

## بررسی تغییر ویژگی های کیفی مخلوط های روغن آفتابگردان و روغن پالم حاصل از واکنش استر کردن داخلی توسط آنزیم لیپاز

زهرا کوچک یزدی<sup>۱\*</sup>، ایران عالمزاده<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف \* نویسنده مسئول (zahra.yazdi@gmail.com)

۲- استاد گروه مهندسی شیمی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف

### چکیده

واکنش استر کردن داخلی با استفاده از مخلوط های روغن پالم و روغن آفتابگردان با ترکیب درصدهای مختلف (۸۰:۲۰، ۶۰:۴۰، ۵۰:۵۰، ۴۰:۶۰ و ۶۰:۴۰) انجام شد. برای انجام این فرآیند از لیپاز ویژه تثبیت شده (لیپوزیم تی ال آی ام) استفاده شده و آزمون های فیزیکی شیمیایی از جمله درصد اسید چرب آزاد، عدد پراکسید، عدد یدی، نقطه ذوب لغزشی، مقدار چربی جامد، عدد آنیسیدین، صابون باقی مانده، مقاومت اکسایشی در دمای ۱۱۰°C و پروفیل اسیدهای چرب بر روی مخلوط های اولیه و نمونه های نهایی پس از فرآیند استری شدن انجام شد. واکنش استر کردن داخلی در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴ ساعت همراه با ۶٪ آنزیم در مخلوط واکنش انجام شد. فرآیند استری شدن موجب کاهش مقاومت اکسایشی، میزان چربی جامد، نقطه ذوب لغزشی و عدد پراکسید و افزایش عدد آنیسیدین، صابون و درصد اسیدهای چرب آزاد گردید. مخلوط های روغن پالم و آفتابگردان با ترکیب درصدهای مختلف دارای اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع در محدوده ۵۲-۳۷/۶٪ و ۴۸/۰-۶۲/۴٪ بودند. در بهینه سازی این فرآیند برای تولید حداقل اسیدهای چرب آزاد و به حداقل رساندن افت روغن، شرایط بهینه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و با استفاده از ۷/۵ درصد آنزیم در ۴/۵ ساعت واکنش بدست آمد. همچنین بررسی آماری ترکیب اسیدهای چرب قبل و بعد از واکنش برای مخلوط ۵۰:۵۰ روغن ها نشان داد که واکنش استری شدن تأثیری بر ترکیب اسیدهای چرب ندارد.

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۲

تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۳۰

### واژه های کلیدی

استر کردن داخلی

خواص فیزیکوشیمیایی

روغن آفتابگردان

روغن پالم

لیپاز

### مقدمه

چربی هایی با درجه اشباع بالا مثل روغن پالم، استتارین پالم و روغن های گیاهی هیدروژنه همراه با روغن های مایع خوراکی انجام می شود تا چربی با خواص و ویژگی های متوسطی بدست آید. استر کردن داخلی به دو روش شیمیایی و آنزیمی انجام می شود. استر کردن داخلی

استر کردن داخلی مخلوط های تری گلیسرید راهی است برای صنعت روغن که بتواند چربی های دلخواه را با نقاط ذوب مناسب، برای کاربردهای مختلف غذایی تولید کند. استر کردن داخلی معمولاً با مخلوط کردن

آنزیمی وجود ندارد. در مقایسه مقاومت اکسیداتیو نمونه ها دریافتند که استر کردن داخلی شیمیایی کاهش شدیدتری در مقاومت اکسیداتیو نمونه ها ایجاد می کند، Soares و همکاران (۲۰۰۹) اثرات استر کردن داخلی شیمیایی را بر خواص فیزیکوشیمیایی مخلوطهای اولئین پالم و استئارین پالم بررسی کردند و نشان دادند که استر کردن داخلی شیمیایی امکان استفاده تجاری اولئین پالم و استئارین پالم را افزایش می دهد و خواص فیزیکی و شیمیایی آنها را اصلاح می نماید.

در پژوهش حاضر اثر استری شدن داخلی بر ویژگی های فیزیکی و شیمیایی مخلوط های روغن پالم و آفتابگردان بررسی شده است. روغن آفتابگردان به دلیل اثرات تغذیه ای مطلوب و روغن پالم به دلیل مقاومت اکسایشی بالا انتخاب شده اند. افت روغن نیز از مهمترین مسائل در فرآیند استر کردن داخلی روغن ها و چربی ها است، بنابراین بهینه سازی این فرآیند برای تولید حداقل اسیدهای چرب آزاد و به حداقل رساندن افت روغن بررسی گردید، شرایط بهینه برای به حداقل رساندن اسید چرب آزاد در روغن با در نظر گرفتن پارامترهای دمای واکنش، زمان واکنش و درصد آنزیم استفاده شده در واکنش بدست آمد.

### مواد و روش ها

#### مواد

روغن آفتابگردان (خنثی، رنگبری و بی بو شده) تولید شرکت صنعتی بهشهر (تهران، ایران) از بازار تهران و روغن پالم از شرکت روغن نباتی پارس (تهران، ایران) تهیه شدند. آنزیم تجاری لیپوزیم تی ال آی ام (لیپاز یک - سه ویژه ی تولید شده از میکروارگانسیم ترمومایس لانوگینوزا) که بر روی گرانول های سیلیکا تثبیت شده است از شرکت نووزیم (شهر بگس ورد، دانمارک) تهیه شد. استانداردهای متیل استر اسیدهای چرب شامل اسید پالمیتیک، اسید استئاریک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک از شرکت ویکو ژاپن تهیه شدند. تری فلئوروبر متانولی از شرکت فلوکا و سایر مواد شیمیایی از درجه کروماتوگرافی یا تجزیه ای بودند و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

#### تهیه مخلوط روغن ها

شیمیایی و آنزیمی بیشتر برای تولید مارگارین و شورتینگ ها استفاده می شود که محصول تولید شده دارای اسید چرب ترانس نباشد اما به لحاظ خواص فیزیکی، طعم و پایداری خوبی داشته باشد. برای تغییر خواص فیزیکی و ساختمان چربی سه نوع عملیات در صنایع روغن متداول می باشد: روش فیزیکی تبلور جزء به جزء، روش شیمیایی هیدروژنه کردن و روش شیمیایی استری کردن داخلی (صفری، ۱۳۸۷).

Zhang و همکاران (۲۰۰۱) تولید چربی مارگارین را با استفاده از فرآیند استر کردن داخلی آنزیمی توسط لیپوزیم تی ال آی ام و استئارین پالم و روغن نارگیل در مقیاس بالا بررسی کردند، آنها پایداری فعالیت آنزیم را در یازده بیج یک کیلوگرمی و ۹ بیج سیصد کیلوگرمی اعلام کردند و با مقایسه اسیدهای چرب در مورد تری گلیسریدها در محصولات تولید شده به روش آنزیمی و شیمیایی دریافتند که با توجه به ویژگی گزینش پذیری لیپاز توزیع اسیدهای چرب در جایگاه sn-2، این محصولات متفاوت است، که از مزایای تکنولوژی آنزیمی است، Chu و همکاران (۲۰۰۲) خواص فیزیکی و شیمیایی مخلوط استئارین پالم و اولئین هسته پالم ترانس استری شده با آنزیم لیپاز را بررسی کرده و گزارش دادند که استر کردن داخلی تغییر زیادی در ساختار اسیدهای چرب مخلوط انجام نداد ولی میزان چربی جامد مخلوط پس از استر کردن داخلی کاهش پیدا کرد، Akimoto و همکاران (۲۰۰۳)، استر کردن داخلی آنزیمی روغن سویا با اسید چرب چند غیر اشباعی  $\omega$ -3 را که از روغن سردین بدست آمده بود بررسی کردند و توانستند روغن را تا ۳۴/۱٪ از  $\omega$ -3 غنی کنند، Wang و همکاران (۲۰۰۶) تولید جانشین کره کاکائو را از طریق استر کردن داخلی روغن دانه چای و متیل استر اسیدهای چرب (متیل پالمیتات، متیل استئارات) بررسی کردند و گروه های آسیدل عمده در ملکول های تری آسیدل گلیسرول را مشابه کره کاکائو بدست آوردند، Farmani و همکاران (۲۰۰۷) تولید و اناسپاتی ایرانی را از طریق فرآیند استر کردن داخلی شیمیایی و آنزیمی بررسی و مقایسه کردند. آنها از روغن سویای کاملاً هیدروژنه، روغن کلزا و آفتابگردان استفاده کردند. و گزارش نمودند که تفاوت قابل ملاحظه ای بین نقطه ذوب لغزشی مخلوط های استری شده داخلی از دو روش شیمیایی و

درجه سانتیگراد و به مدت ۴ ساعت استفاده شد. برای همزدن، یک همزن مغناطیس بکار برده شد و سرعت همزن (۴۰۰ دور در دقیقه) طوری تنظیم شد تا آنزیم در کل روغن پراکنده باقی بماند. جهت جلوگیری از اکسیدشدن روغن‌ها، جریانی از نیتروژن با خلوص ۹۹/۹۹٪ به داخل راکتور دمیده شد. پس از سپری شدن زمان واکنش عمل همزدن قطع شد و پس از ته نشین شدن کامل آنزیم با استفاده از پی پت از روغن نمونه گیری شد. جهت جداسازی ذرات ریز باقیمانده در روغن، نمونه بر روی کاغذ صافی واتمن چهار صاف شد. از روغن صاف شده جهت جداسازی اسیدهای چرب آزاد و گلیسریدهای ناقص از روش Rousseau و Marangoni استفاده شد (1999)، به این صورت که ۷۰ گرم از هر نمونه در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد بالاتر از دمای ذوبش، ذوب شده و سپس با ۷۰ گرم اتانول در یک قیف جدا کننده مخلوط و کاملاً هم زده شد، سپس فاز اتانولی جدا شد و این شستشو پنج بار تکرار شد و حلال باقی مانده در روغن‌ها در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد و با وارد کردن جریانی از گاز نیتروژن با خلوص ۹۹/۹۹٪ به داخل آن جدا شد. از نمونه‌های خالص سازی شده جهت اندازه گیری میزان چربی جامد (SFC) نمونه گیری شد.

#### ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی روغن‌ها

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی روغن‌ها قبل و بعد از فرایند استر کردن داخلی اندازه گیری شدند. ضریب شکست از روش AOCS Cc 7-25، نقطه ذوب لغزشی از روش AOCS Cc 3-25، صابون باقی مانده از روش AOCS Cc 17-95، عدد یدی از روش AOAC 920.158، عدد پراکسید از روش AOCS cd 8-53، درصد اسید چرب آزاد از روش AOCS ca 5a-40، میزان چربی جامد از روش AOCS Cd 16-93 با استفاده از دستگاه NMR (شرکت بروکر، آلمان)، عدد آنیسیدین از روش AOCS cd 18-90 و مقاومت اکسیداتیو از روش AOCS Cd 12b-92 با استفاده از دستگاه رنسیمت ۷۴۳ (شرکت متروم، سوئیس) بدست آمدند. برای تهیه متیل استر نیز از روش AOCS Ce2-66 استفاده شد و روغن‌ها برای تعیین

به منظور بهبود کیفیت روغن پالم از ترکیب روغن‌های آفتابگردان و پالم استفاده شد. ترکیب دوتایی روغن آفتابگردان و روغن پالم با ترکیب درصدهای ۱۰۰:۰، ۸۰:۲۰، ۶۰:۴۰، ۵۰:۵۰، ۴۰:۶۰، ۲۰:۸۰ و ۰:۱۰۰ در نظر گرفته شد. این مخلوط‌ها را پس از ذوب در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد تهیه و در دمای یخچال نگهداری کردیم.

#### آماده سازی آنزیم

جهت آماده سازی آنزیم برای انجام واکنش آنزیمی به طور ناپیوسته ابتدا هوای محبوس در گرانولهای آنزیم حذف شده و سپس رطوبت موجود در آن کاهش داده شد. هنگام تثبیت آنزیم لیپاز مقدار زیادی هوا در ساختمان متخلخل گرانولهای سیلیکا گیر می افتد که اگر روغن جایگزین آن نگردد تماس مناسب بین روغن و آنزیم برقرار نشده و در نتیجه فعالیت ذرات آنزیم کامل نخواهد بود. به این منظور ۱۵۰ میلی لیتر روغن مایع آفتابگردان همراه با ۸ درصد وزنی آنزیم تثبیت شده (لیپوزیم تی ال ای ام) در حدود ۱۰ دقیقه تحت خلاء حدود ۶۰۰ میلیمتر جیوه و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد تا قطع کامل خروج حباب از گرانولها هوا زدایی شد. همچنین لیپوزیم تی ال ای ام حاوی حدوداً ۶ درصد رطوبت می باشد که وجود رطوبت در محیط واکنش باعث افزایش درصد اسیدهای چرب آزاد در محصول نهایی خواهد شد. بنابراین سه حجم ۱۵۰ گرمی از روغن آفتابگردان به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از همزن مغناطیسی و وارد کردن جریانی از گاز نیتروژن به محیط واکنش استری شدند تا با مصرف شدن رطوبت در واکنش هیدرولیز و خروج آن از آنزیم، اثر رطوبت باقیمانده در آنزیم کاسته شود. سپس در هر مرحله پس از قطع همزدن و ته نشین شدن آنزیم روغن از آنزیم جدا گشته و آنزیم با مخلوط‌های مورد نظر شستشو داده شد.

#### واکنش استری شدن آنزیمی

به روش بیج در یک راکتور شیشه ای دوجداره با گنجایش ۳۰۰ میلی لیتر مجهز به حمام آب دارای سیستم چرخش آب با دمای قابل تنظیم انجام شد و از ۱۵۰ گرم مخلوط روغن‌ها با ۶٪ آنزیم در دمای ۷۰

ترکیب اسیدهای چرب، به وسیله گاز کروماتوگرافی آماده شدند (Cunniff et al., 1997; AOCS, 1997).

### گاز کروماتوگرافی

برای تعیین اسیدهای چرب از دستگاه گاز کروماتوگراف مدل PR2100 ساخت شرکت PERICHRON (فرانسه) استفاده شد که مشخصات آن بدین شرح است: نوع ستون (۵۰ متر × ۰/۲۰۱ میلیمتر × ۰/۵ میکرومتر) HP PONA، گاز حامل: هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪، سرعت جریان گاز هلیوم: ۱ میلی لیتر در دقیقه، قبل از تزریق، برنامه دمایی به دستگاه داده می شود. دمای اولیه ۱۲۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۵ دقیقه و سپس با گرادیان ۴ درجه در دقیقه تا دمای ۲۲۵ درجه سانتیگراد افزایش می یابد و برای مدت ۲۰ دقیقه در این دما نگاه داشته می شود. دمای تزریق ۲۵۰ و دمای آشکارساز بر روی ۲۸۰ درجه تنظیم می شود و مقدار تزریق هر نمونه نیز برابر یک میکرولیتر بود و هر نمونه حداقل سه بار به دستگاه تزریق شد.

### تجزیه تحلیل آماری و بهینه سازی تولید اسیدهای چرب آزاد شده در واکنش

یافته های آزمایشگاهی به صورت انحراف معیار اطمینانگین در سطح اطمینان ۹۵٪ ارائه شد. جهت بررسی نتایج نقاط ذوب لغزشی، مقاومت اکسایشی و

ترکیب اسیدهای چرب قبل و بعد از واکنش اینتراستریفیکاسیون آنزیمی از نرم افزار SPSS 16.0 استفاده شد و آزمون تی برای نمودارهای جفت شده قبل و بعد از واکنش انجام شد. نرمال بودن از فرضهای این آزمون می باشد. که قبل از آزمون تی توسط آزمون کولمرگروف - اسمیرنوف (K-S) کنترل گردید. افت روغن از مهمترین مسائل در فرآیند استر کردن داخلی روغن ها و چربی ها است. بنابراین بهینه سازی این فرآیند برای تولید حداقل اسیدهای چرب آزاد و به حداقل رساندن افت روغن بررسی گردید. برای بهینه سازی اسیدهای چرب آزاد شده در واکنش و به حداقل رساندن آن از روش پاسخ سطحی استفاده شد، همچنین طراحی آزمایش ها بر اساس طرح مرکب مرکزی با ۳ فاکتور و هر فاکتور در سه سطح با ۵ تکرار در نقطه مرکزی مشتمل بر ۱۹ آزمایش انجام شد. مقادیر متغیرهای مستقل شامل دمای واکنش (درجه سانتیگراد)، زمان واکنش (ساعت) و مقدار آنزیم (%). به مقادیر کد شده +۱ و ۰ و -۱ تبدیل شده که به ترتیب نشان دهنده سطوح زیاد، میانی و کم می باشد و در جدول ۱ ذکر شده است. به منظور تجزیه و تحلیل آماری شامل رگرسیون، تحلیل واریانس، شکل های گرافیکی و بهینه سازی از نرم افزار Design Expert 8 استفاده شد (RSM Tutorial).

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح آنها برای طرح مرکب مرکزی در فرآیند استری شدن آنزیمی

متغیرهای مستقل	نماد	سطوح متغیر کد شده		
زمان واکنش (ساعت)	$X_1$	-۱	۰	+۱
دمای واکنش (درجه سانتیگراد)	$X_2$	۵۵	۶۵	۷۵
مقدار آنزیم (%)	$X_3$	۶	۷/۵	۱۰

برای تبدیل سطوح متغیر واقعی به سطوح متغیر کد شده از معادلات زیر استفاده می شود.

$$X_1 = \text{زمان} - ۴/۵, X_2 = (۸۵ - \text{دما}) / ۱۰, X_3 = \text{مقدار آنزیم} - ۷/۵$$

### نتایج و بحث

بررسی ویژگی های فیزیکی شیمیایی روغن های پالم و آفتابگردان در جدول ۲ آمده است. مقایسه ویژگی های روغن آفتابگردان با استاندارد ملی شماره ۱۳۰۰ نشان می دهد که این ویژگی ها در محدوده تعیین

شده استاندارد قرار دارند و این امر هم بیانگر کیفیت مناسب روغن آفتابگردان است. مقایسه ویژگی های روغن پالم با استاندارد ملی شماره ۴۴۶۷ نیز نشان می دهد که عدد پراکسید (۵/۸) و اسیدهای چرب آزاد (۰/۰۶۵) در محدوده مجاز قرار دارند.

گرد (پروانه، ۱۳۷۴). که عددهای بدست آمده برای روغن آفتابگردان و روغن پالم و ترکیبات مخلوط آنها در محدوده قابل مصرف قرار دارند. پراکسید مخلوط‌های اولیه بین ۵/۸-۲/۶ meq/kg و عدد آنیسیدین برای مخلوط‌های اولیه بین ۳/۹۸-۱/۵۰

تعریف کلی عدد پراکسید عبارت است از مقدار میلی اکی والان پراکسید در هزار گرم ماده چرب، عدد پراکسید در روغن و مواد چرب تازه بایستی کمتر از ۵ بر حسب روش لی یا کمتر از ۱۰ بین المللی باشد و هرگاه عدد پراکسید ۲۰ میلی اکی والان در ۱ کیلو گرم باشد روغن یا ماده چرب غیر قابل مصرف می

جدول ۲- خواص فیزیکی روغن های پالم و آفتابگردان\*

روغن آفتابگردان	روغن پالم	
۰/۰۷±۰/۰۰۳۵۳	۰/۶۵±۰/۰۰۳۵۳	اسید های چرب آزاد
۱۲۷/۵±۰/۷۹۰۵۷	۵۷/۳±۰/۸۶۳۱۳	عددیدی
۲/۶±۰/۰۷۰۷۱	۵/۸±۰/۰۷۰۷۱	عدد پراکسید
-۵ ±۰/۵۶۸۱۵C	۳۸/۵±۰/۷۹۰۵۷ C	نقطه ذوب لغزشی
۱/۴۷۱۵±۰/۰۰۰۰۵	۱/۴۶۴۶±۰/۰۰۰۰۵	ضریب شکست
۰/۰	۰/۰	صابون (ppm)

\* میانگین ± انحراف معیار

جدول ۳- درصد اسید های چرب و عدد یدی نمونه های روغن

نسبت PO/SFO	درصد اسیده‌های چرب									عدد یدی
	16:0	18:0	18:1	18:2	Others	SFA	MUSFA	PUFA	PUFA/(SFA+TFA)	
۱۰۰/۰	۳۷/۹۴	۴/۴۹	۴۰/۳۳	۱۵/۷۲	۱/۷۱	۴۲/۴۳	۴۰/۳۳	۱۵/۷۲	۰/۳۷۰۴	۵۷/۳۰
۸۰/۲۰	۳۱/۸۴	۴/۳۹	۳۸/۰۸	۲۴/۱۲	۱/۶۶	۲۶/۲۳	۳۸/۰۸	۲۴/۱۲	۰/۶۶۵۷	۷۱/۳۴
۶۰/۴۰	۲۵/۷۴	۴/۲۹	۳۵/۸۳	۳۲/۵۳	۱/۶۲	۳۰/۰۳	۳۵/۸۳	۳۲/۵۳	۱/۰۸۳۲	۸۴/۳۸
۵۰/۵۰	۲۲/۶۹	۴/۲۵	۳۴/۷۰	۳۶/۷۳	۱/۶۰	۲۶/۹۴	۳۴/۷۰	۳۶/۷۳	۱/۳۶۳۴	۹۲/۴۰
E ۵۰/۵۰	۲۲/۵۵	۴/۱۸	۳۴/۳۳	۳۷/۳۵	۱/۵۹	۲۶/۷۳	۳۴/۳۳	۳۷/۳۵	۱/۳۹۷۳	۹۲/۶۰
۴۰/۶۰	۱۹/۶۴	۴/۲۰	۳۳/۵۸	۴۰/۹۳	۱/۵۸	۲۳/۸۴	۳۳/۵۸	۴۰/۹۳	۱/۷۱۶۸	۹۹/۴۲
۲۰/۸۰	۱۳/۵۴	۴/۱۰	۳۱/۳۳	۴۹/۳۴	۱/۵۴	۱۷/۶۴	۳۱/۳۳	۴۹/۳۴	۲/۷۹۷۰	۱۱۳/۴۶
۰/۱۰۰	۷/۴۴	۴/۰۱	۲۹/۰۸	۵۷/۷۵	۱/۵۰	۱۱/۴۵	۲۹/۰۸	۵۷/۷۵	۴/۰۴۳۶	۱۲۷/۵۰

SFA: اسیده‌های چرب اشباع، MUSFA: اسیده‌های چرب تک غیر اشباع، PUSFA: اسیده‌های چرب چند غیر اشباع، E: مخلوط استری شده

داخلی جابجایی اسیده‌های چرب صورت می گیرد. بنابراین انتظار می رود که این فرآیند تاثیری بر ترکیب اسیده‌های چرب و عدد یدی مخلوط ها نداشته باشد. جدول ۳ درصد اسید های چرب در نمونه های روغن را نشان می دهد که با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی بدست آمده است. با توجه به جدول ۳ و مقایسه اسیده‌های چرب قبل و بعد از فرآیند استری شدن برای

بود. مقدار پراکسید در مخلوط ها بعد از استر کردن داخلی بین ۱/۳-۲/۴ meq/kg بود. ترکیب اسیده‌های چرب مخلوط ها و همچنین عدد یدی آنها در جدول ۳ ارائه شده است.

با توجه به جدول ۳ همگام با کاهش درصد روغن پالم در مخلوط روغن آفتابگردان و پالم، عدد یدی آنها کاهش یافت. با توجه به این که در فرآیند استر کردن

ای بالاتر روغن های شامل درصد بیشتر روغن آفتابگردان می باشد. استر کردن داخلی آنزیمی باعث کاهش عدد پراکسید و افزایش عدد آنیسیدین در مخلوطها شد. Pedersen و همکاران (۲۰۰۴) علت کاهش عدد پراکسید را اتصال پراکسید به پروتئین آنزیم ذکر کردند. ولی با توجه به اندازه گیری عدد آنیسیدین و افزایش آن در اثر استر کردن داخلی، مقدار آلدیها نیز افزایش یافته است. این بدان معنی است که بخشی از پراکسید در شرایط واکنش به آلدی تبدیل شده است. اتصال پراکسید به آنزیم، غیر فعال شدن آنزیم را در پی دارد، و تبدیل پراکسید به آلدی نیز موجب بالا رفتن عدد آنیسیدین می گردد بنابراین عدد پراکسید مخلوط اولیه باید تا حد امکان کم باشد تا از اثرات منفی آن بر فعالیت آنزیم کاسته شود و عدد آنیسیدین نیز پس از واکنش در محدوده مجاز قرار گیرد.

صابون، اصلی ترین محصول جانبی در فرآیند استری کردن است. انجام عملیات رنگبری بعد از فرآیند استری کردن می تواند صابون را تا حد صفر کاهش دهد. مقدار صابون باقی مانده در تمامی مخلوط های اولیه صفر بود که در اثر فرآیند استر کردن داخلی افزایش یافت.

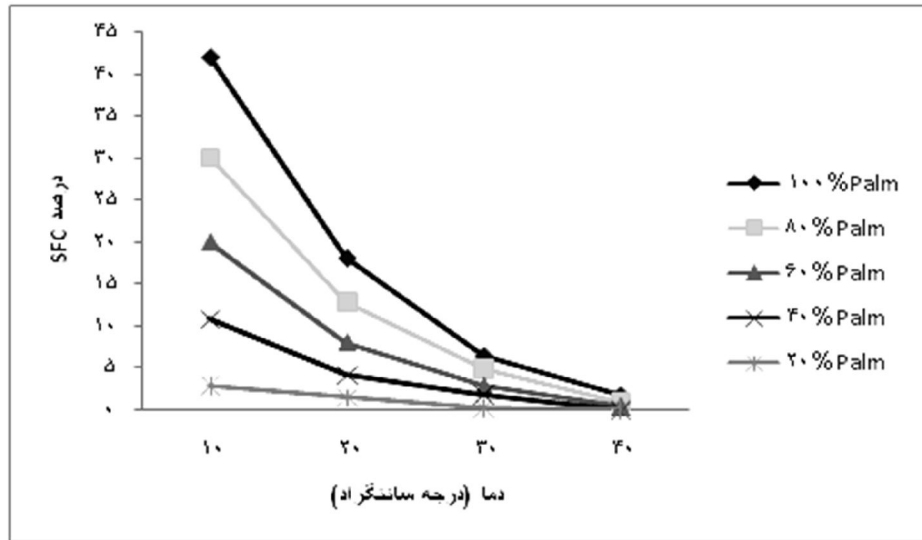
عدد یدی نیز نشان دهنده غیر اشباع بودن اسیدهای چرب ماده تشکیل دهنده روغن است، عدد یدی برای روغن های سرخ کردنی مطابق با استاندارد باید حداکثر ۱۰۰ باشد و این نشان دهنده این است که روغن پالم و نیز مخلوط های آن تا حداکثر ۶۰٪ روغن آفتابگردان می تواند به عنوان روغن سرخ کردنی به کار گرفته شود. فرآیند استری کردن، تاثیر چندانی بر عدد یدی محصول استری شده نداشت، زیرا در فرآیند استری کردن تنها نوآرایی اسیدهای چرب بر روی بدنه گلیسرولی انجام می شود و گروه های آسید از یک استر به استر دیگر جابجا می شوند و تغییر شیمیایی در ماهیت اسیدهای چرب تشکیل دهنده چربی بوجود نمی آید.

شکل ۱ SFC مخلوط ها در دماهای ۴۰-۱۰ درجه سانتیگراد قبل از استر کردن داخلی نشان می دهد و شکل ۲ SFC مخلوط ها را بعد از فرآیند استر کردن داخلی در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۴

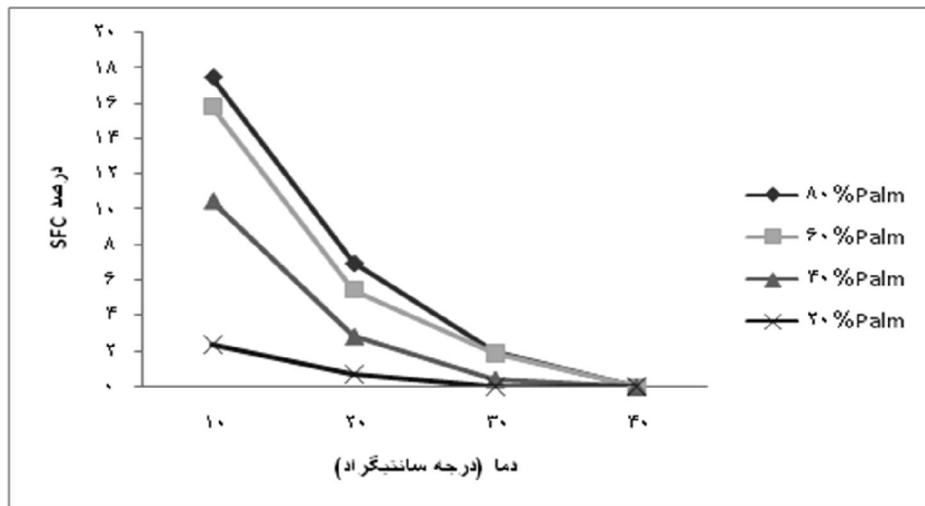
مخلوط ۵۰:۵۰ روغنهای پالم و آفتابگردان مشاهده می شود که این فرایند تاثیر چندانی بر درصد اسیدهای چرب ندارد و تغییر اندک مشاهده شده نیز به دلیل شستشو و جداسازی اسیدهای چرب آزاد بوجود آمده در فرایند استر کردن داخلی می باشد. همچنین انجام آزمون نرمال بودن و آزمون تی برای واکنش استری شدن، مخلوط ۵۰:۵۰ روغن پالم و آفتابگردان و مقایسه ترکیب اسیدهای چرب قبل و بعد از واکنش نشان دهنده این است که فرض نرمال بودن داده ها رد نمی شود و داده ها با یکدیگر همبستگی دارند همچنین واکنش استری شدن تاثیری بر ترکیب اسیدهای چرب روغن ندارد. مخلوط کردن ۵۰٪ روغن آفتابگردان با روغن پالم باعث کاهش یافتن سطح اسیدهای چرب اشباع به مقدار ۱۶٪ و اسیدهای چرب تک غیر اشباعی به مقدار ۷٪ و افزایش اسیدهای چرب چند غیر اشباعی به مقدار ۲۱٪ شده است. مخلوط های دارای درصد بالاتر اسیدهای چرب چند غیر اشباعی و تک غیر اشباعی می توانند غذای سالم تری برای انسان باشند (Soares et al., 2009). با توجه به جدول ۳ روغن پالم دارای بیشترین مقدار اسیدهای چرب اشباع، ۳۷/۹ درصد اسید پالمیتیک و در مجموع ۴۲/۴۳ درصد اسید چرب اشباع می باشد، و روغن آفتابگردان دارای ۷/۴۴ درصد اسید پالمیتیک و در مجموع ۱۱/۴۵ درصد اسید چرب اشباع می باشد. بنابراین با افزایش درصد روغن پالم، میزان اسیدهای چرب اشباع در ترکیب ها افزایش می یابد. افزایش اسیدهای چرب اشباع عمدتاً مربوط به افزایش اسید پالمیتیک است. بدلیل استفاده از روغن های طبیعی گیاهی و بدون ترانس، کلیه مخلوط ها، فاقد اسید چرب ترانس می باشند و بدلیل استفاده از فرایند استری شدن بجای هیدروژناسیون، شورتینگ حاصل از استر کردن داخلی پالم و آفتابگردان نیز فاقد اسید چرب ترانس می باشد. مخلوطهای شامل روغن پالم از (۶۰٪-۱۰۰٪) به دلیل داشتن اسید پالمیتیک و اسید اولئیک بیشتر و اسید لینولئیک کمتر در مقایسه با سایر مخلوطها، از نظر مقاومت اکسیداتیو در شرایط بهتری قرار دارند. بالاتر بودن میزان اسیدهای چرب چند غیر اشباعی به مجموع اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب ترانس نشان دهنده ارزش تغذیه

با قوام مناسب در دمای یخچال و احساس دهانی مطلوب را میسر می‌سازد. Reshma و همکاران (۲۰۰۸) واکنش استری شدن داخلی، کاتالیزور لیپاز را برای مخلوط‌های استئارین پالم و روغن سبوس برنج به منظور تولید شورتینگ بدون ترانس انجام دادند و گزارش دادند که کاهش زیادی در دمای ذوب و میزان چربی جامد در اثر فرآیند اینتراستیفیکاسیون آنزیمی بوجود آمده است. نقطه ذوب لغزشی مخلوطها نیز قبل و بعد از فرآیند استر کردن داخلی در شکل ۳ ارائه شده است. با توجه به شکل ۳ استر کردن داخلی آنزیمی موجب کاهش نقطه ذوب لغزشی مخلوطها گردید. کاهش نقطه ذوب لغزشی را می‌توان مربوط به کاهش درصد تری آسیل گلیسرول‌های سه اشباعی در اثر استر کردن داخلی دانست (Norizzah et al., 2004). نقطه ذوب لغزشی مخلوط‌های اولیه بین ۳۷/۵-۱۷ درجه سانتیگراد بود که پس از فرآیند و استر کردن داخلی به ۲۷-۸ درجه سانتیگراد رسید. یکی دیگر از عوامل موثر بر نقطه ذوب روغن‌ها نسبت روغن آفتابگردان و پالم می‌باشد که با افزایش درصد روغن آفتابگردان به دلیل افزایش درصد اسیدهای چرب چند غیر اشباع نقطه ذوب کاهش خواهد یافت. حیدرزاده و همکاران (۱۳۸۷) هم کاهش نقطه ذوب مخلوط‌های مورد بررسی را در اثر استر کردن داخلی شیمیایی گزارش کردند.

ساعت و شستشوی مخلوط‌های استری شده با اتانول نشان می‌دهد. میزان چربی جامد، مقدار کریستال‌های چربی در یک روغن یا مخلوط روغن‌ها، تاثیر زیادی بر مناسب بودن آن چربی یا مخلوط برای یک کاربرد خاص دارد، مقدار چربی جامد برای بسیاری از خواص محصول در مارگارین‌ها، شورتینگ‌ها و پخشینه‌های چربی، شامل ظاهر عمومی آنها، راحتی بسته بندی آنها، توانایی پخش شونگی آنها، اکسید شدن روغن و خواص ارگانولپتیک آنها اهمیت دارد. مقدار چربی جامد با افزایش مقدار روغن پالم مخلوطها نسبت مستقیم دارد. فرایند استر کردن داخلی باعث کاهش میزان چربی جامد مخلوطها شد. در نتیجه واکنش استری شدن، تری گلیسریدهای دارای نقطه ذوب لغزشی بالاتر ( $S_2U$ ,  $S_3$ ) کاهش می‌یابند که اصلی ترین علت برای کاهش میزان چربی جامد می‌باشد. دلیل دیگر کاهش محتوای چربی جامد روغن در فرایند استر کردن داخلی، تبدیل کریستالهای روغن از شکل  $\beta$  (کریستال‌های درشت) به شکل  $\beta'$  (کریستال‌های ریز) می‌باشد. ریزتر شدن کریستال‌های روغن باعث می‌شود که روغن تحت تاثیر دما، بیشتر و سریعتر ذوب گردد و حتی در حالت جامد دارای ظاهری یکنواخت و مطلوب باشد. روغن‌هایی که دارای کریستال‌های درشت هستند در حالت جامد به صورت دانه دانه در می‌آیند که امری نامطلوب بشمار می‌آید. با توجه به میزان چربی جامد محصولات استری شده، به نظر می‌رسد که استفاده از استئارین پالم بجای روغن پالم امکان تهیه مارگارین‌ها



شکل ۱- اثر دما بر مقدار چربی جامد مخلوطها قبل از استر کردن داخلی



شکل ۲- اثر دما بر مقدار چربی جامد مخلوطها بعد از استر کردن داخلی در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد

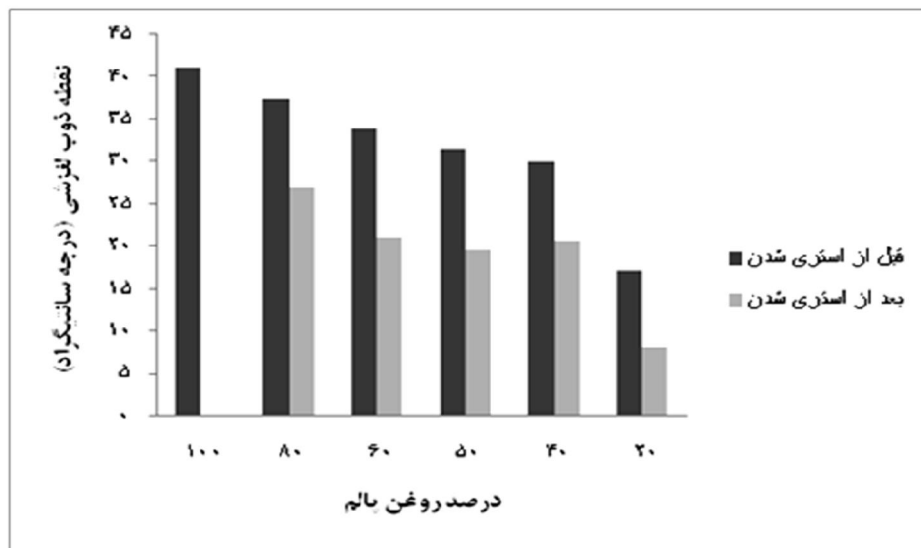
پی خواهد داشت. مقاومت اکسیداتیو روغن ها علاوه بر ترکیب اسیدهای چرب به عواملی چون آنتی اکسیدان ها، درصد اسیدهای چرب آزاد، میزان آلدهیدها و ... نیز بستگی دارد. با مقایسه جدول ۳ با جدول ۴ در می- یابیم که افزایش ((SFA)+(TFA))/(PUFA) کاهش مقاومت اکسیداتیو را در پی خواهد داشت. بنابراین فقط می توان با افزایش اسیدهای چرب تک غیر اشباعی و کاهش ((SFA)+(TFA))/(PUFA) بین ارزش تغذیه ای روغن و مقاومت اکسیداتیو آن توازن برقرار نمود.

مقاومت اکسیداتیو روغن آفتابگردان و روغن پالم و مخلوط های آنها قبل و بعد از فرآیند استر کردن داخلی در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد اندازه گیری شد و در جدول ۴ آمده است. با افزایش اسید لینولئیک و کاهش اسید پالمیتیک و اسید اولئیک در مخلوطها مقاومت اکسیداتیو کمتری شود. در بین روغن های اولیه روغن پالم به دلیل داشتن بیشترین درصد اسید چرب اشباع ۴۳/۴۲٪ دارای بیشترین مقاومت اکسیداتیو می باشد. بنابراین افزایش درصد روغن پالم در مخلوطها افزایش مقاومت اکسیداتیو روغن را در



نیز افزایش میزان آلدئیدها و در نتیجه افزایش عدد آنیسیدین می باشد. نتایج بدست آمده منطبق بر نتایج سایر محققین بوده است، و می توان کاهش مقاومت اکسیداتیو را با افزودن آنتی اکسیدان جبران نمود (Kowalski et al., 2004). انجام آزمون نرمال بودن و آزمون تی برای داده های مقاومت اکسایشی نمونه های روغن قبل و بعد واکنش اینتراستریفیکاسیون نشان داد که داده ها از توزیع نرمال پیروی می کنند و ارتباط معنی داری بین داده ها قبل و بعد واکنش وجود ندارد. همچنین واکنش اینتراستریفیکاسیون بر مقاومت اکسایشی نمونه ها موثر می باشد و موجب کاهش آن می گردد.

با توجه به جدول ۴ مقاومت اکسیداتیو نمونه ها پس از فرآیند استر کردن داخلی به شدت کاهش یافته و از (۱۲/۶۸ - ۱۰/۴۷) به (۷/۱۶ - ۴/۶) ساعت رسیده است. افزایش اسیدهای چرب آزاد باعث کاهش مقاومت اکسیداتیو نمونه های روغنی می گردد. با توجه به این که نمونه ها پنج بار با اتانول شسته شده اند. اسیدهای چرب آزاد در آنها به حداقل رسیده است و در حدود ۰/۱۱-۰/۲۴ درصد می باشد، که از مخلوط های اولیه بیشتر می باشد. همچنین پس از فرآیند استر کردن داخلی عدد آنیسیدین نیز افزایش می یابد و بخشی از پراکسید به آلدئید تبدیل می شود که موجب کاهش مقاومت اکسیداتیو مخلوطها می گردد. بنابراین علت کاهش مقاومت اکسیداتیو نمونه ها پس از فرآیند استر کردن داخلی افزایش درصد اسیدهای چرب آزاد و



شکل ۳- نقطه ذوب لغزشی مخلوطها قبل و بعد از فرآیند استر کردن داخلی

جدول ۴- مقاومت اکسیداتیو مخلوطها قبل و بعد از فرآیند استر کردن داخلی\*

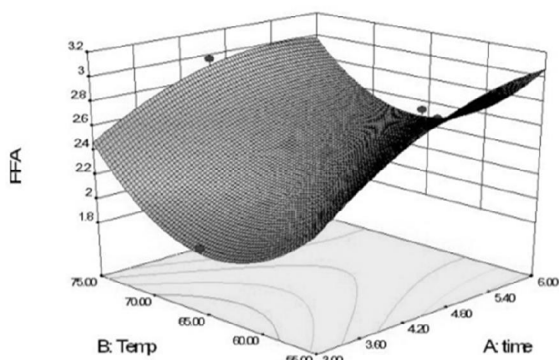
مقاومت اکسیداتیو (ساعت)	نمونه	
قبل از استر کردن داخلی	بعد از استر کردن داخلی	
۰/۰۵±۱۵/۹۱	-	پالم ۱۰۰٪
۰/۰۶±۱۲/۶۸	۰/۰۴±۷/۱۶	پالم ۸۰٪
۰/۰۲±۱۲/۲۱	۰/۰۳±۵/۴۱	پالم ۶۰٪
۰/۰۴±۱۰/۹۹	۰/۰۵±۵/۳۸	پالم ۴۰٪
۰/۰۲±۱۰/۴۷	۰/۰۴±۴/۶	پالم ۲۰٪
۰/۰۳±۱۰/۴۲	-	آفتابگردان ۱۰۰٪

\* میانگین ± انحراف معیار

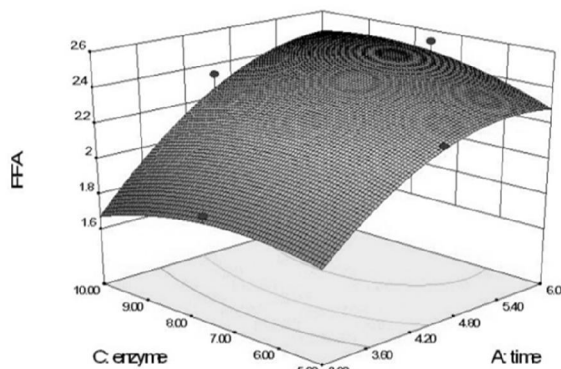
همچنین در این مدل مقادیر R-Squared و Adjusted R-Squared به ترتیب ۰/۸۸۹ و ۰/۹۸۷۵ بدست آمده که بیانگر این مساله می باشد که داده ها به خوبی با مدل درجه دوم برازش شده است. پس از برازش کردن مدل درجه دوم می توان تاثیر پارامترهای مورد نظر را بر روی پاسخ دریافتی که همان اسیدهای چرب آزاد شده می باشد در شکل ۴ مشاهده نمود. در شکل ۴ (الف) تاثیر زمان واکنش و دمای واکنش بر درصد اسیدهای چرب آزاد شده و در شکل ۴ (ب) تاثیر درصد آنزیم و زمان واکنش بر درصد اسیدهای چرب آزاد شده نشان داده شده است.

در بهینه سازی فرآیند برای تولید حداقل اسیدهای چرب آزاد و به حداقل رساندن افت روغن، شرایط بهینه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و با استفاده از ۷/۵ درصد آنزیم در ۴/۵ ساعت واکنش بدست آمد. همچنین رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ به صورت زیر بدست آمده است:

$$\begin{aligned} \text{FFA} = & +26.95168 + 1.15759 * \text{time} - 0.77432 * \\ & \text{Temp} - 0.71786 * \text{enzyme} \\ & - 5.15917\text{E-}003 * \text{time} * \text{Temp} + 0.020097 * \text{time} \\ & * \text{enzyme} + 0.013366 * \text{Temp} * \text{enzyme} \\ & - 0.083737 * \text{time}^2 + 5.39092\text{E-}003 * \text{Temp}^2 - \\ & 0.015505 * \text{enzyme}^2 \end{aligned}$$



(الف)



(ب)

شکل ۴- (الف) تاثیر زمان واکنش (ساعت) و دمای واکنش (دما) بر درصد اسیدهای چرب آزاد شده، (ب) تاثیر درصد آنزیم (%) و زمان واکنش (ساعت) بر درصد اسیدهای چرب آزاد شده

#### منابع

- ۱- استاندارد ویژگیهای روغن آفتابگردان. شماره استاندارد ۱۳۰۰. انتشارات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- ۲- استاندارد ویژگیهای روغن پالم. شماره استاندارد ۴۴۶۷. انتشارات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.
- ۳- پروانه، و. ۱۳۷۴. کنترل کیفی و آزمایشهای شیمیایی مواد غذایی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. چاپ سوم. صفحات ۱۹۰-۲۲۰.
- ۴- حیدرزاده، ش. زندی، پ.، صفافر، ح. و شریف زاده، ز. ازیلیست، جی. ۱۳۸۷. کاربرد اینتراستریفیکاسیون شیمیایی روغن- های نباتی برای تولید شورتینینگ چند منظوره بدون ترانس. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال سوم. شماره ۴، صفحات ۲۹-۳۸.
- ۵- صفری، م. ۱۳۸۷. تکنولوژی روغن و چربی خوراکی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ اول، صفحات ۲۲۵-۲۴۸ و ۴۶۳-۴۷۷.

- 6- Akimoto, M., Izawa, M., Hoshinok, Ichi Abe K. & Takahashi, H. 2003. Lipase-catalyzed interesterification of soybean oil with an  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acid concentrate prepared from sardine oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104: 105-118.
- 7- Andreia Schäfer, D. S. F., Claro da Silva R., Guimarães da Silva K. C., Bertolessi Lourenço M, Ferreira Soares D, Gioielli L A. 2009. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of blends of palm stearin and palm olein. *Food Research International*, 42: 1287-1294.
- 8- AOCS. 1997. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign : Official methods, Ca 5a-40 Cd 8-53, Cc7-25, Cc 3-25, Cd 16b-93, Cd 12-57 and Ce 2-66.
- 9- Chu, B. S., Ghazali, H. M., Lai, O. M., Che Man, Y. B. & Yusof, S. 2002. Physical and chemical properties of a lipase-transesterified palm stearin/palm kernel olein blend and its isopropanol-solid and high melting triacylglycerol fractions. *Food Chemistry*, 76: 155–164.
- 10- Cunniff, P. 1997. Association of Official Analytical Chemists AOAC Official Methods of Analysis, 920. 158. Champaign, IL: AOCS Press.
- 11- Farmani, J., Hamed, M., Safari, M. & Madadlou A. 2007. Trans-free Iranian vanaspati through enzymatic and chemical transesterification of triple blends of fully hydrogenated soybean, rapeseed and sunflower oils. *Food Chemistry*, 102: 827–833.
- 12- Kowalski, B., Tarnowska, K., Gruczynska, E. & Bekas, W. 2004. Chemical and enzymatic interesterification of tallow and rapeseed oil equal-weight blend. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106: 655–664.
- 13- Norizzah, A.R., Chong, C.L., Cheow, C.S. & Zaliha, O. 2004. Effects of chemical interesterification on physicochemical properties of palm stearin and palm kernel olein blends. *Food Chemistry*, 86: 229–235.
- 14- Pedersen, L. S., Kristensen, D., Adler-Nissen, J. & Holm, H. C. 2004. Modification of margarine fats by enzymatic interesterification: evaluation of solid fat content-based exponential model with two groups of oil blends. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(7): 653–658.
- 15- Reshma, M.V., Saritha, S.S., Balachandran, C. & Arumughan C. 2008. Lipase catalyzed interesterification of palm stearin and rice bran oil blends for preparation of zero trans shortening with bioactive phytochemicals. *Bioresource Technology*, 99: 5011–5019.
- 16- Rousseau, D. & Marangoni, A. G. 1999. The effect of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads. *Food Research International*, 31(5): 381–388.
- 17- Wang, H. X., Wu, H., Tang Ho C., Chu Weng X. 2006. Cocoa butter equivalent from enzymatic interesterification of tea seed oil and fatty acid methyl esters. *Food Chemistry*, 97: 661–665.
- 18- Response Surface Design and Analysis. Multifactor RSM Tutorial (Part 1–The Basics). [www.statease.com](http://www.statease.com).
- 19- Zhang, H., Xu X., Nilsson, Mu H., Adler-Nissen J. & Erik Høy C. 2001. Production of margarine fats by enzymatic interesterification with silica-granulated thermomyces lanuginosa lipase in a large-scale study. *Journal of American Oil Chemist' Society*, 78: 57–64.

## Quality changes of palm oil and sun flower oil blends by enzymatic interesterification

Z. Kouchak yazdi<sup>1\*</sup>, I. Alemzadeh<sup>2</sup>

1- Ph.D. Student, Department of Food Chemical Engineering, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology

\* Corresponding author (zahra.yazdi@gmail.com)

2- Professor, Department of Food Chemical Engineering, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology

### Abstract:

Mixtures of palm and sunflower oils with different compounds of 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80 were inter-esterified. For this purpose a special stabilized lipase (Lipozyme TLIM) was used and the physicochemical properties were determined as following: free fatty acids content, peroxide value, iodine value, slip melting point, solid fat content, P-anisidine value, soap, oxidative stability at 110 °C, and the profile of fatty acids on the primitive blends and final samples after esterification processes. The inter-esterification reactions were done by addition 6% enzyme to blend and reactions were done at 70 °C for 4 hours. Esterification caused to decrease in oxidative stability, solid fat content, slip melting point, peroxide value and increase in P-anisidine value, soap and free fatty acids. The blend of palm and sunflower oils with different percentages had saturated and unsaturated by and from fatty acids in ranges of 37.6-52%, 48-62.4% respectively. Loss of oil is the most important issue in inter-esterification process of oils and fats; so the optimization of the process was studied to produce the minimum free fatty acids content and to minimize loss of the oil. The optimum condition for minimizing the fatty acid in oil under the condition at 65 °C and using 7.5 percent enzyme for 4.5 hours reaction was obtained. Also the statistical studies of fatty acids blends before and after reaction for 50:50 ratio of the used oils showed that the esterification process has no effect on fatty acid structure of the blends.

**Keywords:** Inter-esterification; Lipase; Palm oil; Physicochemical properties; Sun flower oil