

УДК 577.153.2

БИОКОНВЕРСИЯ ОТХОДОВ МАСЛОЖИРОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ ЛИПАЗОЙ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA*

Репин П.С., Корнеева О.С., Карманова О.В.

ГОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия»,
Воронеж, Россия, e-mail: biochem@vgta.vrn.ru

Выбраны оптимальные условия гидролиза отходов масложировой промышленности дрожжевой липазой *Yarrowia lipolytica* при низком содержании воды и одновременном присутствии в реакционной смеси оксида кальция, позволяющие использовать продукты гидролиза в технологии производства резино-технических изделий.

Ключевые слова: липаза, ферментативный гидролиз, эмульсия «вода–жир»

Липолитические ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности. Однако их использование ограничивается гидролизом субстрата, представляющего собой водную эмульсию жира. Это связано с тем, что при гидролизе эмульсии типа «жир–вода» дисперсионная среда берется в избытке для достижения практически полной степени деструкции глицеридов за счет смещения равновесия в сторону образования конечных продуктов. Получаемые при этом гидролизаты представлены в виде водного раствора, и для их дальнейшего использования необходимы стадии отделения воды, сушки, а также очистки сточных вод, что нерентабельно. Литературных данных, описывающих применение липаз для расщепления триглицеридов в условиях обратной эмульсии, крайне мало.

Биодеструкция жира при использовании эмульсии «вода–жир» позволит избежать вышеуказанных недостатков, а также осуществить переработку крупнотоннажных отходов масложирового производства, содержащих кроме масел и жиров минеральные компоненты [3], препятствующие эмульгированию глицеридов в воде. Полученные при этом гидролизаты – моно-, ди-

и триацилглицериды, жирные кислоты – могут быть в дальнейшем использованы в производстве резино-технических изделий (РТИ) в качестве вторичных активаторов вулканизации, диспергаторов ингредиентов и мягчителей резиновых смесей и др. [4-6].

Основным требованием к применяемым в технологии РТИ добавкам является их влажность, значение которой не должно превышать 0,5–1%, в связи с чем была поставлена цель: подбор оптимальных условий биодеструкции отходов масложировой промышленности с низким содержанием воды (до 10%). Для этого в реакционную среду дополнительно вносили оксид кальция [4].

Материалы и методы исследования

В работе использовали отход стадии дополнительного саломаса и липазу дрожжей *Yarrowia lipolytica* (ГосНИИГенетика) со степенью очистки Г10х, химические реактивы марок: х.ч., ч.д.а., ч.

Гидролиз проводили в лабораторных реакторах объемом 15 см³. Предварительно усредненную навеску отхода 10 г (содержание жира 50–55% мас.) помещали в реактор, где при 40°C и постоянном перемешивании с использованием лабораторной двухлопастной мешалки расплавляли до однородной массы. Далее в реактор добавля-

ли СаО в виде мелкодисперсного порошка. Фермент растворяли в фосфатно-цитратном буферном растворе (рН 7,0) и, предварительно нагрев до 40°C, вносили в реакционную смесь. Перемешивание осуществляли в течение первых 10 минут. Дальнейшее перемешивание при данной температуре затруднялось из-за образования в смеси более высокоплавких продуктов: моно- и диацилглицеридов. Гидролиз продолжали в статических условиях при комнатной температуре (23±3°C) в течение 1-5 суток.

Об эффективности протекания процесса судили по кислотному числу, характеризующему содержание свободных жирных кислот и определяемому по ГОСТ 52 110-2003 с предварительной экстракцией жировой фазы смесью растворителей (диэтиловый эфир и этиловый спирт в соотношении 2 : 1), по массовому количеству кальциевых солей жирных кислот, характеризующему содержание связанных жирных кислот и определяемому по ГОСТ 5480-59 с предварительной экстракцией карбоксилатов горячим толуолом. Общий выход жирных кислот (сумма свободных и связанных в кальцевые соли кислот) в результате гидролиза оценивали по объему соляной кислоты (0,05 моль/дм³, ацетоновый раствор), пошедшему на титрование избытка добавленного спиртового раствора КОН (2 моль/дм³, спиртовой раствор) в ацетоновой среде в присутствии тимолфталена.

Оценку липидного состава проб осуществляли методом тонкослойной хроматографии. Анализ проводили на пластинках марки «Sorbfil-ПТСХ-АФ-А» (100×100 мм). Система растворителей: петролейный эфир (40-70) : диэтиловый эфир : уксусная кислота = 80 : 20 : 1 [2]. Проявление хроматограмм осуществляли в эксикаторе, насыщенном парами йода. Проявленные хроматограммы сканировали при разрешении 600 dpi (точек на дюйм). Обработку хрома-

тограмм проводили с использованием программы «ТСХ-Менеджер 4.0.1».

Результаты исследования и их обсуждение

Подбор концентраций и дозировок компонентов для проведения ферментативного гидролиза осуществляли по методу латинского квадрата 4×4 [1]. Рассматривалось влияние следующих факторов: фактор «А» – масса вносимого в реакционную среду оксида кальция, фактор «В» – объем вносимой воды (объем буферного раствора), фактор «С» – дозировка липазы. Об эффективности протекания гидролиза судили по общему выходу жирных кислот (в % от теор.) через двое 2 суток проведения процесса. Результаты эксперимента обрабатывались на ПЭВМ с использованием метода регрессионного анализа (таблица).

Из таблицы следует, что все из исследуемых факторов оказывали влияние на степень ферментативного гидролиза жира в заданных условиях. Увеличение дозировки оксида кальция способствовало росту выхода конечного продукта гидролиза. Однако увеличение концентрации СаО выше 20% к массе отхода не позволяло получить однородную массу в заданных условиях, поэтому за оптимальное значение приняли дозировку оксида 20% к массе отхода. Меньшее влияние на процесс оказывал другой из исследуемых факторов – дозировка воды. Зависимость выхода жирных кислот от фактора «В» носила нелинейный характер, и при увеличении дозировки воды с 9 до 12% к массе отхода выход кислот возрастал менее чем на 1%. Учитывая цель настоящего исследования – проведение ферментативного гидролиза при низком содержании воды, за оптимальную концентрацию приняли 9% воды к массе отхода. Наибольшее влияние на выход жирных кислот оказывал фактор «С». Увеличение количества вносимого фермента в ре-

акционную смесь с 7 до 14 ед. Е/г жира приводило к возрастанию выхода жирных кислот более чем в 1,5 раза. Дальнейшее повышение концентрации липазы с 14 до

21 ед. Е/г жира увеличивало выход продукта гидролиза лишь на 10%, что говорит о нецелесообразности повышения дозировки фермента свыше 14 ед. Е/г жира.

Выход жирных кислот в зависимости от исследуемых факторов

Наименование фактора	Номер уровня	Значение фактора	Значение функции отклика (общий выход жирных кислот, в % от теор.)
Фактор «А» – дозировка СаО, в % к массе отхода	1	5	33,3
	2	10	35,8
	3	15	41,7
	4	20	48,4
Фактор «В» – дозировка Н ₂ О, в % к массе отхода	1	3	37,9
	2	6	39,7
	3	9	41,6
	4	12	42,1
Фактор «С» – дозировка липазы, ед. Е/г жира	1	7	27,1
	2	14	41,0
	3	21	45,4
	4	28	45,5

Для определения продолжительности гидролиза отхода исследовали динамику процесса в течение 5 суток при комнатной температуре в статическом режиме (рис. 1).

Реакционная смесь содержала: 20% СаО и 10% Н₂О к массе отхода. Дозировка липазы дрожжей *Yarrowia lipolytica* – 14 ед. Е/г жира.

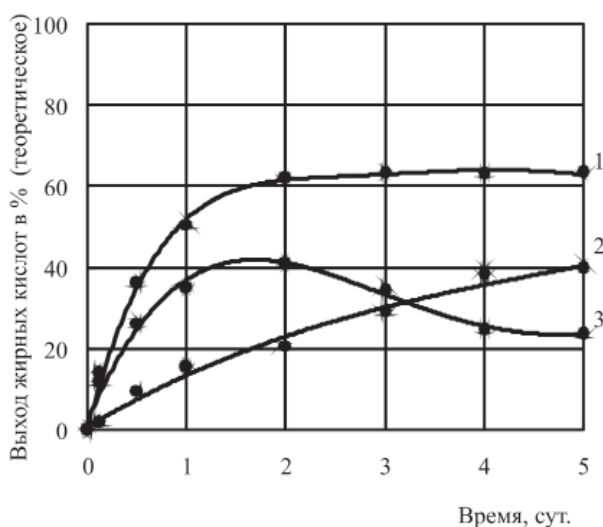


Рис. 1. Динамика изменения состава реакционной массы:

1 – общий выход жирных кислот; 2 – содержание связанных в кальциевые соли жирных кислот; 3 – содержание свободных жирных кислот

Общий выход жирных кислот в гидролизате (рис. 1) достигал максимального значения через двое суток проведения гидролиза. Далее в реакционной смеси происходило образование только карбоксилатов кальция при одновременном снижении концентрации свободных жирных кислот.

Для оценки изменения липидного состава реакционной смеси отбор проб осуществляли через 1, 3 и 5 суток после начала гидролиза. Как показывают денситограммы проб (рис. 2), промежуточными продуктами процесса являлись 1,2-диацилглицериды и О-диалкилмоноглицериды. Последние, вероятно, образовались в результате взаимодействия высших жирных спиртов, присутствующих в отходе, и моноацилглицеридов, образующихся в результате гидролиза. Максимальное количество данного продукта отмечено на третьи сутки проведения гидролиза, после чего количество его в среде заметно снижалось. Площадь пика, соответствующая жирным кислотам на третьи и пятые сутки гидролиза, оставалось неизменной, что согласуется с представленными ранее данными (рис. 1). Высота пика триглицеридов снижалась в течение всего периода проведения процесса.

Полученный в результате ферментативного гидролиза отхода гидролизат сушили при 60°C в течение 60 минут. Влажность полученного порошка не превышала 1%. Продукт был испытан в резиновых смесях на основе этиленпропиленового каучука марки «DUTRAL TEP» в качестве технологической добавки. Содержание его в опытных образцах резин составляло 2–5 мас. ч. на 100 мас. ч. каучука дополнительно к серийному рецепту.

Результаты испытаний показали, что опытная технологическая добавка в исследуемом диапазоне концентраций оказывала пластицирующее влияние на резиновые

смеси. Вязкость опытных образцов снижалась до 138–134 усл. ед. по Муни по сравнению с серийным (143 усл. ед.). Одновременно наблюдалось снижение времени достижения оптимума вулканизации с 12,24 минут до 11,62, что свидетельствует об активирующем влиянии исследуемого продукта на вулканизационные характеристики резиновых смесей. Также отмечено некоторое улучшение упруго-прочностных свойств резин с исследуемой добавкой: условная прочность при растяжении составляла 13,6–15,8 МПа при значении данного показателя для серийной резины 13,5 МПа; увеличение относительного удлинения при разрыве возросло приблизительно на 15%; сопротивление раздиру увеличилось с 41 кН/м у серийного образца до 47 кН/м у опытного. По-видимому, это связано с проявлением диспергирующего эффекта предложенной технологической добавки и улучшением распределения наполнителей и компонентов вулканизирующей группы в ее присутствии.

Заключение

Проведенные исследования позволили установить, что максимальный выход жирных кислот и их солей в результате гидролиза отхода стадии дополнительного отбеливания саломаса липазой дрожжей *Yarrowia lipolytica* наблюдается при внесении фермента в количестве 14 ед. Е/г жира и содержании в реакционной смеси 20 % оксида кальция и 9–12 % воды к массе отхода в течение 4–5 суток при комнатной температуре в стационарном режиме.

Полученный гидролизат, содержащий свободные жирные кислоты и их соли, моно-, ди- и триглицериды, после сушки можно рассматривать как технологическую добавку, выполняющую функции диспергатора, мягчителя и активатора вулканизации, для резиновых смесей на основе этиленпропиленового каучука.

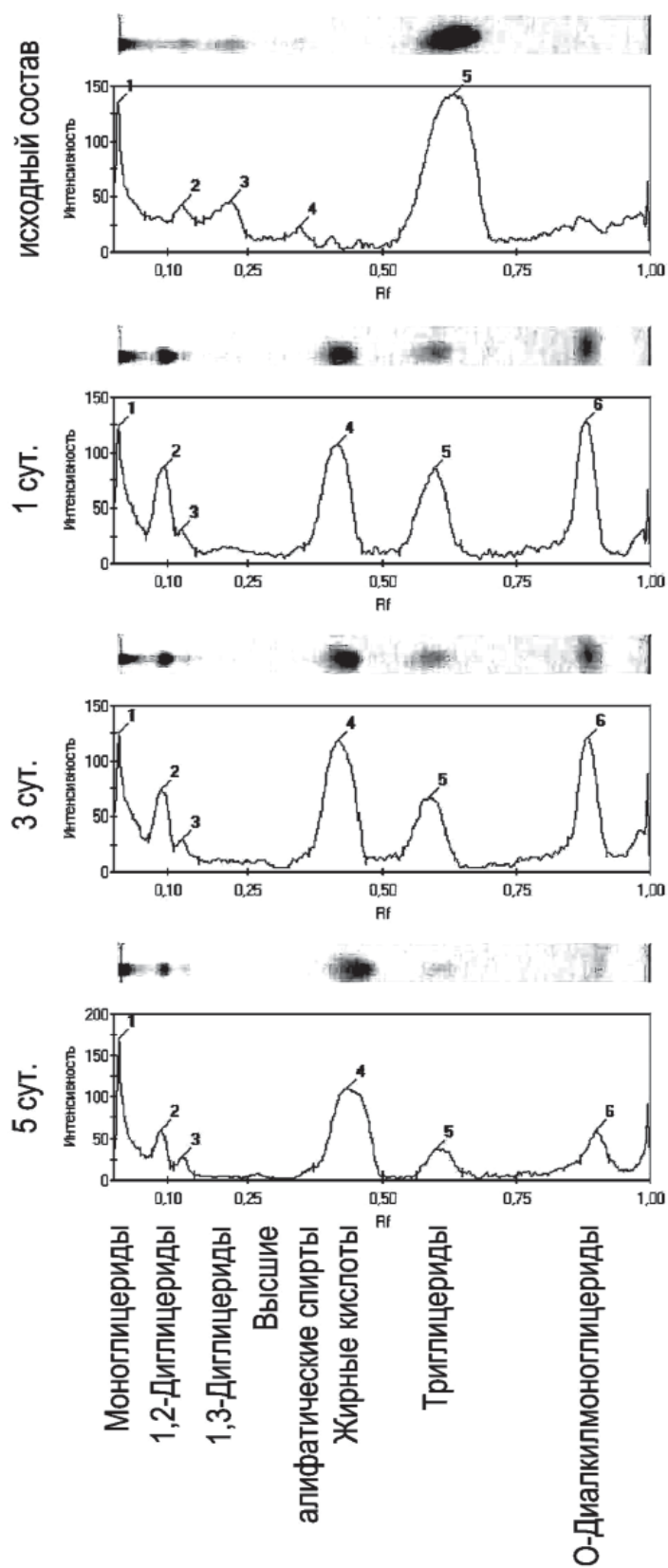


Рисунок 2. Характеристика изменения липидного состава реакционной смеси через 1, 3 и 5 суток гидролиза

Список литературы

1. Ахназарова С.Л., Кафаров В.В. Методы оптимизации эксперимента в химической технологии : учеб. пособие для хим.-технол. спец. вузов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 1985. – 327 с.

2. Лабораторный практикум по химии жиров / Н.С. Арутюнян, Е.П. Корнена, Е.В. Мартовщук и др.; под ред. проф. Н.С. Арутюняна и проф. Е.П. Корненой. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб. : ГИОРД, 2004. – С. 145-148.

3. О'Брайен, Р. Жиры и масла. Производство, состав, свойства, применение; пер. с англ. 2-го изд. В. В. Широкова, Д. А. Бабейкиной, Н. С. Селивановой, Н.В. Магды. – СПб. : Профессия, 2007. – 752 с.

4. Патент РФ № 2015161, 30.06.94.

5. Рахматулина А.П. Влияние стеариновой и олеиновой кислот на молекулярно-топологическое строение резин на основе бутадиев-метилстирольного каучука / А.П. Рахматулина,

Ю.А. Ольхов, Р.А. Ахмедьянова, А.Г. Лиакумович // Каучук и резина. – 2005. – №3. – С. 17-22.

6. Шутилин Ю.Ф. Справочное пособие по свойствам и применению эластомеров : монография. – Воронеж: ВГТА, 2003. – 871 с.

Рецензенты:

Лукин Алексей Леонидович, д.с.-х.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и микробиологии, Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Воронежский государственный аграрный университет им. К.Д. Глинки» Министерства сельского хозяйства РФ;

Кузнецов Вячеслав Алексеевич, д.х.н., доцент, кафедры химии высокомолекулярных соединений и коллоидов государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет» Министерства образования и науки РФ.

BIOCONVERSION OF A FAT INDUSTRY WASTE THE LIPASE OF YEAST YARROWIA LIPOLYTICA

Repin P.S., Korneeva O.S., Karmanova O.V.

Voronezh State Technological Academy, Voronezh, Russia,

e-mail: biochem@vgta.vrn.ru

Optimum conditions of hydrolysis by *Yarrowia lipolytica* yeast lipase of the fat industry waste was studied at the low maintenance of water and presence at a reactionary mix the calcium oxide. It allows to use hydrolysis products in the technology of rubber wares.

Keywords: lipase, enzyme hydrolysis, fat-contained waste, emulsion «water in fat»