



# Содержание

Введение .....	4
1. Аналитический обзор литературы .....	6
1.1. Смоляные затруднения.....	6
1.2. Ферменты .....	7
1.2.1. Строение ферментов. Активный центр .....	8
1.2.2. Свойства ферментов.....	10
1.2.3. Классификация ферментов .....	11
1.2.4. Каталитическая активность фермента.....	13
1.2.5. Факторы, влияющие на протекание ферментативных реакций .....	14
1.2.6. Субстратная специфичность .....	18
1.2.7. Классификация методов определения каталитической активности ферментов .....	19
1.3. Липаза и ее смеси с амфифильными соединениями .....	20
1.4. Методики планирования эксперимента .....	24
1.4.1. Основные понятия .....	24
1.4.2. Классификация экспериментальных планов.....	25
1.4.3. Центральные композиционные планы .....	26
1.4.4. Центральный композиционный ротационный план (ЦКРП) .....	28
2. Объекты и методы исследования .....	31
2.1. Объекты исследования .....	31
2.3. Определение каталитической активности липазы по методу Ота-Ямада.....	32
2.4. Методика построения математической модели процесса взаимодействия липазы с синтанолом ДС-10 .....	34
2.5. Определение условий и построение плана эксперимента .....	34

2.6.Обработка результатов экспериментальных данных. Расчет коэффициентов регрессионного уравнения.....	37
2.7. Определение средних размеров частиц дисперсной фазы методом динамического светорассеяния .....	39
2.8.Методика определения солюбилизирующей способности .....	41
3.Результаты эксперимента и их обсуждение .....	42
3.1.Результаты планирования эксперимента.....	42
3.2.Кинетические зависимости каталитической активности липазы от времени.....	47
3.4. Результаты динамического светорассеяния .....	48
3.5.Солюбилизация канифоли .....	50
Выводы.....	53
Библиографический список .....	53

## Введение

Продукты переработки древесины являются важной и неотъемлемой частью нашей жизни. Безусловным достоинством древесинного сырья является его возобновляемость. Древесина является уникальным сырьем, еще с древнейших времен человечество использует ее в качестве топлива, в строительстве, при изготовлении различных орудий труда и бумаги. Помимо, собственно использования древесины с целью получения целлюлоз и продуктов на их основе, древесина служит источником различных экстрактивных веществ. Эти вещества разнообразны по составу и свойствам.

Как и для любого производства, в целлюлозно-бумажной промышленности существует ряд проблем. Одной из актуальных проблем в ЦБП является проблема смоляных затруднений. Её решают как с помощью нереагентных, так и с применением химических методов.

Широкое распространение в ЦБП получили различные амфифильные соединения. Помимо ПАВ, в ЦБП используются ферменты в различного рода процессах, например для удаления чернил с бумаги, на стадии отбеливания, а также для уменьшения содержания так называемой “вредной смолы”. В связи с общностью строения ферментов и ПАВ, возможно их совместное применение, для решения различных проблем.

Процесс исследования достаточно труден и требует много времени, поэтому для получения экспериментальных данных довольно часто используют различные методики планирования экспериментов.

Планирование эксперимента может решить задачи при поиске оптимальных условий процесса, выборе влияющих факторов, а также для построения, оценке и уточнении констант теоретических моделей.

Алгоритмы построения планов эксперимента применимы к большинству оптимизационных задач как проектно-расчетных, так и экспериментальных. Методы статистической оценки опытных данных необходимы для любого экспериментального исследования, претендующего на достоверность результатов.

Планирование эксперимента — это процедура выбора числа и условий проведения опытов, необходимых и достаточных для решения поставленных задач с требуемой точностью.

Различные методики планирования эксперимента способствует сокращению количества опытов, на основании которых строятся модели процессов. Таким образом, основной задачей планирования становится установление минимального числа опытов и условий их проведения.

Цель работы: определение влияния амфифильных соединений на каталитическую активность липазы при различных факторах (температуры, рН среды и добавки поверхностно-активного вещества).

Для достижения поставленной цели были поставлены задачи:

1. Изучить структуру и физико-химические свойства ферментов, используемых в системе ПАВ/фермент;
2. Выбрать методику планирования эксперимента;
3. Определить каталитическую активность липазы в зависимости от трех выбранных факторов;
4. Построить математическую модель влияния факторов на каталитическую активность липазы и построить графики зависимости.

# 1. Аналитический обзор литературы

## 1.1. Смоляные затруднения

Смоляные затруднения появляются вследствие выделения экстрактивных веществ при разрушении строения древесины.

Состав древесной смолы, находящейся в древесине, довольно сложен и разнообразен по химическим и физическим свойствам и представляет собой смесь веществ с определенными строениями [1,2]. В состав древесной смолы входят смоляные и жирные кислоты, их сложные эфиры и неомыляемые вещества [3]. Содержание древесных смол в хвойных и в лиственных породах может различаться в зависимости от места происхождения. Древесная смола делится на два типа: смола, которая содержится в смоляных каналах (живица) и смола, содержащаяся в паренхимных клетках.

В паренхимных клетках основным компонентом древесной смолы являются жирные кислоты. Жирные кислоты представляют собой алифатические монокарбоновые кислоты с длинными прямыми цепными молекулами. Разделяют три группы жирных кислот [4]:

- Предельные твердые кислоты;
- Непредельные жидкие кислоты;
- Окисленные жирные кислоты (оксикислоты).

Появление «смоляных затруднений» в основном вызвано некоторыми неомыляемыми веществами, содержащимися в древесине. Неомыляемые вещества паренхимных клеток представляют собой не растворимые в щелочи так называемые резены. Резены – это сложная смесь алифатических, полициклических соединений и ряда других компонентов.

Проблема смоляных затруднений известна давно. Для ее решение существует ряд как не химических, так и реагентных методов ее устранения. Не смотря на это, полного решения данной задачи так и не найдено и во всем мире продолжают исследования для поиска эффективных способов устранения «вредной смолы».

Методы, влияющие на снижение вредной смолы, относят:

- Выдерживание и высушивание балансовой древесины;
- Пропарка щепы перед самой варкой;
- Отделение опилок;
- Эмульгирование смолы и ее отделение от целлюлозных масс механическими методами;
- Обработка целлюлозы щелочью, обычно применяют NaOH;
- Добавление тринатрийфосфат или гексаметафосфат, которые пептизируют частицы смолы;
- Обработка массы поверхностно-активными веществами и ферментами.

## 1.2. Ферменты

Ферменты (или энзимы)( fermentum (лат.) — закваска, брожение; enzyme (греч.)-дрожжи) - вещества белковой природы, которые являются биологическими катализаторами и ускоряют химические реакции в живых системах. Наука, которая занимается изучением ферментов, называется энзимология.

В настоящее время известно почти 2000 различных ферментов, они входят в состав клеток всех животных, растений и микроорганизмов [5]. Каждый из этих ферментов катализирует какую-то одну определенную химическую реакцию.

### **1.2.1.Строение ферментов. Активный центр**

Все известные ферменты представляют собой белки, т.е. цепочки аминокислот, молекулы которых подвергаются конформации, и образуют белковую глобулу с определенными свойствами.

Многие ферменты представляют собой глобулярные белки, фибриллярную структуру имеют только малая часть из всех известных ферментов. Основными характеристиками, описывающие структуру ферментов являются размер и форма молекулы, молекулярный вес и аминокислотную формула, число пептидных цепей, их упаковка и расположение в молекуле, способ соединения и расположение субъединиц.

Молекулярные массы белков лежат в пределах 12000 - 1000000, таким образом, их размеры превышают как размеры субстратов, так и функциональных групп на которые они действуют [6]. Размер самой молекулы фермента, как правило в пределах нескольких десятков ангстрем по длине, широте и высоте.

В настоящее время для многих ферментов известен аминокислотный состав [5], но данные о последовательности аминокислот в цепях установлены для небольшого числа ферментов.

Важной характеристикой, влияющей на действие фермента является пространственная структура его молекулы. На основе рентгеноструктурного анализа и методом спектрополяриметрии, было доказано небольшое количество спиральных участков в ферменте. Таким образом, каждый фермент имеет уникальную, свойственную только ему, третичную структуру.



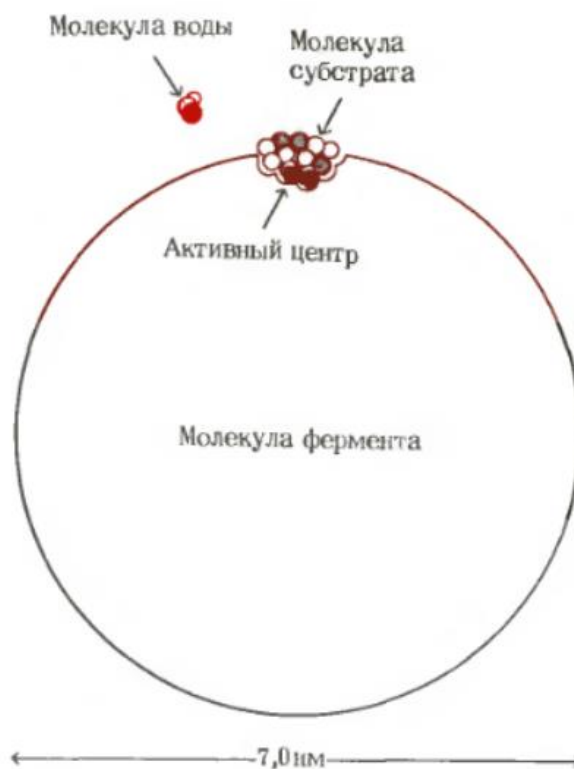


Рис. 1. Соотношение размеров активного центра к размерам молекулы фермента [6].

Молекулы многих ферментов представляют собой простые белки, которые не содержат дополнительных компонентов. Однако для многих ферментов, для выполнения их биологической деятельности необходим дополнительный компонент - кофактор. Его роль выполняют различные неорганические вещества (например, ионы металла) или комплексные органические соединения (коферменты). Такие коферменты или ионы металлов могут связываться как временно, так и являться постоянными веществами. Небелковая группа фермента в этом случае зовется простетической, а фермент с коферментом зовется голоферментом.

Активный центр определяет каталитическую активность и специфичность. У некоторых ферментных белков может существовать не один активный центр. Ряд сведений о числе активных центров получают, определяя количество простетических групп в молекуле катализатора. Считают, что активный центр располагается на различных участках одной или нескольких изогнутых цепях.

Кошланд предлагал выделить несколько групп аминокислот в молекуле фермента [5]:

- “контактные” аминокислоты - находятся на малом расстоянии от атомов молекулы субстрата, таким образом входя в контакт с субстратом;
- “дополнительные” аминокислоты - являются частью активного центра и в какой-то мере определяют его свойства и структуру;
- “вспомогательные” аминокислоты - отвечают за стабильность активного центра и не участвуют в катализе;
- “инертные” аминокислоты - не участвуют в катализе и не влияют на реакционную способность и специфичность фермента.

Количество участков, способных связывать фермент можно определить по изменению ряда физико-химических свойств, как например поглощение ультрафиолетовой части спектра.

### **1.2.2.Свойства ферментов**

Вследствие того, что ферменты являются веществами белковой природы, для них характерны те же свойства, что и для простых белков.

Ферменты являются катализаторами различных химических реакций. Но в то время как под воздействием органических катализаторов процессы протекают медленно и для их проведения требуются высокие температуры, большие давления, кислая и щелочная среда, ферменты же довольно чувствительны к таким факторам.

К отличиям ферментов от неорганических катализаторов относят [6]:

- Специфичность - катализируют небольшую группу сходных реакция или реакцию со сходными по строению соединениями;
- Субстратная специфичность, которая обусловлена комплементарностью структур молекулы субстрата и химической конфигурацией

определенного участка (центра связывания и активного центра) молекулы фермента;

- Низким значением энергии активации, по сравнению с соответствующими реакциями, катализируемыми небиологическими катализаторами;
- Большая зависимость ферментов от температуры; pH среды, окислительно-восстановительных условий и наличия ничтожных примесей некоторых веществ.

### 1.2.3.Классификация ферментов

Ферменты классифицируют по катализируемой им химической реакции [6,7]:

*Оксиредуктазы* - к ним относятся ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции. Систематическое название образуется по типу: «донор: акцептор оксиредуктаза». Данные ферменты участвуют в процессах брожения и дыхания.

- 1) Дегидрогеназы и оксидазы;
- 2) Пероксидазы;
- 3) Оксигеназы.

*Трансферазы* - ферменты, переносящие ту или иную группу от одного соединения (донор группы) к другому (акцептору). Систематическое название: акцептор-(группа)трансфераза или донор-(группа)трансфераза.

- 1) Метилтрансферазы;
- 2) Переносчики различных одноуглеродных групп;
- 3) Трансальдолаза и транскетолаза;
- 4) Ацетилтрансферазы;
- 5) Гликозилтрансферазы;

- 6) Алкилтрансферазы;
- 7) Ферменты, переносящие азотистые группы;
- 8) Ферменты, переносящие фосфатные группы;
- 9) Сульфид- и сульфотрансферазы;
- 10) СоА-трансферазы.

*Гидролазы* - ферменты, катализирующие реакции гидролитического расщепления внутримолекулярных связей.

- 1) Эстеразы;
- 2) Тиолэстеразы;
- 3) Фосфатазы;
- 4) Гликозидазы;
- 5) Пептидазы;
- 6) Пирофосфатазы;

*Лиазы* – ферменты, которые разрывают С-С, С-О-, С-N- и другие связи в результате реакции элиминирования (что приводит к образованию двойных связей) или присоединяющие определенные группы по двойным связям.

- 1) Декарбоксилазы;
- 2) Альдегид-лиазы;
- 3) Лиазы кетокислот;
- 4) Гидро-лиазы;
- 5) Полисахарид-лиазы;
- 6) Другие лиазы (группы, которые катализируют расщепления связей С-N, С-S, С-галоген, Р-О, N-Fe.

*Изомеразы* - ферменты, катализирующие превращения органических соединений в их изомеры.

- 1) Рацемазы и эпимеразы;

- 2) цис-транс-Изомеразы;
- 3) Внутримолекулярные оксидоредуктазы;
- 4) Внутримолекулярные трансферазы;
- 5) Внутримолекулярные лиазы.

*Лигазы* - ферменты, которые катализируют присоединение друг к другу двух молекул. Процесс связан с разрывом пирофосфатной связи в молекуле АТФ; энергия, освобождаемая при расщеплении АТФ, используется для синтеза.

#### 1.2.4. Каталитическая активность фермента

Присутствие фермента обнаруживается по протеканию (ускорению) реакции, количество фермента чаще всего определяют по ее скорости.

Таким образом, скорость ферментативной реакции определяется уменьшением количества молекул субстрата или увеличением количества молекул продукта за единицу времени.

*Активность фермента* — это скорость ферментативной реакции и является мерой каталитической активности фермента.

Согласно международному соглашению, “за единицу активности фермента принимается такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата А (мкмоль =  $10^{-6}$  моля) в 1 мин при 25 °С в оптимальных условиях действия фермента” [8].

$$1\text{Е} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин}} \quad (1)$$

*Удельная активность фермента (Уд.Ак.)*, является мерой чистоты ферментного препарата, и численно равна количеству превращенного субстрата (в мкмольях) за единицу времени одним 12 миллиграммом (мг) белка (фермента, выделенного из ткани) [8]:

$$\text{Уд. Ак.} = \frac{1 \text{ мкмоль превращенного субстрата}}{1 \text{ мин} \cdot \text{количество белка (мг)}} = \frac{E}{\text{количество белка (мг)}}. \quad (2)$$

Молекулярная активность фермента (число оборотов) - число молекул субстрата, превращаемых одной молекулой фермента за 1 мин. Определяется, только если известна молекулярная масса фермента и его молекулярная концентрация в растворе [8].

### **1.2.5. Факторы, влияющие на протекание ферментативных реакций**

Известно, что биологические системы чувствительны к изменениям температуры, рН среды и многих других факторов. К таким факторам можно отнести влияние концентраций фермента и субстрата, изменение рН среды, температуры и давления.

#### ***Влияние концентрации фермент:***

- Прямая зависимость. Во многих случаях скорость реакции прямо пропорционально концентрации фермента (рис. 2.):

$$v = k[E]. \quad (3)$$

Возможно отклонение от нелинейности вызванное несовершенством системы определения активности или является особенностью данного фермента;

- Вогнутые кривые. Данные отклонения от линейности могут быть вызваны вследствие присутствия в реакционной смеси токсичных примесей или наличием диссоциирующего активатора или кофермента в ферментном препарате (рис. 3.).

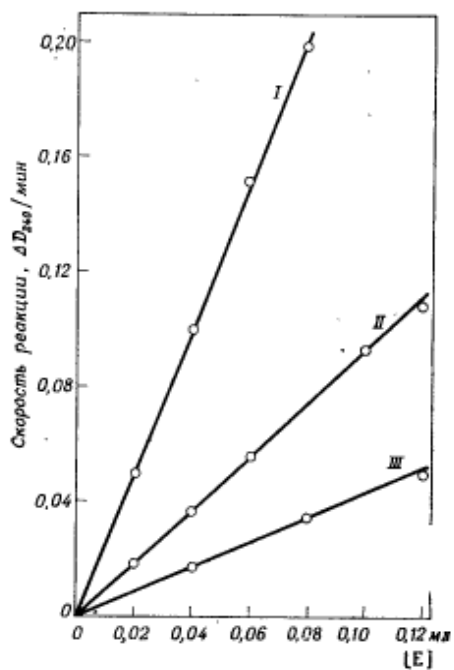


Рис. 2. Примеры влияния концентрации фермента на скорость реакции. I – аспартат-аммиак-лиаза; II – фумартгидратаза; III – аконитат-гидратаза [9].

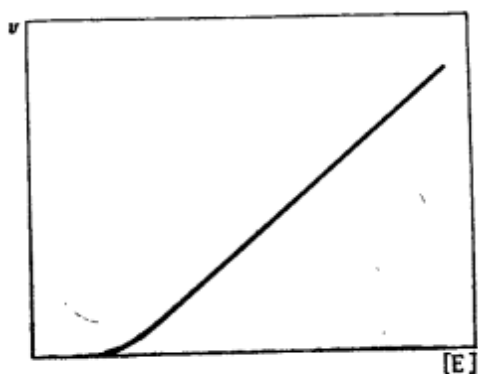


Рис. 3. Примеры влияния токсичных примесей на скорость протекания реакции [9].

- Выпуклые кривые. Причинами таких отклонений служат несовершенство метода определения, слишком большое количество фермента, вместо определения начальной скорости получают изменения, происходящие в промежутке времени или наличие в системе ингибитора (рис. 4.).

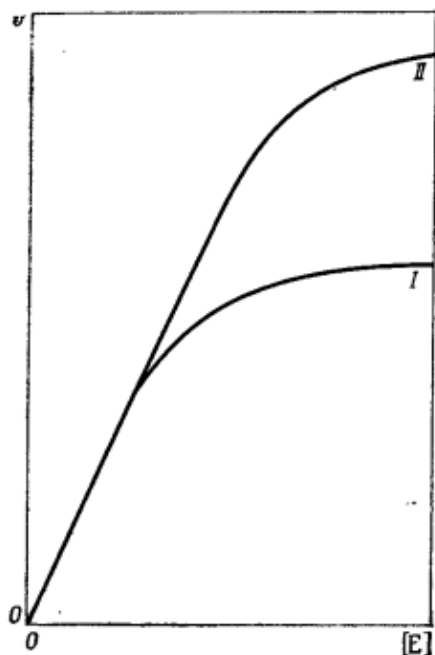


Рис. 4. Ограничение скорости реакции условиями измерения [9].

**Влияние рН среды.** Активность ферментов сильно зависят от кислотности среды и для большинства ферментов существует определенный оптимум рН.

Такое влияние рН на активность может быть обусловлено [9]:

- Истинное обратимое влияние рН на скорость реакции (в условиях насыщения фермента субстратом);
- Влияние рН на сродство фермента к субстрату;
- Влияние на стабильность фермента и последующая необратимая инактивация.

**Влияние температуры.** Температура влияет на:

- Стабильность фермента;
- Изменение скорости распада фермент-субстратного комплекса;
- Сродство фермента к субстрату;
- Сродство фермента к активаторам или ингибиторам и т.д.



Важным показателем в данном случае является теплота инактивации фермента. Типичные кривые представлены на рис. . Появление кривизны обусловлено одновременным действием на фермент двух факторов: увеличением скорости протекания реакции и одновременной его деструкции с повышением температуры. В большинстве случаев мгновенная инактивация фермента наблюдается при достижении температуры в 100 °С, но много чаще деструкция наблюдается при 70 °С [9].

### ***Влияние добавки поверхностно-активных веществ на фермент.***

Амфифильные соединения оказывают влияние на структуру липазы и на форму организации субстрата в растворе.

Данные о влиянии поверхностно-активных веществ на каталитическую активность ферментов разнятся. В каких-то случаях наблюдается возрастание активности, где-то же наоборот происходит инактивация фермента [10,11,12].

Механизм взаимодействия амфифильных соединений с молекулами белка довольно сложен и сильно зависит от природы белка, рН среды, электролитного состава раствора, количества и относительное расположение гидрофобных и гидрофильных участков на молекуле фермента. Вследствие всей сложности взаимодействия макромолекулы фермента с ПАВ не существует общепринятой модели, описывающей их взаимодействие.

Довольно часто в литературе встречается модель “ожерелье и бусинки”, что используется для описания взаимодействия белка с ПАВ. Например, взаимодействие додецилсульфата натрия и бычьей сыворотки альбумина приводит к образованию агрегата такого типа [13].

Так же описываются модели, где вокруг цилиндрической мицеллы ПАВ оборачивается спиралью полипептид [14].

В некоторых работах [15,16] описывают, что при добавлении ПАВ к раствору белка возникает гидрофобный комплекс, где взаимодействуют гидрофобные группы ПАВ и белка. С увеличением же концентрации ПАВ в растворе, происходит связывание белка по гидрофобному механизму и образование гидрофильного комплекса.

### **1.2.6.Субстратная специфичность**

Для некоторых ферментов характерна почти абсолютная специфичность к определенным субстратам и отсутствие взаимодействия с похожими по строению веществами, как пример фермент аспартаза [7]. Существуют и ферменты с наоборот широкой специфичностью.

Изучение данной особенности ферментов, привело к возникновению идеи о комплементарности молекулы субстрата и специфического участка на поверхности молекулы фермента. Существует две модели определяющие специфичность ферментов:

1) Модель “ключ-замок” - где к специфическому участку, называемому активным центром присоединяется молекула субстрата и образуется временный фермент-субстратный комплекс. Модель была предложена Э. Фишером в 1890 году. Крупные молекулы субстратов, атакуют активный центр, составляющий малую часть фермента. Остальные молекулы отвечают за правильную глобулярную форму фермента. Образовавшиеся продукты по форме отличаются от активного центра и отделяются от него. Далее к освободившемуся активному центру подходит новая молекула субстрата. Данная модель не объясняет стабилизацию переходного состояния.

2) Модель индуцированного соответствия - представляет собой немного измененную модель “ключ-замок”. Модель была предложена в 1958 году Д.

Кошландом. В основе данной модели лежит то, что соединяясь с активным центром, молекула субстрата изменяет его структуру. Изменение формы активного центра способствует более эффективно выполнять свои функции. В дальнейшем теория получила модификации.

### **1.2.7.Классификация методов определение каталитической активности ферментов**

Изучение свойств ферментов происходит с применением различных физических, химических и физико-химических методов [17].

*Спектрофотометрические и фотоколориметрические методы.* Часто данные методы применяются для определения активности ферментных препаратов, используемых в промышленности. Например, для  $\alpha$ -амилазы, глюкоамилазы,  $\alpha$ -галактозидазу, целлюлазу, пектиназу и др. Данный метод основан на поглощении света окрашенными продуктами, образовавшимися при протекании ферментативной реакции. Величина поглощения пропорциональна количеству взятого на анализ фермента.

*Поляриметрический метод.* Сущность метода заключается в способности растворов углеводов отклонять плоскость колебания поляризованных лучей света, где отклонение пропорционально содержанию углеводов в растворе. Данный метод применяю для определения активности ,например, осаживающих, глюкоамилазных ферментов.

*Интерферометрический метод.* Сущность метода заключается в измерении разности показателей преломления исследуемого и эталонного растворов, в которых распространяются интерферирующие пучки лучей, и по разности определяют содержание сухих веществ в растворе. Метод применяется для определения активности протеолитических и пектолитических ферментов.

**Химические методы.** Основаны на определении активности ферментов по образовавшимся в процессе протекания реакции продуктам. Данные методы используются для различных ферментов.

**Ферментативно-фотокolorиметрический метод.** Данный метод основан на специфическом окислении глюкозы, образующейся в процессе ферментативной реакции гидролиза субстрата (например, крахмала) кислородом воздуха под действием фермента глюкоксидазы.

### **1.3. Липаза и ее смеси с амфифильными соединениями**

**Липаза** (lipos (греч.)-жир) - относится к классу гидролаз и катализирует гидролиз сложноэфирных связей в триглицеридах с образованием жирной кислоты и глицерина [5].

В природе липазы содержатся в тканях животных и растений, а также во многих микроорганизмах [6]. Все они различны по физико-химическим свойствам и по действию. В качестве примера строения молекулы липазы приведена трехмерная модель фермента из *Candida rugosa* на рис. 5.

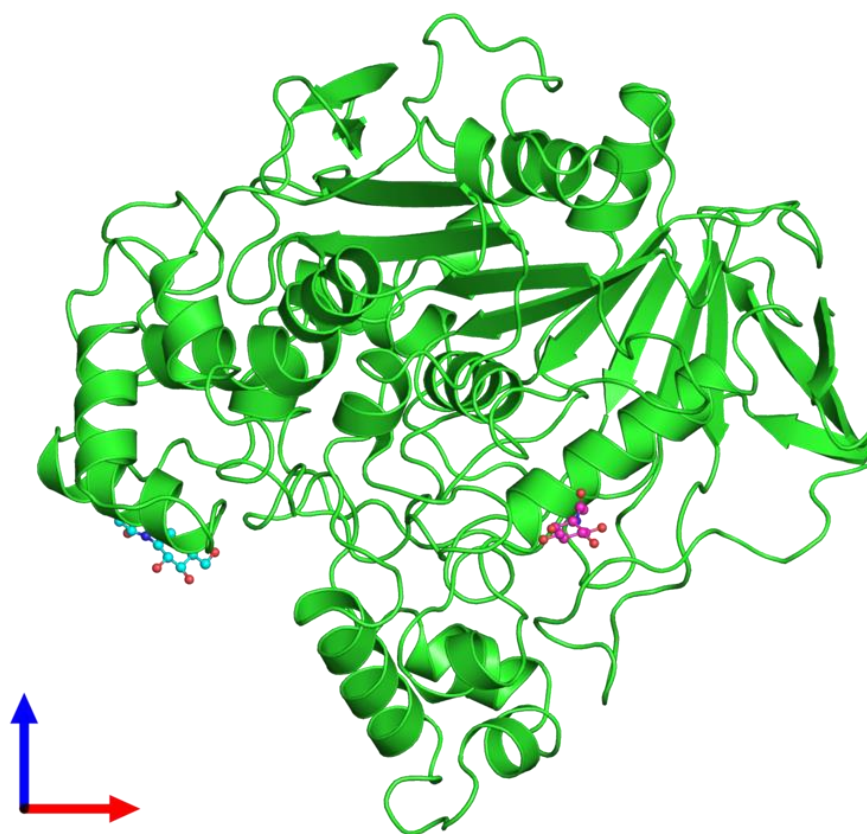


Рис. 5. Трехмерная геометрическая модель липазы из Candida rugosa [18].

Оптимальное значение pH большинства липаз лежит в пределах 7,0-9,0, но например, для промышленных препаратов липазы Lipex 100L и Lipex 100T, большая активность проявляется в диапазоне pH 9-10,5 [12]. Существуют также кислые и нейтральные липазы. Оптимум кислой липазы ферментативной системы плесневых грибов рода *Penicillium* лежит в пределах pH 6,0-6,5[19], pH оптимум для желудочных липаз равен 5,4 [7].

На активность и стабильность липаз сильное влияние оказывает температура. Увеличение температуры до определенного уровня приводит к ускорению реакции, а далее может происходить снижение скорости, как например для липаз *Alcaligenese*, *Candida rugosa*. При температурах выше 30 °С, наблюдается снижение скорости реакции [20].

Многие препараты липазы обладают малой термоустойчивостью и разрушаются при температурах выше 50 °С. Оптимальная температура липазы *Candida rugosa*, для которой максимальная активность достигается при 35 °С [12], далее уже наблюдается его разрушение.

Существуют исследования по получению препаратов липазы с увеличенной термостабильностью, например получение препарата липазы LipA, методом рекомбинантных генов ДНК, где получается липаза с оптимумом pH=9 и температурой T=60 °С [21].

Исследования липазы семян каучука показали, что максимальная активность достигается при температуре 40 °С и pH=8,0.

Одним из способов увеличения стабильности фермента является иммобилизация его на полимерном носителе. Такие ферменты обладают преимуществами для промышленного использования. Для стабилизации ферментных препаратов также используют различные неорганические соединения. Влияние неорганических солей ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{KI}$ ) на панкреотическую липазу приведены в работе [22,23] и показали, что присутствие ионов  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , повышают активность липазы.

Липазы широко используются в пищевой и медицинской промышленности. Для промышленного использования липазу чаще всего получают из грибов [6]. Так же довольно часто липазы используются в составе моющих композиций.

### ***Смеси липазы и амфифильных соединений***

Помимо использования липаз в моющих композициях, и возможно применение их в неводных средах. В качестве защиты от денатурирующего действия органических растворителей используют мицеллярные системы [24].

В работе [25] исследовалось влияние температуры, pH среды термостабильного гена липазы из *Shewanella putrefaciens*, методом спектрофотометрии в присутствии неионогенного ПАВ Твин-80. Наибольшая активность данной липазы наблюдалась при температуре 80 °С, что может говорить о его довольно высокой стабильности и оптимальным pH=5,0.

Добавка неионогенных ПАВ в небольшом количестве может приводить к резкому возрастанию каталитической активности липазы [26]. Исследования проводились при pH=7 и температуре 37 °С. В качестве добавки к липазе использовались неионогенные поверхностно-активные вещества Тритон X-100, Твин-80 и Твин-20.

В работе [27] также исследовалось влияние поверхностно-активных веществ различно типа на каталитическую активность липаз LipA и LipB. По результатам исследования установлено, что наибольшее влияние на каталитическую активность обеих липаз имеет додецилсульфат натрия (ДДСН). Активность возрастает уже при добавке анионогенного ДДСН меньше значения критической концентрации мицеллообразования (ККМ), затем резко возрастает и достигает пика в точке ККМ. Более высокие концентрации ДДСН приводят к снижению каталитической активности липаз. Такое снижение активности при высоких концентрациях АПАВ объясняют возможным изменением структуры макромолекулы белка (частичным разворачиванием) под воздействием мицелл ДДСН.

Таким образом, анализ литературных данных показал, что в настоящее время продолжается широкое исследование композиций на основе ПАВ/фермент. Проведено много исследований по активности ферментов из различных природных источников. Смеси ПАВ/фермент находят применение во многих технологических и производственных процессах. Влияние поверхностно-активных веществ на их каталитическую активность в растворах ферментов и их смесей с ПАВ исследованы недостаточно.

Подбор композиций ПАВ/фермент, в настоящее время, в основном осуществляется эмпирическим путем, поэтому целесообразно применение планирование эксперимента.

## **1.4.Методики планирования эксперимента**

### **1.4.1.Основные понятия**

Под математической теорией планирования эксперимента понимают науку о способах составления экономичных экспериментальных планов, которые позволяют извлекать наибольшее количество информации об объекте исследования, о способах проведения эксперимента, о способах обработки экспериментальных данных и их использования для оптимизации производственных процессов, а так же инженерных расчетов [28-33].

Последовательность проведения активного эксперимента имеет вид:

- разработка схемы проведения исследования (планирование эксперимента);
- осуществление опыта по заранее поставленному плану (проведение активного эксперимента);
- обработка результатов измерений, их анализ и принятие решений.

Теория планирование эксперимента обеспечивает:

- минимизацию необходимого числа опытов;
- одновременное варьирование всех факторов;
- выбор четкой стратегии для принятия дальнейших решений после каждой серии опытов;



- минимизация ошибок эксперимента за счет использования специальных проверок.

### **1.4.2.Классификация экспериментальных планов**

В зависимости от задач исследования, свойств объекта, выполнения математических предпосылок, наличие априорной информации планы можно классифицировать на [30]:

- планы дисперсного анализа - статистический метод, с помощью которого производится разложение суммарной дисперсии на составляющие;
- планы отсеивающего эксперимента — они используются на этапе предварительных исследований для выделения существенных эффектов факторов. Примеры: насыщенные планы, сверхнасыщенные планы случайного баланса, планы последовательного отсеивания;
- планы многофакторного анализа (ПМА) — такие планы используются для оценки линейных эффектов и эффектов взаимодействия многих факторов, варьируемых на одинаковом (симметричные планы) или не одинаковом (несимметричные планы) числе уровней;
- планы для изучения поверхности отклика — их используют для детального изучения области оптимума и участков поверхности отклика со значительной кривизной, где линейная модель становится неадекватной;
- планы для динамических задач планирования;
- планы для изучения механизма явлений;
- планы для построения диаграмм состав-свойство, состав-состояние.

Также все перечисленные выше планы объединяют в три группы:

- планы дисперсионного анализа;
- планы регрессионного анализа;
- планы ковариационного анализа.

На основании проведенного анализа материала, в качестве экспериментального плана был выбран ротабельный центральный композиционный план.

### **1.4.3. Центральные композиционные планы**

Для вычисления полинома 2-ого порядка число уравнений должно быть как минимум три. В ПФЭ  $3^k$  при  $k=2$   $N=9$ , а при трех факторах  $N=27$ . Поэтому при увеличении числа факторов применение ПФЭ не рационально, так как это планирование характеризуется резким увеличением объема эксперимента. Для сокращения числа опытов используют центральные композиционные планы (ЦКП).

Преимуществом ЦКП являются то, что если гипотеза о линейной математической модели не подтвердилась, то нет необходимости ставить все эксперименты заново для получения модели более высокого порядка, так как ядром таких планов являются линейные ортогональные планы. Таким образом достаточно добавить несколько специально спланированных экспериментальных точек, чтобы получить план, соответствующий полиному 2-ого порядка.

Построение ЦПК объясняется на примере с двумя независимыми переменными  $x_1, x_2$ . К полному факторному эксперименту  $2^2$  (точки 1,2,3,4) добавляют некоторое число  $n_0$  опытов в центре плана (точка 9) и четыре «звездных» точки 5,6,7,8 с координатами  $(+\alpha; 0); (-\alpha; 0); (0; +\alpha); (0; -\alpha)$ .

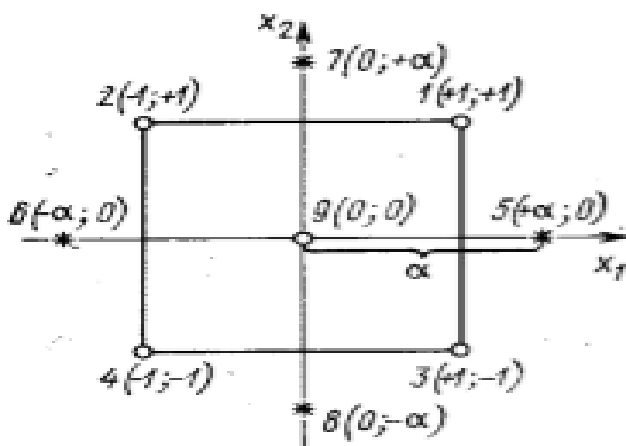


Рис. 6. Схема центрального композиционного плана второго порядка для двух факторов [29].

План второго порядка для двух факторов может быть представлен матрицей (Таблица 1.)

Таблица 1. Матрица центрального композиционного плана второго порядка для двух факторов [29]

Содержание плана	Номер опыта	$x_0$	$x_1$	$x_2$	$x_1 x_2$	$x_1^2$	$x_2^2$	$y$
План типа $2^2$	1	+	+	+	+	+	+	$y_1$
	2	+	-	+	-	+	+	$y_2$
	3	+	+	-	-	+	+	$y_3$
	4	+	-	-	+	+	+	$y_4$
«Звездные» точки	5	+	$+\alpha$	0	0	$\alpha^2$	0	$y_5$
	6	+	$-\alpha$	0	0	$\alpha^2$	0	$y_6$
	7	+	0	$+\alpha$	0	0	$\alpha^2$	$y_7$
	8	+	0	$-\alpha$	0	0	$\alpha^2$	$y_8$
Нулевая точка	9	+	0	0	0	0	0	$y_9$

Общее число опытов ЦКП второго порядка при  $k$  факторов составит (4)

$$N=2^k+2k+n_0, \quad (4)$$

где  $2k$ -число «звездных» точек;  $n_0$ -число опытов в центре плана.

Выбор величины «звездного» плеча  $\alpha$  и число опытов в центре плана  $n_0$  осуществляется в зависимости от критерия оптимальности. За критерий оптимальности принимается ортогональный или ротабельный план.

В теории планирования эксперимента для получения моделей 2-ого порядка различают несколько типов ЦКП. Наибольшее распространение получили ортогональный и ротабельный ЦКП.

#### **1.4.4.Центральный композиционный ротабельный план (ЦКРП)**

Ротабельным называется планирование, для которого дисперсия отклика (выходного параметра)  $y$ , предсказанного уравнения регрессии, постоянна для всех точек, находящихся на равном расстоянии от центра эксперимента. При данном методе планирования информационная поверхность приближается к сферической, т. е. Точность  $Y$  во всех направлениях на одинаковом расстоянии  $R$  от центра планирования становится практически одинаковой. При этом ЦКРП позволяет минимизировать ошибки в определениях  $Y$  связанные с неадекватностью представления результатов в виде полинома 2-ого порядка. Это достигается тем, что выбираемые удаленные от центра плана «звездные» точки на осях координат дополняются информацией из центра плана, представляющей собой сферу с нулевым радиусом, т.е. информацией равноточной во всех направлениях. Удельный вес этой информации в общем объеме увеличивается за счет увеличения числа опытов ( $m_0$ ) в центре плана.

При реализации ротабельных планов можно отказаться от параллельных опытов для оценки воспроизводимости экспериментов, что уменьшит общее

число опытов по сравнению с ЦКОП. Дисперсия экспериментальных значений  $Y$  в параллельных опытах может быть оценена в этом случае по экспериментам в центре плана.

Данный метод позволяет получить модель в виде

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2, \quad (5)$$

где  $b_0$ -свободный член;  $b_i$ -коэффициенты при линейных членах;  $b_{ij}$ -коэффициенты при взаимодействиях;  $b_{ii}$ -коэффициенты при квадратичных членах модели;  $X_i$ -факторы.

Матрица ЦКРП делится на как бы три области: ядро плана, «звездные» точки и центральные точки. Пример матрицы ЦКРП для двух факторного эксперимента представлен в Таблице 2.

Таблица 2. Матрица ЦКРП для двухфакторного эксперимента [30]

Виды точек	Номер опыта (точки)	$x_0$	$x_1$	$x_2$	$x_1 \cdot x_2$	$x_1^2$	$x_2^2$	$y$
Точки ядра плана $2^2$	1	+	-	-	+	+	+	$y_1$
	2	+	+	-	-	+	+	$y_2$
	3	+	-	+	-	+	+	$y_3$
	4	+	+	+	+	+	+	$y_4$
«Звездные точки»	5	+	$+\alpha$	0	0	$\alpha^2$	0	$y_5$
	6	+	$-\alpha$	0	0	$\alpha^2$	0	$y_6$
	7	+	0	$+\alpha$	0	0	$\alpha^2$	$y_7$
	8	+	0	$-\alpha$	0	0	$\alpha^2$	$y_8$
Центральные точки (в центре плана)	9	+	0	0	0	0	0	$y_9$
	10	+	0	0	0	0	0	$y_{10}$
	11	+	0	0	0	0	0	$y_{11}$
	12	+	0	0	0	0	0	$y_{12}$
	13	+	0	0	0	0	0	$y_{13}$

Величину звездного плеча выбирают в зависимости от ядра плана. Если в качестве ядра плана был выбран ПФЭ  $2^k$ , то  $\alpha=2^{k/4}$ . Для ядра в виде полуреплики ПФЭ величина звездного плеча рассчитывается, как  $\alpha=2^{(k-1)/4}$ .

Для ряда числа факторов величины звездного числа подсчитаны и представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Значения звездных плеч и числа точек в центре ротательных планов [31]

Число факторов $k$	Число точек ядра $2^k$	Число звёздных точек $2k$	Число нулевых точек $n_0$	Величина звёздного плеча $\alpha$	Общее число опытов $N$
2	4	4	5	1,414	13
3	8	6	6	1,682	20
4	16	8	7	2,000	31
5	32	10	10	2,378	52
$5^x$	16	10	6	2,000	32
6	64	12	15	2,828	91
$6^x$	32	12	9	2,378	53
7	128	14	21	3,333	163
$7^x$	64	14	14	2,828	92

<sup>x</sup> – полуреплика

## 2. Объекты и методы исследования

### 2.1. Объекты исследования

В качестве исследуемого фермента был выбран ферментный препарат липазы:

**Lipex 100L (Novozymes)** – представляет собой прозрачную жидкость желтоватого цвета с содержанием липазы 4,5 %. Имеет широкий кислотный диапазон применения, может использоваться в нейтральных и щелочных средах и в диапазоне температур 30-60 С. Воздействует на: триглицериды (жирные загрязнения: масла, жиры и т.п.) Механизм воздействия: гидролиз эфирных связей в триглицеридах [35].

Поверхностно-активные вещества:

- **Синтанол ДС-10 ( $\alpha$ -децил - октадецил- $\omega$ -гидроксиполи (окси-1,2-этандиол))** - неионогенный ПАВ; смесь полиоксиэтиленгликолевых эфиров синтетических первичных высших жирных спиртов фракции  $C_{10} - C_{18}$ , этоксилированные спирты фракции  $C_{10} - C_{18}$  на 10 молей ОЭ, Alcohols,  $C_{10} - C_{18}$  ethoxylated. Выглядит как паста белого или желтоватого цвета, хорошо растворимая в воде. Находит применение в моющих средствах [36,37].
- **Синтамид-5** - неионогенный ПАВ; смесь полиоксиэтилированных эфиров моноэтаноламидов жирных кислот кокосового масла фракции  $C_7-C_{17}$ , с общей формулой  $C_nH_{2n+1}CONHCH_2CH_2O(C_2H_4O)_mH$ , где  $n=10\div 16$ ,  $m=5\div 6$ . Внешне представляет собой довольно прозрачную вязкую жидкость желтоватого цвета [36,38].
- **Додecilсульфат натрия (ДДСН)** - анионогенный ПАВ; натриевая соль лаурилсерной кислоты, общая формула соединения имеет вид:  $C_{12}H_{25}OSO_3Na$ . По внешнему виду представляет собой порошок белого цвета, хорошо растворимы в воде [36,39].

### 2.3. Определение каталитической активности липазы по методу Ота-Ямада

Каталитическую активность липазы определяли с применением метода Ота-Ямадо [40].

За единицу ферментативной активности липазы принимают такое количество фермента, которое освобождает 1 мкмоль олеиновой кислоты из 40%-й эмульсии оливкового масла при pH 7,0 и  $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч.

В основе метода лежит определение титрованием щелочью жирных кислот, образовавшихся под действием липазы при использовании в качестве субстрата оливкового масла.

Реактивы: раствор оливкового масла (субстрат); 2%-й раствор поливинилового спирта; 1 н раствор соляной кислоты; 0,05 н раствор щелочи, фосфатно-цитратный буфер с pH 7,0; 1%-й раствор фенолфталеина; 90%-й раствор спирта; 1%-й раствор фермента. Приготовление субстрата: 100 см<sup>3</sup> оливкового масла смешивают со 150 см<sup>3</sup> 2%-го раствора поливинилового спирта в эмульсаторе. Полученную эмульсию выдерживают на льду в течение 60 мин. Если расслаивания не наблюдается, субстрат пригоден к использованию.

Приготовление раствора поливинилового спирта:

Взвешенные 20 г ПВС помещают в мерную колбу на 1 дм<sup>3</sup> и добавляют 800 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Суспензию выдерживают в течение 30 мин при комнатной температуре, затем добавляют 0,5 см<sup>3</sup> 1 н раствора соляной кислоты и непрерывно перемешивают при температуре 80–90 °C в течение 1 ч. Затем раствор охлаждают, доводят до pH 7,0 раствором щелочи, объем доводят до 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной водой и полученный раствор фильтруют.



Проведение опыта: 5 см<sup>3</sup> эмульсии – субстрата и 4 см<sup>3</sup> буфера с рН 7,0 помещают в колбу на 100 см<sup>3</sup>, которую закрывают пробкой. Смесь выдерживают на водяной бане при температуре 37 °С в течение 10 мин. Затем к смеси добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора фермента и хорошо перемешивают. Полученную смесь выдерживают при температуре 37 °С в течение 60 мин, после чего немедленно добавляют 30 см<sup>3</sup> этанола для прекращения реакции. Раствор титруют 0,05 н раствором щелочи в присутствии 1%-го раствора фенолфталеина до появления окраски.

Контрольную пробу готовят следующим образом. К смеси субстрата и буфера с рН 7,0, выдержанной при температуре 37 °С добавляют 30 см<sup>3</sup> этанола, затем 1 см<sup>3</sup> ферментного раствора и смесь немедленно титруют.

Разность между результатами титрования контрольной и опытной проб соответствует количеству 0,05 н раствора щелочи, которое пошло на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся из оливкового масла под действием фермента.

Липазную активность фермента ЛС (в ед/г) определяют по формуле :

$$ЛС = \frac{А*Т*50}{В}, \quad (6)$$

А – разность между результатами титрования опытной и контрольной проб, см<sup>3</sup>;

Т – титр щелочи, г/мл (0,001996 г/мл);

В – концентрация образца ферментного раствора, г/см<sup>3</sup>;

50 – коэффициент пересчёта в мкмоль жирных кислот.

## 2.4. Методика построения математической модели процесса взаимодействия липазы с синтанолом ДС-10

Реализацию многофакторного планирования эксперимента влияния добавки синтанола ДС-10 на каталитическую активность фермента при различных условиях проводили по методике [17]. На основании результатов литературного обзора по теме было установлено, что основными факторами, воздействующими на активность липазы являются рН среды, температура и добавка ПАВ. В качестве метода для установления математической модели был выбран ротабельный центрально композиционный план [32].

Так же определили уровни варьирования факторов. Температуру варьировали от 20 до 80 °С. Значения кислотности среды изменяли от 2 до 12. Добавку ПАВ в раствор осуществляли в диапазоне соотношений 10/90-70/30 (ПАВ/энзим).

## 2.5. Определение условий и построение плана эксперимента

Перед проведением эксперимента определяют число факторов и уровни их варьирования.

Вначале определяют истинные значения параметров для кодируемых переменных (нулевой уровень):

$$x_i = \frac{X_i - X_i^{(0)}}{\Delta_i}, \quad (7)$$

где  $X_i^{(0)}$  - основной уровень натурального фактора  $X_i$ ;  $X_{i\max}$  - максимальное значение фактора  $X_i$ .

Выделим три варьируемых переменных:

$x_1$ - рН;

$x_2$ - температура, °С;

$x_3$  – концентрация ПАВ в растворе, %.

Определим истинные значения параметров для кодируемых переменных. В качестве нулевого уровня выбраны:

$x_0^{(1)} = 7$ ;

$x_0^{(2)} = 50$  °С – температура раствора;

$x_0^{(3)} = 0,613$  - количество ПАВ, в растворе, мл;

$\Delta x_1 = 2,95$ ,  $\Delta x_2 = 18$  °С,  $\Delta x_3 = 0,331$  - шаги для рН, температуры и количества ПАВ в растворе.

Далее по формуле (7) рассчитываем истинные значения параметров на трех уровнях, результаты расчетов представлены в таблице 4.

Таблица 4 . Переменные факторы и уровни их варьирования

Факторы	Кодовое обозначение	Звездные точки	Нижний уровень	Основной уровень	Верхний уровень	Звездные точки
рН	$x_1$	2,038	4,05	7	9,95	11,962
Температура, °С	$x_2$	19,724	32	50	68	80,276
Концентрация ПАВ, %	$x_3$	0,0039	0.018	30	0,058	0,071

Продолжение таблицы 4.

После получения значений уровней варьирования, был составлен план проведения трехфакторного эксперимента (таблица 5)

Таблица 5. План эксперимента в действительных значениях переменных

	Номер опыта	Матрица плана			Активность
		X1	X2	X3	
Ядро плана	1	4	32	0,28	
	2	10	32	0,28	
	3	4	68	0,28	
	4	10	68	0,28	
	5	4	32	0,94	
	6	10	32	0,94	
	7	4	68	0,94	
	8	10	68	0,94	
Звездные точки	9	2	50	0,61	
	10	12	50	0,61	
	11	7	20	0,61	
	12	7	80	0,61	
	13	7	50	0,06	
	14	7	50	1,2	
Центр плана	15	7	50	0,61	
	Продолжение таблицы 5.				
	17	7	50	0,61	
	18	7	50	0,61	
	19	7	50	0,61	

## 2.6. Обработка результатов экспериментальных данных. Расчет коэффициентов регрессионного уравнения

Для эксперимента с тремя факторами и с учетом всех взаимодействий математическая модель имеет вид:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2, \quad (8)$$

где,

$b_0$  - свободный член;

$b_1, b_2, b_3$  - линейные коэффициенты регрессии;

$b_{11}, b_{22}, b_{33}$  - квадратичные члены регрессии;

$b_{12}, b_{13}, b_{23}$  - коэффициенты при парных взаимодействиях;

$Y$  - значение выходного параметра.

Коэффициенты уравнения регрессии (8) рассчитываются по формулам (9)-(12);

$$b_0 = a_1 \sum_{u=1}^N \bar{y}_u - a_2 \sum_{i=1}^k \sum_{u=1}^N x_{iu}^2 \bar{y}_u; \quad (9)$$

$$b_i = a_3 \sum_{u=1}^N x_{iu} \bar{y}_u; \quad (10)$$

$$b_{ij} = a_4 \sum_{u=1}^N x_{iu} x_{ju} \bar{y}_u; \quad (11)$$

$$b_{ii} = a_5 \sum_{u=1}^N x_{iu}^2 \bar{y}_u + a_6 \sum_{i=1}^k x_{iu}^2 \bar{y}_u - a_7 \sum_{u=1}^N \bar{y}_u. \quad (12)$$

где, значения коэффициентов  $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6, a_7$  для числа факторов  $2 \leq n \leq 7$  приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Значения коэффициентов ( $a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6, a_7$ ) в формулах (9)-(12) [28]

Число факторов	Общее число опытов	$b_0$		$b_i$	$b_{ij}$	$b_{ii}$		
		$a_1$	$a_2$	$a_3$	$A_4$	$a_5$	$a_6$	$a_7$
2	13	0,2000	0,1000	0,1250	0,2500	0,1251	0,0187	0,1000
3	20	0,1663	0,0568	0,0732	0,1250	0,6250	0,0069	0,0568
4	31	0,1428	0,0357	0,0414	0,0625	0,0312	0,0037	0,0357
5	52	0,0988	0,0191	0,0231	0,0312	0,0156	0,0015	0,0191
5 <sup>x</sup>	32	0,1591	0,0341	0,0417	0,0625	0,0312	0,0028	0,0341
6	91	0,6250	0,0098	0,0125	0,0156	0,0078	0,0005	0,0098
6 <sup>x</sup>	53	0,1108	0,0187	0,0231	0,0312	0,0156	0,0012	0,0187
7	163	0,0398	0,0052	0,0066	0,0078	0,0039	0,0002	0,0052
7 <sup>x</sup>	92	0,0703	0,0098	0,0125	0,0156	0,0078	0,0005	0,0098

<sup>x</sup> – полуреплика ПФЭ

Адекватность полученной математической модели оценивается критерием Фишера по формуле (13):

$$F_p = \frac{S_{ad}^2}{S_y^2} \quad (13)$$

Далее проводят проверку значимости коэффициентов регрессии.

В соответствии с методикой оценки значимости коэффициентов регрессии определяют табличное значение t-критерия Стьюдента для числа степеней свободы :

$$F_y = N(n-1). \quad (14)$$

По значению, полученному по уравнению (14) из таблицы определяют t-критерий Стьюдента [42].

Дисперсия коэффициента регрессии для рассматриваемого планирования

$$S^2 \{b_0\} = a_1 S^2 \{y\};$$

$$S^2 \{b_i\} = a_3 S^2 \{y\}; \quad (15)$$

$$S^2 \{b_{ij}\} = a_4 S^2 \{y\}; \quad (16)$$

$$S^2 \{b_{ii}\} = a_5 S^2 \{y\}.$$

определяется по формулам (15)-(18):

где,  $S_y$ -дисперсия эксперимента, вычисляемая по формуле (19):

$$s_y^2 = \frac{\sum_{u=1}^{n_0} (y_u - \bar{y})^2}{n_0 - 1} \quad (17)$$

$$s_y^2 = \frac{\sum_{u=1}^{n_0} (y_u - \bar{y})^2}{n_0 - 1} \quad (18)$$

## 2.7. Определение средних размеров частиц дисперсной фазы методом динамического светорассеяния

Для измерения параметров диспергированных в жидкости наноразмерных частиц в данной работе используется анализатор размеров частиц Photocor Complex. Прибор (рис.7) собран по традиционной схеме спектрометра динамического рассеяния света, предназначенного для многоугловых измерений динамического и статического рассеяния света и измерения размеров наночастиц.

На жестком основании смонтированы прецизионный гониометр и оптическая скамья, на которой размещены диодный лазер PhotocorDL (длина волны 658.6 нм) и фокусирующий узел. Термостат и адаптер кювет установлены на гониометре коаксиально с его осью. На поворотной консоли гониометра располагается фотоприемный блок, в состав которого входит приемная оптическая система со сменной диафрагмой выбора апертуры, малошумящий фотоумножитель, работающий в режиме счета фотонов, быстрый усилитель-дискриминатор со сквозным по постоянному току трактом

и специальный высоковольтный источник питания ФЭУ без паразитных корреляций. Сигнал с выхода фотоприемного блока анализируется многоканальным коррелятором, который подключается непосредственно к персональному компьютеру. С помощью компьютера осуществляется управление процессом измерения и обработка результатов измерения.

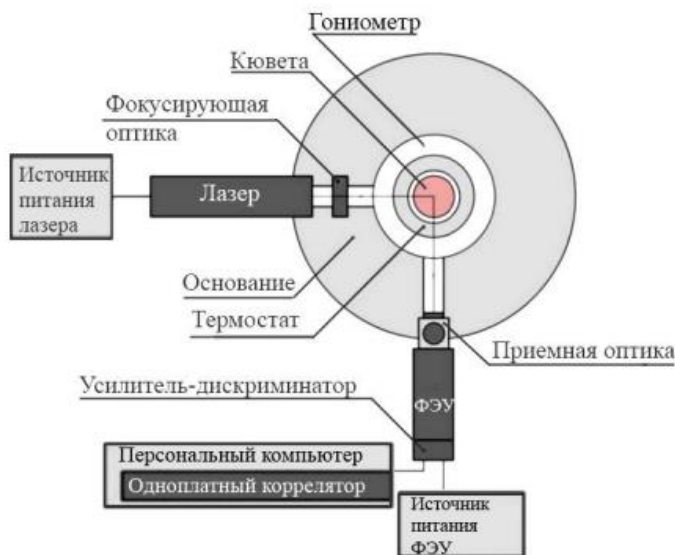


Рис.7. Схема прибора Photocor Complex

Кювета с исследуемым раствором помещается в кюветное отделение анализатора. Свет от лазера при прохождении через раствор, рассеивается на полимерных молекулах или дисперсных частицах, имеющих в растворе. Рассеянный свет принимается системой счета фотонов, сигнал с выхода которой подается на вход коррелятора. Коррелятор накапливает корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света. По завершении выбранного времени измерения корреляционная функция передается в компьютер в виде функции, связанной с АКФ линейной зависимостью. Уровень базовой линии такой зависимости является нулевой линией, а закон спада и время спада совпадают с таковыми для исходной АКФ. Далее указанную зависимость также будем называть АКФ, учитывая приведенное уточнение. Компьютер (программа обработки DynaLS)



рассчитывает размер частиц, обрабатывая измеренную корреляционную функцию [42].

Чувствительность метода 1 нм.

## **2.8.Методика определения солюбилизирующей способности**

Солюбилизирующую способность проводили на основе методике, описанной в [43].

Проведение эксперимента: в ряд конических колб помещают 50 мл раствора, добавляли избыток (0,1 г) растертой и фракционированной живичной канифоли (размер частиц не более 0,26 мм), закрывают притертой пробкой и перемешивают на магнитной мешалке 60 мин. Затем растворы центрифугируют 30 мин. при скорости 5000 об/мин, в процессе чего происходит отделение грубодисперсной фазы, и осторожно декантируют супернатант.

После установления равновесия, которое в зависимости от концентрации составляет 5-48 часов, в каждую колбу приливают по 5 мл 1 н. раствора LiOH и после окончательного развития окраски (60 мин.) измеряют оптическую плотность на СФ-2000 при  $\lambda=297,9$  нм и длине оптического пути 1 см относительно холостой пробы.

Далее, по построенным калибровочным кривым находят содержание солюбилизированной канифоли. Погрешность спектрофотометрического измерения составляет 3%.

### 3. Результаты эксперимента и их обсуждение

#### 3.1. Результаты планирования эксперимента

Данные, полученные в результате планирования эксперимента, приведены в таблице 7.

Таблица 7. Результаты серий опытов

	Номер опыта	Матрица плана			Активность $A/A_0$
		X1(pH)	X2(T),C	X3(Vпав)	
Ядро плана	1	4,05	32	36	0,889
	2	9,95	32	36	0
	3	4,05	68	36	0
	4	9,95	68	36	0
	5	4,05	32	65	0,644
	6	9,95	32	65	0,972
	7	4,05	68	65	0
	8	9,95	68	65	0
Звездные точки	9	2,038	50	55	0,076
	10	11,962	50	55	0
	11	7	20	55	0,097

	12	7	80	55	0,006
	13	7	50	10	0,076
	14	7	50	70	0,095
Продолжение таблицы 7. Центр плана	15	7	50	55	0,63
	16	7	50	55	0,63
	17	7	50	55	0,63
	18	7	50	55	0,63
	19	7	50	55	0,63
	20	7	50	55	0,63

Обработку данных полученных в результате экспериментальных исследований производили на ЭВМ методами математической статистики в программе Microsoft Excel.

Результаты расчета по формулам (9)-(12) приведены в таблице 8.

Таблица 8. Результаты расчета коэффициентов регрессии

	Коэффициенты регрессии
<b>b0</b>	0,62
<b>b1</b>	-0,05
<b>b2</b>	-0,19
<b>b3</b>	0,06
<b>b11</b>	-0,15

<b>b22</b>	-0,14
<b>b33</b>	-0,13
<b>b12</b>	0,07
<b>b13</b>	0,15
<b>b23</b>	-0,09

Проверку значимости коэффициентов регрессии производили с использованием t-распределения Стьюдента. Критерий Кохрена, использовался для проверки однородности дисперсий опытов. Адекватность модели определяли с помощью критерия Фишера [28].

Расчеты, проведенные на ЭВМ, показали что, значимые коэффициенты появляются лишь при вероятности равной P=80 %. Таким образом, значимыми коэффициентами уравнения регрессии являются: b0, b2, b11, b22, b33, b13, b23.

В итоге уравнение регрессии в общем виде имеет вид:

$$Y=b_0+b_2*x_2+b_{11}*x_1*x_1+b_{22}*x_2*x_2+b_{33}*x_3*x_3+b_{13}*x_1*x_3+b_{23}*x_2*x_3.$$

Уравнение регрессии в натуральных величинах имеет вид:

$$Y=0,62-0,19*x_2-0,15*x_1*x_1-0,14*x_2*x_2-0,13*x_3*x_3+0,15*x_1*x_3-0,09*x_2*x_3$$

На основании полученной зависимости были построены графики поверхностей (8-10). Как видно из рис. 8 и рис. 9 максимальное значение каталитической активности липазы наблюдается при рН среды равно 7 (рН=7). На рис. 8 и рис. 10 видно, что оптимальная температура проведения процесса лежит в пределах 30-35 °С. Добавка Синтанола ДС-10 к липазе должна быть 60-70, как видно из рис. 9 и рис. 10.

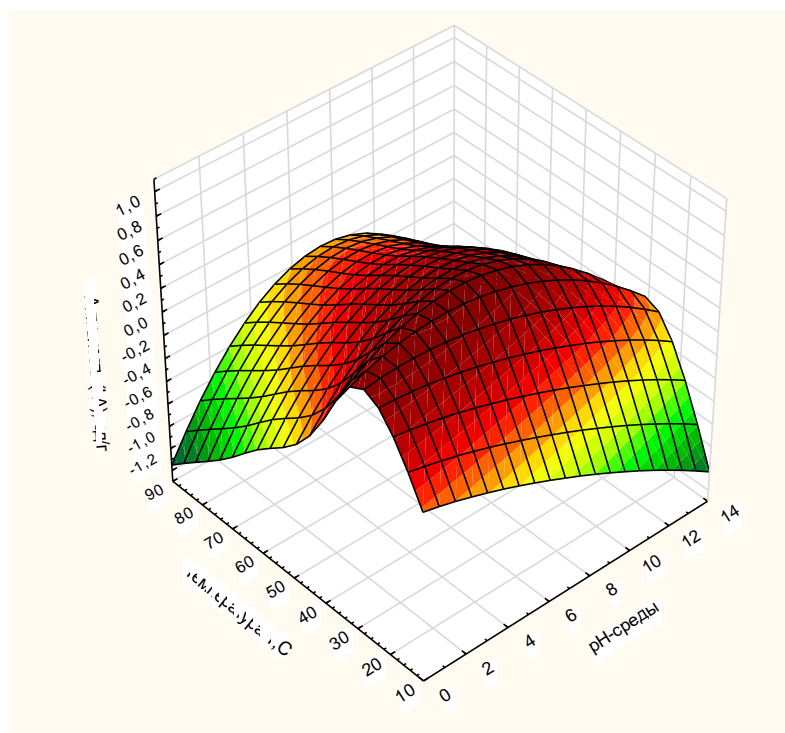


Рис. 8. Зависимость каталитической активности липазы от температуры процесса и рН среды.

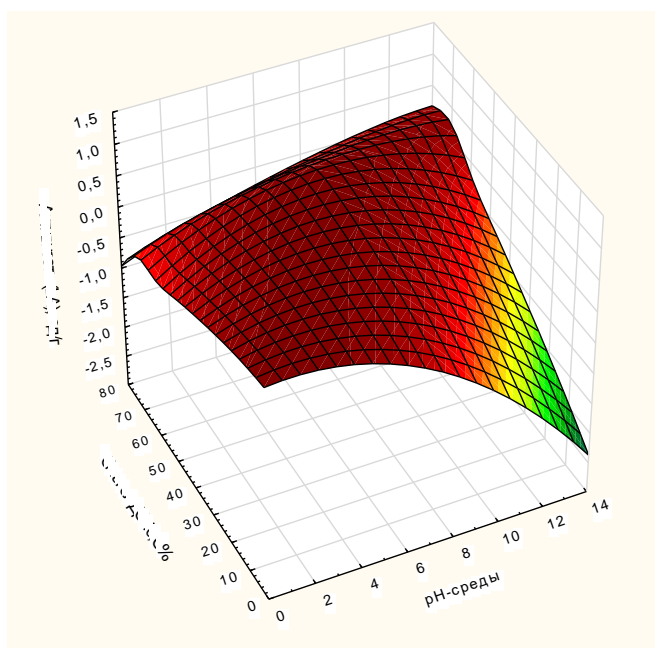


Рис. 9. Зависимость каталитической активности липазы от добавки Синтанола ДС-10 в раствор и рН среды.

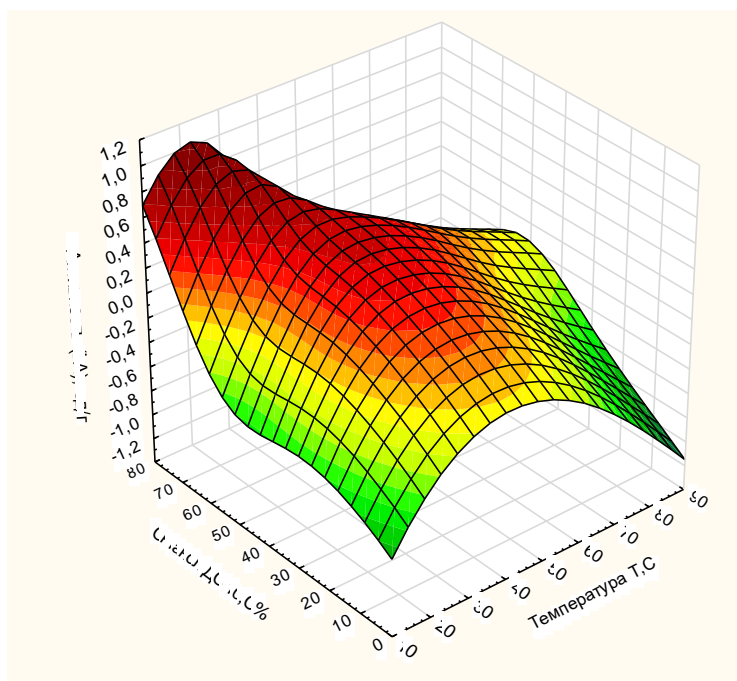


Рис. 10. Зависимость каталитической активности липазы от температуры процесса и добавки Синтанола ДС-10 в раствор.

Вследствие недостаточной точности полученной зависимости ( $P=80\%$ ), не рекомендуется ее применение для оценки воздействия ПАВ на активность липазы

### 3.2. Кинетические зависимости каталитической активности липазы

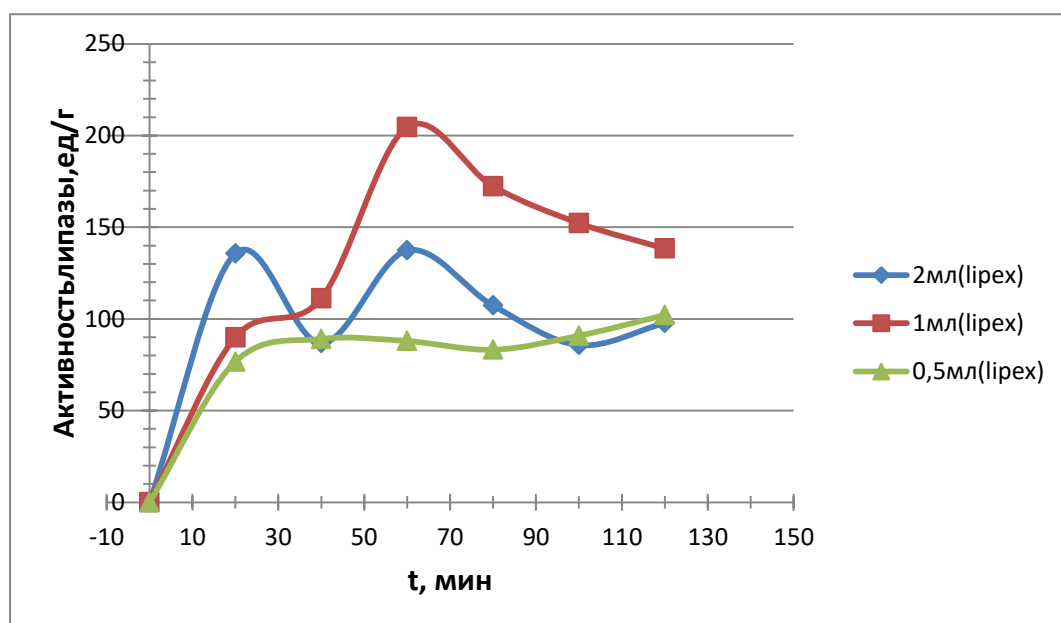


Рис. 11. Зависимость каталитической активности липазы от времени проведения реакции и различной концентрации фермента. При рН=7 и Т=32 °С.

Вероятно, наблюдаемые скачки связаны с недостаточным содержанием липазы в системе ПАВ/фермент.

### 3.3. Влияние добавки Синтамида-5 и ДДСН на каталитическую активность фермента

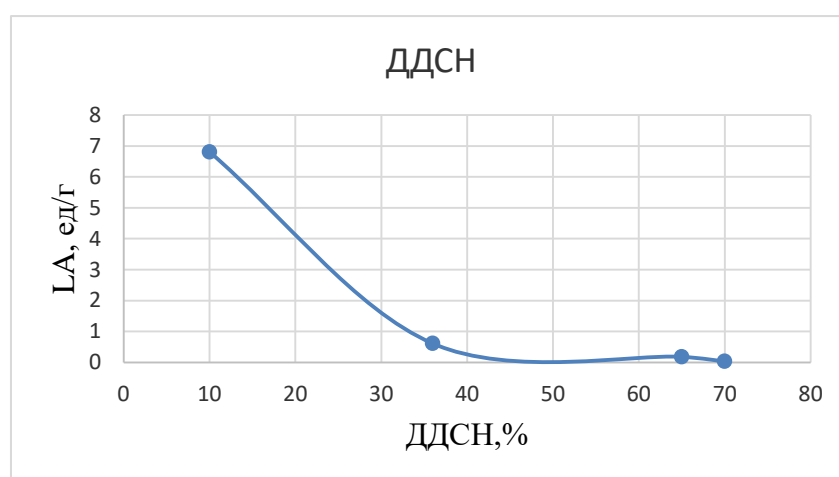


Рис. 12. Зависимость каталитической активности липазы от содержания ДДСН в растворе, при рН=7 и Т=32 С.

Как видно из рисунка в присутствии анионногенного ПАВ происходит резкое падение каталитической активности липазы. При достижении содержания 35% ДДСН активность энзима практически не меняется и равна нулю. Вероятно, такое поведение системы ПАВ/фермент связано с тем, что возможно это связано с действием на третичную структуру белка и как следствие на сам активный центр.

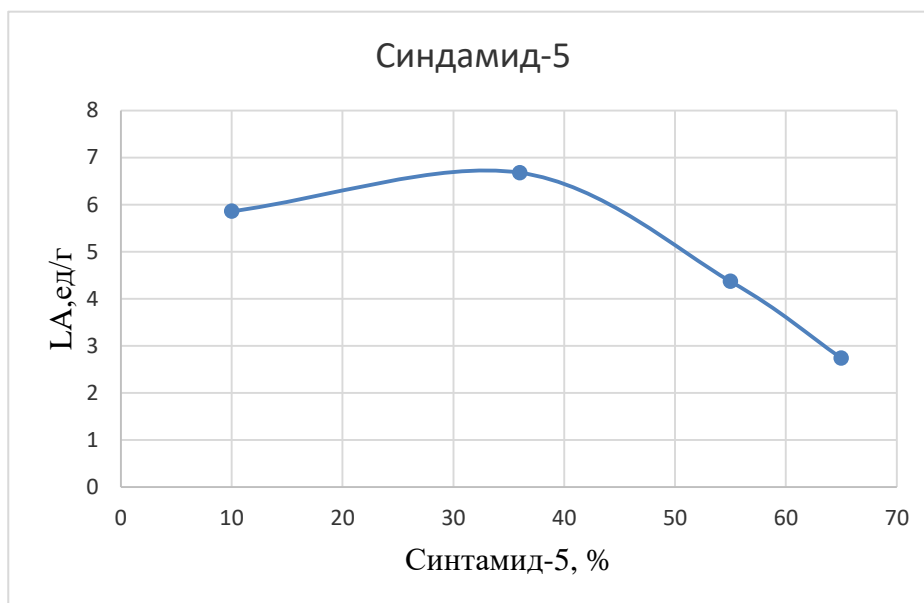


Рис. 13. Зависимость каталитической активности липазы от содержания Синтамида-5 в растворе, при pH=7 и T=32 С.

Добавка Синтамида-5 к раствору липазы до 35% приводит к незначительному повышению активности фермента, после достижения данной отметки ферментативная активность довольно резко снижается. Наблюдаемое воздействие неионогенного ПАВ синтамида-5 на липазу, возможно связано с общностью природы ПАВ и фермента.

### 3.4. Результаты динамического светорассеяния

Как видно из рис, что при добавки Синтамида-5 к раствору липазы до 5% наблюдается бимодальное распределение частиц с гидродинамическими радиусами в 110 и 18 нм. Дальнейшая добавка ПАВ (до 10%) приводит к исчезновению медленной моды и остаются только частицы размером 80 нм.



При соотношении ПАВ-фермент (70/30) снова наблюдается мономодальное распределение и исчезает быстрая мода и размер образовавшейся частицы равен 203 нм.

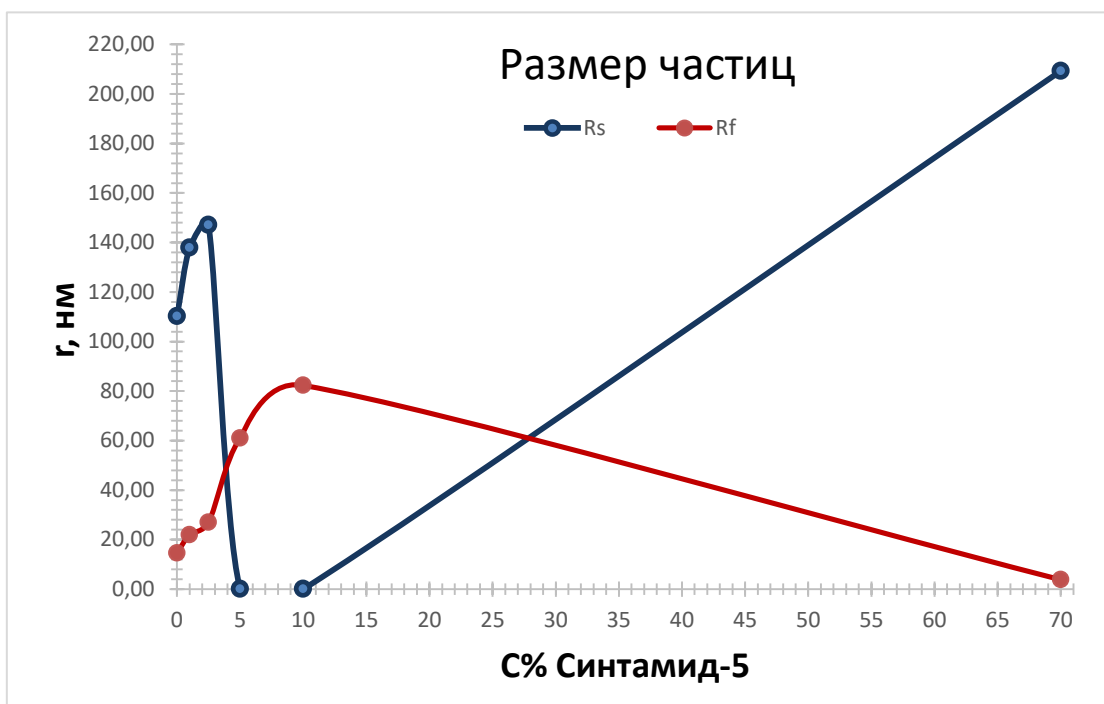


Рис. 14. Зависимость размера частиц в смеси Синтаמיד-5/липаза.

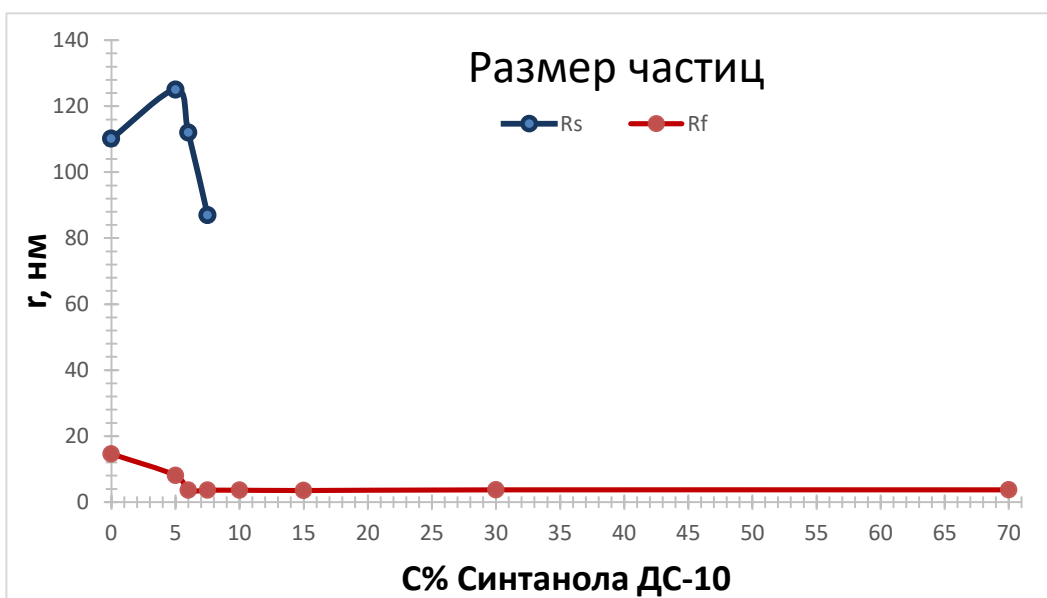


Рис. 15. Зависимость размера частиц в смеси Синтанола ДС-10/липаза.

В случае неионогенного Синтанола ДС-10 в растворе липазы, до содержания ПАВ в растворе 10%, наблюдается бимодальное распределение с

размером частиц 18 и 100 нм. Дальнейшее увеличение содержания ПАВ в системе, приводит к исчезновению частиц с размерами 100 нм и в растворе остаются лишь частицы с радиусом 6 нм.

Результаты динамического светорассеяния согласуются с данными по каталитической активности системы Синтанол ДС-10/липаза и подтверждают, что добавка неионогенного ПАВ в раствор липазы в количестве большем 10% приводит к значительному падению каталитической активности энзима.

### 3.5. Солюбилизация канифоли

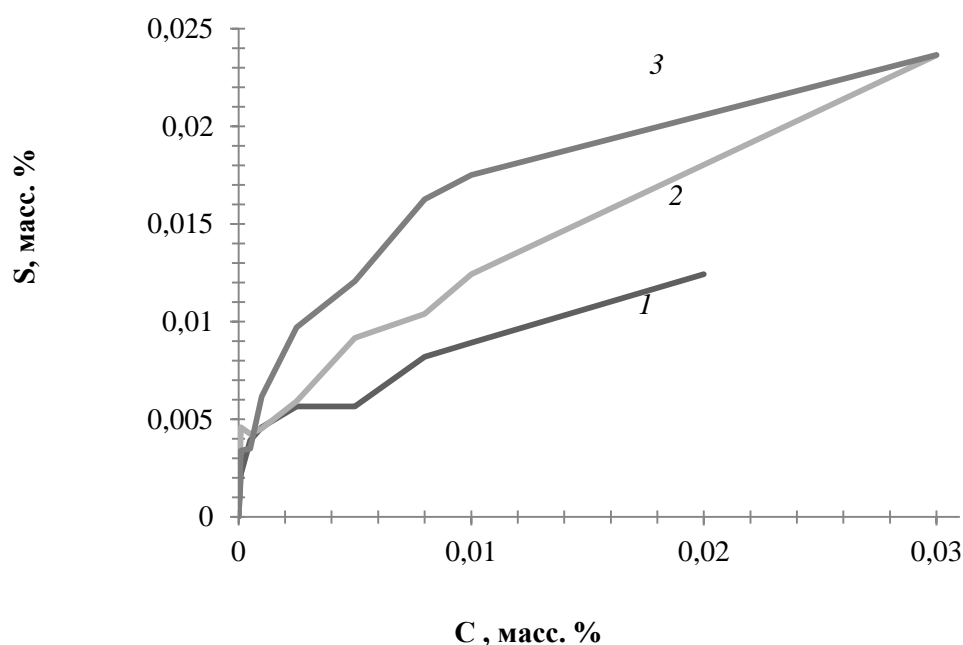


Рис. 16. Зависимость равновесного количества солюбилизированной канифоли S от концентрации растворов C. 1 – синтаמיד-5; 2 – смесь синтанол ДС-10/синтаמיד-5 (70:30); 3 – синтанол ДС-10.

Оценку солюбилизирующего действия амфифильных соединений, липазы и их смесей производили на канифоли, в качестве выбранной модели

смолистых веществ. Зависимость солюбилизирующей способности от концентрации веществ приведена на рис. 16.

Как видно из рис. 16 с ростом концентрации ПАВ наблюдается увеличение солюбилизирующей способности вследствие качественного изменения коллоидной структуры раствора (перестройка мицелл, мицеллярная масса, числа агрегации).

Таким образом, в мицеллярных растворах происходит солюбилизация канифоли вследствие образования смешанных агрегатов. Наиболее высокой солюбилизирующей способностью обладает смесь НПАВ Синтанола ДС-10 с липазой, из-за большой эффективной ёмкости ассоциатов.

В итоге, данные полученные на основании планировании эксперимента, динамического светорассеяния и в результате исследования влияния смесей ПАВ/фермент при солюбилизации канифоли подтверждают, что наилучшим составом композиции Синтанол ДС-10/липаза для обессоливания целлюлозных масс является смесь в соотношениях ПАВ/фермент (70/30). Результаты солюбилизации канифоли смесью Синтаמיד-5/липаз (70/30) немного хуже, чем при солюбилизации композиции Синтами-ДС-10/липаза (70/30), возможно это связано с различии в механизме солюбилизации.

Макромолекула Lipex100L имеет молекулярную массу 30000. Взаимодействие Синтанола ДС-10 и макромолекулы белка происходит по микроэмульсионному механизму. В данном случае, более мелкие мицеллы

НПАВ, с размером 3 нм, находятся в большом количестве в растворе и обладают развитой поверхностью. Возможно, такие мицеллы изменяют структуру белка, можно предположить, что они взаимодействуют с макромолекулой белка по модели «ожерелье», и снижают доступность субстрата к активному центру.

Механизм взаимодействия Синтамида-5 и липазы, вероятно, происходит по диффузионному механизму, где возможно одиночная макромолекула белка, размером 16 нм, встраивается в мицеллу и образует агрегат размером 210 нм.

Различие в механизме взаимодействия ПАВ с ферментом может влиять на динамику каталитической активности в зависимости от добавки амфифильных соединений в раствор. В одном случае добавка НПАВ Синтанола ДС-10 способствует росту ферментативной активности, в другом же случае наблюдается обратная динамика и дальнейшее добавление НПАВ Синтамида-5 (до 70%) приводит к снижению каталитической активности липазы.

## **Выводы**

1. Установлена математическая зависимость каталитической активности липазы от трех факторов: температуры, рН среды и добавки НПАВ (Синтанола ДС-10), определены оптимальные условия проведения процесса ( $T=30-35$ ,  $pH=7$  и состав композиции НПАВ/фермент (70/30);
2. Показана зависимость каталитической активности липазы от концентрации его в растворе;
3. Установлено, что добавка ДДСН больше 10%, приводит к снижению активности липазы. Максимальная активность липазы наблюдается при содержании Синтамида-5 в смеси 35%;
4. Установлено влияние природы поверхностно-активных веществ на дисперсный состав фермента;
5. Обнаружено, что наилучшей солюбилизующей способностью обладает смесь Синтанол ДС-10/липаза (70/30).

## **Библиографический список**

1. Тумбин, П.А. Современные методы обессмоливания сульфитной целлюлозы [Текст] / П.А. Тумбин. - М.: Лесная промышленность, 1966. - 333 с.

2. Степанов, Ю.И. Экстрактивные вещества сульфатной целлюлозы [Текст] / Ю.И. Степанов. - М.: ВНИПИЭИ, 1972. - 27 с.
3. Никитин В. М. Химия древесины и целлюлозы [Текст] / В. М. Никитин, А. В. Оболенская, В. П. Щеголев.— Л.:Лесная промышленность, 1978.— 368 с.
4. Азаров В .И. Химия древесины и синтетических полимеров /В. И. Азаров, А. В. Буров, А. В. Оболенская.- СПб: Лань, 2010.— 624 с.
5. Цыперович А. С. Ферменты (основы химии и технологии) [Текст] / А. С. Цыперович.- Киев: Техніка, 1971.- 360 с.
6. Ленинджер А. Основы биохимии [Текст] / А. Ленинджер.- под ред. В. А. Энгельгардата, Я. М. Варшанского.- пер. с англ. В. В. Борисова, М. Д. Гроздовой.- Т. 1.-М.: Мир, 1985.- 367 с.
7. Диксон М. Ферменты [Текст] / М. Диксон, Э. Уэбб: пер. с англ. Л. М. Гиндоман, М. Ию Левянт.- под ред. В. К. Антонова, А. Е. Браунштейн.- Т. 1.- М.:Мир, 1982.- 515 с.
8. Демьянцева Е. Ю. Ферментативный катализ в ЦБП: уч. метод. указ-ие [Текст] / Е. Ю. Демьянцева, Копнина Р.А.-СПб.:СПбГТУРП, 2014.- 47 с.
9. Диксон М. Ферменты [Текст] / М. Диксон, Э. Уэбб: пер. с англ. Л. М. Гиндоман, М. Ию Левянт.- под ред. В. К. Антонова, А. Е. Браунштейн.- Т. 2.- М.:Мир, 1982.- 515 с.
10. Емельянова М.В. Ферментативное обессмоливание целлюлозы и механической массы: автореф. дисс. ... кандидата технических наук: 05.21.03 / М.В. Емельянова; Архангельск, 2007. – 19 с.;
11. Богданова Л.Р. Механизмы регуляции активности липаз в микрогетерогенных системах на основе амфифильных соединений: автореф.

дисс. ... кандидата технических наук: 03.01.02 / Л.Р. Богданова. Казань, 2012.- 22 с.;

12. Петрунина Л.С. Разработка физико-химических основ и технологии удаления жировых загрязнений с текстильных материалов: автореф. дисс. ... кандидата технических наук: 05.19.02 / Л.С. Петрунина; Москва, 2009 – 16 с.;

13. Turro N.J., Lei X-G., Ananthapadmanabhan K.R., Aronson M. Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: the BSA/SDS system // *Langmuir*. 1995.- V.11.- N.7.- P.2525-2533.

14. Lundahl P., Greijer E., Sandberg M., Cardell S., Eriksson K.O. A model for ionic and hydrophobic interactions and hydrogen-bonding in sodium dodecyl sulfate-protein complexes // *Biochimica et Biophysica Acta*. -1986. -V.873.- N.1.- P.20-26.

15. Pradines V., Fainerman V.B., Aksenenko E.V., Kragel J., Wustneck W., Miller R. Adsorption of protein-surfactant complexes at the water/oil interface // *Langmuir*. 2011.- V.27. -N.3. -P.965-971.

16. Kotsmar Cs., Pradines V., Alahverdjieva V.S., Aksenenko E. V., Fainerman V. B., Kovalchuk V.I., Kragel J., Leser M., Noskov B.A., Miller R. Thermodynamics, adsorption kinetics and rheology of mixed protein-surfactant interfacial layers // *Advances in Colloid and Interface Science*.- 2009. -V.150.- N.1. -P.41-54.

17. Луценко Н. Г. Лабораторные работы по энзимологии [Текст] / Н. Г. Луценко.- М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2006.- 64 с.

18. Grochulski P. Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. / P Grochulski; Y Li; J D Schrag; F Bouthillier; P Smith; D Harrison; B Rubin; M Cygler // *The Journal of biological chemistry*.-1993. -V.268.- P. 65-70.

19. Садовая Т. Н. Научное обоснование и разработка технологий производства сыров с плесневыми грибами *PENCELLIUM*: автореф. дисс. ... доктор технических наук: 05.18.04 / Т. Н. Садова; Кемерово, 2011. – 41 с.
20. Майдина А. Б. Особенности выбора температуры для проведения реакции каталитического гидролиза масла сафлора под действием липаз из *Candida rugosa* / А. Б. Майдина, А.В. Белова, Н.Л. Левашов, Н.Л. Клячко // Вестн. Моск. Ун-та, 2008.- Т. 49.- № 2 - 134-137 с.
21. Корнеева О.С. Получение ферментного препарата липазы методом рекомбинантных ДНК / О.С. Корнеева, В.А. Анненков // Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК - продукты здорового питания.- Воронеж, 2014.- N 3.- 59-62 с.
22. Гамаюрова В. С. АКТИВАЦИЯ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НЕОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ / В. С. Гамаюрова, М. Е. Зиновьева, К. Л. Васина // Вестник Казанского технологического университета, 2009.- № 6. - 121-129 с.
23. Федорова К. В. Оптические свойства макромолекул белков и ферментов в водных растворах, содержащих металлические ионы: автореф. дисс. ... кандидата технических наук: 01.04.05 / К. В. Федорова; Москва, 2016. – 146 с.
24. Hegg P.O. Precipitation of egg white proteins below their isoelectric points by sodium dodecyl sulphate and temperature // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1979. - V.579. -N.1. -P.73-87.
25. Akbas F., Arman K., Sinirlioglu Z. A., Sinirlioglu. MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF NOVEL THERMOSTABLE LIPASE FROM *SHEWANELLA PUTREFACIENS* AND USING ENZYMATIC BIODIESEL PRODUCTION // *J Microbiol Biotech Food Sci*. 2015. -V. 4- N. 4.- P.297-300.



26. Helisto P., Korpela T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method // *Enzyme Microb. Technol.* 1998.- V.23. -P.113-117.
27. Salameh M. A., Wiegel J. Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*// *The Open Biochemistry Journal*, 2010.- V.4. -P.22-28.
28. Шестаков В.Н. Планирование эксперимента в оптимизационных задачах техноческой мелиорации грунтов: уч. Пособие. [Текст] / В.Н. Шестаков .- Омск: Изд-во СибАДИ, 2007.- 95 с.
29. Спиридонов А.А. Планирование эксперимента при исследовании технологических процессов [Текст] / А.А. Спиридонов.- М.: Машиностроение, 1981.- 184 с.
30. Хикс Ч. Основные принципы планирования эксперимента [Текст] / Ч. Хикс; под ред. В.В. Налимова.- М.: Изд-во МИР, 1967.- 406 с.
31. Математическое моделирование металлургических процессов в АСУ ТП/Н.А. Спирин, В.В. Лавров, В.Ю. Рыболовлев, Л.Ю. Гилева, А.В. Краснобаев, В.С. Швыдкий, О.П. Онорин, К.А. Щипанов, А.А. Бурькин; под ред. Н.А. Спирина. – Екатеринбург: ООО «УИПЦ», 2014. – 558 с.
32. Теория экспериментов. Налимов В.В. Физико-математическая библиотека инженера. М.: Изд-во Наука, 1971.- 208 с.
33. Блинова Е.И. Планирование и организация эксперимента: учеб-метод пособие для студентов/ Е.И. Блинова.-Минск: БГТУ, 2010.- 130 с.
34. Методы планирования и обработки результатов инженерного эксперимента: конспект лекций/ Н.А. Спирин, В.В. Лавров. По ред. Н.А. Спирина. Екатеринбург.: ГОУ ВПО УГТУ-УПИ, 2004.- 257 с.
35. Паспорт безопасности химической продукции Lipex 100L.
36. Плетнев М. Ю. Поверхностно-активные вещества и композиции.-М.: Кламель , 2002. — 768 с.

37. Паспорт безопасности химической продукции. РПБ № 71150986-24-30994; 17.06.2013.
38. Паспорт безопасности химической продукции. РПБ № 78722668-20-47671; 10.08.2017.
39. Паспорт безопасности GOST 30333-2007.0183., 22.06.2018
40. Луценко Н.Г. (сост.) Лабораторные работы по энзимологии: уч. пособие. — М.:РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2006. — 64 с.
41. Полякова В.В. Основы теории статистики: уч. пособие / В.В. Полякова, Шаброва Н. В.- Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та.- 2-е изд., 2015.- 148 с.
42. Бочаров К. В. Методы статического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворах: уч.-метод. Пособ. / К. В. Бочаров, Н. И. Марукович, А. Ю. Куксин. – М.: МФТИ, 2016. – 40 с.
43. Смит Р. А.. Влияние липазы на мицеллообразующую и солубилизирующую способность неионогенных поверхностно-активных веществ / Р. А. Смит, Е. Ю. Демьянцева, О. С Андранович // Изв. Вузов. Химия и хим. Технология.- 2018.- Т.61.- Вып. 6.- 54-60 с.