

УДК 539.22[53.085+35.243]

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРОВ ЧАСТИЦ ДИСПЕРСНОЙ ФАЗЫ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ В НАТИВНЫХ МАСЛАХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

И.С. Михаловский¹, Н.П. Матвейко¹, Г.Б. Мельникова², Е.Н. Волнянко³,
В.Н. Бабодей⁴, А.В. Пчельникова⁴

¹Белорусский государственный экономический университет, Минск

²Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси, Минск

³Институт механики металлополимерных систем имени В.А. Белого НАН Беларуси, Гомель

⁴Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию, Минск

PARTICLES SIZES DETERMINATION OF THE NANOSTRUCTURED PHOSPHOLIPIDES DISPERSED PHASE IN PLANT ORIGIN NATIVE OILS

J.S. Mikhalovsky¹, M.P. Matveyko¹, G.B. Melnikova², E.N. Volnyanko³,
V.N. Babodey⁴, A.V. Pchelnicova⁴

¹Belarus State Economic University, Minsk

²A.V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of NAS of Belarus, Minsk

³V.A. Belyi Metal-Polymer Research Institute of NAS of Belarus, Gomel

⁴Scientific and Practical Centre for Foodstuffs of NAS of Belarus, Minsk

Предложен способ получения фосфолипидного концентрата из растительных масел и метод определения размерных характеристик дисперсной фазы из фосфолипидных структур. С использованием светорассеяния и атомно-силовой микроскопии установлено, что дисперсная фаза фосфолипидной суспензии образована структурами с линейными размерами частиц, не превышающими 100 нм. Метод получения фосфолипидов в виде наносуспензий может быть положен в основу новых технологий получения фосфолипидных концентратов как источников эмульгаторов для пищевой промышленности, технологических сред, а также переработки маслянистого сырья.

Ключевые слова: спектрофотометрия, атомно-силовая микроскопия, фосфолипиды, наноструктуры, технологические среды.

A method for obtaining phospholipid concentrate from vegetable oils and a method for determining the size characteristics of the dispersed phase from phospholipid structures are proposed. It was found with light scattering and atomic force microscopy that the dispersed phase of the phospholipid suspension was formed by structures with linear particle sizes not exceeding 100 nm. The method of obtaining phospholipids in the nanosuspension form can be the basis for new technologies of phospholipid concentrates as sources of emulsifiers for the food industry, technological substance, as well as processing of oilseeds.

Keywords: spectrophotometry, atomic force microscopy, phospholipids, nanostructures, technological substances.

Введение

В производстве новых материалов из биологического сырья первостепенное значение имеют подходы, основанные на использовании достижений био- и нанотехнологий [1]. Полная переработка растительных масел требует использования ряда технологических процессов [2]–[4], одним из которых является выделение из масел фосфолипидов (фосфатидов), с одной стороны, являющихся источником крайне востребованных пищевых лецитиновых эмульгаторов и кормовых концентратов, с другой стороны, перспективных в качестве основы при создании технологических сред [2]–[6]. Актуальность данной проблемы также связана с тем, что наличие фосфолипидов в нерафинированном масле приводит к образованию на маслодобывающих заводах значительного количества баковых отстоев (фузов), которые, практически, не имеют рентабельного

сбыта, а при длительном хранении становятся практически невостребованными. Рафинация масел на перерабатывающих предприятиях приводит к значительным потерям как фосфолипидов, так и глицеридов с гидратационным осадком. Вызывает интерес применение методов, позволяющих выделять фосфолипидную фракцию путем формирования турбулентности, вызванной интенсивным вращением ферромагнитных рабочих элементов в электромагнитном вихревом поле [7].

При рафинации растительных масел перспективными являются акустические методы. Установлено, что обработка подсолнечного масла ультразвуком после его гидратации ускоряет процессы седиментации, что способствует более полному удалению фосфолипидов [8]. Авторы работы [9] считают, что сочетание методов экстракции с использованием растворителя (гексан,

изопропиловый спирт) и ультразвуковой обработки увеличивает степень извлечения липидов из растительных низкомасличных сырьевых источников (плоды, злаковые культуры). Особенности рафинирования подсолнечного и соевого масел фосфорной кислотой совместно с ультразвуковым воздействием показано в работе [10].

Высокоэффективное отделение фосфолипидной компоненты из растительных масел должно основываться на теоретической базе молекулярной биофизики и коллоидной химии. Следует понимать, что водонерастворимые амфифильные молекулы фосфолипидов с водой в маслах способны лишь к образованию регулярных низкоразмерных структур в условиях воздействия внешних факторов. Так, например, согласно математической модели, созданной с помощью гибридных функциональных сетей Петри, возможно протекание процесса формирования везикулярных фосфолипидных наноструктур путем дискретно-импульсного введения энергии [11]. В узлах стоячих ультразвуковых волн молекулы фосфолипидов в зависимости от их концентрации могут формировать в присутствии воды мицеллы, бислойные и многослойные униламеллярные и мультиламеллярные глобулярные везикулы (липосомы), линейные размеры которых характеризуются десятками нанометров [12], [13]. На этом основании акустическая обработка масел в присутствии воды должна проводиться путем формирования поля с узлами стоячих ультразвуковых волн и образованием в них фосфолипидных высокодисперсных структур. В отличие от известных способов эмульгирования фосфолипидов путем гидратации, их ультразвуковое наносупензирование и последующее осаждение структур (везикул, их агрегатов) в градиенте центробежных сил позволит получить субстанцию с характеристиками, близкими к требуемым характеристикам готового фосфатидного концентрата [2]. Сочетание метода ультразвукового наноструктурирования фосфолипидов с промышленными технологиями центрифугирования и сепарирования позволит разработать технологию получения фосфатидной фракции в высококонцентрированной суспензионной форме.

Цель работы – получение наноструктурированных фосфолипидов в маслах с использованием внешнего воздействия (ультразвука) и определение размеров дисперсных структур.

В работе введены следующие обозначения:

- АСМ – атомно-силовая микроскопия;
- a , м – показатель, зависящий от интенсивности падающего света;
- D – оптическая плотность;
- T – светопропускание;
- R , % – светорассеяние;
- λ , нм – длина волны.

1 Материалы и методы исследования

В работе использовали нативные (нерафинированные [2]) рапсовое, соевое и подсолнечное масла.

Ультразвуковую обработку молекулярных композиций проводили с использованием установки «ИЛ100-6/1» (ООО «Ультразвуковая техника – ИНЛАБ», Россия). Частота ультразвуковых колебаний составляла 22 кГц. Мощность генератора 750 Вт. Использовали волновод с коэффициентом передачи энергии акустических колебаний равным единице.

Механическую гомогенизацию осуществляли с помощью магнитной мешалки с использованием магнитных роторов, покрытых политетрафторэтиленом (тефлоном).

Спектральные исследования проводили с помощью цифрового спектрофлуориметрического комплекса «СМ2203» («Солар», Республика Беларусь), работающего в режиме спектрофотометра. Использовали кварцевые кюветы с оптическим путем 1 см. Шаг изменения длины волны при записи спектра – 1 нм. Время накопления сигнала при сканировании спектра – 0,5 с. Оптическая щель – 2 нм.

Использовали центрифугу «Universal 320R» («Hettich», ФРГ) с бакет-ротором и объемом чашек на пробирки до 100 мл, регулируемой температурой от минус 20° С до комнатной 18–20° С.

Структуру дисперсной фазы функциональных эмульсий на кремниевых подложках изучали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на приборе «НТ-206» (ОДО «Микротестмашины», Республика Беларусь). Использовали стандартные кремниевые зонды («Mikromasch», Эстония) жесткостью 2,5 Н/м и радиусом кривизны не более 10 нм [14].

Обработку экспериментальных данных, математическую аппроксимацию спектров осуществляли с использованием программного пакета Origin for MS Windows.

2 Результаты и их обсуждение

Структурирование при условиях твердой аморфной компоненты растительного масла, представленной преимущественно амфифильными фосфолипидами, представляется возможным с использованием ультразвукового воздействия. Обработка нативного масла в присутствии воды приводит к формированию дисперсной фазы с визуально различимым желтым оттенком.

Возникают вопросы о размерных характеристиках фосфолипидных структур и последующей возможности их отделения от жидкой фракции масла, главным образом представленной глицеридами и свободными жирными кислотами. Для определения размеров дисперсной фазы применяли оригинальный методический подход, основанный на установлении характера кривой светорассеяния частиц непосредственно в

дисперсии. Так, в представлении Ангстрема [15] процесс светорассеяния дисперсными фазами при отсутствии поглощающих центров описывается уравнением (2.1), коррелирующим с зависимостью Рэлея [16]:

$$R = a / \lambda^p, \quad (2.1)$$

где R – рассеяние света с длиной волны λ ; a – показатель, зависящий от интенсивности падающего света (в спектрофотометре величина постоянная) и постоянный при неизменных:

- геометрии и условиях измерения,
- частичной концентрации (числа частиц в единице объема среды),
- объеме одной частицы,
- показателях преломления дисперсной фазы и дисперсной среды,
- расстоянии от рассеивающего объекта до точки наблюдения,
- угле рассеяния.

Установление показателя p позволяет определить порядок размеров структур дисперсной фазы липидного коллоида. Так, если спектр светорассеяния в видимой области аппроксимируется кривой по уравнению (2.1) с показателем $p = 4$ (справедлив закон Рэлея), то можно утверждать, что дисперсная фаза коллоида образована, главным образом, частицами, близкими к сферической форме, с размерами, не превышающими десятую долю длины волны рассеянного света.

Величина интенсивности светорассеяния R связана уравнением (2.2) со светопропусканием коллоида T , регистрируемым спектрофотометрическим способом:

$$R(\%) = 100(\%) - T(\%). \quad (2.2)$$

Для корректного использования данного методического подхода необходимо учитывать поглощение флуорофоров в исследуемых дисперсиях. На рисунке 2.1 представлены спектры поглощения нативного рапсового масла в кварцевой кювете, оптический путь которого 1 см (кривая 1). Наблюдается крайне интенсивное поглощение компонентов масла менее 580 нм. Кроме того, имеет место интенсивная полоса поглощения масла при 670 нм, характерная для поглощения хлорофилла [17], [18]. В этой связи применение метода анализа по светорассеянию частиц непосредственно в масле в сантиметровой кювете не представляется возможным вследствие значительного поглощения света. Регистрация спектра поглощения тонкого слоя масла (между двумя кварцевыми пластинами) существенно снижает интенсивность поглощения и позволяет определить полосы поглощения в широком 240–950 нм интервале длин волн (рисунок 2.1, кривая 2). Кроме длинноволновой полосы при 670 нм, видны полосы при 275 нм, 415 нм, 455 нм и 485 нм. Несмотря на значительное снижение интенсивности поглощения молекул масла в тонком слое, наличие поглощающих

флуорофоров не позволяет применить закон Рэлея для изучения процессов светорассеяния на дисперсных частицах непосредственно в тонком слое нативного растительного масла.

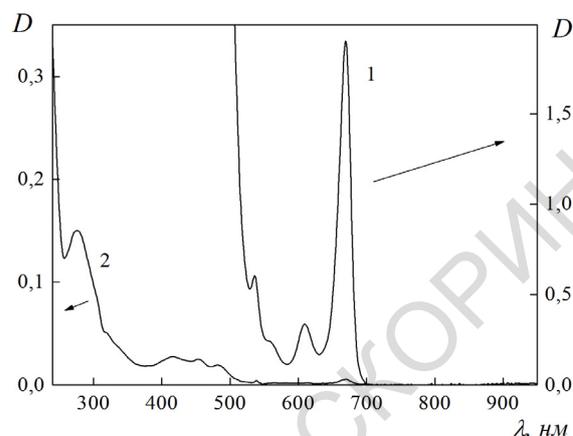


Рисунок 2.1 – Спектры поглощения рапсового масла в кварцевой кювете с оптическим путем 1 см (кривая 1) и тонкого слоя масла между кварцевыми пластинами (кривая 2) относительно воздуха

С целью оценки линейных размеров фосфолипидных структур по светорассеянию применяли методический подход, основанный на закономерностях протекания механизмов образования фосфолипидных липосом в полярных водных средах [12]. Фосфолипидные структуры, сформированные в ультразвуковом поле непосредственно в маслах, сохраняют свою геометрию и структуру в водной среде. Это позволяет применить метод светорассеяния при низкой концентрации фосфолипидных структур, при которой процессами поглощения света можно пренебречь. Для этого определенное количество структур вместе с масляной средой помещали в водную среду и гомогенизировали. Данную дисперсию центрифугировали при 3000 об/мин для флотации масляной глицеридной компоненты. Из середины супернатанта брали объем дисперсии фосфолипидных структур, достаточный для исследований (3 мл). На рисунке 2.2 представлена зависимость интенсивности рассеянного света на фосфолипидных структурах в водной среде от длины волны (кривая 1), рассчитанная на основании уравнения (2.2). Установлено, что экспериментальная кривая светорассеяния хорошо аппроксимируется зависимостью (2.1) с показателем p равным 4 в диапазоне длин волн 300–950 нм (кривая 2). При длинах волн менее 300 нм наблюдается отклонение кривой аппроксимации (рисунок 2.2), что, по-видимому, связано с процессами поглощения света дисперсными структурами. Полученные данные позволяют утверждать, что рассеивающие центры, сформированные в масле, главным образом, фосфолипидами в присутствии воды в узлах ультразвуковых стоячих

волн не превышают одну десятую длины волны видимого излучения. Можно считать, что линейные размеры исследованных структур укладываются в нанодиапазон согласно ГОСТ [19].

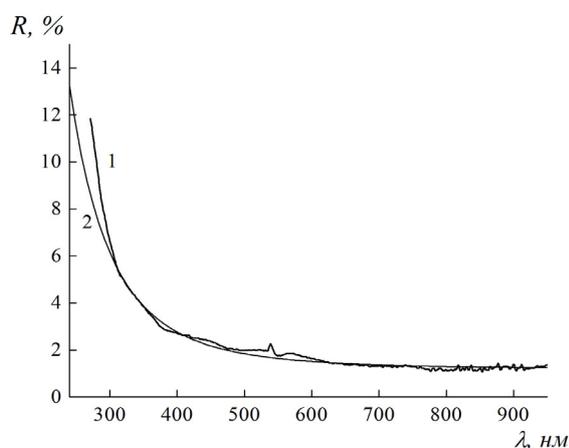


Рисунок 2.2 – Спектр светорассеяния фосфолипидных структур в водной среде (кривая 1) и его аппроксимация согласно уравнению (2.1) (кривая 2)

Исследованный образец дисперсии фосфолипидных структур использовали для определения структуры дисперсной фазы с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). На рисунке 2.3 представлены 3D (а) и 2D-изображения (б) структуры эмульсий на кремниевой подложке. Размер оценивали по 2D-изображению путем построения профиля по линии сканирования с использованием специализированного программного пакета *SurfaceExplorer*. Размер дисперсной структуры определяли, как перепад высоты (z) на профиле в нижней и верхней точке выделенной частицы.

Установлено, что частицы на гидрофилизированной кремниевой подложке образуют сегменты, близкие к сферическим. Среднее значение

линейного размера сегмента фосфолипидной структуры по высоте составляет от 30 нм до 50 нм. Среднее значение линейного размера ширины (диаметр основания сегмента) дисперсных структур составляет 80 нм. Аналогичным образом проведены измерения размера остальных дисперсных частиц.

Приведенные данные АСМ о сегментарном характере частиц на подложке позволяют предположить, что формирование системы в узлах ультразвуковых стоячих волн в маслах обеспечивает сборку фосфолипидов в структуры до 100 нм. Суспензионный характер дисперсий фосфолипидов позволяет подобрать условия для их осаждения в поле центробежных сил.

Заключение

В работе предложили новый метод отделения фосфолипидов от глицеридов растительных масел, основанный на процессе наноструктурирования фосфатидов в ультразвуковом поле с образованием высокодисперсной фазы суспензионного типа (наносуспензирование), в отличие от традиционных методических подходов, в результате которых образуется эмульсионная фракция неизвестной структуры.

Применяя спектрофотометрический метод и метод атомно-силовой микроскопии установили размеры дисперсной фазы из фосфолипидов в растительном масле – линейные размеры фосфолипидных структур не превышают 100 нм.

В общем плане разработанный метод получения фосфолипидных наносуспензий может быть положен в основу технологических приемов получения фосфатидов как ценного источника пищевых эмульгаторов, кормовых добавок, биологически безопасных технологических сред, а также современных промышленных технологий рафинирования растительных масел.

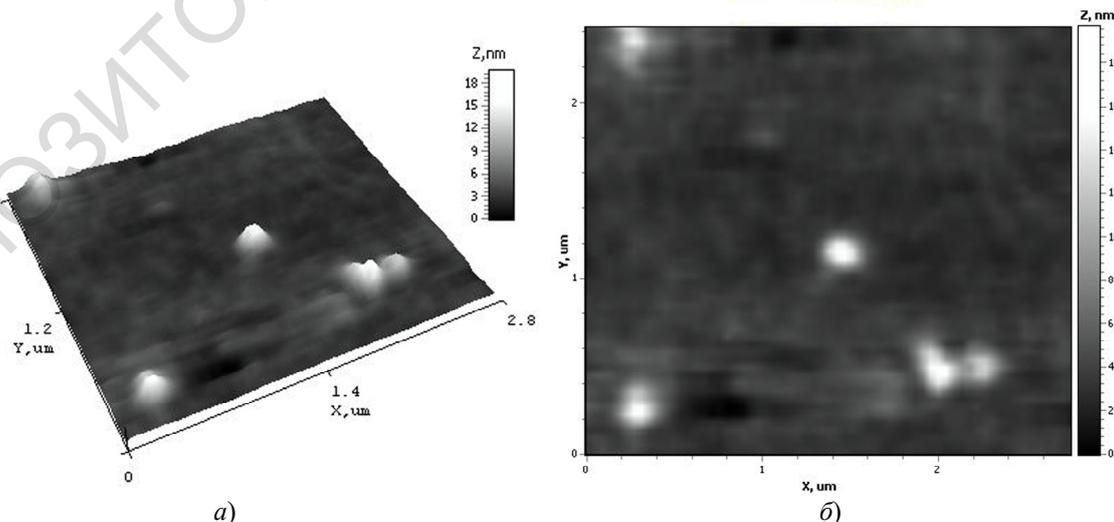


Рисунок 2.3 – АСМ-изображения дисперсной фазы фосфолипидных структур (поле сканирования $2,0 \times 2,0$ мкм): 3D-изображения (а) и 2D-изображения (б)

ЛИТЕРАТУРА

1. *Программа развития промышленного комплекса Республики Беларусь на период до 2020 года* [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://research.bsu.by/wp-content/uploads/2014/10/postanovlenie-sm-622-5.07.2012-red-30.06.2014.pdf>. – Дата доступа: 10.01.2010.
2. *ГОСТ 21314-75. Масла растительные. Производство. Термины и определения*. Введ. 1976-06-30. – М.: Стандартинформ, 2005. – 30 с.
3. *Технология переработки жиров* / под ред. Б.Н. Тютюнникова. – М.: Пищевая промышленность, 1970. – 652 с.
4. *Товбин, И.М. Рафинация жиров* / И.М. Товбин, Г.Г. Фаниев. – М.: Пищевая промышленность, 1977. – 240 с.
5. *Стрельцов, В.В. Тенденции использования биологических смазочных материалов* / В.В. Стрельцов, С.В. Стребков // Вестник ФГОУ ВПО МГАУ. – 2009. – № 2. – С. 66–69.
6. *Евдокимов, А.Ю. Жировое сырье в производстве смазочных материалов* / А.Ю. Евдокимов // Нефтепереработка. Нефтехимия. – 2011. – № 3. – С. 105–108.
7. *Очистка растительных масел с применением АВС: основные способы и методы* [Электронный ресурс] // GlobeCore GmbH. – 2018. – Режим доступа: <https://avs.globecore.ru/ochistka-rastitelnyh-masel-s-primeneniem-avs.html>. – Дата доступа: 10.01.2019.
8. *Алексеева, С.Л. Повышение эффективности выделения гидратированных фосфолипидов из подсолнечного масла с помощью ультразвукового воздействия* / С.Л. Алексеева, А.А. Бернацкий, В.Л. Миронов // Известия вузов. Пищевая технология. – 1996. – № 5–6. – С. 44–45.
9. *Ультразвуковой метод оценки эффективности извлечения липидов из низкомасличного сырья* / В.И. Мартовщук [и др.] // Новые технологии. – 2011. – № 2. – С. 43–45.
10. *Using of ultrasonic in degumming of soybean and sunflower seed oils: comparison with the conventional degumming* / Н. Mahmood-Fashandi, М. Ghavami, М. Ghara-chorloo, R. Abbasi, K.A. Mousavi // J. Food Processing and Preservation. – 2017. – Vol. 41, №. 1. – P. e12799.
11. *Авдеева, Л.Ю. Моделирование процесса формирования фосфолипидных везикулярных наноструктур* / Л.Ю. Авдеева, А.Ю. Чунихин [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.klgtu.ru/upload/science/magazine/news_kstu/2013_29/avdeeva-chunihin.pdf. – Дата доступа: 10.01.2019.
12. *Ивков, В.Г. Динамическая структура липидного бислоя* / В.Г. Ивков, Г.Н. Берестовский. – М.: Наука, 1981. – 293 с.
13. *Михаловский, И.С. Фосфолипидные наноструктурированные дисперсные системы как основа биоцидных препаратов* / И.С. Михаловский, В.А.Тарасевич, М.В. Самойлов // Наноструктуры в конденсированных средах: сб. науч. статей. – Минск: Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, 2013. – С. 317–322.
14. *Михаловский, И.С. Наноэмульсии на основе глицеридов мононенасыщенных жирных кислот для дисперсных функциональных материалов* / И.С. Михаловский, Г.Б. Мельникова, Е.Н. Волнянко // Полимерные материалы и технологии. – 2017. – № 4. – С. 75–79.
15. *Хюлст, Г. ван де. Рассеяние света малыми частицами* / Г. ван де Хюлст. – М.: Издательство иностранной литературы, 1961. – 536 с.
16. *Рэлей, Дж. Волновая теория света* / Дж. Рэлей, В. Стрэтт. – М.: Едиториал УРСС, 2004. – 208 с.
17. *Govindjee. Chlorophyll a fluorescence. A Bit of Basics and History* // Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis / eds. Papageorgiou G., Govindjee G. – Dordrecht: Springer, 2004. – P. 1–42.
18. *Состав и спектральные характеристики компонентов биотоплива, синтезированных из масел рапса, рыжика и крамбе* / С.В. Романцова [и др.] // Вестник Тамбовского университета. Серия Естественные и технические науки. – 2012. – Т. 17, № 1. – С. 339–341.
19. *ГОСТ ISO/TS 80004-2-2017. Нанотехнологии. Часть 2. Нанообъекты. Термины и определения*. – М.: Стандартинформ, 2018. – 10 с.

Поступила в редакцию 09.10.19.