

JOANNA BRYŚ, MAGDALENA WIRKOWSKA, BOLESŁAW KOWALSKI

**PRZEESTRYFIKOWANIE MIESZANIN TŁUSZCZU MLEKOWEGO
Z OLEJEM SŁONECZNIKOWYM W OBECNOŚCI PREPARATU
NOVOZYM 435**

Streszczenie

Celem pracy było określenie zmian, jakie zachodzą w mieszaninach tłuszczu mlekowego z olejem słonecznikowym w wyniku przeestryfikowania w obecności preparatu Novozym 435. Przedmiotem badań były mieszaniny tłuszczu mlekowego i oleju słonecznikowego o składzie wagowym odpowiednio 1:3, 1:1, 3:1. Mieszaniny przeestryfikowywano w temp. 80°C przez 2, 4 i 8 h w obecności preparatu enzymatycznego Novozym 435. Przeestryfikowanie spowodowało wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych we wszystkich mieszaninach. Temperatura mięknięcia i zawartość fazy stałej produktów przeestryfikowania zależała przede wszystkim od składu mieszanin wyjściowych. Przeestryfikowanie nie spowodowało zmian składu kwasów tłuszczowych w triacyloglicerolach, zmieniła się natomiast struktura triacylogliceroli.

Słowa kluczowe: przeestryfikowanie, tłuszcz mlekowy, olej słonecznikowy, Novozym 435

Wprowadzenie

Tłuszcz mlekowy stanowi mieszaninę ponad stu tysięcy różnych triacylogliceroli. Z ponad 400 różnych kwasów występujących w tłuszczu mlekowym długołańcuchowe nasycone kwasy tłuszczowe stanowią około 45%, natomiast krótkołańcuchowe stanowią około 25% wszystkich kwasów tłuszczowych. Dzięki specyficznemu składowi kwasów tłuszczowych tłuszcz mlekowy jest jednym z najlepiej przyswajalnych tłuszczów jadalnych, w związku z tym powinien zajmować ważne miejsce w żywieniu człowieka [1, 4]. W ostatnich dwóch dekadach można jednak zaobserwować zmniejszenie konsumpcji masła. Główną barierą zwiększenia sprzedaży produktów, w skład których wchodzi wyłącznie tłuszcz mlekowy jest między innymi ich wysoka cena oraz ograniczone właściwości plastyczne. Funkcjonalność tłuszczu

mlekowego oraz jego wartość zdrowotną można polepszyć poprzez mieszanie go z olejami roślinnymi oraz poddanie mieszanin modyfikacjom [8].

Potencjalnie największe znaczenie technologiczne ma reakcja przeestryfikowania, która umożliwia dokonywanie zmian rozmieszczenia kwasów tłuszczowych w triacyloglicerolach. Dzięki temu można otrzymywać tłuszcze zmodyfikowane o pożądanej temperaturze topnienia i o określonych właściwościach krystalizacyjnych [6]. Proces przeestryfikowania może zachodzić w obecności katalizatorów chemicznych i biologicznych. Obecnie coraz większym zainteresowaniem cieszy się przeestryfikowanie tłuszczów z zastosowaniem katalizatorów biologicznych, jakimi są enzymy lipolityczne. W procesie enzymatycznego przeestryfikowania tłuszczów reakcje przebiegają z dostateczną szybkością w łagodnych warunkach, co umożliwia łatwiejsze sterowanie procesem i przerwanie go na z góry założonym etapie [15].

Celem pracy było określenie zmian, jakie zachodzą w mieszaninach tłuszczu mlekowego z olejem słonecznikowym w wyniku przeestryfikowania w obecności preparatu Novozym 435.

Materiał i metody badań

Przedmiotem badań były mieszaniny tłuszczu mlekowego i oleju słonecznikowego o składzie wagowym odpowiednio 1:3, 1:1, 3:1. Głównymi składnikami tłuszczu mlekowego są kwasy: palmitynowy (29,9%) oraz oleinowy (20,9%). W oleju słonecznikowym występuje głównie kwas linolowy (61,2%) oraz oleinowy (25,3%). Reakcje przeestryfikowania mieszanin wykonywano przez 2, 4 i 8 h w temp. 80°C w obecności preparatu enzymatycznego Novozym 435. Preparat ten zawiera lipazę niespecyficzną, otrzymaną z *Candida antarctica*, immobilizowaną na makroporowatej żywicy akrylowej. Zawartość wody w preparacie wynosiła 2%, a jego dozowanie wynosiło 8% względem masy tłuszczu.

W mieszaninach przed i po przeestryfikowaniu oznaczano liczbę kwasową metodą miareczkową [14]. Frakcje triacylogliceroli (TAG) izolowano metodą chromatografii kolumnowej [12]. W wyizolowanych z mieszanin fizycznych i produktów ich przeestryfikowania frakcjach triacylogliceroli oznaczano temperaturę mięknięcia metodą kapilary otwartej [13] – wykonywano dwa równoległe oznaczenia, a bezwzględne różnice pomiędzy wynikami nie przekraczały 0,5°C - oraz zawartość fazy stałej metodą pulsacyjnego protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego [11] – wykonywano po dwa równoległe oznaczenia, a bezwzględne różnice pomiędzy wynikami nie przekraczały wartości przewidzianych w Polskiej Normie [11].

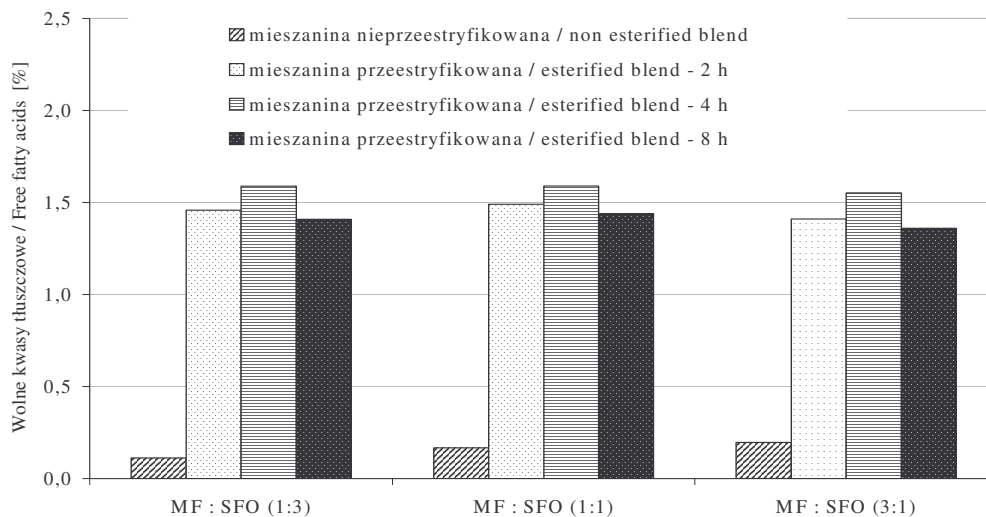
Określano również skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej [10] oraz ich rozmieszczenie w pozycjach *sn*-2 i *sn*-1,3 triacylogliceroli [2].

W tłuszczach, obok triacylogliceroli, znajdują się również pewne ilości mono- i diacylogliceroli, a także wolnych kwasów tłuszczowych stanowiących frakcję

nietriacyloglicerolową. Zwiększona zawartość tej frakcji w produkcie tłuszczowym może zmniejszać jego odporność na utlenianie, a także jest przyczyną strat substancji tłuszczowej [7]. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w mieszaninach fizycznych oraz w produktach ich przeestryfikowania została obliczona na podstawie liczb kwasowych oraz wyników oznaczeń GLC. Bezwzględna różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wolnych kwasów tłuszczowych nie przekraczała 3% średniej arytmetycznej tych wyników, co jest zgodne z Polską Normą [14].

Wyniki i dyskusja

W wyniku przeestryfikowania zaobserwowano znaczący wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych (rys. 1). W procesie enzymatycznego przeestryfikowania zachodzą dwie przeciwstawne reakcje: częściowa hydroliza i ponowna estryfikacja niepełnych acylogliceroli, co powoduje, że w końcowym produkcie obecne są, obok acylogliceroli, również pewne ilości wolnych kwasów tłuszczowych [6]. Największy wpływ na zawartość FFA ma czas trwania procesu enzymatycznego. Niezależnie od początkowego składu mieszanin fizycznych obserwowano wzrost zawartości FFA w ciągu pierwszych 2 h trwania procesu. Okres, po którym ustalała się równowaga wynosił około 4 h.



Rys. 1. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) w mieszaninach tłuszczu mlekowego (MF) z olejem słonecznikowym (SFO) przed i po przeestryfikowaniu.

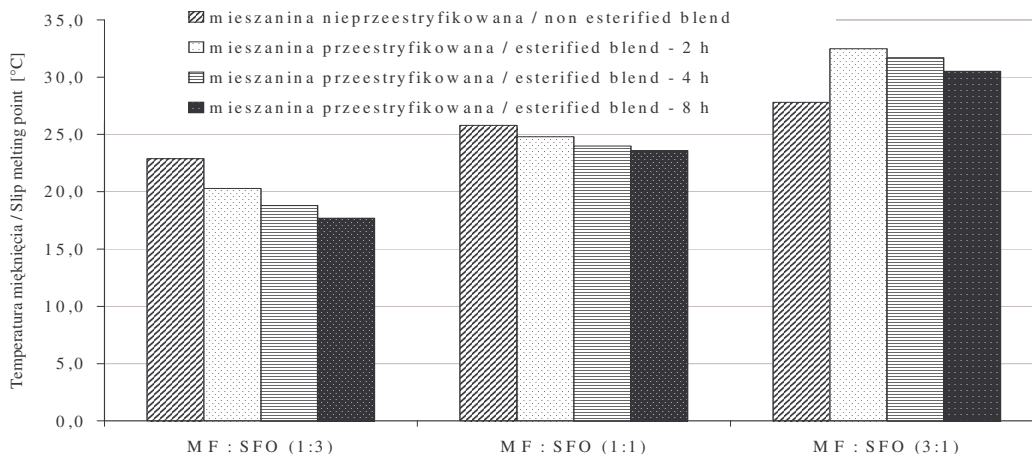
Fig. 1. The concentration of free fatty acids (FFA) for milkfat (MF) with sunflower oil (SFO) blends before and after interesterification.

Jedną z cech tłuszczów w znacznym stopniu określającą ich przydatność użytkową jest konsystencja. Cecha ta najczęściej musi być kształtowana w drodze różnorodnych zabiegów (fizycznych, chemicznych, mikrobiologicznych). Wynika to z faktu, że tłuszcze wprost pozyskiwane z surowców roślinnych lub zwierzęcych w nielicznych tylko przypadkach są akceptowane przez odbiorców i konsumentów. Najbardziej rozpowszechnionym wskaźnikiem konsystencji tłuszczów jest temperatura mięknięcia [5]. Analizując wartości tego parametru produktów przeestryfikowania w obecności preparatu Novozym 435 (rys. 2) stwierdzono, że temperatura mięknięcia zależała przede wszystkim od składu mieszanin wyjściowych. W przypadku mieszanin zawierających 25% lub 50% tłuszczu mlekowego obserwowano obniżenie temperatury mięknięcia frakcji triacylogliceroli wyizolowanych z produktów przeestryfikowania, natomiast w przypadku mieszaniny zawierającej 75% tłuszczu mlekowego obserwowano wzrost temperatury mięknięcia po przeestryfikowaniu. Obniżenie temperatury mięknięcia było tym większe, im mniejsza była zawartość tłuszczu mlekowego w mieszaninach wyjściowych. Wyniki te znajdują potwierdzenie w naszych wcześniejszych badaniach [3].

Redukcja lub podwyższenie temperatury mięknięcia nie zawsze jest oczywistym dowodem powstających po przeestryfikowaniu zmian w strukturze triacylogliceroli, a tym samym zmian konsystencji. Lepszym odzwierciedleniem jest zawartość fazy stałej, mierzona w szerokim zakresie temperatury [5]. W celu wzbogacenia tłuszczu mlekowego w niżej topliwe triacyloglicerole przeestryfikowywano go olejem słonecznikowym. Takie postępowanie pozwala również na wzbogacenie finalnego tłuszczu w kwasy polienowe, co ma istotne znaczenie ze względów żywieniowych.

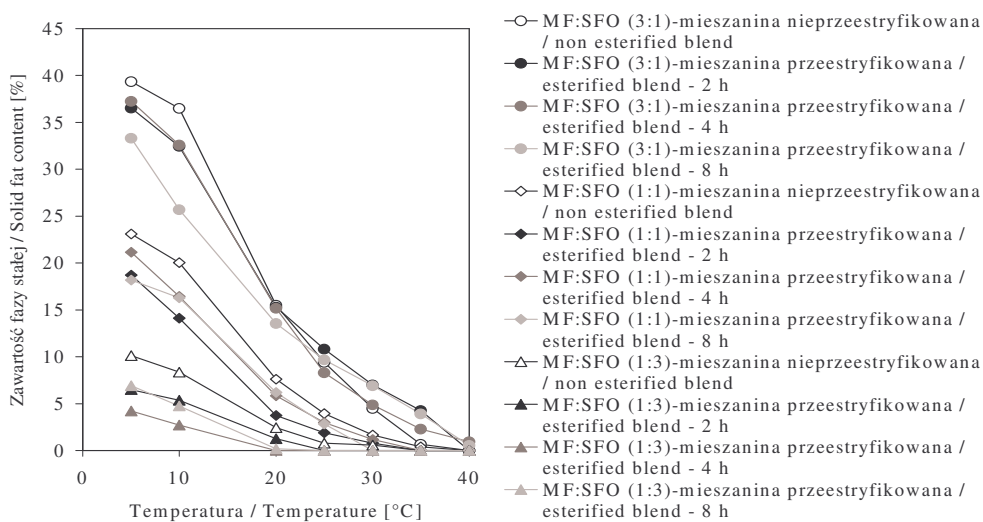
Analizując profile zmian zawartości fazy stałej (rys. 3) w triacyloglicerolach wyizolowanych z produktów przeestryfikowania mieszanin tłuszczu mlekowego z olejem słonecznikowym stwierdzono, że przeestryfikowanie spowodowało zmniejszenie zawartości fazy stałej w prawie wszystkich mieszaninach doświadczalnych. Redukcja zawartości fazy stałej jest związana z tym, że zmienia się stosunek wyżej topliwych triacylogliceroli do pozostałej ich części obecnej w mieszaninie po przeestryfikowaniu.

W analizie lipidów dużo uwagi poświęca się badaniom kwasów tłuszczowych. Rodzaj kwasów tłuszczowych występujących w danym tłuszczu oraz ich rozmieszczenie w cząsteczkach triacylogliceroli decydują o jego właściwościach. Analizując skład procentowy kwasów tłuszczowych w mieszaninach przeestryfikowanych (tab. 1) stwierdzono, że zmienił się on nieznacznie w porównaniu ze składem kwasów tłuszczowych mieszanin fizycznych. Wyniki wskazują na występowanie korzystnych ze względów żywieniowych kwasów polienowych w triacyloglicerolach finalnych produktów reakcji. Oznacza to, że nastąpiło wbudowanie się tych kwasów w powstałe w wyniku przeestryfikowania struktury triacylogliceroli.



Rys. 2. Temperatura mięknięcia triacylogliceroli mieszanin tłuszczu mlekowego (MF) z olejem słonecznikowym (SFO) przed i po przeestryfikowaniu.

Fig. 2. Slip melting points of triacylglycerols of milkfat (MF) with sunflower oil (SFO) blends before and after interesterification.



Rys. 3 Zawartość fazy stałej w funkcji temperatury w triacyloglicerolach mieszanin tłuszczu mlekowego (MF) z olejem słonecznikowym (SFO) przed i po przeestryfikowaniu.

Fig. 3 The solid fat content profiles as a function of temperature in triacylglycerols of milkfat (MF) with sunflower oil (SFO) blends before and after interesterification.

W trakcie przeestryfikowania zmienia się rozmieszczenie kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-2 i *sn*-1,3 triacylogliceroli. Preparat Novozym 435 zawiera lipazę niespecyficzną, zatem rozmieszczenie kwasów tłuszczowych pomiędzy pozycje *sn*-2 i *sn*-1,3 triacylogliceroli mieszanin przeestryfikowanych jest bliskie statystycznemu. W tab. 1. zamieszczono dane dotyczące udziału kwasów tłuszczowych w pozycjach

wewnętrznych triacylogliceroli (TAG) wybranej mieszaniny przeestryfikowanej (czas reakcji - 4 h). Rozmieszczenie kwasów tłuszczowych pomiędzy pozycje wewnętrzną i zewnętrzne TAG mieszanin przeestryfikowanych przez 8 h jest również bliskie statystycznemu. W naturalnym tłuszczu mlekowym nasycone kwasy tłuszczowe, takie jak palmitynowy czy mirystynowy są zlokalizowane w pozycji *sn*-2 triacylogliceroli. W procesie enzymatycznego przeestryfikowania z użyciem lipazy niespecyficzej następuje równomierny rozkład tych kwasów pomiędzy wszystkie pozycje w cząsteczkach triacylogliceroli [16].

Tabela 1

Skład wybranych kwasów tłuszczowych oraz udział poszczególnych kwasów w pozycjach wewnętrznych (*sn*-2) triacylogliceroli (TAG) mieszaniny tłuszczu mlekowego z olejem słonecznikowym (1:1) przed i po przeestryfikowaniu (czas reakcji: 4 h).

Fatty acid compositions and percentage of a given fatty acid in *sn*-2 position of triacylglycerols of 50% MF + 50% SFO mixture and its chosen interesterification product (time of interesterification: 4 h).

Kwas tłuszczowy Fatty acid n:m*	Skład kwasów tłuszczowych Fatty acid compositions [%]		Udział głównych kwasów tłuszczowych w pozycji <i>sn</i> -2 TAG Percentage of a given fatty acid in <i>sn</i> -2 position of TAG [%]	
	Mieszanina nieprzeestryfikowana Non esterified blend	Mieszanina przeestryfikowa na Esterified blend	Mieszanina nieprzeestryfikowana Non esterified blend	Mieszanina przeestryfikowana Esterified blend
14:0	5,2	5,9	53,8	39,0
16:0	20,1	20,7	31,0	35,9
18:0	7,2	6,2	14,4	27,4
18:1 (9-cis)	23,0	22,1	31,6	31,7
18:2 (all-cis)	32,1	32,5	38,4	31,9
18:3 (all-cis)	0,4	0,4	33,3	33,3

* n – liczba atomów węgla / number of carbon atoms; m – liczba podwójnych wiązań / number of double bonds

Zastosowanie katalizatora chemicznego także umożliwia uzyskanie ujednoczenia składu kwasów tłuszczowych we wszystkich pozycjach cząsteczek triacylogliceroli [3]. Przeestryfikowanie chemiczne wiąże się z koniecznością stosowania wysokiej temperatury oraz związków chemicznych jako katalizatorów, co może skutkować pogorszeniem jakości produktu końcowego [9]. Przeestryfikowanie w obecności lipaz przebiega natomiast w łagodnych warunkach, z dostateczną szybkością pozwalającą na przerwanie procesu na założonym etapie. Technologia związana z użyciem naturalnych

katalizatorów, jakimi są lipazy, nie stanowi zagrożenia dla środowiska oraz jest praktycznie bezodpadowa [15].

Wnioski

1. W przeestryfikowanych w obecności preparatu Novozym 435 mieszaninach tłuszczu mlekowego z olejem słonecznikowym stwierdzono wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w stosunku do ich zawartości w mieszaninach wyjściowych.
2. Temperatura mięknięcia i zawartość fazy stałej produktów przeestryfikowania zależały przede wszystkim od składu mieszanin wyjściowych.
3. Potwierdzono, że przeestryfikowanie nie powoduje zmian składu procentowego kwasów tłuszczowych w produktach w stosunku do mieszanin wyjściowych.
4. W wyniku przeestryfikowania nastąpiła zmiana rozmieszczenia kwasów tłuszczowych w triacyloglicerolach produktów reakcji w stosunku do ich rozmieszczenia w mieszaninach wyjściowych.
5. Rozkład kwasów tłuszczowych po reakcji przeestryfikowania w obecności preparatu Novozym 435 jest bliski statystycznemu.

Literatura

- [1] Balcao V. M., Malcata F. X.: Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotech. Adv.*, 1998, **16** (2), 309–341.
- [2] Brockerhoff H.: A stereospecific analysis of triglycerides. *J. Lipid Res.*, 1965, **6**, 10–15.
- [3] Bryś J., Gruczyńska E., Kowalski B., Tarnowska K.: Przeestryfikowanie mieszanin tłuszczu mlekowego i oleju rzepakowego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40) Supl., 18–26.
- [4] Chmura M., Staniewski B.: Przeestryfikowanie enzymatyczne jako metoda modyfikacji składu i właściwości tłuszczu mlekowego. *Przegl. Mlecz.*, 2001, **6**, 271–275.
- [5] Jakubowski A.: Przeestryfikowanie jako metoda modyfikacji konsystencji tłuszczów. *Tuszcze Jadalne*, 1990, **28** (2), 21–29.
- [6] Ledóchowska E., Datta I.: Enzymatyczne i chemiczne przeestryfikowanie mieszaniny oleju rzepakowego i stearyny palmowej. *Tuszcze Jadalne*, 1995, **30** (4), 169–183.
- [7] Ledóchowska E., Datta I.: Wpływ frakcji nietriacyloglicerolowej na stabilność oksydacyjną tłuszczu przeestryfikowanego chemicznie i enzymatycznie. *Żywność. Technologia. Jakość*, 1999, **18** (1), 15–23.
- [8] Marangoni A. G., Rousseau D.: Chemical and enzymatic modification of butterfat and butterfat-canola oil blends. *Food Res. Int.*, 1998, **31** (8), 595–599.
- [9] Marangoni A. G., Rousseau D.: Engineering triacylglycerols: the role of interesterification. *Trends Food Sci. Technol.*, 1995, **6** (10), 329–335.
- [10] PN-EN ISO 5508: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- [11] PN-EN ISO 8292: 1999. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości fazy stałej. Metoda pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego.

- [12] PN-EN ISO 8420: 1999. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości związków polarnych.
- [13] PN-ISO 6321: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie punktu topnienia w kapilarze otwartej (punkt płynięcia).
- [14] PN-ISO 660: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości.
- [15] Quinlan P., Moore S.: Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. *International News on Fats, Oils and Related Materials*, 1993, **4** (5), 580–585.
- [16] Rodrigues J. N., Gioielli L. A.: Chemical interesterification of milkfat and milkfat-corn oil blends. *Food Res. Int.*, 2003, **36** (2), 149–159.

INTERESTERIFICATION OF MILKFAT WITH SUNFLOWER OIL MIXTURES IN PRESENCE OF NOVOZYM 435

S u m m a r y

The aim of the research was to investigate the changes of the milkfat with sunflower oil mixtures as a result of the interesterification in the presence of enzymatic preparation Novozym 435. The subject of the examination were the milkfat with sunflower oil mixtures with the following weight composition: 1:3, 1:1, 3:1. The mixtures have been interesterified at the temperature of 80°C for 2, 4 and 8 hours in the presence of enzymatic preparation Novozym 435. After interesterification an increase in the free fatty acids content for all mixtures was observed. The slip melting temperatures and the solid fat contents of the interesterification products depended on the mixtures composition before the process. The interesterification has not influenced the composition of the fatty acids in triacylglycerols, but the structure of the triacylglycerols changed.

Key words: interesterification, milkfat, sunflower oil, Novozym 435 ☒