

ОДЕСЬКА ДЕРЖАВНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

ГУБАРЕНКО ПАВЛО СЕРГІЙОВИЧ

УДК 577.125.53

**РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОТРИМАННЯ
МОДИФІКОВАНИХ РОСЛИННИХ ФОСФОЛІПІДІВ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата технічних наук

Одеса - 2001

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Одеській державній академії харчових технологій,
Міністерство освіти і науки України

Науковий керівник: доктор технічних наук, професор
Капрельянц Леонід Вікторович,
Одеська державна академія харчових технологій,
завідувач кафедри біохімії та мікробіології

Офіційні опоненти: доктор технічних наук, професор
Безусов Анатолій Тимофійович,
Одеська державна академія харчових технологій,
завідувач кафедри технології консервування;

кандидат технічних наук, доцент

Шерстобітов Валерій Валентинович,
Закрите акціонерне товариство НПО "Одеський біотехнологічний
інститут", замісник генерального директора з технологій

Провідна установа: Український державний університет харчових технологій,
проблемна науково-дослідна лабораторія, Міністерство освіти і
науки України, м. Київ.

Захист відбудеться 07.06.2001 року о 10-30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д
41.088.02 Одеської державної академії харчових технологій (65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської державної академії харчових
технологій. Україна, (м. Одеса, вул. Канатна, 112).

Автореферат розісланий 06.05. 2001 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Віннікова Л.Г.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Найважливішою сучасною тенденцією в корекції стану здоров'я населення є використання в харчуванні біологічно активних добавок (БАД) – амінокислот, вітамінів, білків, мінеральних речовин та ін., за участю яких здійснюється регулювання механізмів гомеостазу, тобто динамічної сталості складу і властивостей внутрішнього середовища та стійкості основних фізіологічних функцій організму людини. Крім того, БАД користуються значним попитом, який задовольняється переважно продукцією закордонного виробництва, що визначає актуальність створення вітчизняних БАД з регіональної сировини та адаптування їх до потреб мешканців певних регіонів.

Одним із перспективних БАД у плані посилення захисного потенціалу організму можуть бути фосфоліпіди і їх похідні, зокрема лецитин, які містяться у фосфатидному концентраті – вторинному продукті переробки насінь олійних культур.

Лецитин – попередник ацетилхоліну – найважливішого нейромедіатора організму людини, основна складова мієлінової оболонки мозку і нервових волокон, а також клітинних мембран. Його дефіцит є причиною дратівливості, стомлюваності, погіршення пам'яті і спроможності зосередитися, безсоння, порушення функцій печінки. Лецитин бере участь у багатьох біохімічних процесах, сприяє виведенню холестерину шляхом зв'язування його з жовчними кислотами, перешкоджає утворенню каменів у жовчному міхурі і багато чого іншого. Поряд із високою біологічною цінністю фосфоліпідів вони мають важливі технологічні функції в харчових продуктах, що пов'язані з емульгуванням, особливостями яких є спроможність утворювати і підтримувати в однорідному стані як прямі, так і зворотні емульсії, стабілізація різноманітних систем, піногасіння, антирозприскуюча спроможність, спроможність запобігати прилипанню виробів до різноманітних матеріалів і інше. Перераховані властивості фосфоліпідів визначають їх як традиційні харчові добавки, які вводять в харчові продукти з метою надання їм заданих властивостей, а також їх зберігання, оскільки відома, наприклад, антиоксидантна дія деяких фосфоліпідів. До того ж, від більшості інших харчових добавок (наприклад, моногліцеридів, споживання яких складає біля 60 % загальної кількості харчових емульгаторів) препарати фосфоліпідів відрізняє висока фізіологічна активність, у зв'язку з чим їхнє використання виходить за рамки рішення тільки технологічних завдань і створює передумови для створення нових видів продуктів харчування, які позитивно впливають на здоров'я людини.

Актуальність теми. Численні дослідження свідчать про порівняно слабку водно-олійну і олійно-водну емульгуючу силу нативних фосфоліпідів. З метою модифікації технологічних властивостей використовуються фізико-хімічні і біотехнологічні методи, що дозволяють змінювати гідрофільно-ліпофільний баланс фосфоліпідів, а отже і поверхневу активність препарату, що визначає технологічні функції добавок фосфоліпідів у різноманітних харчових

системах.

З існуючих методів перевага віддається ферментній технології. За допомогою специфічних ферментів можуть бути отримані частково гідролізовані фосфоліпіди з яскраво вираженими олійно-водяними емульгуючими властивостями. Хоча в лабораторних масштабах використовуються декілька типів фосфоліпаз, у промисловому масштабі фосфоліпаза A_2 найбільш прийнятна. Цей фермент специфічно розщеплює жирні кислоти в другому положенні молекул фосфоліпідів. Отримані за таким способом лізоформи фосфоліпідів є більш гідрофільними агентами. Їхня емульгуюча сила у системі олія-вода набагато перевершує нативні фосфоліпіди, що дозволяє ефективніше використовувати модифіковані фосфоліпіди в харчовій промисловості за емульгатор.

Незважаючи на наявність відповідної сировинної і виробничої бази, в Україні подібні модифіковані фосфоліпідні продукти не виробляються, що пов'язано з відсутністю як вітчизняних технологій біомодифікації фосфоліпідів, так і ферментних препаратів, що використовуються у подібних технологіях.

На підставі викладеного, актуальною є розробка вітчизняного ферментного препарату, призначеного для модифікації фосфоліпідів, а також розробка технології переробки фосфоліпідної сировини в модифікований харчовий продукт із регульованими фізико-технологічними властивостями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота відповідає тематиці міжвузівської програми науково-дослідної роботи №31 “Будова, склад, властивості і перетворення компонентів рослинної сировини як основи створення поліфункціональних добавок, збагачувачів і модулів для одержання продуктів з новими властивостями, які забезпечують продовольчу безпеку населення України”, яку затверджено наказом Міністерства освіти і науки України № 271 від 15.08.96, зокрема, темі досліджень проблемної лабораторії Одеської державної академії харчових технологій 2/97-П “Розробка наукових основ і технологій виробництва харчових речовин та функціональних продуктів харчування на основі біотехнологічних методів переробки рослинної сировини, біомаси мікроорганізмів та екзометаболітів” (№ держреєстрації 0197016054).

Мета і задачі досліджень. Метою роботи є розробка біотехнології одержання модифікованих рослинних фосфоліпідів із поліпшеними функціональними властивостями і використання їх у харчових продуктах.

У зв'язку з цим, задачами роботи є:

1. Вивчення складу й основних фізико-хімічних властивостей промислових зразків рослинних олій і фосфоліпідів, отриманих із насіння сучасних сортів соняшнику;
2. Вибір і обґрунтування технології одержання фосфатидного концентрату з

- використанням поляризуючого реагенту, визначення оптимальних режимів;
3. Розробка удосконаленої технології гідратації рослинних олій і додаткового очищення одержуваного фосфатидного концентрату від супутніх речовин;
 4. Вивчення фізико-хімічних і функціонально-технологічних показників фосфоліпідів, отриманих за розробленою технологією;
 5. Розробка методу одержання ферментного препарату, з специфічною фосфоліпазою A_2 активністю та вивчення його властивостей;
 6. Розробка технологічних параметрів ферментативної модифікації фосфоліпідів фосфоліпазою A_2 і вивчення фізико-хімічних і функціонально-технологічних показників отриманих продуктів;
 7. Дослідження емульгуючої сили модифікованих фосфоліпідів у харчових системах.

Наукова новизна. Теоретично обґрунтовано й експериментально підтверджено доцільність використання поляризуючого реагенту на основі суміші янтарної і лимонної кислот, що гарантувало більш якісне виведення комплексу фосфоліпідів із нерафінованих соняшникових олій у порівнянні з класичною технологією гідратації, де за гідратуючий реагент використовується вода. Експериментально встановлена необхідна концентрація кислот і їх співвідношення в реагенті.

Встановлено режими одержання фосфоліпідного продукту, вільного від супутніх речовин (нейтральних ліпідів, пігментів, продуктів окислення тощо).

Отримано ферментний препарат із фосфоліпазою A_2 активністю на основі панкреатину і показано можливість його використання у біомодифікації рослинних фосфоліпідів.

Охарактеризований за фізико-хімічними і функціонально-технологічними властивостями модифікований фосфоліпідний продукт, отриманий за розробленою технологією.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі проведених експериментальних і теоретичних досліджень розроблена технологія виробництва модифікованого фосфоліпідного препарату з поліпшеною емульгуючою силою.

Запропоновані технології отримання фосфоліпідних продуктів апробовані на Одеському олійножировому комбінаті і Одеському підприємстві по виробництву бактерійних препаратів.

Отримані дані увійшли в основу розробленої нормативно-технічної документації на виробництво гідролізованих фосфоліпідів (ГФЛ).

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок полягає у забезпеченні методичного оформлення роботи, участі у виконанні аналітичної й експериментальної роботи, аналізі й узагальненні отриманих даних, формуванні висновків і рекомендацій, підготуванні матеріалів

досліджень до публікації, розробці нормативно-технічної документації, промислової апробації розробленої технології. Особистий внесок здобувача підтверджується поданими документами і науковими публікаціями.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень повідомлені на наукових конференціях Одеської державної академії харчових технологій (Одеса, 1998, 1999, 2000 рр.); третьої міжнародної науково-практичної конференції “Хлебопродукты-2000” (Одеса, 2000р.); міжнародної конференції, присвяченої 100-річчю А.М.Несм'янова (Москва, 1999р.); міжнародної конференції молодих вчених “Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов” (Москва, 2000р.); четвертому установчому Українському мікробіологічному з'їзді (Чернігів, 2000р.).

Публікації. Результати дисертації опубліковані в 6 друкованих роботах, включаючи 4 статті в збірниках наукових праць, 2 тези.

Структура і обсяг роботи. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку літератури та дев'яти додатків. Зміст роботи викладено на 197 сторінках, включаючи 33 таблиці (5 стор.), 37 рисунків (10 стор.), 10 додатків (27 стор.). Список використаних бібліографічних джерел містить 233 найменувань (20 стор.).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обгрунтовано актуальність теми досліджень, визначено наукову новизну та практичну цінність, сформульовано загальну мету та спрямованість роботи.

У першому розділі на базі аналізу літературних джерел розглянуті питання, пов'язані з властивостями фосфоліпідів і їхньої біологічної ролі. Описано широкий спектр біологічних і фізіологічних функцій рослинних фосфоліпідів, що дозволяє в цілому розглядати фосфоліпіди як біопротектори, які у стресових для організму ситуаціях виступають як регулятори механізмів гомеостазу; а також функціонально-технологічних функцій фосфоліпідів, які засновані на одній із найважливіших їхніх властивостей – поверхневій активності і визначають фосфоліпіди як харчові добавки, котрі навмисно вводяться в харчові продукти з метою надання їм заданих властивостей (попередження розшарування, поліпшення консистенції та ін.). Наведено основні шляхи виділення, очищення й ідентифікації фосфоліпідів. Обгрунтовано необхідність модифікації рослинних фосфоліпідів біотехнологічним шляхом з метою поліпшення функціональних властивостей фосфоліпідів. Розглянуто ліполітичні ферменти: їхня класифікація і специфічність дії. Детально розглянута фосфоліпаза A_2 , наведені дані про її фізико-хімічні властивості, механізми взаємодії із субстратом, методи одержання.

Базуючись на даних аналізу літератури, зроблений висновок про високу біологічну і

технологічну активність фосфоліпідів і ефективність їх одержання в модифікованій формі шляхом ферментативного гідролізу з використанням панкреатичної фосфоліпази A_2 , а також про доцільність досліджень, спрямованих на одержання вітчизняного ферментного препарату з фосфоліпазою A_2 активністю і розробки біотехнології одержання модифікованих фосфоліпідів із вторинного продукту переробки олійної сировини – фосфатидного концентрату.

В другому розділі "Організація експериментальних досліджень" викладені відомості про об'єкти, обладнання і методи досліджень. Подано структурну схему, що відображає основні напрямки досліджень і взаємозв'язок етапів рішення поставлених завдань даної роботи (рис.1).

Об'єктами досліджень у даній дисертаційній роботі були: фосфатидний концентрат (побічний продукт переробки насіння соняшнику), соняшникова олія, вироблені на Одеському олійножировому комбінаті за типовими технологіями; панкреатин, вироблений на Кременчуцькому заводі "Фармаком".

Основна частина досліджень проведена в лабораторіях кафедри біохімії і мікробіології ОДАХТ. Вивчення фізико-хімічних і функціонально-технологічних властивостей отриманих продуктів, які містили фосфоліпідів, здійснювали за допомогою хімічних, хроматографічних і спектрометричних методів дослідження. Промислові апробації розроблених технологій одержання фосфатидного концентрату (ФКР) з використанням поляризуючого реагенту на стадії гідратації й одержання частково гідролізованого фосфоліпідного продукту (ГФЛ) із використанням ферментного препарату з фосфоліпазою A_2 активністю були проведені на Одеському олійножировому комбінаті і Одеському підприємстві по виробництву бактерійних препаратів.

У третьому розділі "Виділення і характеристика фосфоліпідів" наведені експериментальні дані з вивчення процесу виділення фосфатидного концентрату із соняшникових олій шляхом гідратації з використанням поляризуючого реагенту і виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату шляхом екстракції з використанням полярного розчинника, а також розроблені схеми одержання ФКР і екстрагованих фосфоліпідів (ФЛП) і вивчені їх фізико-хімічні і функціонально-технологічні властивості.

Аналіз науково-технічної літератури показав, що найбільш ефективним засобом виділення гідратованих і трудногідратованих форм фосфоліпідів при гідратації нерафінованих олій є використання поляризуючого реагенту на основі суміші янтарної і лимонної кислот. Досліджено вміст фосфатидів в олії згідно технологій, за якими отримали гідратовані олії, а також вплив різноманітних технологій на деякі показники якості вироблених олій. Згідно даних, пресова олія містила фосфатидів – $0,58 \pm 0,02\%$ (у перерахунку на стеароолеофосфатидилхолін), а екстракційна олія – $0,69 \pm 0,02\%$. При проведенні пробної гідратації показано, що використання реагенту на

основі даних кислот значно збільшує ступінь гідратації в порівнянні з водою, а також покращує показники якості одержаної гідратованої олії і фосфатидного концентрату. Таким чином, отримані дані підтвердили висунуте положення про доцільність використання для гідратації олій комплексного реагенту на основі янтарної і лимонної кислот, оскільки їх застосування дозволяє знизити залишкове утримання фосфатидів в олії до 0,14 % (у порівнянні з застосуванням води – 0,28 %).

Дослідження фізико-хімічних показників фосфатидних концентратів за класичною (ФКС) і розробленою (ФКР) технологіями показали (табл.1), що ФКР має кращі показники, які характеризують ступінь окислення продукту. При цьому найбільший ефект досягався при гідратації поляризуючим реагентом у концентрації $2,3 \times M_{\phi}$ % до маси олії (M_{ϕ} – масова частка фосфоліпідів у нерафінованій олії); співвідношенні янтарної і лимонної кислот – 1,0:3,0 і концентрації суміші кислот у реагенті – $8,0 \times M_{\phi}$ %. Використання поляризуючого реагенту у цих концентраціях і співвідношенні дозволяє найбільш повно зруйнувати метал-фосфоліпідні комплекси з утворенням власних більш стійких комплексів кислот із металами, що й обумовлює найменші масові частки фосфоліпідів у гідратованих цим способом оліях.

На наступному етапі роботи вивчали умови виділення фосфоліпідів із ФКР. Для рішення цього завдання використали метод відділення фосфоліпідів від нейтральних ліпідів, у тому числі і від пігментів і продуктів окислювання шляхом селективної розчинності при осадженні ацетоном.

Досліджено вплив співвідношення ФКР:ацетон на якість виведення олії з ФКР і залежність кількості виділеної олії з фосфоліпідів від кратності обробки розчинником. Оптимальними умовами екстракції були: співвідношення ФКР:ацетон – 60:200 (або 0,3:1); кратність екстракції – 4 рази.

Отриманий знежирений фосфоліпідний продукт ФЛП відрізнявся підвищеним вмістом найбільш цінного компонента - комплексу фосфоліпідів, що складало не менше 95%, а також низьким перекисним числом і являв собою порошок кремового кольору (табл.1).

Таблиця 1

Фізико-хімічні показники фосфоліпідів

Показники	ФКС	ФКР	ФЛП	ГФЛ
Масова частка вологи і летких сполук, %	0,71±0,01	0,60±0,01	2,07±0,14	1,66±0,2
Масова частка фосфатидів, % в перерахунку на стеароолеофосфатидилхолін	60,14±0,04	63,21±0,1	95,40±1,5	96,03±1,2
Масова частка масла, %	38,03±0,03	34,80±0,08	0,72±0,02	0,6±0,1

Масова частка речовин нерозчинних у діетиловому ефірі, %	1,12±0,01	1,39±0,01	1,81±0,09	1,71±0,1
Кислотне число олій, виділеного із зразка, мг КОН /г	8,37±0,04	8,00±0,05	8,05±0,25	7,8±0,3
Перекисне число, ½О ммоль /кг	7,5±0,01	3,5±0,01	1,04±0,05	0,42±0,1
Кольорове число, мг I ₂	14,0±0,5	8,0±0,5	6,0±0,5	6,0±0,5
Консистенція	текуча	текуча	порошок	порошок

Для оцінки групового складу отриманих фосфоліпідних продуктів використали хроматографічні і спектрометричні методи дослідження. Наведено якісний і кількісний склад фосфоліпідних продуктів ФКР і ФЛП. Відповідно до результатів (табл.2), у ФЛП дещо зменшилася масова частка малополярних груп (фосфатидні кислоти, поліфосфатидні кислоти, дифосфатидилгліцериди, фосфатидилетаноламін) і виросла частка полярних груп (фосфатидилхолін, фосфатидилінозит, лізоформи), біологічна цінність яких вища, ніж малополярних груп.

Для порівняльної оцінки досліджуваних зразків ФКР, ФЛП, як емульгаторів, вивчали їх емульгуючу спроможність, для чого готувалися модельні емульсії (вода:олія:емульгатор) і вивчали їх стійкість до розшарування.

Як видно з рисунків (рис.2, 3), внесення ФЛП у кількості 4 % до маси емульсії дозволяє при 18 хв центрифугування зберегти 80 % нерозруйнованої емульсії. Для досягнення аналогічного результату стійкості необхідно і достатньо 6 % ФКР до маси емульсії, тобто в 1,5 рази більше, ніж ФЛП. Таким чином, отриманий фосфоліпідний продукт дозволяє скоротити витрату використовованого емульгатора в 1,5 рази.

Отриманий фосфоліпідний продукт ФЛП призначений для застосування як самостійної біологічно активної добавки в лікувальних і профілактичних цілях або як емульгатора, стабілізатора в харчовій промисловості, зокрема для виробництва борошняних виробів і емульсійних продуктів.

Таблиця 2

Якісний і кількісний склад фосфоліпідів

Група ФЛ	Вміст (масова частка), %		
	ФКР	ФЛП	ГФЛ
Лізофосфатидилхоліни	2,8	3,5	21,9
Лізофосфатидилетаноламіни	3,1	3,9	16,3
Інші лізофосфоліпіди	–	–	23,4
Фосфатидилсерини	2,6	3,7	1,1
Фосфатидилінозити	18,7	20,3	7,8
Фосфатидилхоліни	23,7	28,5	4,6
Фосфатидилетаноламіни	20,2	17,1	7,0
Дифосфатидилгліцерини	17,1	13,4	9,4
Поліфосфатидні кислоти	8,3	6,7	6,2
Фосфатидні кислоти	3,5	2,9	2,3

У четвертому розділі "Біотехнологія одержання модифікованих фосфоліпідів" наведені результати дослідження процесу одержання модифікованих фосфоліпідів із ФКР з використанням ферментного препарату фосфоліпазною A_2 активності і дані про властивості отриманого частково гідролізованого фосфоліпідного продукту (ГФЛ), а також технологічна схема одержання ГФЛ.

Загальновідомо, що природні фосфоліпіди в нативному виді мають слабкі водно-масляні і масляно-водні емульгуючі властивості, що пов'язано з низьким гідрофільно-ліпофільним балансом. Відомі також основні напрямки зміни емульгуючої спроможності хімічними і біотехнологічними методами. З існуючих методів модифікації властивостей фосфоліпідів біотехнологічні є найбільш прийнятними виходячи з того, що біологічні каталізатори (ферменти) є специфічними каталізаторами, які дозволяють цілеспрямовано вести хід реакції, не змінюючи хімічної природи вихідної сировини (чого не можна сказати про хімічні методи).

Розроблена схема одержання ферментного препарату з фосфоліпазною A_2 активністю з панкреатину у формі буферного розчину, яка включає рН-термічну обробку розчину панкреатину (концентрація – 2мг/см^3) при рН 4,0 і температурі $70\text{ }^\circ\text{C}$ тривалістю 3 хв. Отримано дані про вплив рН, температури, гідромодуля, концентрації внесеного трипсину на активність фосфоліпази A_2 і встановлено оптимальні умови дії ферментного препарату. Відповідно до даних, фосфоліпазна A_2 активність ферментного препарату при оптимальних умовах температури – $38\text{ }^\circ\text{C}$, рН середовища – 8,0, гідромодуля – 8,0 склала 4,0-4,5 Ед/мг. Термо- та рН-стабільність ферментного препарату в зоні проявлення ним максимальної активності дуже висока. Отримані дані вказують на можливість використання ферментного препарату для гідролізу фосфоліпідів протягом тривалого періоду часу. Внесення ферменту трипсину з метою підвищення активності фосфоліпази не зробило позитивного впливу, навпаки, знизило активність.

Вивчено вплив технологічних параметрів на процес гідролізу фосфоліпідів. З метою оптимізації окремих технологічних параметрів процесу одержання модифікованих фосфоліпідів із ФКР із використанням розробленого ферментного препарату використовували метод математичного планування експерименту. Вихідним параметром була стійкість емульсії до розшарування. Досліджували модельні емульсії олії у воді (з вмістом олії - 40 %) із використанням цільового гідролізованого продукту у концентрації 4 % до маси емульсії. Інтервали зміни досліджуваних параметрів (час процесу гідролізу – 13-15 год, концентрація ферментного препарату – 350-400 Од/г), що відповідають високій ефективності процесу гідролізу, були установлені відповідно до попередніх досліджень. Значення оптимальних параметрів процесу одержання модифікованих фосфоліпідів (ГФЛ) склали: концентрація ферментного препарату – 400 Од/г субстрату; час процесу гідролізу – 16 год.; температура – $38\text{ }^\circ\text{C}$; рН середовища – 8,0; гідромодуль – 8,0.

З урахуванням експериментальних даних розроблена технологічна схема процесу одержання модифікованого фосфоліпідного продукту ГФЛ (рис.4). Технологія одержання розроблених продуктів складається з трьох етапів: одержання фосфатидного концентрату ФКР, знежиреного фосфоліпідного продукту ФЛП і модифікованого фосфоліпідного продукту ГФЛ.

На першому етапі нерафіновану соняшникову олію піддають гідратації поляризуючим реагентом на основі суміші янтарної і лимонної кислот. Отриманий фосфатидний концентрат ФКР використовується для одержання знежиреного комплексу фосфоліпідів (ФЛП) або як субстрат для одержання модифікованих фосфоліпідів (ГФЛ). На другому етапі технології здійснюється обробка ФКР полярним розчинником і сушіння. На третьому етапі ФКР використовують як субстрат для гідролізу із застосуванням розробленого ферментного препарату, що володіє фосфоліпазною A_2 активністю, з подальшим знежиренням і сушінням аналогічно ділянці схеми одержання ФЛП.

Дослідження функціонально-технологічних властивостей ГФЛ (рис.5) показали, що ГФЛ володіє емульгуючою силою в 6 разів вище, ніж ФКР.

Дані про фосфоліпідний і жирнокислотний склад отриманих фосфоліпідних продуктів наведено в табл. 2 і 3. Згідно даних, цільовий фосфоліпідний продукт ГФЛ відрізнявся від ФЛП і ФКР більш високим вмістом насичених жирних кислот (30,4 %), що забезпечує більшу стійкість продукту до окислення при зберіганні, а також містив високий відсоток лізоформ фосфоліпідів (61,6 %), що забезпечує зсув гідрофільно-ліпофільного балансу у бік збільшення гідрофільності фосфоліпідного продукту.

Наведено дані про зміну якості фосфоліпідних продуктів ФКС, ФКР, ФЛП і ГФЛ при зберіганні (рис.6). Показано, що після 6 місяців зберігання перекисне число зросло у ФКС на 9,2, а у ФКР на 4,8 ммоль/кг, то в порошкоподібних зразків ФЛП і ГФЛ перекисне число зросло відповідно на 2,06 і 1,18 ммоль/кг. Тобто технологія одержання ФКР із використанням поляризуючого агента дозволила знизити швидкість накопичення перекисних сполук при збереженні продукту. Такі зразки, як ФЛП і ГФЛ, після їх виділення мали порівняно низькі значення перекисного числа, і у процесі збереження, накопичення первинних продуктів окислювання було незначним.

При дослідженні антиокислювальної дії розроблених фосфоліпідних продуктів показано, що внесення фосфоліпідних продуктів у рослинну олію дозволяє помітно знизити швидкість окислювання олії. Так, наприклад, якщо значення перекисного числа досягає розміру 10 ммоль/кг у зразку олії з ФЛП через 4 год інкубації при 100 °С, то в контрольному зразку олії, який не містив фосфоліпідні продукти – уже приблизно через 1,7 год. Найбільший антиокислювальний ефект спостерігається при використанні за антиокислювач продуктів ГФЛ і ФЛП.

Жирнокислотний склад фосфоліпідів

Найменування жирних кислот		Масова частка, % до суми жирних кислот		
		ФКР	ФЛП	ГФЛ
Міристинова	C _{14:0}	сліди	сліди	сліди
Пальмітинова	C _{16:0}	9,8±0,6	14,1±0,6	21,2±0,6
Стеаринова	C _{18:0}	4,6±0,4	6,5±0,3	9,2±0,3
Сума		14,4	20,6	30,4
Олеїнова	C _{18:1}	32,2±0,7	23,0±0,8	26,1±0,6
Лінолева	C _{18:2}	53,2±0,5	56,1±0,6	43,5±1,0
Ліноленова	C _{18:3}	0,2±0,1	0,3±0,1	сліди
Сума		87,9	85,6	69,6

За мікробіологічними показниками спостерігали відносно невисокий ступінь контамінації бактеріями і мікроміцетами при відсутності мікроорганізмів *Salmonella*, патогенних *Staphylococcus* і бактерій групи *Escherichia coli*, що дозволяє зробити висновок про задовільну мікробіологічну чистоту фосфоліпідних продуктів ФКР, ФЛП, ГФЛ.

Досліджено й обгрунтовано функціонально-технологічні властивості ГФЛ при використанні його в харчовій системі майонезу на основі рецептури “Провансаль”. Використання ГФЛ дозволяє знизити масову частку жиру в 1,85 раз. При цьому в’язкість емульсії складає 14,6 Па·с, а стійкість отриманої емульсії складає 97-100 % нерозруйнованої емульсії. Розроблено рецептуру низькокалорійного майонезу з утриманням масової частки жиру 35 % і ГФЛ – 3 %. На підставі проведених досліджень за фізико-хімічними, мікробіологічними, органолептичними, реологічними показниками експериментальні майонези рекомендується берегти 60 діб при 7±2 °С.

Досліджено функціонально-технологічні властивості ГФЛ при виробництві пшеничного хліба. Внесення його в кількості 1 % у рецептуру хліба дозволяє поліпшити консистенцію тіста, полегшити змішування компонентів, забезпечити великий об’єм виробу. Це пов’язано з тим, що ГФЛ, впливаючи на властивості білків клейковини, підвищують газоутримуючу спроможність тіста і в той же час роблять вільну вологу тіста більш трудновипарюваною. При випічці хліба це може викликати певне уповільнення утворення скоринки і в результаті – подовження періоду збільшення об’єму тіста-хліба. Разом з підвищеною газоутримуючою спроможністю тіста це й обумовлює, очевидно, те, що хліб із добавкою фосфоліпідів має більший об’єм, ніж контрольний хліб без цієї добавки.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено фізико-хімічні показники олій і фосфоліпідів, одержаних із насінь сучасних сортів соняшника, запропоновано й обгрунтовано технологію отримання гідратованої олії і фосфоліпідів із застосуванням поляризуючого агента на основі суміші янтарної і лимонної кислот. Оптимальні технологічні режими при температурі гідратації 65-70°C характеризуються такими параметрами: кількість поляризуючого агента – $2,3 \times M_{\phi}$ % до маси олії; кількість суміші кислот у реагенті – $8 \times M_{\phi}$ %; співвідношення янтарної і лимонної кислот у суміші – 1:3 (M_{ϕ} – масова частка фосфоліпідів в олії, %).
2. Розроблено й обгрунтовано технологію одержання знежиреного фосфоліпідного продукту ФЛП, яка дозволяє одержати продукт з вмістом фосфоліпідів не менше 94 %. Оптимальні технологічні режими процесу екстракції: співвідношення ФКР:розчинник – 60:200 (або 0,3:1); кратність екстракції – 4.
3. Порівняльне дослідження емульгуючої спроможності фосфоліпідних продуктів ФКР і ФЛП показало, що внесення 4 % ФЛП у систему олія-вода дозволило зберегти 80 % нерозруйнованої емульсії відповідно до умов методу, а при використанні ФКР для досягнення цих же результатів необхідне внесення в емульсію 6 % ФКР, тобто у 1,5 раз більше.
4. Розроблено й обгрунтовано схему технологічного процесу одержання ферментного препарату з фосфоліпазною A_2 активністю з панкреатину в формі буферного розчину. Досліджено властивості ферментного препарату, отриманого за запропонованою технологією. Препарат із фосфоліпазною A_2 активністю характеризується такими оптимальними показниками: рН середовища – 8,0; температура – 38 °C; гідромодуль – 8,0. При цьому активність ферментного препарату склала – 4,0-4,5 Од/мг.
5. Розроблено й обгрунтовано технологію одержання фосфоліпідних продуктів модифікованих біотехнологічним шляхом із застосуванням розробленого ферментного препарату. За допомогою методів математичного моделювання оптимізовані основні технологічні параметри процесу одержання модифікованих фосфоліпідів ГФЛ: концентрація ферменту – 400 Од/г субстрату, тривалість процесу гідролізу – 16 год.
6. Досліджено фізико-хімічні і функціонально-технологічні властивості отриманого ГФЛ. Показано, що утримання лізоформ фосфоліпідів у продукті складає не менше 61 %. На прикладі модельної емульсії показано, що ГФЛ володіє емульгуючою силою, яка визначається стійкістю до розшарування в 6 разів вищою ніж ФКР, який використано за субстрат для гідролізу.

7. Досліджено зміни якості отриманих фосфоліпідних продуктів при їх збереженні. Показано, що фосфоліпідні продукти можна берегти в герметичній тарі при відсутності доступу світла і температурі $20\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 6 місяців без істотної зміни якості фосфоліпідів і не більше 1,5-2 місяців після розгерметизації продукту.

Найбільший антиокислювальний ефект спостерігається при використанні як антиокислювача продуктів ГФЛ і ФЛП. Так, наприклад, якщо значення перекисного числа досягає розміру 10 ммоль/кг у зразку олії з ФЛП через 4 год інкубації при 100°C , то у контрольному зразку олії, яка не містить фосфоліпідні продукти – вже приблизно через 1,7 год.

8. Досліджено й обгрунтовано функціонально-технологічні властивості ГФЛ при використанні його в харчовій системі майонез на основі рецептури “Провансаль”. Використання ГФЛ дозволило знизити масову частку жиру в 1,85 раз. При цьому в’язкість емульсії складає $14,6 \text{ Па}\cdot\text{с}$, а стійкість отриманої емульсії склала 97-100 % нерозруйнованої емульсії. До того ж, використання ГФЛ дозволило цілком виключити вміст холестерину в готовому продукті за рахунок повної заміни яєчного порошку ГФЛом. Розроблено рецептуру низькокалорійного майонезу з вмістом масової частки жиру 35 % і ГФЛ – 3 %. На підставі проведених досліджень за фізико-хімічними, мікробіологічними, органолептичними, реологічними показниками запропонований емульсійний продукт рекомендується берегти 60 діб при $7\pm 2^\circ\text{C}$.

Використання ГФЛ у виробництві пшеничного хліба при внесенні його в кількості 1 %, що було оптимізовано, дозволило поліпшити консистенцію тіста, полегшити змішування компонентів, забезпечити великий об’єм виробу.

9. Проведено промислову апробацію розробленої технології одержання фосфатидного концентрату ФКР і гідролізованого фосфоліпідного продукту ГФЛ на Одеському олійножировому комбінаті й Одеському підприємстві по виробництву бактерійних препаратів. Розроблено нормативно-технічну документацію на виробництво ФКР, ФЛП, ГФЛ. Собівартість розробленого модифікованого рослинного фосфоліпідного продукту ГФЛ склала 33,01 грн/кг.

Основний зміст роботи викладено в таких публікаціях:

1. Губаренко П.С., Капрельянц Л.В., Колесник А.А. Отримання нових видів біологічно активних добавок з вторинного продукту масложирової промисловості // Наукові праці ОДАХТ. – Одеса, 1999. Вип.20.– С.124-126.
2. Капрельянц Л.В., Губаренко П.С. Фосфоліпідний препарат з соняшникової олії // Нові технології та удосконалення процесів харчових виробництв. – Харків, 1999. – С.48-52.

3. Губаренко П.С., Капрельянц Л.В. Гидролиз фосфолипидов панкреатической фосфолипазой // Холодильная техника и технология. – Одесса, 2000. – С.98-101.
4. Губаренко П.С. Модифицированный фосфолипидный препарат при производстве пшеничного хлеба // Наукові праці ОДАХТ. – Одеса, 2001. Вип.21. – С.264-265.
5. Капрельянц Л.В., Губаренко П.С. Біотехнологія отримання фосфоліпази A_2 // Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології УААН, 2000. – №7. – С.30.
6. Губаренко П.С. Энзиматическая модификация подсолнечного лецитина // Тез. докл. международной конференции молодых ученых “Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов”, Москва, 2000. – С.51.

АННОТАЦИЯ

Губаренко П.С. Разработка биотехнологии получения модифицированных растительных фосфолипидов.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20. – биотехнология. – Одесская государственная академия пищевых технологий, Одесса, 2001.

Диссертация посвящена вопросам разработки технологии получения растительного фосфолипидного продукта, обладающего улучшенной эмульгирующей силой с целью применения его в пищевой промышленности в качестве эмульгатора и, одновременно, биологически активной добавки.

Основными задачами работы являлись: разработка технологии получения фосфатидного концентрата из подсолнечного масла с использованием поляризующего реагента и дополнительной очистки фосфатидного концентрата от сопутствующих веществ полярным растворителем с целью получения фосфолипидов повышенной физиологической ценности и антиоксидантной активности; разработка метода получения ферментного препарата, обладающего специфической фосфолипазной A_2 активностью, предназначенного для модификации фосфолипидов; изучение свойств ферментного препарата; разработка биотехнологии получения модифицированных растительных фосфолипидов с использованием полученного ферментного препарата; изучение физико-химических и функционально-технологических свойств новых продуктов, а также исследование эмульгирующей силы модифицированных фосфолипидов в пищевых продуктах.

Исследован процесс выделения фосфатидного концентрата из масла путем гидратации с использованием поляризующего реагента и выделения фосфолипидов из фосфатидного концентрата путем экстракции с использованием полярного растворителя. Разработана и оптимизирована тех-

нология получения фосфатидного концентрата (ФКР) и экстрагированных фосфолипидов (ФЛП). Исследованы физико-химические и функционально-технологические свойства этих фосфолипидных продуктов. Показано, что эмульгирующая сила ФЛП полученного по разработанной технологии в 1,5 раза выше, чем у ФКР.

Разработана схема технологического процесса получения ферментного препарата, обладающего фосфолипазной A_2 активностью, основанная на рН-термической обработке ферментного комплекса (панкреатина) с целью инактивации сопутствующих активностей. Полученный ферментный препарат характеризуется такими показателями: – рН – 8,0; температура – 38 °С; гидро-модуль – 8,0. При этом активность ферментного препарата составила – 4,0-4,5 Ед/мг.

Разработана и оптимизирована технология получения фосфолипидного продукта (ГФЛ) из ФКР, модифицированного биотехнологическим путем с применением разработанного ферментного препарата. Полученный ГФЛ содержал фосфолипидов – 96 % (из них 61,6 % – лизофосфолипиды), нейтральных липидов - 0,6 % и имел порошкообразный вид. Изучение функционально-технологических свойств полученного фосфолипидного продукта ГФЛ в системе модельных эмульсий показало, что ГФЛ владеет эмульгирующей силой в 6 раз выше, чем ФКР, использованный в качестве субстрата.

Исследованы качественные изменения полученных фосфолипидных продуктов при их хранении по показателям скорости накопления продуктов окисления, антиокислительной активности, микробиологическим показателям.

Исследованы и обоснованы функционально-технологические свойства ГФЛ при использовании его в пищевой системе типа майонез, а также при производстве пшеничного хлеба. Разработанные технологии получения ФКР и ГФЛ апробированы в производственных условиях.

Ключевые слова: эмульгаторы, фосфолипиды, фосфатидный концентрат, ферментный препарат, панкреатин, фосфолипаза A_2 , гидролиз, технология получения, поверхностная активность.

АНОТАЦІЯ

Губаренко П.С. Розробка біотехнології одержання модифікованих рослинних фосфоліпідів.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за фахом 03.00.20. - біотехнологія. - Одеська державна академія харчових технологій, Одеса, 2001.

Дисертація присвячена питанням розробки технології одержання рослинного фосфоліпідного продукту, який має поліпшену емульгуючу силу із метою застосування його в харчовій промисловості як емульгатора й одночасно біологічно активної добавки.

Досліджено процес виділення фосфатидного концентрату з олії шляхом гідратації з використанням поляризуючого реагенту і виділення фосфоліпідів із фосфатидного концентрату

шляхом екстракції з використанням полярного розчинника. Розроблено й оптимізовано технології одержання фосфатидного концентрату (ФКР) і екстрагованих фосфоліпідів (ФЛП).

Розроблено схему технологічного процесу одержання ферментного препарату, що володіє фосфоліпазною A_2 активністю заснованого на рН-термічній обробці ферментного комплексу (панкреатину) із метою інактивації супутніх активностей.

Розроблено й оптимізовано технологію одержання фосфоліпідного продукту (ГФЛ) із ФКР модифікованого біотехнологічним шляхом із застосуванням розробленого ферментного препарату. Отриманий ГФЛ містив фосфоліпідів – 96 % (з них 61,6 % – лізофосфоліпідів), нейтральних ліпідів – 0,6 % і мав порошкоподібний вигляд. Досліджено якісні зміни отриманих фосфоліпідних продуктів при їх зберіганні за показниками швидкості накопичення продуктів окислювання, антиокислювальної активності, мікробіологічними показниками.

Досліджено й обґрунтовано функціонально-технологічні властивості ГФЛ при використанні його в харчовій системі типу майонез, а також при виробництві пшеничного хліба. Розроблені технології одержання ФКР і ГФЛ апробовані у виробничих умовах.

Ключові слова: емульгатори, фосфоліпідів, фосфатидний концентрат, ферментний препарат, панкреатин, фосфоліпаза A_2 , гідроліз, технологія одержання, поверхнева активність.

ANNOTATION

Gubarenko P.S. Working-out the biotechnology of production of modified vegetable phospholipids.

Thesis for a candidate's degree of technical sciences for speciality 03.00.20. - biotechnology. – The Odessa State Academy of Food Technologies, Odessa, 2001.

The theses is devoted to the fact of working-out the technology of production vegetative phospholipid products having improved emulsifier force with the purpose of application it in a food-processing industry as quality emulsifier and simultaneously biologically active additive.

The process of allocation of phosphatide concentrate from vegetable oil by hydratation using polarization reagent and allocation of phospholipids from phosphatide concentrate by extraction using polar solvent was investigated. The technology of producing of phosphatide concentrate (PCD) and the extracted phospholipids (PLP) was worked out.

The technological process scheme of reception of enzyme preparation having phospholipase A_2 activity based on pH-thermal processing of enzyme complex (pancreatin) with the purpose of inactivation accompanying activities was developed.

The technology of reception of phospholipid product (HPL) produced from PCD that was modified by a biotechnological way with application of developed enzyme preparation was worked out and optimized. Received HPL contained phospholipids – 96 % (including 61,6 % – lisophospholipids),

neutral lipids – 0,6 % and was in a kind of powder. The qualitative changes of received phospholipid products were investigated during storage for parameters of accumulation speed of oxidative products, antioxidative activity and microbiological parameters.

The functional-technological properties of HPL in use as a component of food system such as mayonnaise and also for production of wheat bread were investigated and proved. The developed technologies of reception of PCD and HPL was approbated under industrial conditions.

Key words: emulsifier, phospholipids, phosphatide concentrate, enzyme preparation, pancreatin, phospholipase A2, hydrolysis, technology of production, superficial activity.