

Беккулова Р.Ф., Ельцов О.С.  
tynafa@rambler.ru

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА КАСТОРОВОГО МАСЛА ЛИПАЗОЙ ИЗ *CANDIDA RUGOSA* В ФЕРМЕНТАТОРЕ

*Аннотация.* Изучение зависимости выхода жирных кислот от основных параметров ферментативного гидролиза касторового масла липазой.

*Ключевые слова:* касторовое масло, ферментативный гидролиз, липаза, себациновая кислота, рицинолевая кислота.

*Abstract.* The dependence of the yield of fatty acids on the main parameters of enzymatic hydrolysis of castor oil by lipase was studied.

*Keyword:* castor oil, enzymatic hydrolysis, lipase, sebacic acid, ricinoleic acid.

### 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 [1].

Касторовое масло («касторка», масло клещевины, лат. *Oleum Ricini*) 0 растительное масло, получаемое из растения клещевина обыкновенная, смесь триглицеридов рицинолевой, линолевой и олеиновой кислот. Касторовое масло не высыхает, не образует плёнку. Большую его долю (80 %) составляют глицериды вязкой рицинолевой кислоты, содержащей в огромной молекуле только одну ненасыщенную связь [2]. Остальное приходится на глицериды линолевой и олеиновой кислот. Состав касторового масла представлен в таблице 1.

Таблица 1 – 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

Благодаря высокому содержанию рицинолевой кислоты касторовое масло широко используется в медицине и ветеринарии, а такие свойства, как высокая вязкость, оксистабильность 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, имеющая цис-конформацию у 9-го атома углерода и хиральный 12-й атом углерода [2].

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 азелаиновой), гептанала, 2-октанола, ПАВ и других ценных продуктов [3].

Получают рицинолевую кислоту гидролизом касторового масла, а далее, изменив условия гидролиза (повысив температуру, концентрацию щёлочи), можно получить себациновую кислоту. В промышленности используют щелочной гидролиз при 150°C с последующим подкислением. Получаемая кислота имеет неприятный запах и окрашена, содержит много примесей, в частности трудно отделяемый сульфат натрия. При этом кроме рицинолевой кислоты образуется дирицинолевая, а при более высоких температурах – тетра- и пентарицинолевые кислоты [4].

В связи с этим вполне естественны попытки заменить химический гидролиз на ферментативный, который позволил бы получить чистую рицинолевую кислоту в мягких условиях: в интервале температур 35–45 °C и без повышенного давления [5].

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 [6].

Ферментативный процесс протекает при умеренных температурах, атмосферном давлении, с перемешиванием, в отсутствие эмульгатора, что облегчает выделение целевого продукта [7].

На ферментативный гидролиз масел оказывают влияние различные факторы: соотношение масло/вода, температура, количество фермента, продолжительность гидролиза и др.

Переход к ферментативному гидролизу может быть затруднен в силу разных причин [8].

Прежде всего, отсутствие высокоэффективного и селективного фермента, пригодного для гидролиза касторового масла, а, следовательно, и разработанной технологии, дороговизна имеющихся ферментов и затруднение гидролиза касторового масла по сравнению с другими растительными маслами вследствие его высокой вязкости. Однако работы в этой области ведутся достаточно интенсивности [9].

Одним из возможных путей повышения эффективности ферментативного гидролиза является повышение каталитической активности и термостабильности ферментных препаратов [10]. Скорость ферментативной реакции, как и активность фермента, в значительной степени определяется присутствием в среде активаторов и ингибиторов: первые повышают скорость реакции, а вторые тормозят эту реакцию [11]. Использование соединений, активирующих и стабилизирующих ферменты, может иметь существенный экономический эффект, так как позволяет сократить расход дорогостоящих ферментных препаратов [12].

Основой для создания принципиально новых биотехнологических процессов альтернативных традиционным химическим производствам могут служить гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных ферментов или бактериальных клеток [14].

Хорошо известно, что любая иммобилизация ферментов позволяет получать технологические биокатализаторы, которые могут быть многократно использованы, легко отделяться от реакционной смеси фильтрацией или каким-либо другим методом и прерывать реакцию в любой заданный момент времени [15].

В связи с этим в настоящее время интенсивно изучаются различные методы иммобилизации липаз: физическая сорбция на гидрофильных адсорбентах,

включение в гидрофобные гели, а также включение в гидрофобные конпреципитаты и обработка фермента синтетическими липидоподобными реагентами. Различные методы иммобилизации дают возможность получать катализаторы с широко варьируемыми свойствами и изменять направление их применения [16-17].

В данной работе исследовалась возможность иммобилизации липазы в агаровый гель и их стабилизация.

Целью данной работы является исследование ферментативного гидролиза касторового масла в системе «масло–вода» с использованием в качестве ферментной системы липазы из *Candida rugosa*, выбор условий проведения процесса, а также подбор условий для оптимизации процесса.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи: провести анализ литературных источников по обозначенной тематике, изучить имеющиеся технологии получения себаценовой кислоты, разработать заявленную систему.

### **Образцы и методика эксперимента**

Вначале была проведена характерная реакция на касторовое масло. В отличие от всех других растительных масел касторовое масло растворяется в спирте. Для проверки при 15°С смешали в химическом стакане 20 мл касторового масла и такой же объём 95%-ного этилового спирта, после перемешивания раствор становился прозрачным.

В качестве фермента использовали препарат Lipase from *Candida rugosa*, Type VII. Липазную активность определяли модифицированным методом Ота, Ямада.

За единицу ферментативной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 1мкмоль олеиновой кислоты из 40%-ной эмульсии оливкового масла при рН 7,0 и температуре 37°С в течение 1 часа.

Метод основан на определении путем титрования щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливкового масла.

Липазную активность фермента ЛС (в ед/мг) определяла по формуле:

$$ЛС=(А*Т*50)/В$$

где ЛС – липолитическая активность, ед/мг; А – разность между результатами титрований опытной и контрольной проб, мл; Т – титр щелочи; В – концентрация образца ферментного раствора, мг/мл.

$$A=24,5-15=9,5 \text{ мл}$$

$$T=0,05n=2 \text{ мг/мл}$$

$$B=1 \text{ мг/мл}$$

$$ЛС1=(9,5*2*50)/1=980 \text{ ед/мг}$$

$$ЛС2=(9,1*2*50)/1=910 \text{ ед/мг}$$

$$ЛС3=(8,9*2*50)/1=890 \text{ ед/мг}$$

Эксперимент проводили в 3 параллелях, в итоге взяла среднее арифметическое значение.

$$ЛС_{ср}=(980+910+890)/3=926,7=927 \text{ ед/мг}$$

Полученное значение совпадает с заявленным производителем.

Ферментативный гидролиз касторового масла липазой из *Candida rugosa* проводили в химическом стакане объёмом 100 мл, а затем масштабировали процесс в ферментаторе объёмом 3 л.

Гидролиз касторового масла липазой из *Candida rugosa* в системе «масло – вода» проводили, используя высокоскоростной пищевой диспергатор (рисунок 1).

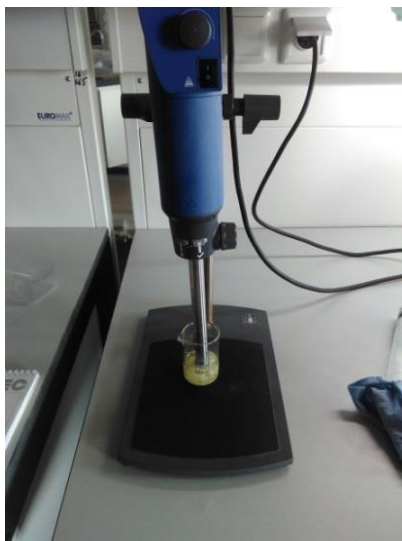


Рисунок 1 – Диспергирование масло и воды

Перемешивание осуществляли в течение 20 мин при 25°C до получения однородной эмульсии «масло – вода». Сухой ферментный препарат липазы 50 мг вводили в 50 мл эмульсии «масло – вода» (объемное соотношение компонентов варьировали от 44:6). Реакцию проводили при 40 °С с перемешиванием (250 об./мин) в течение 7 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, трёх измерений.

Далее проводили ферментативный гидролиз в ферментаторе объёмом 3 л (Рисунок 2). Перемешивание осуществляли в течение 20 мин при 25°C до получения однородной эмульсии. Сухую липазу массой 2 г вводили в 2000 мл эмульсии. Далее реакцию проводили при 40 °С с перемешиванием (250 об./мин) в течение 25 ч.

Подбор условий активации в присутствии ряда соединений осуществлялся в лабораторных условиях с использованием стандартных методик определения ферментативной активности.

Были проведены исследования влияния на активность ферментного препарата бактериальной липазы следующих соединений: NH<sub>4</sub>Cl, MgCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>.



Рисунок 2 – Проведение гидролиза на ферментаторе

Известно, что активность ряда ферментов зависит от присутствия определенных групп небелковой природы – кофакторов. Для многих липаз кофактором являются ионы кальция, они могут служить мостиками, связывающими фермент с субстратом, или могут непосредственно выполнять каталитическую функцию. Поэтому в процессе работы рассматривалось влияние ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на активность иммобилизованного препарата.

Введение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на стадии приготовления агарового геля способствует повышению термостабильности липаз, тем самым активность ферментных препаратов сохраняется после иммобилизации. Рекомендуемая концентрация соли была взята из литературных данных и составила 1 моль/л.

Иммобилизацию фермента проводили методом включения в агаровый гель. Для получения агарового геля 100 мг агара суспендировали в 4,5 мл физиологического раствора. Затем вносили хлористый кальций в концентрации 1 моль/л. Агар нагревали на кипящей водяной бане до образования однородного раствора. Полученный гель охлаждали до  $50^{\circ}\text{C}$ .

Для приготовления ферментного раствора 10 мг сухого препарата бактериальной липазы разбавляли в 2,5 мл фосфатно–цитратного буфера ( $\text{pH} = 7,0$ ) и 7,5 мл дистиллированной воды.

Включение фермента в агар: 1 мл ферментного раствора добавляли к 9 мл раствора агара при  $50^{\circ}\text{C}$  и перемешивали полученную смесь. Выливали смесь в чашку Петри и охлаждали до  $5^{\circ}\text{C}$ .

Полученную мембрану хранили в закрытой чашке Петри при  $4^{\circ}\text{C}$  до использования.

Для изучения процесса ферментативного гидролиза касторового масла иммобилизованным ферментным липазным препаратом в плотно закрывающиеся пробирки поместили 2,0; 3,0 мл масла соответственно. В каждую пробирку вносила по 0,5 г иммобилизованного ферментного препарата липазы. Пробы перемешивали и выдерживали на водяной бане при 30°C в течение 2; 4; 8 часов. По истечении указанного времени в образцы добавляли по 3 мл 96 %-го этилового спирта. Пробы тщательно перемешивала и методом титрования определяла количество выделившихся жирных кислот.

### **Результаты и их обсуждение**

Для достижения поставленной цели было проведено несколько этапов экспериментов. Был выбран альтернативный метод получения продукта, а именно вместо распространённого щелочного гидролиза исследовали ферментативный гидролиз. Для начала определили качество касторового масла. Также была выбрана ферментная система, в качестве фермента использовали препарат *Lipase from Candida rugosa, Type VII*.

После выбора фермента был проведён эксперимент по определению липазной активности модифицированным методом Ота, Ямада, сравнение значение с заявленным производителем. Далее оптимальное соотношение масло и воды, для создания устойчивой эмульсии, а также скорость вращения ротора диспергатора. После этого необходимо было выбрать оптимальные условия проведения процесса, а именно: температура, скорость вращения мешалки, состав эмульсии, концентрация фермента в реакционной смеси.

Затем была проведена серия опытов, направленная на оптимизацию гидролиза, а именно: иммобилизация фермента в агаровом геле со стабилизатором, определены активаторы и ингибиторы процесса.

В качестве активаторов и ингибиторов использовали неорганические соли и органические растворители. Вначале эксперименты проводили в химических стаканах объёмом 100 мл на магнитных мешалках с установленным термометром для определения условий процесса. После этого проводили эксперимент в ферментаторе объёмом 3 литра. Выход жирных кислот определяли методом титрования и далее математически и графически обрабатывали полученные результаты. Полученные результаты сравнили с литературными данными других методов. Также для сравнения была выбрана другая ферментная система, а именно: липаза животного происхождения (телячья).



В итоге были получена смесь жирных кислот и глицерина, содержание рицинолевой кислоты было преимущественным в процентном соотношении.

В таблице 2 приведены данные эксперимента ферментативного гидролиза, проведённого в химическом стакане объёмом 100 мл.

Таблица 2 – Выход жирных кислот

Время, ч	Объём щёлочи, мл	Выход жирных кислот, мкМ/мл
0 (без фермента)	1,5	-
1	5	35
2	9	75
3	14,5	130
4	20,5	190
5	24	225
6	29	275
7	32,5	310

Пример расчёта:

$$A(1ч) = (O - K)T \cdot 100 = (5 - 1,5)0,1 \cdot 100 = 35 \text{ мкМ/мл}$$

$$A(2ч) = (O - K)T \cdot 100 = (9 - 1,5)0,1 \cdot 100 = 75 \text{ мкМ/мл}$$

В таблице 3 приведены результаты ферментативного гидролиза в ферментаторе.

Таблица 3 – Результаты ферментативного гидролиза

Время, ч	Объём щёлочи, мл	Выход жирных кислот, мкМ/мл
0 (без фермента)	0,5	-
1	7	65
2	11	105
3	16	155
4	19	185
5	23	225
6	26	255
7-20	-	-
21	63	625
22	67	665
23	66	655
24	64	635
25	60	595

Пример расчёта:

$$A = (7 - 0,5)0,1 \cdot 100 = 65 \frac{\text{мкМ}}{\text{мл}}$$

По данным эксперимента был построен график, показывающий зависимость выхода жирных кислот от времени при гидролизе касторового масла (Рисунок 3).

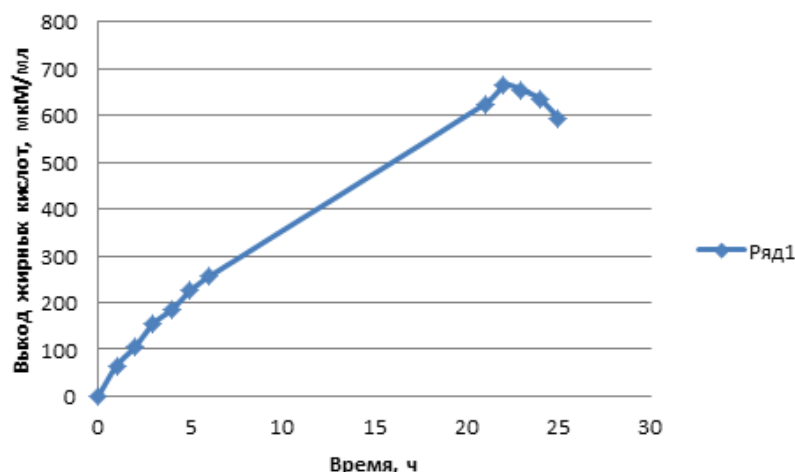


Рисунок 3 – Зависимость выхода жирных кислот от времени при гидролизе касторового масла в ферментаторе

По графику видно сначала увеличение выхода, достигая максимума к 22 часам, далее идёт плавное снижение.

Проведенные исследования показали, что добавление  $\text{FeCl}_3$ , оказывает слабое активирующее воздействие (прирост активности не превышал 10 %) или не оказывает влияния на каталитическую активность исследуемого ферментного препарата, а  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в определенных концентрациях значительно увеличивают активность ферментного препарата (таблица 2).

Гидролиз касторового масла в используемой системе затруднен его высокой вязкостью. Для устранения этого фактора, мешающего процессу, были проведены исследования по влиянию органических растворителей на гидролиз касторового масла.

Были проведены исследования влияния на активность ферментного препарата бактериальной липазы следующих соединений: хлороформ, диэтиловый эфир.

Введение в систему хлороформа оказывает ингибирующее влияние во всех исследуемых концентрациях.

Внесение диэтилового эфира сначала ускоряет процесс гидролиза в, но по мере увеличения времени протекания процесса положительное действие снижается ингибирующим влиянием растворителя на фермент (таблица 3).

Таблица 4 – Влияние неорганических соединений на активность ферментного препарата липазы

Активатор	Оптимальная конц. реактива, моль/л	Прирост активности при оптимальной конц. активатора, %
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,1	35
$\text{MgCl}_2$	0,1	40
$\text{FeCl}_3$	0,03	8

Изучено влияние соединений различной природы на ферментативный гидролиз касторового масла в бездетергентной эмульсии. Установлено, что максимальное увеличение глубины гидролиза достигается при внесении ионов магния в концентрации 0,1 моль/л. Введение в среду органических растворителей оказывает неоднозначный эффект.

Титрование проводили 0,1N водным раствором NaOH в присутствии 1 % раствора фенолфталеина до устойчивой розовой окраски. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Выход жирных кислот при использовании иммобилизованного фермента

Количество субстрата, мл	Выход жирных кислот, мкмоль/мг		
	Время, час		
	2	4	8
2	31,4	33,4	38,6
3	27,4	27,1	29,8

### Заключение

В ходе данной работы была определена ферментативная активность катализатора, также определены возможные активаторы и стабилизаторы

процесса. Показана возможность ферментативного гидролиза касторового масла с помощью иммобилизованных ферментных препаратов.

Как известно из курса промышленного биокатализа активность фермента зависит от активаторов и ингибиторов. Было выяснено, что активация бактериальной липазы требует индивидуального подбора активирующего агента.

### ***Библиографический список***

1. Пат. 2166309 Рос. Федерация, МПК А61К 7/00 (2000.01), А61К 7/48 (2000.01), А61К 31/23 (2000.01). Лечебно-профилактическая и косметическая композиция : № 000116320/14 : заявл. 26.06.2000 : опубл. 10.05.2001 / Разумова Т. Н. – 3 с.
2. Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies / M. S. Puthli, V. K. Rathod, A. B. Pandit // *India Biochemical Engineering Journal*. – 2006. – Vol. 31. – P. 31–41.
3. Rathod V. K. Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil / V. K. Rathod, A. B. Pandit // *Biochemical Engineering Journal*. – 2009. – № 47. – P. 93–99.
4. Maximization of bioconversion of castor oil into ricinoleic acid by response surface methodology / Debajyoti Goswami, Ramkrishna Sen, Jayanta Kumar Basu, Sirshendu De // *Bioresource Technology*. – 2009. – Vol. 100. – P. 4067–4073.
5. Гамаюрова В. С. Ферментативный катализ в неводных средах / В. С. Гамаюрова, М. Е. Зиновьева // *Бутлеровские сообщения*. – 2011. – Т. 25, № 7. – С. 87–95.
6. Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов : учеб. пособие для вузов / И. М. Грачева, Ю. П. Грачев, М. С. Мосичев [и др.]. – Москва : Легкая и пищевая промышленность, 1982. – С. 75.
7. Synthesis of fatty esters by polyethylene glycol – modified lipase / B. Mahiran, A. Kamaruzaman, J. Zinwan [et al.] // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 1995. – Vol. 64, Is. 1. – P. 10–16.
8. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов / И. М. Грачева. – Москва : Агропромиздат, 1997. – С. 233–244.
9. Брокерхоф Х. Липолитические ферменты / Х. Брокерхоф, Р. Джексен. – Москва : Мир, 1998. – 388 с.
10. Claon P. A. Lipase – catalyzed synthesis of terpene esters by transesterification in n-hexane / P. Aclaon, C. C. Akoh // *Biotechnology Letters*. – 1994. – Vol. 16, Is. 3. – P. 235–240.
11. 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. техн. ун-та, 2007. – С. 245.
12. 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 студенческих научно-исследовательских работ. – Казань : Изд-во Казан. гос. техн. ун-та, 2007. – С. 276.
13. Ферментативные процессы, осуществляемые липазами в неводных средах / К. Л. Васина, М. Е. Зиновьева, В. С. Гамаюрова // Микробные биокатализаторы и их роль в нано- и биотехнологии : сб. науч. тр. – Москва : ПищПромиздат, 2008. – С. 135–146.
  14. Давранов К. Д. Синтетазная активность липазы из *Penicillium* sp. в водной среде и в системе обращенных мицелл / К. Д. Давранов, В. Б. Халамейзер, О. Н. Вагина // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, № 4. – С. 386–388.
  15. Павленко И. М. Влияние химической модификации липазы на регуляцию липолитической активности в системе обращенных мицелл / И. М. Павленко, Н. Л. Клячко, А. В. Левашов // Биоорганическая химия. – 2005. – Т. 31, № 6. – С. 593–601.
  16. Зиновьева М. Е. Гидролиз оливкового масла панкреатической липазой в неводных средах / М. Е. Зиновьева, Н. В. Калачева, В. С. Гамаюрова // Биотехнология. – 1998. – № 2. – С. 64–67.
  17. Биферментная система липаза/липоксигеназа в обращенных мицеллах АОТ в октане / И. М. Павленко, О. С. Купцова, Н. Л. Клячко, А. В. Левашов // Биоорганическая химия. – 2002. – Т. 28, № 1. – С. 50–55.