

27. *Khassin A.A., Yurieva T.M., Kaichev V.V., Bukhtiyarov V.I., Budneva A.A., Paukshtis E.A., Parmon V.N.* // J. Mol. Catal. A. 2001. Vol. 175. P. 189.
28. *Khairallah F., Glisenti A.* // J. Mol. Catal. A. 2007. Vol. 274. P. 137.
29. *Позин М.Е.* Технология минеральных солей. 4-е изд. Ч. 1. Л., 1974. С. 263.
30. *Smith D.K., Cline C.F.* // J. Amer. Ceram. Soc. 1962. Vol. 45. P. 249.
31. *Сухаревский Б.Я., Алапин Б.Г., Гавриш А.М.* // Изв. АН СССР. Неорганические материалы. 1965. Т. 1, № 9. С. 1537.
32. *Иванова А.С.* // Кинетика и катализ. 2001. Т. 42, № 3. С. 394.

УДК 577.15

ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА КАСТОРОВОГО МАСЛА

© 2013 г. **В.С. Гамаюрова,**
М.Е. Зиновьева,
Чан Т.Т. Хыонг

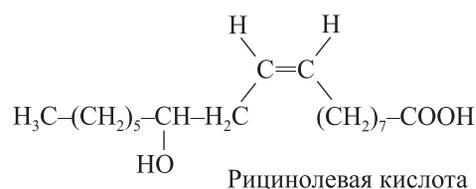
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВПО «КНИТУ»)

Введение

Касторовое масло, получаемое из семян клещевины, относится к невысыхающим жидким маслам и содержит до 85 % рицинолевой кислоты, а современные селекционированные сорта клещевины позволяют получать масло с содержанием рицинолевой кислоты до 95 %. Основные мировые производители касторового масла — Индия и Китай. Благодаря высокому содержанию рицинолевой кислоты касторовое масло широко используется в медицине и ветеринарии, а такие свойства, как высокая вязкость, оксидостабильность и большая плотность, позволяют использовать его в промышленности для различных целей.

Одно из важнейших направлений в использовании касторового масла — получение рицинолевой кислоты. Это непредельная гидроксикислота, име-

ющая *цис*-конформацию у 9-го атома углерода и хиральный 12-й атом углерода.



Рицинолевая кислота представляет интерес для медицины, так как обладает эффективным бактерицидным, противовоспалительным и противогерпетическим действием. Но основная область ее применения — органический синтез: получение ряда кислот (себациновой, ундециленовой и азе-лаиновой), гептанола, 2-октанола, ПАВ и других ценных продуктов [1, 2]. Получают рицинолевую кислоту гидролизом касторового масла. В промышленности используют щелочной гидролиз при 150 °С с последующим подкислением. Получаемая кислота имеет неприятный запах и окрашена, содержит много примесей, в частности трудно отделяемый сульфат натрия [3–5]. При этом кроме рицинолевой кислоты образуется дирицинолевая, а при более высоких температурах — тетра- и пента-рицинолевые кислоты.

Гамаюрова В.С. – д-р хим. наук, проф. кафедры пищевой биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» (ФГБОУ ВПО «КНИТУ»). Тел.: 2-314-165. E-mail: gataur@kstu.ru

Зиновьева М.Е. – канд. техн. наук, доцент того же университета. Тел.: 2-314-173. E-mail: zino-mari@yandex.ru

Чан Тху Хыонг – аспирант того же университета. Тел. тот же. E-mail: huong_htb0902@yahoo.com

В связи с этим вполне естественны попытки заменить химический гидролиз на ферментативный, который позволил бы получить чистую рицинолеву кислоту в мягких условиях: в интервале температур 35—45 °С и без повышенного давления [3—5]. При ферментативном гидролизе льняного и рапсового масел нам удалось достичь выхода жирных кислот 85 и 45 % соответственно [6]. Получению высокого выхода рицинолевой кислоты препятствует в основном высокая вязкость касторового масла, затрудняющая образование устойчивых эмульсий «масло — вода», тогда как ферментативный гидролиз идет на границе раздела фаз. В работах [3—5] эту проблему пытаются решить добавлением эмульгаторов, растворителей, повышением скорости гомогенизации, оптимизацией всех технологических параметров.

Авторам [4] удалось повысить выход рицинолевой кислоты при ферментативном гидролизе касторового масла (с использованием в качестве катализатора липазы из *Aspergillus oryzae*) с 5—6 % до 40 % путем подбора среды реакции и оптимизации технологических параметров процесса.

Другим решением проблемы ферментативного гидролиза касторового масла является поиск новых высокоэффективных и селективных ферментативных систем.

Использование эмульгаторов и растворителей повышает устойчивость эмульсии и снижает вязкость касторового масла, но затрудняет процесс выделения рицинолевой кислоты, поэтому целью данной работы было исследование ферментативного гидролиза касторового масла в системе «масло — вода» в отсутствие эмульгатора с использованием в качестве катализатора липазы из *Candida rugosa* и подбор условий проведения данного процесса.

Материалы и методы

В качестве катализатора использовали коммерческий препарат Lipase from *Candida rugosa*, Type VII, лиофильно высушенный (активность — 700—1500 ед./мг белка по оливковому маслу, производитель — Япония).

Исходная активность исследуемого ферментного препарата липазы, определенная модифицированным методом Ота, Ямада [7], составила 715 ед./мг.

Жирнокислотный состав касторового масла определяли методом газожидкостной хроматографии. Жирные кислоты анализировали в виде их мети-

ловых эфиров на хроматографе Shimadzu-GC-8A с плазменно-ионизационным детектором с использованием насадочной колонки (2,0 м × 2,5 мм), заполненной 5 % ДЭГА (Р) на Chromaton N-super, в режиме программирования температуры. Газ-носитель — гелий со скоростью потока 30 мл/мин. Идентификацию кислот проводили путем сравнения относительного времени удерживания их метиловых эфиров по отношению к стандарту (18920-LAMP).

Гидролиз касторового масла липазой из *Candida rugosa* в системе «масло — вода» проводили, используя высокоскоростной пищевой диспергатор марки PHILIPS мощностью 700 Вт. Перемешивание осуществляли в течение 10—12 мин при 22—25 °С до получения однородной эмульсии «масло — вода». Сухой ферментный препарат липазы (20—40 мг) вводили в 30 мл эмульсии «масло — вода» (объемное соотношение компонентов варьировали от 40 : 2 до 40 : 7). Реакцию проводили при 37—50 °С с перемешиванием (100—200 об./мин) в течение 1—48 ч.

Количество выделившихся в ходе реакции жирных кислот определяли методом титрования. Для этого проводили отбор образцов эмульсии каждый час. Объем используемого для титрования образца эмульсии составлял 1 мл. Титрование проводили 0,1 н спиртовым раствором NaOH в присутствии 1 %-ного раствора фенолфталеина до устойчивой (не исчезающей в течение 1 мин) розовой окраски.

Контрольный образец эмульсии не содержал фермента.

Выход жирных кислот (мкМ/мл) рассчитывали по формуле

$$A = (O - K)T \cdot 100,$$

где O — количество 0,1 н спиртового раствора NaOH, пошедшее на титрование пробы, мл; K — количество 0,1 н спиртового раствора NaOH, пошедшее на титрование контрольного образца эмульсии, мл; T — титр щелочи; 100 — коэффициент пересчета в микромоли жирных кислот.

Кроме того, оценивали выход жирных кислот в процентах от теоретического.

Все эксперименты проводились не менее чем в трех повторностях, каждая точка является результатом, как минимум, шести измерений. Расчет погрешности измерений произведен по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента при доверительной вероятности 0,95.

Результаты и их обсуждение

Ферментативный гидролиз липидов — гетерогенный процесс, так как подавляющее большинство липаз растворимо в воде, а субстратные молекулы нерастворимы и объединены в малоподвижные ассоциаты (мицеллы, эмульгированные жировые капли). Чем выше степень диспергирования субстрата, тем быстрее идет липолиз. Для увеличения площади поверхности раздела фаз широкое применение нашли эмульгаторы различной природы (целлюлоза, гуммиарабик, ПВС, желатин и другие). Однако отделение продуктов гидролиза от эмульгатора (ПАВ) является весьма сложным и дорогостоящим процессом. В связи с этим в данной работе исследовалась возможность ферментативного гидролиза касторового масла в отсутствие эмульгатора, что значительно упрощает технологическое оснащение процесса. Ферментативный процесс протекает при умеренных температурах, атмосферном давлении, с перемешиванием, в отсутствие эмульгатора, что облегчает выделение целевого продукта.

На ферментативный гидролиз масел оказывают влияние различные факторы: соотношение масло/вода, температура, количество фермента, продолжительность гидролиза и др. В результате исследований были экспериментально определены оптимальные условия проведения процесса гидролиза касторового масла с применением в качестве катализатора липазы, выделенной из *Candida rugosa*.

Жирнокислотный состав используемого субстрата — касторового масла — представлен в таблице.

В ходе первого этапа работы было изучено влияние содержания воды в системе на выход целевого продукта — жирных кислот (рис. 1). Как видно из данных, с повышением содержания воды в системе выход целевого продукта увеличивается, что закономерно, так как вода является непосредственным участником реакции гидролиза. Увеличение содер-

Содержание жирных кислот в касторовом масле

Кислота	Содержание, мас. %
Рицинолевая	82,5
Линолевая	8,0
Олеиновая	7,4
Пальмитиновая	1,9
Эйкозеновая	≈0,1
Линоленовая	≈0,1

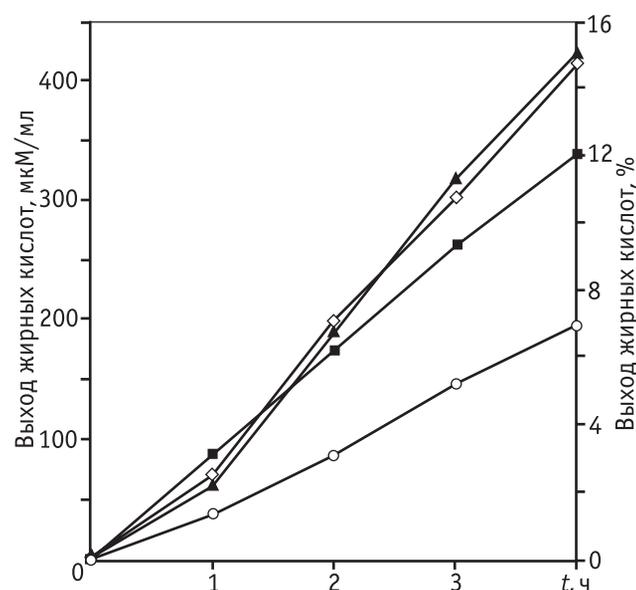


Рис. 1. Зависимость выхода жирных кислот от времени при соотношениях масло/вода: 40 : 2 (○), 40 : 5 (■), 40 : 6 (▲), 40 : 7 (◇). Условия гидролиза: 37 °С, количество фермента — 1 мг/мл, скорость перемешивания 150 об./мин

жания воды в системе с 4,77 % (40 : 2) до 13,0 % (40 : 6) позволило повысить глубину гидролиза более чем в два раза. Однако дальнейшее увеличение содержания воды (40 : 7) не дает положительного эффекта, что обусловлено особенностями касторового масла. Являясь вязкой средой, касторовое масло образует неустойчивые быстро расслаивающиеся эмульсии, а повышенное содержание воды в системе (более 13 %) приводит к быстрому расслоению эмульсии и к уменьшению поверхности раздела фаз. А так как гидролиз протекает именно на границе раздела фаз, его скорость уменьшается. При использовании касторового масла наибольшей устойчивостью обладали эмульсии, получаемые при соотношении масло : вода, равном 40 : 5. Такая эмульсия была устойчива в течение 60—70 мин.

На втором этапе было изучено влияние количества фермента, вносимого в реакционную среду, на выход жирных кислот. Согласно полученным данным (рис. 2), увеличение содержания ферментного препарата не оказывало существенного влияния на выход жирных кислот на начальных этапах гидролиза, но при увеличении длительности процесса до 3—4 ч более высокие концентрации фермента в среде позволяют увеличить глубину гидролиза. Так как с увеличением продолжительности гидролиза возрастает содержание свободных жирных кислот, оказывающих ингибирующее влияние на фермент,

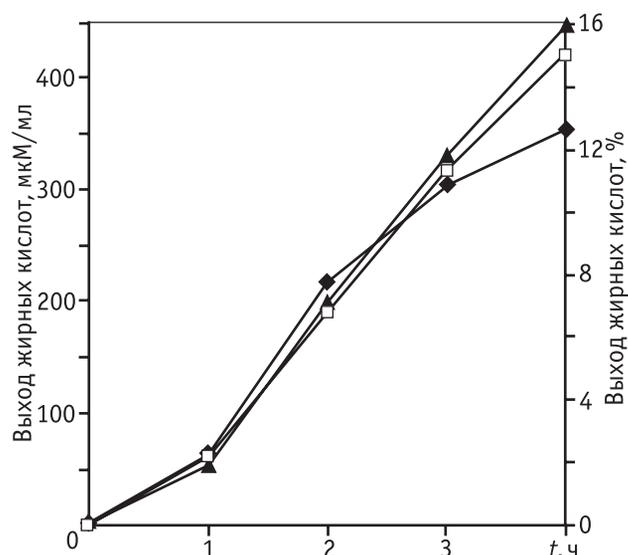


Рис. 2. Зависимость выхода жирных кислот от времени при количествах фермента, мг/мл: 0,7 (◆), 1,0 (□), 1,3 (▲). Условия гидролиза: 37 °С, масло : вода = 40 : 6, скорость перемешивания 150 об./мин

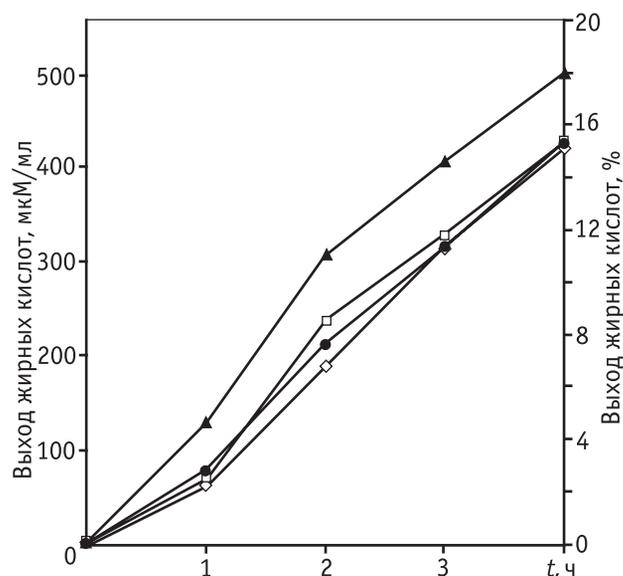


Рис. 3. Зависимость выхода жирных кислот от времени при температурах, °С: 37 (◇), 40 (□), 45 (▲), 50 (●). Условия гидролиза: масло : вода = 40 : 6, количество фермента – 1 мг/мл, скорость перемешивания 150 об./мин

то при более высоком содержании фермента в среде ингибирующее влияние ослабляется. Вследствие дороговизны ферментных препаратов целесообразно проводить процесс гидролиза при его концентрации 1 мг/мл.

Известно, что изменение температуры оказывает значительное влияние на скорость ферментативных

реакций. В настоящей работе ферментативный гидролиз касторового масла в системе «масло — вода» осуществляли в диапазоне температур 37—50 °С. Результаты представлены на рис. 3.

При проведении гидролиза касторового масла в системе без эмульгатора оптимальной температурой гидролиза, как видно из полученных результатов, является температура 45 °С, хотя оптимальная температура действия данного фермента согласно паспорту составляет 37 °С. Увеличение скорости гидролиза при повышении температуры обусловлено уменьшением вязкости системы и ускорением диффузии продуктов и субстратов к границе раздела фаз. Снижение скорости процесса при температуре 50 °С связано с негативным влиянием высокой (для фермента) температуры на конформацию липазы и, возможно, с ее частичной денатурацией.

В ходе работы исследовано влияние скорости перемешивания на выход целевого продукта (рис. 4).

Перемешивание эмульсии осуществлялось с помощью перемешивающего устройства (шейкер-инкубатор) марки ЛАБ-ПУ-01 в диапазоне частоты вращения 100—200 об./мин. Установлено, что увеличение скорости перемешивания эмульсии «масло — вода» при прочих оптимальных условиях процесса позволяет повысить выход жирных кислот за

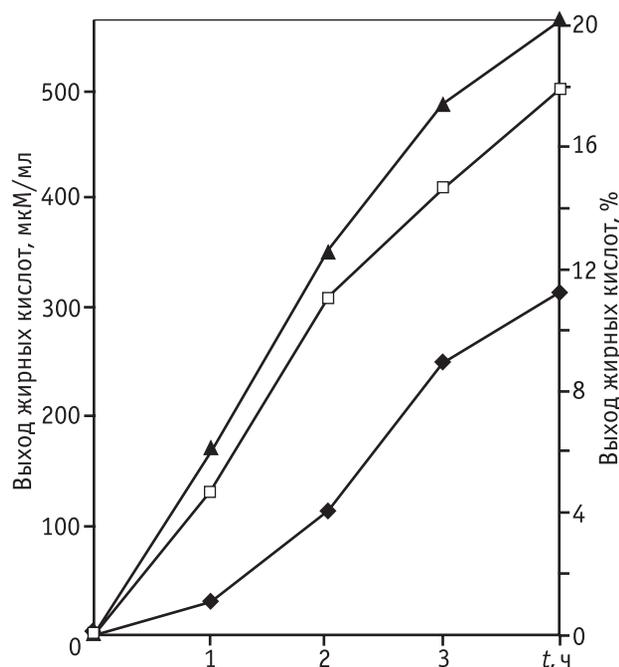


Рис. 4. Зависимость выхода жирных кислот от времени при скоростях перемешивания, об./мин: 100 (◆), 150 (□), 200 (▲). Условия гидролиза: 45 °С, масло : вода = 40 : 6, количество фермента – 1 мг/мл

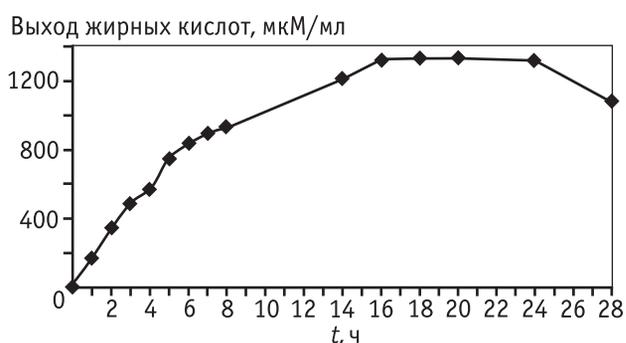


Рис. 5. Зависимость выхода жирных кислот от времени при гидролизе касторового масла в оптимальных условиях: 45 °С, масло : вода = 40 : 6, количество фермента – 1 мг/мл, скорость перемешивания – 200 об./мин

4 ч с 18 до 20 %. Наибольший выход целевого продукта получен при частоте перемешивания 200 об./мин. Проведение гидролиза при более высокой скорости перемешивания (с применением магнитной мешалки) показало, что выход продукта увеличился мало, а энергетические затраты значительно возросли, поэтому дальнейшие исследования проводили с применением перемешивающего устройства марки ЛАБ-ПУ-01.

В результате экспериментов определены оптимальные условия гидролиза касторового масла: 45 °С, масло : вода = 40 : 6, количество фермента — 1 мг/мл, частота вращения перемешивающего устройства — 200 об./мин.

При оптимальных условиях процесса исследована зависимость выхода жирных кислот от времени гидролиза. Процесс проводили в течение 48 ч. На рис. 5 показаны данные лишь для периода 0–28 ч, когда выход продукта существенно изменяется: сначала он плавно увеличивается во времени, достигая максимума (47 %) к 16 ч. В течение последующих 8 ч выход изменяется незначительно, а далее начинают играть роль процессы, обратные гидролизу, то есть процессы этерификации, что приводит к некоторому снижению выхода жирных кислот: к 48 ч их выход снизился на 2–3 %.

Заключение

Предложен метод гидролиза касторового масла липазой из *Candida rugosa* в системе «масло — вода»,

позволяющий исключить применение эмульгатора и тем самым упростить стадию отделения продуктов гидролиза и соответственно технологию процесса.

Изучена зависимость выхода жирных кислот от основных параметров ферментативного гидролиза касторового масла ферментным препаратом липазы. Определены условия проведения гидролиза, при которых выход жирных кислот достигает 47 %.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Наноматериалы и нанотехнологии» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» по госконтракту № 01201252915 от 28.02.2012 г., тема «Разработка биологически активных добавок на основе супрамолекулярных бионаносистем».

Литература

1. Пат. 2135161 РФ. Композиция «Рициниол» для лечения и косметического ухода за слизистыми оболочками, кожей и волосами / О.Н. Марцинкевич, опубл. 27.08.99 г.
2. Пат. 2166309 РФ. Лечебно-профилактическая и косметическая композиция / Т.Н. Разумова, опубл. 10.05.2001 г.
3. Meenal S. Puthli, Virendra K. Rathod, Aniruddha B. Pandit. Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies // *India Biochemical Engineering Journal* 31/ 2006. P. 31–41.
4. Virendra K. Rathod, Anirudha B. Pandit. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil // *Biochemical Engineering Journal*/ № 47/ 2009. P. 93–99.
5. Debajyoti Goswami, Ramkrishna Sen, Jayanta Kumar Basu, Sirshendu De. Maximization of bioconversion of castor oil into ricinoleic acid by response surface methodology // *Bioresource Technology* 100/ 2009. P. 4067–4073.
6. Гамаюрова В.С., Зиновьева М.Е. Ферментативный катализ в неводных средах // *Бутлеровские сообщения*. Т. 25/ № 7/ 2011. С. 87–95.
7. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов: Учеб. пособие для вузов / И.М. Грачева, Ю.П. Грачев, М.С. Мосичев и др. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982. С. 75.