بهینه‌سازی تولید روغن فراسودمند دی‌آسیل‌گلیسرول از روغن گلرنگ و بررسی خصوصیات آن

سید محمد صحافی[۱]، سید امیرحسین گلی[۲]*، مهدی کدیور[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۲۰)

چکیده

روغن دی‌آسیل‌گلیسرول به عنوان یک ترکیب مفید برای سلامتی انسان شناخته شده و از آن به عنوان روغن پخت و پز فراسودمند و حتی دارویی یاد می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی پارامترهای مؤثر در تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول از روغن گلرنگ و بهینه‌سازی واکنش در جهت حداکثر تولید می‌باشد. پس از استخراج روغن از دانه گلرنگ، از روش گلیسرولیز آنزیمی برای تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول استفاده شد. شرایط تیمارهای انتخابی با استفاده از نرم‌افزار Design-expert تعیین شد و پس از مدل‌سازی فرآیند بهینه‌سازی صورت گرفت و در نهایت برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی روغن تولیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تعیین مدل مشخص شد که اثر متغیر آنزیم به صورت خطی معنی‌دار و اثر متغیرهای زمان و مقدار گلیسرول به صورت درجه دوم معنی‌دار می‌باشند. همچنین بین متغیرهای آنزیم و زمان، آنزیم و مقدار گلیسرول و زمان و مقدار گلیسرول اثر متقابل معنی‌دار وجود دارد. نتایج نشان داد که روغن دی‌آسیل‌گلیسرول در مقایسه با روغن گلرنگ از لحاظ وزن مخصوص و عدد یدی تفاوتی نداشته ولی از لحاظ ضریب شکست، رنگ و عدد پراکسید دارای تفاوت می‌باشد. بیشترین مقدار تولید DAG، ۴۸/۴۵۴ درصد در دمای ۴۶/۹ درجه سانتیگراد، زمان ۴ ساعت، مقدار آنزیم ۰/۷۵ درصد روغن گلرنگ و نسبت مولی گلیسرول به روغن ۲ به ۱ به دست آمد که پس از انجام خالص‌سازی مقدار آن به ۵۳/۸۴ درصد افزایش یافت.

کلید واژگان: روغن گلرنگ، لیپاز TL IM، گلیسرولیز، دی‌آسیل‌گیسرول، روش سطح پاسخ

*مسئول مکاتبات: amirgoli@cc.iut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

۱- مقدمه

دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG) استر الکل گلیسرول با دو اسید چرب است که دارای دو ساختار ایزومری sn-1,2(2,3) و sn-1,3 می‌باشد[۱]. اکثر روغن‌های خوراکی به طور معمول دارای مقادیر متفاوتی از DAG هستند که بیشترین مقدار آن در روغن پنبه‌دانه به میزان ۹/۵ و کمترین مقدار آن در روغن کانولا به میزان ۰/۸ درصد گزارش شده است[۲، ۳]. در سال ۱۹۹۹، روغن DAG با ترکیبی از روغن‌های سویا و کانولا برای اولین بار در ژاپن و در سال ۲۰۰۰ در آمریکا تولید شد. شایان ذکر است که این روغن در سال ۲۰۰۰ توسط اداره غذا و دارو آمریکا (FDA) به عنوان یک ترکیب مفید برای سلامتی انسان (GRAS) شناخته شده و در هر دو کشور مذکور این نوع روغن به عنوان روغن پخت و پز فراسودمند و حتی دارویی یاد می‌شود[۴، ۵]. امروزه روغن‌های DAG با روغن‌های معمول که حاوی TAG هستند از لحاظ خصوصیات مختلف مقایسه می‌شوند. روغن‌های DAG دارای عطر، طعم و رنگ ملایم هستند و از مقاومت اکسیداتیو و هیدرولیتیک خوبی برخوردار می‌باشند[۶، ۷].

تحقیقات انجام شده بر روی روغن‌های دی‌آسیل‌گلیسرول نشان می‌دهد که تفاوت ناشی از مصرف DAG نسبت به TAG به علت اختلاف مراحل هضم، جذب و مسیر متابولیکی در بدن می‌باشد[۸]. افرادی که روغن دی‌آسیل‌گلیسرول مصرف می‌کنند کمتر احساس گرسنگی کرده و اشتهای کمتری به غذا دارند که این نشان دهنده تمایل بیشتر این روغن به واکنش بتااکسیداسیون برای تولید انرژی نسبت به ذخیره‌سازی چربی است و به همین دلیل برای افراد چاق توصیه می‌شود[۲، ۹، ۱۰]. در مطالعه‌ای میزان انرژی حاصل از روغن‌های DAG و TAG با ترکیب اسیدهای چرب یکسان به روش بمب کالریمتری اندازه‌گیری شد که مقدار آن به ترتیب ۳۸/۹ و ۳۹/۶ کیلوژول بر گرم بود، به عبارتی میزان انرژی حاصل از روغن DAG معادل ۹۸ درصد میزان انرژی حاصل از روغن TAG می‌باشد که نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین مقدار انرژی حاصل از این دو وجود ندارد[۱۱]. از این نوع روغن در موارد مختلفی نظیر روغن طباخی، سرخ‌کردنی، سالاد، قنادی، مارگارین و شورتنینگ، نانوایی، مربا و ژله، صنایع لبنی، نوشیدنی‌ها، تولید پلیمرهای ترموپلاستیک، جایگزینی برای سوخت‌های فسیلی، مواد آرایشی و صنایع داروسازی استفاده می‌شود[۱۲، ۱۳]. با توجه به نزدیک بودن خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن دی‌آسیل‌گلیسرول با روغن تری‌آسیل‌گلیسرول، در صورتی که از این روغن در تولید محصولات مختلف استفاده شود می‌توان انتظار داشت که محصول جدید در مقایسه با محصولات تولیدی از روغن تری‌آسیل‌گلیسرول تفاوت چندانی نداشته باشد.

روغن DAG را می‌توان به روش‌های مختلفی نظیر هیدرولیز، الکولیز و استریفیکاسیون و یا ترکیبی از این روش‌ها تولید کرد. محیط واکنش در هر کدام از این روش‌ها می‌تواند در حضور حلال و یا عدم حضور حلال باشد، همچنین از کاتالیزورهای شیمیایی و آنزیمی برای تسریع این واکنش‌ها می‌توان استفاده کرد. از بین این روش‌ها معمولاً روش گلیسرولیز آنزیمی به دلیل ارزان‌بودن، شرایط واکنش ملایم، تخریب حرارتی کمتر مواد اولیه و محصولات نهایی، امکان مصرف انرژی کمتر، کنترل راحت فرآیند، عدم حضور حلال و هزینه‌های حذف آن به عنوان بهترین روش انتخاب می‌شود.

چونگ و همکاران (۲۰۰۷) به روش هیدرولیز نسبی آنزیمی (Novozym 435)، تولید روغن پالم اولئین غنی از دی‌آسیل‌گلیسرول را در محیط بدون حلال بهینه‌سازی کرد. بهترین راندمان در شرایطی که نمونه حاوی ۵۰ درصد وزنی آب، ۱۰ درصد وزنی آنزیم، دمای $۶۵^{\circ}C$ و زمان ۱۲ ساعت بود به دست آمد که بعد از خالص‌سازی مقدار DAG به ۶۰ درصد وزنی رسید[۱۴]. فرگولنت و همکاران (۲۰۰۹) از روغن سویا و آنزیم Novozym 435 برای تولید دی‌آسیل‌گلیسرول در محیط بدون حلال استفاده کردند. روغن دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی حاوی ۲۹/۸۳ درصد تری‌آسیل‌گلیسرول، ۵۳/۲۰ درصد دی‌آسیل‌گلیسرول، ۱۵/۶۴ درصد منوآسیل‌گلیسرول و ۱/۳۳ درصد اسیدهای چرب آزاد بود که چنین ترکیب روغنی می‌تواند جایگزین مناسبی برای روغن تری‌آسیل‌گلیسرول در رژیم غذایی باشد[۱۵]. لو و همکاران (۲۰۰۷) بهینه‌سازی تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول را به روش استریفیکاسیون اسید چرب و گلیسرول با استفاده از آنزیم تثبیت شده Lipozyme RM IM انجام دادند. بهترین راندمان تولید در دمای $۶۶/۲۹^{\circ}C$، ۴ درصد وزنی آنزیم، نسبت مولی اسید چرب به گلیسرول ۲/۱۴ و زمان واکنش ۴/۱۴ ساعت به دست آمد که منجر به تولید ۴۸ درصد وزنی DAG شد[۱۶].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

هدف از انجام این مطالعه تولید روغن حاوی DAG از روغن گلرنگ به روش گلیسرولیز آنزیمی در محیط بدون حلال بود. در این تحقیق ابتدا اثر پارامترهای مختلف در تولید روغن DAG توسط روش سطح پاسخ (RSM) بررسی گردید و شرایط بهینه تولید این نوع روغن به روش گلیسرولیز تعیین شد. در مرحله بعد برخی از خواص روغن DAG با روغن اولیه گلرنگ بررسی و مقایسه گردید.

۲- مواد و روش‌ها

دانه گلرنگ از شرکت کشت و توسعه دانه‌های روغنی در اصفهان تهیه شد. حلال هگزان صنعتی از کارخانه تولید مواد شیمیایی شهرضا، گلیسرول از شرکت مرک و استاندارهای منوآسیل‌گلیسرول (MAG) و دی‌آسیل‌گلیسرول (DAG) از شرکت سیگما خریداری و آنزیم‌میکروبی TL IM از شرکت نووزایم در تهران تهیه شد.

۲-۱- استخراج روغن گلرنگ

به منظور استخراج روغن از دانه‌های گلرنگ، ابتدا دانه‌ها توسط آسیاب خرد شده و سپس عمل استخراج روغن با استفاده از حلال هگزان به نسبت ۲ به ۱ در دو نوبت به مدت ۲۴ ساعت و در دمای اتاق انجام گرفت. ذرات جامد توسط کاغذ صافی از حلال حاوی روغن جدا گردید و در پایان حلال توسط دستگاه تبخیر کننده تحت خلأ از روغن خارج شده و روغن گلرنگ در ظروف پلی‌اتیلن با پوشش آلومینیوم فویل در یخچال به منظور انجام آزمایشات بعدی نگهداری شد[۱۷، ۱۸، ۱۹].

۲-۲- تعیین ترکیب اسیدهای چرب در روغن گلرنگ و روغن دی‌آسیل‌گلیسرول

برای تعیین پروفیل اسیدهای چرب در روغن گلرنگ از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 6890N ساخت آمریکا استفاده و طبق روش Goli و همکاران (۲۰۰۸) متیل استر اسیدهای چرب تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از روغن گلرنگ در ۱ میلی‌لیتر هگزان حل شد سپس ۱۰۰ میکرولیتر از متوکسید سدیم متانولی ۰/۵ نرمال به آن اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. در انتها نمونه متیله شده در تماس با سولفات سدیم بدون آب قرار گرفت تا رطوبت آن خارج شود[۲۰]. ستون مورد استفاده HP-88 به طول ۱۰۰ متر، قطر ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۰ میکرومتر بوده و از گاز نیتروژن به عنوان گاز حامل با فلوریت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. برنامه دمایی ستون به این صورت بود که در دمای ۱۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه مانده، با سرعت ۵ درجه سانتیگراد در دقیقه به دمای ۲۱۰ درجه سانتیگراد رسیده و به مدت ۸ دقیقه در این دما مانده و سپس با سرعت ۵ درجه سانتیگراد در دقیقه به دمای ۲۴۰ درجه سانتیگراد رسیده و به مدت ۶ دقیقه در این دما نگه داشته می‌شود. آشکارساز دستگاه GC از نوع FID با دمای ۲۵۰ درجه سانتیگراد، دمای تزریق ۱۵۰ درجه سانتیگراد و حجم تزریق ۱ میکرولیتر با حالت Split ۱ به ۳۰ بود[۲۱].

۲-۳- تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول

برای تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول از روش گلیسرولیز آنزیمی در محیط بدون حلال استفاده شد[۲۲، ۲۳]. آنزیم مورد استفاده در این تحقیق Lipozyme TL IM بود. مقدار روغن گلرنگ مورد استفاده در تمامی آزمایش‌ها ۳۰ گرم در نظر گرفته و روغن حاوی DAG تحت پارامترهای مختلفی شامل دمای واکنش (۵۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتیگراد)، زمان واکنش (۸، ۱۶ و ۲۴ ساعت)، مقدار آنزیم (۵، ۱۰ و ۱۵ درصد وزنی روغن گلرنگ) و نسبت مولی گلیسرول به روغن گلرنگ (۱ به ۱، ۲ به ۱ و ۳ به ۱) در دور ثابت همزن (۴۰۰ rpm) تولید شد.

۲-۴- تعیین میزان دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی

به منظور تعیین میزان تولید DAG و بررسی راندمان تولید از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 6890N ساخت آمریکا استفاده و طبق روش AOCS 11b-91 عمل شد. در این روش برای تشخیص MAG، DAG و TAG ابتدا نمونه روغن حاوی DAG توسط BSTFA (N,O-bistrimethylsilyltrifluoroacetamide) و کاتالیزور TMCS (Trimethylchlorosilane) در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه مشتق‌سازی شد[۲۱]. این ترکیبات با اتصال به گروه‌های هیدروکسیل فعال گلیسریدها باعث تفکیک آن‌ها در ستون می‌شود. ستون مورد استفاده HP-5 حاوی ۵ درصد فنیل متیل سیلوکسان به طول ۳۰ متر، قطر ۳۲۰ میکرومتر و ضخامت فاز ثابت ۰/۲۵ میکرومتر بوده و از گاز هلیم به عنوان گاز حامل با فلوریت ۵ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد. برنامه دمایی ستون به این صورت بود که از دمای ۸۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰ درجه سانتیگراد به دمای ۳۲۰ درجه سانتیگراد رسیده و به مدت ۲۶ دقیقه در این دما نگه داشته شد. آشکارساز مورد استفاده در دستگاه GC از نوع

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

FID با دمای ۳۵۰ درجه سانتیگراد، دمای تزریق ۳۲۰ درجه سانتیگراد، مقدار تزریق ۲ میکرولیتر با حالت Split ۱ به ۳۰ بود[۲۱].

۲-۵- خالص‌سازی روغن دی‌آسیل‌گلیسرول

پس از تولید اسیدهای چرب آزاد موجود در مخلوط واکنش با استفاده از یک قلیا خنثی‌سازی شدند. به این ترتیب که مخلوط واکنش همراه با ۱۰۰ میلی‌لیتر پترولیوم اتر در یک فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری در مقابل سود ۰/۱ نرمال و معرف فنل فتالئین تیتر شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط آب/ اتانول به نسبت حجمی ۱:۱ اضافه شده و پس از همزدن ملایم به یک قیف جداکننده ۲۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. چند دقیقه‌ای فرصت داده شد تا فاز آبی و آلی از یکدیگر جدا شوند. سپس فاز آبی را جدا کرده و پس از انتقال فاز آلی به یک فلاسک ته گرد ۵۰۰ میلی‌لیتری، با استفاده از اواپراتور چرخان تحت خلأ و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، فاز آلی تبخیر شد. روغن حاصل به ظرف‌های مخصوص منتقل شده و تا زمان آزمایش، در دمای یخچال نگهداری شد[۹].

۲-۶- تعیین برخی خصوصیات فیزیکوشمیایی

اندازه‌گیری ضریب شکست با استفاده از رفرکتومتر دیجیتال کروس مدل DR 201-95، وزن مخصوص مطابق AOCS روش Cc 10a-25، عدد پراکسید مطابق AOCS روش Cd 8-53، عدد یدی مطابق AOCS روش Cd 1-25 و ارزیابی رنگ نمونه‌ها در دستگاه رنگ سنج بر پایه‌سیستم رنگ *L، *a و *b انجام شد[۲۱]. در این سیستم اندیس *L درجه‌روشنایی(سفیدی یا سیاهی)، اندیس *a تمایل به قرمز یا سبز بودن و اندیس *b درجه زرد یا آبی بودن را نشان می‌دهد. اندیس‌های *a و *b منفی، به ترتیب مشخص کننده‌غالب بودن رنگ سبز و آبی می‌باشند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیب اسیدهای چرب روغن گلرنگ و روغن دی‌آسیل‌گلیسرول

در جدول ۱ نوع و میزان اسیدهای چرب روغن گلرنگ نشان داده شده است. بیشترین مقدار اسید چرب مربوط به اسید لینولئیک و اسید اولئیک به ترتیب با درصدهای ۸۱/۵۷ و ۱۱/۲۰ است. با توجه به این ترکیب می‌توان گفت که روغن گلرنگ منبع غنی از اسید لینولئیک است که این اسید چرب یکی از اسیدهای چرب ضروری (امگا-۶) به شمار می‌رود. به این ترتیب با توجه به غالب بودن اسید لینولئیک در روغن گلرنگ، ارزش غذایی قابل توجهی را می‌توان برای آن در نظر گرفت. علاوه بر آن با توجه به این که در این تحقیق، تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول با استفاده از روغن گلرنگ صورت گرفته است بنابراین انتظار می‌رود روغن تولید شده نیز عمدتاً حاوی اسید لینولئیک باشد که این مسئله بر خصوصیات مثبت روغن دی‌آسیل گلیسرول تولیدی می‌افزاید. از طرف دیگر میزان کم اسید لینولنیک در روغن گلرنگ موجب پایداری مناسب این روغن در برابر اکسیداسیون می‌شود که در فرآیند تولید دی‌آسیل‌گلیسرول یک فاکتور مطلوب به حساب می‌آید.

۳-۲- مدل‌سازی

برای تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول از روش گلیسرولیز آنزیمی در محیط بدون حلال استفاده شد. با استفاده از نرم افزار، ۲۵ تیمار مختلف بر اساس سطوح متغیرهای مورد بررسی مشخص شد و سپس آزمایش‌ها بر اساس تیمارهای تعیین شده انجام گرفت. آنالیز آماری مدل‌ها در جدول۲ آورده شده است.

با توجه به نتایج، نرم افزار مدلی را پیشنهاد می‌کند که دارای انحراف استاندارد (S.D.) و مجموع مربعات باقیمانده برآورد شده (Press) کم و ضریب همبستگی (R^2) زیاد باشد که در مورد این تحقیق نرم افزار، مدل درجه دوم را به دلیل داشتن این ویژگی‌ها پیشنهاد کرد. در این بررسی مدل‌مربوط تولید دی‌آسیل‌گلیسرول در سطح احتمال ۹۵ درصد تعیین شد و مدل مربوط به آن در معادله ۱ آورده شده است (X_1، X_2، X_3 و X_4 به ترتیب بیانگر مقدار آنزیم، زمان، دما و نسبت مولی گلیسرول به روغن می‌باشند).

معادله ۱ نشان می‌دهد اثر متغیر آنزیم به صورت خطی معنی‌دار و اثر متغیرهای زمان و مقدار گلیسرول به صورت درجه دوم معنی‌دار می‌باشند. همچنین بین دو متغیرهای آنزیم و زمان، آنزیم و مقدار گلیسرول و زمان و مقدار گلیسرول اثر متقابل معنی‌دار وجود دارد.

معادله ۱)

$$Y = ۳۱/۵۰۶۹۷ - ۱/۰۷۰۸۳ X_1 - ۱/۱۰۰۳۵ X_2 + ۲/۶۸۱۸۴ X_4 + ۰/۰۲۰۴۵۸ X_2^2 - ۰/۲۶۸۸۶ X42 - ۰/۰۲۴۲۸۲ X1X2 + ۰/۱۱۲۴۵ X1X4 + ۰/۰۳۸۸۰۶ X2X4$$

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

جدول۱ ترکیب اسیدهای چرب روغن گلرنگ و روغن دی‌آسیل‌گلیسرول

اسیدهای چرب	روغن گلرنگ (درصد)	روغن دی‌آسیل‌گلیسرول (درصد)
اسید میریستیک	۰/۱ ±۰/۰۰	۰/۹۹ ±۰/۰۰
اسید پالمتیک	۵/۴۵ ±۰/۰۵	۵/۳۷ ±۰/۱
اسیداستئاریک	۱/۵۳ ±۰/۰۹	۱/۶۱ ±۰/۰۲
اسید اولئیک	۱۱/۲۰ ±۰/۰۴	۱۱/۲۴ ±۰/۰۶
اسید لینولئیک	۸۱/۵۷ ±۰/۱۱	۸۱/۵۰ ±۰/۰۳
اسید لینولنیک	۰/۱۳ ±۰/۰۱	۰/۱۶ ±۰/۰۵

داده‌های جدول میانگین سه تکرار ± S.D. را نشان می‌دهند.

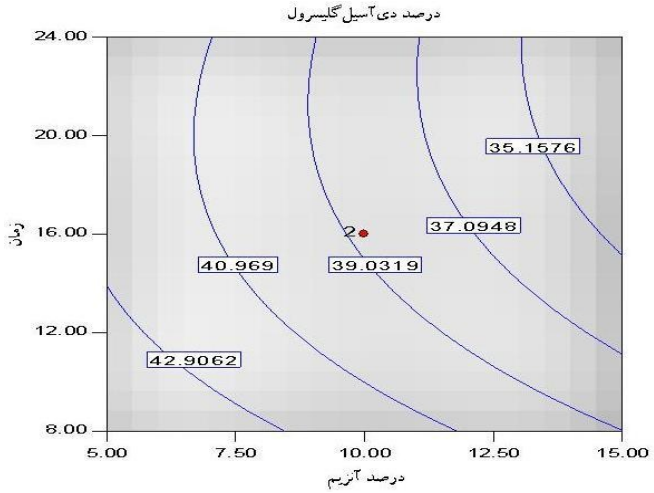
جدول۲ آنالیز آماری مدل‌ها

مدل	S.D.	R^2	R^2 تعدیل شده	R^2 پیش‌بینی شده	Press
خطی	۲/۱۲	۰/۸۱۹۳	۰/۷۸۳۲	۰/۶۹۸۷	۱۵۰/۵۵
فاکتور متقابل دوگانه	۱/۶۵	۰/۹۲۳۷	۰/۸۶۹۲	۰/۶۴۸۱	۱۷۵/۸۲
درجه دوم	۰/۹۲	۰/۹۸۳۱	۰/۹۵۹۵	۰/۸۶۲۳	۶۸/۸۰
درجه سوم	۰/۹۴	۰/۹۹۱۱	۰/۹۵۷۳	-	-

۳-۳- بررسی اثر متقابل عوامل بررسی شده بر میزان تولید دی‌آسیل‌گلیسرول

۳-۳-۱- تأثیر درصد آنزیم/ زمان

نمودار کانتور دو بعدی مربوط به اثر متقابل آنزیم/ زمان در شکل۱ قابل مشاهده است. برای رسم این منحنی دو متغیر دیگر ثابت فرض شده و اثر متقابل آنزیم/ زمان در میزان تولید DAG بررسی شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش درصد آنزیم مقدار دی‌آسیل‌گلیسرول کاهش چشمگیری می‌یابد و در واقع این دو نسبت به هم حالت عکس دارند در حالی که با افزایش زمان تغییر چندانی در مقدار دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی مشاهده نمی‌شود.



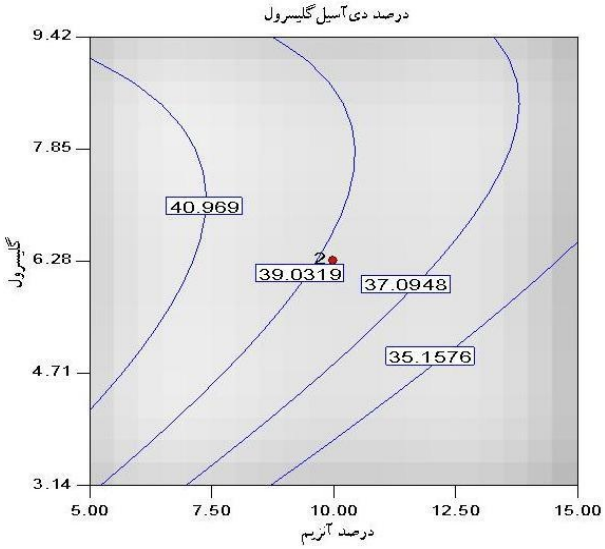
شکل۱ نمودار کانتور دو بعدی درصد دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی در مقابل درصد آنزیم و زمان

۳-۳-۲- تأثیر درصد آنزیم/ مقدار گلیسرول

شکل ۲ اثر متقابل آنزیم/ گلیسرول را در قالب نمودار کانتور دو بعدی بعدی نشان می‌دهد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

با افزایش درصد آنزیم، مقدار دی‌آسیل‌گلسرول کاهش یافته در حالی که با افزایش گلیسرول مقدار آن افزایش و سپس با یک سیر نزولی بسیار ملایمی روند کاهشی را در پیش می‌گیرد. این نتایج نشان می‌دهد که مقدار آنزیم تأثیر بسزایی در دستیابی به نتیجه مورد نظر دارد و زمانی که مقدار سوبسترای گلیسرول به مقدار کافی در محیط واکنش وجود داشته باشد آنزیم در جهت افزایش راندمان تولید دی‌آسیل‌گلیسرول فعالیت کرده و زمانی که مقدار آن از یک حد مشخص کاهش یافت آنزیم در جهت عکس روند مورد نظر عمل کرده و دی‌آسیل‌گلیسرول را به عنوان سوبسترا مصرف نموده و به تری‌آسیل‌گلیسرول و یا در شرایطی دیگر به منوآسیل‌گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد تبدیل کرده است.

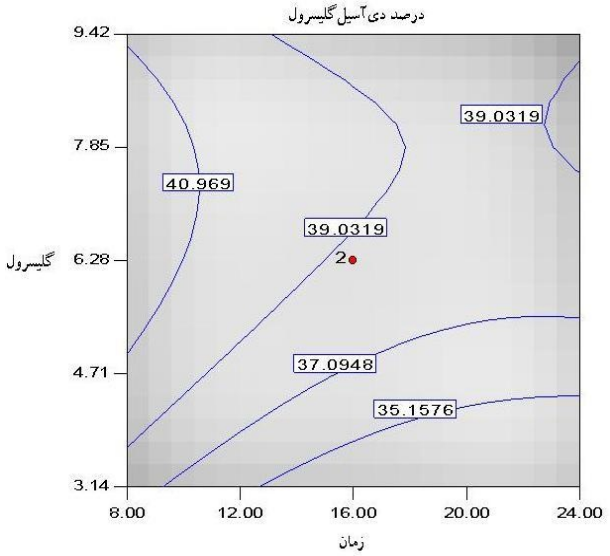


شکل۲ نمودار کانتور دو بعدی درصد دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی در مقابل درصد آنزیم و گلیسرول

در مطالعه‌ای، فرریا- دیاس و همکاران (۲۰۰۱) اثر متقابل دو آنزیم Novozym 435 و TL IM را در مقابل مقدار گلیسرول به منظور تولید دی‌آسیل‌گلیسرول بررسی کردند. نتایج نشان داد با افزایش این دو آنزیم مقدار تولید دی‌آسیل‌گلیسرول افزایش یافته به طوری که این افزایش در مورد آنزیم TL IM به صورت چشمگیرتر مشاهده شد. این در حالی است که با افزایش گلیسرول مقدار تولید دی‌آسیل‌گلیسرول در مورد آنزیم Novozym 435 به مقدار ناچیز افزایش و در مورد آنزیم TL IM کاهش پیدا کرد [۶].

۳-۳-۳- تأثیر زمان/ مقدار گلیسرول

با افزایش زمان، مقدار دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی با شیب نزولی به صورت درجه دوم کاهش می‌یابد. زمان واکنش با مقدار گلیسرول اثر متقابل دارد که برای بررسی اثر متقابل آن بر روی مقدار تولید دی‌آسیل‌گلیسرول، نمودار کانتور دو بعدی آن‌در شکل ۳ رسم شده است. برای رسم این منحنی‌ها دو متغیر درصد آنزیم و دما ثابت فرض شده و چگونگی تغییر همزمان دو متغیر دیگر یعنی مدت زمان و مقدار گلیسرول مورد بررسی واقع شد.



شکل۳ نمودار کانتور دو بعدی و درصد دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی در مقابل زمان و گلیسرول

همان‌طور که در نمودار نیز مشخص است و در قسمت قبل نیز گفته شد افزایش مدت زمان واکنش تأثیر بسیار کمی در مقدار تولید دی‌آسیل‌گلیسرول دارد این در حالی است که با افزایش مقدار گلیسرول راندمان تولید دی‌آسیل‌گلیسرول افزایش می‌یابد که می‌تواند به دلیل افزایش مناسب مقدار سوبسترای گلیسرول برای انجام فعالیت آنزیم باشد. بدیهی است زمانی که مقدار گلیسرول در محیط به حدی باشد که با تمامی جایگاه‌های فعال آنزیم در محیط واکنش اتصال بر قرار نماید؛ افزایش بیش از آن تأثیر چندانی در افزایش راندمان تولید دی‌آسیل‌گلیسرول ندارد.

۳-۴- بهینه‌سازی فرآیند

پس از تعیین مدل، برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که در نتیجه به کارگیری آنها بیشترین مقدار

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی از شرایط مختلف واکنش به دست آید، بهینه‌سازی انجام شد. بیشترین مقدار تولید DAG، ۴۸/۴۵۴ درصد در دمای ۴۶/۹ درجه سانتیگراد، زمان ۴ ساعت، مقدار آنزیم ۰/۷۵ درصد روغن گلرنگ و نسبت مولی گلیسرول به روغن ۲ به ۱ به دست آمد که پس از انجام خالص‌سازی و خارج کردن اسیدهای چرب آزاد مقدار آن به ۵۳/۸۴ درصد افزایش یافت.

۳-۵- خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن DAG

برخی از خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن دی‌آسیل‌گلیسرول تولیدی و گلرنگ در جدول ۳ مقایسه شده است.

۳-۵-۱- وزن مخصوص

در روغن‌و چربی‌وزن مخصوص به دو منظور تشخیص خلوص روغن و اندازه‌گیری وزن موجود در یک محموله روغن از روی حجم آن اندازه‌گیری می‌شود. در مورد هر دو نمونه‌وزن مخصوص محاسبه شده در محدوده تعیین شده توسط استاندارد است و هیچ تفاوت آماری بین دو نوع روغن دی‌آسیل‌گلیسرول و گلرنگ وجود نداشت.

۳-۵-۲- ضریب شکست

ضریب شکست با عوامل مختلفی از جمله ساختار مولکولی و میزان غیر اشباعیت در یک روغن رابطه مستقیم دارد که مقدار آن در مورد روغن دی‌آسیل‌گلیسرول (۱/۴۷۵۸) بیشتر از روغن گلرنگ (۱/۴۷۳۹) به دست آمد. از آنجا که دو نمونه از لحاظ طول زنجیره اسیدهای چرب و عدد یدی با یکدیگر تفاوتی ندارند بنابراین نمی‌توان این دو عامل را در بروز این تفاوت دخیل دانست. با توجه به بالاتر بودن عدد پراکسید در روغن دی‌آسیل‌گلیسرول، گروه‌های کتو و اکسی به وجود آمده در آن نیز نسبت به روغن گلرنگ بیشتر بوده که باعث افزایش ضریب شکست در آن می‌شوند. ضمن این که وجود گروه‌های هیدروکسیل در مولکول‌های دی‌آسیل‌گلیسرول نسبت به مولکول‌های تری‌آسیل‌گلیسرول نیز در بروز این تفاوت بی‌تأثیر نیست.

۳-۵-۳- عدد یدی

عدد یدی شاخصی از تعداد پیوندهای دوگانه موجود در اسیدهای چرب روغن‌ها می‌باشد که با افزایش میزان پیوندهای غیر اشباع، افزایش می‌یابد. با توجه به جدول ۱ مشاهده می‌شود که در نوع اسید چرب و مقادیر آنها در روغن گلرنگ و روغن دی‌آسیل‌گلیسرول تفاوتی مشاهده نمی‌شود. بنابراین در طی فرآیند تولید روغن دی‌آسیل‌گلیسرول میزان غیراشباعیت روغن گلرنگ دستخوش تغییر نگردیده است به طوری که در هر دو روغن اسید چرب غالب در درجه اول اسید لینولئیک (۸۱/۵ درصد) و پس از آن اسید اولئیک (۱۱/۲ درصد) می‌باشد. با توجه به حضور دو اسید چرب در ساختار دی‌آسیل‌گلیسرول نسبت به تری‌آسیل‌گلیسرول مقدار عدد یدی در مورد روغن دی‌آسیل‌گلیسرول می‌بایست کمتر به دست آید که در مورد این تحقیق نیز چنین نتیجه‌ای حاصل شد (عدد یدی روغن دی‌آسیل‌گلیسرول و تری‌آسیل‌گلیسرول به ترتیب ۱۳۲/۹۹ و ۱۳۷/۹۳ می‌باشد) این در حالی است که از لحاظ آماری بین عدد یدی این دو نمونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

۳-۵-۴- عدد پراکسید

عدد پراکسید در روغن معمولاً در ارتباط با فساد شیمیایی بوده و اندازه‌گیری آن در شروع اکسیداسیون اهمیت دارد و در واقع یک شاخص کیفی می‌باشد. این شاخص در روغن‌های مختلف تحت تأثیر نوع روغن و میزان غیر اشباعیت آن، مدت زمان نگهداری روغن و سالم و مناسب بودن ظروف بسته‌بندی قرار می‌گیرد. آزمون مقایسه میانگین داده‌ها اختلاف زیادی را بین دو نمونه نشان می‌دهد به طوری که عدد پراکسید بیشتر مربوط به روغن دی‌آسیل‌گلیسرول (۱۳/۰۵) بود. با توجه به عدم تفاوت بین عدد یدی دو نمونه می‌توان علت افزایش عدد پراکسید در نمونه روغن دی‌آسیل‌گلیسرول (به مقدار ۳ واحد) را به شرایط طولانی تولید مربوط دانست که باعث می‌شود بیشتر در معرض عواملی مثل نور، دما و اکسیژن قرار گرفته و به دنبال آن اکسیداسیون را در پی داشته باشد.

۳-۵-۵- رنگ

رنگ زرد و شفاف روغن یکی از عوامل مهم در پذیرش روغن توسط مصرف کننده به حساب می‌آید. همان‌گونه که بیان شد، به منظور ارزیابی رنگ در این تحقیق از پارامترهای L^*، a^* و b^* استفاده شد. قابل ذکر است عامل L^* در دامنه ۱۰۰-۰ متغیر بوده و درصد روشنایی را نشان می‌دهد، به طوری که برای سطح کاملاً سفید عامل L^* ۱۰۰، و a^* و b^* صفر هستند و برای سطح کاملاً سیاه هر سه این عوامل صفر می‌باشند. عوامل a^* و b^* بین ۱۲۰+ تا ۱۲۰- متغیر بوده و در مورد a^* از سبز تا قرمز تغییر می‌کند و منفی بودن این عامل بیانگر رنگ سبز و مثبت بودن آن رنگ قرمز را نشان می‌دهد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

جدول۳ خصوصیات فیزیکوشیمیایی روغن دی‌آسیل‌گلیسرول و روغن گلرنگ

شاخص	روغن گلرنگ	روغن دی‌آسیل‌گلیسرول
وزن مخصوص($^{\circ}C$ ۲۵)	۰/۹۱ ±۷ × ۱۰$^{-۴}$	۰/۹۲ ±۱ × ۱۰$^{-۳}$
ضریب شکست($^{\circ}C$ ۲۵)	۱/۴۷۳۹^{b} ±۰/۰	۱/۴۷۵۸^{a} ±۰/۰
عدد یدی(گرم ید در صد گرم چربی)	۱۳۷/۹۳ ±۱/۹۸	۱۳۲/۹۹ ±۲/۳۶
اندیس پراکسید(میلی اکی‌والان اکسیژن در کیلوگرم)	۱۰/۰۶^{b} ±۰/۵۰	۱۳/۰۵^{a} ±۰/۰۹
L*	۹۵/۱۵^{b} ±۰/۰۹	۹۶/۹۱^{a} ±۰/۳۳
a*	۶/۴۵ ±۰/۱۱	۶/۲۵ ±۰/۰۵
b*	۵۵/۰۵^{b} ±۰/۲۷	۵۸/۰۲^{a} ±۰/۰۵

داده‌های جدول میانگین سه تکرار ± S.D. را نشان می‌دهند.

در هر ردیف حروف غیر مشابه نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

عامل *b از آبی تا زرد تغییر می‌کند و منفی بودن این عامل، بیانگر رنگ آبی و مثبت بودن آن، رنگ زرد را نشان می‌دهد. نتایج آنالیز آماری بر روی میانگین در سطح پنج درصد نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین عامل *a بین دو نوع روغن وجود ندارد ولی در مورد عوامل *L و *b تفاوت معنی‌دار وجود دارد. در روغن دی‌آسیل‌گلیسرول عوامل *L و *b از روغن گلرنگ بیشتر بود که این امر نشان دهنده این است که روغن دی‌آسیل‌گلیسرول روشن‌تر از روغن گلرنگ بوده و رنگ آن زردتر است. یکی از علل افزایش زردی در روغن دی‌آسیل‌گلیسرول می‌تواند اکسیداسیون توکوفرول‌ها و تبدیل آن‌ها به ترکیباتی دیگر باشد که موجب ایجاد رنگ زرد بیشتر در روغن دی‌آسیل‌گلیسرول گردیده است[۲۴].

۴- نتیجه‌گیری کلی

روش آماری سطح پاسخ روشی خوب و قابل اطمینان برای انتخاب سطوح بهینه است به طوری که بین مشاهدات پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار و مشاهدات واقعی تفاوت چشمگیری دیده نشد. بیشترین مقدار تولید DAG، ۴۸/۴۵۴ درصد در دمای ۴۶/۹ درجه سانتیگراد، زمان ۴ ساعت، مقدار آنزیم ۰/۷۵ درصد روغن گلرنگ و نسبت مولی گلیسرول به روغن ۲ به ۱ به دست آمد که پس از انجام خالص‌سازی و خارج کردن اسیدهای چرب آزاد مقدار آن به ۵۳/۸۴ درصد افزایش یافت. روش گلیسرولیز آنزیمی یک روش بسیار مناسب به منظور تولید DAG است که البته عوامل متعددی در فرایند آن دخیل می باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که پارامترهای دما و نسبت مولی گلیسرول به روغن می تواند اهمیت دوچندانی در تولید داشته باشد.

۵- تشکر و قدردانی

در پایان مراتب سپاسگزاری خود را از جناب آقای مهندس بهمن بهرامی کارشناس محترم آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان که با مساعدت و راهنمایی‌های خود امکان انجام این تحقیق را فراهم آوردند، ابراز می‌دارم.

۶- منابع

[1] Watanabe, T., M. Shimizu, M. Sugiura, M. Sato, J. Kohori, N. Yamada and K. Nakanishi. 2003. Optimization of reaction conditions for the production of DAG using immobilized 1,3-regiospecific lipase lipozyme RM IM. *JAOCS*. 80(12): 1201-1207.

[2] Flickinger, B. D. and N. Matsuo. 2005. Diacylglycerols. PP. 37-48. *In:* F. Shahidi (Ed.), *Baileys Industrial Oil and Fat Products.* Vol. III. A John Wiley & Sons, INC., New York.

[3] Morita, O. and M. G. Soni. 2009. Safety assessment of diacylglycerol oil as an edible oil: a review of the published literature. *Food Chem. Toxicol*. 47: 9-21.

[4] Blasi, F., L. Cossignani, M. S. Simonetti and P. Damiani. 2007. Biocatalysed synthesis of *sn*-1,3-diacylglycerol oil from extra virgin olive oil. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 727-732.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

[5] Lo, S. K., C. P. Tan, K. Long, M. S. A. Yusoff and O. M. Lai. 2008. Diacylglycerol oil- properties, processes and products: a review. *Food Bioprocess Technol*. 1: 223-233.

[6] Ferreira-Dias, S., A. C. Correia, F. O. Baptista and M. M. R. da Fonseca. 2001. Contribution of response surface design to the development of glycerolysis systems catalyzed by commercial immobilized lipases. *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 11: 699-711.

[7] Flickinger, B. D. and N. Matsuo. 2003. Nutritional characteristics of DAG oil. *Lipids.* 38(2): 129-132.

[8] Matsuo, N. 2004. Nutritional characteristics and health benefits of diacylglycerol in foods. *Food Sci. Technol. Res*. 10(2): 103-110.

[9] Lo S. K., B. S. Baharin, C. P. Tan and O. M. Lai. 2004. Enzyme-catalyzed production and chemical composition of diacylglycerols from corn oil deodorizer distillate. *Food Biotechnol*. 18(3): 265-278.

[10] Morita, O., J. F. Knapp, Y. Tamaki, M. D. Nemec, B. J. Varsho and D. G. Stump. 2008. Safety assessment of dietary diacylglycerol oil: a two-generation reproductive toxicity study in rats. *Food Chem. Toxicol*. 46: 3059-3068.

[11] Taguchi, H., T. Nagao, H. Watanabe, K. Onizawa, N. Matsuo, I. Tokimitsu and H. Itakura. 2001. Energy value and digestibility of dietary oil containing mainly 1,3-diacylglycerol are similar to those of triacylglycerol. *Lipids*. 36(4): 379-382.

[12] Isidorov, V. A., M. Rusak, L. Szczepaniak and S. Witkowski. 2007. Gas chromatographic retention indices of trimethylsilyl derivatives of mono- and diglycerides on capillary columns with non-polar stationary phases. *J. Chromatogr* A. 1166: 207-211.

[13] Wang, Y., M. Zhao, S. Tang, K. Song, X. Han and S. Ou. 2010. Evaluation of the oxidative stability of diacylglycerol-enriched soybean oil and palm olein under rancimat-accelerated oxidation conditions. *JAOCS*. 87:483-491.

[14] Cheong, L. Z., C. P. Tan, K. Long, M. S. A. Yusoff, N. Arifin, S. K. Lo and O. M. Lai. 2007. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: optimization using response surface methodology. *Food Chem*. 105: 1614-1622.

[15] Fregolente, P. B. L., G. M. F. Pinto, M. R. Wolf-Maciel and R. M. Filho. 2009. Monoglyceride and diglyceride production through lipase-catalyzed glycerolysis and molecular distillation. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 160(7): 1879-1887.

[16] Lo, S. K., L. Z. Cheong, N. Arifin, C. P. Tan, K. Long, M. S. A. Yusoff and O. M. Lai. 2007. Diacylglycerol and triacylglycerol as responses in a dual response surface-optimized process for diacylglycerol production by lipase-catalyzed esterification in a pilot packed-bed enzyme reactor. *J. Agric. Food Chem*. 55: 5595-5603.

[17] Goli, S. A. H., S. M. Sahafi, B. Rashidi and M. Rahimmalek. 2013. Novel oilseed of *Dracocephalum kotschyi* with high n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acid ratio. *Ind. Crop Prod.* 43: 188-193.

[18] Khoddami, A., H. M. Ghazali, A. Yassoralipour, Y. Ramakrishnan and A. Ganjloo. 2011. Physicochemical characteristics of nigella seed (*Nigella sativa L.*) oil as affected by different extraction methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88: 533-540.

[19] Zhang, Z.-S., L.-J. Wang, D. Li, S.-J. Li and N. Ozkan. 2011. Characteristics of flaxseed oil from two different flax plants. *Int. J. Food Prop.* 14: 1286-1296.

[20] Goli, S. A. H., M. M. Sahri and M. Kadivar. 2008. Enzymatic interesterification of structured lipids containing conjugated linoleic acid with palm stearin for possible margarine production. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 110: 1102-1108.

[21] AOCS. 2004. *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 5th ed., Champaign, IIIinois.

[22] Fregolente, P. B. L., L. V. Fregolente, G. M. F. Pinto, B. C. Batistella, M. R. Wolf-Maciel and R. M. Filho. 2008. Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 146: 165-172.

[23] Fureby, A. M., P. Adlercreutz and B. Mattiasson. 1996. Glyceride synthesis in a solvent-free system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 1489-1495.

[24] Lee, J.-H., J.-A. Shin, J.-H. Lee and K.-T. Lee. 2004. Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts. *Food Res. Int.* 37: 967-974.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]

Optimization of functional diacylglycerol (DAG) oil Production from safflower oil and evaluation of its properties

Sahafi, S. M. [1], Goli, S. A. H. [2*], Kadivar, M. [3]

1. M. Sc. in Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2. Assistant Professor of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
3. Associate Professor of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

(Received: 90/8/7 Accepted: 90/11/20)

From 1999 and 2000, DAG oil production has been started in Japan and USA. It must be mentioned that DAG oil has been considered as useful product for human health and it is known as functional and nutraceutical cooking oil. The objective of this study was to evaluate reaction parameters in DAG production from safflower oil and to optimize the process to obtain maximum yield of DAG. After safflower oil extraction, enzymatic glycerolysis was used to produce DAG oil. The treatments were determined using Design-expert software and after modeling, the process optimization was done. Finally, some physicochemical properties of DAG oil were investigated. After modeling, it was observed that the enzyme load had linear effect while the reaction temperature and glycerol content showed the quadratic effect on DAG yield. Also it was obtained that there was significant interaction effect between enzyme load/time, enzyme load/ glycerol and time/glycerol. Results showed that there was no significant difference between DAG and safflower oils in terms of specific gravity and iodine value but refractive index, color and peroxide value were different. Maximum production of DAG (48.454 %) obtained at reaction temperature of 46.9 $^{\circ}$C, reaction time of 4 h, enzyme load of 0.75 % (weight of oil), and molar ratio of glycerol to oil 2:1 which was increased to 53.84 % after product purification.

Keywords: Safflower oil, Lipase TL IM, Glycerolysis, Diacylglycerol, Response surface methodology

* Corresponding Author E-Mail Address: amirgoli@cc.iut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-11]