

Katarzyna Tarnowska, Joanna Bryś, Magdalena Kostecka,  
Magdalena Wirkowska, Bolesław Kowalski

## WPŁYW ILOŚCI WODY W KATALIZATORZE NA WŁAŚCIWOŚCI PRZEESTRYFIKOWANYCH ENZYMATYCZNIE MIESZANIN ŁOJU WOŁOWEGO I OLEJU RZEPAKOWEGO

Zakład Chemii Żywności Wydziału Nauk o Żywności  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Kierownik: dr P. Koczoń

*Określono wpływ ilości wody obecnej w preparacie enzymatycznym (Novozym 435) na wybrane właściwości przeestryfikowanych mieszanin łoju wołowego i oleju rzepakowego. W wyniku przeestryfikowania stwierdzono wzrost zawartości wolnych kwasów tłuszczowych i niepełnych acylogliceroli. Zawartość tych frakcji wzrastała wraz ze zwiększaniem ilości wody w preparacie enzymatycznym. Zawartość fazy stałej w produktach reakcji obniżała się w miarę wzrostu zawartości wody w preparacie enzymatycznym.*

Hasła kluczowe: przeestryfikowanie enzymatyczne, lipazy, łoź wołowy, olej rzepakowy.

Key words: enzymatic interesterification, lipases, beef tallow, rapeseed oil.

Jednym ze sposobów modyfikacji własności lipidów jest proces przeestryfikowania. Na szczególną uwagę zasługuje przeestryfikowanie tłuszczów przy użyciu enzymów lipolitycznych jako biokatalizatorów. Znaczącą rolę w procesie przeestryfikowania enzymatycznego odgrywa woda obecna w początkowym układzie reakcyjnym, a zwłaszcza w enzymie. Pewna jej ilość jest niezbędna dla właściwej aktywności enzymu, ponieważ lipazy katalizujące ten proces działają na granicy faz woda/olej. Nadmierna ilość wody w układzie reakcyjnym może spowodować dominację reakcji hydrolizy nad estryfikacją, co w przypadku przeestryfikowania tłuszczów jest niekorzystne (1, 2).

Celem pracy było zbadanie wpływu ilości wody obecnej w preparacie enzymatycznym na wybrane właściwości przeestryfikowanych mieszanin łoju wołowego i oleju rzepakowego.

### MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań były mieszaniny łoju wołowego (T) z olejem rzepakowym (RSO) o składzie 3:1, 1:1, 1:3 (m/m). Mieszaniny przeestryfikowywano enzymatycznie w obecności preparatu Novozym 435 (Novozymes – Dania) zawierającego immobilizowaną lipazę z *Candida antarctica* niespecyficzną względem wiązań

estrowych w triacyloglicerolach. Zawartość wody w preparacie Novozym 435 wynosiła 2, 6 i 10% w stosunku do masy preparatu, co odpowiadało określonymu stopniowi uwodnienia układu reakcyjnego: 0,15; 0,44 i 0,74%. Reakcję przeestryfikowania prowadzono przez 4 godziny w temperaturze 80°C. Dozowanie katalizatora ustalono na poziomie 8% w stosunku do substratu tłuszczowego.

W mieszaninach przed i po przeestryfikowaniu oznaczano liczbę kwasową metodą miareczkową (3) oraz zawartość frakcji polarnej metodą chromatografii kolumnowej (4). We frakcjach triacylogliceroli wyizolowanych z mieszanin fizycznych i produktów ich przeestryfikowania oznaczano temperaturę mięknięcia metodą kapilary otwartej (5) oraz zawartość fazy stałej metodą pulsacyjnego jądrowego rezonansu magnetycznego (6). Oznaczono również skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej (GLC) (7) oraz ich rozmieszczenie w pozycjach *sn-2* i *sn-1,3* triacylogliceroli metodą *Brockerhoffa* (8).

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

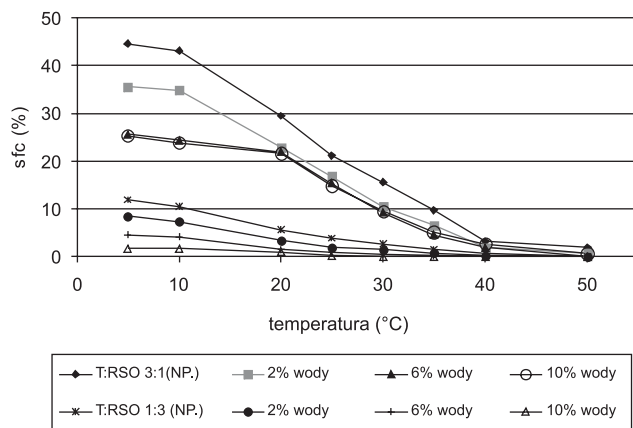
W procesie enzymatycznego przeestryfikowania zachodzą równocześnie dwie reakcje: hydroliza i estryfikacja. Proces hydrolizy powoduje, że w uzyskanych produktach obok wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) i triacylogliceroli (TAG) pojawiają się diacyloglicerole (DAG) i monoacyloglicerole (MAG). Analizując zmiany udziałów procentowych tych frakcji w produktach przeestryfikowania (tab. I) w zależności od ilości wody obecnej w enzymie katalizującym proces stwierdzono, że w miarę wzrostu zawartości wody w preparacie Novozym 435 następuje zwiększenie udziału WKT, DAG i MAG, a obniżenie wydajności TAG – największe w przeestryfikowanej mieszaninie T:RSO (3:1). Świadczy to o przesuwaniu się równowagi reakcji hydroliza – estryfikacja w kierunku hydrolizy tłuszczu. Podobne zależności zaobserwowali autorzy innych prac dotyczących systemów o różnej zawartości wody (9–11). *Forssell* wykazał (9), że reakcja hydrolizy zachodzi nawet przy tak minimalnej ilości wody, jaka znajduje się w enzymie liofilizowanym (~0,05% wody w mieszaninie). Stwierdzono także, że nawet stosunkowo małe zmiany zawartości wody w układzie znacząco wpływały na stopień hydrolizy tłuszczu.

Tab e l a I. Zawartości wolnych kwasów tłuszczowych (WKT), frakcji niepełnych acylogliceroli (DAG+MAG), triacylogliceroli (TAG) oraz temperatura mięknięcia (SMP) mieszanin przed (NP) i po przeestryfikowaniu

Table I. Free fatty acids (WKT), mono- and diacylglycerol (DAG+MAG), triacylglycerol (TAG) contents and slip melting point (SMP) for initial mixtures (NP) and interesterification products

Oznaczenia	T:RSO (3:1)				T:RSO (1:1)				T:RSO (1:3)			
	Zawartość wody w preparacie enzymatycznym (%)											
	NP	2	6	10	NP	2	6	10	NP	2	6	10
WKT (%)	0,6	2,3	5,3	7,3	0,4	2,3	5,2	8,7	0,2	2,2	5,2	6,1
DAG+MAG (%)	2,4	6,2	9,3	25,2	1,8	7,6	13,3	11,8	0,9	5,7	7,3	11,4
TAG (%)	97,0	91,5	85,4	67,5	97,8	90,1	81,5	79,5	98,9	92,1	87,5	82,5
SMP (°C)	38,5	38,4	37,6	37,2	34,4	28,4	32,6	30,0	32,9	19,0	21,0	16,6

Po oznaczeniu temperatury mięknięcia (SMP) matryc triacylogliceroli wyizolowanych z produktów reakcji i porównaniu z danymi dla mieszanin wyjściowych (tab. I) zaobserwowano, że dla składów zawierających mało łożu (25%) obniżenie SMP jest bardzo wyraźne (maksymalnie o  $16,3^{\circ}\text{C}$ ), natomiast dla mieszanin zawierających dużo łożu, SMP pozostaje praktycznie bez zmian. Podobny kierunek zmian stwierdzono w innych pracach (9,13,14), gdzie wraz ze wzrostem udziału tłuszczu twardego w mieszaninie uzyskiwano coraz mniejsze obniżenie SMP w stosunku do mieszaniny wyjściowej. Nie ustalono ścisłych zależności między zawartością wody w katalizatorze a temperaturą mięknięcia otrzymanych produktów.



Ryc. 1. Zawartość fazy stałej (sfc) w funkcji temperatury w TAG przed (NP) i po przeestryfikowaniu mieszanin T:RSO (3:1) i (1:3).

Fig. 1. The solid fat content versus temperature for initial T:RSO (3:1) i (1:3) mixtures (NP) and TAG isolated after interesterification.

Innym wskaźnikiem konsystencji tłuszczu jest zawartość fazy stałej (sfc) w funkcji temperatury. Wpływ ilości wody obecnej w enzymie reakcji na sfc przeestryfikowanych tłuszczów zaprezentowano na przykładzie mieszanin o największym i najmniejszym udziale łożu (ryc. 1). Stwierdzono, że sfc w produktach reakcji, w porównaniu z mieszaninami wyjściowymi obniża się w miarę wzrostu zawartości wody w układzie. Może to świadczyć o maksymalnej, w ramach prowadzonego doświadczenia, aktywności lipazy zawierającej 10% wody. Obserwacje te są zgodne z danymi literaturowymi dotyczącymi mieszanin innych tłuszczów twardych, np. stearyny palmowej z tłuszczem mlecznym (12).

Stosowana w doświadczeniach lipaza, wg instrukcji producenta, charakteryzuje się zarówno specyficnością pozycyjną, jak i jej brakiem w zależności od rodzaju katalizowanej reakcji. Ważnym aspektem badań było sprawdzenie regioselektywności preparatu enzymatycznego Novozym 435 w warunkach przeprowadzonych doświadczeń. W tabeli II pokazano rozkład ważniejszych kwasów tłuszczowych TAG wybranej mieszaniny T:RSO (3:1) przeestryfikowanej w obecności Novozym 435 zawierającym 2% wody.

W wyniku przeestryfikowania nastąpiło przegrupowanie acyli kwasowych dające zbliżoną do statystycznej dystrybucję kwasów tłuszczowych we wszystkich pozycjach TAG. Podobny kierunek zmian stwierdzono dla pozostałych mieszanin (13, 14).

Table I a. Skład ważniejszych kwasów tłuszczowych TAG mieszaniny T:RSO (3:1 m/m) oraz udział procentowy kwasów tłuszczowych w pozycji sn-2 przed i po przeestryfikowaniu

Table II. Fatty acids composition for TAG of T:RSO (3:1 w/w) mixture and percentage of a given fatty acid in sn-2 position before and after interesterification

Rodzaj kwasu tłuszczowego	Skład kwasów tłuszczowych w TAG (%)	Przed przeestryfikowaniem		Po przeestryfikowaniu	
		Skład kwasów tłuszczowych w pozycji sn-2	Udział danego kwasu w pozycji sn-2 (%)	Skład kwasów tłuszczowych w pozycji sn-2	Udział danego kwasu tłuszczowego w pozycji sn-2 (%)
14:0	2,9	5,5	63,2	2,9	40,3
16:0	23,0	15,8	22,9	22,7	33,3
16:1 (9-cis)	3,5	3,6	32,7	2,3	34,8
18:0	11,6	6,4	18,4	17,4	32,8
18:1 (9-cis)	40,5	42,9	35,2	40,6	33,5
18:2 (all-cis)	6,1	8,8	48,3	5,7	36,5
18:3 (all-cis)	2,5	4,0	51,3	2,5	37,9

## WNIOSKI

1. Proces przeestryfikowania spowodował wzrost zawartości frakcji niepełnych acylogliceroli (DAG+MAG) i wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) we wszystkich badanych tłuszczach. Zawartość tych frakcji wzrastała wraz ze zwiększającym się stopniem uwodnienia biokatalizatora.

2. Wartości temperatur mięknięcia produktów przeestryfikowania zależały przede wszystkim od składu mieszanin wyjściowych.

3. Zawartość fazy stałej w produktach reakcji, w porównaniu z mieszaninami wyjściowymi obniżała się w miarę wzrostu zawartości wody w układzie reakcyjnym.

4. Produkty przeestryfikowania charakteryzowały się bliskim statystycznemu rozmieszczeniem kwasów tłuszczowych w cząsteczkach TAG.

K. Tarnowska, J. Bryś, M. KostECKA, M. Wirkowska, B. Kowalski

THE INFLUENCE OF THE WATER CONTENT IN CATALYST ON THE PROPERTIES OF ENZYMATICALLY INTERESTERIFIED BEEF TALLOW AND RAPESEED OIL BLENDS

### Summary

The influence of the water content in catalyst (Novozym 435) on some selected properties of the interesterified blends of beef tallow and rapeseed oil was defined. It was stated that after interesterification the concentration of free fatty acids and partial acylglycerols content increased. The increase of this fractions was proportional to the water content in enzymatic catalyst used for interterification. The reductions of solid fat content for TAG from interesterified blend were proportional to the water content in Novozym 435.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Marangoni A.G., Rousseau D.*: Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends Food Sci. Technol.*, 1995; 6: 329-335. – 2. *Malcata F., Malcata F.X., Reyes H.R., Gracia H.S., Hill Ch.G., Amundson Jr.C.H.*: Kinetics and mechanism of reaction catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992; 14: 426-446. – 3. PN-ISO 660: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie liczby kwasowej i kwasowości. – 4. PN-EN ISO 8420: 1999. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości związków polarnych. – 5. PN-ISO 6321: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie punktu topnienia w kapilarze otwartej (punkt płynięcia). – 6. PN-ISO 8292: 1999. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Oznaczanie zawartości fazy stałej. Metoda pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego. – 7. PN-EN ISO 5509: 2000. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej. – 8. *Brockerhoff H.*: A stereospecific analysis of triglycerides. *J. Lipid Res.*, 1965; 6: 10-15. – 9. *Forsell P., Kervinen R., Lappi M., Linko P., Suortti T., Poutanen K.*: Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow (LEAR) mixture. *JAOCS*, 1992; 69(2): 126-129. – 10. *Chang H., Xu X., Mu H., Nisson J. Adler-Nissen J., Hoy C.E.*: Lipozyme IM – catalyzed interesterification for the production of margarine fats in 1 kg scale stirred tank reactor. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2000; 102: 411-418.
11. *Ledóchowska E., Datta I.*: Optimization of enzymatic interesterification of fats to increase the content of triacylglycerols in the reaction product. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1998; 7/48 (4): 683-691. – 12. *Lai O.M., Ghazali H.M., Cho F., Chong C.L.*: Physical properties of lipase – catalyzed transesterified blends of palm stearin and anhydrous milkfat. *Food Chem.*, 2000; 70: 215-219. – 13. *Kowalski B., Tarnowska K., Gruczyńska E., Bekas W.*: Chemical and enzymatic interesterification of beef tallow and rapeseed oil equal-weight blend. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2004; 106: 655-664. – 14. *Kowalski B., Tarnowska K., Gruczyńska E., Bekas W.*: Chemical and enzymatic interesterification of beef tallow and rapeseed oil blend with low content of tallow. *J. Oleo Sci.*, 2004; 53 (10): 479-488.

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166.