

Stanisław Ptasznik, Małgorzata Jerzewska, Magdalena Ropelewska
Instytut Przemysłu Mięsnego i Tłuszczowego w Warszawie

Próby enzymatycznego przeestryfikowania mieszanek olejów rzepakowego i rybiego o zróżnicowanym poziomie kwasów tłuszczowych polienowych oraz ocena uzyskanych produktów*

**Trials on enzymatic interesterification of rapeseed and fish oils
mixtures with a diversified level of polyenic fatty acids
and examination of obtained products**

Słowa kluczowe: restrukturyzacja, enzym, triacyloglicerole, EPA, DHA, omega-3

Przeprowadzono badania nad procesem enzymatycznej strukturyzacji na drodze przeestryfikowania tłuszczów mieszanych zawierających kwasy tłuszczowe grupy omega-3 o zróżnicowanej długości łańcucha i stopniu nasycenia. Badania prowadzono w układzie modelowym w skali laboratoryjnej. Jako biokatalizator zastosowano enzym o nazwie Lipozyme RM IM firmy Novozymes A/S Dania, wykazujący specyficzność do pozycji *sn*-1,3 triacyloglicerolu (TAG).

Materiał badawczy stanowiły mieszanki oleju rzepakowego i olejów rybich o różnym poziomie kwasów EPA i DHA. Procesy enzymatycznego przeestryfikowania prowadzono w reaktorze okresowym z mieszadłem, bez rozpuszczalnika. Określono optymalne parametry procesu oraz dokonano analizy uzyskanego produktu.

Key words: restructurization, enzyme, triacylglycerols, EPA, DHA, omega-3

The studies on the enzymatic restructuring process with the application of interesterification of the fat mixtures, containing fatty acids of Omega-3 with a differentiated chain length and degree of saturation, were carried out. The investigations were conducted in a model system, in a laboratory scale. The Lipozyme® RM IM of Novozymes® A/S company, Denmark, revealing specificity to the *sn*-1,3 triacylglycerol (TAG), was used as a biocatalyst.

The research material consisted of rapeseed oil and fish oil with different levels of EPA and DHA acids. The enzymatic processes of interesterification were conducted in batch system with a stirrer and without solvent. The optimal parameters of the process were determined and the analysis of the obtained product was carried out.

Considering information from the literature, process conditions and products, it can be stated that in the case of the reaction of enzymatic esterification with specific biocatalyst Lipozyme® RM IM, the TAGs structure was influenced by migration of the acyl-groups in *sn*-1,3 positions in the TAGs molecules.

* Pracę wykonano w ramach PBKZ/KBN/021/P06/99 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 2001–2004

Enzymatic esterification reaction with specific biocatalyst Lipozyme[®] RM IM proceeded simultaneously to hydrolysis reaction. As a result of partial hydrolysis at first the DAGs arise (separation of one acyl group from TAG), then MAG was formed (separation of two acyl groups from *sn*-1 and *sn*-3 positions of TAG). The separated acyl-groups again occupied the *sn*-1,3 positions, but *sn*-2 internal position remained unchangeable. It may be concluded that over grouping in the external positions could take place during the reaction, however it was not confirmed directly, because the fatty acid composition in individual positions *sn*-1 and *sn*-3 were not determined.

The slight changes in the *sn*-2 TAG position were observed, although taking into consideration accuracy of the applied analytical method, it was stated that this position remains unchanged.

The polar fractions – the DAGs, MAGs as well as free fatty acids and non polar – TAGs were found as the result of the enzymatic esterification process of the rapeseed and fish oils mixtures.

Wstęp

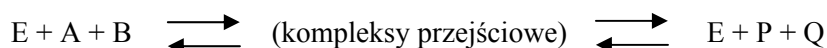
Próby otrzymywania strukturyzowanych lipidów (SL) podejmowało i podejmuje wielu badaczy w różnych krajach. Powodem są szerokie możliwości jakie dają technologie enzymatyczne ze względu na specyficzność działania enzymów, łagodne parametry procesu zabezpieczające surowce przed niepożądanymi zmianami oraz uzyskiwanie szerokiej gamy lipidów o zmodyfikowanej strukturze, stwarzającej ich szerokie wykorzystanie w produkcji żywności specjalnego przeznaczenia oraz leków (Lee, Akoh 1998; Ledóchowska 2001).

Podstawowym źródłem polienowych kwasów długołańcuchowych z rodziny *n*-3 (omega 3) są oleje rybne (Haumann 1997). W szczególności cenne ze względów żywieniowych są kwasy: all *cis* — 5, 8, 11, 14, 17 — eikozapentaenowy (EPA) C_{20:5} oraz all *cis* — 4, 7, 10, 13, 16, 19 — dokozaheksaenowy (DHA) C_{22:6}. W olejach roślinnych (np. lniany, sojowy, rzepakowy) występuje kwas linolenowy (all *cis* — 9, 12, 15 oktadekatrienowy) C_{18:3}, który również należy do rodziny *n*-3. Niedobór kwasów omega 3 w organizmie człowieka może być przyczyną wielu groźnych chorób i dlatego też racjonalne spożywanie różnych produktów zawierających te kwasy jest niezbędne (Newton 1998, Shorland 1990, Kinsella i in. 1990, Ziemiański 1991).

Jak już wspomniano, zastosowanie lipaz jako biokatalizatorów daje możliwości specyficznego oddziaływania między innymi na poszczególne pozycje cząsteczek triacylogliceroli (TAG) — wewnętrzną *sn*-2 oraz zewnętrzne *sn*-1,3. W literaturze wymienia się szereg różnych reakcji enzymatycznych takich jak: hydroliza wiązania estrowego, synteza acylogliceroli, estryfikacja kwasów tłuszczowych alkoholem, przeestryfikowanie mieszanek olejów i tłuszczów. Umieszczenie kwasów tłuszczowych polienowych w poszczególnych pozycjach cząsteczki TAG ma istotny wpływ na właściwości fizykochemiczne, a w szczególności na stabilność oksydacyjną oleju. W przypadku olejów rybnych, kwasy EPA i DHA występujące w pozycji *sn*-2 (wewnętrzna) są bardziej stabilne od tych występujących w pozycjach *sn*-1,3 (zewnętrzne) (Haraldsson, Halldorsson i Kulas 2000). Olej rzepakowy, będący

źródłem kwasu linolenowego, jest w porównaniu z olejami rybimi bardziej odporny na zmiany oksydacyjne. Kwas linolenowy (rodzina n-3) jest umiejscowiony w ponad 50% w pozycji wewnętrznej TAG (Hazuka, Ledóchowska i Jurkowska 2003). Kompozycja oleju rzepakowego oraz rybiego jest interesująca pod względem badawczym z uwagi na obecność kwasów rodziny n-3, jak i stabilność oksydacyjną układu. Prace nad przeestryfikowaniem (transestryfikacja) prowadzone przez Xu wykazały, że zachodzą również reakcje uboczne, prowadzące do powstawania monoacylogliceroli (MAG) i diacylogliceroli (DAG), obniżające wydajność TAG. Zmniejszenie skutków reakcji ubocznych można uzyskać przez zwiększenie stężenia biokatalizatora oraz minimalizację czasu przebiegu reakcji (Xu 2000). Wiele prac dotyczy wprowadzenia pojedynczych kwasów krótkołańcuchowych — kaprylowego C_{8:0}, kaprynowego C_{10:0} — do oleju rybiego, a więc do TAG zawierających kwasy długołańcuchowe EPA i DHA, w wyniku czego uzyskuje się specyficznie strukturyzowane lipidy (SSL) (Jennings, Akoh 1999, Xu, Zhou, Mu i in. 2001). Mniej informacji istnieje na temat układów złożonych z wielu różnych triacylogliceroli i dlatego też układy takie stanowią przedmiot niniejszej pracy.

Enzymatyczną reakcję w sposób ogólny można opisać równaniem:



W reakcji występują dwa substraty (A, B) dwa produkty (P, Q) oraz pewna liczba kompleksów przejściowych. W praktyce występuje wiele substratów i wiele produktów. Przebieg reakcji można śledzić oznaczając wybrany charakterystyczny parametr, np. stężenie produktu.

Celem pracy były badania nad procesem enzymatycznego przeestryfikowania kompozycji tłuszczów (olej rybi i rzepakowy), zawierających kwasy tłuszczowe grupy omega 3 (tri-, tetra-, penta-, heksaenowe) o zróżnicowanej długości łańcucha i stopniu nasycenia. Badania prowadzono w układzie modelowym w skali laboratoryjnej. Praca obejmuje próby enzymatycznego przeestryfikowania z zastosowaniem enzymu o nazwie Lipozyme[®] 435 firmy Novozymes[®] A/S Dania, wykazującego specyficzność do pozycji *sn*-1,3 TAG.

Material wyjściowy

Material stanowiły oleje: rybi i rzepakowy. Olej rybi pochodził z Norwegii, Denomega[™] 100 (D) i zawierał 8,8% kwasu eikozapentaenowego (EPA) oraz 13% dokozaheksaenowego (DHA), zaś olej rzepakowy (R) z produkcji krajowej i odznaczał się 10% zawartością kwasu α-linolenowego C_{18:3}. Oleje powyższe posłużyły do sporządzania mieszanek doświadczalnych w proporcjach wagowych 3:2, 1:1, 2:3.

Praca obejmowała swoim zakresem przeprowadzenie procesów przeestryfikowania z enzymem o działaniu specyficznym oraz badania analityczne uzyskanych produktów reakcji przeestryfikowania.

Metody

Procesy prowadzono w reaktorze okresowym z mieszadłem, bez rozpuszczalnika. Zastosowano biokatalizator o nazwie Lipozyme® RM IM (immobilizowana lipaza uzyskana z *Rhizomucor miehei*), osadzony na makroporowatej anionowej żywicy fenolowej. Lipaza ta katalizuje reakcję interestryfikacji w pozycji *sn*-1,3 TAG, a więc wykazuje specyficzność pozycyjną. Aktywność tej lipazy wynosiła 6 BAUN/g (Batch Acidolysis Units Novo), a zawartość wody 2,5%. Parametry reakcji były następujące: dodatek enzymu — 8%, temperatura reakcji — 60°C, atmosfera reakcji — azot, czas reakcji 4 godziny. Proces przerywano przez odsączenie preparatu Lipozyme® RM IM od mieszaniny reakcyjnej.

Stosowano następujące metody analityczne:

- oznaczanie składu kwasów tłuszczowych przy użyciu chromatografii gazowej (aparatury firmy Hewlett-Packard 6890, kolumna 60 m BPX 70) wg PN-ISO 5508,
- oznaczanie składu kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-2 TAG przy pomocy lipazy trzustkowej wg PN-EN ISO 6800,
- oznaczanie składu produktu przeestryfikowania metodą chromatografii kolumnowej wg AOCS Cd 11c-93,
- oznaczanie stabilności oksydacyjnej metodą testu przyspieszonego utleniania — Rancimat 679 firmy Methrom wg PN-ISO 6886:1997,
- oznaczanie liczby kwasowej wg PN-ISO 660:1998.

Wyniki i omówienie

Otrzymane produkty enzymatycznego przeestryfikowania składały się z mieszaniny acylogliceroli (triacylogliceroli — TAG, diacylogliceroli — DAG, monoacylogliceroli — MAG) oraz wolnych kwasów tłuszczowych — WKT. W wyniku przeestryfikowania mieszaniny reakcyjnej TAG w obecności biokatalizatora Lipozyme® RM IM, zamiana kwasów tłuszczowych zachodziła w pozycjach zewnętrznych TAG, zaś pozycja wewnętrzna *sn*-2 TAG nie uległa zasadniczym zmianom. W procesie przeestryfikowania dążono do maksymalizacji frakcji triacylogliceroli — TAG i dlatego pod tym kątem określono optymalne warunki reakcji. Analiza chromatograficzna pozwoliła na określenie obecności kwasów tłuszczowych w mieszankach modelowych o różnej zawartości kwasów EPA i DHA (tab. 1). Modelowa mieszanka R/D (olej rzepakowy : olej rybi — 2 : 3) wykazała skład kwasów tłuszczowych, nasyconych w ilości 13,3% (w tym palmitynowy 7,7%) i nienasyconych 86,7% (oleinowy 34,8%, linolowy 9,3%, linolenowy 4,4%, eikozapentaenowy (EPA) 5,2%, dokozaheksaenowy (DHA) 8,1%). W pozostałych mieszankach modelowych (R/D — 1 : 1 i 3 : 2) zawartość kwasów tłuszczowych EPA i DHA była na niższym poziomie, natomiast zawartość kwasów osiemnasto-

Tabela 1

Skład kwasów tłuszczowych w TAG mieszanek doświadczalnych [%]
Fatty acids composition in TAG experimental mixtures

Kwas tłuszczowy <i>Fatty acid</i>	Mieszanka olej rzepakowy : olej rybi <i>Mixture rapeseed oil : fish oil</i>		
	2:3	1:1	3:2
C _{12:0}	–	–	–
C _{14:0}	2,3	2,0	1,5
C _{14:1}	0,3	0,3	0,2
C _{15:0}	0,2	0,2	0,2
C _{15:1}	0,1	0,1	0,1
C _{16:0}	7,7	7,3	6,9
C _{16:1}	5,6	4,7	3,8
C _{16:2}	0,2	0,2	0,2
C _{16:3}	< 0,1	–	–
C _{16:4}	0,1	<0,1	–
C _{17:0}	0,3	0,2	0,2
C _{17:1}	0,1	0,1	0,1
C _{18:0}	2,0	2,0	2,0
C _{18:1 c (n-9)}	34,8	38,9	43,0
C _{18:1 t}	1,4	1,2	0,9
C _{18:2 cc (n-6)}	9,3	11,1	12,9
C _{18:3 ccc (n-3)}	4,4	5,2	6,1
C _{18:3 izo}	0,4	0,3	0,2
C _{18:4 (n-3)}	1,8	1,5	1,2
C _{20:0}	0,7	0,8	0,9
C _{20:1 Σ}	8,4	7,1	6,0
C _{20:2 (n-6)}	0,3	0,3	0,2
C _{20:3 (n-6)}	0,2	0,1	0,1
C _{20:3 (n-3)}	0,1	< 0,1	< 0,1
C _{20:4 (n-6)}	0,2	0,2	0,2
C _{20:4 (n-3)}	< 0,1	–	–
C _{20:5 n-3 EPA}	5,2	4,3	3,5
C _{22:0}	0,1	0,1	0,2
C _{22:1 Σ}	5,0	4,3	3,5
C _{22:2}	–	–	–
C _{22:3}	0,2	0,2	0,1
C _{22:4 (n-6)}	0,4	0,3	0,2
C _{24:0}	< 0,1	–	–
C _{24:1}	< 0,1	–	–
C _{22:5 (n-3) DPA}	0,2	0,2	0,2
C _{22:6 (n-3) DHA}	8,1	6,7	5,4

Wyniki przedstawione w tabeli stanowią średnią arytmetyczną z trzech oznaczeń.

Tabela 2

Skład wybranych kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn-2* i *sn-1,3* TAG przed i po enzymatycznym przeestryfikowaniu oraz udział procentowy kwasów w pozycji *sn-2* — *The selected fatty acids composition in sn-2 and sn-1,3 TAG before and after enzymatic interesterification. The percentage of fatty acids in sn-2 position.*

Biokatalizator — *Bocatalists* Lipozyme RM IM.

Kwas tłuszczowy (KT) <i>Fatty acid</i> (FA)	KT w TAG <i>FA in TAG</i> [%]	KT w pozycjach TAG — <i>FA in TAG positions</i> [%]				Udział KT w <i>sn-2</i> <i>Participation in sn-2</i> [%]	
		<i>sn-2</i>		<i>sn-1,3</i>		przed <i>before</i>	po <i>after</i>
		przed <i>before</i>	po <i>after</i>	przed <i>before</i>	po <i>after</i>		
Mieszanka modelowa R/D, 2:3 w/w — <i>The model mixture R/D 2:3 w/w</i>							
C _{16:0}	7,67 ± 0,06	5,57 ± 0,06 *	5,77 ± 0,06 *	8,77 ± 0,03 *	8,67 ± 0,03 *	24,26 ± 0,11 **	25,17 ± 0,11 **
C _{16:1}	5,57 ± 0,06	1,37 ± 0,06	1,40 ± 0,0	7,73 ± 0,06	7,73 ± 0,06	8,27 ± 0,06	8,23 ± 0,06
C _{18:0}	2,00 ± 0,0	1,60 ± 0,00 **	1,50 ± 0,00 **	2,17 ± 0,06	2,23 ± 0,03	26,73 ± 0,06 **	25,00 ± 0,00 **
C _{18:1}	36,17 ± 0,06	26,63 ± 0,06	26,50 ± 0,0	40,93 ± 0,06	41,00 ± 0,0	25,23 ± 1,18	24,43 ± 0,06
C _{18:2}	9,30 ± 0,1	14,03 ± 0,06 **	14,57 ± 0,06 **	6,93 ± 0,03 **	6,63 ± 0,03 **	50,17 ± 0,06 **	52,23 ± 0,11 **
C _{18:3} (n-3)	4,37 ± 0,06	6,87 ± 0,06	6,87 ± 0,15	3,12 ± 0,03	3,10 ± 0,0	52,27 ± 0,06 **	52,97 ± 0,06 **
C _{20:5} (n-3) EPA	5,17 ± 0,06	8,67 ± 0,06	8,67 ± 0,06	3,47 ± 0,03	3,47 ± 0,03	55,73 ± 0,11	55,73 ± 0,11
C _{22:6} (n-3) DHA	8,07 ± 0,06	10,17 ± 0,06 *	10,03 ± 0,06 *	7,07 ± 0,03	7,13 ± 0,03	41,97 ± 0,06 **	41,23 ± 0,06 **

ciąg dalszy tabeli 2

Mieszanka modelowa R/D, 1:1 w/w — The model mixture R/D 1:1 w/w										
C _{16:0}	7,30 ± 0,0	5,27 ± 0,06	5,23 ± 0,06	8,37 ± 0,06	8,37 ± 0,06	24,17 ± 0,06	24,27 ± 0,06			
C _{16:1}	4,67 ± 0,06	1,17 ± 0,06	1,17 ± 0,06	5,97 ± 0,03	5,97 ± 0,03	16,37 ± 0,06	16,43 ± 0,06			
C _{18:0}	2,00 ± 0,0	1,47 ± 0,06	1,50 ± 0,0	2,25 ± 0,0	2,25 ± 0,0	24,97 ± 0,06	25,00 ± 0,0			
C _{18:1}	40,07 ± 0,06	29,50 ± 0,1	29,40 ± 0,2	43,77 ± 0,12	43,77 ± 0,11	24,53 ± 0,06	24,37 ± 0,15			
C _{18:2}	11,07 ± 0,06	16,57 ± 0,15	16,63 ± 0,21	8,40 ± 0,1	8,32 ± 0,08	50,00 ± 0,1	52,17 ± 0,15			
C _{18:3 (n-3)}	5,20 ± 0,0	8,17 ± 0,06	8,13 ± 0,06	3,67 ± 0,06	3,77 ± 0,03	52,57 ± 0,06	53,03 ± 0,06			
C _{20:5 (n-3) EPA}	4,27 ± 0,06	8,60 ± 0,1	7,77 ± 0,49	3,05 ± 0,18	3,05 ± 0,18	55,67 ± 0,11	56,10 ± 0,26			
C _{22:6 (n-3) DHA}	6,63 ± 0,06	8,37 ± 0,06	8,33 ± 0,11	5,87 ± 0,03	5,88 ± 0,06	41,73 ± 0,06	41,13 ± 0,11			
Mieszanka modelowa R/D, 3:2 w/w — The model mixture R/D 3:2 w/w										
C _{16:0}	6,90 ± 0,0	5,03 ± 0,06	5,07 ± 0,06	7,86 ± 0,03	7,83 ± 0,06	24,13 ± 0,06	24,63 ± 0,06			
C _{16:1}	3,77 ± 0,06	0,92 ± 0,03	0,93 ± 0,03	5,23 ± 0,03	5,23 ± 0,06	8,30 ± 0,0	8,27 ± 0,06			
C _{18:0}	2,00 ± 0,0	1,57 ± 0,06	1,57 ± 0,06	2,17 ± 0,06	2,20 ± 0,0	26,57 ± 0,06	26,60 ± 0,0			
C _{18:1}	43,83 ± 0,06	32,30 ± 0,06	32,40 ± 0,1	49,68 ± 0,03	49,55 ± 0,05	24,60 ± 0,0	25,25 ± 0,05			
C _{18:2}	12,83 ± 0,06	19,33 ± 0,11	20,13 ± 0,06	9,70 ± 0,09	9,28 ± 0,03	50,10 ± 0,0	52,23 ± 0,03			
C _{18:3 (n-3)}	6,07 ± 0,06	9,57 ± 0,06	9,67 ± 0,06	4,33 ± 0,03	4,32 ± 0,03	52,43 ± 0,06	53,02 ± 0,03			
C _{20:5 (n-3) EPA}	3,50 ± 0,0	5,87 ± 0,06	5,87 ± 0,06	2,30 ± 0,0	2,30 ± 0,0	56,20 ± 0,0	56,20 ± 0,0			
C _{22:6 (n-3) DHA}	5,37 ± 0,06	6,77 ± 0,06	6,73 ± 0,11	4,67 ± 0,06	4,73 ± 0,06	41,98 ± 0,03	42,23 ± 0,06			

* oznacza występowanie statystycznie istotnych różnic (pomiędzy wynikami przed i po procesie) przy $\alpha = 0,05$, ** przy $\alpha = 0,001$

węglowych (oleinowy, linolowy, linolenowy) była na wyższym poziomie (tab. 1). Optymalny czas reakcji ustalono empirycznie na 4 godziny.

Przeprowadzono 6 kolejnych reakcji na tym samym materiale badawczym (R/D — 2 : 3). Czas pierwszej reakcji trwał 1 h, następnie 2, 3, 4, 5 i 6 h. Uzyskane produkty analizowano pod względem obecności TAG, DAG, MAG i WKT. W reakcji czwartej (4 h trwania procesu) zawartość TAG była na podobnym poziomie jak w reakcji 5 i 6 (odpowiednio po 5 i 6 godzinach).

Wyciągnięto wniosek, że po czterech godzinach został osiągnięty stan równowagi. Przedłużanie czasu reakcji nie wpływało na dalszy postęp reakcji i nie zwiększało frakcji TAG. Analiza modelowego produktu (R/D) uzyskanego w reakcji z Lipozyme[®] RM IM wykazała następujący jego skład: TAG 85,1%, DAG 5,9%, MAG 2,9%, WKT 5,8%, pozostałe 0,3% (tab. 3).

Ocenę struktury triacylogliceroli dokonano metodą deacylacji z zastosowaniem lipazy trzustkowej. Mieszaninę produktów poddano rozdzielowi metodą chromatografii cienkowarstwowej. Po rozwinięciu chromatogramu pasma z płytki zbierano i ekstrahowano eterem etylowym. Na płytce widoczne były pasma *sn*-1,2 DAG, *sn*-1,3 DAG, *sn*-2 MAG, WKT. Uzyskany materiał przekształcono w estry metylowe i analizowano metodą chromatografii gazowej.

Powyższe wyniki pozwoliły na wyliczenie udziału procentowego poszczególnych kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-2 TAG, a tym samym w pozycjach zewnętrznych *sn*-1,3 TAG. Zgodnie z założeniem, skład KT w pozycjach zewnętrznych TAG przed i po przeestryfikowaniu powinien być zróżnicowany, zaś w pozycji wewnętrznej TAG powinien pozostać niezmienny. Powyższe stwierdzenie jest zasadne pod warunkiem, że obie pozycje *sn*-1 i *sn*-3 TAG będą rozpatrywane oddzielnie oraz, że przed reakcją przeestryfikowania skład KT w tych pozycjach był różny. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zmiany w pozycji wewnętrznej *sn*-2 TAG praktycznie nie miały miejsca (tab. 2). Oceniając wyniki w pozycjach *sn*-1,3 TAG, które to pozycje przyjęto za równocenne, nie można na tej podstawie określić ilości poszczególnych kwasów tłuszczowych w pozycji *sn*-1 TAG czy też w *sn*-3 TAG, gdyż jest to wynik sumaryczny. Należy jednak sądzić, że nastąpiło przemieszczenie acyli w tych pozycjach, aczkolwiek nie ma dowodu bezpośredniego. Analiza produktu określająca związki polarne (MAG, DAG, KT) i niepolarne (TAG) jest dowodem reakcji częściowej hydrolizy. Biorąc pod uwagę, że reakcja przeestryfikowania przebiegała równoległe z reakcją hydrolizy, z dużym prawdopodobieństwem zachodziło przegrupowanie acyli w pozycjach zewnętrznych *sn*-1,3 TAG. Określenie bezpośrednio struktury TAG w pozycji *sn*-1 oraz osobno w *sn*-3 wymaga zastosowania analizy stereospecyficznej triacylogliceroli (Ledóchowska, Hazuka, Jurkowska 2003).

Tabela 3

Udział frakcji polarnej (MAG, DAG, KT) i niepolarniej (TAG) w mieszkach i produktach enzymatycznego przeestryfikowania mieszanek modelowych R/D 2:3, 1:1, 3:2

Participation of the polar (MAG, DAG, FA) and non-polar (TAG) fractions in the mixtures and products of the enzymatic interestification model mixtures R/D 2:3, 1:1, 3:2

Typ mieszaneki Type of mixtures (m)		Udział frakcji w produkcie (p), % Fraction participation in the product (p), %				
		TAG TAG	DAG DAG	MAG MAG	KT FA	pozostałe other
R/D 2:3	m	98,07 ± 0,11	0,87 ± 0,06	0,77 ± 0,06	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	p	85,1 ± 0,1	5,9 ± 0,1	2,83 ± 0,11	5,87 ± 0,11	0,3 ± 0,0
R/D 1:1	m	98,23 ± 0,15	0,8 ± 0,1	0,67 ± 0,06	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	p	86,6 ± 0,11	5,6 ± 0,1	2,2 ± 0,1	5,33 ± 0,06	0,3 ± 0,0
R/D 3:2	m	98,27 ± 0,11	0,77 ± 0,06	0,67 ± 0,06	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0
	p	88,27 ± 0,15	4,99 ± 0,1	2,1 ± 0,1	4,5 ± 0,1	0,27 ± 0,06

Podsumowanie

- Biorąc pod uwagę informacje literaturowe, warunki procesu i produkty reakcji można uznać, iż w przypadku reakcji enzymatycznego przeestryfikowania z udziałem biokatalizatora o działaniu specyficznym Lipozyme[®] RM IM, struktura TAG uległa zmianie w wyniku przemieszczenia się acyli w cząsteczkach TAG, w pozycjach *sn*-1,3.
- Reakcja przeestryfikowania enzymatycznego przebiega równolegle z reakcją hydrolizy. W wyniku częściowej hydrolizy powstają najpierw DAG (odłączenie jednego acylu od TAG), potem MAG (odłączenie dwóch acyli od TAG z pozycji *sn*-1 i *sn*-3). Odłączone acyle ponownie zajmują pozycje *sn*-1,3, zaś pozycja wewnętrzna *sn*-2 cały czas pozostaje niezmienną. Wynika z tego, że przegrupowanie w pozycjach zewnętrznych musiało mieć miejsce, chociaż nie ma bezpośredniego dowodu na to, gdyż nie oznaczono składu KT w pozycji *sn*-1 i *sn*-3 z osobna.
- Nieznaczne zmiany zaobserwowano również w pozycji *sn*-2 TAG, jednak biorąc pod uwagę dokładność stosowanej metody analitycznej należy uznać, że pozycja ta pozostała niezmienną.
- W wyniku enzymatycznego przeestryfikowania mieszanek olejów rzepakowego i rybiego w produkcie pojawiły się frakcje polarne — DAG, MAG, WKT oraz niepolarna TAG. W mieszkach wyjściowych głównym składnikiem były TAG.

Literatura

- Atkins P.W. 2001. Szybkość reakcji chemicznych. W: *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa, 758-763.
- Becker C.C., Rosenquist A., Hølmer G. 1993. Regiospecific Analysis of Triacylglycerols using Allyl Magnesium Bromide. *Lipids*, 28, 2: 147-149.
- Drozdowski B. 1994. 2000. *Lipidy*. W: *Chemia żywności. Skład, przemiany i właściwości żywności*. Praca zbiorowa pod redakcją Z.E. Sikorskiego WNT, Warszawa, 192-195.
- Haraldsson G., Halldorsson A., Kulas E. 2000. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols containing eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77: 1139-1145.
- Haumann B. 1997. Structured lipids allow fat tailoring. *Inform*, 8: 1004-1011.
- Hazuka Z., Ledóchowska E., Jurkowska A. 2003. Porównanie metod oznaczania struktury triacylogliceroli z wykorzystaniem lipazy trzustkowej metodą Brockerhoffa i metodą ISO, *Tłuszcze jadalne*, 38, 1/2: 31-41.
- Jennings B.H., Akoh C.C. 1999. Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and dokosaheksaenoic acids content to produce structured lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 10: 1133-1137.
- Kinsella J., Lokesh B., Stone R. 1990. Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Amelioration of Cardiovascular Disease, Possible Mechanism. *Am. J. Clin. Nutr.*, 52: 1-28, wg materiałów Raisio Polska Foods Sp. z o.o. 2001.
- Ledóchowska E. 2003. Wykorzystanie lipaz do produkcji strukturyzowanych lipidów. *Tłuszcze Jadalne*, XXXVIII, 3/4: 79-95.
- Ledóchowska E., Hazuka Z., Jurkowska A. 2003. Metody badania struktury triacylogliceroli, *Tłuszcze Jadalne*, 38, 1/2: 19-29.
- Lee K.T., Akoh C. 1998. Solvent free enzymatic synthesis of structured lipids from peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75: 1533-1537.
- Newton I.S. 1998. Food enrichment with long-chain n-3 PUFA. *Inform*, 7: 169-174.
- Ptasznik S. 2000. Przeestryfikowanie chemiczne jako sposób modyfikacji tłuszczów mieszanych. *Tłuszcze Jadalne*, 35, 1/2: 52-56.
- Ptasznik S., Brzeska M. 2001. Wybrane aspekty enzymatycznej restrukturyzacji triacylogliceroli zawierających długołańcuchowe polienowe kwasy z grupy n-3. *Rocz. Inst. Przem. Mięsn. i Tł.*, 38: 157-170.
- Stryer L. 1997. *Enzymy: podstawowe pojęcia i kinetyka*. W: *Biochemia*. PWN, Warszawa, 191-217.
- Xu X., Zhou D., Mu H., Adler-Nissen J., Hoy C-E. 2002. A packed-bed enzyme mini-reactor for the production of structured lipids using nonimmobilized lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79: 205-206.
- Xu Y. 2000. Enzymatic production of structured lipids: process reactions and acyl migration. *Inform*, 11: 1121-1131.