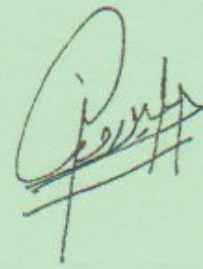


Автореф  
Р21

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

**ХАССАН Е. А. РАМАДАН**



УДК 664.34:577.152.3

**УДОСКОНАЛЕННЯ СПОСОБУ ВИДІЛЕННЯ  
РОСЛИННИХ ЛПАЗ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ  
В ТЕХНОЛОГІЯХ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата технічних наук

Одеса – 2009

С.Т.

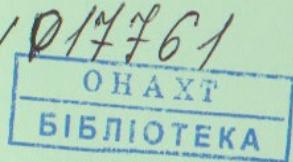
Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій  
Міністерства освіти і науки України.

**Науковий керівник:** доктор технічних наук, професор  
**Безусов Анатолій Тимофійович**,  
Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра технології консервування, завідувач кафедри

**Офіційні опоненти:** - доктор біологічних наук, професор  
**Юкало Володимир Глібович**,  
Тернопільський державний технічний університет  
імені Івана Пулюя, кафедра харчової біотехнології і  
хімії, завідувач кафедри;

- кандидат технічних наук, доцент  
**Велічко Тетяна Олексіївна**,  
Одеська національна академія харчових технологій,  
кафедра біохімії та мікробіології та фізіології  
харчування, доцент кафедри.



Захист відбудеться "10" серпня 2009 року о 12<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.088.02 Одеської національної академії харчових технологій за адресою: вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039, ауд. А-234

бібліотеці Одеської національної академії  
на, 112, м. Одеса, 65039

ОНАХТ 15.09.09  
Удосконалення способу



v017761

Г.М. Станкевич

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Одним з напрямів удосконалення технологій виробництва харчових продуктів є використання ферментів на окремих технологічних операціях.

У харчовій промисловості при виробництві продуктів харчування широко використовуються естерази. До них відноситься ліпаза (К.Ф. 3.1.1.3), яка є важливим ферментом, що бере участь в різних біохімічних процесах при зберіганні і переробці харчової сировини.

Сучасна фармацевтична промисловість випускає ряд препаратів ліпази тваринного походження: «Мезим Форте», «Фестал», «Мексаза» і багато інших.

Ліпази каталізують не лише гідроліз, але і синтез довголанцюгових ацилгліцеридів. Ці властивості знаходять широке застосування в біотехнології при виробництві детергентів, харчових добавок, для отримання вітамінів.

Одним з напрямів можливого застосування ліпази є отримання поверхнево активних речовин, продуктів неповного гідролізу тригліцеридів (моно- і дигліцеридів). Ці речовини володіють властивостями емульгаторів (Е 471). Сьогодні їх отримують за складними умовами гідролізу жирів і подальшою молекулярною дистиляцією при температурі 220-225 °С. Це призводить до перетворення природних цис-ізомерів моно- і диненасичених жирних кислот в транс-ізомери, які не властиві жирним кислотам природних ліпідів і є шкідливими для організму людини.

В даний час, як джерело нових натуральних компонентів, що використовують в харчовій, медичній і комбікормовій промисловості, особливу увагу привертає пшеничний зародок — вторинний продукт борошномельного виробництва, який є біологічно цінним продуктом, що містить вітаміни, білки з незамінними амінокислотами, ліпіди.

У пшеничному зародку знаходиться активна ферментна система, у складі якої міститься ліпаза. Удосконалення способу виділення рослинних ліпаз із зародків і висівки зерна пшениці та їх застосування в технологіях виробництва харчових продуктів є актуальним.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана з тематики робіт проблемної науково-дослідної лабораторії Одеської національної академії харчових технологій (ОНАХТ) за темою "Розробка біотехнологічних процесів цільового спрямованого регулювання функціональних, фізіологічних та технологічних властивостей продуктів та БА-Дів": тема 1/06-17 № 654 від 16.11.2005 г, № держреєстрації 0106U001445, код КПКВ-2201920; за темою держбюджетної науково-дослідної роботи кафедри технології консервування ОНАХТ "Удосконалення способу виділення рослинних ліпаз і їх застосування в технологіях харчових продуктів"

**Мета і завдання досліджень.** Метою дисертаційної роботи є розробка технології отримання ліпаз з вторинних продуктів переробки зерна (зародок, висі-

вки), їх концентрування і використання при виробництві продуктів емульсійного типу.

Відповідно до поставленої мети визначені наступні завдання:

- розробити і обґрунтувати технологічні параметри виділення і концентрування ліпаз із зародків і висівок зерна пшениці;
- провести дослідження впливу способів осадження на активність ліпаз;
- оптимізувати ключові технологічні параметри отримання ліпаз із зародків і висівок зерна пшениці;
- провести дослідження з отримання низькометоксильованих пектинових речовин;
- розробити спосіб концентрування ліпази модифікованими пектиновими речовинами;
- визначити зміну активності ліпази при її комплексоутворенні з модифікованими пектиновими речовинами;
- дослідити процес гідролізу соняшникової та оливкової олій, пектинліпазного комплексу;
- вивчити вплив ступеню гідролізу олій на емульгуючі властивості продуктів її ліполізу;
- розробити технології емульгованих продуктів з фруктовими і овочевими наповнювачами.
- розробити принципову технологічну схему отримання ліпази із зародка і висівок зерна пшениці із застосуванням модифікованих пектинових речовин, провести її промислово апробацію, розробити нормативну документацію, розрахувати собівартість готової продукції.

*Об'єкт дослідження* — технологія виділення і концентрування ліпаз рослинної сировини, процес емульгування рослинних жирів.

*Предмет дослідження* — висівки і зародки зерна пшениці, ліпази, модифіковані пектинові речовини, продукти ліполізу соняшникової і оливкової олій.

*Методи дослідження* — загальноприйняті і спеціальні фізико-хімічні, хімічні, біохімічні, мікробіологічні, аналітичні, математичні з використанням сучасних пристроїв і комп'ютерних технологій.

#### **Наукова новизна отриманих результатів:**

- вивчено процес виділення і концентрування ліпаз із зародків і висівок зерна пшениці. Експериментально встановлені параметри технологічного процесу виділення ліпаз.
- вперше показана можливість концентрування виділених ліпаз модифікованими пектиновими речовинами. Визначена активність виділених ліпазах і їх фізико-хімічна характеристика.
- вивчено процес гідролізу рослинних олій з використанням виділених ліпаз;
- вивчено властивості нових ферментних препаратів, що емульгують, при отриманні продуктів емульсивного типу;

- теоретично обґрунтована і експериментально доведена можливість виробництва ліпази із зародків і висівок зерна пшениці із застосуванням пектинових речовин.

**Практичне значення отриманих результатів.** В результаті проведення комплексних аналітичних і експериментальних досліджень розроблена технологія концентрації ліпаз з водних екстрактів модифікованими пектиновими речовинами. Отримані пектин-ліпазні комплекси рекомендовано використовувати при виробництві фруктових-овочевих емульгованих продуктів типу „майонез”. Розроблена нормативна документація на ферментний препарат ліпаза (ТУ У 10.6-00377147-002-2009). Розроблена технологія апробована на НВО „Аріандра”.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Експериментальна робота виконана особисто здобувачем. Автором розроблено наукові основи отримання ліпаз з вторинних продуктів переробки зерна (зародок, висівки), їх концентрування і використання при виробництві продуктів емульсивного типу, забезпечено методичне оформлення роботи, виконано аналітичну та експериментальну роботу, проведено аналіз і узагальнення отриманих результатів, сформульовано висновки і рекомендації, підготовлено матеріали досліджень до публікацій у вигляді статей і тез, розроблено нормативну документацію, проведено промислово апробацію розробленої технології. Особистий внесок здобувача підтверджується наданими документами і науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення і результати дисертаційної роботи доповідались і отримали позитивну оцінку на щорічних наукових конференціях професорсько-викладацького складу Одеської національної академії харчових технологій в період 2007-2009 рр., IV Міжнародній науково-практичній конференції «Харчові технології-2008».

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових робіт, з них 5 публікацій в фахових виданнях, тезах 3 доповідей на науково-практичних конференціях.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертаційна робота складається з вступу, 5 розділів, висновків, списку використаних літературних джерел, який включає 213 найменувань і 2 додатків (10 стор.).

Робота викладена на 164 сторінках основного тексту, містить 27 таблиць (23 стор.) і 51 рисунок (39 стор.).

### **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

У вступі обґрунтовується актуальність теми дисертаційного дослідження, визначається ступінь і стан наукової проблеми, характеризується теоретична і методологічна основа дисертації, сформульована мета і завдання дослідження, об'єкт, предмет, обґрунтовується наукова новизна отриманих результатів, висловлюється теоретико-практична значущість дослідження та апробація результатів роботи, дається структура дисертації.

У першому розділі на основі огляду й аналізу літературних джерел розглянуті властивості ліпази та її особливості, механізм каталізу, кінетичні моделі дії, субстратна специфічність, очищення і фізико-хімічні властивості ліпаз, її застосування у виробництві майонезу (емульсії типу «олія у воді»).

Розглянута спільна характеристика ліпаз з різних джерел. Ліпаза (гідролаза тригліцеридів, К.Ф. 3.1.1.3), завдяки її широкій субстратній специфічності і високій енантиселективності знаходить широке застосування в медицині, харчовій і косметичній промисловості, виробництві миючих засобів і органічному синтезі. Розглянута технологія виробництва майонезу та його склад.

У другому розділі «Об'єкти і методи досліджень» представлена структурна схема, яка відображує основні напрями досліджень і взаємозв'язок етапів рішення з поставленими завданнями (рис.1).

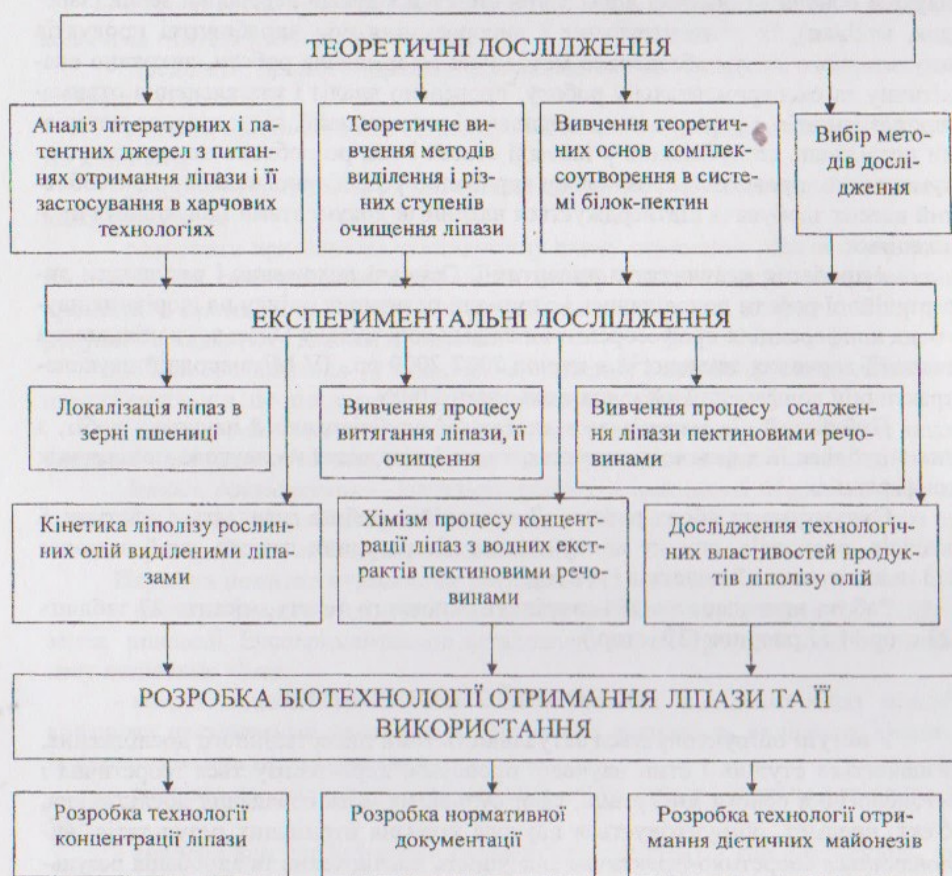


Рис.1. Програма досліджень

Об'єктами досліджень в даній дисертаційній роботі були: зародки і висівки зерна пшениці (*Triticum aestivum*), що відповідають вимогам ГОСТ 9353-90, соняшникова олія і оливкова олія.

Основна частина досліджень була проведена в лабораторіях кафедри технології консервування і в проблемній науково-дослідній лабораторії Одеської національної академії харчових технологій. Обробка результатів досліджень проводилася статистичним методом найменших квадратів. Результати експериментів були оброблені за допомогою пакетів Microsoft Office та Microsoft Excel.

У третьому розділі «Виділення і очищення ліпази висівок і зародків зерна пшениці» викладені результати експериментальних досліджень умов виділення ліпази із зародків і висівок зерна пшениці. Зародки або висівки пшениці заливали охолодженою до 4 °С водою і екстрагували фермент при перемішуванні протягом 30...180 хв. Відділення рідкої фази розчину від нерозчинної частки здійснювали шляхом центрифугування, при 1500 обертів за хвилину протягом 15 хв. В результаті проведених досліджень, використовуючи метод математичного планування експерименту, встановлені оптимальні значення технологічних параметрів процесу екстрагування ферменту з сировини з оптимальною активністю, які складають: тривалість — 60 хв, активна кислотність — 6,7 одиниць рН. При цьому активність ферменту складає 0,136 мкМ/хв.мг при гідромодулі рівному 1:10.

Порівняльну характеристика активності ліпази із зародків зерна пшениці представлено на рис. 2. Залежно від умов концентрування активність осаджен -

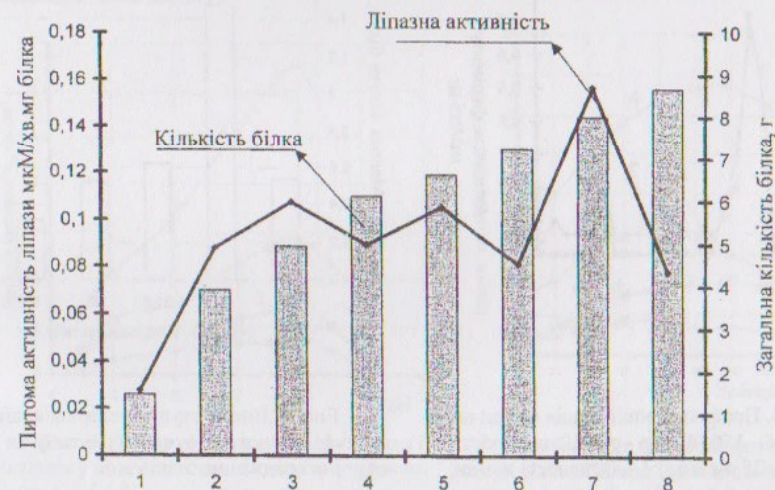


Рис. 2. Діаграма залежності активності ліпази в осаді від природи осаджувача: 1 - водним екстрактом; 2 - пектином (с.е. 72 %); 3 - спиртом; 4 - таніном; 5 - пектином (с.е.72 %) і таніном; 6 - пектином (с.е.50 %) і таніном; 7 - пектином (с.е. 50 %); 8 - ацетоном

них з водного екстракту ліпаз збільшилася в 3,0 - 6,0 разів, в порівнянні з активністю ліпази у водному екстракті.

Для вивчення процесу комплексоутворення використовували 2-відсоткові водні розчини пектинових речовин зі ступенем етерифікації 75, 53, 31,6, 23 і 9,2 % в співвідношенні 1:10 водних екстрактів, що містять 3,5 % білка. Часткову деетерифікацію пектину проводили методом регульованої лужної обробки (рис. 4 і табл. 1).

Очищення осаджених білкових концентратів проводили з використанням гель-фільтрації на сефадексе G-150 (рис. 3). При пропусканні буферного розчину через колонку з сефадексом G-150 отримали 3 піки: білкові фракції 10 і 15 володіли ліпазною активністю, відповідно 0,15 і 0,25 мкМ/хв.мг. Наявність максимальної активності ліпази виявлена у фракціях 2...5 з активністю 0,75 мкМ/хв.мг.

У отриманих пектин-ліпазних комплексах співвідношення білок-пектин залежить від ступеня етерифікації пектинових речовин. При с.е. 75 % вміст пектину в комплексі мінімальний. По мірі зниження ступеня етерифікації пектинових речовин частка пектину в комплексі збільшується з одночасним збільшенням питомої активності ліпаз комплексів.

Частка пектинових речовин в комплексах, отриманих з висівок зерна пшениці, більш, ніж їх вміст в комплексах із зародків.

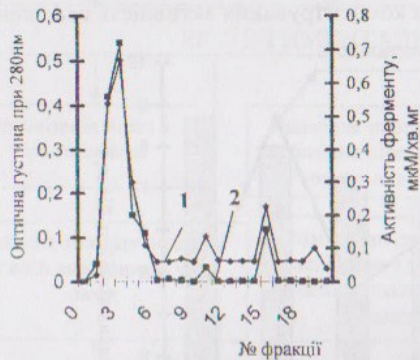


Рис. 3. Профіль елюції осадів ліпази на сефадексі G-150 (буфер - рН 8,0, швидкість закінчення 25 см<sup>3</sup>/год): 1 - активності ліпази, 2 - вміст загального білка (оптична густина при 280 нм).

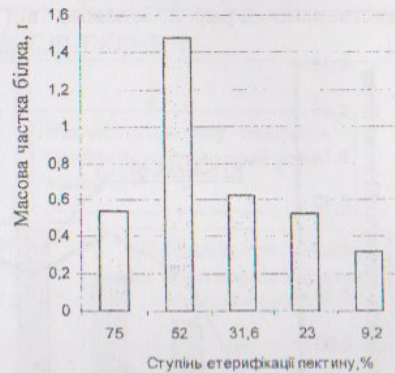


Рис. 4. Вплив ступеня етерифікації модифікованого яблучного пектину на ступінь осадження білків

Характеристика пектин-ліпазного комплексу із зародків і висівок зерна пшениці (n = 5, P ≥ 0,95)

Агент	Вологість, %	Вміст білка, мг/г	Загальна активність, мкМоль/хв	Питома активність, мкМоль/хв.мг	Масова частка пектину, мг/г	Співвідношення пектин/білок
Пектин (с.е. 75 %)	1	88,6	3,33	0,101	1,76	0,050
	2	94,3	10,00	0,625	2,00	0,125
Пектин (с.е. 52 %)	1	90,5	5,00	0,147	2,60	0,070
	2	96,0	23,47	1,381	2,50	0,147
Пектин (с.е. 31,6%)	1	93,7	4,17	0,126	2,30	0,060
	2	97,0	16,67	1,042	2,30	0,143
Пектин (с.е. 23 %)	1	95,1	3,33	0,107	2,20	0,070
	2	95,0	13,30	0,950	2,20	0,157
Пектин (с.е. 9,2 %)	1	96,9	1,67	0,056	3,00	0,100
	2	96,0	5,00	0,714	4,00	0,570

Примітки: 1 - зародки; 2 - висівки.

Як відомо, поведінка молекул білка в розчині характеризується формою молекул, які змінюються залежно від температури та активної кислотності (рН) середовища. При кожному значенні рН білок має відповідний розподіл зарядів, що створюється функціональними (іоногенними) групами полімеру.

Проведено дослідження впливу величини рН реакційного середовища (рис. 5) і температури (рис. 6) на ліпазну активність вільної ліпази і пектин-ліпазного комплексу.

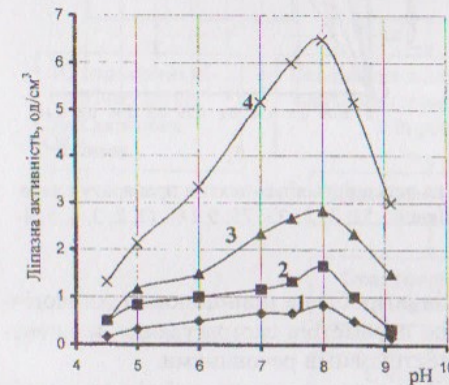


Рис. 5. Вплив рН на активність ліпази і комплексу ліпаза-пектин: 1 - ліпаза з пшеничних зародків; 2 - комплекс пектин-ліпаза із зародків; 3 - ліпаза з висівок; 4 - комплекс пектин-ліпаза з висівок.

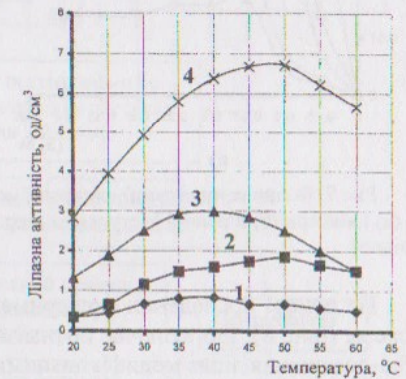


Рис. 6. Вплив температури на активність вільної ліпази і комплексів пектин-ліпазних комплексів: 1 - ліпаза з пшеничного зародків; 2 - комплекс пектин-ліпаза із зародків; 3 - ліпаза з висівок; 4 - комплекс пектин-ліпаза з висівок.

Залежність активності пектин-ліпазних комплексів від активної кислотності середовища визначали в широкому діапазоні рН (від 4,0 до 10,0) в 0,05 М трис-НСІ буфері. Було встановлено, що значення рН в даному діапазоні істотно не впливає на активність ферменту.

Оптимальне значення рН для ліпази і комплексів пектин-ліпаза однакове і складає 8,0. Температурний оптимум комплексу ліпази зрушений до ділянки вищих температур на 10 °С (від 40 °С для вільної, до 50 °С — для комплексу) (рис. 6). Спостерігається також значно менша чутливість комплексів ферменту до змін температури, що вказує на захист ферменту від теплової денатурації.

У четвертому розділі "Розробка технології отримання пектин-ліпазних комплексів з висівок і зародків зерна пшениці". До чинників, що визначають швидкість протікання ферментативних реакцій, відноситься концентрація субстрату. Залежність питомої активності досліджуваних ліпаз від концентрації оливкової олії показано на рис. 7.

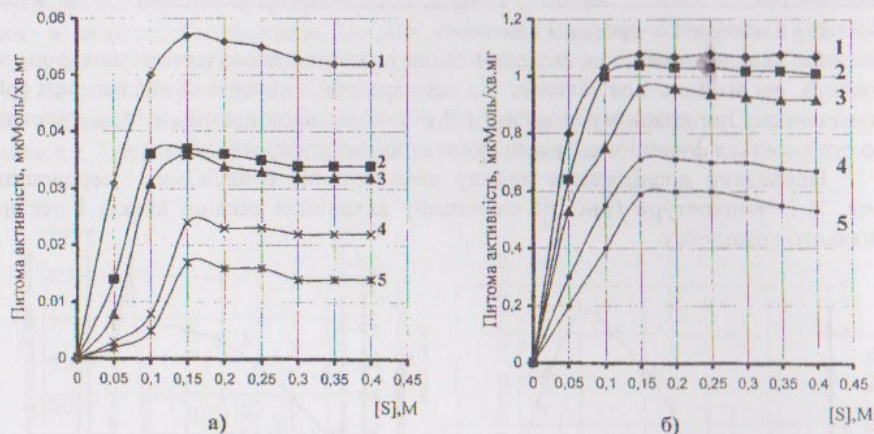


Рис. 7. Вплив концентрації оливкової олії на активність ліпаз-пектин препарату з зародків (а) і висівок (б) пшениці із ступенем естерифікації: 52; 31,1; 23; 75; 9,2 %, (1, 2, 3, 4, 5 відповідно).

На основі проведених експериментів розроблена принципова технологічна схема (рис. 8), що включає оптимізацію параметрів екстрагування, концентрацію-осадження ліпаз модифікованими пектиновими речовинами.

Таким чином запропонований спосіб отримання рослинної ліпази з висівок або зародків зерна пшениці методом осадження модифікованими пектиновими речовинами і подальшим ліофільним сушінням дозволив збільшити її активність з 1,2  $\mu\text{M}/\text{h}\cdot\text{mg}$  білка до 114  $\mu\text{M}/\text{h}\cdot\text{mg}$  білка.

Для характеристики реакції гідролізу оливкової олії визначені кінетичні параметри  $K_m$  і  $V_{\text{max}}$  (рис. 9а, 9б), значення яких визначені методом Лайнуївера-

Берка. Встановлено, що кінетичні параметри для ліпаз, виділених із зародків і висівок зерна пшениці, різні. Відмінності існують і для тих ліпаз, що знаходяться у водному екстракті і в пектин-ліпазному комплексі. Так,  $K_m$  для ліпаз з висівок складає 0,4 і 0,1  $\mu\text{M}$ , відповідно для ліпази екстракту і пектин-ліпазного комплексу. Їх  $V_{\text{max}}$  = 0,133  $\mu\text{M}/\text{h}$ .  $K_m$  для ліпаз, виділених від зародків, склали 0,33  $\mu\text{M}$  (екстракт) і 0,13  $\mu\text{M}$  пектин-ліпазного комплексу. Їх  $V_{\text{max}}$  = 0,033  $\mu\text{M}/\text{h}$ . Встановлено, що продукти гідролізу: гліцерин, жирні кислоти є інгібіторами ліпазної активності. Інгібування носить не конкурентний характер. Моно- і дигліцериди є конкурентними інгібіторами. Активація ліпази пектиновими поліаніонами можна пояснити утворенням певної щільності негативних зарядів на поверхні олії, що сприяє упорядкованості реагуючих молекул на поверхні розділу фаз.

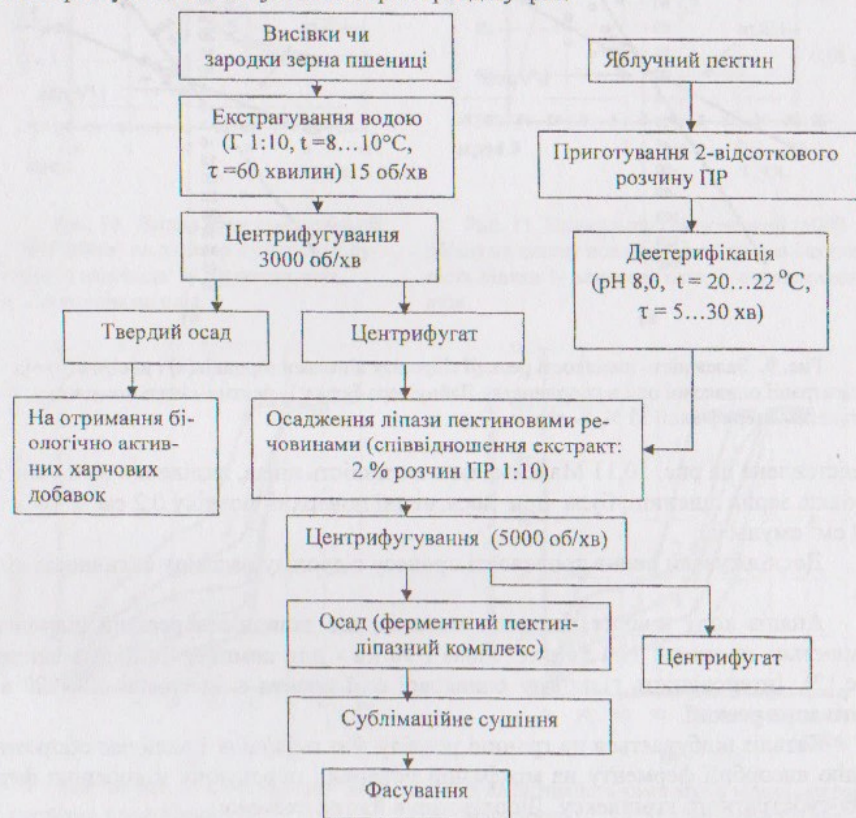


Рис. 8. Технологічна схема отримання гідролітичного ферментного пектин-ліпазного комплексу.

У п'ятому розділі "Ліполіз соняшникової і оливкової олій ліпазами із зародків і висівок зерна пшениці" досліджено вплив ступеня емульгування олій на глибину гідролізу, при постійній її концентрації. Емульсію отримували шляхом емульгування соняшникової (оливкової) олії препаратом ліпази активністю 1,2 мкМ/хв.мг білка. Зміна поверхні розділу фаз залежно від розміру кульки жиру.

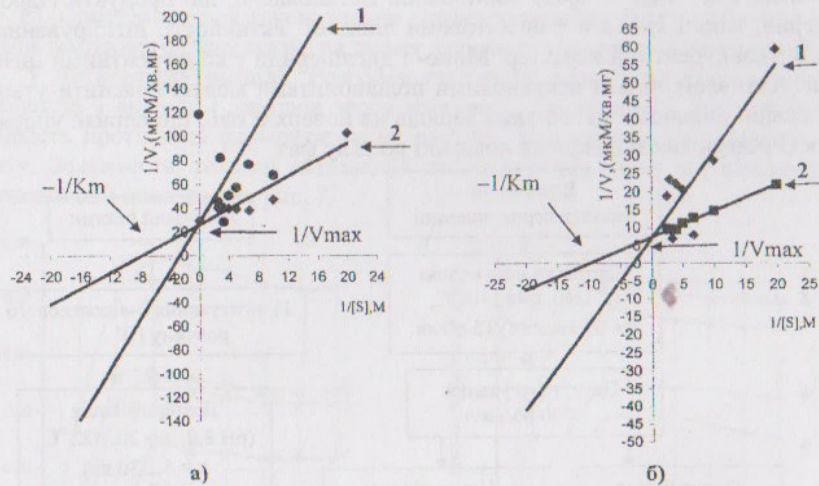


Рис. 9. Залежність швидкості реакції гідролізу ліпазами зародків(а) і висівок (б) від концентрації оливкової олії в координатах Лайнуівера-Берка: 1- пектин-ліпаза комплексу зі ступенем етерифікації 52 %, 2- ліпаза.

представлена на рис. 10,11 Максимальна активність ліпаз, виділених з висівок і зародків зерна пшениці, була при досягненні поверхні розділу  $0,2 \text{ см}^2 \times 10^5$  на  $100 \text{ см}^3$  емульсії.

Досліджували вплив тривалості процесу гідролізу на зміну активності ліпаз.

Аналіз ходу кривих гідролізу показав, що швидкість реакцій гідролізу змінюється протягом 120 хв для ліпаз і 90 хв - для комплексів ліпаза-пектин (рис.12). Інтенсивність гідролізу оливкової олії висока в інтервалі 120-180 хв протікання реакції.

Каталіз відбувається на границі розділу фаз олія/вода і включає оборотну стадію адсорбції ферменту на міжфазній поверхні, передуючу утворенню фермент-субстратного комплексу. Ліполіз жирів йде за схемою:

Триацилгліцерид  $\rightarrow$  1,2-диацилгліцерид  $\rightarrow$  2-ацилгліцерид  $\rightarrow$  гліцерин + жирні кислоти.

У зв'язку з тим, що моно- і дигліцериди накопичуються протягом перших стадій ліполізу, тригліцериди гідролізуються швидше, ніж моно- і дигліцериди.

Глибину ліполізу соняшникової і оливкової олій визначали за величиною кислотних чисел. Теоретично при гідролізі одного моля олії утворюватиметься один моль дигліцериду і одна молекула жирної кислоти. Кислотне число суміші дорівнюватиме 66.

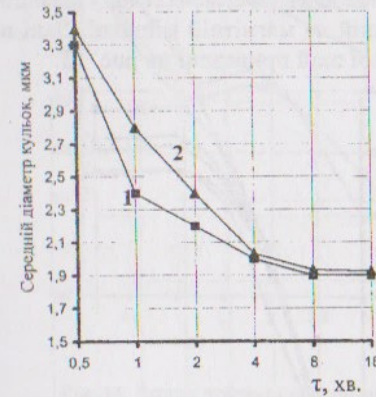


Рис. 10. Вплив часу гомогенізації (5000 об/хв) на діаметр кульок олії суспензій олія/вода: 1- оливкова олія, 2- соняшникова олія.

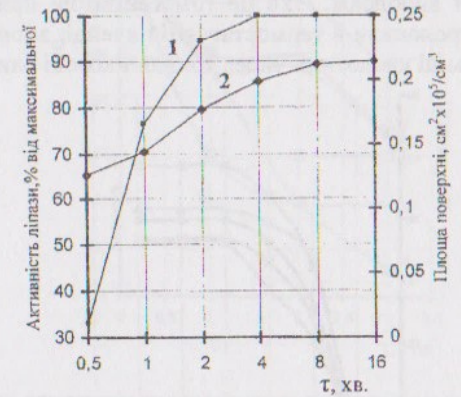


Рис. 11. Вплив часу гомогенізації (5000 об/хв) на площу поверхні розділу фаз і активність ліпази 1- оливкова олія, 2- соняшникова олія.

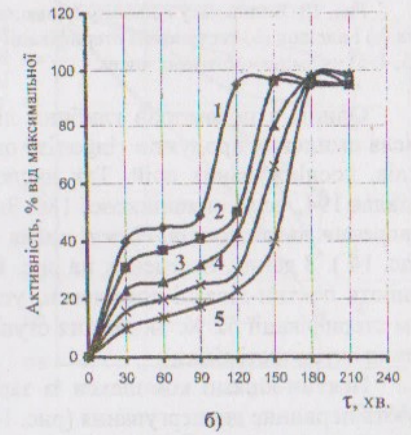
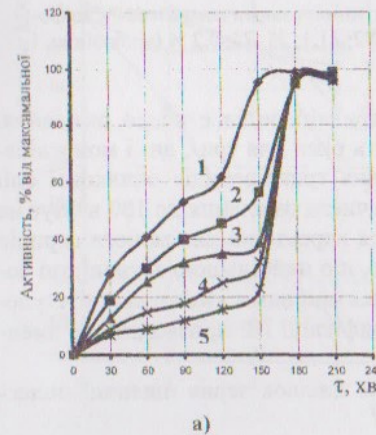


Рис. 12. Вплив часу гідролізу оливкової олії на активність комплексів ліпаза-пектин зі ступенем етерифікації: 52; 31,1; 23; 75; 9,2 %, (відповідно 1,2,3,4, 5) з зародків (а) і висівок (б) зерна пшениці.

При гідролізі тригліцериду до моногліцериду кислотне число суміші складе 133, а при повному гідролізі 200. Рафіновану соняшникову (оливкову) олію з кислотним числом 0,2 змішували з рівною кількістю водного розчину ліпази з активністю 1,2 мкМ/хв.мг, білки емульгували при кімнатній температурі впродовж 2 хв на гомогенізаторі при 5000 об/хв. Ферментативну реакцію проводили в термостатувемій ячeyці, змонтованій на магнітній мішалці. Дані по зміні кислотних чисел соняшникової і оливкової олій приведені на рис. 13.

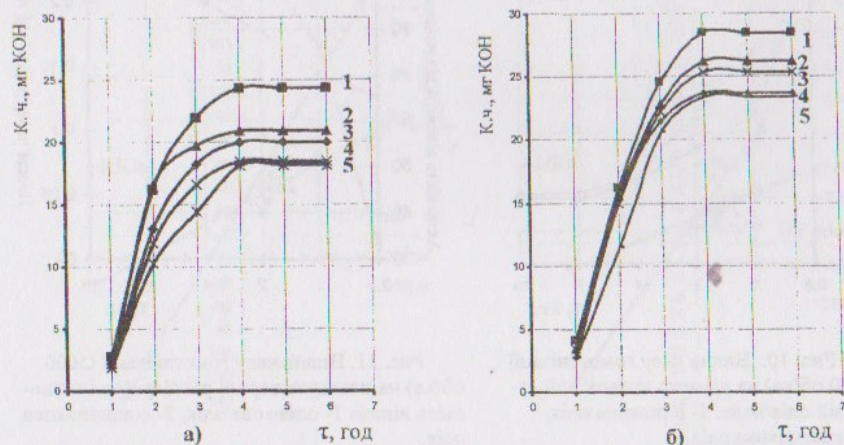


Рис. 13. Вплив часу гідролізу оливкової олії пектин-ліпазними комплексами з зародків (а) і висівок (б) із ступенем естерифікації пектину: 52; 31,1; 23; 75; 9,2 % (відповідно, 1, 2, 3, 4, 5) на зміну кислотних чисел.

Одним з показників глибини ліполізу тригліцеридів є число омилення. Числа омилення продуктів гідролізу олій будуть різні для три-, ди- і моногліцеридів, досліджуваних олій. Так число омилення тригліцеридів оливкової олії складає 194, для соняшникової 186. Зниження числа омилення до 180 вказує на утворення дигліцеридів. Нижчі числа омилення характерні для моногліцеридів (рис. 14). З даних, наведених на рис. 15, видно, що найбільшою активністю володіють пектин-ліпазні комплекси, утворені пектиновими кислотами зі ступенем естерифікації 52%. Зниження ступеня естерифікації ПР призводить до зменшення активності ліпаз.

Пектин-ліпазні комплекси із зародків або висівок зерна пшениці полегшують первинне диспергування (рис. 14, 15).

Стійкість тонкодисперсних емульсій можна підвищити використанням стабілізатора. Складовою препаратів ліпази є пектин. Пектин, будучи желатиноподібним колоїдом, підсилює емульгуючі властивості моно- і дигліцеридів, що утворюються при ліполізі рослинних олій. На рис. 16 представлені результати стабілізуючої дії препаратів ліпаза-пектин.

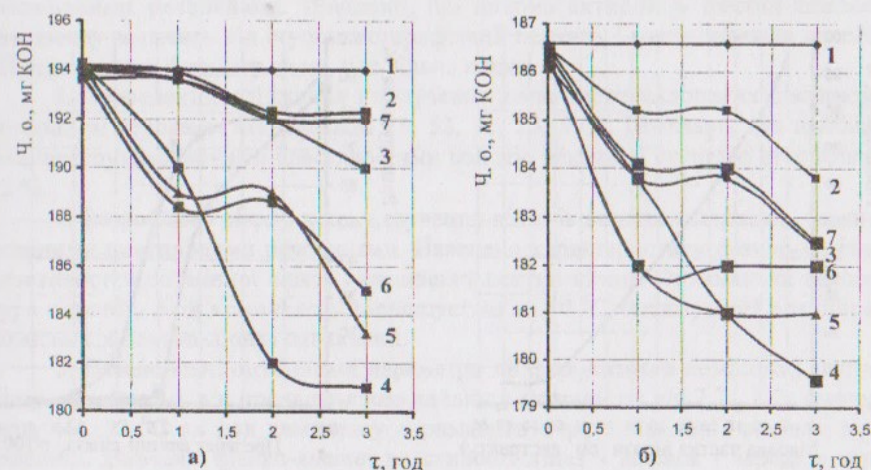


Рис. 14. Вплив природи пектин-ліпазних комплексів із зародків зерна пшениці зі ступенем естерифікації пектину на зміни числа омилення оливкової (а) і соняшникової (б) олій: 1 - контроль, 2 - водний екстракт ліпази, 3, 4, 5, 6, 7 комплекс з пектиновими речовинами зі ступенем естерифікації 75, 52, 31, 23, 9 % відповідно.

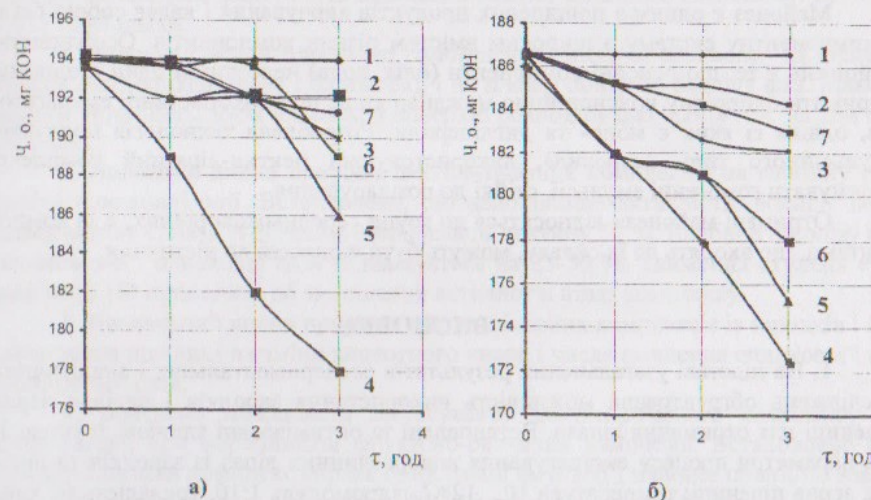


Рис. 15. Вплив природи пектин-ліпазних комплексів з висівок зерна пшениці зі ступенем естерифікації пектину на зміни числа омилення оливкової (а) і соняшникової (б) олій: 1 - контроль, 2 - водний екстракт ліпази, 3, 4, 5, 6, 7 комплекс з пектиновими речовинами зі ступенем естерифікації 75, 52, 31, 23, 9 % відповідно.

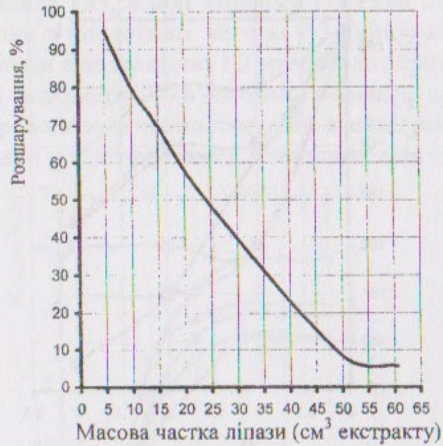


Рис. 16. Вплив масової частки ліпази на розшарування емульсії типу вода/олія

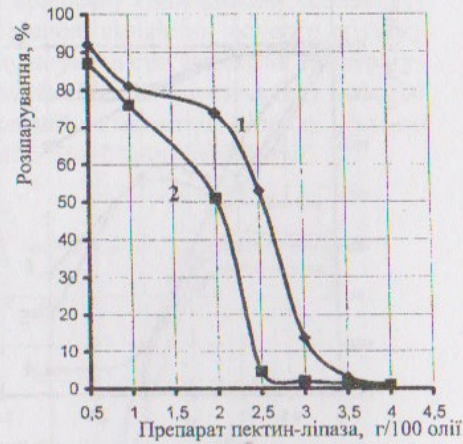


Рис. 17. Вплив масової частки ліпази на розшарування емульсії типу вода/олія: 1 - комплекс ліпаза-пектин із зародків, 2 - комплекс ліпаза-пектин з висівків

Майонез є одним з поширених продуктів харчування і являє собою багатокомпонентну систему з широким вмістом різних компонентів. Особливістю майонезів є те, що основні компоненти (олія, вода) нерозчинні один в одному. Отримати однорідну консистенцію можливо лише при використанні емульгаторів, одним із яких є моно- та дигліцериди. Розроблена технологія продуктів емульсійного типу дозволила, використовуючи пектин-ліпазний комплекс, отримувати гомогенні емульсії, стійкі до розшарування.

Отримані майонези відносяться до групи середньокалорійних, а за компонентами, що входять до їх складу, можуть бути віднесені до дієтичних.

## ВИСНОВКИ

1. На підставі узагальнених результатів експериментальних і аналітичних досліджень обґрунтована можливість використання зародків і висівок зерна пшениці для отримання ліпази. Встановлені та оптимізовані ключові технологічні параметри процесу екстрагування водорозчинних ліпаз із зародків та висівок зерна пшениці: температура 10...12°C, гідромодуль 1:10, тривалість 60 хвилин.

2. Теоретично обґрунтовано та експериментально доказана можливість використання пектинових речовин з різною ступеню етерифікації для осадження білка (ферментного препарату ліпази) із екстрактів. Вивчено процес комп-

лексоутворення ліпази із зародків і висівок зерна пшениці з модифікованими пектиновими речовинами. Показано, що питома активність пектин-ліпазного комплексу залежить від ступеню етерифікації пектину і менш залежна до зміни рН середовища й температури, ніж вільна ліпаза.

3. Проведені дослідження з вилучення низькометоксилонаних пектинових речовин зі ступенем етерифікації 75, 52, 31, 23, 9 %. Показано, що найбільш комплексуючими властивостями володіє пектин зі ступеню етерифікації 52 %.

4. Розроблено спосіб концентрування ліпаз із водних екстрактів модифікованими пектиновими речовинами. Наведено характеристику фізико-хімічних властивостей розчинної ліпази і комплексу пектин-ліпаза. Оптимальна температура гідролізу олій комплексом підвищується на 10 °С, оптимум рН для ліпази і комплексів пектин-ліпаза однаковий.

5. Встановлені оптимальні параметри дії ферментного комплексу пектин-ліпаза, при якому він проявляє свою найвищу активність: рН 7,7...8,2; температура 46...53 °С як для комплексу отриманого з зародків, так і висівок зерно пшениці. Вивчено фізико-хімічні властивості ліпаз з висівок і зародків зерна пшениці. Встановлено, що кінетичні параметри для ліпаз, виділених із зародків і висівок зерна пшениці, різні. Значення  $K_m$  для ліпаз з висівок складає 0,4 і 0,1 мкМоль/л, відповідно для ліпази екстракту і пектин-ліпазного комплексу.  $\dot{X} V_{max}$  0,133 мкМоль/хв.  $K_m$  для ліпаз, виділених від зародків, склало 0,33 мкМоль/л (екстракт) і 0,13 мкМоль/л пектин-ліпазного комплексу.  $\dot{X} V_{max}$  0,033 мкМоль/хв.

6. Вивчений вплив тривалості гомогенізації системи олія/вода на діаметр кульок олії (соняшникова і оливкова), і на площу поверхні розділу фаз. Максимальна активність досягається при поверхні розподілу фаз  $0,2 \times 10^5 \text{ см}^2$  на  $100 \text{ см}^3$  емульсії.

7. Вивчений вплив природи пектин-ліпазних комплексів на глибину гідролізу оливкової олії. Встановлено, що найбільшою активністю володіє комплекс пектин-ліпаза із ступеню етерифікації пектину 52 %. Глибина ліполізу соняшникової і оливкової олій підвищується на 25-30 %. Зниження ступеня етерифікації ПР приводить до зменшення активності ліпаз комплексу.

8. Визначений вплив природи пектин-ліпазних комплексів із зародків і висівок зерна пшениці на зміни кислотного числа і числа омилення оливкової і соняшникової олій.

9. Доведено можливість застосування пектин-ліпазного комплексу як емульгатора при виробництві фруктово-овочевих майонезів. Встановлено що пектин-ліпазний комплекс сприяє стабілізації емульсії і майонез повністю зберігає свою структуру при температурі 85 °С і руйнується при 100 °С.

Розроблено технологічну схему отримання фруктово-овочевих майонезів.

10. Розроблено принципову технологічну схему отримання ліпази із зародка і висівок зерна пшениці із застосуванням модифікованих пектинових речо-

вин, проведено її промислово апробацію, розроблено нормативну документацію.

### Перелік публікацій за темою дисертаційної роботи

1. Безусов А. Т. Виділення та очистка ліпази з зародків зерна пшениці / А. Т. Безусов, З. Ю. Средницкая, Хассан Е. А. Рамадан // Зернові продукти і комбікорми. – 2007. – № 4. – С. 11 – 14.

*Особистий внесок здобувача: досліджено процеси екстрагування ліпаз із зародків та висівок зерна пшениці. Проведена оптимізація процесу екстрагування.*

2. Хассан Е. А. Рамадан. Осадження рослинних ліпаз пектином. Хассан Е. А. Рамадан, А. Т. Безусов, З. Ю. Средницкая // Харчова наука і технологія. – 2008. – Т 2 (2). – С. 11 – 13.

*Особистий внесок здобувача: досліджено процес концентрування ліпаз із водних екстрактів модифікованими пектиновими речовинами та дана характеристика пектин-ліпазних комплексів.*

3. Хассан Е. А. Рамадан. Ліполіз соняшникової і оливкової олій ліпазами з висівок та зародків зерна пшениці. Хассан Е. А. Рамадан, А. Т. Безусов // Харчова наука і технологія. – 2008. – № 3 (4). – С. 29 – 30.

*Особистий внесок здобувача: досліджено процес ферментативного гідролізу соняшникової та оливкової олій пектин-ліпазними комплексами. Встановлені параметри процесу.*

4. Хассан Е. А. Рамадан. Розробка технології фрукто-овочевих майонезів. Хассан Е. А. Рамадан, А. Т. Безусов, З. Ю. Средницкая // Харчова наука і технологія. – 2008. – № 4 (5). – С.38 – 41.

*Особистий внесок здобувача: розроблена технологія отримання емульгованих продуктів типу «майонез». Розрахована енергетична цінність фруктово-овочевих майонезів.*

5. Immobilization of lipase from plant in pectin. A.T. Bezusov, Nassan E.A. Ramadan. " Науч. конф. с междунар. участие „Хранительна наука, и техника и технологи 2008", Научни Трудове, Пловдив. Том LV, Свитк 1, 24-25 жовтня 2008 – С. 337-341.

*Особистий внесок здобувача: проведені дослідження, обробка та узагальнення результатів. Підготовка матеріалів до друку.*

6. Хассан Е. А. Рамадан. Застосування пектинових речовин для осадження рослинних ліпаз з екстрактів." МГУП. Техніка і технологія харчових виробництв. 6-а - міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів. Республіка Білорусь м. Могильов. 24-25 квітня 2008 р.- С. 42 - 43.

*Особистий внесок здобувача: досліджено процес комплексоутворення ліпаз з пектиновими речовинами різного ступеня етерифікації.*

7. Хассан Е. А. Рамадан. асп. Порівняння активності ліпаз в продуктах переробки зерна: зародки і висівки " збірка праці молодих учених, аспірантів і студентів ОНАХТ.- 2008 р. - С.183 – 185.

*Особистий внесок здобувача: проведені дослідження, обробка та узагальнення результатів. Підготовка матеріалів до друку.*

8. Хассан Е. А. Рамадан., З. Ю. Средницкая. Дослідження процесу гідролізу соняшникової і оливкової олій рослинними ліпазами " Четверта міжнародна наукова конференція. Полтава 24 - 26 листопада 2008 р.– С. 81 – 84.

*Особистий внесок здобувача: проведені дослідження, обробка та узагальнення результатів. Підготовка матеріалів до друку.*

### АНОТАЦІЯ

**Хассан Е. А. Рамадан. Удосконалення способу виділення рослинних ліпаз та їх застосування в технологіях харчових продуктів. - Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.20 - біотехнологія. - Одеська національна академія харчових технологій, Міністерства освіти і науки України, Одеса, 2009.

Дисертація присвячена розробці технології отримання і концентрації ліпаз з відходів переробки зерна (зародок і висівки) пшениці та їх використання при виробництві фруктово-овочевих майонезів.

Розроблені параметри екстракції ліпази із зародків і висівок зерна пшениці, концентрації і очищення. Найбільший вплив на осадження білків і ліпази із зародків або висівок зерна пшениці спостерігається пектиновими речовинами зі ступенем етерифікації 52 %.

Розроблені способи отримання високоактивного комплексу пектин-ліпази із зародків і висівок зерна пшениці. Дана характеристика фізико-хімічних властивостей ліпази і комплекс пектин-ліпаза. Питома ліпазна активність становить 0,16 мкМоль/хв.мг для ліпази із зародків і 1,20 мкМоль/хв.мг для ліпази з висівок.

Встановлені оптимальні параметри процесу гідролізу тригліцеридів оливкової або соняшникової олій вільною ліпазою і пектин-ліпазою комплексів та визначені закономірності впливу на ступінь гідролізу тригліцеридів температури, масової частки субстрату і ферменту та часу гідролізу.

Розроблена технологія виробництва фруктових і овочевих майонезів на основі продуктів гідролізу тригліцеридів. Розроблена нормативна документація на фруктові і овочеві майонези.

**Ключові слова:** ліпаза, очищення і концентрації, зародок і висівки зерна пшениці, пектин, емульсія, майонез, біотехнологія.

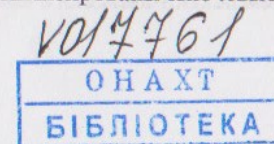
### АННОТАЦИЯ

**Хассан Е. А. Рамадан. Усовершенствование способа выделения растительных липаз и их применение в технологиях пищевых продуктов. - Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 -- биотехнология. - Одесская национальная академия пищевых технологий, Министерства образования и науки Украины, Одесса, 2009.

Диссертация посвящена разработке технологии получения и концентрирования липаз из отходов переработки зерна (зародыш и отруби) пшеницы и их использования при производстве фруктовых и овощных майонезов.

Разработаны параметры экстракции липазы из зародышей и отрубей зерна пшеницы, концентрирования и очистки. Оптимизированы ключевые технологи-



ческие параметры процесса экстрагирования водорастворимых липаз и зародышей и отрубей пшеницы: температура 10...12 °С, гидромодуль 1:10, продолжительность 60 мин.

Установлено, что ферментный препарат с наиболее высокой липолитической активностью может быть получен путем настаивания с экстрагирующим агентом (вода) при гидромодуле 1:10 и температуре 10...12 °С.

Разработаны условия получения низкометоксилированных пектиновых веществ с различной степенью этерификации, а также способность их к комплексообразованию. Установлено, что наибольшей комплексообразующей способностью обладает пектин со степенью этерификации 52 %.

Доказана возможность использования пектиновых веществ с различной степенью этерификации для осаждения (ферментативного препарата липазы) из водных экстрактов зародышей и отрубей зерна пшеницы.

Разработаны условия комплексообразования липазы из зародышей зерна и отрубей пшеницы с модифицированными пектиновыми веществами. Дана характеристика физико-химических свойств липазы и комплекса пектин-липаза. Удельная липазная активность составляет 0,16 мкмоль/мин·мг для липазы из зародышей и 1,20 мкмоль/мин·мг для липазы из отрубей. Установлено, что удельная активность пектин-липазного комплекса зависит от степени этерификации пектина и меньше зависит от изменения рН среды и температуры, чем свободная липаза.

Установлены оптимальные параметры процесса гидролиза триглицеридов оливкового или подсолнечного масел свободной липазой и пектин-липазой комплексов и определены закономерности влияния на степень гидролиза триглицеридов температуры, массовой доли субстрата и фермента и времени гидролиза. Установлены, что кинетические параметры для липаз выделенных из зародышей и отрубей зерна пшеницы различны. Значение  $K_m$  для липаз с отрубей составляет 0,4 и 0,1 мкмоль/л, соответственно для липазы экстракта и пектин-липазного комплекса, для них  $V_{max}$  0,133 мкмоль/мин.  $K_m$  для липаз, выделенных из зародышей составило 0,33 мкмоль/л (экстракт) и 0,13 мкмоль/л пектин-липазного комплекса. Для них  $V_{max}$  0,033 мкмоль/мин.

Установлено влияние продолжительности гомогенизации системы «масло-вода» от диаметра жировой частички масла (подсолнечного и оливкового), а также на площадь поверхности раздела фаз.

Показано, что наибольшей активностью на процесс гидролиза триглицеридов (подсолнечного и оливкового масла), оказывает ферментный комплекс пектин-липаза со степенью этерификации пектина 52 %. При этом глубина гидролиза возрастает на 25...30 %, в сравнении с использованием при ферментации свободной липазы. Снижение степени этерификации приводит к уменьшению активности липазы в пектин-липазном комплексе.

Разработана технология получения фруктово-овощных майонезов с использованием пектин-липазного комплекса в качестве эмульгаторов.

Установлено, что пектин-липазный комплекс способствует стабилизации эмульсии, и майонез полностью сохраняет свою структуру при температуре 85 °С. Разработана принципиальная технологическая схема получения липазы из зародыша и отрубей зерна пшеницы с применением модифицированных пектиновых веществ, проведена промышленная апробация, разработана нормативная документация на фруктовые и овощные майонезы.

**Ключевые слова:** липаза, очистка и концентрирования липаз, зародыш и отруби зерна пшеницы, пектин, эмульсия, майонез, биотехнология.

## SUMMARY

**Hassan E. A. Ramadan. Improvement of the separation method of plant lipases and their application in technologies of foodstuffs.**

The thesis is subjected for the granting of Ph.D. scientific degree of engineering science, speciality 03.00.20 – biotechnology. – Odessa National Academy of Food Technologies, Ministry of Education and Science of Ukraine, Odessa, 2009.

The thesis is devoted to development of technology of reception and concentration of lipases from a secondary products of processing of wheat grains (a germ and bran) and their use in manufacture of fruit-vegetable mayonnaise.

Parameters of concentration and purification of lipases extraction from germs and brans of wheat grains, are developed. The greatest influence on precipitation of proteins and lipases from germs or brans of wheat grains is observed by pectinaceous substances with degree etherification 52 %.

Developed the method of reception of a highly active complex pectin-lipases from germs and bran of wheat grains. The characteristics physical and chemical properties of dissolved and complex of pectin-lipases are given. Specific lipase activity of 0,16  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  for lipases from germs and 1,20  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  for lipases from bran were obtained.

Optimum parameters of process of hydrolysis triglycerides (olive or sunflower oils) by lipases (free and pectin-lipases complexes) are established and determined influence of temperature, substrat concentration, enzyme concentration and hydrolysis time on hydrolysis of triglycerides.

The technological manufacture of fruit-vegetable mayonnaise on the basis of products of hydrolysis triglycerides was developed. The standard documentation on fruit-vegetable mayonnaise is developed.

**Key words:** lipase, purification and concentration of lipases, germs or brans of wheat grains, pectin, emulsion, mayonnaise, biotechnology.