



УДК 541.18.045

© 2012

К. Є. Гузикевич, В. В. Коновалова, А. Ф. Бурбан, І. І. Полтавцев

Гідроліз олії у двофазному ферментативному мембранному реакторі

(Представлено членом-кореспондентом НАН України М. Т. Картелем)

Досліджено вплив умов середовища на кінетику гідролізу соняшникової олії у двофазному мембранному ферментативному реакторі з використанням мембран з іммобілізованою ліпазою. Ліпазу ковалентно іммобілізували на модифікованих целюлозних мембранах з прищепленими тіольними групами. Вивчено кінетику гідролізу олії залежно від рН водної фази реактора, температури та перемішування. Встановлено оптимальні умови роботи реактора: максимальна швидкість гідролізу олії досягається при рН 9,5 та температурі 30 °С та становить 0,24 ммоль/(л · год).

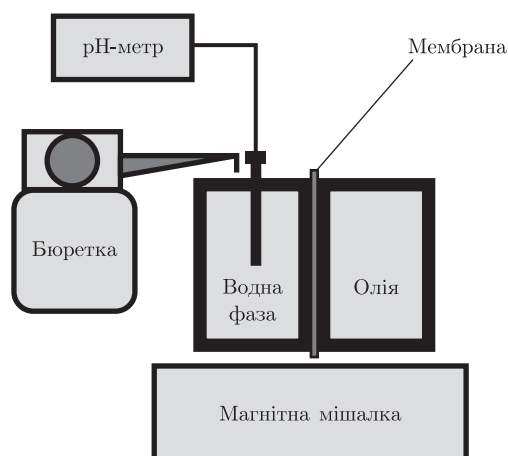
Жирні кислоти є важливою сировиною для фармацевтичної промисловості, виготовлення косметичних засобів, детергентів тощо. Однак, зазвичай, каталітичний процес гідролізу (Colgate Emery) олій і тваринних жирів відбувається при тиску близько 4,82 МПа, температурі 250 °С і вище та забезпечує високу конверсію олії (97–98%), але потребує значних енерговитрат [1]. Ферментативний процес гідролізу як альтернативний проходить при кімнатній температурі та не потребує значних тисків. Фермент (ліпаза) як каталізатор проявляє високу селективність, що забезпечує відсутність побічних продуктів, а значить, і додаткових стадій очистки.

Серед конструкцій ферментативних реакторів найбільше переваг мають двофазні мембранні реактори. Оскільки субстрати ліпаз обмежено розчинні у воді, реакція гідролізу відбувається на межі поділу фаз. В таких реакторах ліпаза закріплюється на мембрані, розташованій між двома фазами. Таким чином забезпечується можливість одночасного проведення реакції і відділення її продуктів. Те, що фермент іммобілізовано на мембрані, запобігає забрудненню ним продуктів, а також уможливорює його повторне використання [2].

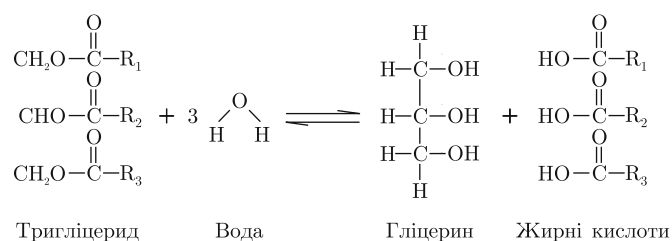
Метою даної роботи є вивчення впливу умов середовища на кінетику гідролізу соняшникової олії у двофазному мембранному ферментативному реакторі з використанням мембран з іммобілізованою ліпазою. Нами було використано модифіковані целюлозні мембрани з попередньо введеними тіольними групами, на яких ковалентно іммобілізували ліпазу через тіольні групи ферменту. Іммобілізацію ліпази та визначення її активності проводили за методиками, опублікованими нами раніше [3].

Кінетику гідролізу жирних кислот на модифікованих мембранах вивчали у двофазному мембранному реакторі. Об'єм кожної камери 145 мл, площа робочої поверхні мембрани 25 см². Для зниження впливу концентраційної поляризації на процеси розділення реактор обладнано магнітною мішалкою. Швидкість перемішування 500 об/хв.

Концентрацію жирних кислот у олії визначали методом кислотно-основного титрування. Як титрант використовували 10 ммоль/л розчин гідроксиду натрію. Титрування проводили безпосередньо в реакторі в режимі підтримання постійного значення рН водної фази. Для проведення дослідження кінетики розщеплення жирів на мембрані при різних температурах використали нагрівач для обох камер, що складався з U-подібних алюмінієвих трубок, з'єднаних між собою та з термостатом WiseCircu WCB-11. Схема установки для дослідження кінетики гідролізу жирів у двофазному мембранному реакторі:



Гідроліз тригліцеридів — це багатостадійна реакція, що включає в себе формування дигліцеридів і моногліцеридів як продуктів проміжних стадій і всі реакції є оборотними за своєю природою. Вважається, що ступінь гідролізу не залежить від типу жирної кислоти та константи швидкості усіх стадій однакові [1]. Сумарну реакцію можна записати як



Як відомо, гетерогенний катализ включає три основні стадії: 1) транспорт субстрату до поверхні; 2) власне реакція; 3) транспорт продуктів від поверхні. Таким чином, для оптимізації роботи реактора, важливим є дослідити, яка з даних стадій є лімітуючою в мембранному реакторі. Вивчення впливу перемішування на швидкість екстракції жирних кислот у водну фазу (рис. 1) дозволили встановити, що кінетика процесу залежить від швидкості підведення субстрату і відведення продуктів реакції. Так, при роботі реактора без перемішування швидкість гідролізу становила лише 0,088 ммоль/(л · год), що в 2 рази менше, ніж при перемішуванні (0,18 ммоль/(л · год)). Таким чином, можна зробити висновок, що лімітуючою стадією процесу гетерофазного каталітичного гідролізу олії є транспортна ста-

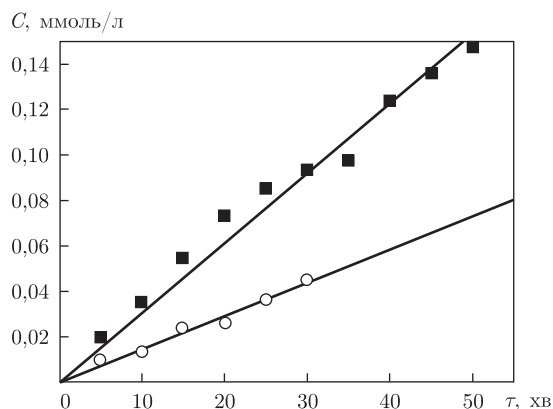


Рис. 1. Вплив турбулізації на кінетику гідролізу рослинних жирів у мембранному біореакторі: рН 9,5; температура 25 °С

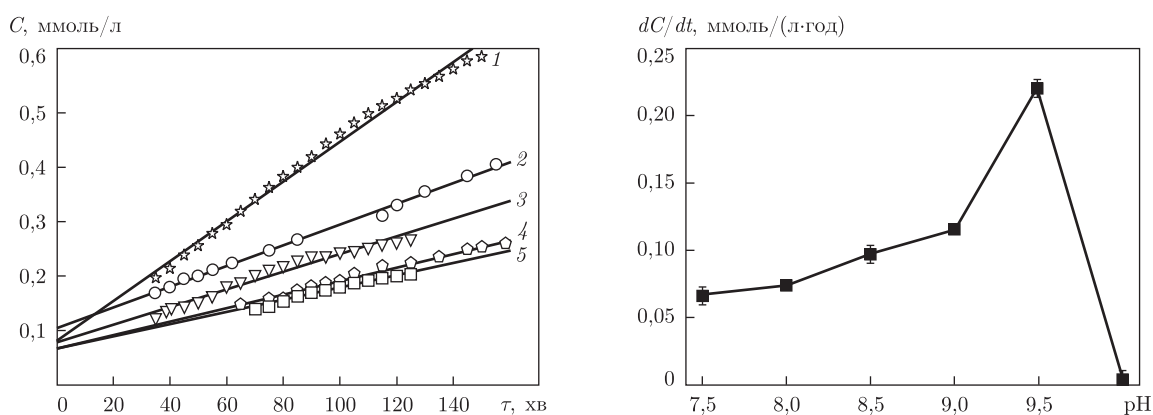


Рис. 2. Вплив рН на кінетику гідролізу олій в мембранному біореакторі: 1 – рН 9,5; 2 – рН 9; 3 – рН 8,5; 4 – рН 8; 5 – рН 7,5

дія, що пов'язано з дифузійним обмеженням. Кінетичні криві гідролізу також вказують на нульовий порядок реакції у мембранному біореакторі.

Припускають, що у двофазному мембранному реакторі на поверхні мембрани існує постійне мікросередовище реакції, в якому два реагенти контактують з іммобілізованим ферментом та між собою [1]. У цьому випадку зміна рН може впливати на швидкість реакції (активність ферменту), екстракцію утворених жирних кислот та на структуру мембрани і на її транспортні характеристики.

Як видно з рис. 2, швидкість гідролізу зростає зі збільшенням рН середовища. При рН 9,5 спостерігається максимальна швидкість масопереносу 0,23 ммоль/(л·год). З літератури відомо, що оптимальний рН середовища, при якому фермент проявляє найвищу каталітичну активність, для вільної ліпази з *Candida rugosa* знаходиться в діапазоні рН 7–8 [4–6], при цьому іммобілізація не значно впливає на оптимум рН ферменту. Так, автори роботи [4] повідомляють про зсув оптимуму рН з 7 до 7,5 при ковалентній іммобілізації ліпази на хітині, попередньо модифікованому аміногрупами. А в роботі [5] зазначено, що адсорбційна іммобілізація ліпази на полісульфонових і поліетерсульфонових мембранах не призвела до зміни оптимуму рН ферменту (рН_{опт} 8). Автори роботи [7] також повідомляють про відсутність зсуву оптимуму рН ліпази (рН_{опт} 7,5) при її ковалентній іммобілізації на попередньо

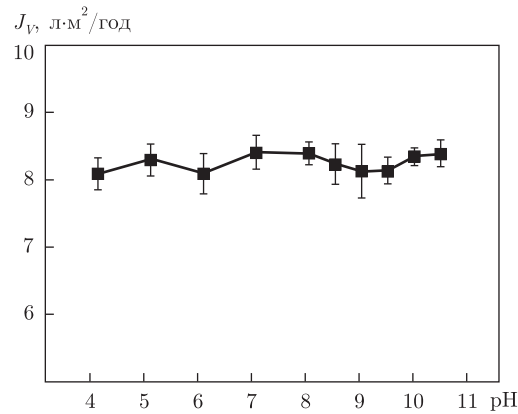


Рис. 3. Залежність об'ємного потоку води через модифіковану мембрану від рН середовища

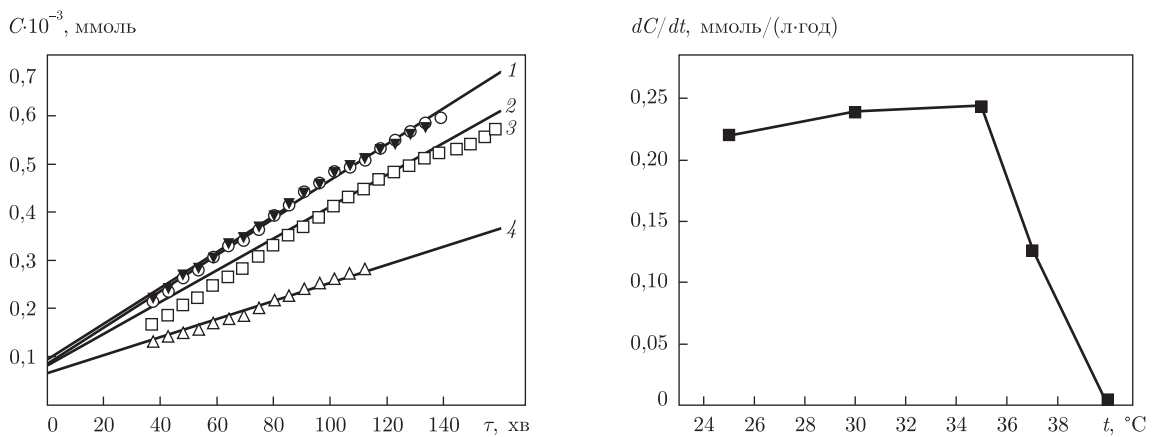


Рис. 4. Вплив температури на кінетику гідролізу рослинних жирів у мембранному біореакторі (рН водної фази 9,5): 1 – 35 °С; 2 – 30 °С; 3 – 25 °С; 4 – 37 °С;

модифікованому поліпропілені. Таким чином, з великою імовірністю можна вважати, що оптимум рН іммобілізованої ліпази не відповідає оптимуму рН роботи реактора (рН_{опт} 9,5), і це дозволяє зробити висновок, що активність ферменту не є лімітуючим фактором, який визначає ефективність роботи реактора.

При рН середовища 10 швидкість гідролізу дорівнює нулю, що може бути пов'язано як з функціональною залежністю властивостей біокатализатора від умов середовища, так і самої мембрани.

Встановлено, що зміна рН середовища в діапазоні від 4 до 10 не впливає на водопроникність мембран (рис. 3), на основі чого можна допустити, що порувата структура мембрани не зазнає змін. Таким чином, найбільший вплив на кінетику масопереносу у реакторі справляє швидкість екстракції жирних кислот з реакційного середовища до водної фази, яка визначається концентрацією OH^- -іонів у водній фазі реактора.

Зазвичай в літературі описуються ферментативні процеси гідролізу жирів при 35 °С [7]. Є підстави вважати, що біореактор може ефективно працювати в більш широкому діапазоні температур. У зв'язку з цим, нами було досліджено ефективність роботи реактора в температурних межах від 25 до 40 °С. Як видно з рис. 4, концентрація жирних кислот у водній фазі зростає з майже однаковою швидкістю у межах температур від 25 до 35 °С.

Таблиця 1. Порівняння ефективності мембранних реакторів, описаних в літературі

Посилання	Тип реактора	pH	Температура, °C	Швидкість, ммоль/(л · год)
Досліджуваний біореактор [1] [8] [9] [10]	Діалізний	9,5	25–35	0,240
	Діалізний	9,5	40	0,145
	Трубчастий	8	38–40	0,068
	Порожнистоволоконний	9,5	40	0,074
	Діалізний	9,5	30	0,270

Отже, можна зробити висновок, що в цьому діапазоні швидкість гідролізу не залежить від температури. При 40 °C швидкість гідролізу різко падає, однак, при зниженні температури до 35 °C відновлюється до початкового рівня протягом невеликого проміжку часу. Це може свідчити, що підвищення температури не призводить до повної денатурації білку на мембрані, а лише до деяких його конформаційних змін, що і є причиною зменшення швидкості гідролізу.

У літературних джерелах наводяться дані про гідроліз різних олій у двофазних мембранних реакторах діалізного та порожнистоволоконного типів (табл. 1). Порівняння літературних даних з даними експерименту показує, що отриманий нами ферментативний двофазний мембранний реактор демонструє більш високу швидкість виділення жирних кислот (0,24 ммоль/(л · год)) при нижчій температурі, ніж реактори. Крім того, на відміну від описаних мембран з адсорбованою ліпазою, обраний нами метод іммобілізації ферменту дозволяє проводити його регенерацію після втрати активності, що значно подовжує термін експлуатації мембран.

Таким чином, в результаті проведених досліджень встановлено вплив умов середовища на кінетику гідролізу соняшникової олії у двофазному мембранному ферментативному реакторі з використанням мембран з іммобілізованою ліпазою. Показано, що кінетика гідролізу в мембранному реакторі є реакцією нульового порядку, швидкість виділення жирних кислот залежить від турбулізації потоку, а отже, діє дифузійне обмеження.

Вивчено вплив pH та температури водної фази на роботу реактора. Встановлено, що швидкість надходження жирних кислот у водну фазу залежить головним чином від швидкості екстракції жирних кислот і мало залежить від активності ферменту і змін у структурі мембрани. Вивчення впливу температури показало, що швидкість виділення жирних кислот є стабільно високою в межах 25–35 °C. Максимальна швидкість гідролізу олій досягається при pH 9,5 та 30 °C та становить 0,24 ммоль/(л · год).

1. Pugazhenth G., Kumar A. Enzyme membrane reactor for hydrolysis of olive oil using lipase immobilized on modified PMMA composite membrane // J. Membrane Sci. – 2004. – **228**. – P. 187–197.
2. Rios G. M., Belleville M. P., Paolucci D., Sanchez J. Progress in enzymatic membrane reactors – a review // Ibid. – 2004. – **242**. – P. 189–196.
3. Гузикевич К. Є., Коновалова В. В., Побігай Г. А., Бурбан А. Ф. Розроблення нового методу іммобілізації ліпази на целюлозних мембранах // Доп. НАН України. – 2010. – № 8. – С. 142–147.
4. Gomes F. M., Pereira E. B., de Castro H. F. Immobilization of Lipase on Chitin and Its Use in Nonconventional Biocatalysis // Biomacromolecules. – 2004. – **5**. – P. 17–23.
5. Gupta S., Yogesh G., Javiya S. et al. Comparative study of performances of lipase immobilized asymmetric polysulfone and polyether sulfone membranes in olive oil hydrolysis // Int. J. Biol. Macromol. – 2008. – **42**. – P. 145–151.
6. Pujari N. S., Vaidya B. K., Bagalkote S. et al. Poly(urethane methacrylate – co-glycidyl methacrylate)-supported-polypropylene biphasic membrane for lipase immobilization // J. Membrane Sci. – 2006. – **285**. – P. 395–403.

7. Murty R. V., Bhat J., Muniswaran P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review // Biotechnol. and Bioproc. Eng. – 2002. – 7. – P. 57–66.
8. Giorno L., Molinari R., Natoli M. et al. Hydrolysis and regioselective transesterification catalyzed by immobilized lipases in membrane bioreactors // J. Membrane Sci. – 1997. – 125. – P. 177–187.
9. Deng H.-T., Xu Zh.-K., Dai Zh.-W. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on polypropylene microfiltration membrane modified by glycopolymer: hydrolysis of olive oil in biphasic bioreactor // Enzyme and Microbial Technol. – 2005. – 36. – P. 996–1002.
10. Shukla A., Kumar A. Experimental Studies and Mass-Transfer Analysis of the Hydrolysis of Olive Oil in a Biphasic Zeolite-Membrane Reactor Using Chemically Immobilized Lipase // Ind. Eng. Chem. Res. – 2004. – 43. – P. 2017. – 2029.

Національний університет
“Києво-Могилянська академія”

Надійшло до редакції 06.10.2011

Е. Е. Гузикевич, В. В. Коновалова, А. Ф. Бурбан, И. И. Полтавцев

Гидролиз растительного масла в двухфазном ферментативном мембранном реакторе

Исследовано влияние условий среды на кинетику гидролиза подсолнечного масла в двухфазном ферментативном мембранном реакторе с использованием мембран с иммобилизованной липазой. Липазу ковалентно иммобилизовали на модифицированных целлюлозных мембранах с привитыми тиольными группами. Получены зависимости кинетики гидролиза масла от pH водной фазы реактора, температуры и перемешивания. Определены оптимальные условия работы реактора: максимальная скорость гидролиза масла достигается при pH 9,5 и температуре 30 °C и составляет 0,24 ммоль/(л·ч).

K. Y. Guzykevych, V. V. Konovalova, A. F. Burban, I. I. Poltavtsev

Hydrolysis of oil in biphasic enzymatic membrane reactor

The influence of operating conditions on the kinetics of sunflower oil hydrolysis in a biphasic enzymatic membrane reactor is investigated. Modified cellulose membranes with lipase covalently immobilized through thiol groups are used in the reactor. The dependence of the hydrolysis kinetics on pH of the aqueous phase, temperature, and stirring is studied. Optimum operation parameters for the enzymatic membrane reactor are determined: the maximum hydrolysis rate was achieved at pH = 9.5 and 30 °C and reached 0.24 mmol/Lh.