



На правах рукописи

Шнайдер

ШНАЙДЕР КСЕНИЯ ЛЕОНИДОВНА

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕВОДНЫХ СРЕД**

02.00.15 – Катализ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

14 ЯНВ 2010

Казань – 2009

Работа выполнена на кафедре пищевой биотехнологии
ГОУ ВПО «Казанский государственный технологический университет»

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Гамаярова Валентина Семейовна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор
Харлампиди Харлампий Эвклидович

доктор биологических наук, профессор
Максютова Наиля Назибовна

Ведущая организация: ГОУ ВПО «Казанский государственный университет им.
В.И. Ульянова-Ленина»

Защита диссертации состоится « 25 » декабря 2009 г. в 11⁰⁰ часов на заседании
диссертационного совета Д 212.080.07 при Казанском государственном технологи-
ческом университете по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68, КГТУ, зал
заседаний Ученого совета (А-330).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Казанского государст-
венного технологического университета.

Автореферат разослан « 24 » ноября 2009 г.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Казанского го-
сударственного технологического университета. Режим доступа <http://www.kstu.ru/>

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат химических наук, доцент



В.М. Захаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Ферментные препараты находят все более широкие области применения в биотехнологии пищевой, фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности. Сравнительно новое направление – изучение применения ферментных препаратов в неводных средах, что позволяет значительно расширить круг объектов и процессов, для которых могут быть использованы ферментные препараты.

В настоящей работе объектами исследования являются растительные масла различного жирно-кислотного состава – льняное и рапсовое масла. Эти масла важны, как для пищевой промышленности, так и для технических целей. Так, химический гидролиз рапсового масла является основой для крупнотоннажного получения ПАВ.

К перспективнейшим объектам исследования среди растительных масел можно отнести льняное масло, содержание ω -3-ПНЖК (α -линоленовой кислоты) в котором составляет 35-65 % к сумме кислот. Благодаря своему жирно-кислотному составу и присутствию антиоксидантов льняное масло используется для профилактики и комплексного лечения многих заболеваний.

Наряду с льняным маслом неплохим источником α -линоленовой кислоты может служить рапсовое масло.

Современные сорта рапса содержат 40-49 % масла, богатого олеиновой (45-70 %), линолевой (15-28 %) и линоленовой (6-13 %) кислотами, вследствие чего рапсовое масло можно отнести к ценным растительным маслам.

Изучение процесса ферментативного гидролиза растительных масел актуально с точки зрения получения свободных высших жирных кислот, которые имеют очень широкий спектр применения. Ферментативные процессы, как известно, протекают в мягких условиях и обладают более выраженной селективностью.

Для пищевой промышленности указанные масла представляют ценность, как источники незаменимых ω -3 и ω -6 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) – линолевой и α -линоленовой кислот, которые выполняют функцию особого витамина, получившего наименование витамин F. ПНЖК семейства ω -3 и ω -6 обладают широким спектром лечебно-профилактического действия, так как они являются биологическими предшественниками эйкозаноидов и структурными блоками биологических мембран.

В связи с этим интерес исследователей различного профиля к незаменимым ПНЖК семейств ω -3 и ω -6 чрезвычайно высок. При этом если источники ПНЖК семейства ω -6 довольно распространены, то гораздо более ограничен круг источников ПНЖК семейства ω -3. Поэтому поиск новых источников ω -3 ПНЖК, доступных и легко усвояемых является актуальной задачей. Для получения продуктов с повышенным содержанием ω -3 ПНЖК, а, следовательно, с повышенной пищевой и биологической ценностью была использована ферментативная трансформация растительных масел липазами различного происхождения.

¹ В руководство диссертационной работой принимала участие к.т.н., доцент кафедры пищевой биотехнологии Зиновьева М.Е.

Цель и задачи исследования. Выявление особенностей ферментативного гидролиза растительных масел различного жирно-кислотного состава липазами животного и микробиологического происхождения.

Получение нового модифицированного липидного продукта с повышенным содержанием ω -3 ПНЖК, а, следовательно, с повышенной пищевой ценностью.

Научная новизна. Панкреатическая липаза и липаза из *Candida rugosa* гидролизуют растительные масла в органических средах (углеводороды) в мицеллярных системах АОТ гораздо эффективнее, чем в эмульсии масло/вода стабилизированной АОТ.

Панкреатическая липаза в системе обращенных мицелл АОТ специфична по отношению к жирно-кислотному составу гидролизуемых масел и легче отделяет в ацилглицеридах остатки полиненасыщенных жирных кислот, чем насыщенных и мононенасыщенных.

Липаза из *Candida rugosa* в системе масло/вода гораздо эффективнее подвергает гидролизу растительные масла, чем панкреатическая липаза, при этом она труднее всего отделяет в ацилглицеридах остатки полиненасыщенной α -линоленовой кислоты, что позволяет получить модифицированные масла с повышенным относительным содержанием этой кислоты.

Практическая значимость. Разработан метод гидролиза льняного масла с применением липазы из *Candida rugosa* в отсутствие эмульгатора, что позволяет получить биологически-активный липидный продукт с повышенным относительным содержанием ω -3-ПНЖК.

Подобраны оптимальные условия для получения активных иммобилизованных препаратов липаз различного происхождения. Показано, что при иммобилизации необходимо введение хлорида кальция в гель агара и подобраны его оптимальные концентрации.

Разработан метод выделения кальциевых и натриевых солей жирных кислот льняного масла, который включает последовательную ферментативную и химическую обработку масла. Данные соли находят применение в качестве добавок к корму сельскохозяйственных животных, а также могут использоваться как основа для получения ПАВ, восков и др.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на Международной научно-практической конференции “Биотехнология. Вода и пищевые продукты” (Москва, 2008), на X Международной конференции молодых ученых “Пищевые технологии и биотехнологии” (Казань, 2009), на XIV Международной конференции, посвященной 20-летию партнерства между Казанским государственным университетом и Гиссенским университетом им. Ю. Либиха (Казань, 2009), на ежегодных отчетных конференциях КГТУ (2007-2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения (3 главы), выводов и библиографического указателя (129 наименований источников). Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, включает в себя 19 таблиц и 43 рисунка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве катализаторов использовали: коммерческий препарат Lipase from *porcine pancreas*, Type II лиофильно высушенный (активность – 100-400 ед./мг белка с использованием оливкового масла в качестве субстрата, производство – США); коммерческий препарат Lipase from *Candida rugosa*, Type VII лиофильно высушенный (активность – 700-1500 ед./мг белка по оливковому маслу, производство – Япония); коммерческий препарат, содержащий липазу, “Novozyme 868” жидкий (активность – 178 ед./мг белка по оливковому маслу, производитель Novo Nordisk A/S, Novo Alle, DK-2880 Bagsvaerd (Дания)).

Исходную активность ферментных препаратов липаз определяли модифицированным методом Ота, Ямада и колориметрическим методом с использованием п-нитрофенилбутирата.

Изучение гидролиза масел ферментными препаратами липаз осуществляли в системе прямых и обращенных мицелл АОТ, в системе масло/вода в отсутствие эмульгатора, в эмульсиях масла с использованием в качестве эмульгатора желатина, а также гидролиз масла с добавлением органического растворителя.

Для включения фермента (панкреатической липазы или липазы из *Candida rugosa*) в мицеллы к 1 мл раствора АОТ в определенной концентрации (от 0,03 до 0,12 М/л) в органической среде (пентан, гексан, гептан, октан, декан), содержащей субстрат (льняное или рапсовое масло) в концентрации от 42,9 до 269,6 мкМ/мл, добавляли раствор ферментного препарата в фосфатно-цитратном буфере с рН 7,4 (количество буфера 0,0-1,0 мл; количество ферментного препарата 0,07-1,00 мг/мл). Смесь интенсивно встряхивали и выдерживали в течение 1-36 часов при определенной температуре (от 20 °С до 55 °С). Количество выделившихся в ходе реакции жирных кислот определяли методом титрования.

В контрольную пробу фермент вносили непосредственно перед титрованием.

Гидролиз в водной среде проводили подобным образом, с использованием в качестве эмульгатора АОТ.

Выход жирных кислот (мкМ/мг белка) рассчитывали по формуле:

$$A = (O - K) \cdot T \cdot 200 / B,$$

где O – количество 0,2 н спиртового раствора NaOH, пошедшее на титрование пробы, мл; K – количество 0,2 н спиртового раствора NaOH, пошедшее на титрование контроля, мл; T – титр щелочи; 200 – коэффициент пересчета в мкмоли жирных кислот; B – концентрация ферментного раствора, мг/мл.

Иммобилизацию ферментных препаратов липаз проводили методом включения в гель агара, содержащий хлорид кальция в концентрации от 0,0 М/л до 1,1 М/л. Затем с помощью иммобилизованных ферментных препаратов липаз проводили гидролиз льняного масла и эмульгированного оливкового масла.

Гидролиз льняного и рапсового масел ферментными препаратами липаз в отсутствие эмульгатора осуществляли следующим образом: льняное (рапсовое) масло

эмульгировали в воде с помощью высокоскоростного диспергатора. В 25 мл эмульсии масло/вода вносили 30 мг сухого ферментного препарата липазы (панкреатической липазы или липазы из *Candida rugosa*). Реакцию осуществляли при температуре 37 °С с интенсивным перемешиванием (число оборотов – 150) в течение определенного времени (от 1 до 10 часов).

Для отделения жирных кислот был применен метод холодной рафинации.

Из гидролизата льняного масла после обработки его липазой из *Candida rugosa* выделяли кальциевые соли жирных кислот. Для этого в промытый гидролизат вносили гидроксид кальция. Полученную смесь тщательно перемешивали и оставляли до полного застывания.

Анализ полученных продуктов осуществляли следующими методами: ИК-спектроскопия, ТСХ, ГЖХ.

Все эксперименты проводили в 3-12 повторностях. Результаты обрабатывали с помощью пакета статистических программ «Statistica». Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения жирно-кислотного состава, в частности количества α -линоленовой и линолевой кислот в исследуемых маслах, использовали метод газожидкостной хроматографии. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1

Состав льняного и рапсового масел

Жирная кислота	Льняное масло, %	Рапсовое масло, %
Гондоиновая (C _{20:1})	-	1,2
α -Линоленовая (C _{18:3})	49,5	7,6
Линолевая (C _{18:2})	17,6	20,6
Олеиновая (C _{18:1})	23,8	64,5
Стеариновая (C _{18:0})	5,8	-
Пальмитиновая (C _{16:0})	3,3	6,1
Суммарное содержание кислот C ₁₈	96,7	92,7

1 Гидролиз льняного и рапсового масел ферментными препаратами липаз в системе масло/вода

Для проведения гидролиза, чтобы адсорбция фермента на поверхности гидрофобного субстрата была продуктивной, широкое применение нашли эмульгаторы различной природы (целлюлоза, гуммиарабик, поливиниловый спирт, желатин и другие). Однако в связи с тем, что отделение продуктов гидролиза от эмульгатора (ПАВ) усложняет задачу, исследовалась возможность ферментативного гидролиза льняного и рапсового масел при отсутствии эмульгатора в системе масло/вода.

Показано, что панкреатическая липаза в подобранных условиях осуществляет гидролиз льняного и рапсового масел в системе масло/вода с крайне низким выхо-

дом жирных кислот. Так, максимальный выход целевого продукта через 4 часа гидролиза льняного масла составил 70 мкМ или 2,5 %.

В то же время гидролиз масел липазой из *Candida rugosa* в установленных условиях протекает значительно интенсивнее. Максимальный выход жирных кислот через 9 часов гидролиза льняного масла составил 1241 мкМ или 43,8 %, что в 17,7 раза превышает выход продуктов гидролиза масла панкреатической липазой. При гидролизе рапсового масла максимальный выход жирных кислот наблюдался через 3 часа от начала процесса и составил 37,0 %.

Для получения липидного продукта с улучшенным жирно-кислотным составом на основе льняного масла (рапсового масла), свободные жирные кислоты отделяли методом холодной рафинации. Далее продукт анализировали методом ГЖХ. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Изменение количественного и качественного состава льняного масла (рапсового масла) после гидролиза липазой из *Candida rugosa*

Жирно-кислотный состав льняного и рапсового масел	Жирно-кислотный состав исходного льняного масла, %	Жирно-кислотный состав липидного продукта на основе льняного масла, %	Жирно-кислотный состав исходного рапсового масла, %	Жирно-кислотный состав липидного продукта на основе рапсового масла, %
гондоиновая	-	-	1,2	-
α -линоленовая	49,5	66,7	7,6	8,36
линолевая	17,6	10,7	20,6	21,4
олеиновая	23,8	15,2	64,5	63,6
пальмитиновая	5,8	2,1	6,1	6,55
стеариновая	3,3	5,3	-	-

Согласно данным, представленным в таблице 2, липаза из *Candida rugosa* преимущественно отделяет в ацилглицеридах льняного масла остатки олеиновой и линолевой кислот, а также значительно снижает содержание пальмитиновой кислоты в масле. Отделив данные кислоты от гидролизованного льняного масла, становится возможным обогатить полученный продукт α -линоленовой кислотой. Таким образом, относительное содержание ценной ω -3-ПНЖК в липидном продукте увеличилось с 49,5 % до 66,7 %.

При гидролизе рапсового масла липазой из *Candida rugosa* также в основном отделяется олеиновая кислота, что подтверждает специфичность данного фермента по отношению к мононенасыщенным жирным кислотам. Однако относительное содержание ценных линолевой и α -линоленовой кислот в конечном продукте повышается незначительно.

2 Гидролиз льняного и рапсового масел ферментным препаратом панкреатической липазы. Мицеллярные системы

Другим подходом позволяющим избежать стадии эмульгирования субстрата является применение органических сред. В частности хорошие результаты показывают мицеллярные системы.

Был изучен гидролиз льняного и рапсового масел ферментным препаратом панкреатической липазы в системе обращенных мицелл поверхностно-активного вещества АОТ (ди-(2-этил)-гексилловый эфир натриевой соли сульфоянтарной кислоты) и подобраны оптимальные условия.

Показано, что при гидролизе льняного и рапсового масел ферментным препаратом панкреатической липазы при изменяющихся концентрациях субстрата наблюдается увеличение выхода жирных кислот до определенной насыщающей концентрации, которая для льняного масла составила 157 мкМ/мл, для рапсового масла – 50 мкМ/мл. Гидролиз рапсового масла панкреатической липазой протекает со значительно более низким выходом жирных кислот.

Методом двойных обратных координат (метод Лайнуивера-Берка) были рассчитаны значения констант уравнения Михаэлиса-Ментен (K_m и V_{max}). Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3

Значения K_m и V_{max}			
Ферментный препарат	Субстрат	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ/мл·мин
Панкреатическая липаза	Льняное масло (пентан)	161,3	16,0

Рассчитать значения K_m и V_{max} при гидролизе рапсового масла ферментным препаратом панкреатической липазы не представляется возможным.

Зависимость каталитической активности ферментного препарата панкреатической липазы от степени гидратации мицелл в процессе гидролиза растительных масел имеет вид кривых, представленных на рис. 1.

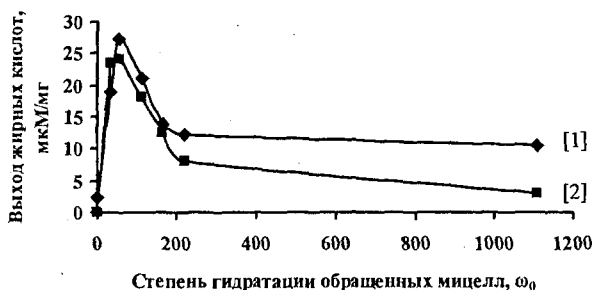


Рис. 1 – Влияние степени гидратации на ферментативный гидролиз растительных масел ферментным препаратом панкреатической липазы в системе обращенных мицелл АОТ: 1 – гидролиз льняного масла; 2 – гидролиз рапсового масла

Условия эксперимента: среда – пентан; концентрация АОТ – 0,05 М/л; pH 7,4; время реакции – 1 час

Согласно представленным данным для панкреатической липазы наблюдаются ярко выраженные максимумы при значении степени гидратации (ω_0) равном 56. Увеличение содержания воды в системе приводит к уменьшению выхода жирных кислот.

Был рассчитан радиус внутренней полости мицеллы солюбилизирующей панкреатическую липазу, который составил $r_m = 88 \text{ \AA}$ (8,8 нм).

Ферменты можно разделить на две группы: способные и неспособные взаимодействовать с мицеллярной матрицей. Тестом на эту способность является зависимость каталитической активности ферментов от концентрации ПАВ в мицеллярной системе. Данные, полученные при гидролизе растительных масел ферментным препаратом панкреатической липазы, представлены на рис. 2.

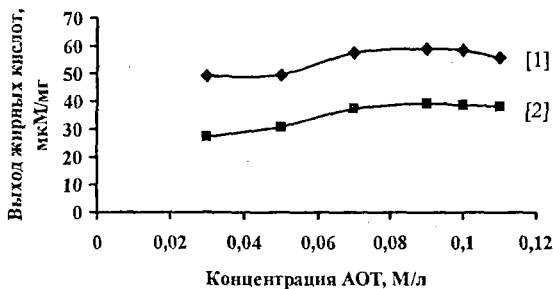


Рис. 2 – Влияние количества АОТ на гидролиз растительных масел ферментным препаратом панкреатической липазы в системе обращенных мицелл: 1 – гидролиз льняного масла; среда – декан; 2 – гидролиз рапсового масла; среда – гексан

Условия эксперимента: рН 7,4; время реакции – 1 час

Из данных представленных на рис. 2 видно, что активность панкреатической липазы при гидролизе как льняного, так и рапсового масел зависит от концентрации АОТ, свидетельствуя о взаимодействии липазы с внутренней поверхностью мицеллы. Увеличение концентрации молекул АОТ в среде до 0,09 М/л способствует небольшому росту каталитической активности фермента.

Увеличение концентрации молекул АОТ в системе обращенных мицелл приводит к увеличению числа меньших по размеру мицелл, соответственно, происходит перераспределение воды в мицеллах и изменение степени гидратации, величина которой составила $\omega_0 = 31$. Это способствует уменьшению радиуса мицеллы $r_m = 50,5 \text{ \AA}$ (по расчету $r_m = 5,05 \text{ нм}$, по сравнению с $r_m = 8,8 \text{ нм}$, полученным ранее) и, как следствие, к увеличению поверхности раздела фаз.

Установлено, что наиболее высокий выход жирных кислот при гидролизе льняного масла ферментным препаратом панкреатической липазы наблюдается в среде декана, а при гидролизе рапсового масла – в среде гексана.

Применяя систему обращенных мицелл АОТ в качестве среды реакции ферментативного гидролиза льняного и рапсового масел, становится возможным снизить оптимальную температуру реакции с $37 \text{ }^\circ\text{C}$ до $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Повысить скорость гидролитического процесса возможно изменяя содержание фермента в среде. Согласно полученным данным, выход жирных кислот в ходе гидролиза льняного и рапсового масел ферментным препаратом панкреатической липазы максимален при концентрации фермента в системе – $0,07 \text{ мг/мл}$ ($\omega_0 = 31$).

Полученные результаты по влиянию времени на ферментативный гидролиз льняного и рапсового масел ферментным препаратом панкреатической липазы представлены на рис. 3-6.

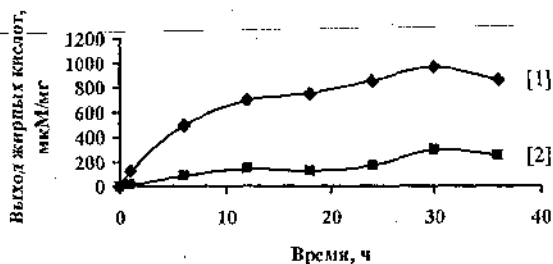


Рис. 3 – Влияние времени на выход жирных кислот при гидролизе льняного масла ферментным препаратом панкреатической липазы: 1 – среда – декан; 2 – среда – вода

Условия эксперимента: концентрация субстрата – 157 мкМ/мл; ω_0 31; концентрация АОТ – 0,09 М/л; pH 7,4; концентрация фермента – 0,07 мг/мл



Рис. 4 – Влияние времени на скорость гидролиза льняного масла ферментным препаратом панкреатической липазы: 1 – среда – декан; 2 – среда – вода

Условия эксперимента: концентрация субстрата – 157 мкМ/мл; ω_0 31; концентрация АОТ – 0,09 М/л; pH 7,4; концентрация фермента – 0,07 мг/мл

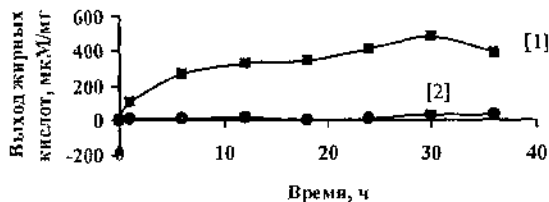


Рис. 5 – Влияние времени на выход жирных кислот при гидролизе рапсового масла ферментным препаратом панкреатической липазы: 1 – среда – гексан; 2 – среда – вода

Условия эксперимента: концентрация субстрата – 50 мкМ/мл; ω_0 31; концентрация АОТ – 0,09 М/л; pH 7,4; концентрация фермента – 0,07 мг/мл

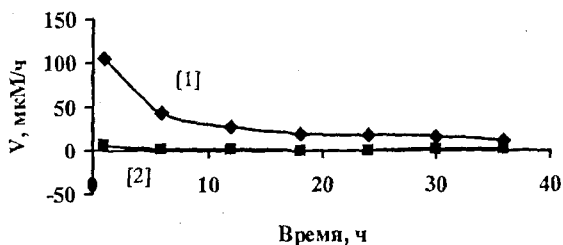


Рис. 6 – Влияние времени на скорость гидролиза рапсового масла ферментным препаратом панкреатической липазы: 1 – среда – гексан; 2 – среда – вода

Условия эксперимента: концентрация субстрата – 50 мкМ/мл; ω_0 31; концентрация АОТ – 0,09 М/л; pH 7,4; концентрация фермента – 0,07 мг/мл

Таким образом, для ферментного препарата панкреатической липазы при гидролизе льняного и рапсового масел в системе обращенных мицелл АОТ в среде органического растворителя оптимальное время процесса составило 30 ч.

По полученным данным были рассчитаны каталитические константы скоростей реакций ферментативного гидролиза льняного и рапсового масел. Данные представлены в таблице 4.

Таблица 4

Значения $k_{кат}$, рассчитанные для процесса гидролиза льняного и рапсового масел ферментным препаратом панкреатической липазы

$k_{кат}, ч^{-1}$			
Льняное масло		Рапсовое масло	
декан	вода	гексан	вода
0,0163	0,0025	0,0098	-

Как видно из представленных в таблице 4 данных, при аналогичных условиях проведения процесса число каталитических актов совершаемых активным центром панкреатической липазы при гидролизе льняного масла в среде декана в 6,5 раз выше, чем в эмульсии масло/вода, стабилизированной АОТ.

3 Гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa*.

Мицеллярные системы

Гидролиз льняного масла также был осуществлен с помощью липазы из *Candida rugosa* с использованием мицеллярной системы АОТ.

Показано, что при концентрации льняного масла в системе 157 мкМ/мл наблюдается максимальный выход продуктов гидролиза.

Методом двойных обратных координат (метод Лайнуивера-Берка) были рассчитаны значения констант уравнения Михаэлиса-Ментен (K_m и V_{max}) для гидролиза льняного масла липазой из *Candida rugosa*. Данные представлены в таблице 5.

Таблица 5

Значения K_m и V_{max}			
Ферментный препарат	Субстрат	K_m , мкМ	V_{max} , мкМ/мг·мин
Липаза из <i>Candida rugosa</i>	Льняное масло (гексан)	433,3	77,5

— Низкое значение K_m при гидролизе льняного масла ферментным препаратом панкреатической липазы ($K_m=161,3$ мкМ) свидетельствует о том, что панкреатическая липаза обладает большим сродством к льняному маслу, чем липаза из *Candida rugosa*.

В то же время значение V_{max} при гидролизе льняного масла липазой из *Candida rugosa* значительно превышает максимальную скорость гидролиза панкреатической липазой ($V_{max}=16,0$ мкМ/мг·мин), что связано с изначально более высокой каталитической активностью исходного фермента.

Зависимость выхода продуктов гидролиза льняного масла липазой из *Candida rugosa* от степени гидратации мицеллярной системы приведена на рис. 7.



Рис. 7 — Влияние степени гидратации на ферментативный гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa* в системе мицелл АОТ

Условия эксперимента: среда — гексан; концентрация АОТ — 0,05 М/л; pH 7,4; время реакции — 1 час

Зависимость представленная на рис. 7 имеет три максимума: первый максимум — при ω_0 167, второй — при ω_0 778 и третий — при ω_0 1000. Наличие нескольких максимумов может свидетельствовать о нескольких фазовых переходах в системе при изменяющихся концентрациях воды. В точке максимальной каталитической активности фермента происходит геометрическое совпадение внутренней полости мицеллы с молекулой фермента. Радиус внутренней полости мицеллы, солюбилизирующей липазу из *Candida rugosa* при ω_0 167 составляет $r_m = 254,5 \text{ \AA}$ (25,4 нм); при ω_0 778 — $r_m = 1171 \text{ \AA}$ (117,1 нм) и при ω_0 1000 — $r_m = 1504 \text{ \AA}$ (150,4 нм).

Несмотря на то, что в целом состав молекулы панкреатической липазы не является исключительно гидрофобным, ее вторичная и третичная структуры, согласно литературным данным, возможны, таковы, что значительное число неполярных аминокислот находится на поверхности молекулы, а не спрятано внутри. В связи с этим молекула панкреатической липазы требует меньшего объема гидратно-солевой оболочки. Проведенные исследования это подтверждают. Уменьшение степени гид-

ратации (с 56 до 31) и соответственно радиуса мицелл (с 8,8 нм до 5,05 нм) приводит к увеличению активности панкреатической липазы.

Липаза из *Candida rugosa* проявляет максимальную активность при значительно более высокой степени гидратации мицелл (рис.7). Таким образом, можно предположить наличие большего числа гидрофильных групп на поверхности белка и необходимость более объемной гидратно-сольватной оболочки белковой молекулы для проявления максимальной активности данным ферментом.

Изменяя концентрацию ПАВ в мицеллярной системе, также становится возможным регулировать каталитическую активность фермента. Данные по влиянию количества АОТ на выход продуктов гидролиза представлены на рис. 8.

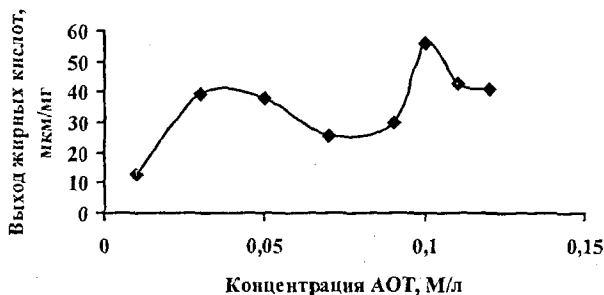


Рис. 8 — Влияние количества АОТ на гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa* в мицеллярной системе

Условия эксперимента: среда — гептан; pH 7,4; время реакции — 1 час

Согласно данным, приведенным на рис. 8, характер влияния концентрации АОТ на гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa* отличается от влияния количества АОТ на гидролиз льняного масла ферментным препаратом панкреатической липазы. На кривой, представленной на рис. 8, наблюдается два пика. Первый соответствует содержанию АОТ в системе 0,03 М/л, второй — 0,1 М/л. Наличие двух максимумов на кривой, представленной на рис. 8, может наблюдаться в связи с фазовыми переходами, а также с перераспределением воды и фермента в мицеллах при изменяющихся концентрациях АОТ. Изменение оптимальной концентрации АОТ предполагает изменение степени гидратации системы, величина которой составила $\omega_0 = 1111$, радиус мицеллы $r_m = 1670,5 \text{ \AA}$ (167,05 нм) при содержании АОТ — 0,03 М/л и $\omega_0 = 333$, радиус мицеллы $r_m = 504 \text{ \AA}$ (50,4 нм) при содержании АОТ — 0,1 М/л.

Таким образом, для липазы из *Candida rugosa* наблюдается сложный характер зависимости протекания реакции гидролиза в мицеллярной системе как в зависимости от содержания воды, так и от содержания АОТ. Все это свидетельствует о том, что липаза из *Candida rugosa* представляет собой более лабильную систему, способную к легкой перестройке в зависимости от условий окружающей среды, по сравнению с более компактной панкреатической липазой.

В качестве органического растворителя при гидролизе льняного масла липазой из *Candida rugosa* использовали гексан, гептан, октан и декан. Как показали исследования, наилучшим растворителем является гептан.

Гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa* в системе мицелл АОТ также дает возможность снизить оптимальную температуру процесса с 37 °С до 25 °С.

Установлено, что выход жирных кислот в ходе гидролиза льняного масла липазой из *Candida rugosa* максимален при концентрации фермента в системе – 0,5 мг/мл ($\omega_0 = 333$).

Данные по влиянию времени на ферментативный гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa* представлены на рис. 9 и 10.

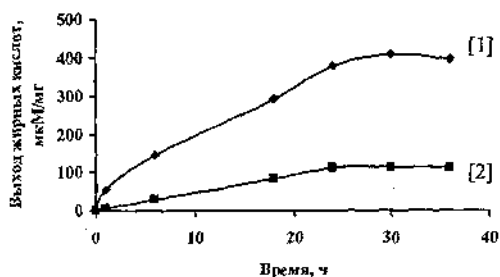


Рис. 9 – Влияние времени на выход жирных кислот при гидролизе льняного масла липазой из *Candida rugosa*: 1 – среда – гептан; 2 – среда – вода

Условия эксперимента: концентрация субстрата – 157 мкМ/мл; ω_0 333; концентрация АОТ – 0,10 М/л; pH 7,4; концентрация фермента – 0,5 мг/мл

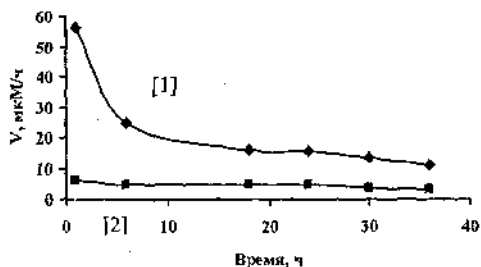


Рис. 10 – Влияние времени на скорость гидролиза льняного масла липазой из *Candida rugosa*: 1 – среда – гептан; 2 – среда – вода

Условия эксперимента: концентрация субстрата – 157 мкМ/мл; ω_0 333; концентрация АОТ – 0,10 М/л; pH 7,4; концентрация фермента – 0,5 мг/мл

Для липазы из *Candida rugosa* при гидролизе льняного масла оптимальное время процесса составило 24 ч для водной среды и 30 ч для среды гептана.

Согласно данным, представленным на рис. 10, увеличение времени проведения гидролиза льняного масла в системе мицелл АОТ сопровождается уменьшением

скорости реакции. При гидролизе эмульсии масло/вода, стабилизированной АОТ обнаруживается кажущаяся независимость скорости реакции от времени. По полученным данным были рассчитаны каталитические константы скорости реакции ферментативного гидролиза льняного масла. Данные представлены в таблице 6.

Таблица 6

Значения $k_{кат}$ рассчитанные для процесса гидролиза льняного масла липазой из *Candida rugosa*

$k_{кат}, ч^{-1}$	Льняное масло	
	гептан	вода
	0,0061	0,0009

Приведенные в таблице 6 результаты, свидетельствуют о том, что число каталитических актов совершаемых активным центром липазы в среде гептана почти в 7 раз выше, чем в эмульсии масло/вода, стабилизированной АОТ.

4 Активация и стабилизация ферментного препарата панкреатической липазы неорганическими соединениями

Влияние на активность липаз может оказывать целый ряд веществ – желчно-кислые соли, белки, различные виды эмульгаторов, неорганические соединения.

Было изучено влияние хлоридов кальция и магния, сульфата магния на активность ферментного препарата панкреатической липазы. Показано, что панкреатическая липаза обладает более низкой активностью при отсутствии ионов кальция или магния в среде. В то же время внесение этих солей приводит к его активации. Полученные результаты приведены в таблице 7.

Таблица 7

Влияние некоторых солей на активность ферментного препарата панкреатической липазы

Вещество	Эмульсия с размером частиц $d < 85 \cdot 10^{-3} \text{ м}$		Эмульсия с размером частиц $d < 250 \cdot 10^{-3} \text{ м}$	
	Оптимальная концентрация активатора, М/л	Прирост активности, %	Оптимальная концентрация активатора, М/л	Прирост активности, %
CaCl_2	0,02	27	0,05	94
MgCl_2	0,06	15	0,04	59
MgSO_4	-	-	0,03	39

Диапазон исследуемых концентраций хлоридов кальция и магния, сульфата магния от 0,01 М/л до 0,09 М/л.

Контрольная липолитическая активность ферментного препарата панкреатической липазы – 129 ед./мг (100 %).

Как показывают результаты исследования, степень влияния неорганических соединений на скорость реакции гидролиза зависит от размера частиц эмульгированного субстрата. При этом прирост липолитической активности при введении хлорида кальция или хлорида магния в среду с большим размером частиц эмульсии существенно превышает прирост активности в эмульсии с меньшим размером частиц.

Сульфат магния показал более низкий активирующий эффект, чем хлорид магния.

5 Иммобилизация ферментных препаратов липаз в агаровый гель

Исследована иммобилизация липаз различного происхождения в гель агара.

В процессе работы иммобилизации подверглись ферментный препарат панкреатической липазы, липаза из *Candida rugosa* и препарат "Novozyme 868".

При использовании стандартного метода иммобилизации липаз в гель агара получены иммобилизованные препараты с крайне низкой активностью. Установлено, что внесение хлорида кальция в агаровый гель позволяет не только сохранить исходную активность, но и значительно ее повысить. Данные приведены в таблице 8.

Таблица 8

Активность иммобилизованных в гель агара препаратов липаз

Ферментный препарат	Удельная липолитическая активность, ед./мг (ед./мкл)		
	Исходного фермента	Иммобилизованного фермента	Иммобилизованного фермента при внесении хлорида кальция в оптимальной концентрации
Панкреатическая липаза	129,0	35,0	1592
Липаза из <i>Candida rugosa</i>	346,0	31,5	1740
"Novozyme 868"	178,0	0,0	2158

Показано, что удельная активность иммобилизованных ферментных препаратов липаз плавно возрастает с повышением концентрации хлорида кальция (диапазон концентраций составлял 0,1-1,1 М/л) и достигает максимального значения при содержании хлорида кальция в агаре 0,8 М/л для панкреатической липазы и препарата "Novozyme 868", для липазы из *Candida rugosa* – 0,8-0,9 М/л.

Иммобилизация в гель агара ферментных препаратов липаз позволяет повысить их липолитическую активность относительно активности исходных ферментов: ферментного препарата панкреатической липазы – в 12,4 раза; липазы из *Candida rugosa* – в 5 раз; препарата "Novozyme 868" – в 11,6 раз.

Установлена возможность проведения ферментативного гидролиза не эмульгированного льняного масла иммобилизованными ферментными препаратами липаз.

ВЫВОДЫ

1. Гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa* в системе масло/вода без внесения эмульгатора, позволяет выделить липидный продукт, обогащенный α -линоленовой кислотой. Относительное содержание ценной ω -3-ПНЖК в липидном продукте увеличилось с 49,5 % до 66,7 %.

Установлено, что в данной системе липаза из *Candida rugosa* проявляет более высокую специфичность по отношению к насыщенным, а также моно- и диненасыщенным жирным кислотам. Для выделения высших жирных кислот и отделения их от модифицированного масла (липидного продукта) применен метод холодной рафинации.

Панкреатическая липаза в системе масло/вода практически не осуществляет гидролиз растительных масел.

2. Установлено, что панкреатическая липаза способна расщеплять льняное масло в системе обращенных мицелл АОТ в среде декана в 3,3 раза эффективнее, чем в эмульсии масло/вода, стабилизированной АОТ. Гидролиз рапсового масла в среде гексана в 16,5 раз эффективнее гидролиза стабилизированной АОТ эмульсии масло/вода.

Определены оптимальные условия для проведения гидролиза льняного и рапсового масел ферментным препаратом панкреатической липазы. Выход жирных кислот в оптимальных условиях составил 85 % для льняного масла и 45 % – для рапсового масла.

3. Фермент панкреатическая липаза в системе обращенных мицелл АОТ специфичен по отношению к жирно-кислотному составу гидролизуемых масел и легче отделяет в ацилглицеридах остатки полиненасыщенных жирных кислот, чем остатки насыщенных и мононенасыщенных кислот, что приводит к тому, что в системе обращенных мицелл АОТ в среде декана льняное масло гидролизуется почти в 2 раза эффективнее рапсового масла.

4. Установлено, что гидролиз льняного масла липазой из *Candida rugosa* в системе мицелл АОТ лучше всего протекает в среде гептана и в 3,6 раз более эффективен, чем в эмульсии масло/вода, стабилизированной АОТ. Выход жирных кислот в оптимальных условиях составил 36 %.

5. Установлено, что на липолитическую активность и стабильность ферментного препарата панкреатической липазы оказывают активирующий эффект хлориды кальция и магния, сульфат магния. Подобраны оптимальные концентрации активирующих добавок.

6. Получены иммобилизованные препараты липаз с высокой удельной активностью. Активность иммобилизованных ферментных препаратов выше липолитической активности исходных ферментов: ферментного препарата панкреатической липазы – в 12,4 раза; липазы из *Candida rugosa* – в 5 раз, препарата “Novozyme 868” – в 11,6 раз.

Основное содержание диссертации изложено в работах:

1. Васина, К.Л. Иммобилизация и стабилизация ферментных препаратов липаз / К.Л. Васина [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2007. – № 2. – С. 103-108.

2. Гамаюрова, В.С. Влияние ионов металлов на активность ферментного препарата панкреатической липазы / В.С. Гамаюрова, К.Л. Васина // Бутлеровские сообщения. – 2007. – Т. 12, № 7. – С. 51-54.

3. Ферментативные процессы, осуществляемые липазами в неводных средах / К.Л. Васина [и др.] // Микробные биокатализаторы и их роль в нано- и биотехнологии: сб. науч. тр. – М.: ПищПромиздат, 2008. – С. 135-146.

4. Vasina, K.L. Enzymatic hydrolysis of linseed oil in reversed micelles / K.L. Vasina, M.E. Zinoyeva, V.S. Gamaurova // Ферменты микроорганизмов в биотехнологии и медицине: тез. докл. XIV Международ. конф. – Казань: КГУ, 2009. – С. 90-91.

5. Гамаюрова, В.С. Влияние воды на ферментативный гидролиз растительных масел в неводных средах / В.С. Гамаюрова, К.Л. Васина // Биотехнология. Вода и пищевые продукты: материалы Международ. науч.- практ. конференции. – М.: ЗАО “Экспо-биохим-технологии”, РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2008. – С. 264.

6. Васина, К.Л. Иммобилизация ферментных препаратов липаз / К.Л. Васина, М.Е. Зиновьева, В.С. Гамаюрова // Пищевые технологии и биотехнологии: тез. докл. X Международ. конф. молодых ученых. – Казань: Изд-во «Отечество», 2009. – С. 234.

7. Васина, К.Л. Влияние ионов кальция и магния на активность ферментного препарата панкреатической липазы / К.Л. Васина, М.Е. Зиновьева, В.С. Гамаюрова // Материалы конкурса студ. науч.-исслед. работ, 2007. – С. 276.

8. Васина, К.Л. Влияние гексана на ферментативный гидролиз льняного масла в системе обращенных мицелл / К.Л. Васина, В.С. Гамаюрова // Научная сессия. Аннотации сообщений, 5-9 февраля 2007 г. – Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2007. – С. 244.

9. Васина, К.Л. Влияние ионов кальция на активность иммобилизованной панкреатической липазы / К.Л. Васина, В.С. Гамаюрова // Научная сессия. Аннотации сообщений, 5-9 февраля 2007 г. – Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2007. – С. 245.

10. Васина, К. Л. Ферментативный гидролиз растительных масел в системе обращенных мицелл АОТ / К.Л. Васина, М.Е. Зиновьева, В. С. Гамаюрова // Научная сессия. Аннотации сообщений, 4-8 февраля 2008 г. – Казань: Изд-во Казан. гос. технол. ун-та, 2008. – С. 241.

11. Васина, К.Л. Получение полиненасыщенных жирных кислот ферментативным гидролизом растительных масел / К.Л. Васина, М.Е. Зиновьева, В.С. Гамаюрова // Научная сессия. Аннотации сообщений, 3-6 февраля 2009 г. – Казань: Изд-во. Казан. гос. технол. ун-та, 2008. – С. 237.

12. Васина, К.Л. Иммобилизация липаз в агаровый гель / К.Л. Васина, М.Е. Зиновьева, В.С. Гамаюрова // Научная сессия. Аннотации сообщений, 3-6 февраля 2009 г. – Казань: Изд-во. Изд-во. Казан. гос. технол. ун-та, 2008. – С. 238.

Соискатель

Шнайдер

К.Л. Шнайдер

Подписано к печати 23.11.2009
Формат 60x84/16. Бумага офсетная.
Усл.-печ. л. 1.0. Печать резотрафическая.
Тираж 100 экз.. Заказ 330
Отпечатано с готовых оригинал макетов.

420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 34
ЗАО «Альфа-Т», тел. 510-96-35