

УДК 665:664.3

Некрасов П.О.

ДОСЛІДЖЕННЯ КІНЕТИКИ ПРОЦЕСУ ОТРИМАННЯ СТРУКТУРОВАНИХ ЛІПІДІВ МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ ТРАНСЕТЕРИФІКАЦІЇ ЖИРІВ

Актуальність проблеми. Харчування із самого моменту народження людини відіграє ключову роль у збереженні його здоров'я, формуючи потенціал, що забезпечує довголіття. Різні поживні речовини, надходячи з їжею в організм і переутворюючись у ході метаболізму в результаті складних біохімічних процесів у структурні елементи клітин, забезпечують його пластичним матеріалом і енергією, визначаючи здоров'я, фізичну та розумову активність, тривалість життя людини, її здатність до репродукування.

Згідно даним Всесвітньої організації охорони здоров'я з кожним роком зростає число людей з аліментарно-залежними захворюваннями, тобто захворюваннями, для яких доведено безпосередній зв'язок з неправильним харчуванням.

У зв'язку із цим виникла необхідність створення функціональних харчових продуктів. Під поняттям «функціональних» мають на увазі продукти харчування, які при включенні в харчовий раціон забезпечують організм людини не стільки енергетичним і пластичним матеріалом, скільки контролюють та оптимізують конкретні фізіологічні функції та біохімічні реакції.

Олійно-жирова промисловість становить один з основних сегментів ринку функціональних харчових продуктів. До них належать структуровані ліпіди (СТЛ), які мають у своєму складі середньоланцюгові ацили, омега-3 і омега-6 поліненасичені кислоти. СТЛ розглядаються як нове покоління жирів, що є нутріцевіками, тобто компонентами харчових продуктів, які збільшують поживну цінність останніх або роблять їх корисними для здоров'я, включаючи можливість запобігання та лікування хвороб [1–3].

Отримання структурованих ліпідів методом ферментативної трансетерифікації жирів є інноваційною технологією, яка в останні роки плідно розробляється на кафедрі технології жирів та продуктів бродіння Національного технічного університету «ХПІ».

Мета представленої роботи полягала в комплексному дослідженні та аналізі кінетики ферментативної трансетерифікації жирів, що спрямована на отримання структурованих ліпідів.

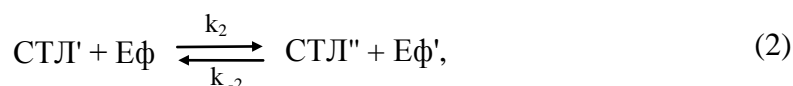
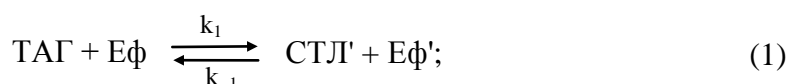
Модельними триацилгліцерином, що містить ацили поліненасичених кислот, та ефіром середньоланцюгової кислоти – було обрано відповідно трилінолеїн та етиловий ефір каприлової кислоти. Співвідношення вказаних компонентів в модельній суміші становило 1 моль : 8 моль, при якому, за попередніми результатами, спостерігався найбільший вихід цільового продукту. Реакцію каталізували за допомогою ферментного препарату 1,3-специфічної ліпази Lipozyme RM IM виробництва фірми «Novozymes» (Данія). Кількість біокаталізатора – 10 % мас. по відношенню до маси реакційної суміші. Процес проводили в двох паралелях при температурах 50 °С, 60 °С, 70 °С протягом 6 годин при постійному перемішуванні під шаром азоту.

Через визначені проміжки часу відбирались проби, ліпідний склад яких аналізувався методом високотемпературної газорідинної хроматографії у відповідності із AOCS Official Method Cd 11b-91 [4]. Використовувався хроматограф Clarus 500 Gas Chromatography (Perkin-Elmer), оснащений полум'яно-іонізаційним детектором (ПІД). Колонка Restek Rtx-65TG, капілярна; її геометричні параметри: довжина 30 м, 0,25 мм

внутрішній діаметр, 0,2 мкм товщина нерухомої фази. Стаціонарна фаза Crossbond 35 % диметил – 65 % діфенілполісілоксан. Температурна програма 80 °С (0 хв.), 10 °С/хв. до 320 °С (0 хв.), 5 °С/хв. до 360 °С (15 хв.) Температура інжектора – 320 °С, температура детектора – 370 °С. Газ-носієй – гелій. Швидкість газу-носія 3 см³/хв. Спліт 1 : 50. Витрата повітря для ПІД – 450 см³/хв., витрата водню для ПІД – 45 см³/хв. Обсяг проби, що вводився, – 0,5 мкл.

Отримані експериментальні дані застосовувались як вихідні для дослідження кінетики процесу з використанням математичного моделювання.

Раніше проведені нами дослідження ферментативної трансестерифікації жирів з метою отримання структурованих ліпідів показали, що вказаний процес обумовлен одночасним перебігом двох реакцій:



де k_1, k_2 є константами швидкостей прямих реакцій, і k_{-1}, k_{-2} – відповідні величини для зворотних реакцій. У рівняннях прийняті наступні позначення компонентів: ТАГ – триацилгліцерин; Еф – етиловий ефір середньоланцюгової кислоти; Еф' – етиловий ефір довголанцюгової кислоти; СТЛ' – однозаміщений структурований ліпід (монокапрілоділінолеїн); СТЛ'' – двозаміщений структурований ліпід (дікапріломонолінолеїн).

На основі приведених реакцій для математичного моделювання було складено систему нелінійних диференціальних рівнянь, що описують зміну концентрацій вихідних субстратів і продуктів реакцій у часі.

$$\left. \begin{aligned} \frac{d[\text{ТАГ}]}{d\tau} &= -k_1[\text{ТАГ}][\text{Еф}] + k_{-1}[\text{СТЛ}'][\text{Еф}']; \\ \frac{d[\text{Еф}]}{d\tau} &= -k_1[\text{ТАГ}][\text{Еф}] + k_{-1}[\text{СТЛ}'][\text{Еф}] - k_2[\text{СТЛ}'][\text{Еф}'] + k_{-2}[\text{СТЛ}''][\text{Еф}']; \\ \frac{d[\text{Еф}']}{d\tau} &= k_1[\text{ТАГ}][\text{Еф}] - k_{-1}[\text{СТЛ}'][\text{Еф}'] + k_2[\text{СТЛ}'][\text{Еф}'] - k_{-2}[\text{СТЛ}''][\text{Еф}']; \\ \frac{d[\text{СТЛ}']}{d\tau} &= k_1[\text{ТАГ}][\text{Еф}] - k_{-1}[\text{СТЛ}'][\text{Еф}'] - k_2[\text{СТЛ}'][\text{Еф}'] + k_{-2}[\text{СТЛ}''][\text{Еф}']; \\ \frac{d[\text{СТЛ}'']}{d\tau} &= k_2[\text{СТЛ}'][\text{Еф}'] - k_{-2}[\text{СТЛ}''][\text{Еф}']. \end{aligned} \right\} \quad (3)$$

Для ідентифікації констант швидкостей прямих та зворотних реакцій здійснювався процес моделювання в середовищі Mathcad 14 (Parametric Technology Corporation) з використанням методу оптимізації, у ході якого проводилася мінімізація помилок між експериментальними та модельними даними. У якості чисельної процедури моделювання диференціальних рівнянь було використано метод Рунге-Кутта зі змінним кроком четвертого порядку точності. Отримані за допомогою зазначеного методу дані використовувались для обчислення цільової функції $J(k)$, яка фактично становила помилку між експериментальними та модельними даними, і мала такий вигляд:

$$J(k) = \sum_{i=0}^m \left\| x_i - \bar{x}(t_i, x^0, k) \right\|^2, \quad (4)$$

де x_i – значення вектора станів системи, отримані експериментальним шляхом у момент часу t_i ; $\bar{x}(t_i, x^0, k)$ – значення вектора станів системи, обчислені з використанням обраної процедури імітаційного моделювання в момент часу t_i з початковими умовами $x^0 = x_0 = \bar{x}(t_0, x^0, k)$; k – вектор параметрів системи; m – кількість наборів експериментальних даних.

Для оптимізації застосовувався алгоритм випадкового багатомірного пошуку – метод комплексів [5].

У результаті було розроблено програму, що дозволила визначити чисельні значення констант швидкостей прямих і зворотних реакцій, які протікають у процесі ферментативної трансетерифікації жирів, а також їх констант рівноваги (відповідно табл. 1 та 2).

Таблиця 1 – Константи швидкостей $\left(\frac{1}{\text{моль} \cdot \text{ч} \cdot \text{год}} \right)$

Реакція	Значення констант швидкостей при різних температурах					
	50 °C		60 °C		70 °C	
	Пряма	Зворотна	Пряма	Зворотна	Пряма	Зворотна
$\text{ТАГ} + \text{Еф} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} \text{СТЛ}' + \text{Еф}'$	0,0258	0,0041	0,0382	0,0052	0,0530	0,0058
$\text{СТЛ}' + \text{Еф} \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} \text{СТЛ}'' + \text{Еф}'$	0,0131	0,0062	0,0232	0,0077	0,0342	0,0091

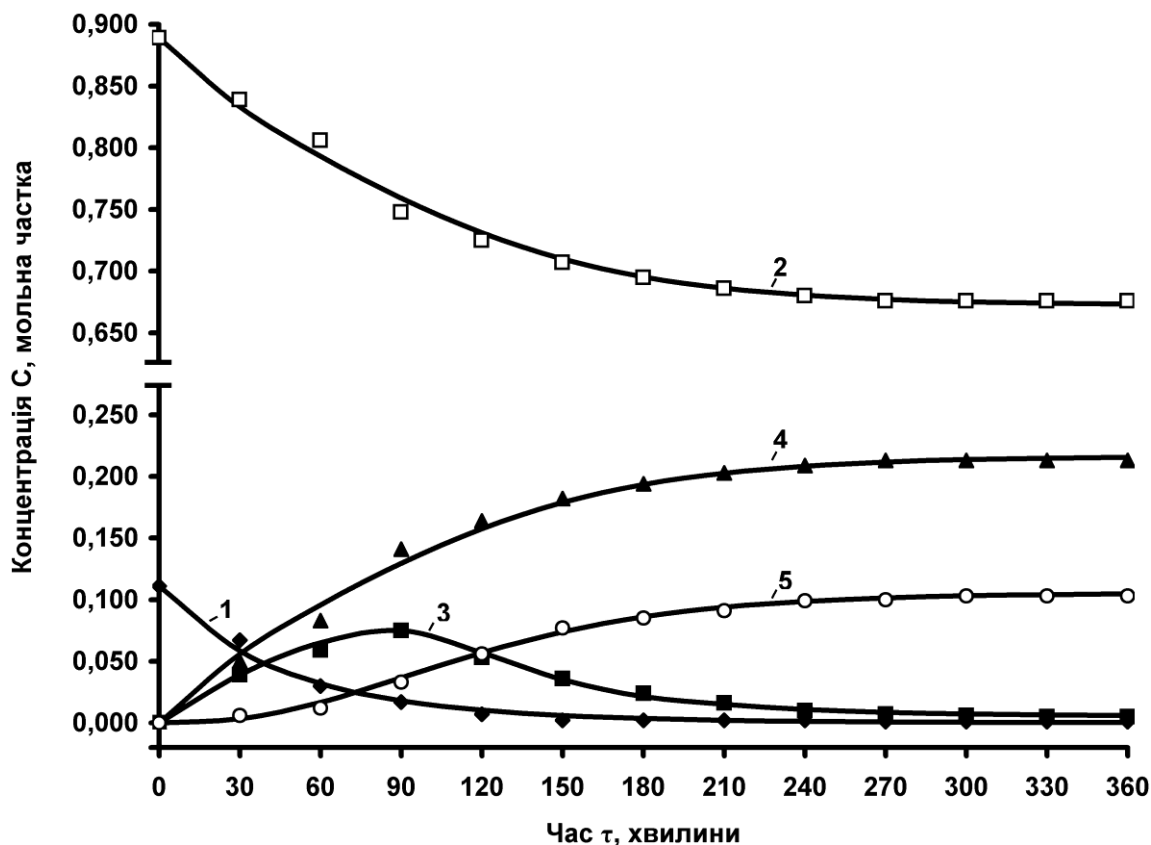
Таблиця 2 – Константи рівноваги (K_p)

Реакція	Значення констант рівноваги при різних температурах		
	50 °C	60 °C	70 °C
$\text{ТАГ} + \text{Еф} \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} \text{СТЛ}' + \text{Еф}'$	6,29	7,35	9,14
$\text{СТЛ}' + \text{Еф} \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} \text{СТЛ}'' + \text{Еф}'$	2,11	3,01	3,76

Аналіз даних, представлених в таблицях 1 та 2, дозволяє зробити висновок, що прямі реакції перевищують зворотні, тобто спостерігається спрямованість в бік отримання продуктів. Чисельні значення констант швидкостей прямих та зворотніх реакцій, а також констант рівноваги збільшуються з підвищенням температури трансетерифікації. Крім того, взаємодія однозаміщеного структурованого ліпиду з етиловим ефіром каприлової кислоти є лімітуючою стадією процесу в цілому, про що свідчить відно-

шення чисельних значень констант швидкостей прямих реакцій при температурах проведення експерименту, тобто $k_1 > k_2$.

Розроблена програма додатково дала можливість моделювати зміни концентрацій вихідних речовин і продуктів реакцій у часі при заданих співвідношеннях субстратів і температурі. Отримані експериментально та змодельовані дані представлено на рис. 1.



Експериментальні дані: \blacklozenge – ТАГ; \square – Еф; \blacksquare – СТЛ'; \blacktriangle – Еф'; \circ – СТЛ''

Моделі: 1 – ТАГ; 2 – Еф; 3 – СТЛ'; 4 – Еф'; 5 – СТЛ''

Рисунок 1 – Експериментальна та отримана за допомогою математичного моделювання кінетика ферментативної трансестерифікації жирів (температура процесу 70 °С)

Для перевірки адекватності отриманої моделі за формулою (5) обчислювалося середнє значення помилки між експериментальними та розрахованими даними.

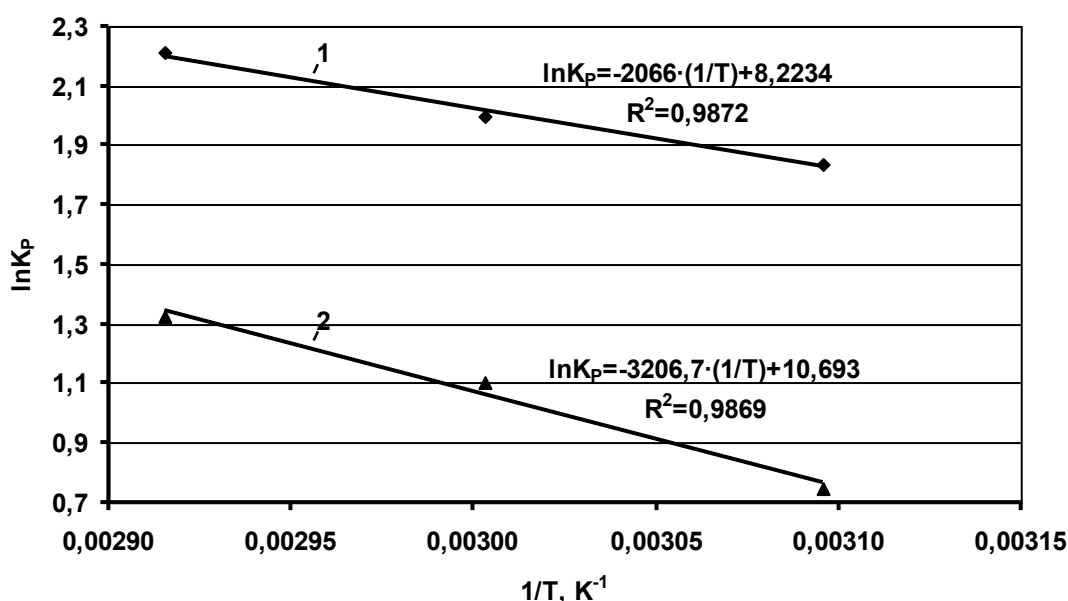
$$\tilde{J}(k) = \frac{\sum_{i=0}^m \|x_i - \bar{x}(t_i, x^0, k)\|^2}{m}. \quad (5)$$

Обчислене значення склало 0,011, коефіцієнт кореляції дорівнював 0,9902. Зазначені величини і дані, наведені на рис. 1, свідчать про те, що розроблена математична модель адекватно описує факторний простір експерименту.

При аналізі ходу кінетичних залежностей (рис. 1) можна зробити висновок, що основна частка однозаміщеного структурованого ліпиду (СТЛ') утворюється через 2,5 години. Разом з тим час, який необхідний для одержання цільового продукту при заданих умовах становить 5 годин. Це пояснюється тим, що швидкість прямої реакції (1) значно перевищує аналогічний показник реакції (2). Таким чином, підтверджується попередньо зроблений висновок, що лімітувальною стадією процесу є друга реакція.

Для створення цілісної картини кінетики ферментативного процесу отримання структурованих ліпідів на підставі даних, представлених у табл. 1 і 2, було обчислено термодинамічні параметри вказаних реакцій.

Спочатку в напівлогарифмічних координатах були побудовані залежності $\ln K_p = f(1/T)$ (рис. 2).



1 – залежність $\ln K_p = f(1/T)$ для реакції $\text{ТАГ} + \text{Еф} \rightleftharpoons \text{СТЛ}' + \text{Еф}'$;
 2 – залежність $\ln K_p = f(1/T)$ для реакції $\text{СТЛ}' + \text{Еф} \rightleftharpoons \text{СТЛ}'' + \text{Еф}'$.

Рисунок 2 – Залежність логарифмів констант рівноваги від зворотних значень температури

Залежності, що приведені на рис. 2, для кожної реакції підпорядковуються рівнянням прямих ліній з відповідними кутовими коефіцієнтами. Це дозволило розрахувати чисельні значення теплових ефектів ΔH за формулою:

$$\Delta H = -\text{tg}\alpha \cdot R, \tag{6}$$

де $\text{tg}\alpha$ – кутовий коефіцієнт, R – універсальна газова стала, Дж/(моль·К).

Енергію Гіббса ΔG та ентропію ΔS в інтервалі температур 50 – 70 °С (323–343К) визначали за формулами (7) та (8) відповідно:

$$\Delta G = -RT \ln K_p, \tag{7}$$

де K_p – константа рівноваги при відповідній температурі T .

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (8)$$

Величину енергії активації для прямих та зворотних реакцій в області оптимальних значень температурних режимів процесу 60–70 °С (333–343К) розраховували за формулою:

$$E_{\text{акт}} = \frac{RT_1T_2}{T_2 - T_1} \ln \frac{k_{T_2}}{k_{T_1}}, \quad (9)$$

де k_{T_1} та k_{T_2} – константи швидкості при температурах T_1 та T_2 .

Чисельні значення термодинамічних характеристик досліджуваних реакцій та їх енергій активації представлено в табл. 3 та 4 відповідно.

Таблиця 3 – Термодинамічні характеристики

Реакція	ΔH , кДж/моль	ΔG , кДж/моль			ΔS , кДж/(моль·К)		
		50 °С	60 °С	70 °С	50 °С	60 °С	70 °С
ТАГ+Еф \rightleftharpoons СТЛ'+Еф'	17,18	-4,94	-5,52	-6,31	0,07	0,07	0,07
СТЛ'+Еф \rightleftharpoons СТЛ''+Еф'	26,66	-2,01	-3,05	-3,78	0,09	0,09	0,09

Таблиця 4 – Енергія активації

Реакція	Енергія активації, кДж/моль	
	Пряма	Зворотна
ТАГ+Еф \rightleftharpoons СТЛ'+Еф'	31,10	10,37
СТЛ'+Еф \rightleftharpoons СТЛ''+Еф'	36,85	15,86

Аналізуючи дані, наведені в табл. 3 і 4, необхідно відзначити, що для обох реакцій чисельне значення теплового ефекту ΔH позитивне і енергії активації в прямому напрямку суттєво більше відповідних величин для зворотних. Це свідчить про те, що зазначені реакції ендотермічні, тобто протікають із поглинанням тепла.

Зі зростанням температури для обох реакцій значення ΔG зменшується, тобто тим переважніше реакції йдуть убік утворення продуктів. У той же час при всіх температурах значення ΔG першої реакції набагато менше аналогічного показника для другої реакції. Це підтверджує раніше зроблений висновок про те, що друга реакція більш утруднена і є лімітувальною для всього процесу в цілому.

Висновки. Таким чином, результати здійснених досліджень та математичного моделювання дозволили визначити константи швидкостей прямих і зворотних реакцій, що протікають в процесі ферментативної трансетерифікації жирів, а також константи рівноваги кожної з них. Це дало можливість розрахувати термодинамічні параметри та зробити висновок про внесок кожної з реакцій в загальний процес у цілому. Крім того,

результати моделювання можуть бути основою для розробки системи автоматизованого керування технологією отримання структурованих ліпідів, що дозволить здійснювати якісну та кількісну оцінку складу реакційної суміші з наступною оптимізацією технологічних параметрів.

Література

1. Akoh C.C. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology, 3rd ed. / Casimir C. Akoh and David B. Min. – CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 2008.– 914 p.
2. Mu H. The metabolism of structured triacylglycerols / H. Mu, T. Porsgaard // Progress in Lipid Research.– 2005.– Vol. 44, №6.– P. 430–448.
3. Gunstone F.D. The lipid handbook, 3rd ed. / F. D. Gunstone, J. L. Harwood, A. J. Dijkstra, – CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, 2007.– 719 p.
4. AOCS. In: Firestone D, editor. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society. 5th ed. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society (AOCS), 2003.
5. Растринин Л.А. Системы экстремального управления / Л.А. Растринин. – М.: Наука, 1974 – 632 с.

УДК 665:664.3

Некрасов П.А.

**ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ
СТРУКТУРИРОВАННЫХ ЛИПИДОВ МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ
ТРАНСЭТЕРИФИКАЦИИ ЖИРОВ**

Выполнено математическое моделирование кинетики ферментативной трансэтерификации жиров. Определены константы скоростей прямых и обратных реакций, а также их константы равновесия. Рассчитаны термодинамические параметры и сделан вывод о вкладе каждой из реакций в общий процесс.

Nekrasov P.O.

**THE INVESTIGATION OF PROCESS KINETIC OF STRUCTURED LIPIDS
PRODUCTION WITH ENZYMATIC TRANSESTERIFICATION OF FATS**

Mathematical modeling of enzymatic fats transesterification kinetic was fulfilled. Rate constants for direct and reverse reactions were estimated. Equilibrium constants of the reactions were determined. Computed thermodynamic characteristics gave an opportunity to establish the dominant reaction.