

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
“ХАРКІВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ”

Богодіст-Тимофєєва Олена Юрїївна

УДК 665.347.8:665.37:577.152.31

**УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ГІДРАТАЦІЇ
СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ ФОСФОЛІПАЗ**

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

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Харків – 2005

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

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

кандидат технічних наук
Любченко Владислав Владиславович
Інститут сільського господарства Полісся,
м. Житомир, завідувач лабораторією переробки хмелю та інших культур

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

Захист відбудеться “ 09 ” червня 2005 р. о 14⁰⁰ 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 07.05.2005 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Тимченко В.К.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми Стратегічним напрямком у розвитку олійно-жирової промисловості є використання ферментних технологій. Вони забезпечують збереження енергетичних і матеріальних ресурсів, сприяють скороченню кількості відходів і небажаних продуктів. Використання ферментних препаратів фосфоліпаз у гідратації соняшникової олії дає змогу отримати високоякісні продукти: очищену олію та фосфатидний концентрат з поліпшеними властивостями, що містить гідролізовані фосфоліпіди, а також знизити витрати сировини й тим самим підвищити ефективність виробництва.

Застосування фосфоліпаз для гідратації олії дозволить вирішити також проблему щодо виробництва ефективних фосфоліпідних харчових добавок, у тому числі для випікання хліба. Такі продукти на основі соєвих фосфоліпідів вже з'явилися на світовому ринку. В Україні такого виробництва немає, тому створення технології, що забезпечує отримання гідролізованих фосфоліпідів на базі вітчизняної сировини – соняшникової олії – є актуальним.

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. Як виконавець здобувач проводив дослідження в рамках держбюджетної роботи “Дослідження перетворень речовин, супутніх жирам, за допомогою ензимів” (МОН України, №ДР 0102U000982) та 2-х госпдоговорів: з розробки ферментних технологій майонезу й гідратації олії (ЗАТ “Пологівський ОЕЗ”, м. Пологи) та переетерифікації жирів і гідратації олії (УНДІ олій та жирів, м. Харків).

Мета і задачі дослідження Метою дисертаційної роботи є удосконалення технології гідратації соняшникової олії, розроблення способу отримання фосфатидного концентрату з поліпшеними властивостями.

У зв'язку з цим було поставлено задачі:

- визначити кінетичні закономірності та ефективні умови дії препаратів фосфоліпази A₁ Lecitase Novo і Lecitase Ultra, продуцентом яких є мікроорганізм *Aspergillus oryzae*;
- виявити та порівняти умови дії різних препаратів фосфоліпаз щодо гідролізу фосфоліпідів, вилучених із соняшникової олії;
- установити функціональні властивості модифікованих (гідролізованих) фосфоліпідів, що вилучено із соняшникової олії;
- визначити умови застосування ферментних препаратів у технології гідратації соняшникової олії.

Об'єкт дослідження – технологія ферментативної гідратації соняшникової олії, технологія ферментативного модифікування фосфоліпідів.

Предмет дослідження – препарати фосфоліпаз, соняшникова олія, фосфоліпіди соняшникової олії, фосфатидний концентрат.

Методи дослідження – вміст фосфоліпідів у вихідній і гідратованій олії визначався колориметричним методом; фракційний склад фосфоліпідів встановлювався за допомогою тонкошарової хроматографії; жирнокислотний склад фосфоліпідів визначався методом газо-рідинної хроматографії метилових ефірів; фізико-хімічні та органолептичні властивості олій, фосфоліпідів та продуктів на їх основі визначалися за стандартними методиками; седиментаційний аналіз суспензії “гідратована олія - фосфоліпіди” проводився з використанням спеціального приладу М.О. Фігуровського; оброблення результатів експериментів здійснювалося методами математичної статистики; визначення раціональних умов ферментативної гідратації соняшникової олії базувалося на методах центрального композиційного рототабельного планування (ЦКРП).

Наукова новизна одержаних результатів

- вперше виявлено вибірковість дії препаратів фосфоліпази A₁ (Lecitase Novo і Lecitase Ultra) на певні фракції фосфоліпідів, що містяться у соняшниковій олії та фосфатидному концентраті, а саме на фосфатидилхоліні, фосфатидилетаноламіні і фосфатидні кислоти;
- вперше встановлено кінетичні характеристики означених фосфоліпазних препаратів (константа Міхаеліса і максимальна швидкість реакції);

- визначено ефективні умови ферментативного процесу гідратації соняшникової олії з отриманням математичної моделі, а також умови модифікування фосфоліпідів соняшникової олії;
- визначено функціональні властивості модифікованих фосфоліпідів, що вилучено із соняшникової олії.

Практичне значення одержаних результатів Розроблено технологію ферментативної гідратації соняшникової олії з використанням сучасних ферментних препаратів фосфоліпаз. Показано можливість отримання модифікованих фосфоліпідів не тільки у разі гідратації, але й шляхом модифікування фосфоліпідів у складі побічного продукту гідратації олії за звичайною технологією – фосфатидного концентрату. На основі досліджень функціональних властивостей модифікованих фосфоліпідів показана можливість їх використання у виробництві низькожирних майонезів і хлібопеченні.

Розроблена технологія гідратації соняшникової олії пройшла промислові випробування на ЗАТ “Пологівський ОЕЗ”.

Особистий внесок здобувача. Всі основні положення дисертаційної роботи, що винесено на захист, отримані здобувачем особисто. Серед них: реалізація науково-дослідних задач при розробленні ферментативних технологій гідратації соняшникової олії і модифікування фосфоліпідів; аналіз та обґрунтування отриманих результатів; формулювання висновків. Здобувачем відпрацьовано технологічний процес гідратації соняшникової олії з використанням сучасних ферментних препаратів та доведено його до рівня промислових випробувань.

Апробація результатів дисертації Результати дисертаційної роботи були представлені на X та XI Міжнародних науково-практичних конференціях “Інформаційні технології: наука, техніка, технологія, освіта, здоров’я” (м. Харків, 2002, 2003 рр.), Першій обласній конференції молодих науковців “Тобі Харківщино – пошук молодих” (м. Харків, 2002 р.), I Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених “Біотехнологія. Освіта. Наука” (м. Київ, 2003 р.), Міжнародному науково-технічному семінарі “Ферментні технології модифікування жирів” (м. Харків, 2003 р.), Міжнародній науково-технічній конференції “Розроблення та виробництво продуктів функціонального харчування, інноваційні технології та конструювання обладнання для перероблення сільгоспсировини, культура харчування населення України” (м. Київ, 2003 р.), Третій міжнародній конференції “Масложировая промышленность Украины: состояние, перспективы, технологии” (м. Київ, 2004 р.), Науково-технічній конференції “Біотехнологія, біотехніка, харчова технологія” (м. Харків, 2004 р.).

Публікації Результати дисертації опубліковано у 5 статтях, з них – 4 статті у фахових виданнях, 2 тезах наукових конференцій.

Структура і обсяг дисертації Дисертація складається із вступу, 5 розділів, висновків та 2 додатків. Повний обсяг дисертації 136 сторінок; з них 27 ілюстрацій по тексту, 6 на 3 сторінках, 20 таблиць; 2 додатки на 4 сторінках, список використаних джерел із 174 найменувань на 17 сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

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

У першому розділі “Огляд літератури і вибір напрямків досліджень” наведено аналітичний огляд науково-технічної інформації закордонних та вітчизняних авторів щодо сучасних тенденцій у галузі гідратації рослинних олій і отримання фосфоліпідвмісних продуктів. Виявлено, що останнім часом асортимент фосфоліпідних добавок дуже урізноманітнівся. Показано, що на цей час біокаталітичні процеси почали широко впроваджуватися в технології жирів, це стосується і гідратації рослинної олії й перетворень фосфоліпідів. Розглянуто фосфоліпази, що використовуються при модифікуванні фосфоліпідів, джерела їх одержання та властивості. Проаналізовано особливості ферментативного гідролізу фосфоліпідів. На основі аналізу літературних джерел вибрано основні напрямки досліджень.

У другому розділі “Методи й способи досліджень” наведено загальний план робіт з гідратації соняшникової олії та модифікування фосфоліпідів з використанням ферментів; перелік речовин, що

використовувалися в експериментальних дослідженнях; характеристики речовин, що є предметом досліджень; методи дослідження ферментних препаратів, вихідної сировини, одержаних продуктів та їх властивостей.

Метод дослідження ступеня перетворення фосфоліпідів базується на визначенні титрометричним способом кількості продуктів реакції гідролізу, а саме жирних кислот.

Кількість фосфоліпідів в олії (у перерахуванні на стеароолеолецитин) визначалася відповідно ГОСТ 7824 – 80 колориметричним способом, кислотне число олії – за ГОСТ 5476 - 80.

Фракційний склад фосфоліпідів, що містяться в олії, фосфатидній емульсії, а також у фосфатидному концентраті, аналізувався шляхом тонкошарової хроматографії (на пластинках НРТLC Silicagel G60, фірми “Merck”, Германія, і Silufol UV254, Чехія). Попередньо зі зразків видаляли олію і вологу (за наявності) методом ацетонової екстракції, потім екстрагували фосфоліпіди хлороформ-метанольною сумішшю. Ідентифікацію фракцій проводили за допомогою спеціальних кольорових реакцій на полярні групи, а також у порівнянні зі стандартами. Як стандарти використовували фосфоліпіди виробництва фірми “Sigma”, США.

Жирнокислотний склад фосфоліпідів вихідних і модифікованих фосфатидних концентратів визначався з використанням методу газо-рідинної хроматографії метилових ефірів кислот на хроматографі Carlo Erba (Італія).

Поверхневий натяг водних розчинів фосфоліпідів, як таких і модифікованих, визначали напівстатистичним методом Дю-Нуї (відриву кільця) відносно до поверхневого натягу води при даній температурі експерименту. Піноутворююча здатність оцінювалася за методом взбовтування. Емульгуюча здатність визначалася за ТУ 25660944.009-2003.

Виготовлення низькожирних майонезів, випікання та визначення органолептичних і фізико-хімічних показників хліба з використанням модифікованих і немодифікованих фосфоліпідів проводили згідно рекомендованим методикам.

Дослідження впливу температури на процес відділення фосфатидної емульсії від гідратованої олії визначався шляхом седиментаційного аналізу на спеціальному приладі М.О. Фігуровського.

Методом математичного планування експериментів (ЦКРП) отримано математичну модель ферментативної гідратації соняшникової олії і визначено ефективні умови проведення процесу. Оброблення результатів експериментів здійснювалося методами математичної статистики.

У третьому розділі “Дослідження модифікування фосфоліпідів” були здійснені експерименти щодо визначення кінетичних характеристик фосфоліпаз, вивчення умов ферментативного гідролізу фосфоліпідів, що вилучено із соняшникової олії, складу і властивостей отриманих продуктів реакції.

Сучасні ферментні препарати, Lecitase Novo і Lecitase Ultra, продуцентом яких є мікроорганізм *Aspergillus oryzae*, відносяться до одного класу (фосфоліпази A_1), проте їхня активність за інструкцією фірми-виробника “Novozymes” визначається по-різному, з використанням різних субстратів, що не дає можливості порівняти характер їхньої дії. У зв’язку з цим було визначено кінетичні характеристики ферментних препаратів: максимальна швидкість реакції (V_{max}) і константа Міхаеліса (K_m) з використанням одного субстрату – ячного фосфатидилхоліну. Кінетичні характеристики кількісно визначають активність ферментного препарату. Їх було знайдено в умовах, що наближені до оптимальних і визначені за попередніми експериментами (температура $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6$). Графічне визначення характеристик (V_{max} і K_m) зображено на рис. 1-2.

Результати досліджень виявили, що препарат Lecitase Ultra мав більшу каталітичну активність за Lecitase Novo: максимальна швидкість реакції за його участю майже в двічі більша, $4,85\text{ ммоль/хв.}$ проти $2,97\text{ ммоль/хв.}$; константи Міхаеліса склали відповідно для Lecitase Novo і Lecitase Ultra $0,76$ і $0,75\text{ моль/л.}$

Дослідження впливу температури на ступінь гідролізу із фосфоліпазами дозволили визначити й інші кінетичні характеристики реакції: константу швидкості і енергію активації при різних температурах. Константа швидкості визначалася за формулою:

$$k = \frac{1}{\tau} \cdot \ln \frac{KЧ}{KЧ_0}, \quad (1)$$

Енергія активації:

$$Ea = R \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_2 - T_1} \cdot \ln \left(\frac{k_{T2}}{k_{T1}} \right), \quad (2)$$

де τ – час реакції, с; $KЧ$ – кислотність продукту реакції, мгКОН/г; $KЧ_0$ – кислотність фосфатидилхоліну на початку реакції, мгКОН/г; R – газова постійна, Дж/(моль*К); k_{T1} і k_{T2} – константи швидкості, s^{-1} , що знайдено за рівнянням (1), при різних температурах реакції $T1$ і $T2$ (К). Результати розрахунків констант швидкості реакції і енергії активації наведено у табл. 1.

Більші значення констант швидкості реакції і менші енергії активації реакції гідролізу з препаратом Lecitase Ultra підтвердили його більшу каталітичну ефективність порівняно із Lecitase Novo.

Таблиця 1.

Кінетичні параметри реакції ферментативного гідролізу

фермент	Константа швидкості реакції, $s^{-1} \cdot 10^3$				Енергія активації, кДж/моль		
	293 К	303 К	313 К	323 К	293/303	303/313	313/323
Lecitase Ultra	3,52	3,61	3,82	3,43	1,7	4,5	9,0
Lecitase Novo	2,98	3,06	3,29	2,75	2,0	5,7	15

Щоби перейти до вивчення процесу ферментативної гідратації соняшникової олії, необхідно було визначити вплив ферментів і умови їхньої дії на комплекс фосфоліпідів, що вилучено із соняшникової олії. Тому подальші дослідження присвячені гідролізу фосфатидного концентрату з використанням фосфоліпазних препаратів, як у розчиннику так і без нього.

Показано можливість проведення ферментативного гідролізу з використанням розчиннику (діетиловий ефір). Виявлено, що в продукті реакції після відділення жирних кислот і залишків олії міститься близька 40 % лізофосфоліпідів. Для цих дослідів використано фосфоліпазний препарат тваринного походження – Lecitase 10L. Він має певні недоліки: потребує додавання активатора (іонів кальцію), має обмежену сировинну базу. Ферментні препарати мікробного походження не мають таких вад. Тому для подальших досліджень обрані саме вони (Lecitase Novo і Lecitase Ultra).

При вивченні модифікування фосфатидного концентрату із ферментними препаратами Lecitase Novo і Lecitase Ultra у водному середовищі в лабораторних умовах досліджено характер впливу таких факторів як кількість води, ферментного препарату, тривалість реакції і визначено їхні ефективні значення: кількість води – 30 %, кількість препарату фосфоліпази – 0,3 %, тривалість реакції – 3 години. Виявлено, що ферментні препарати одного класу (фосфоліпази A_1) діють в однакових ефективних умовах, але з різною активністю, що підтвердило попередні досліди з ячним фосфатидилхоліном.

Методом тонкошарової хроматографії було досліджено зміну складу фосфоліпідів фосфатидних концентратів під впливом Lecitase Novo і Lecitase Ultra (рис. 3-4).

На рис. 3-4: ФХ – фосфатидилхоліни, ФЕА – фосфатидилетаноламіни, ФК – фосфатидні кислоти, ЛФХ – лізофосфатидилхоліни, ЛФЕА – лізофосфатидилетаноламіни, ЛФК – лізофосфатидні кислоти, Ін – інші фосфоліпіди.

Хроматографічний аналіз фракційного складу фосфоліпідів (рис. 3-4) визначив, що кількість фосфатидилхолінів, фосфатидилетаноламінів і фосфатидних кислот при ферментативному модифікуванні зменшилася, а кількість відповідних лізоформ збільшилася, що свідчить про

вибіркову специфічність фосфоліпаз. Загальна кількість лізофосфоліпідів збільшилася у випадку з Lecitase Novo з 22,9 до 55,4 %, у випадку з Lecitase Ultra з 21,3 до 51,8 %, тобто більш ніж в 2,4 раза.

Жирнокислотний склад фосфоліпідів фосфатидних концентратів, як таких (КЧ = 19,6 мгКОН/г) і модифікованих (КЧ = 31,5 мгКОН/г) з використанням Lecitase Ultra, досліджено шляхом газо-рідинної хроматографії метилових ефірів кислот (табл. 2).

Таблиця 2.

Жирнокислотний склад фосфоліпідів

Жирні кислоти (ЖК)	Масова частка ЖК, % до загальної кількості,	
	вихідних ФЛ	МФЛ
Насичені,	33,13	29,66
у тому числі міристинова	0,14	0,12
пальмітинова	23,72	20,48
стеаринова	6,04	5,41
арахінова	0,39	0,53
Ненасичені,	66,87	70,34
у тому числі олеїнова	13,64	13,61
лінолева	48,47	52,73
ліноленова	0,07	0,18
арахідонова	3,23	2,44

Як видно з табл. 3, баланс насичених і ненасичених кислот фосфоліпідів при ферментативному модифікуванні дещо змінюється: кількість насичених кислот зменшується. Це підтверджує, що фермент Lecitase Ultra виявляє фосфоліпазну активність щодо ацилів першого положення молекули фосфоліпідів, а ні щодо другого, в якому переважно знаходяться ненасичені кислоти.

Зміна фосфоліпідного складу фосфатидного концентрату при модифікуванні, а саме збільшення кількості лізоформ, дозволила припустити, що також зміняться і його певні фізико-хімічні властивості (як емульгатора). Для цього визначено функціональні властивості водних розчинів модифікованих і немодифікованих фосфоліпідів, що були отримані шляхом знежирення ацетоном зразків відповідних фосфатидних концентратів.

На рис. 5 наведено результати досліджень поверхневого натягу (σ) водних розчинів фосфоліпідів концентрацією (C , кг/м^3) менш $0,8 \text{ кг/м}^3$ на межі з повітрям. На цьому інтервалі концентрацій фосфоліпіди утворюють колоїдний розчин. Обидва зразки мають дві критичні концентрації утворення (перетворення) адсорбційного шару: ККП_{σ_1} . (точки "а" і "б") і ККП_{σ_2} (точки "в" і "г"); при низьких концентраціях фосфоліпідів поверхневий натяг розчинів близький до поверхневого натягу води. Після ККП_{σ_1} поверхневий натяг починає значно зменшуватися до певній межі при ККП_{σ_2} , після якої значення натягу змінюється повільніше. З рис. 5 видно, що на обраному інтервалі концентрацій модифіковані фосфоліпіди мають нижче за вихідну речовину значення поверхневого натягу.

Порівняння властивостей піни, що утворюють водні розчини обох зразків фосфоліпідів в інтервалі концентрацій $0,95 - 10 \text{ кг/м}^3$, виявило більшу піноутворюючу здатність гідролізованих фосфоліпідів протягом обраного інтервалу концентрацій. Порівняння емульгуючих властивостей знежирених зразків фосфоліпідів показало, що вони обидва сприяють утворенню низькожирних емульсій прямого типу (30 % олії і 70 % води), а не високожирних (70 % олії і 30 % води), проте низькожирна емульсія з модифікованими фосфоліпідами більш стійка.

Результати визначення фізико-хімічних властивостей знежирених зразків фосфоліпідів наведено у табл. 3. Визначено, що запропонований спосіб ферментативного гідролізу фосфоліпідів призводить до збільшення його поверхнево-активних і піноутворюючих властивостей.

Фізико-хімічні показники знежирених фосфоліпідів

Показник	Вихідні ФЛ	Модифіковані ФЛ
Поверхневий натяг, Н/м*10 ³ , при ККП _{σ1} ; при ККП _{σ2}	58,0 50,14	52,9 39,59
Поверхнева активність, Н·м ³ /(м·кг), при ККП _{σ2}	60	170
Піностійкість, %	98-99	98-99
Кількість піни, % (при C _{ФЛ} =10 кг/м ³)	7,8	12
Стійкість емульсії, %, 30 % олії + 70 % води 70 % олії + 30 % води	92,8 1,1	99,0 0,6

За результатами визначення функціональних властивостей фосфоліпідів виготовлено низькожирні майонези за типовою рецептурою із заміною яєчного порошку на знежирені фосфоліпідні у меншій кількості (у 2 рази). Стійкість майонезів із додаванням вихідних і гідролізованих фосфоліпідів склала відповідно 95,8 і 96,8 %.

Ефективність запропонованої добавки підтвердило порівняння органолептичних і фізико-хімічних властивостей випеченого хліба з використанням фосфоліпідів як таких і модифікованих (у вигляді фосфатидної емульсії). Хліб з додаванням модифікованих фосфоліпідів мав більшу вологоутримуючу здатність як при випіканні, так і при збереженні виробу, кращі формостійкість, пористість й органолептичні показники.

У четвертому розділі “Дослідження технології гідратації соняшникової олії” були здійснені експерименти щодо визначення умов процесу гідратації олії.

Встановлено необхідність попереднього оброблення олії перед уведенням ферменту органічною кислотою – цитриною. Додавання кислоти потребує подальшої нейтралізації лугом (гідроксидом натрію) до ефективного рівня рН, що знайдено раніше (розділ 3), і вже потім можливе введення ферменту. У “холостому” експерименті ферментативної гідратації із заміною розчинів цитринової кислоти і гідроксиду натрію на воду у тій самій кількості видалено фосфоліпідів (ФЛ) 39,7 % (на загальну кількість ФЛ) проти 96,6 % при ферментативній гідратації з використанням цих розчинів. Ефективна кількість водної фази, яка складається з розчинів цитринової кислоти і гідроксиду натрію, знаходиться близько 1 %.

Доведено, що спосіб отримання олії суттєво не впливає на ступінь видалення фосфоліпідів. Для цього в однакових умовах було очищено олію нерафіновану (кількість ФЛ = 0,28 %), пресову (ФЛ = 0,63 %) і екстракційну (ФЛ = 0,81 %), залишкова кількість ФЛ у гідратованій олії склала 0,03 - 0,06 %.

Для визначення ефективних умов, що близькі до оптимальних, процесу ферментативної гідратації соняшникової олії з ефективним фосфоліпазним препаратом Lecitase Ultra, необхідно було розробити математичну модель очищення певної олії. Головні параметри ферментативної гідратації: кількість реагентів (водної фази, ферменту), температура, рівень рН та тривалість ферментативної реакції.

Для експериментів обрано соняшкову олію з кількістю ФЛ = 0,16 %. Для математичного моделювання технології гідратації застосовано метод центрального композиційного

рототабельного планування. У якості функції відгуку Y обрано кількість фосфоліпідів у гідратованій олії. Незмінними вихідними даними, що були визначені раніше, прийнято: кількість водної фази – близько 1 %; $pH = 6$.

Спочатку експериментально було визначено межу варіювання параметрів реакції: температура і тривалість ферментативного оброблення, кількість ферментного препарату Lecitase Ultra.

При визначенні межі варіювання температури процесу ферментативної реакції (час реакції – 2 год., кількість фосфоліпази – 0,005 %) температуру гідратації змінювали з $30^{\circ}C$ до $50^{\circ}C$ з інтервалом $5^{\circ}C$. Як свідчать отримані дані, ефективна температура знаходиться у обраному діапазоні і близька до $40^{\circ}C$.

При дослідженні зміни кількості ФЛ на протязі ферментативної реакції при $40-45^{\circ}C$ (кількість фосфоліпази – 0,005 %) відбирали проби кожну годину, реакція тривала 6 годин. За результатами експериментів, вже після години реакції залишкова кількість ФЛ у гідратованій олії знижується близько до 0,05 % і потім майже не змінюється.

При дослідженні впливу кількості ферменту ($40-45^{\circ}C$) гідратацію проводили з додаванням препарату від 0,001 % мас. до 0,007 % мас. (по відношенню до олії) з кроком 0,002 % мас. Аналіз залежності залишкової кількості ФЛ в гідратованій олії від кількості уведеного ферменту показав, що ефективна кількість препарату знаходиться в діапазоні 0,003 % - 0,007 % мас.

В наслідок проведених досліджень для отримання математичної моделі ферментативної гідратації соняшникової олії методом ЦКРП обрано такі інтервали варіювання: X_1 – час ферментативної реакції, год., від 1 до 5 год.; X_2 – температура процесу, $^{\circ}C$, від 30 до $50^{\circ}C$; X_3 – кількість препарату Lecitase Ultra, % мас. (на олію), від 0,002 до 0,008 %. Тобто кількість факторів $n = 3$, що означає: загальна кількість експериментів $N = 20$, кількість експериментів у центрі плану $N_0 = 6$.

Для усунення випадкових похибок експерименти проведено у двох паралелях. Статистичне оброблення даних експерименту і оптимізація отриманої математичної моделі зроблено з використанням пакету програм Microsoft Excel.

За математичним обробленням результатів експериментів визначені значимі коефіцієнти рівняння регресії (за умовою, що при числі ступенів свободи $f_0 = N_0 - 1 = 5$ та довірчої імовірності $p = 0,95$ значення критерію Стьюдента $t = 2,57$) і отримано рівняння, що адекватно описує процес ферментативної гідратації соняшникової олії, у фізичних величинах:

$$Y_{\phi} = 0,17005 - 0,0195 \cdot X_1 - 0,00664 \cdot X_2 + 22,34 \cdot X_3 + 0,002075 \cdot X_1^2 + 0,000083 \cdot X_2^2 - 2233,29 \cdot X_3^2 \quad (3)$$

де X_1 – тривалість реакції, год.;

X_2 – температура реакції, $^{\circ}C$;

X_3 – кількість препарату Lecitase Ultra, % мас.

З рівняння (3) знайдено ефективні умови дії препарату фосфоліпази Lecitase Ultra при гідратації соняшникової олії:

$$X_1 = 4 \text{ год. } 45 \text{ хв.}; \quad X_2 = 40^{\circ}C; \quad X_3 = 0,005 \text{ \% мас.}$$

Таким чином, була отримана математична модель технології очищення соняшникової олії, а також знайдені значення ефективних параметрів певного процесу у лабораторних умовах.

Визначено, що протягом ферментативної гідратації кислотне число гідратованої соняшникової олії збільшується на 0,1-0,3 мгКОН/г. Це збільшення не корелюється з кількістю видалення фосфоліпідів. Припущено, що таке відбувається в наслідок вибіркового гідролізу фосфоліпідів або завдяки використанню цитринової кислоти.

Дослідження впливу температури на відділення фосфатидної емульсії від гідратованої олії після ферментативної гідратації визначили, що ефективною є температура близько $80^{\circ}C$ (рис. 6). За цією температурою гідратовані фосфоліпіди не перерозчиняються в олії. Тоді як пластівці фосфоліпідів після гідратації з використанням цитринової кислоти розчиняються при $80-90^{\circ}C$.

Ефективність розділення суміші після ферментативної гідратації при різних температурах визначалася порівнянням величини деформації ваг приладу М.О. Фігуровського (мм), що прямо пропорційна кількості фосфоліпідів на чашці ваг, за певний час (30 хв).

Методом тонкошарової хроматографії визначено вплив ферментних препаратів фосфоліпаз А₁ (на прикладі Lecitase Novo) на фракції фосфоліпідів при ферментативній гідратації. Аналіз проведено (табл. 4) для двох зразків олії з отриманням відповідно двох фосфатидних емульсій (ФЕ).

Результати досліджень показали, що під впливом ферментів означеного класу збільшується кількість лізофосфатидилхолінів, лізофосфатидилетаноламінів і утворюються лізофосфатидні кислоти, кількість фосфатидилхолінів, фосфатидилетаноламінів і фосфатидних кислот зменшується, що знов підтвердило субстратну вибірковість фосфоліпаз.

Таблиця 4.

Склад фосфоліпідів вихідної олії та вилученої фосфоліпідної емульсії

Група фосфоліпідів	Сира олія		ФЕ	
	№1	№2	№1	№2
фосфатидилхолін	22,6	46,6	12,3	23,2
фосфатидилетаноламін	15,6	12,7	не ідент.	
лізофосфатидилхолін	12,3	11,2	38,0	23,0
лізофосфатидилетаноламін			22,3	24,2
фосфатидна кислота	15,5	5,0	18,8	2,5
лізофосфатидна кислота	-	-	5,5	10,3
інші фосфоліпіди	34,0	24,5	3,1	16,8

У п'ятому розділі “Розроблення технології ферментативної гідратації соняшникової олії” запропоновано періодичну і безперервну технології гідратації олії.

Ферментативну гідратацію соняшникової олії на прикладі використання Lecitase Novo проведено на існуючому устаткуванні підприємства “Пологівський ОЕЗ”. У періодичних умовах було очищено дві партії пресової соняшникової олії по 6 м³. Функціональну схему випробувань наведено на рис. 7.

Сиру соняшкову олію очищали від механічних домішок на фільтрі Ф, нагрівали у теплообмінниках Т1-Т2 до температури 70 °С і подавали в апарат Р, де підтримувалася постійна температура. Розчини цитринової кислоти, гідроксиду натрію і ферменту з ємностей Є2-Є4 дозуючим пристроєм подавали в цей апарат через насос Н2, який перекачував суміш з апарату в цей же апарат. Перед уведенням гідроксиду натрію суміш охолоджували у пластинчатому теплообміннику Т3 до 40-45 °С.

По закінченні ферментативної реакції суміш підігрівали у теплообміннику Т4 і розділяли на сепараторі СП на фосфатидну емульсію і гідратовану олію. Олію висувували на вакуум-сушильній установці ВС. Фізико-хімічні властивості вихідної і гідратованої олії наведено у табл. 5.

Таблиця 5.

Фізико-хімічні властивості олії

Найменування показника	Вихідна олія		Суха гідратована олія	
	№1	№2	№1	№2

кислотне число, мгКОН/г	2,4	2,7	3,0	2,8
перекісне число, ммоль 1/2O ₂ /г олії	3,0	4,2	7,1	4,2
масова частка фосфоліпідів, %	0,72	0,63	0,08	0,06
масова частка вологи і летких речовин, %	0,19	0,25	0,05	0,08

Промислові випробування показали, що фермент сприяє задовільному видаленню фосфоліпідів із соняшникової олії. Результати аналізу отриманих фосфатидних емульсій виявили, що при цьому способі гідратації відходи олії значно зменшилися: кількість олії у фосфатидній емульсії склала близько 20 % (у перерахуванні на суху речовину) проти 50-60 % у фосфатидному концентраті, що отримано за звичайною схемою.

Безперервний спосіб ферментативної гідратації соняшникової олії (рис. 8) пропонується проводити таким чином.

Гарячу сиру соняшкову олію змішують із розчином цитринової кислоти (ЦК) і витримують 20-30 хв. Потім суміш охолоджують і послідовно змішують із розчином гідроксиду натрію й ферментом.

Ферментативну реакцію проводять у системі реакторів, що з'єднані послідовно і в яких підтримується певна температура процесу і постійне перемішування.

По закінченні реакції суміш нагрівають у теплообміннику і розділяють на сепараторі. Далі гідратована олія та фосфатидна емульсія обробляються за звичайною схемою.

Проведення ферментативної гідратації соняшникової олії дозволяє проводити її подальше очищення шляхом фізичної рафінації, що виключає стадію нейтралізації.

Доведено, що економія при переході від рафінації соняшникової олії зі звичайною технологією гідратації з використанням води (пари) до фізичної рафінації з ферментативною гідратацією складає близько 70 грн. на 1 т неочищеної олії.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена рішення науково-практичної задачі побудування науково обґрунтованої ферментативної технології гідратації соняшникової олії, що дає змогу отримати якісну гідратовану олію та фосфатидний концентрат із поліпшеними властивостями.

За результатами досліджень зроблено такі висновки.

1. Визначено кінетичні характеристики ферментних препаратів Lecitase Novo і Lecitase Ultra, продуцентами яких є мікроорганізм *Aspergillus oryzae*, а саме константа Міхаеліса і максимальна швидкість реакції; знайдено кінетичні параметри реакції гідролізу (константи швидкості і енергія активації) про різних температурах; виявлено більшу каталітичну активність препарату Lecitase Ultra за Lecitase Novo.

2. Знайдено ефективні умови дії препаратів фосфоліпази A₁ щодо модифікування фосфоліпідів, які вилучено із соняшникової олії; виявлено поліпшення їх поверхнево-активних і піноутворюючих властивостей внаслідок ферментативного гідролізу.

3. Методом центрального композиційного рототабельного планування визначено математичну модель ферментативної гідратації соняшникової олії при використанні фосфоліпази Lecitase Ultra і знайдено ефективні умови цього процесу.

4. Встановлено вплив ферментних препаратів Lecitase Novo і Lecitase Ultra на фракційний склад фосфоліпідів як при модифікуванні фосфатидного концентрату, так і у процесі ферментативної гідратації соняшникової олії; визначено зміну жирнокислотного складу фосфоліпідів у разі гідролізу з фосфоліпазою Lecitase Ultra.

5. Розроблено періодичну й безперервну ферментативну технологію гідратації соняшникової олії. Економія при переході від рафінації соняшникової олії, що включає гідратацію з використанням води (пари), до фізичної рафінації з ферментативною гідратацією дорівнює близько 70 грн. на 1 т нерафінованої олії.

6. Промислові випробування ферментативної технології гідратації соняшникової олії підтвердили можливість зниження кількості фосфоліпідів в олії до 0,06 % і зменшення відходів сировини (олії).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Богодіст-Тимофєєва О.Ю. Ферментативна гідратація олії // Вісник Національного технічного університету “Харківський політехнічний інститут”. – Харків: НТУ “ХПІ”. – 2002. – №6, т. 2. – с. 131 - 134.

2. Гладкий Ф.Ф., Богодіст-Тимофєєва О.Ю. Модифікування фосфатидного концентрату за допомогою ферменту // Вісник Національного технічного університету “Харківський політехнічний інститут”. – Харків: НТУ “ХПІ”. – 2002. – №9, т. 2. – с. 35 - 38.

Здобувачем проведено модифікування фосфоліпідів фосфатидного концентрату у розчиннику з використанням фосфоліпазного препарату LecitaseTM 10L, виконано аналіз отриманих даних.

3. Богодіст-Тимофєєва О.Ю., Гладкий Ф.Ф., Чумак О.П., Гасюк Л.В. Перетворення фосфоліпідів під впливом ліполітичних ферментів // Вісник Національного технічного університету “Харківський політехнічний інститут”. – Харків: НТУ “ХПІ”. – 2003. – №11, т. 2. – с. 7 - 10.

Здобувачем здійснено експерименти щодо гідролізу фосфатидного концентрату і фосфатидній емульсії з використанням препаратів фосфоліпази А₁ (Lecitase Novo і Lecitase Ultra).

4. Богодіст-Тимофєєва О.Ю., Гладкий Ф.Ф. Дослідження властивостей препаратів мікробних фосфоліпаз // Вісник Національного технічного університету “Харківський політехнічний інститут”. – Харків: НТУ “ХПІ”. – 2004. – №41. – с. 47 - 52.

Здобувачем визначено напрямки дослідження, проведено низку експериментів щодо знайдення кінетичних характеристик фосфоліпаз Lecitase Novo і Lecitase Ultra, проаналізовано результати.

5. Гладкий Ф.Ф., Богодіст-Тимофєєва О.Ю. Ферментна технологія гідратації соняшникової олії // Олійно-жировий комплекс. – Дніпропетровськ: “АПК-Информ”. – 2004. - №3 (6). – с. 35 - 37.

Здобувачем узагальнено дослідження, що зроблено в галузі ферментативних процесів модифікування рослинних фосфоліпідів і гідратації соняшникової олії.

6. Богодіст-Тимофєєва О.Ю. Зміна фосфоліпідного змісту соняшникової олії при гідратації під дією фермента фосфоліпаза А₁ // Тези доповідей учасників I Всеукр. наук-практ. конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Біотехнологія. Освіта. Наука”. – К.: “Політехніка”. - 2003. – с. 33 - 34.

7. Богодіст-Тимофєєва О.Ю., Чумак О.П. Ферментні технології гідратації олії // Матеріали Міжнар. наук.-практ. конф. “Розроблення та виробництво продуктів функціонального харчування, інноваційні технології та конструювання обладнання для перероблення сільгоспсировини, культура харчування населення України” 21-23 жовт. 2003р. – К.: “НУХТ”. – 2004. – Додаток до журналу “Харчова промисловість” №3. – с. 84 - 84.

АНОТАЦІЇ

Богодіст-Тимофєєва О.Ю. Удосконалення технології гідратації соняшникової олії з використанням фосфоліпаз. – 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, 2005.

Дисертацію присвячено вдосконаленню технології гідратації соняшникової олії і розробленню способу отримання фосфатидного концентрату з поліпшеними функціональними властивостями.

Визначено особливість кінетики ферментативного гідролізу фосфоліпідів із застосуванням препаратів фосфоліпази A_1 (Lecitase Novo і Lecitase Ultra) та знайдено відповідні кінетичні характеристики: константа Міхаеліса і максимальна швидкість реакції. Встановлено ефективні умови дії ферментних препаратів Lecitase Novo і Lecitase Ultra при модифікуванні фосфатидилхоліну і комплексу фосфоліпідів, що вилучено із соняшникової олії. Виявлено, що препарат Lecitase Ultra має більшу каталітичну здатність щодо модифікування фосфоліпідів порівняно з Lecitase Novo. Визначено поліпшення поверхнево-активних і піноутворюючих властивостей отриманих модифікованих фосфоліпідів, що вилучено з соняшникової олії; показано ефективність їх використання у хлібопеченні і виробництві низькожирних майонезів.

Вперше встановлено, що препарати фосфоліпази A_1 виявляють вибірковість щодо гідролізу певних груп фосфоліпідів, що містяться у соняшниковій олії та фосфатидному концентраті, а саме фосфатидилхолінів, фосфатидилетаноламінів і фосфатидних кислот. Визначено ефективні умови ферментативного процесу гідратації соняшникової олії і отримано його математичну модель з використанням фосфоліпазного препарату Lecitase Ultra.

Запропоновано періодичну і безперервну технології ферментативної гідратації соняшникової олії. У результаті промислових випробувань періодичної технології підтверджено можливість зниження кількості фосфоліпідів в олії до 0,06 % і зменшення відходів сировини (олії). Економія при переході від рафінації соняшникової олії, що включає гідратацію з використанням води (пари), до фізичної рафінації з ферментативною гідратацією дорівнює близько 70 грн. на 1 т олії.

Ключові слова: ферментативна гідратація, фосфоліпази, модифіковані фосфоліпіди, кінетика ферментного гідролізу.

Богодист-Тимофеева Е.Ю. Усовершенствование технологии гидратации подсолнечного масла с применением фосфолипаз. – 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, 2005.

Диссертация посвящена усовершенствованию технологии гидратации подсолнечного масла и разработке способа получения фосфатидного концентрата с улучшенными свойствами.

Определена особенность кинетики ферментативного гидролиза фосфолипидов с применением препаратов фосфолипазы A_1 (Lecitase Novo и Lecitase Ultra) и найдены соответствующие кинетические характеристики: константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции. Установлены эффективные условия действия ферментных препаратов Lecitase Novo и Lecitase Ultra при модифицировании фосфатидилхолина и комплекса фосфолипидов, полученных из подсолнечного масла. Выведено, что препарат Lecitase Ultra обладает большей каталитической способностью при гидролизе по сравнению с Lecitase Novo. Это подтвердили и найденные значения констант скорости реакции гидролиза фосфатидилхолина и энергии активации при разных температурах. Определено изменение функциональных свойств полученных модифицированных растительных фосфолипидов, а именно улучшение поверхностно-активных и пенообразующих свойств; показана эффективность их использования в хлебопечении и производстве низжирных майонезов.

Впервые установлено, что препараты фосфолипазы A_1 проявляют избирательность при гидролизе определенных групп фосфолипидов, содержащихся в подсолнечном масле и фосфатидном концентрате, а именно фосфатидилхолинов, фосфатидилэтанолламинов и фосфатидных кислот. Определены эффективные условия ферментативного процесса гидратации подсолнечного масла и получена его математическая модель с использованием фосфоліпазного препарату Lecitase Ultra.

Предложена технология ферментативной гидратации подсолнечного масла в периодических и непрерывных условиях. В результате промышленных испытаний периодической гидратации подтверждена возможность снижения количества фосфолипидов в масле до 0,06 % и уменьшение отходов сырья (масла). Экономия при переходе от рафинации подсолнечного масла, включающая

гидратацию с использованием воды (пара), к физической рафинации с ферментативной гидратацией составляет около 70 грн. на 1 т масла.

Ключевые слова: ферментативная гидратация, фосфолипазы, модифицированные фосфолипиды, кинетика ферментного гидролиза.

Bogodist-Timofeeva E.Y. The development of technology of sunflower oil hydration, using phospholipases. – Manuscript.

Thesis for a scientific degree of candidate of technical sciences on specialty 05.18.06. – technology of fats, essential oils and perfumery-cosmetic products. National technical university “Kharkiv polytechnic institute” Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2005.

Dissertation is dedicated to the improvement of technology of sunflower oil hydration and development of the way of getting phosphatide concentrate with the improved properties.

The feature of kinetics of phospholipids' enzymatic hydrolysis is determined using phospholipase A₁ (Lecitase Novo and Lecitase Ultra) and the proper kinetics' characteristics are found: the Michaelis's constant and the maximum reaction speed. The effective work conditions for enzymatic preparations Lecitase Novo and Lecitase Ultra during modification of phosphatidilcholine and complex of vegetable phospholipids are set. It is discovered, that the Lecitase Ultra preparation possesses greater catalytic ability during hydrolysis then the Lecitase Novo. It was confirmed by the constants of phosphatidil's hydrolysis reaction speed values and the energy of activation at different temperatures. The change of modified vegetable phospholipids' functional properties is determined, namely the improvement of surface-active and foam-forming properties; it's shown the efficiency of using them in bread baking and production of low fat mayonnaises.

It is set first, that the phospholipase A₁ preparations show selectivity during hydrolysis of certain groups of phospholipids in the sunflower oil and in the phosphatide concentrate, namely phosphatidilcholins, phosphatidilethanolamines and phosphatid acids. The effective terms of enzymatic hydration process of sunflower oil are certain and it's mathematical model using the phospholipase's preparation Lecitase Ultra is got.

As a result of industrial tests of enzymatic hydration technology of sunflower oil the possibility of reduction the amount of phospholipids in butter to 0,06% and reduction of raw material wastes is confirmed.

Key words: enzymatic hydration, phospholipases, modified phospholipids, enzymatic hydrolysis' kinetics.