**Лекція 3. Технологія виробництва ліпідів**

***Ліпіди***(грец. lipos — жир)**—**велика група природних гідрофобних сполук, неоднорідних за хімічним складом і біологічними функціями, які об’єднують за такими критеріями: 1) обмежена розчинність у воді та полярних розчинниках і, навпаки, хороша розчинність у неполярних розчинниках; 2) знаходження в природі у вигляді складних ефірів вищих жирних кислот; 3) наявність в усіх живих організмах.

До основних функцій ліпідів відносяться:

– енергетична: жири є основним джерелом енергії (1 г тригліцеридів – 38,9 кДж (9,0 ккал)) енергетичні витрати людини забезпечуються за рахунок жирів приблизно на 33%;

– структурна: жири, що входять до складу клітинних мембран

– резервна: резервні жири є "запасним джерелом енергії" й використовуються організмом за нестачі їжі або під час захворювань;

– транспортна: ліпопротеїни – сполуки ліпідів з білками

– виконують транспортну функцію – переносять жиророзчинні вітаміни А, D, E і К в організмі;

– синтезуюча: жири є постачальниками біологічно-активних речовин: незамінних поліненасичених кислот, різних форм вітаміну А (рібофлавіну), вітаміну Д (кальціферолу), вітаміну Е (токоферолу), фосфоліпідів, стеринів; Ліпіди є джерелом синтезу стероїдних гормонів, які багато в чому забезпечують пристосування організму до різних стресових ситуацій;

– терморегуляторна: підшкірна жирова тканина оберігає організм людини від надмірної тепловіддачі (терморегуляторна функція);

* захисна - жири внутрішніх органів є своєрідними амортизаторами

для них, сприяють закріпленню в певному положенні таких внутрішніх органів, як нирки, кишечник, і оберігають їх від зміщення під час струсів.

**Біологічна роль ліпідів в організмі** визначається комплексом своєрідних фізико-хімічних властивостей.

Недостатнє надходження жиру в організм людини призводить

– до порушення центральної нервової системи;

– послаблення імунологічних механізмів;

– змін шкіряного покриття, нирок, зору.

Водночас надлишкова кількість жиру в раціоні харчування

призводить до ожиріння, атеросклерозу, жовчно-камяного та інших

захворювань.

**Класифікація ліпідів.**

1. за функціями, які вони виконують в організмі, виділяють ліпіди запасні та мембранні (фосфоліпіди та гліколіпіди);
2. за фізичними властивостями — нейтральні (неполярні) та полярні;
3. за хімічними властивостями — ліпіди , які омилюються лугами (жири, віск, складні ліпіди), та неомилювані ліпофільні речовини.

Сучасна класифікація поділяє ліпіди на прості та складні, окремі групи становлять похідні і різні ліпіди.

До простих ліпідів відносять ліпіди, які побудовані з залишків спиртів і вищих жирних кислот. В ліпідах вищі жирні кислоти представлені головним чином насиченими і ненасиченими ациклічними карбоновими кислотами,що мають парне число вуглецевих атомів. Деякі ненасичені жирні кислоти не синтезуються в організмі людини і тварин або утворюються з недостатній кількості. Тому Їх називають незамінними. До таких жирних кислот відносять лінолеву, ліноленову, арахідонову та деякі інші вищі ненасичені жирні кислоти. Основ ним джерелом поповнення ними організму людини є лляна, конопляна, кукурудзяна та соняшникова олія. Найпоширенішими з групи простих ліпідів є нейтральні жири (гліцериди), стериди і воски.

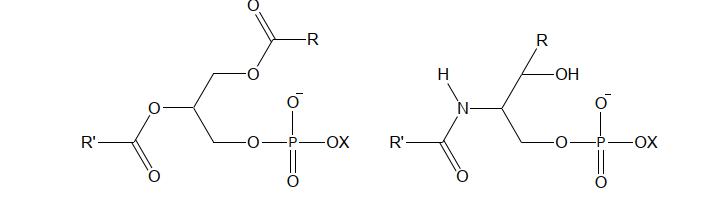
Нейтральні жири (гліцериди) — це *складні ефіри трьохатомного спирту гліцерину і жирних кислот.* Якщо в гліцерині всі три спиртові групи етерифіковані жирними кислотами, то такі сполуки називають тригліцеридами, якщо дві групи —дигліцеридами і якщо етерифікована одна спиртова група –моногліцеридами До складу нейтральних жирів входять жирні кислоти з різним числом вуглецевих атомів і різним ступенем насиченості, що значною мірою визначає їх фізичні властивості.

Стериди-це складні ефіри стеринів - похідних циклопентапергідрофенантрену і вищих жирних кислот. Основним представником стеринів є холестерин - ненасичении одноатомниим циклічнии спирт. Із жирними кислотами холестерин утворює складні ефіри — холестерид. Із вищих жирних кислот у складі стеридів переважно є пальмітинова, стеаринова та олеїнова кислоти. Основна кількість стеринів і стеридів утворює в організмі комплекси з білками.

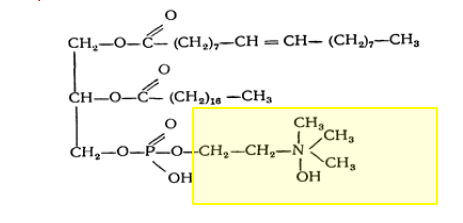
Воском називають естери вищих одноосновних карбонових кислот і одноатомних високомолекулярних (з 18-30 атомами карбону) спиртів. Природні воски, крім складних ефірів, містять певну кількість вільних вищих спиртів і вищих жирних кислот, а також невелику кількість вуглеводів, барвників та пахучих речовин. До групи восків тваринного походження відносять ланолін, спермацет і бджолиний віск. Рослинні воски відіграють важливу захисну роль, покриваючи листя і плоди тонким шаром (карнаубський віск).

Група складних ліпідів характеризується наявністю *в Їхній молекулі крім спиртів і вищих жирних кислот фосфорної або сульфатної кислот, азотистих речовин, вуглеводів та деяких інших компонентів.* У тканинах і органах складні ліпіди містяться в точно визначених кількостях, їх вміст у клітинах не змінюється навіть при голодуванні .

Основними представниками цієї групи ліпідів є фосфоліпіди. Загальні формули фосфоліпідів що містять залишки гліцерину і сфінгозину



Характерною особливістю **фосфоліпідів (фосфатидів)** є наявність в їх молекулах залишків фосфорної кислоти. Важливими представниками є фосфатидилхоліни, що мають гліцерин, два залишки молекул вищих жирних кислот, залишок фосфорної кислоти і холін, також фосфатидилетаноламіни, плазмалогени, сфінгомієліни.



Група фосфатидилетаноламінів представлена коламінфосфатидами, кефалінами, акі тісно пов’язані з лецитинами і між собою у процесі обміну і є важливими ліпідними компонентами клітинних мембран. До їх складу замість холіну входить інша азотиста основа-коламін.

**Плазмалогени** (ацетальфосфатиди) відрізняються тим, що в їх складі замість однієї з вищих жирних кислот з гідроксильною групою гліцерину сполучається альдегід вищої жирної кислоти. Містяться вони переважно в складі нервової м’язової тканин.

**Сфінгомієліни** містять двохатомний спирт сфінгозин, що зв’язується пептидним зв’язком з вищою жирною кислотою і ефірним зв’язком з фосфорною кислотою. Остання зв’язується з азотистою основою — холіном. Сфінгомієлінів складають основу мієлінових оболонок нервових волокон.

До групи похідних ліпідів відносять каротини, окремі жиророзчинні вітаміни, жирні кислоти, вищі спирти .

У медицині ліпіди використовуються як переносники ряду вітамінів, регулятори транспорту води і солей, іммуномодулятори, а також як регулятори активності деяких ферментів і передавачі біологічних сигналів. Важлива роль їм приділяється при виробництві ліпосом, що сприяють запобіганню утворення тромбозу.

Мікробні ліпіди мають переваги для використання в медицині і харчовій промисловості, тому що є екологічно чистими препаратами. У сільському господарстві ліпіди використовують при годуванні тварин і птахів. Наприклад, при годуванні птахів перевага віддається ліпідам, що містять до 65-75% ненасичених жирних кислот. Як кормові добавки, ліпіди як самостійний продукт, не роблять, тому що їхній вміст цілком достатньо для харчування тварин і в кормових дріжджах і в білкових концентратах.

***Біотехнологія отримання ліпідів***.

Кормові дріжджі одержують вирощуванням дріжджів роду Сапdida на звичайних гідролизатах або парафінах нафти. Вміст ліпідів у клітинах дріжджів відносно невисоке (16-20 % на суху біомасу). Однак виділення ліпідів із дріжджів економічно вигідно, тому що кормові дріжджі виробляються у великих кількостях, а зайвий вміст ліпідів є в ряді випадків небажаним для білкових концентратів. При виробництві білкових концентратів, що містять підвищений вміст ліпідів, здійснюють їх відділення від білкового концентрату. При цьому одержують окремо мікробний жир і знежирений білковий концентрат. Таким чином, з одного боку, це дозволяє одержувати збалансовані за своїм складом кормові добавки для сільсько-господарських тварин, з іншого боку - одержувати технічний мікробний жир, як сировину і очищені ліпіди для виготовлення косметичних товарів і лікарських препаратів.

*Продуцентами ліпідів,* що мають практичне значення, є ліпідні дріжджі та міцеліальні гриби, акі хоча і не набули широкого застосуванна, але їх жир за складом наближений до рослинних жирів, вихід на вуглеводних середовищах досягає 51%. Ліпідний склад грибів представлений нейтральними жирами і фосфоліпідами.

Особливість бактерій у ролі продуцентів ліпідів полагає у їх складі, що включає в основному складні ліпіди (фосфо і гліколіпіди).

Водорості також переспективні для культивуванна їх в якості ліпідоутворювачів, тому що вони не мають потреби в органічному джерелі вуглецю для біосинтезу білка, вуглеводів, жиру. Хімічний склад водоростей значно залежить від умов культивування -зміна вмісту азоту в середовищі призводить до збільшення вмісту жиру від 5 до 85%. Однак низька швидкість росту, накопичення в клітинах токсичних сполук обмежує їх промислове застосування.

Загальні вимоги до росту продуцентів ліпідів, зокрема дріждів - по-перше, збалансоване поживне середовище з визначеним співвідношенням джерел вуглецю й азоту в середовищі, по-друге, чітко аеробний метаболізм, повне виключення бродіння.

Дріжджі *Cryptococcus terricolus* можуть синтезувати велику кількість ліпідів (до 60% від сухої маси) в будь-яких умовах, навіть найбільш сприятливих для синтезу білка.

Дріжджі видів *Lipomyces lipoferus і Rhodotorula gracilis* накопичують великі кількості ліпідів і активно розвиваються на вуглеводних субстратах (на мелясі, гидролизатах торфу і деревини) також У цих видів дріжджів ліпогенез сильно залежить від умов культивування. Ці продуценти накопичують значні кількості (до 70%) триацилгліцеридів.

Процес утворення ліпідів у більшості дріжджів складається з двох чітко розмежованих стадій:

* Перша характеризується швидким утворенням білка в умовах посиленого постачання культури азотом і супроводжується повільним накопиченням ліпідів (в основному гліцерофосфат і нейтральних жирів);
* Друга - припиненням росту дріжджів і посиленим накопиченням ліпідів (в основному нейтральних).

За допомогою дріжджів можливе одержання ліпідів на різних **субстратах:** гідролізатах рослинної сировини, сульфітних лугах, вуглеводнях нафти й ін. Ефективність виробництва дріжджового жиру багато в чому зв'язана з кількістю основної сировини, необхідного для одержання визначеної одиниці маси дріжджів, і його вартістю. Крім того сировина, на базі якої готується поживне середовище для вирощування дріжджів, повинна забезпечувати одержання ліпідів, що відповідають вимогам, пропонованим промисловістю, що переробляє ліпіди в різні продукти. Найбільш відпрацьовані технологічні схеми одержання ліпідів за допомогою дріжджів на гідролизатах торфу малого ступеня розкладання і вуглеводнях нафти.

Процес виробництва мікробного жиру можна охарактеризувати як безперервний, тому що подача поживного середовища і відбір культуральной рідини відбувається безупинно при постійній швидкості потоку, установлюється стаціонарний стан, при якому концентрація біомаси субстратів, питома швидкість росту мікроорганізмів і інших параметрів – постійні. Безперервнии процес є найбільш перспективним, тому що він дозволяє скоротити витрати ручної праці й автоматизувати виробництво.

Джерелом карбону й енергії для продуцентів ліпідів при спрямованому культивуванні мікробного жиру виступають вуглеводи, карбонові і жирні кислоти, вуглеводні, спирти.

Технологічна схема одержання ***мікробних ліпідів*** на відміну від технологічної схеми одержання мікробних білкових препаратів включає стадію виділення ліпідів із клітинної біомаси методом екстракції. При цьому одночасно виходять два продукти – мікробний жир і знежирений білковий препарат.

*Стадія 1*

Торф піддається кислотному гідродізу при впливі концентрованої сірчаної кислоти і високої температури (120 С). Мета гідролізу – перевести виглеводи в прості цукри для харчування дріжджів.

*Стадія 2*

Умови культивування : на фракційний склад синтезованих ліпідів надають інші умови культивування: аерація, рН і температура. Від інтенсивності аерації залежить синтез фосфогліцерідов, жирних кислот і триацилгліцеридів. При недостатній аерації ліпіди містять в 4 рази менше триацилгліцеридів, в 2 рази більше фосфогліцерідов і в 8 разів більше жирних кислот, ніж при нормальній. При інтенсифікації аерації зростає ступінь ненасиченості ліпідів і збільшується відносна кількість усіх груп ненасичених кислот. Підвищення рН середовища веде до збільшення вмісту фосфогліцерідов і жирних кислот при одночасному зниженні кількості триацилгліцеридів. Оптимальні температури росту та ліпідообразованія для клітин збігаються, причому зміст ліпідів не залежить від температури культивування. Однак, регулюючи температуру, можна створювати різні співвідношення насичених і ненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідних мембран.

Для вуглеводних субстратів найбільш відпрацьована технологія отримання ліпідів на гидролизатах торфу і деревини. Як показали дослідження, співвідношення гідролізатів торфу і деревини 1:4 забезпечує найбільший вихід біомаси у стадії культивування (до 10 г / л) при максимальному вмісті ліпідів (до 51% від АСВ) і високому коефіцієнті засвоєння субстрату (до 0,54). З 1 тонни абсолютно сухого торфу після його гідролізу і ферментації можна отримати 50-70 кг мікробного жиру з переважним вмістом триацилгліцеридів.

***Ідентифікація та кількіснии аналіз ліпідів.***

Визначення вмісту загальних ліпідів

Найбільш простим методом визначення загальних ліпідів в тканинах є метод настоювання наважок тканини в хлороформ-метанольній суміші. За різницею мас зразка до і після екстракції знаходять процентний вміст ліпідів. Визначення ліпідів можна проводити в абсолютно-сухому чи повітряно-сухому матеріалі. При використанні повітряно-сухого матеріалу паралельно із визначенням ліпідів визначають вміст води, щоб зробити розрахунки на абсолютно-суху речовину. Для одержання надійних результатів роблять два паралельних визначення.

1,0-1,5 г. насіння сосни звичайної зважують на аптечних терезах, розтирають у ступці, потім переносять у висушені і зважені на аналітичних терезах пакети із фільтрувального паперу. Зважують матеріал разом із пакетом і по різниці між одержаною масою і масою порожнього пакету визначають масу наважки. Пакет із наважкою вкладають в пакет більшого розміру і поміщають в конічну колбу, додають 35-40 мл. метанолу і потім доливають 35-40 мл. хлороформу. Вміст колби перемішують і залишають в темному місці. Пакет із обезжиреним матеріалом промивають і сушать в термостаті при 100(С протягом 2,5 год. , після чого зважують.

Визначення вмісту води проводять у повітряно-сухому матеріалі паралельно із обезжиренням. Матеріал поміщають у бюкс, сушать і за різницею мас б’юкса до і після просушення визначають вміст води.

**Визначення вмісту загальних ліпідів в тканинах за допомогою апарату Сокслету**

Метод полягає в неперервній екстракції сумарних ліпідів з висушеного матеріалу з подальшим визначенням різниці мас зразка до і після екстракції.

Досліджуваний зразок, висушений і подрібнений, поміщають в пакет з фільтрувального паперу, який опускають в екстрактор апарату Сокслета. Екстрактор заповнюють ефіром на 1/5 об’єму. Колбу поміщають в водяну баню, і пропустивши воду в холодильник, нагрівають. Після нагрівання ефір, який містить жири, стікає в колбу. Процес повторюють до повного виділення жиру із зразка.

Кількість загальних ліпідів визначають за різницею мас пакета до і після екстракції .

**Розділення ліпідів на фракції методом ТШХ**

Для розділення ліпідів широко використовують ТШХ. Метод базується на тому, що ліпідний екстракт наносять на спеціально приготовлені пластинки з шаром силікагелю або Silufol пластинки. Розділення проводять в підібраній системі розчинників, в спеціальних камерах. Проявляють хроматограми концентрованою сульфатною кислотою або парами йоду. Плями обводять і розраховують Rf кожної і порівнюють з теоретичним значенням Rf.

В якості рухомої фази при ТШХ ліпідів використовують суміш хлороформу, метанолу і води у співвідношенні 65:25:4.

Виявляють ліпіди на хроматограммах наступними методами:

1. Ліпіди виявляються у вигляді коричнево-чорних плям на майже безбарвному фоні при обробці 50% сірчаною кислотою з подальшим нагріванням 10 хв при температурі 160-180°С.

2. Ліпіди, що містять ненасичені кислоти, виявляються при обприскувані насиченим розчином біхромату калія в 80% розчині сірчаної кислоти (нагрівання при 160-180°С) у вигляді коричневих плям.

3. Обприскуванням 10% розчином фосфорномолібденової кислоти в 96% спирті, після нагрівання (80-90°С) ліпиди забарвлюються в темно-синій колір на жовто-зеленому фоні.

4. Обприскування розчином бромтімолового синього. Ліпіди виявляються у вигляді жовтих плям на синьому фоні.

5. Ліпіди, що містять ненасичені жирні кислоти, виявляються у вигляді коричневих плям при обробці хроматограм парами йоду. На ряду з тригліцерідами в насінні різних рослин містяться ліпіди, що є ефірами жирних кислот з такими гліколями, як етилгліколь, ізомерні пропіленгліколі, бутандіол.