بررسي عوامل مؤثر بر اسيدوليز آنزيمي روغن كلزا با اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک در توليد ليپيد بازساخته

داود ثواقبي فيروزآبادي[۱]، كرامت اله رضايي[۲]، محمد صفري[۳]* و پرويز اشتري [۴]
[۱، ۲، ۳] كارشناس ارشد، استاد، دانشكده مهندسي و فناوري كشاورزي، پرديس كشاورزي و منابع طبيعي دانشگاه تهران
[۴] پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌اي، پژوهشكده چرخه سوخت هسته‌اي

(تاريخ دريافت: ۱۳۹۰/۷/۱۴- تاريخ تصويب: ۱۳۹۱/۷/۱۸)

چكيده

در اين پژوهش اسيدوليز آنزيمي روغن كلزا با اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک به منظور توليد ليپيد بازساخته مورد بررسي قرار گرفت. ليپوزيم تي‌ال آي‌ام كه يك نوع ليپاز يک، سه-ويژة ترمومايسس لانوگينوزا مي باشد به عنوان كاتاليزور در واكنشگاه بچ استفاده گرديد. شرايط واكنش با در نظر گرفتن نسبت مولي اسيد چرب به روغن (۱:۱، ۱:۲ و ۱:۳)، مقدار آنزيم (۴،۸ و۱۲ درصد)، دما (۴۵، ۵۵ و ۶۵ درجة سلسيوس) و زمان (۱۵، ۳۰ و ۴۵ ساعت) به روش تاگوچي طرح ريزي شد. پروفيل اسيدهاي چرب محصولات واكنش با استفاده از كروماتوگرافي گازي،آزمون و تغييرات عدد يدي از روي تركيب درصد اسيد چرب نمونه‌ها تعيين گرديد. محصولات واكنش در شرايط بهينه از نظر چگونگي توزيع اسيدهاي چرب مقايسه شدند.نتايج نشان داد كه تركيب درصد اسيدهاي چرب روغن كلزا در اثر واكنش تغيير مي كند. واكنش اسيدوليز در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام در ۵۵ ^{o}C، نسبت مولي اسيد چرب به روغن ۱:۳ و ۱۲% آنزيم بالاترين درصد مولي اسيدهاي چرب كاپريليک (۳۷/۲%) و كاپريک (۳۸/۹%) را بعد از ۱۵ ساعت گرماگذاري در روغن كلزا وارد نمود. تفاوت بين دو اسيد چرب كاپريليک و كاپريک در جريان واكنش اسيدوليز با هر يک از آنزيم‌ها معني دار نبود و عدد يدي روغن از ۱۱۸/۵ به ۷۸/۵ كاهش يافت. بررسي توزيع اسيدهاي چرب در تري‌آسيل‌گليسرول‌ها در اثر واكنش اسيدوليز با استفاده از ليپوزيم تي‌ال آي‌ام به ترتيب حضور ۴۹/۵ و ۵۳/۴ درصد مولي از اسيد كاپريليك و اسيد كاپريک را در جايگاه sn-1, 3 نشان داد.

واژه‌هاي كليدي: اسيدوليز، اسيد كاپريليک، اسيد كاپريک، روغن كلزا، ليپاز، ليپيد بازساخته

مقدمه

ليپيدهاي بازساخته گروهي از چربي‌هاي ويژه با كاربردهاي پزشكي، تغذيه‌اي و صنايع غذايي هستند كه در نتيجة اصلاح چربي، از طريق وارد كردن اسيدهاي‌چرب جديد و يا تغيير جايگاه اسيدهاي‌چرب موجود روي پاية گليسرول به دست مي‌آيند (Ozturk *et al*., 2010).

وجود ارتباط بين نحوة توزيع اسيدهاي چرب در ساختار تري‌آسيل‌گليسرول (TAG) و خواص تغذيه‌اي ليپيدها، نشان داد كه واكنش‌هاي اينتراستريفيكاسيون يا اسيدوليز مي‌توانند براي بهبود فوايد تغذيه‌اي ليپيدها به كار روند (Osborn &Akoh, 2002). اسيدوليز انتقال گروه آسيل بين يك اسيد چرب و يك استر است كه يكي از مؤثرترين روش‌ها براي وارد كردن اسيدهاي چرب جديد در TAG به منظور توليد ليپيد بازساخته مي باشد (Iwasaki & Yamane, 2000).

اسيدهاي چرب زيادي در ساخت ليپيدهاي بازساخته استفاده مي‌شوند. نوع و موقعيت اسيدهاي چرب در مولكول TAG، خصوصيات فيزيكي و كاربردي، سرنوشت متابوليكي و فوايد سلامتي يک ليپيد بازساخته را تعيين مي‌كنند (Akoh, 1997). توليد ليپيدهاي بازساخته به وسيلة وارد كردن اسيدهاي چرب زنجيرمتوسط[1] در روغن‌ها يكي از زمينه‌هاي مورد توجه محققان است. اسيدهاي چرب زنجير متوسط داراي خواص بي‌مانند تغذيه‌اي و متابوليكي هستند و در كاربردهاي غذايي و دارويي مفيد مي‌باشند. اين تركيبات همچنين به عنوان يک حامل براي عطر و طعم، ويتامين‌ها و رنگ‌ها استفاده مي‌شوند. اسيدهاي‌چرب زنجير متوسط در مقايسه با همتايان زنجير بلند، در جريان بتا اكسيداسيون (βOxidation-) با سرعت بيشتري اكسيد و جذب مي‌شوند (Odle, 1997). تري‌آسيل‌گليسرول‌هاي زنجير متوسط[2] به گروه ليپيدهاي داراي اسيدهاي چرب زنجير

* نويسنده مسئول:

1 . Medium Chain Fatty Acids
2 . Medium Chain Triacylglycerol

متوسط با درازاي ٦ تا ١٢ کربن تعلق دارند (Ko *et al*., 2003). اين ترکيبات بعد از جذب در ساختار کيلوميکرونها[1] شرکت نميکنند و بنابراين به صورت چربي در بافتهاي ذخيرهاي چربي[2] بدن جمع نميشوند (Kennedy, 1991). Ivasaki *et al*. (1999) اسيدوليز آنزيمي روغن تکياختة حاوي DHA[3] (٤١%) و DPA[4] (١٨%) با اسيدکاپريليک را گزارش کردند. دو ليپاز به دست آمده از رايزوموکور ميهي و سودوموناس به عنوان بيوکاتاليست استفاده شد. محصول نهايي واکنش روغن اصلاح شدهاي با اسيدکاپريليک درجايگاه *sn*-1, 3، DHA و DPA در جايگاه *sn*-2 گليسرول بود. ليپاز سودوموناس جايگزيني ٦٠% اسيدهاي چرب روغن تکياخته را با اسيدکاپريليک کاتاليز کرد، در حالي که ليپاز رايزوموکور ميهي تنها ٢٣ درصد از اسيدکاپريليک را در روغن وارد کرد. Jennings & Akoh (1999) با استفاده از ليپاز تثبيت شدة رايزوموکور ميهي توانستند اسيد کاپريک را به ميزان ٤٣% در ساختار ترِيآسيل گليسرولهاي روغن ماهي وارد کنند. Senannayake, & Shahidi (2002) چربي خوک آبي[5] را با استفاده از ليپاز تثبيت شدة موکور ميهي در جريان واکنش اسيدوليز با اسيدکاپريک اصلاح کردند. آنها توانستند ميزان ٢٥/٤% اسيدکاپريک را با موفقيت در ساختار چربي خوک آبي وارد کنند. Hamam & Shahidi (2005) واکنش اسيدوليز آنزيمي يک روغن تکياختة غني از DHA و DPA را به وسيلة اسيدکاپريک گزارش کردند و نشان دادند که ليپاز سودوموناس بعد از ٢٤ ساعت در ٤٥ درجة سلسيوس بالاترين درصد (٢٧/٩%) وارد کردن اسيدکاپريک در ساختار روغن را نشان ميدهد. Zaho *et al*. (2007) به منظور توليد ليپيد بازساخته، واکنش اسيدوليز آنزيمي لارد با اسيدکاپريک را در حضور حلال آلي بررسي کردند. آنها از ليپوزيم تيال آيام به عنوان کاتاليزور بهره بردند و نشان دادند که اين آنزيم در محتواي رطوبت ١٠-٥%، بعد از حدود ٢٤ ساعت در دماي ٥٠-٥٥ ^{o}C بالاترين ميزان اسيدکاپريک را در ترِيآسيلگليسرول لارد وارد ميکند.

روغن کلزا به طور عمده داراي اسيدهاي چرب اولئيک، لينولئيک و لينولنيک بويژه در جايگاه *sn*-2 است و ميتواند به عنوان سوبسترا زمينه را براي توليد ليپيدهاي بازساختة نوع MLM (Medium-Long-Medium Fatty Acids) فراهم کند (Xu *et al*., 1998). با در نظر گرفتن خواص تغذيهاي روغن کلزا و ترکيب اسيدهاي چرب آن، استفاده از اين روغن براي توليد ليپيدهاي بازساخته مورد توجه است.

واکنش اسيدوليز کاتاليز شده با ليپاز يک، سه- ويژه يکي از مؤثرترين روشها براي وارد کردن اسيدهايچرب مفيد در ساختار ترِيآسيلگليسرول است (Nunes *et al*., 2011). اين واکنش به وسيلة متغيرهاي زمان و دماي واکنش، غلظت و نوع آنزيم، نسبت مولي اسيد چرب مورد استفاده به روغن، درصد رطوبت واکنش و نوع حلال و اسيد چرب مورد استفاده تحت تأثير قرار ميگيرد (Zhao et al., 2007). لذا بررسي اثر اين متغيرها در نحوة توزيع اسيدهايچرب مفيد در روغن و در نتيجه کيفيت روغن توليدي و ارزش تغذيه اي آن تأثير مهمي دارد. هدف از اين تحقيق وارد کردن اسيدهايچرب زنجيرمتوسط کاپريک (C_{10}) و کاپريليک (C_8)، به عنوان منابع توليد سريع انرژي، در ترِيآسيلگليسرولهاي روغن کلزا به منظور توليد ليپيد بازساختة نوع MLM و بررسي تأثير متغيرهاي مؤثر بر واکنش شامل دما، زمان، غلظت و نوع آنزيم و نسبت مولي سوبستراها مي باشد.

مواد و روش ها

روغن کلزا (خنثي، رنگبري و بيبو شده) توليد شرکت صنعتي بهشهر (تهران، ايران) از بازار کرج تهيه شد. آنزيم تجاري ليپوزيم تيال آيام (Lipozyme TL IM) (ليپاز يک، سه- ويژة ترمومايسس لانوگينوزا (*Thermomyces Lanuginosa*) که بر روي گرانولهاي سيليکا تثبيت شده است) اهدايي شرکت نوو نورديسک اي، اس (بگس ورد، دانمارک) (Novo Nordisk A, S Bagsvaerd, Denmark) بود. روغن و آنزيم بلافاصله پس از تهيه به ترتيب در دماي ١٨-و ٥ درجة سلسيوس نگه داشته شدند. اسيدهايچرب کاپريليک و کاپريک با خلوص بالاي ٩٨%، سديم متوکسيد، سيليکاژل و استانداردهاي متيل استر اسيدهايچرب شامل $C_{8:0}$، $C_{10:0}$، $C_{13:0}$، $C_{16:0}$، $C_{18:0}$، $C_{18:1}$، $C_{18:2}$، $C_{18:3}$و$C_{20:0}$ با خلوص بالاي ٩٩/٥% از شرکت مرک -آلمان تهيه شدند. آنزيم ليپاز پانکراس (Pancreatic Lipase) و سديم کوليت (Sodium Cholate) توليدي شرکت سيگما-آمريکا بود. ساير مواد شيميايي از درجة کروماتوگرافي يا تجزيهاي بودند و از شرکت مرک-آلمان خريداري شدند.

خشک کردن روغن

به منظور حذف رطوبت موجود در روغن، سديم سولفات بي آب با روغن کلزا به نسبت ٢٠:١ وزني- وزني مخلوط شد، بعد از جذب رطوبت روغن توسط اين ترکيب، سديم سولفات به

1 . Chylomicrons
2 . Adipose Tissue
3. Docosahexaenoic Acid
4. Docosapentaenoic Acid
5 . SealBlubber Oil

وسيلة فيلتراسيون جدا شد و روغن خشک شده براي انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت.

واكنش آنزيمي

واکنش اسيدوليز به روش بچ و در داخل ارلن ۵۰ ميلي ليتري صورت گرفت. مقدار ۵ گرم روغن کلزا بعد از حل شدن در ۱۰ ميلي‌ليتر حلال آلي هگزان به عنوان سوبستراي اوليه مورد استفاده قرار گرفت (از روي وزن مولکولي اسيدهاي چرب تشکيل دهنده، وزن يك مول روغن کلزا معادل ۲۸۰/۳۴ گرم محاسبه گرديد) و بر اساس جدول (۱) با مقدار مناسبي از آنزيم ليپاز (ليپوزيم تي‌ال آي‌ام) در داخل ارلن مخلوط گرديد. هر يک از اسيدهاي چرب کاپريليك و کاپريك با نسبت هاي مولي ذکر شده در جدول (۱) به صورت جداگانه به مخلوط واکنش اضافه شدند.به دليل استفاده از ليپاز تثبيت شده و با توجه به پايداري نسبتا بالاي اين نوع ليپاز در مقابل تغييرات pH در مقايسه با آنزيم آزاد (Cruz-Ortiz *et al*., 2011) از بافر در محيط واکنش استفاده نگرديد.درب ارلن با چوب پنبه بسته شد. يک شيکر چرخشي (کريستالIS-RSDA، چين)با سرعت ۲۰۰ دور در دقيقه به جهت پراکنده نگه داشتن آنزيم در روغن و حفظ شرايط دمايي واکنش مورد استفاده قرار گرفت. پس از سپري شدن زمان لازم، همزدن قطع شد و اجازه داده شد تا آنزيم کاملا ته‌نشين شود. جهت جداسازي ذرات ريز آنزيم معلق در روغن، نمونه بر روي کاغذ صافي واتمن[1] شمارة ٤ صاف شد.

جداسازي اسيدهاي‌چرب‌آزاد و آسيل‌گليسرولهاي ناقص

به منظور خنثي‌سازي اسيدهاي چرب واکنش نداده و يا آزاد شده در جريان واکنش از روش Hamam & Shahidi (2005) استفاده شد. مخلوط حاصل از واکنش اسيدوليز آنزيمي به وسيلة محلول سود ۰/۲ مولار تيتر شد. همزمان با استفاده از فنل‌فتالئين به عنوان معرف، با قرار دادن الکترود pH متر در ظرف و رسم منحني تيتراسيون، نقطة پاياني تيتراسيون در pH حدود ۸/۵ و با تغيير رنگ محلول به صورتي تعيين شد. براي استخراج آسيل‌گليسرول‌ها ۵۰ ميلي‌ليتر هگزان به مخلوط اضافه و بعد از همزدن شديد به يک قيف جدا کننده منتقل شد. فرصت داده شد تا اينکه دو فاز آبي و آلي جداسازي شوند. لاية آبي پاييني دور ريخته شد و لاية آلي به منظور حذف رطوبت باقيمانده از بستر سديم سولفات بدون‌آب عبور داده شد. هگزان در آون خلأ تبخير شد و آسيل‌گليسرول‌ها به دست آمدند. جداسازي آسيل‌گليسرول‌هاي ناقص از مخلوط واکنش با استفاده از روش Farmani *et al*. (2008) انجام شد. آسيل گليسرول‌هاي به دست آمده با حجم مساوي از اتانول (۹٦%) در يک لولة آزمايش مخلوط و كاملا همزده شدند. سپس فاز بالايي (اتانولي) جدا شد. اين عمل پنج بار تکرار شد. حلال باقيمانده در روغن‌ها با وارد کردن جرياني از گاز نيتروژن (خلوص ۹۹/۹%) به داخل آن خارج شد. نمونه‌هاي خالص‌سازي شده تا زمان انجام مراحل بعدي آزمايش در فريزر و دماي ۱۸-درجة سلسيوس نگهداري شدند.

تعيين توزيع موقعيتي اسيدهاي چرب روغن

براي تعيين توزيع موقعيتي اسيدهاي چرب روغن کلزا در اين مطالعه، ۰/۱ گرم از نمونة روغن درون لوله آزمايش توزين شد و سپس حدود ۲۰ ميلي‌گرم از ليپاز پانکراس همراه با ۲ ميلي‌ليتر از محلول بافر تريسبا pH= ۷/٦ (مناسب براي فعاليت آنزيم) اضافه و به شدت توسط شيکر همزده شد. بعد از ايجاد محلول يکنواختي از آنزيم، بافر و روغن، محلول‌هاي آبي سديم کوليت (g/L ۱) و کلسيم کلريد (۲۲۰g/L) اضافه و به آرامي مخلوط شدند. محلول حاصل به مدت يك دقيقه درون حمام آبگرم (٤۰ درجه سلسيوس) با دست و بعد از آن، بلافاصله به مدت ۲ دقيقه به شدت توسط شيکر همزده شد. بعد از اتمام همزدن، بلافاصله به آن ۱ ميلي‌ليتر اسيدكلريدريك ٦ نرمال و ۱ ميلي‌ليتر دي اتيل اتر اضافه و توسط شيکر يکنواخت گرديد. سپس، به مدت ۵ دقيقه توسط سانتريفوژ با ۱۵۰۰ دور در دقيقه سانتريفوژ شد. لاية رويي با استفاده از ميکروسرنگ، درون ويالي جمع‌آوري و به منظور حذف آب باقيمانده از داخل ستون سديم سولفات عبور داده شد و حلال باقيمانده با عبور جريان گاز نيتروژن خارج گرديد. مخلوط ليپيدي حاصل جهت استخراج منو آسيل‌گليسرول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. به اين منظور صفحات TLC (۲۰×۲۰cm ، ۰/۵ mm،سيليکا ژل ٦۰) با محلول اسيد بوريک ۵% (وزني حجمي) در اتانول و آب (به نسبت ۱ به ۱) آغشته و بعد از فعال سازي در دماي ۱۱۰ درجه سلسيوس به مدت ۳۰ دقيقه استفاده گرديدند. جهت آناليز نمونه، ۲۰ ميکروليتر از ليپيد استخراجي با استفاده از يک ميکروسرنگ در عرض صفحات TLC و به فاصله ۲cm از لبه صفحات بارگذاري شد و سپس درون حلالي شامل مخلوط هگزان، دي‌اتيل‌اتر و اسيد فرميك به نسبت‌هاي۷۰ به ۳۰ به ۱ (حجمي حجمي) قرار گرفت. با عبور حلال از روي نمونه، سه بخش منو، دي و تري آسيل‌گليسرول به صورت باندهاي مجزا از هم تفکيك شدند. باندهاي ليپيد به وسيله اسپري کردن محلول۱% (وزني حجمي) ۲،۷دي فلوئوروسئين در متانول و آب (به نسبت حجمي ۹۵ به ۵) و تحت نورUVآشکار سازي شدند. باند ۲- مونو آسيل‌گليسرول با R_f=۰/۰۳۵ از روي صفحه به

1 . Wattman

درون لوله آزمايش حاوي حلال دي اتيل اتر تراشيده و توسط شيكر به خوبي همزده شد تا منو آسيل‌گليسرول موجود در محيط به‌خوبي درون حلال حل شود. با سانتريفوژ كردن محتويات درون لوله آزمايش و انتقال فاز رويي به‌داخل لوله آزمايش ديگري كه از قبل توزين شده و عبور جريان ملايم گاز ازت حلال باقيمانده تبخير شد. بدين ترتيب تنها منوآسيل‌گليسرول درون لوله باقي ماند. با توزين لوله آزمايش، وزن منو آسيل‌گليسرول به دست آمد و جهت متيله شدن ثبت شد (AOCS, Ch 3-91).

بررسي تركيب درصد اسيدهاي چرب

نمونة روغن با استفاده از روش Huang *et al.* (2006) با استفاده از سديم متوكسيد به متيل استرهاي اسيدچرب تبديل شد. براي اين منظور ۲۰ ميلي‌گرم از روغن خالص‌سازي شده در ۵۰۰ ميكروليتر هگزان حل شد و سپس با ۲۵۰ ميكروليتر سديم متوكسيد (محلول ۰/۵ مولار در متانول) در يک لولة آزمايش مخلوط و بعد از بستن در لولة آزمايش به مدت ۱ دقيقه به شدت همزده (Vortex) شد. بعد از اضافه كردن ۵۰۰ ميكروليتر محلول سديم كلريد اشباع، براي مدت ۱۵ ثانيه به شدت مخلوط شد. بعد از گذشت ۱۰ دقيقه، به منظور خشک كردن نمونه، مقداري سديم سولفات بي‌آب به مخلوط اضافه گرديد. در پايان ۵۰ ميكروليتر هگزان و ۲۰ميكروليتر استاندارد داخلي (متيل تري دكانوئات) با غلظت ثابت به هركدام از نمونه‌ها اضافه شد. بعد از مدت ۳۰ دقيقه لاية هگزان توسط يك ميكروسرنگ تميز جداسازي و توسط صافي (ميكروپور، ۰/٤٥ ميكرومتر) داخل ويال صاف وتا زمان تزريق به دستگاه GC نگهداري شد.

براي اندازه گيري كيفي و كمي اسيدهاي چرب متيله از دستگاه GC (شيمادزو 14-A، كيوتو، ژاپن) مجهز به ستون موبين (Restec RT-2560، طول ۱۰۰ متر، قطر داخلي ۰/۲۵ ميلي‌متر)، آشكارگرFID[1] و گاز حامل نيتروژن استفاده شد. برنامه دمايي مورد استفاده براي ستون به اين شرح بود: نگهداري دما به مدت ٤ دقيقه در ۱۰۰°C، بالا بردن دما با سرعت ۳°C در دقيقه تا دماي ۲٤۰°C، حفظ اين دما به مدت ۵ دقيقه. لازم به ذكر است در طول مدت آزمايش دماي محل تزريق و آشكارگر به ترتيب ۲۲۵°C و ۲٤۰°C بود.

تعيين عدد يدي

اين كار با محاسبه عدد يدي (IV) پروفيل اسيد چرب نمونه‌ها از رابطه زير طبق روشAOCS Cd 1c-85 انجام شد.

$$IV=(0.95\times\%C16:1)+(0.86\times\%C18:1)+(1.732\times\%C18:2)+(2.616\times\%C18:3)+(0.785\times\%C20:1)+(0.723\times\%C22:1) \quad (۱)$$

1 . Flame Ionization Detector

اندازه گيري ميزان اسيدهاي چرب در سه موقعيت تري-آسيل‌گليسرول روغن كلزا

مقادير اسيدهاي چرب در جايگاه *sn*-2 روغن كلزا بعد از هيدروليز روغن با ليپاز پانكراس توسط تزريق به دستگاه GC تعيين شد. به منظور به دست آوردن مقادير اسيدهاي چرب در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 از اين معادله استفاده مي‌شود (Fomuso&Akoh, 2002):

$$sn\text{-}1,3 = [3.(sn\text{-}1,2,3) - (sn\text{-}2)]/2 \quad (۲)$$

***sn*-2**: درصد مولي اسيدهاي چرب موجود در ۲-مونوآسيل-گليسرول‌ها

***sn*-1, 2, 3**: درصد مولي اسيدهاي چرب موجود در تري آسيل گليسرول ها (روغن كلزا)

***sn*-1, 3**: درصد مولي اسيدهاي چرب موجود در ۱و۳-دي‌آسيل-گليسرول‌ها (اين دو موقعيت يكسان در نظر گرفته مي شوند).

آناليز آماري

تمام آزمايش‌ها به منظور تهيه ليپيد بازساخته به روش تاگوچي طرح ريزي و سپس به وسيله نرم افزار Minitab (مدل 14.1) آناليز گرديد. كليه آزمايش‌ها دو بار تكرار شد و داده‌هاي به دست آمده با استفاده از نرم افزار MSTATC جهت آناليز واريانس و مقايسة ميانگين‌ها بررسي شدند.

نتايج و بحث

تركيب درصد اسيد چرب نمونه‌هاي حاصل از واكنش

انجام واكنش اسيدوليز آنزيمي روغن كلزا با اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک، به علت وارد كردن اسيدهاي چرب جديد و خروج بعضي از اسيدهاي چرب موجود در ساختار روغن اوليه، بر روي تركيب درصد اسيد چرب نمونه‌هاي حاصل از واكنش تأثيرگذار بود. اثر متغيرهاي واكنش در قالب طرح تاگوچي بر روي تركيب درصد اسيدچرب و عدد يدي نمونه‌هاي حاصل از واكنش اسيدوليز روغن كلزا با اسيدهاي كاپريليک و كاپريک درحضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام به ترتيب در جداول (۲) و (۳) آمده است. روغن كلزاي اوليه (شاهد) فاقد اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک بود كه با انجام واكنش اسيدوليز در شرايط مختلف، اسيدهاي چرب زنجير متوسط كاپريليک و كاپريک جايگزين بخشي از اسيدهاي چرب موجود در روغن كلزا گرديد. تركيب درصد اسيد چرب نمونه‌ها نشان داد كه روغن حاصل از واكنش ۱ (٤٥°C، ۱۵ ساعت، نسبت مولي اسيد چرب به روغن۱:۱ و ٤% آنزيم) پايين‌ترين درصد مولي اسيدهاي چرب كاپريليک (۱۲/٤%) و كاپريک (٦/٨%) را دارا بود. در حالي كه روغن حاصل از واكنش ۹ (۵۵°C، ۱۵ ساعت، نسبت مولي اسيد چرب به روغن ۱:۳ و ۱۲% آنزيم) بالاترين مقدار اسيدهاي چرب كاپريليک (۳۷/۲%) و كاپريک (۳۸/۹%) را نشان داد. با اين

حال مقدار اسيد کاپريليک در نمونة حاصل از واکنش ۸ (۴۵°C، ۴۵ ساعت، نسبت مولي اسيد چرب به روغن ۱:۳ و ۸% آنزيم) با واکنش ۹ در سطح ۵% تفاوت معني داري نداشت. اين نتايج با يافته‌هاي Zhao *et al.* (2007) تا حدودي همخواني داشت. اين محققان واکنش اسيدوليز لارد با اسيد کاپريک را در حضور حلال آلي هگزان و ليپوزيم تي‌ال آي‌ام بررسي کردند که بالاترين مقدار اسيد کاپريک را در شرايط واکنشي ۵۵°C، ۲۴ ساعت، نسبت مولي اسيد چرب به روغن ۱:۲ و ۱۵% آنزيم به دست آوردند. با افزايش مقادير اسيدهاي چرب کاپريليک و کاپريک در روغن در اثر واکنش اسيدوليز، درصد مولي اسيدهاي چرب اشباع در نمونه‌هاي حاصل از واکنش در مقايسه با شاهد افزايش قابل توجهي پيدا کرد. مقدار اسيدهاي چرب پالمتيک ($C_{16:0}$) استئاريک ($C_{18:0}$) و اولئيک در شرايط بهينة واکنش نسبت به شاهد به حدود نصف کاهش پيدا کرد. درحالي که اسيدهاي چرب لينولئيک ($C_{18:2}$) و لينولنيک ($C_{18:3}$) در جريان واکنش در مقايسه با روغن اوليه کاهش کمتري را نشان دادند. اين موضوع به ويژگي آنزيم نسبت داده مي‌شود. ليپوزيم تي-ال‌آي‌ام يک آنزيم يک، سه-ويژه است و از آنجايي که بخش قابل توجهي از اسيدهاي چرب پالمتيک، استئاريک و اولئيک روغن کلزا در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 قرار دارند (Xu *et al.*, 1998) انتظار مي‌رود که در اثر واکنش با ليپوزيم تي‌ال آي‌ام اين اسيدهاي چرب افت بيشتري را نشان دهند.

جدول ۱- طرح ريزي متغيرهاي موثر بر واکنش بر اساس طرح تاگوچي

واکنش ها	نسبت مولي اسيد چرب به روغن	درصد آنزيم	دما(°C)	زمان(ساعت)
۱	۱	٤	٤٥	۱٥
۲	۱	۸	٥٥	۳۰
۳	۱	۱۲	٦٥	٤٥
٤	۲	٤	٥٥	٤٥
٥	۲	۸	٦٥	۱٥
٦	۲	۱۲	٤٥	۳۰
۷	۳	٤	٦٥	۳۰
۸	۳	۸	٤٥	٤٥
۹	۳	۱۲	٥٥	۱٥

جدول ۲- ترکيب درصد اسيد چرب نمونه‌هاي حاصل از اسيدوليز آنزيمي روغن کلزا با اسيد کاپريليک در حضور ليپوزيم تي‌ال‌آي‌ام. (روغن کلزاي واکنش نداده به عنوان شاهد استفاده شد).

نمونه‌ها	$C_{8:0}$	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$	SFA	USFA	IV
شاهد	۰	۴/۷±۰/۳ ^{a}	۲/۱±۰/۱ ^{a}	۵۸/۹±۰/۳ ^{a}	۲۴/۵±۰/۱ ^{a}	۹/۷±۰/۱ ^{a}	۶/۹ ^{g}	۹۳/۱ ^{a}	۱۱۸/۵±۰/۱۲ ^{a}
۱	۱۲/۴±۰/۵ ^{h}	۳/۹±۰/۱ ^{b}	۱/۹±۰/۲ ^{b}	۵۱/۲±۱/۴ ^{b}	۲۲/۰±۰/۴ ^{b}	۸/۵±۰/۷ ^{b}	۱۸/۲ ^{f}	۸۱/۸ ^{b}	۱۱۱/۱±۳/۳ ^{b}
۲	۱۸/۱±۰/۲ ^{g}	۳/۵±۰/۱ ^{bc}	۱/۸±۰/۱ ^{b}	۴۸/۱±۰/۴ ^{c}	۲۰/۸±۰/۵ ^{cd}	۷/۶±۰/۳ ^{c}	۲۳/۵ ^{e}	۷۶/۵ ^{c}	۱۰۶/۷±۰/۳ ^{c}
۳	۲۱/۰±۱/۱ ^{f}	۳/۸±۰/۱ ^{b}	۱/۹±۰/۲ ^{b}	۴۵/۹±۰/۴ ^{d}	۲۰/۰±۰/۵ ^{ef}	۷/۴±۰/۵ ^{cd}	۲۶/۷ ^{d}	۷۳/۳ ^{d}	۱۰۴/۷±۲/۷ ^{c}
۴	۲۹/۴±۱/۴ ^{d}	۲/۹±۰/۱ ^{de}	۱/۲±۰/۱ ^{c}	۴۰/۴±۰/۲ ^{f}	۱۹/۰±۰/۴ ^{f}	۷/۰±۰/۶ ^{de}	۳۳/۶ ^{b}	۶۶/۴ ^{f}	۹۹/۸±۲/۹ ^{de}
۵	۲۳/۴±۱/۲ ^{e}	۳/۹±۰/۶ ^{b}	۱/۹±۰/۱ ^{b}	۴۲/۵±۰/۳ ^{e}	۲۱/۴±۰/۲ ^{bc}	۶/۸±۰/۱ ^{e}	۲۹/۳ ^{c}	۷۰/۷ ^{e}	۱۰۲/۸±۰/۷ ^{cd}
۶	۲۹/۸±۰/۷ ^{d}	۲/۸±۰/۱ ^{de}	۱/۳±۰/۲ ^{c}	۳۹/۱±۰/۱ ^{f}	۲۰/۱±۱/۱ ^{de}	۶/۸±۰/۱ ^{e}	۳۳/۹ ^{b}	۶۶/۱ ^{f}	۹۵/۷±۱/۶ ^{f}
۷	۳۵/۰±۰/۳ ^{c}	۳/۱±۰/۲ ^{cd}	۱/۳±۰/۱ ^{c}	۳۶/۹±۰/۸ ^{g}	۱۷/۲±۰/۲ ^{g}	۶/۵±۰/۲ ^{e}	۳۹/۴ ^{a}	۶۰/۶ ^{g}	۹۶/۶±۰/۴ ^{ef}
۸	۳۶/۰±۲/۲ ^{bc}	۲/۶±۰/۴ ^{de}	۱/۰±۰/۱ ^{d}	۳۶/۲±۲/۲ ^{gh}	۱۷/۶±۰/۶ ^{g}	۶/۷±۰/۲ ^{e}	۳۹/۶ ^{a}	۶۰/۴ ^{g}	۹۵/۹±۱/۷ ^{f}
۹	۳۷/۲±۱/۵ ^{ab}	۲/۳±۰/۱ ^{e}	۱/۲±۰/۱ ^{c}	۳۴/۸±۰/۹ ^{h}	۱۷/۷±۰/۴ ^{g}	۶/۷±۰/۱ ^{e}	۴۰/۷ ^{a}	۵۹/۳ ^{g}	۹۴/۸±۱/۸ ^{f}

اختصارها: SFA ، مجموع اسيدهاي چرب اشباع ؛ USFA ، مجموع اسيدهاي چرب غير اشباع ؛ IV ، عدد يدي.

اعداد به صورت ميانگين± انحراف استاندارد حاصل از دو تکرار نشان داده شده اند. اعداد داراي بالانويس هاي مختلف داراي تفاوت معني دار در سطح $P<0.05$مي باشند.

جدول ۳- ترکيب درصد اسيد چرب نمونه هاي حاصل از اسيدوليز آنزيمي روغن کلزا با اسيد کاپريک در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام. روغن کلزاي واکنش نداده به عنوان شاهد استفاده شد.

نمونه ها	$C_{10:0}$	$C_{16:0}$	$C_{18:0}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$	SFA	USFA	IV
شاهد	۰	۴/۷±۰/۳ ^{a}	۲/۲±۰/۱ ^{a}	۵۸/۹±۰/۳ ^{a}	۲۴/۵±۰/۱ ^{a}	۹/۷±۰/۱ ^{a}	۶/۹ ^{g}	۹۳/۱ ^{a}	۱۱۸/۵±۰/۱۲ ^{a}
۱	۶/۸±۲/۱ ^{f}	۴/۳±۰/۵ ^{ab}	۱/۹±۰/۱ ^{b}	۵۴/۲±۱/۴ ^{b}	۲۳/۷±۰/۷ ^{a}	۹/۰±۰/۹ ^{b}	۱۳/۰ ^{f}	۸۷/۰ ^{b}	۱۱۴/۰±۲/۴ ^{b}
۲	۱۹/۷±۱/۹ ^{e}	۳/۵±۰/۱ ^{c}	۱/۷±۰/۲ ^{b}	۴۷/۱±۱/۴ ^{c}	۲۰/۲±۰/۱ ^{cd}	۷/۷±۰/۱ ^{c}	۲۵/۰ ^{e}	۷۵/۰ ^{c}	۱۰۴/۲±۱/۶ ^{c}
۳	۱۸/۹±۰/۷ ^{e}	۳/۹±۰/۱ ^{bc}	۲/۱±۰/۳ ^{a}	۴۶/۷±۱/۲ ^{c}	۲۱/۴±۰/۶ ^{b}	۷/۰±۰/۲ ^{d}	۲۴/۹ ^{e}	۷۵/۱ ^{c}	۱۰۲/۰±۲/۴ ^{c}
۴	۲۹/۰±۰/۴ ^{c}	۲/۹±۰/۱ ^{d}	۱/۵±۰/۲ ^{c}	۴۰/۳±۰/۲ ^{e}	۱۹/۲±۰/۷ ^{d}	۷/۰±۰/۲ ^{d}	۳۳/۴ ^{c}	۶۶/۶ ^{e}	۹۷/۴±۰/۹ ^{d}
۵	۲۲/۴±۱/۱ ^{d}	۳/۵±۰/۳ ^{c}	۱/۹±۰/۱ ^{b}	۴۳/۹±۰/۲ ^{d}	۲۱/۱±۱/۱ ^{bc}	۷/۲±۰/۲ ^{cd}	۲۷/۹ ^{d}	۷۲/۱ ^{d}	۱۰۲/۳±۱/۳ ^{c}
۶	۲۸/۶±۰/۷ ^{c}	۲/۹±۰/۱ ^{d}	۱/۷±۰/۱ ^{b}	۴۰/۲±۰/۱ ^{e}	۱۹/۴±۰/۴ ^{d}	۷/۲±۰/۱ ^{cd}	۳۳/۲ ^{c}	۶۶/۸ ^{e}	۹۸/۲±۱/۱ ^{d}
۷	۳۵/۰±۰/۱ ^{b}	۲/۹±۰/۲ ^{d}	۱/۲±۰/۱ ^{d}	۳۸/۰±۱/۰ ^{f}	۱۶/۸±۰/۴ ^{e}	۶/۲±۰/۳ ^{e}	۳۹/۰ ^{b}	۶۱/۰ ^{f}	۹۰/۳±۰/۸ ^{e}
۸	۳۵/۱±۰/۳ ^{b}	۲/۶±۰/۳ ^{d}	۱/۳±۰/۱ ^{d}	۳۷/۲±۰/۱ ^{f}	۱۷/۷±۰/۲ ^{e}	۶/۲±۰/۴ ^{e}	۳۹/۰ ^{b}	۶۱/۰ ^{f}	۹۱/۱±۱/۴ ^{e}
۹	۳۸/۹±۱/۵ ^{a}	۲/۶±۰/۴ ^{d}	۱/۱±۰/۱ ^{d}	۳۴/۳±۰/۴ ^{g}	۱۶/۹±۰/۶ ^{e}	۶/۳±۰/۱ ^{e}	۴۲/۶ ^{a}	۵۷/۴ ^{g}	۸۹/۰±۱/۸ ^{e}

اختصارها: SFA ، مجموع اسيدهاي چرب اشباع ؛ USFA ، مجموع اسيدهاي چرب غير اشباع ؛IV ، عدد يدي.

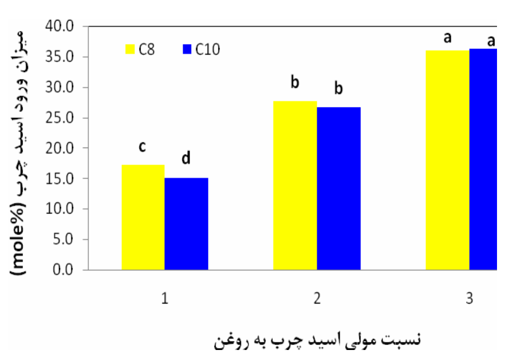
اعداد به صورت ميانگين± انحراف استاندارد حاصل از دو تکرار نشان داده شده اند. اعداد داراي بالانويس‌هاي مختلف داراي تفاوت معني دار در سطح $P<0.05$مي باشند.

ليپوزيم تي‌ال آي‌ام به طور ميانگين به ترتيب ۲٦/۹ و ۲٦/۱ درصد مولي اسيدهاي چرب کاپريليک و کاپريک را در ساختار روغن کلزا وارد کرد، به عبارتي تغيير نوع اسيد چرب تأثير معني‌داري بر ميزان عملکرد آنزيم درواکنش اسيدوليز نداشت و دو اسيد چرب کاپريليک و کاپريک در مجموع عملکرد يکساني را نشان دادند.

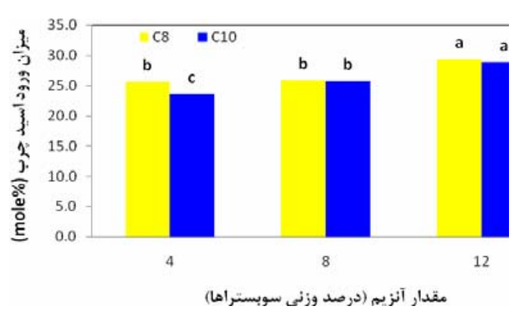
بررسي تغييرات عدد يدي نمونه‌هاي حاصل از واکنش نشان داد که عدد يدي روغن کلزاي اوليه (شاهد) (۰/۱۲±۱۱۸/۵) با پيشبرد واکنش اسيدوليز آنزيمي با اسيدهاي چرب کاپريليک و کاپريک کاهش يافت. کاهش عدد يدي مربوط به افزايش مجموع اسيدهاي چرب اشباع و کاهش اسيدهاي چرب غيراشباع است.

بررسي اثر متغيرهاي مؤثر بر واکنش اسيدوليز

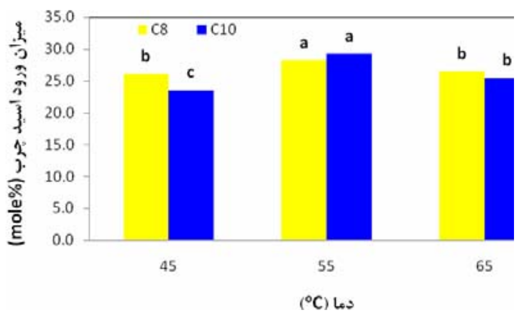
واکنش اسيدوليز آنزيمي به وسيلة متغيرهاي گوناگوني تحت تأثير قرار مي‌گيرد. اثرات اصلي پارامترهاي مؤثر بر واکنش با استفاده از نرم افزار Minitab استخراج و در شکل‌هاي (۱)، (۲)، (۳) و(٤) نشان داده شده است.



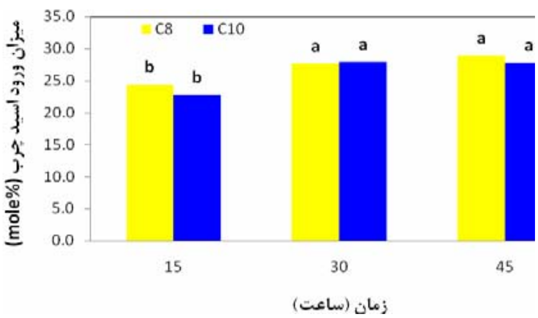
شکل۱- تأثير نسبت مولي اسيد چرب به روغن بر ميزان ورود اسيدهاي چرب کاپريليک(C_8)و کاپريک(C_{10}) در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام. ميانگين‌هاي داراي حرف مشابه تفاوت معني دار ندارند **($P>0.05$)**.



شکل۲- تأثيرمقدار آنزيم بر ميزان ورود اسيدهاي چرب کاپريليک(C_8) و کاپريک (C_{10})در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام .
ميانگين هاي داراي حرف مشابه تفاوت معني دار ندارند **($P>0.05$)**.



شکل۳- تأثير دما بر ميزان ورود اسيدهاي چرب کاپريليک(C_8) و کاپريک (C_{10}) در حضور ليپوزيم تي‌ال‌آي‌ام . ميانگين هاي داراي حرف مشابه تفاوت معني دار ندارند **($P>0.05$)**.



شکل۴- تأثير زمان بر ميزان ورود اسيدهاي چرب کاپريليک(C_8) و کاپريک(C_{10}) در حضور ليپوزيم تي ال آي ام . ميانگين هاي داراي حرف مشابه تفاوت معني دار ندارند **($P>0.05$)**.

اثر نسبت مولي اسيد چرب به روغن کلزا

اثر نسبت مولي اسيدهاي چرب کاپريليک و کاپريک به روغن کلزا بر روي ميزان ورود اسيد چرب در جريان واکنش اسيدوليز آنزيمي با ليپوزيم تي‌ال آي‌ام در شکل (۱) ديده مي‌شود.

در مورد هر دو اسيد چرب کاپريليک و کاپريک با افزايش نسبت مولي اسيد چرب به روغن از ۱:۱ به ۱:۳، ميزان ورود در ساختار روغن کلزا افزايش يافت. زيرا افزايش نسبت مولي اسيدچرب به روغن (سوبستراي اوليه) تعادل واکنش را به سمت تشکيل فرآورده و افزايش وارد شدن گروه‌هاي آسيل در ساختار روغن هدايت مي‌کند (Yang *et al.*, 2003). از طرفي استفاده از نسبت‌هاي مولي بالاتر اسيد چرب به روغن باعث بهبود سرعت واکنش مي‌شود و در نتيجه زمان مورد نياز انجام واکنش را کاهش مي‌دهد (Mu *et al.*, 1998).

نتايج به دست آمده در مورد تأثير مثبت افزايش نسبت مولي اسيد چرب با نتايج تعدادي از محققان مطابقت داشت. Hamam & Shahidi (2005) در جريان اسيدوليز آنزيمي روغن تک ياخته با اسيد کاپريک نشان دادند که با افزايش نسبت مولي اسيد چرب به روغن از ۱:۱ به ۱:۳، ميزان ورود اسيد

کاپريک در ساختار روغن افزايش پيدا مي‌کند. Senanayake & Shahidi (2002) ملاحظه کردند که در جريان اسيدوليز آنزيمي جهت سنتز ليپيد بازساخته، وقتي نسبت مولي سوستراها از ۱:۱ به ۱:۳ افزايش پيدا کرد، ميزان وارد شدن اسيد کاپريک مطابق با آن افزايش پيدا مي‌کند. در يک بررسي که به تازگي انجام شد .Zhao *et al* (2007) در جريان اسيدوليز آنزيمي لارد با اسيد کاپريک با استفاده از ليپوزيم تي‌ال آي‌ام نشان دادند که بالاترين ميزان ترکيب شدن اسيد کاپريک در ساختار لارد در نسبت مولي ۱:۲ اسيدچرب به روغن حاصل مي شود. در حالي که افزايش نسبت مولي از۱:۲ به ۱:۸ تأثير معني داري بر ميزان اسيد کاپريک لارد نداشت. که اين موضوع به از دست رفتن فعاليت آنزيم نسبت داده شد. زيرا سطوح بالاي اسيدهاي چرب آزاد، مقدار زيادي از گروه‌هاي اسيد کربوکسيليک آزاد يا يونيزه را توليد مي‌کند که ممکن است محيط اطراف ليپاز را اسيدي کند و باعث جذب سطحي آب از سطح مشترک شود (Kuo&Parkin, 1993). از طرفي استفاده از نسبت‌هاي مولي بالاتر اسيد چرب به روغن از نظر اقتصادي مقرون به صرفه نيست و به علت فرايندهاي پيچيدة پايين دستي براي حذف اسيدهاي چرب آزاد باقيمانده در فراورده باعث کاهش بازده محصول مي‌شود (Zhao *et al*., 2007).

مقايسة دو اسيدچرب کاپريليک و کاپريک نشان داد که در نسبت مولي ۱:۱ اسيدچرب به روغن مقدار بيشتري از اسيد کاپريليک در ساختار روغن وارد شد. که اين موضوع ممکن است به علت درازاي کمتر زنجيرة کربني اسيد کاپريليک نسبت به اسيد کاپريک باشد. در مورد اثر طول زنجير اسيد چرب در واکنش اسيدوليز، Tsuzuki (2005) در بررسي واکنش اسيدوليز آنزيمي تري اولئين با اسيدهاي چرب زنجير کوتاه در حلال آلي و در حضور ليپاز آسپرژيلوس ارايزا نشان داد که با کاهش طول زنجير درجة مشارکت اسيدچرب زنجير کوتاه در تري اولئين افزايش پيدا مي‌کند. در بررسي ديگري .Paez *et al* (2003) گزارش دادند که اسيد کاپريليک در مقايسه با اسيد اولئيک به مقدار بيشتري در ساختار تري اولئين وارد مي‌شود که اين اثر به طول زنجير اسيد چرب نسبت داده شد.

اثر درصد وزني آنزيم به سوستراها

شکل (۲) اثر درصد وزني ليپوزيم تي‌ال آي‌ام به سوستراهاي واکنش روي ميزان ورود اسيدهاي چرب کاپريليک و کاپريک به روغن کلزا را نشان مي دهد

افزايش مقدار آنزيم از ٤% به ۱۲% در مورد اسيد کاپريليک ميزان ترکيب اين اسيد در ساختار روغن را از ۲۵/٦ به ۲۹/۳ درصد مولي افزايش داد و براي اسيد کاپريک باعث افزايش از ۲۳/٦ به ۲۸/۸ درصد مولي شد. مقدار آنزيم ٤ و ۸ درصد بر روي ميزان ورود اسيد کاپريليک تفاوت معني‌داري را نشان نداد ولي با افزايش مقدار آنزيم به ۱۲%، ميزان ورود اسيد کاپريليک به طور معني‌داري افزايش يافت. در حالي که در مورد اسيد کاپريک اثر افزايش مقدار آنزيم از ٤ به ۸ درصد بر ميزان ورود اين اسيد در ساختار روغن در سطح ٥% معني‌دار بود. ورود مقدار بيشتري از اسيد کاپريليک نسبت به اسيدکاپريک در حضور ٤% آنزيم به درازاي کمتر زنجيرة کربني اسيدکاپريليک نسبت داده مي‌شود. در کل با افزايش درصد وزني آنزيم به سوستراها مقدار ترکيب هر دو اسيد چرب کاپريک و کاپريليک در ساختار روغن افزايش يافت. وقتي مقدار آنزيم افزايش پيدا کند، سرعت واکنش با توجه به آن افزايش مي‌يابد. محتواي آنزيم بالاتر مي‌تواند ميزان ورود گروه آسيل را همانند انتقال آسيل در ساختار تري‌آسيل‌گليسرول افزايش دهد (Xu, 2000).

افزايش بيشتر مقدار آنزيم در جريان واکنش ممکن است باعث کاهش ورود اسيدهاي چرب در ساختار روغن در جريان اسيدوليز گردد. که احتمالا به علت کاهش آب هيدراسيون مورد نياز آنزيم و از دست رفتن فعاليت آن است. از طرفي ميزان آنزيم کمتر از نظر اقتصادي مقرون به صرفه‌تر است. نتايج به دست آمده با يافته‌هاي تعدادي از محققان همخواني دارد. .Zhao *et al* (2007) نشان دادند که افزايش محتواي ليپوزيم تي‌ال آي‌ام تا سطح ۱٥% باعث افزايش ورود اسيد کاپريک در ساختار لارد مي‌شود و بعد از آن يک کاهش تدريجي در مقدار اسيد کاپريک مشاهده مي‌گردد. Hamam & Shahidi (2004) با بررسي تأثير درصد ليپاز بر واکنش اسيدوليز آنزيمي دريافتند که با افزايش مقدار آنزيم از ۲ به ۱۰%، مقدار ترکيب اسيد کاپريک به طور تدريجي افزايش پيدا مي‌کند تا به ميزان ۲۲/٤% در حضور ۱۰% ليپاز برسد. Senanayake & Shahidi (2002) نتايج مشابهي را وقتي که ترکيب شدن اسيد کاپريک در روغن چربي خوک آبي را بررسي مي‌کردند، به دست آوردند. Jennings & Akoh (1999) بالاترين سطح ترکيب اسيد کاپريليک در روغن ماهي را در مقدار آنزيم ۱۰% گزارش کردند. در يک بررسي ديگر .Shimada *et al* (1996) دريافتند که مقدار ۲، ٤ و ۸% آنزيم ب ﺩدست آمده از رايزوپوس دلمار به ترتيب ميزان ٤۰، ٤٤ و ٤٥% مولي از اسيد کاپريليک را در روغن ماهي تون وارد مي‌کند.

اثر دما

دما يک فاکتور مهم در اسيدوليز کاتاليز شده با ليپاز است. در کل دماهاي بالاتر به علت تغيير تعادل ترموديناميک واکنش بازده بالاتري را براي واکنش‌هاي اندوترميک فراهم

مي‌كنند. بالا بردن دما به علت افزايش حلاليت سوبستراها و كاهش ويسكوزيتة محلول‌ها فرايند را آسان‌ترمي‌كند. با اين حال دماهاي بالاتر شرايط را براي انتقال آسيل[1] فراهم كرده و از طرفي باعث افزايش سرعت غيرفعال شدن ليپاز مي‌گردند (Martinek, 1993). دماي واكنش بر روي پارامترهايي مانند پايداري آنزيم، نزديكي آنزيم به سوبسترا و پيشبرد واكنش‌هاي رقابتي اثر دارد (Kim *et al*., 2001).

شكل (۳) اثر دماي واكنش بر ميزان ورود اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک در ساختار روغن را نشان مي‌دهد. در دماهاي ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سلسيوس ميزان اسيد كاپريليک به ترتيب به ٢٦/١، ٢٨/٢ و ٢٦/٥ درصد مولي رسيد. در مورد اسيد كاپريک نيز درصد مولي اسيد چرب در دماهاي ٤٥، ٥٥ و ٦٥ درجه سلسيوس به ترتيب به ٢٣/٥، ٢٩/٢ و ٢٥/٤ رسيد. افزايش ميزان اسيدهاي چرب زنجير متوسط در روغن با افزايش دما از ٤٥ به ٥٥ درجه سلسيوس به افزايش سرعت واكنش نسبت داده مي‌شود. در كل هر ۱۰ درجه سلسيوس افزايش دما باعث دو برابر شدن سرعت واكنش و از طرفي افزايش ميزان تركيب اسيد چرب در جريان اسيدوليز مي‌گردد (Hamam & Shahidi, 2005). كاهش نسبي ميزان اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک در دماي ٦٥°C ممكن است به از دست رفتن فعاليت آنزيم در دماهاي بالا مربوط باشد (Zhao *et al*., 2007). مقايسة دو اسيد چرب كاپريليک و كاپريک، در دماي ٤٥°C تفاوت معني داري را نشان داد كه به تفاوت طول زنجير دو اسيد چرب مربوط مي‌شود.

نتايج به دست آمده در مورد اثر دما بر واكنش اسيدوليز آنزيمي با يافته‌هاي تعدادي از محققان مطابقت داشت. در جريان اسيدوليز آنزيمي لارد با اسيد كاپريک در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام، Zhao *et al*. (2007) ملاحظه كردند كه در محدودة دمايي ٤٥-٧٥ درجه سلسيوس، ميزان تركيب اسيد كاپريک تغيير كمي داشت به جز در دماي ٥٥ درجه سلسيوس كه بالاترين مقدار را نشان داد. با افزايش دما به بالاي ۸۰ درجه سلسيوس ميزان تركيب اسيد كاپريک بيشتر كاهش يافت كه به غيرفعال شدن ليپاز در دماي بالا نسبت داده شد.

زمان يک فاكتور مهم در ارزيابي واكنش‌هاي آنزيمي به منظور تعيين سرعت بهينة لازم براي به دست آوردن راندمان مطلوب و به حداقل رساندن هزينه‌هاي واكنش مي‌باشد (Kim *et al*., 2001).

اثر زمان

اثر زمان واكنش روي ميزان ورود اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک در شكل (٤) نشان داده شده است. انجام واكنش اسيدوليز در زمان‌هاي ١٥، ٣٠ و ٤٥ ساعت، به ترتيب باعث تغيير ميزان اسيدكاپريليک به ٢٤/٣، ٢٧/٦ و ٢٨/٨ درصد مولي گرديد و در مورد اسيد كاپريک ميزان ورود اسيد چرب در ساختار روغن به ترتيب به ٢٢/٧، ٢٧/٨ و ٢٧/٧ درصد مولي رسيد كه براي هر دو اسيد چرب با افزايش زمان واكنش به ٤٥ ساعت تفاوت معني‌داري در ميزان ورود به ساختار روغن مشاهده نشد. توقف و يا كاهش روند افزايش درصد مولي اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک با افزايش مدت زمان واكنش به ٤٥ ساعت ممكن است به علت اين باشد كه زمان‌هاي طولاني واكنش در دماهاي بالا باعث دناتوره شدن ليپاز و از دست رفتن ساختار سه بعدي آن و در نتيجه كاهش فعاليت ليپاز مي‌گردد. يک توضيح ديگر در مورد اين حالت وقوع واكنش برگشتي يعني هيدروليز است. با افزايش مدت زمان واكنش به ۳۰ ساعت، واكنش‌هاي سنتز و هيدروليز به تعادل مي‌رسد و آب جمع شده در جريان واكنش‌هاي سنتزي، باعث سرعت بخشيدن به واكنش هيدروليز مي‌گردد (Zhao *et al*., 2007).

در يک بررسي انجام شده در جريان اسيدوليز آنزيمي لارد با اسيد كاپريک با استفاده از ليپوزيم-تي‌ال آي‌ام Zhao *et al*. (2007) نشان دادند كه طولاني‌تر شدن زمان واكنش باعث افزايش ميزان ورود اسيد كاپريک مي‌شود و بيشترين ميزان تركيب در زمان ۷۲ ساعت به دست آمد كه اين ميزان با نتايج به دست آمده براي زمان‌هاي ٢٤، ٣٦ و٤٨ ساعت مشابه بود ولي با زمان‌هاي ۱۲ ساعت يا پايين‌تر در سطح ٥% تفاوت معني‌داري داشت. Hamam & Shahidi (2005) دريافتند كه با افزايش دما از ۱۲ به ٢٤ ساعت، ورود اسيدكاپريک در روغن به طور معني‌داري افزايش پيدا مي‌كند و در ٢٤ ساعت به حداكثر مي‌رسد درحالي كه افزايش زمان واكنش به بالاي ٤٨ ساعت با يک كاهش چشمگير در ميزان ورود اسيد كاپريک همراه است.

توزيع موقعيتي اسيدهاي چرب نمونه‌هاي حاصل از اسيدوليز آنزيمي

جدول (٤) چگونگي توزيع اسيدهاي چرب روغن كلزا در جايگاه‌هاي تري آسيل گليسرول‌هاي آن را نشان مي‌دهد. اسيد اولئيک فراوانترين اسيد چرب موجود در جايگاه‌هاي *sn*-2و *sn*-1, 3 روغن كلزا است. با اين وجود ۷۲% از اين اسيد چرب در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 قرار دارد. اسيدهاي چرب چند غير اشباع لينولئيک و لينولنيک تقريبا به طور مساوي بين جايگاه‌هاي *sn*-2 و *sn*-1, 3 توزيع شده‌اند. به گونه‌اي كه اسيد لينولئيک و لينولنيک به ترتيب به ميزان ٤٣/٧ و ٥٥/٥ درصد در جايگاه *sn*-2 و ٥٦/٣ و ٤٤/٥ درصد در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 قرار دارند.. اسيدهاي چرب اشباع پالمتيک و استئاريک به طور عمده در

1 . Acyl Migration

جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 وجود دارند. در كل در روغن كلزا ۸۸/۱ درصد از اسيدهاي چرب اشباع در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 قرار دارند. در حالي كه تنها ٦٥ درصد از اسيدهاي چرب غير اشباع در اين جايگاه‌ها توزيع شده‌اند. اسيدهاي چرب موجود در جايگاه *sn*-2 بدون توجه به نوع اسيدچرب، در داخل بدن آسان‌تر جذب مي‌شوند (Haumann, 1997).

جدول ۴- چگونگي توزيع اسيدهاي چرب در تري آسيل گليسرول‌هاي روغن كلزا

اسيد چرب	TAG	جايگاه	
		sn-2 (mole%)	*sn*-1,3 (mole%)
$C_{16:0}$	۴/۷±۰/۲۹	۲/۱±۰/۱(۱۴/۵ [a])	۶/۲±۰/۱(۸۵/۵ [b])
$C_{18:0}$	۲/۲±۰/۰۲	۰/۴±۰/۱(۶/۴)	۳/۱±۰/۱(۹۳/۶)
$C_{18:1}$	۵۸/۹±۰/۳۰	۴۹/۵±۰/۲(۲۸/۰)	۶۳/۵±۰/۳(۷۲/۰)
$C_{18:2}$	۲۴/۵±۰/۰۱	۳۲/۱±۰/۲(۴۳/۷)	۲۰/۴±۰/۴(۵۶/۳)
$C_{18:3}$	۹/۷±۰/۰۵	۱۶/۱±۰/۲(۵۵/۵)	۶/۶±۰/۲(۴۴/۵)
SFA	۶/۹	۲/۵ (۱۱/۹)	۹/۳ (۸۸/۱)
USFA	۹۳/۱	۹۷/۷ (۳۵/۰)	۹۰/۵ (۶۵/۰)

a. ۱۰۰ × (۳ ×درصد اسيد چرب در TAG/درصد اسيد چرب در جايگاه*sn*-2)
b. (حاصل a- ۱۰۰)
اختصار. TAG، تري آسيل گليسرول؛ SFA، اسيد چرب اشباع؛ USFA، اسيد چرب غير اشباع.

نحوه توزيع اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک در ليپيدهاي بازساخته توليدي در جريان واكنش با روغن كلزا در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام در جداول (٥) و (٦) نشان داده شده است. ليپوزيم تي‌ال آي‌ام يک ليپاز يک،سه-ويژه است (Zhao *et al*., 2007)، بنابراين انتظار مي‌رود كه در جريان اسيدوليز با اين ليپاز، اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک به طور كامل به جاي اسيدهاي چرب موجود در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 تري‌آسيل‌گليسرول‌هاي روغن كلزا جايگزين شوند.

جدول ۵-چگونگي توزيع اسيدهاي چرب در نمونة حاصل از اسيدوليز آنزيمي روغن كلزا با اسيد كاپريليک در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام

اسيد چرب	TAG	جايگاه	
		sn-2(mole%)	*sn*-1,3(mole%)
$C_{8:0}$	۳۷/۱±۱/۴۶	۱۲/۵±۰/۵(۱۱/۲ [a])	۴۹/۵±۱/۹(۸۸/۸ [b])
$C_{16:0}$	۲/۳±۰/۱۱	۰/۸±۰/۱(۱۱/۸)	۳/۱۱±۰/۱(۸۸/۲)
$C_{18:0}$	۱/۲±۰/۰۶	۰/۱±۰/۰(۲/۴)	۱/۸±۰/۱(۹۷/۶)
$C_{18:1}$	۳۴/۸±۰/۹۲	۴۱/۹±۱/۲(۴۰/۱)	۳۱/۳±۰/۸(۵۹/۹)
$C_{18:2}$	۱۷/۷±۰/۳۷	۲۹/۸±۰/۴(۵۶/۱)	۱۱/۶±۰/۸(۴۳/۹)
$C_{18:3}$	۶/۷±۰/۰۳	۱۴/۸±۰/۴(۷۳/۶)	۲/۶±۰/۲(۲۶/۴)
SFA	۴۰/۶	۱۳/۴ (۱۱/۰)	۵۴/۴ (۸۹/۰)
USFA	۵۹/۲	۸۶/۵ (۴۸/۷)	۴۵/۵ (۵۱/۳)

a.۱۰۰× (۳ ×درصد اسيد چرب در TAG/درصد اسيد چرب در جايگاهsn-2)
b. (حاصل a- ۱۰۰)
اختصارها. TAG، تري آسيل گليسرول؛ SFA، اسيد چرب اشباع؛ USFA، اسيد چرب غير اشباع.

جدول ۶-چگونگي توزيع اسيدهاي چرب در نمونة حاصل از اسيدوليز آنزيمي روغن كلزا با اسيد كاپريک در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام

اسيد چرب	TAG	جايگاه	
		sn-2(mole%)	*sn*-1,3(mole%)
$C_{10:0}$	۳۸/۹±۱/۴۳	۹/۸±۰/۴۷(۸/۴ [a])	۵۳/۴±۲/۰۵(۹۱/۶ [b])
$C_{16:0}$	۲/۶±۰/۳۸	۰/۹±۰/۰۷(۱۱/۹)	۳/۴۱±۰/۵۴(۸۸/۱)
$C_{18:0}$	۱/۱±۰/۰۷	۰/۴±۰/۴۷(۱۱/۹)	۱/۴±۰/۱۳(۸۸/۱)
$C_{18:1}$	۳۴/۲۵±۰/۳۹	۴۳/۸±۱/۵۵(۴۲/۶)	۲۹/۵±۱/۳۷(۵۷/۴)
$C_{18:2}$	۱۶/۹±۰/۶۴	۲۹/۶±۰/۷۱(۵۸/۴)	۱۰/۶±۰/۶۰(۴۱/۶)
$C_{18:3}$	۶/۳±۰/۰۶	۱۵/۵±۰/۷۷(۸۲/۴)	۱/۷±۰/۲۹(۱۷/۶)
SFA	۴۲/۶	۱۱/۱(۳۲/۲)	۵۸/۳ (۶۷/۸)
USFA	۵۷/۴	۸۸/۹(۶۶/۴)	۴۱/۷ (۳۳/۶)

a.۱۰۰× (۳ ×درصد اسيد چرب در TAG/درصد اسيد چرب در جايگاهsn-2)
b. (حاصل a- ۱۰۰)
اختصارها. TAG، تري آسيل گليسرول؛ SFA، اسيد چرب اشباع؛ USFA، اسيد چرب غير اشباع.

بررسي چگونگي توزيع اسيدكاپريليک در ساختار فراورده و مقايسة آن با روغن كلزاي اوليه نشان داد كه اين اسيد چرب به مقدار زيادي جايگزين اسيدهاي چرب موجود در جايگاه *sn*-1, 3 شده است. براي مثال اسيد اولئيک كه در روغن كلزاي اوليه به ميزان ۵۸/۹ درصد مولي وجود داشت، بعد از واكنش به ميزان ۲۵/۱ درصد مولي كاهش پيدا كرد. جايگزيني اسيد كاپريليک در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 تري آسيل گليسرول فراورده، عمل يک،سه-ويژة ليپوزيم تي‌ال آي‌ام را تأييد مي‌كند. بررسي اسيدهاي چرب موجود در تري آسيل گليسرول‌هاي فراوردة به دست آمده از واكنش اسيدوليز روغن كلزا و اسيد كاپريک، در حضور ليپوزيم تي‌ال آي‌ام، نشان داد كه اسيد كاپريک به مقدار زيادي در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 قرار گرفته است. كاهش زياد اسيدهاي چرب اولئيک، پالمتيک و استئاريک كه درصد بالايي از آنها در جايگاه‌هاي *sn*-1, 3 روغن كلزا قرار گرفته‌اند نيز اين موضوع را نشان مي‌دهد.

بررسي توزيع موقعيتي اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک نشان مي‌دهد كه درصدي از اين اسيدهاي چرب در جايگاه *sn*-2 قرار گرفته‌اند. ۱۱/۲ درصد از اسيد كاپريليک و ۸/٤ درصد از اسيد كاپريک در جايگاه*sn*-2 قرار داشتند. با در نظر گرفتن اينكه آنزيم ليپوزيم تي‌ال آي‌ام يک ليپاز يک،سه-ويژه است، حضور اسيدهاي چرب كاپريليک و كاپريک در جايگاه *sn*-2 مقداري انتقال آسيل را نشان مي‌دهد كه چندان غير معمول نيست (Jenning & Akoh, 2000).

Jennings & Akoh (2000) در بررسي توزيع موقعيتي اسيدهاي چرب در ساختار ليپيد بازساختة توليدي از اسيدوليز آنزيمي روغن سبوس برنج با اسيد كاپريک با استفاده از ليپاز

یک،سه-ویژه حضور ۱٤/۲% اسید کاپریک در جایگاه *sn-2* را گزارش کردند که مقداري انتقال آسیل در فراورده را نشان داد.

انتقال آسیل در فرایند اسیدولیز آنزیمي باعث افزایش تولید فراوردههاي جانبي در جریان سنتز لیپیدهاي بازساخته ميشود. این پدیده یک فرایند ترمودینامیک است که جلوگیري کامل از آن در جریان واکنش خیلي دشوار است (Yang *et al*., 2005).

واکنشگاههاي مداوم در مقایسه با بچ براي کاهش انتقال آسیل مناسبتر هستند. زیرا در فرایندهاي مداوم زمان واکنش کوتاه تر است (Mu *et al*., 1998). علاوه بر زمان واکنش، فاکتورهایي مانند دماي واکنش، مقدار رطوبت، نوع حلال آلي، محتواي آنزیم، نوع لیپاز، نوع حامل مورد استفاده براي تثبیت آنزیم و نوع دهندۀ آسیل نیز در میزان انتقال آسیل مؤثر است (Xu et al., 1998).

مقایسۀ دو اسید چرب کاپریلیک و کاپریک نشان داد که اسید کاپریلیک به میزان بیشتري در جایگاه *sn-2* قرار گرفته است. از آنجائي که نوع دهندۀ آسیل در جریان اسیدولیز بر روي انتقال آسیل مؤثر است، حضور مقدار بیشتري از اسید کاپریلیک در جایگاه *sn-2* ممکن است به علت کوتاهي زنجیر آن در مقایسه با اسید کاپریک باشد.

نتیجه گیري کلي

انجام واکنش اسیدولیز آنزیمي روغنکلزا با استفاده از آنزیم لیپوزیم تيالآيام و در حضور حلال آلي هگزان به طور موفقیتآمیزي اسیدهاي چرب کاپریلیک و کاپریک را در ساختار روغن وارد کرد.با وجود تفاوت در طول زنجیر، بین اسیدهاي چرب کاپریلیک و کاپریک در جریان واکنش اسیدولیز تفاوت معنيداري مشاهده نگردید. بررسي تأثیر نسبت مولي اسید چرب به روغن کلزا و مقدار آنزیم مورد استفاده نشان داد که افزایش میزان این دو متغیر با مقدار ورود اسیدهاي چرب در ساختار روغن کلزا نسبت مستقیم دارد.دماي مورد استفاده و مدت زمان واکنش به عنوان عوامل محدود کننده پیشرفت واکنش اسیدولیز در نظر گرفته ميشود زیرا افزایش بیشتر این پارامترها از حد بهینه به علت محدود کردن فعالیت لیپاز باعث کاهش بازده واکنش ميگردد. بررسي چگونگي توزیع اسیدهاي چرب کاپریلیک و کاپریک در محصولات تولید شده از واکنش اسیدولیز آنزیمي روغن کلزا، عمل یک، سه-ویژۀ لیپوزیم-تيال-آيام را نشان ميدهد. در نتیجه این آنزیم مقادیر بیشتري از اسیدهاي چرب کاپریلیک و کاپریک را در جایگاه sn-1, 3 وارد ميکند که با تغییر ناچیز در میزان اسیدهاي چرب زنجیر بلند غیر اشباع در جایگاه sn-2 روغن کلزا در تولید لیپید بازساختۀ MLM کارایي زیادي دارد.

REFERENCES

Akoh, C. C. (1997). Making new structured fats by chemical reaction and enzymatic modification.*Lipid Technol*ogy, 5, 61–66.

Anon. (1996). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists's Society*, 4th ed, 3rd printing.Champain, IL.

Cruz-Ortiz, B. R. , Rioz-Gonzalez, A. J. , Garcia, Y. G., Garza, J. A. R. & Rodriguez-Martinez, J. (2011). Immobilization of *Thermomyceslanuginosus* Lipase in PVA-alginate Beads. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 55(3), 176-180.

Farmani, J. ,Hamedi, M. & Safari, M. (2008). Production of zero *trans*Iranianvanaspati using chemical transesterification and blending techniques from palm olein, rapeseed and sunflower oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 393-399.

Fomuso, L. B. & Akoh, C. C. (2002). Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil and caprylic acid in a bench-scale packed bed bioreactor. *Food Research International*, 35, 15-21.

Hamam, F. &Shahidi, F. (2005).Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid. *Food Chemistry*, 91, 583–591.

Hamam, F. ,&Shahidi, F. (2004). Lipase acidolysis of algal oils with a medium chain fatty acids, capric acid: Optimization using response surface methodology. *Journal of Food Lipids*, 11, 147–163.

Haumann, B. F. (1997). Structured lipids allow fat tailoring. *International News on Fats, Oils and Related Materials*, 8, 1004-1011.

Huang, Z. ,Wang, B. & Crenshaw, A. A. (2006). A simple method for the analysis of trans fatty acid with GC–MS and ATe-Silar-90 capillary column. *Food Chemistry*, 98, 593-598.

Iwasaki ,Y. & Yamane, T. (2000). Enzymatic synthesis of structured lipids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 129-140.

Iwasaki, Y. ,Han, J. J. , Narita, M. , Rosu, R. , & Yamane, T. (1999). Enzymatic synthesis of structured lipids from single cell oil of high docosahexaenoic acid content. *Journal of American Oil Chemists Society*, 76, 563–569.

Jennings, B. H. &Akoh, C. C. (1999).Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids. *Journal of American Oil Chemists Soc*iety, 76, 1133–1137.

Jennings, B. H. &. Akoh, C. C. (2000). Lipase catalyzed modification of rice bran oil to incorporate capric Acid. *Journal of Agricultural* *and Food Chemistry,* 48, 4439-4443.

Kennedy, J. P. (1991). Structured lipids: fats of the future. *Food Technol*ogy, *44*, 76-83.

Kim, I. H. ,Yoon, C. S. , Cho, S. H. , Lee, K. W. , Chung, S. H. & Tae, B. S. (2001). Lipase-Catalyzed Incorporation of Conjugated Linoleic Acid into Tricaprylin. *Journal of American Oil Chemists Society,* 78(5), 547–551.

Ko, S. N. , Kim, H. , Lee, K. T. , Ha, T. Y. , Chung, S. H. & Lee, S. M. (2003). Optimization of enzymatic synthesis of structured lipid with perilla oil and medium chain fatty acid. *Food Science and Biotechnology*, 12(3), 253–256.

Kuo, S. J. &. Parkin, K. L. (1993).Substrate preference for lipase-mediated acyl-exchange reactions with butter oil are concentration-dependent. *Journal of American Oil Chemists Society,* 70(4), 393-399.

Martinek, K. (1993). Need for themostability, its benefits and main strategies for thermostabilization. In M. N. Gupta (Ed.), *Thermostability of enzymes* pp. 76–82. Springer-Verlag, Berlin.

Mu, H. , Xu, X. , Høy, C. E. (1998). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor. *Journal of American Oil Chemists Society,* 75, 1187-1193.

Nunes, P. A. ,Pires-Cabral, P. , Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, 127, 993-998.

Odle, J. (1997). New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by neonate: observations from a piglet model. *Journal of Nutrition,* 127, 1061–1067.

Osborn, H. T. , Akoh, C. C. (2002). Structured Lipids–Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety,* Vol. 1.

Ozturk, T. ,Ustun, G. , Aksoy, H. A. (2010). Production of medium-chain triacylglycerols from corn oil: Optimization by response surface methodology. *Bioresource Technology,* 101, 7456-7461.

Paez, B. C. , Medina, A. R. , Rubio, F. C. , Cerdan, L. E. & Grima, E. M. (2003). Kinetics of lipase-catalyzed Interesterification of triolein and caprylic acid to produce structured lipids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology,* 78, 461–470.

Senanayake, S. P. J. N. &Shahidi, F. (2002). Enzyme-catalyzed synthesis of structured lipids via acidolysis of seal (Phocagroenlandica) blubber oil with capric acid. *Food Research International*, 35, 745–752.

Shimada, Y. ,Sugihara, A. , Nakano, H. , Yokota, T. , Nagao, T. , Komemushi, S. , &Tominaga, Y. (1996). Production of structured lipids containing essential fatty acids by immobilized *Rhizopusdelemar* lipase. *Journal of American Oil Chemists Society,* 73, 1415–1419.

Tsuzuki, W. (2005).Acidolysis between triolein and short-chain fatty acids by lipase in organic solvents. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 69, 1256–1261.

Xu, X. , Skands, A. R. H. , AlderNissen, J. & Hoy, C. (1998). Production of specific structured lipids by enzymatic interesterification: optimization of the reaction by response surface design. *Fett/Lipid,* 100(10), 463-471.

Xu, X. (2000).Production of specific-stucturtedtriacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 287-303.

Yang, T. , Fruekilde, M. B. & Xu, X. (2005). Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming. *Food Chemistry,* 92, 101–107.

Yang, T. ,Xu, X. , He, C. & Li, L. (2003). Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes. *Food Chemistry,* 80, 473–481.

Zhao, H. , Lu, Z. , Bie, X. , Lu, F. & Liu, Z. (2007). Lipase catalyzed acidolysis of lard with capric acid in organic solvent. *Journal of Food Engineering*, 78, 41-46.