів щодо використання ферментної переестерифікації за участю препарату Ліпозим TL ІМ для виробництва замітника молочного жиру.

5. Некрасов П.О. Модифікування жирів шляхом ензимної переестерифікації // Вопросы химии и химической технологии. – Дніпропетровськ: Укр. держ. хім.-техн. ун-т, 2004. – №1. – С. 89–91.

6. Некрасов П.О., Гладкий Ф.Ф. Ферментна переестерифікація жирів // Харчова і переробна промисловість. – Київ, 2004. – №1. – С. 24–25.

Здобувачем визначено методику дослідження кінетики ферментної переестерифікації, здійснено експерименти, проаналізовано результати, знайдено раціональний вміст біокатализатору для періодичних умов реакції.

7. Некрасов П.О. Отримання жирів для маргарину за допомогою ферментативної переестерифікації // Тези доповідей учасників I Всеукр. наук-практ. конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Біотехнологія. Освіта. Наука”. – К.: ІВЦ “Видавництво “Політехніка””, 2003. – С. 59–60.

АНОТАЦІЇ

Некрасов П.О. Ферментна технологія модифікування жирів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 05.18.06 – технологія жирів, ефірних масел і парфумерно-косметичних продуктів. – Національний технічний університет “Харківський політехнічний інститут” Міністерства освіти і науки України, Харків, 2004.

Дисертацію присвячено розробленню науково обґрунтованої ферментної технології модифікування жирів.

Доведено підпорядкованість дії ферменту, продуцентом якого є мікроорганізм *Candida antarctica*, кінетиці Міхаеліса-Ментен та знайдено відповідні кінетичні константи. Визначено раціональні умови дії ферментних препаратів Новозім 398 та Ліпозим TL ІМ при модифікуванні жирової сировини. Підтверджено можливість використання ферментного препарату Ліпозим RM ІМ для модифікування рослинних жирів шляхом ацидолізу. Досліджено кінетику ферментної переестерифікації та визначено математичну модель залежності ступеня перетворення вихідного компонента від часу. Встановлено кількісні залежності складу та властивостей продуктів ферментної переестерифікації від складу вихідної сировини. На основі визначених закономірностей створено технологію модифікування жирів за допомогою ферментів та рецептури ферментно переестерифікованих жирів. Одержано комплекс даних щодо органолептичних і фізико-хімічних характеристик отриманих модифікованих жирів.

У результаті дослідно-промислових і промислових випробувань встановлено можливість одержання модифікованих жирів із заданими властивостями шляхом ферментної переестерифікації. За новою технологією на Вінницькому та Одеському олійно-жирових комбінатах вироблено 250 тон переестерифікованих жирів. Економічний ефект від її впровадження дорівнює більш ніж 50 грн/т.

Ключові слова: ліполітичні ферменти, гідроліз, ацидоліз, переестерифікація, модифіковані жири, кінетика ферментних реакцій.

Некрасов П.А. Ферментная технология модифицирования жиров. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 05.18.06 – технология жиров, эфирных масел и парфюмерно-косметических продуктов. – Национальный технический университет “Харьковский политехнический институт” Министерства образования и науки Украины, Харьков, 2004.

Диссертация посвящена разработке научно обоснованной ферментной технологии модифицирования жиров.

На основе анализа научно-технической литературы показана актуальность изучения липолитических ферментных препаратов, целесообразности их применения в масложировой отрасли и нахождения рациональных условий действия биокатализаторов при модифицировании характерного для украинских предприятий сырья.

Установлено соответствие действия продуцируемого микроорганизмом *Candida antarctica* фермента кинетике Михаэлиса-Ментен. На основе современных методов обработки

экспериментальных данных были определены константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции для указанного биокатализатора. Их значения соответственно равны $7,2 \cdot 10^{-3}$ моль/л и 50 мкмоль/мин. Найдены рациональные условия действия ферментного препарата Новозим 398: температура – 36°C–38°C, pH среды – 7–9.

Экспериментально подтверждена возможность использования ферментного препарата Липозим RM IM для модификации растительных жиров путем ацидолиза.

Найдены рациональные условия проведения переэтерификации жиров под действием ферментного препарата Липозим TL IM. Комплексный анализ проведенных исследований по переэтерификации модельных смесей тристеарина и тримиристина показал, что для периодических условий проведения реакции использование более 10% биокатализатора от суммарной массы жировой смеси не является целесообразным. Наибольшая степень превращения достигается в температурном интервале проведения реакции 65°C–75°C. Исследована кинетика ферментной переэтерификации и определена математическая модель зависимости степени превращения исходного компонента от времени. Найденные значения константы скорости и начальной скорости реакции под действием Липозим TL IM составили соответственно $0,0212 \text{ мин}^{-1}$ и 2,854 ммоль/мин. Путем проведения серии ферментных переэтерификаций смесей пальмового стеарина и кокосового масла доказана возможность многократного использования препарата Липозим TL IM. Определены количественные зависимости состава и свойств продуктов ферментной переэтерификации от состава исходного сырья. На основе проведенных исследований создана технология модифицирования жиров с помощью ферментов и разработаны рецептуры ферментно переэтерифицированных жиров с заданными технологическими характеристиками.

В результате опытно-промышленных и промышленных испытаний установлена возможность получения модифицированных жиров с заданными характеристиками путем ферментной переэтерификации. По новой технологии на Винницком и Одесском масложировых комбинатах изготовлено 250 тонн переэтерифицированных жиров. Экономический эффект от её внедрения составляет более 50 грн/т. Высокое качество и отличные показатели жировых продуктов, полученных по ферментной технологии, были засвидетельствованы на дегустациях, проходящих в рамках международных выставок в Москве и Санкт-Петербурге.

Ключевые слова: липолитические ферменты, гидролиз, ацидолиз, переэтерификация, модифицированные жиры, кинетика ферментных реакций.

Thesis for a candidate degree of technical sciences by speciality 05.18.06 –technology of fats, essential oils and perfume-cosmetic products.– National Technical University “Kharkov Polytechnic Institute” of Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkov, 2004.

The dissertation is devoted to the making of the scientific proved enzyme technology of fats modification.

It was proved that the action of enzyme from *Candida antarctica* obeys Michaelis–Menten kinetics. The appropriate kinetic constants were found. The efficient operation conditions were determined for the action of enzymatic preparations Novozym 398 and Lipozyme TL IM for fat stock modification. The possibility of application of enzymatic preparation Lipozyme RM IM for fats modification by means of acidolysis was vindicated. The enzymatic interesterification kinetics was investigated and the mathematical model of dependence of source component conversion degree on time was elaborated. The quantitative dependences of composition and characteristics of enzymatic interesterified products on feedstock composition were determined. On basis of regularities obtained the technology of fats modification using enzymes and the recipes of enzymatic interesterified fats were developed. The data complex was determined concerning organoleptic and physical-chemical characteristics of modified fats obtained.

As a consequence of experimental-industrial and industrial tests the possibility of production of modified fats with predetermined characteristics by means of enzymatic interesterification was ascertained. According to the new technology 250 tons of interesterified fats were produced at Vinnitskiy and Odesskiy fat-and-oil industrial complexes. The economic effect of its application amounts to 50 grn/t and more.

Key words: lipolytic enzymes, hydrolysis, acidolysis, interesterification, modified fats, enzymatic reactions kinetics.