

Sposób otrzymywania strukturyzowanych triacylogliceroli

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania strukturyzowanych triacylogliceroli w reakcji acydolizy olejów roślinnych z nasyconymi kwasami tłuszczowymi, katalizowanej lipazą, przy udziale promieniowania mikrofalowego.

W czasopiśmie *Process Biochemistry* 2009, t. 44, s. 1284–1288 opisano sposób otrzymywania strukturyzowanych gliceroli w wyniku interesestryfikacji oleju siemienia lnianego z olejem arachidowym katalizowanej przez lipazę *Rhizomucor miehei*.

Z czasopisma *Fett/Lipid* 1998, t. 100, s. 156-160 jest znany sposób otrzymywania strukturyzowanych glicerydów reakcji oleju nasion bawełny, trioleinianu glicerolu i kwasu kaprylowego katalizowanej przez lipazy: *Aspergillus niger* (ANL), *Rhizopus delemar* (RDL), *Rhizopus javanicus* (RJL), *Rhizopus oryzae* (ROL), *Candida rugosa* (CRL) i *Rhizomucor miehei* (RML), *Chromobacterium viscosum* (CVL).

W czasopiśmie *European Journal of Lipid Science and Technology* 2000, t. 102, s. 287–303, ujawniono metody otrzymywania strukturyzowanych triacylogliceroli z różnych substratów, w których jako katalizator stosuje się lipazy: CCL, *Candida cylindracea*, CVL, *Chromobacterium viscosum*, *Lipozyme IM*, *Rhizomucor miehei* (RML), PPL, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus* sp.

W czasopiśmie *Biochemical Engineering Journal* 2009, t. 46, s. 257–264 opisano otrzymywanie strukturyzowanych triacylogliceroli w reakcji oleju z tuńczyka i kwasu kaprylowego katalizowanej przez lipazy *Rhizopus delemar* i *Mucor miehei*.

W czasopiśmie *Journal of Food Engineering* 2010, t. 98, s. 492–497 opisano metodę otrzymywania strukturyzowanych triacylogliceroli z oleju słonecznikowego i kwasów palmitynowego i stearynowego w obecności lipazy *Lipozyme RM IM*.

Z czasopisma *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2010, t. 66, s. 15–32 jest znane otrzymywanie strukturyzowanych triglicerydów katalizowane przez lipazę *Rhizomucor miehei* (RML).

W czasopiśmie *Journal of Food Engineering* 2008, t. 84, s. 243–249 ujawniono reakcję acydolizy oleju słonecznikowego z mieszaniną kwasów palmitynowego/ stearynowego katalizowaną przez lipazy *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosa* lub lipazę z trzustki wieprzowej.

W czasopiśmie *Bioresource Technology* 2009, t. 100, s. 324–329 opisano reakcję oleju oliwkowego z kwasami: palmitynowym, stearynowym katalizowane przez lipazę *Mucor miehei*.

5 Znane jest także, z czasopisma *Food Chemistry* 2005, t. 92, s. 527–533 otrzymywanie strukturyzowanych triglicerydów z oleju palmowego i kwasu kaprylowego katalizowane przez lipazę *Rhizomucor miehei*.

W czasopiśmie *LWT - Food Science and Technology* 2010, t. 43, s. 458–464 opisano zastosowanie lipazy *Lipozyme TLIM* w procesach okresowej i ciągłej interestryfikacji pomiędzy olejem słonecznikowym i uwodorowanym olejem sojowym.

10 Nadto znane jest stosowanie mikrofal w reakcjach estryfikacji katalizowanych przez lipazy, opisane w czasopismach: *Tetrahedron Letters*, 1996, t. 39, s. 8383-8386, *Biotechnology Letters*, 2000, t. 22, s. 1565–1570, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2005, t. 35, s. 113–116, *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, t. 38, s. 814–820, *Process Biochemistry*, 2008, t. 43, s. 306-310, *Journal of Molecular*
15 *Catalysis B: Enzymatic*, 2008, t. 55, s. 6–11, *European Food Research and Technology*, 2010, t. 231, s. 719–726, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2010, t. 67, s. 117–121.

Znane jest także zastosowanie mikrofal w reakcjach transestryfikacji katalizowanych przez lipazy, opisane w czasopismach: *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*,
20 2004, t. 223, s. 51–56, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007, t. 48, s. 51–57, *Bioresource Technology*, 2012, t. 109, s. 1-6, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, t. 81, s. 58-65.

Z czasopisma *Tetrahedron Letters*, 1998, t. 39, w s. 4333-4336 jest znane zastosowanie mikrofal do przyspieszania reakcji acylacji prowadzonej w benzenie, katalizowanej przez lipazę trzustkową.
25

W kolekcji Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej znajduje się selektant szczepu pleśni *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100.

Z opisu zgłoszenia patentowego P. 396515 jest znany sposób otrzymywania grzybnego selektanta pleśni *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100 zawierającej preparat lipaz, polegający na tym, że zarodniki hoduje się na podłożu stałym zawierającym w częściach wagowych: 20-30 części agaru, 1000 części brzezki piwowskiej o stężeniu
30

8° Be, a nadto 0,5-1 części tristéarynianu glicerolu, w temperaturze 29-31° C w czasie 3-5 dni, Następnie zmywa się wyhodowane zarodniki sterylną solą fizjologiczną z dodatkiem surfaktanta, zaszczepia zawiesiną zarodników wysterylizowane, ciekłe podłoże aktywujące zawierające w częściach wagowych: oliwy 10-50 części z oliwek lub oleju, 30-73 części namoku kukurydzianego, 1000 części wody wodociągowej, a nadto 0,5-1 części tristéarynianu glicerolu, stosując 1 cm³ zarodników na 100 cm³ podłoża i prowadzi hodowlę wstrząsaną inokulum selektanta w temperaturze 28-31° C w czasie 18 godzin przy stopniu napełnienia kolb 20 % i szybkości obrotowej wstrząsarki 180 min⁻¹, przy czym używa się wodę o barwie większej niż 5 mg Pt (PN-EN ISO 7887 : 2002), mętności nie większej niż 0,4 NTU (PN-EN ISO 7027 :2003), przewodności nie większej niż 500 μS/cm (PN-EN-27888 : 1999), pH w zakresie 7,1-7,4 (PN-90/C 04540.01), ChZT nie większym niż 1,75 (PN-ISO 15705 : 2005 PB-22.00 : 2009), twardości nie większej niż 15⁰n, o zawartości azotanów nie większej niż 4 mg/l (PB-03.00 : 2008) i żelaza nie większej niż 0,2 mg/l (PN-ISO 6332 : 2001). Otrzymanym inokulum zaszczepia się wysterylizowane i wstępnie napowietrzone sterylnym powietrzem, ciekłe podłoże produkcyjne zawierające w częściach wagowych: 10-50 części oliwy z oliwek lub oleju, 30-73 części namoku kukurydzianego oraz 1000 części wody wodociągowej o właściwościach jak podano wyżej, stosując inokulum w ilości 10 % objętościowych stosunku do objętości podłoża, i prowadzi hodowlę produkcyjną selektanta w temperaturze 28-31° C w czasie 72 godzin w obecności środków przeciwdziałających pienieniu, w trakcie napowietrzania sterylnym powietrzem doprowadzanym w ilości 1 część objętościowa na 1 część objętościową podłoża w czasie 1 minuty, przy mieszaniu zawartości fermentora z szybkością obrotową 120 minut⁻¹ za pomocą mieszadła, do którego przymocowuje się rozłącznie porowaty nośnik hodowanego selektanta w postaci prostopadłościennych płyt pianki poliuretanowej na bazie polioliu poliestrowego, o całkowicie otwartej strukturze komórkowej, charakteryzującej się gęstością 23 – 27 kg/m³, wytrzymałością na rozciąganie 100 kPa, średnicą porów 2,30-3,30 mm, o wymiarach 250 x120 x10 mm. Otrzymane w wyniku hodowli płyty pianki z przerośniętą biomasą selektanta *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100 oddziela się od cieczy pohodowlanej, przemywa się wodą destylowaną w celu odmycia rozpuszczalnych produktów metabolizmu, odwadnia acetonem schłodzonym do temperatury 4° C ,

ekstrahuje eterem naftowym i suszy w temperaturze pokojowej lub przemywa wodą destylowaną, zamraża do temperatury -45°C , liofilizuje, przemywa acetonem, eterem naftowym i suszy w temperaturze pokojowej. Przemycie wodą monitoruje się pomiarem absorbancji $A < 0,05$ dla długości fali $\lambda = 280\text{ nm}$, odwodnienie acetonem prowadzi 3-
5 krotnie stosując 15 części wagowych acetonu na 1 część wagową pianki przefiltrowanej biomasą w czasie 10 minut w zamkniętym naczyniu wyposażonym w mieszalnik o prędkości obrotowej 120 min^{-1} , zaś suszenie prowadzi się na powietrzu w czasie 12 godzin.

Sposób wytwarzania strukturyzowanych triacylogliceroli w reakcji acydolizy oleju rzepakowego, słonecznikowego lub sojowego z kwasem palmitynowym lub stearynowym, katalizowanej lipazą, w środowisku rozpuszczalnika organicznego, przy użyciu mikrofal, **według wynalazku** charakteryzuje się tym, że acydolizę prowadzi się przy stosunku molowym oleju roślinnego i kwasu tłuszczowego od 1:3 do 1:4, w obecności preparatu lipaz w postaci odwodnionej grzybni selektanta pleśni *Mucor circinelloides*
10 T66/IBPUA 100 użytej w ilości 10 % w stosunku do masy substratów, w środowisku eteru naftowego użytego w nadmiarze 9,1-9,6 w stosunku do masy substratów, przy użyciu promieniowania mikrofalowego o mocy 750 W włączanego co 20 sekund na okres 30 sekund, stosowanego w łącznym czasie 470-600 sekund przy temperaturze mieszaniny reakcyjnej nie przekraczającej 50°C . Po zakończeniu reakcji z mieszaniny
15 reakcyjnej oddziela się części stałe enzymu i izoluje wytworzone strukturyzowane triacyloglicerole. Wolne kwasy tłuszczowe usuwa się z mieszaniny po acydolizie metodą zmydlania wodorotlenkiem potasu.

Sposób według wynalazku zezwala na otrzymanie strukturyzowanych triacylogliceroli z wydajnością 68-78 % (mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości
25 wprowadzonego oleju) w czasie kilkadziesiąt razy krótszym w porównaniu z czasem prowadzenia acydolizy oleju z kwasem przy użyciu tradycyjnego ogrzewania przepływowego.

Sposób według wynalazku ilustrują bliżej niżej podane przykłady.

Przykład 1.

W celu otrzymania grzybni selektanta pleśni *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100 zawierającej preparat lipaz, selektant *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100, wysiano na wysterylizowane termicznie w czasie 15 minut w temperaturze 121° C podłoże stałe o składzie w częściach wagowych: 1 część tristearynianu glicerolu, 30 części agaru, 1000 części brzeczki piwowarskiej o stężeniu 8° Be i po 3 dniach hodowli w temperaturze 29-31° C zarodniki selektanta zmywano sterylną solą fizjologiczną zawierającą 0,01% Tritonu® X-100 stosując 8 ml soli fizjologicznej na 1 skos. Otrzymaną zawiesiną zarodników szczepiono wysterylizowane w czasie 30 minut w temperaturze 121° C, podłoże hodowlane o składzie w częściach wagowych: 0,5 części tristearynianu glicerolu, 27 części oliwy z oliwek, 37 części namoku kukurydzianego oraz 1000 części wody wodociągowej o właściwościach jako podano wyżej, o wyjściowym pH 4,6, stosując 1 cm³ zarodników na 100 cm³ podłoża i prowadzono hodowlę wstrząsaną w temperaturze 28-31° C, w czasie 18 godzin, przy stopniu napełnienia kolb 20 % objętościowych i szybkości obrotowej wstrząsarki 180 min⁻¹. Otrzymanym w wyniku tej hodowli inokulum zaszczerpiono, uprzednio wysterylizowane w czasie 30 minut w temperaturze 121° C, podłoże o objętości 18 litrów wprowadzone do fermentora o objętości całkowitej 24 l, wstępnie napowietrzone sterylnym powietrzem, o składzie analogicznym jak w hodowli inokulum, ale bez dodatku tristearynianu glicerolu, stosując 10 % objętościowych inokulum w stosunku do objętości podłoża. Do mieszadła umieszczonego w fermentorze zamocowano w powtarzalny sposób prostopadłościennie płyty pianki poliuretanowej na bazie polioliu poliestrowego o całkowicie otwartej strukturze komórkowej - pianki retykulowanej, uzyskanej w wyniku procesu termicznej retykulacji, o numerze klasyfikacyjnym S28280, charakteryzującej się gęstością 23 – 27 kg/m³, wytrzymałością na rozciąganie 100 kPa, średnicą porów 2,30-3,30 mm, o wymiarach 250 x120 x10 mm (wysokość/szerokość/grubość). Hodowlę prowadzono w temperaturze 28-31° C w czasie 72 godzin, w obecności środków przeciwdziałających pienieniu, przy mieszaniu z szybkością obrotową 120 min⁻¹ doprowadzając powietrze w ilości 1 część objętościowa na 1 część objętościową podłoża w czasie 1 minuty. Otrzymane w wyniku hodowli produkcyjnej płyty pianki poliuretanowej, przerośnięte biomasa *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100, po oddzieleniu od cieczy pohodowlanej na drodze filtracji, przemy-

wano wodą w celu odmycia rozpuszczalnych produktów metabolizmu monitorowanego pomiarem absorbancji $A < 0,05$ dla długości fali $\lambda = 280$ nm, zalewano kolejno 3 porcjami acetonu schłodzonego do temperatury 4°C , stosowanym w ilości 15 części wagowych na 1 część wagową pianki przerośniętej biomasą i odwadniano 10 minut w zakrytym
5 naczyniu umieszczonym na wytrząsarce o szybkości obrotowej 120 minut^{-1} , a następnie ekstrahowano eterem naftowym. Odwodnioną i odlipidowaną biomasę, zaadsorbowaną w porach pianki poliuretanowej, suszono na powietrzu w czasie 12 godzin w temperaturze pokojowej.

W reaktorze o pojemności $0,15\text{ dm}^3$ umieszczono 2,96 g oleju rzepakowego, 3,82 g
10 kwasu stearynowego (stosunek molowy jak 1:4) i dopełniono eterem naftowym do $0,1\text{ dm}^3$. Następnie wprowadzono preparat immobilizowanych lipaz w postaci otrzymanej uprzednio, odwodnionej grzybni *Mucor circinelloides* T66/IBPUA 100 użytej w ilości 10 % w stosunku do masy mieszaniny reakcyjnej i podano reakcji w kuchence mikrofalowej o mocy 750 W włączając promieniowanie mikrofalowe na okres 20 sekund co
15 30 sekund, kontrolując aby temperatura mieszaniny reakcyjnej nie przekraczała 50°C . Sumaryczny czas wzbudzenia mikrofalami wynosił 600 sekund, po czym mieszaninę reakcyjną sączono na przegrodzie ze spieku ceramicznego w celu oddzielenia katalizatora, który po dwukrotnym przemyciu acetonem i eterem naftowym (stosując na każde przemycie 10 ml rozpuszczalnika) używano powtórnie do syntezy strukturyzowanych triacylogliceroli.
20

Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 78,5 %, mierzoną metodą GC i liczoną względem ilości użytego oleju.

Wolne kwasy tłuszczowe z mieszanin po acydolizie oddzielano metodą zmydlania
25 $0,5\text{ M}$ wodorotlenkiem potasu lub sodu w 40 % wodnym roztworze etanolu stosując 4-molowy nadmiar zasady w stosunku do wolnych kwasów tłuszczowych zawartych w danej próbce, delikatnie mieszając 0,5 godziny w temperaturze $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$, próby pozostawiono w temperaturze $30\text{-}35^{\circ}\text{C}$ na około 2-3 godziny do rozdziału na fazy wodną (dolną, zawierającą mydła) oraz górną fazę organiczną z rozpuszczonymi
30 modyfikowanymi w reakcji acydolizy triacyloglicerolami. Z fazy górnej odparowano w wyparce próżniowej rozpuszczalnik. Pozostałość stanowiącą mieszaninę strukturyzo-

wanych triacylogliceroli, w której stężenie wolnych kwasów tłuszczowych nie przekraczało 0,2 % , przechowywano w 4° C.

Przykład 2.

Strukturyzowane triacyloglicerole otrzymano postępując jak w przykładzie 1 z tym, ze reakcję wzbudzania mikrofalami prowadzono sumarycznie 470 sekund.

Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 76,4 %, mierzoną metodą GC i liczoną względem ilości użytego oleju.

Wolne kwasy tłuszczowe z mieszanin po acydolizie oddzielano metodą zmydlania jak w przykładzie 1.

Przykład 3.

W reaktorze o pojemności 0,15 dm³ umieszczono 2,96 g oleju rzepakowego, 3,44 g kwasu palmitynowego (stosunek molowy jak 1:4) i dopełniono eterem naftowym do 0,1 dm³. Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 72,0 %, mierzoną metodą GC i liczoną w stosunku do ilości użytego oleju.

Przykład 4.

W reaktorze o pojemności 0,15 dm³ umieszczono 2,96 g oleju słonecznikowego, 3,44 g kwasu palmitynowego (stosunek molowy jak 1:4) i dopełniono eterem naftowym do 0,1 dm³. Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 70,0 %, mierzoną metodą GC i liczoną względem ilości użytego oleju.

Przykład 5.

W reaktorze o pojemności 0,15 dm³ umieszczono 2,96 g oleju sojowego, 3,82 g kwasu stearynowego (stosunek molowy jak 1:4) i dopełniono eterem naftowym do 0,1 dm³. Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 75,5 % mierzoną metodą GC i liczoną względem ilości użytego oleju.

Przykład 6.

W reaktorze o pojemności $0,15 \text{ dm}^3$ umieszczono 2,96 g oleju sojowego, 3,44 g kwasu palmitynowego (stosunek molowy jak 1:4) i dopełniono eterem naftowym do $0,1 \text{ dm}^3$. Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

- 5 Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 68,0 %, mierzoną metodą GC i liczoną względem ilości użytego oleju.

Przykład 7.

- 10 W reaktorze o pojemności $0,15 \text{ dm}^3$ umieszczono 3,94 g oleju rzepakowego, 3,82 g kwasu stearynowego (stosunek molowy jak 1:3) i dopełniono eterem naftowym do $0,1 \text{ dm}^3$. Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 73,2 %, mierzoną metodą GC i liczoną względem ilości użytego oleju.

- 15 Przykład 8.

W reaktorze o pojemności $0,15 \text{ dm}^3$ umieszczono 3,94 g oleju słonecznikowego, 3,82 g kwasu stearynowego (stosunek molowy jak 1:3) i dopełniono eterem naftowym do $0,1 \text{ dm}^3$. Dalej postępowano jak w przykładzie 1.

- 20 Otrzymano strukturyzowane triacyloglicerole z wydajnością wymiany acyli w pozycjach Sn-1 i Sn-3 równą 72,5 %, mierzoną metodą GC i liczoną względem ilości użytego oleju.

RZECZNIK PATENTOWY

mgr inż. Ewa Kaczur-Kaczyńska