

تولید چربی بازساخته از مخلوط روغن آفتتابگردان و فلیک سویا

هما بهمدی^۱، پروین زندی^۲، محمدتقی گلدانی^۱، مهرداد قوامی^۳

۱- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی

۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، انسستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیکی: p.zandi@nnftri.ac.ir

۳- دکترای علوم و صنایع غذایی

تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: امروزه، استری کردن به عنوان ابزاری کارآمد در دستکاری و نوآرایی مولکولی چربی‌ها در صنایع روغن، اهمیت ویژه‌ای یافته است. در این پژوهش، امکان کاربرد استری کردن شیمیایی تصادفی، به عنوان جایگزین هیدروژنه کردن برای تولید چربی‌های بازساخته بدون ترانس، با خواص عملکردی مناسب برای تهیه مارگارین و شورتنینگ، مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها: استری کردن مخلوط روغن‌های آفتتابگردان و سویا کاملاً هیدروژنه شده (فلیک) به نسبت وزنی ۷۰:۳۰ با کاربرد کاتالیزور متوكسید سدیم (۵٪ درصد وزنی) در ۱۱۰°C و زمان فرایند ۳۰ دقیقه، تحت خلا ۱۰۰ میلی‌متر جیوه انجام شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی شامل نقطه لغزش، عدد اسیدی، عدد یودی، عدد پراکسید، باقیمانده صابون و درصد رطوبت در مخلوط اولیه (قبل از استری شدن) و فراورده استری شده، اندازه‌گیری شدند. برای مطالعة روند پیشرفت واکنش استری شدن و توزیع کاملاً تصادفی اسیدهای چرب، قبل و بعد از نوآرایی مولکولی، ترکیب اسیدهای چرب سیس و ترانس (اسید الائیدیک) به روش کروماتوگرافی گازی (GC)، میزان چربی جامد (SFC) به روش رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (NMR) و آرایش اسیدهای چرب در موقعیت ۲ ساختار مولکول تری گلیسریدها پس از هیدرولیز آنزیمی با لیپاز، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و GC سنجیده شد.

یافته‌ها: نوآرایی مولکولی با روش استری کردن موجب کاهش معنی‌دار (۰/۰۵ p) نقطه لغزش از ۳۴°C به ۵۶°C شد که برای تولید مارگارین و شورتنینگ، مناسب است. همان طور که انتظار می‌رفت، مقایسه عدد یودی مخلوط اولیه و فراورده استری شده، تفاوت معنی‌داری (۰/۰۵ p) را نشان نداد. نوآرایی مولکولی موجب کاهش میزان چربی جامد در منحنی SFC شد که دلالت بر بهبود خواص پلاستیکی محصول دارد. ترکیب شیمیایی اسیدهای چرب، در اثر فرایند، تغییر نکرد و مقدار ایزومر ترانس (ناشی از فلیک) در حد ۰/۳۶ درصد، ثابت باقی ماند. فراورده تولیدی حاوی مقدار قابل ملاحظه‌ای اسیدهای چرب چند غیراشباعی بود؛ به طوری که نسبت P/S+T حدود ۱/۱۳ برآورد شد که نشانه برتری تغذیه‌ای آن نسبت به روغن نباتی هیدروژنه شده است.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که استری کردن شیمیایی، برای تولید چربی بازساخته مناسب جهت تولید مارگارین و شورتنینگ بدون ترانس با خواص تغذیه‌ای و عملکردی مناسب در مقیاس پایلوت، امکان پذیر است. ادامه کار در مقیاس صنعتی توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: استری کردن شیمیایی، روغن، چربی بازساخته

۴. مقدمه

استری جدید به وجود آید. این واکنش‌ها بر حسب نوع به سه دسته تقسیم می‌شوند: اسیدولیز (Esterification)، الکلیز (Alcoholsis)، آcidolysis) (Acidolysis) و جابه‌جایی استری (Ester Interchange) یا تبادل استری (Ester Interchange) یا تبادل استری (Transesterification). طی واکنش‌های تبادل استری،

در فناوری روغن‌های خوراکی، اصطلاح استری کردن (Esterification) به واکنش‌هایی اطلاق می‌شود که در آن‌ها روغن یا دیگر مواد حاوی استرهای اسید چرب، با اسیدهای چرب، الكل یا سایر استرهای واکنش دهد و با جابه‌جایی گروه‌های اسید چرب، مولکول‌هایی با پیوندهای

روغن مایع سویا و سویای کاملاً هیدروژنه شده را در حضور کاتالیزور متوكسید سدیم به صورت شیمیایی و تصادفی استری کرد تا مارگارین‌هایی فاقد اسید چرب و Chobanov ترانس تولید کند (۱۲). در همین سال Chobanova مخلوط‌هایی از روغن آفتتابگردان و پیه گاو (۵۰٪:۴۰٪)، روغن آفتتابگردان و چربی خوک (۵۰٪:۴۰٪) و روغن آفتتابگردان و چربی خوک کاملاً هیدروژنه شده (۶۰٪:۴۰٪) را به صورت شیمیایی و تصادفی، استری و تغییرات ساختمان تری‌گلیسریدها را بررسی کردند (۱۳).

Handel L₀ و در سال ۱۹۸۳ برای تولید روغن پایه مارگارین، روغن سویا و پیه گاو را به نسبت (۶۰٪:۴۰٪) به صورت شیمیایی و تصادفی استری کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که فرایند استری کردن موجب حفظ اسیدهای چرب ضروری و عدم تشکیل ایزومرهای ترانس می‌شود. نسبت هر اسید چرب در موقعیت ۲ پس از تکمیل فرایند استری کردن تصادفی با مقداری که از نظر تئوری به دست آمده بود ($\frac{33}{3}$ درصد) همخوانی داشت و نقطه ذوب و میزان چربی جامد (SFC) مخلوط استری-شده، مشابه مارگارین‌های نرم بود (۱۴).

List و همکاران در سال ۱۹۹۵ به منظور تهیه مارگارین و شورتنینگ، استری کردن شیمیایی و تصادفی روغن‌های مایع با روغن‌های نباتی کاملاً هیدروژنه شده را با استفاده از کاتالیزور متوكسید سدیم بررسی کردند. روغن‌های مایع عبارت بودند از: پنبه‌دانه، بادام زمینی، سویا، ذرت و کانولا که با روغن سویا یا پنبه‌دانه کاملاً هیدروژنه شده به نسبت ۱:۴ استری شدند. شورتنینگ تهیه شده از فراوری روغن‌های فوق، خصوصیاتی مشابه با شورتنینگ تجاری حاصل از مخلوط کردن روغن‌های هیدروژنه شده داشت (۱۵).

List و همکاران در همان سال با استری کردن شیمیایی و تصادفی مخلوط روغن سویا و سویای کاملاً هیدروژنه شده به نسبت ۲۰:۸۰ مارگارینی تولید کردند که میزان اسید چرب ترانس آن، بسیار ناچیز بود. میزان اسید چرب ترانس روغن استری شده $\frac{1}{3}$ درصد و در نمونه کنترل تهیه شده از روغن سویای هیدروژنه شده $\frac{1}{2}$ درصد بود (۱۶).

جابه‌جایی گروه‌های اسید چرب از یک استر به استر دیگر و نوآرایی اسیدهای چرب روی مولکول گلیسرید انجام می‌شود. به این ترتیب، می‌توان لیپیدهای بازساخته‌ای تولید کرد که نوع اسیدهای چرب و نحوه توزیع آن‌ها در مولکول‌های تری‌گلیسرید از قبل، طراحی و تعیین شده باشد (Tailor-Made Lipids or Structured Lipids) (۱). این روش، خواص فیزیکی، شیمیایی، تغذیه‌ای و عملکردی مطلوب و مورد نظر با تغییر ماهیت شیمیایی اسیدهای چرب و تشکیل ایزومرهای غیر طبیعی و ترانس همراه نیست (۱). این موضوع با توجه به آثار نامطلوب مصرف اسیدهای چرب اشبع و ایزومرهای ترانس در تغییر وضعیت لیپوپروتئین‌های سرم، کاهش کلسترول LDL و افزایش کلسترول HDL که از مهم‌ترین علل بروز بیماری‌های قلبی عروقی و وقوع سکته‌های زود رس هستند، از نظر تغذیه‌ای و بهداشت جامعه اهمیت بسیار زیادی دارد (۲-۵).

نگرانی‌های موجود درباره آثار نامطلوب اسیدهای چرب ترانس و همچنین الزامات قانونی برای درج میزان اسیدهای چرب ترانس در برچسب مواد غذایی (۶، ۷) باعث توجه بیشتر محققان و صاحبان صنعت به روش‌های جایگزین هیدروژنه کردن شده است (۶، ۷). در برخی از کشورهای پیشرفته صنعتی، تولید چربی‌های بازساخته به طور تجاری عمدتاً از طریق فرایند استری کردن شیمیایی و تصادفی در سیستم‌های غیرپیوسته انجام می‌شود (۸، ۱). در حال حاضر، مهم‌ترین مشکل فنی در تولید صنعتی چربی‌های بازساخته، پایداری اکسیداتیو کمتر آن‌هاست. تحقیقات نشان می‌دهد که پایداری اکسیداتیو محصولات بازساخته نهایی، کمتر از مواد اولیه و فراورده‌های مشابه حاصل از فرایندهای هیدروژنه کردن است. این موضوع به حضور ترکیبات قطبی نسبت داده می‌شود (۹-۱۱) و در برخی موارد، محافظت از فراورده را با کاربرد بسته‌بندی‌های مناسب یا افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها ضروری می‌سازد (۷).

گستردگری کاربرد صنعتی استری کردن شیمیایی، تولید مارگارین و شورتنینگ‌های دارای اسیدهای چرب ترانس ناچیز است. List در سال ۱۹۷۷ مخلوط‌هایی از

(۱۸) یا روش‌های توصیه شده AOAC (۱۹) انتخاب شدند. آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی سه بار تکرار شدند. مواد شیمیایی: متوكسیدیم از شرکت Aldrich با خلوص ۹۵ درصد و لیپاز Mucor miehei با فعالیت $11\mu\text{g}/\text{mg}$ از شرکت Sigma تهیه شد. سایر مواد شیمیایی ساخت شرکت Merck و با درجه خلوص بالا بودند.

دستگاه‌ها و تجهیزات: کنورتور هیدروژن کردن با ظرفیت ۲ لیتر، ساخت شرکت Parr Instrument آمریکا از جنس فولاد زنگ نزن و مجهز به ترمومتر، همزن دو پره‌ای با دور قابل کنترل (تا ۱۰۰۰ دور در دقیقه)، شیر نمونه‌برداری، ورودی هیدروژن، سیستم تأمین خلاء، فشارسنج و مارپیچ‌های فلزی برای عبور آب سرد، دستگاه لاویاند (تینتومتر) نوع D ساخت شرکت Tintometer انگلستان، رفراکتومتر متعلق به شرکت Bausch&Lamb ساخت آمریکا مجهز به حمام آب برای تأمین آب 40°C ، گاز کروماتوگراف مدل Varian 3400 ساخت آمریکا، شناساگر FID و ستون $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ موئین 23-DB با مشخصات (50%) Cyano Propyl Methyl Poly Siloxane) دستگاه رزونانس‌مغناطیسی هسته‌ای (NMR) با مارک Bruker مدل Minispec PC 120 ساخت آلمان.

روش فرایند: برای انجام فرایند استری کردن شیمیایی از کنورتور ۲ لیتری متداول برای هیدروژن کردن استفاده شد. حدود ۲ کیلوگرم از مخلوط روغن آفتاگردان خنثی-شده و فلیک سویا به نسبت وزنی $30:70$ تحت شرایط همزندن (600 دور در دقیقه) و خلا (100 میلی‌متر جیوه) در دمای 95°C به مدت نیم ساعت در کنورتور، حرارت داده شد تا کاملاً خشک شد. سپس دما تا 110°C افزایش داده شد و کاتالیزور متوكسیدیم ($5\%/\text{د}.\text{ر}.\text{ص}$ وزنی) به کمک خلا موجود، وارد محیط شد. لحظه ورود کاتالیزور، به عنوان زمان شروع واکنش در نظر گرفته شد و پس از 30 دقیقه، نمونه‌گیری به کمک شیر تعبیه شده در پایین دستگاه انجام شد. برای متوقف کردن واکنش و جداسازی صابون و سود تشکیل شده، مخلوط روغن و

Petrauskate و همکاران در سال ۱۹۹۸ استری کردن شیمیایی و تصادفی مخلوط سویا و سویای کاملاً هیدروژنه شده یا پالم استئارین را در نسبت‌های متفاوت از $10:90$ تا $25:75$ بررسی کردند. منحنی‌های پلاستیسیتۀ مخلوط‌های استری شده با 50 تا 300 درصد سویای کاملاً هیدروژنه شده یا پالم استئارین، منطبق با شورتنینگ‌ها و مارگارین‌های سخت تجاری بود. در حالی که مخلوط‌های استری شده با 20 درصد سویای کاملاً هیدروژنه شده یا پالم استئارین برای تولید مارگارین‌های نرم، مناسب بودند. مخلوط استری شده روغن سویا با 40 درصد پالم استئارین یا 25 درصد روغن سویای کاملاً هیدروژنه شده، ویژگی‌های مطلوبی برای تولید روغن‌های قنادی داشت. مقدار اسید چرب ترانس مخلوط استری شده (11.0% درصد) در مقایسه با روغن‌های هیدروژنه شده که ویژگی‌های عملکردی مشابه روغن‌های استری شده داشتند (11.2% تا 13.1% درصد) پایین بود^(۱۷).

هدف از انجام این پژوهش، کاربرد فرایند استری کردن شیمیایی تصادفی، با استفاده از روند ۱,2,3-Random Distribution چرب در ساختار مولکولی تری‌گلیسریدها و تولید چربی بازساخته از مخلوط روغن آفتاگردان و فلیک سویا، برای تهیه شورتنینگ و مارگارین بدون ترانس بود.

• مواد و روش‌ها

نمونه‌های روغن: روغن مایع آفتاگردان خالص، قبل از ورود به مرحلۀ رنگبری از خط تولید کارخانه روغن نباتی پارس برداشته شد. روغن سویای کاملاً هیدروژنه شده (فلیک) با کنورتور ۲ لیتری و در شرایط خلا (100 میلی‌متر جیوه، سرعت همزن 700 دور در دقیقه، کاتالیزور نیکل تازه، 110% درصد وزنی تولید شد. فلیک‌های به دست آمده در دفعات مختلف تولید، پس از رنگبری مجدد، آسیاب و با یکدیگر مخلوط و همگن شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های کیفی، در ظروف پلاستیکی دردار و در دمای یخچال، نگهداری شدند. نمونه‌ها مطابق استاندارد ملی ایران، شماره ۴۹۳

برای تعیین ترکیب اسیدهای چرب به روش کروماتوگرافی گازی (GC)، اسیدهای چرب به روش Christie (۲۲) متیله شدند. درجه حرارت ستون در ابتدا 16°C بود که به صورت برنامه‌ریزی شده در هر دقیقه 10°C افزایش می‌یافتد تا به 20°C برسد. دمای محل تزریق و شناساگر به ترتیب 230°C و 250°C بود. گاز حامل، ازت با فشار 10 psi بود.

اندازه‌گیری اسیدهای چرب در موقعیت ۲ مولکول تری گلیسرید به منظور پی بردن به کامل شدن نوازایی مولکولی انجام گرفت. برای هیدرولیز تری گلیسریدها، ۵ میلی گرم از نمونه روغن صاف شده داخل لوله آزمایش در سمباده‌ای توزین شد و به آن 1 ml محلول بافر Tris [(هیدروکسی متیل) متیل آمین] یک مولار با $\text{pH}=8$ و $1\text{ ml}/0.1\text{ ml}$ محلول کلرید کلسیم $2/2$ درصد اضافه شد و به مدت یک دقیقه در حمام آب 40°C قرار گرفت. سپس 1 mg آنزیم لیپاز به آن افزوده شد و به مدت ۲ تا ۴ دقیقه در همان دما به وسیله همزن برقی به شدت مخلوط شد. واکنش هیدرولیز با افزودن 1 ml اتانول و سپس 1 ml اسید کلریدریک 6 نرمال متوقف شد. محصولات حاصل از هیدرولیز سه بار ($3 \times 10\text{ ml}$) توسط مخلوط کلروفرم و متانول ($7/17$) استخراج شد. لایه آلی، دو بار و هر بار با 5 ml آب م قطر، شسته شد و با عبور از سولفات سدیم انیدر خشک شد. سپس، محلول استخراجی با استفاده از حمام آب تا حدود 1 ml تعلیظ شد.

برای تفکیک محصولات هیدرولیز تری گلیسریدها، از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) روی صفحات شیشه‌ای به ابعاد $20 \times 20\text{ cm}$ دارای لایه سیلیکاژل G به ضخامت 0.5 mm که با اسپری اسید بوریک (به میزان 10 درصد وزنی سیلیکاژل) و قرار گرفتن به مدت یک ساعت در آون پنکه‌دار در 110°C فعال شده بودند، استفاده شد. 20 میکرولیتر از محلول استخراجی تغليظ شده و نمونه هیدرولیز شده (50 mg در 1 ml محلول کلروفرم: متانول $17/1$) به کمک میکرو پیپت، لکه‌گذاری شد. برای شناسایی محل منوگلیسریدها و اسیدهای چرب، روی هر صفحه، از استاندارد گلیسریل منو استئارات حل شده

کاتالیزور با آب مقطر گرم حاوی $1/0.1$ درصد اسید سیتریک به صورت مخلوط 50 درصد آبی و تا هنگام شفاف شدن لایه آبی شسته شد. با استفاده از قیف جداکننده یک لیتری، فاز آبی و روغنی از یکدیگر جدا شدند. در صورت لزوم برای شکستن امولسیون آب و روغن از کلرید سدیم استفاده شد. سپس بخش روغنی توسط دستگاه تبخیر گردان، تحت خلا و در دمای حدود 70°C خشک شد.

روش‌های آزمون ویژگی‌های کیفی: ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بخش‌های جامد (فلیک) و مایع، قبل و پس از مخلوط شدن با یکدیگر، به این شرح تعیین شد. بخش مایع: عدد اسیدی، عدد پراکسید، عدد یُدی، میزان صابون، ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده و درصد رطوبت. بخش جامد: نقطه لغزش (slip melting point)، عدد اسیدی، عدد پراکسید، عدد یُدی و ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده. دو بخش مایع و جامد به نسبت مورد نظر توزین و حین ذوب شدن به خوبی با یکدیگر مخلوط شدند. نقطه لغزش، عدد اسیدی، عدد پراکسید، عدد یُدی، درصد رطوبت، میزان چربی جامد، ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده سیس و ترانس (اسید الائیدیک)، آرایش اسیدهای چرب در موقعیت ۲ مولکول تری گلیسرید مخلوط اولیه و همچنین لیپید بازساخته تولیدی، اندازه‌گیری و تعیین شد. همچنین، میزان باقیمانده صابون در مخلوط اولیه و در فراورده استری شده، اندازه‌گیری شد.

نقطه لغزش با روش لوله موئین باز (AOCS,Cc4-95) (۲۰)، عدد اسیدی مطابق استاندارد ملی ایران، شماره (۴۹۳) (۱۸) و با کاربرد حلال (مخلوط پروپانول و تولوئن به نسبت‌های مساوی)، عدد پراکسید مطابق روش AOAC, 965-33 (۱۹)، عدد یُدی با روش هانوس مطابق روش ۹۲۰-۱۵۸ (۱۹)، درصد رطوبت مطابق استاندارد ملی ایران، شماره (۴۹۳) (۱۸) با استفاده از روش AOCS, 17-79 آون خلا، میزان باقیمانده صابون با روش NMR و مطابق (۲۰) و میزان چربی جامد (SFC) توسط Gunstone و همکاران (۲۱) تعیین شدند.

۰ یافته‌ها

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی روغن‌های اولیه و مخلوط آن‌ها، قبل و بعد از استری کردن در جدول ۱ ارائه شده است. نوآرایی مولکولی، نقطه لغزش مخلوط اولیه را به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) کاهش داده و به کمتر از دمای بدن رسانده که این موضوع از نظر تغذیه‌ای و تکنولوژیکی، حائز اهمیت بسیار است. آزمون آماری، تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) را بین عدد یُدی فراورده نوآرایی شده و مخلوط اولیه نشان نداد. عدد اسیدی فراورده نوآرایی شده، نسبت به مخلوط اولیه، افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) نشان داد. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، عدد پراکسید در فراورده، نسبت به مخلوط اولیه کاهش یافته است. کاربرد خلاً و شرایط همزدن، قبل و حین فرایند موجب خارج شدن پراکسید از محیط واکنش شده است. البته تجزیه پراکسیدها در اثر حرارت نیز محتمل است.

میزان صابون در فراورده استری شده 65 ppm و تقریباً سه برابر میزان آن در مخلوط اولیه بود (جدول ۱). وجود رطوبت در مخلوط اولیه، موجب کاهش فعالیت کاتالیزوری و در فراورده نوآرایی شده، موجب کدر شدن محصول و هیدرولیز تری‌گلیسریدها شد بنابراین، به حداقل رساندن مقدار آن، ضروری است. در این پژوهش با کاربرد شرایط خشک کردن با خلاً میزان رطوبت در فراورده به کمتر از مقدار ابتدایی رسانده شد.

در کلروفرم: متانول (۲:۱۷/۷) و مخلوط استاندارد اسیدهای چرب استفاده شد. صفحه TLC در تانک حاوی حلال‌های پترولیوم اتر: دی‌اتیل اتر: اسید استیک گلاسیال (۴:۲۰:۷۰) قرار داده شد. برای آشکار کردن لکه‌ها، شناساگر ۷' و ۲' دی‌کلرو فلورسین به کار رفت که نقاطی با فلوئورست زرد - سبز روی زمینه ارغوانی در منطقه ماورای بنسن (۴۵۴ نانومتر) به وجود آورد. ناحیه ۲-۲-منوگلیسرید (اولین ناحیه پس از مبدأ یا گلیسروول) از روی صفحه به داخل لوله آزمایش، تراشیده شده و ۲-منوگلیسریدها از سیلیکاژل با کمک ۵ml محلول ۱۰٪ متانول در پترولیوم اتر به لوله آزمایش دیگری منتقل شد. سپس با GC جدازی و تعیین مقدار شد (۲۰-۲۲).

هنگامی که نوآرایی کامل با روند ۱,2,3-Random Distribution انجام شود، نسبت موقعیت ۲ برای هر اسید چرب حدود $33/3$ درصد است که از این رابطه محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{مول درصد هر اسید چرب در موقعیت } 2}{\text{مول درصد همان اسید چرب در کل}} = \frac{\text{نسبت موقعیت } 2}{\text{برای هر اسید چرب}}$$

روش‌های آماری: یافته‌های آزمایشگاهی به صورت انحراف معیار \pm میانگین ارائه شد. تجزیه و تحلیل آماری با برنامه SPSS₁₃ و با استفاده از آزمون t و در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی روغن‌های اولیه و مخلوط آن‌ها قبل و بعد از استری کردن

روغن	نقطه لغزش (°C)	عدد یُدی (g/100 g)	عدد اسیدی (mg/g)	عدد پراکسید (meq/kg)	میزان صابون (ppm)	میزان رطوبت (%)	ویژگی
آفتابگردان	-	۱۱۶/۲±۰/۸۵	۰/۰۵±۰/۰۰۴	۶/۶۱±۰/۰۷	۲۵/۴±۰/۶۲	۰/۱۶±۰/۰۰۴	
فلیک سویا	۶۵/۰±۰/۴۱	۶/۳۸±۰/۴۲	۰/۷۸±۰/۰۳۵	۰/۱۰±۰/۰۳	-	-	
مخلوط اولیه	۵۵/۹±۰/۳۸a*	۸۲/۴±۰/۹۷a	۰/۲۷±۰/۰۰۹a	۴/۸۲±۰/۰۵a	۱۸/۵±۰/۷۹a	۰/۱۳±۰/۰۰۵a	
فراورده استری شده	۳۳/۹±۰/۴۹b	۸۲/۵±۱/۱۰a	۰/۵۴±۰/۰۱۱b	۴/۳۹±۰/۰۷b	۶۵/۱±۰/۷۸b	۰/۰۴±۰/۰۱b	

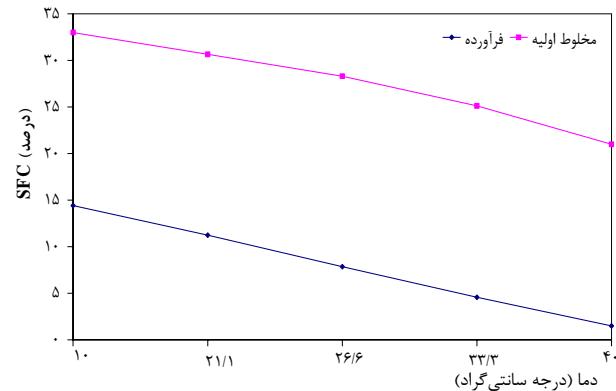
*حروف یکسان نشان دهنده عدم وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح ۵٪ است.

بار تکرار، از نظر میزان اسیدهای چرب پالمیتیک، استئاریک، الائیدیک، اولئیک، لینولئیک و لینولنیک بررسی شد. میانگین و انحراف معیار میزان اسیدهای چرب اندازه‌گیری شده به ترتیب 0.07 ± 0.07 ، 0.08 ± 0.05 ، 0.022 ± 0.009 ، 0.013 ± 0.008 و 0.003 ± 0.004 بود.

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، فرایند استری کردن تصادفی، ترکیب شیمیایی اسیدهای چرب موجود را تغییر نداده است. وجود 0.36% درصد اسیدهای چرب ترانس در فراورده نوآرایی شده، به استفاده از فلیک سویا مربوط می‌شود که حاوی حدود ۲ درصد ایزومر ترانس (اسیدالائیدیک) است. چربی بازساخته در این پژوهش، حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای اسیدهای چرب غیراشباع، به ویژه اسیدهای چرب چند غیراشباعی ضروری است. به طوری که نسبت P/S+T یا نسبت اسیدهای چرب چند غیراشباعی به مجموع اسیدهای چرب اشباع و اسیدهای چرب ترانس حدود $1/13$ برآورد می‌شود.

بررسی آرایش اسیدهای چرب در ساختار مولکول‌های تری گلیسرید (جدول ۲) نشان داد در مخلوط اولیه روغن‌ها و چربی‌ها با منشأ نباتی، بخش عمدۀ اسیدهای چرب غیراشباع در موقعیت ۲ مولکول قرار دارند و در نتیجه، اسیدهای چرب اشباع پالمیتیک و استئاریک موقعیت‌های ۱ و ۳ مولکول‌های تری گلیسرید را اشغال می‌کنند. به عنوان مثال، در مخلوط اولیه $11/6$ درصد از اسید پالمیتیک و $28/2$ درصد از اسید استئاریک در موقعیت ۲ بودند. وجود این مقدار اسید استئاریک در موقعیت ۲ مخلوط اولیه به استفاده از فلیک سویا مربوط می‌شود که بخش عمدۀ آن، تری استئارین است. پس از تبادل تصادفی گروه‌های آسیل، طی نوآرایی مولکولی، نسبت اسیدهای پالمیتیک و استئاریک موجود در موقعیت ۲ به ترتیب از $11/6$ به $33/6$ درصد و از $28/2$ به $29/9$ درصد افزایش یافت. این تغییر برای اسیدهای چرب غیراشباع اولئیک و لینولئیک موجود در موقعیت ۲ به ترتیب از $27/4$ و $37/9$ درصد در مخلوط اولیه به $32/0$ و $30/1$ درصد در فراورده نهایی بود.

در شکل ۱ میزان چربی جامد فراورده تهیه شده از مخلوط روغن آفتتابگردان و فلیک سویا با نسبت وزنی $30:70$ قبل و بعد از استری کردن نشان داده شده است. تکمیل تبادلات تصادفی و تشکیل تری گلیسریدهایی با ساختار مولکولی جدید موجب تغییر نیروهای جاذبه‌ای واندروالس و در نتیجه، تأثیر متقابل بلورهای چربی در شبکه سه بعدی چربی جامد- مایع شده و به این ترتیب، بر خواص رئولوژیکی و عملکردی چربی حاصل در دماهای مختلف اثر می‌گذارد. با در نظر گرفتن نوع روغن در مخلوط اولیه و خواص عملکردی مطلوب محصول نهایی، افزایش یا کاهش میزان SFC در درجه حرارت خاص به عنوان نشانه‌ای از کامل شدن تبادلات تصادفی و نوآرایی مولکولی محسوب می‌شود (25). همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نوآرایی مولکولی، میزان چربی جامد را کاهش داده و منحنی SFC فراورده استری شده، نسبت به مخلوط اولیه کاملاً تغییر کرده است که دلالت بر بهبود خواص پلاستیکی محصول دارد.



شکل ۱- میزان چربی جامد (SFC) فراورده تهیه شده از مخلوط روغن آفتتابگردان و فلیک سویا ($70:30$) قبل و بعد از استری کردن

نتایج آنالیز ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده مخلوط روغن آفتتابگردان و فلیک سویا ($70:30$) قبل و بعد از استری کردن و همچنین نوع و نسبت اسیدهای چرب موجود در موقعیت ۲ ساختار مولکول تری گلیسرید در جدول ۲ ارائه شده است. برای تعیین تکرارپذیری شرایط انتخاب شده در اندازه‌گیری اسیدهای چرب، یک نمونه مخلوط اولیه روغن آفتتابگردان و فلیک سویا ($70:30$) با

جدول ۲- ترکیب اسیدهای چرب تشکیل دهنده روغن‌های اولیه و مخلوط آن‌ها، قبل و بعد از استری کردن
و نسبت اسیدهای چرب موجود در موقعیت ۲ تری‌گلیسریدها

P/S+T*	اسیدهای چرب (mol%)						روغن
	C18:۳	C18:۲	C18:۱	C18:۱t	C18:۰	C16:۰	
۲/۰۰	۵۴/۸۶	۳۰/۶۱	-	۳/۹۰	۷/۶۸		آفتابگردان
-	-	۱/۹۳	۲/۲۱	۸۳/۸۹	۱۰/۹۷		فلیک سویا
• مخلوط اولیه							
۱/۱۱	۱/۴۵	۳۸/۶۸	۲۲/۴۹	۰/۳۶	۲۷/۵۳	۸/۵۶	ترکیب اسیدهای چرب (اندازه‌گیری شده)
۱/۰۷	۱/۴۰	۳۸/۴۰	۲۲/۰۰	۰/۶۶	۲۷/۹۰	۸/۶۷	ترکیب اسیدهای چرب مورد انتظار (محاسبه شده)
-	-	۴۴/۰۴	۱۸/۵۲	-	۲۳/۲۷	۲/۹۹	۲- مونوگلیسرید
-	-	۳۷/۹	۲۷/۴	-	۲۸/۲	۱۱/۶	نسبت ۲- مونوگلیسرید
• فراورده استری شده							
۱/۱۳	۱/۴۲	۳۹/۳۲	۲۲/۶۳	۰/۳۶	۲۷/۰۶	۸/۵۸	ترکیب اسیدهای چرب
-	۱/۲۱	۳۵/۵۵	۲۱/۷۲	-	۲۴/۲۸	۸/۶۵	۲- مونوگلیسرید
-	۲۸/۳	۳۰/۱	۳۲/۰	-	۲۹/۹	۳۳/۶	نسبت ۲- مونوگلیسرید

*P/S+T= (C18:۲ + C18:۳) / (C16:۰ + C18:۰ + C18:۱t)

نظر گرفته شد، به طوری که کارخانجات برای اجرای این روش احتیاج به ماشین‌آلات جدید و حتی تغییر زیاد در خط تولید نداشته باشند.

در جدول ۱ مشاهده می‌شود که نوآرایی مولکولی، نقطه لغزشی مخلوط اولیه را به طور معنی‌داری ($p<0.05$) کاهش داده است. کاهش نقطه لغزش را می‌توان به کاهش تری‌گلیسریدهای S_۲ با نقطه لغزش بالا در مخلوط اولیه و تشکیل تری‌گلیسریدهای S_۲U و S_۲S با نقطه لغزش پایین‌تر در محصول نوآرایی شده، نسبت داد. چربی بازساخته حاصل، با نقطه لغزش حدود ۳۴۰°C برای تهیه انواع مختلف شورتنینگ، روغن‌های قنادی و مارگارین مناسب است. Petrauskaitė و Maciaszek (۹)، Gruczynska (۱۰) و همکاران (۱۱)، List و همکاران (۱۲) و Handle (۱۳) نیز این کاهش مطلق را در نقطه لغزش فراورده‌ها، پس از نوآرایی مولکولی گزارش کرده‌اند.

به طور کلی، مواد اولیه برای استری کردن شیمیایی، باید بر حسب نوع کاتالیزور مصرفی، ویژگی‌های کیفی مطلوبی داشته باشند. رطوبت، اسیدهای چرب آزاد و پراکسیدها بر فعالیت کاتالیزور متوكسید سدیم، اثر منفی دارند. اگرچه در حضور مقادیر کافی متوكسید سدیم در محیط واکنش، اسیدهای چرب آزاد خنثی شده و آب هم با کاتالیزور اضافی واکنش می‌دهند. اما در این حالت، هزینه‌ها و همچنین افت تصفیه به شدت افزایش می‌باید که از نظر اقتصادی، حائز اهمیت است. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، روغن‌های اولیه از این نظر ویژگی‌های کیفی مطلوبی نداشتند. از آنجا که هدف نهایی تحقیق حاضر، بررسی امکان کاربرد فرایند در مقیاس صنعتی و با توجه به امکانات و شرایط کارخانجات تولید روغن نباتی کشور بود، در انتخاب مواد اولیه، تجهیزات و شرایط واکنش، جنبه‌های اقتصادی کار در مقیاس بزرگ نیز در

قطبی در محصول نهایی را تأیید می‌کند^(۹). نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از کاتالیزور متوكسید سدیم در مقایسه با دو کاتالیزور زیستی Liozyme IM و Novozym 435 موجب تشکیل مقادیر بیشتری ترکیبات قطبی شده است. Hoshina و همکاران^(۱۱) با نوآرایی مولکولی تری گلیسریدها به روش استری کردن نشان دادند که ساختار مولکولی تری گلیسریدها و جایگاه قرار گرفتن اسیدهای چرب روی مولکول تری گلیسرید بر پایداری اکسیداتیو و حرارتی روغن‌های خوارکی، شکل‌گیری محصولات اکسیداسیون و ترکیبات مُولد بو و ویژگی‌های کلی فیزیکی و شیمیایی روغن‌ها مؤثر است. از آنجا که انتظار می‌رود، روی این فراورده استری واسطه، فرایندهای رنگبری و بو کردن نیز انجام شود، بالا بودن نسبی عدد پراکسید و عدد اسیدی در این مرحله از فرایند و در مقیاس پایلوت، نگران کننده نیست.

صابون، اصلی‌ترین محصول جانبی در فرایند استری کردن است. ورود آب برای خاتمه دادن به واکنش، موجب تبدیل متوكسیدسیدیم به صابون، مтанول، استرهای متیل و سود می‌شود. پس میزان صابون به طور طبیعی افزایش می‌یابد. بخشی از صابون دوباره در این مرحله به اسیدهای چرب تبدیل می‌شود^(۱۲). البته، استفاده از مراحل شستشو و سپرаторهای موجود در خط تصفیه روغن‌ها و همچنین مرحله رنگبری بعد از فرایند استری کردن، می‌تواند میزان صابون را به نحو چشمگیری کاهش دهد و حتی به حدود صفر برساند.

همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، نوآرایی مولکولی، میزان چربی جامد را کاهش داده است. Lo و همکاران^(۱۶) نیز کاهش میزان SFC از فرایند را گزارش کرده‌اند. به نظر می‌رسد که اصلی‌ترین علت کاهش SFC، تغییر در ساختار مولکولی تری گلیسریدها و کاهش نسبت تری گلیسریدهای دارای نقطه لغزش بالاتر (S_۲ و U_۲) در نتیجه واکنش استری کردن باشد. با

فرایند استری کردن، تأثیر معنی‌داری بر عدد یُدی فراورده نوآرایی شده نداشت (جدول ۱) که این نتیجه، قابل انتظار بود. زیرا در فرایند استری کردن، تنها نوآرایی اسیدهای چرب، روی اسکلت گلیسرولی و با جابه‌جایی گروه‌های آسیل از یک استر به استر دیگر انجام می‌شود^(۱) و تغییر شیمیایی قابل ملاحظه‌ای در ماهیت اسیدهای چرب تشکیل دهنده چربی به وجود نمی‌آید. Lo و Handle^(۱۴) نیز عدم تغییر عدد یُدی، هنگام استری کردن تصادفی شیمیایی را گزارش کرده‌اند. در واقع، اعداد یُدی بالا، به معنی مقادیر بیشتر اسیدهای چرب غیراشبع است. به کمک استری کردن می‌توان فراوردهای تولید کرد که نقطه لغزش آن حدود روغن نباتی هیدروژنه متداول (۳۷–۴۰ °C) باشد، اما عدد یُدی آن بسیار بالاتر باشد. این موضوع از نظر تغذیه‌ای، اهمیت فراوانی دارد.

عدد اسیدی فراورده استری شده، نسبت به مخلوط اولیه افزایش معنی‌داری (p<0.05) نشان داد که به نظر می‌رسد، به دلیل فعالیت خوب کاتالیزوری و همچنین انجام هیدرولیز اسیدی تری گلیسریدها و تشکیل اسیدهای چرب آزاد به دلیل استفاده از آب و محلول اسید سیتریک ۰/۰۱ Gruczynska در مرحله خنثی سازی کاتالیزور باشد. Petrauskaite و همکاران^(۹) و Maciaszek^(۱۷) و Lo^(۱۷) Handle^(۱۴) نیز افزایش عدد اسیدی را گزارش کرده‌اند. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، عدد پراکسید در فراورده، نسبت به مخلوط اولیه، کاهش یافته است. کاربرد خلاً و شرایط هم‌زدن، قبل و حین فرایند موجب خارج شدن پراکسید از محیط واکنش شده است. Mطالعات Wilczynska Ledochowska^(۱۰) روی پایداری اکسیداتیو چربی‌های نوآرایی شده به روش شیمیایی و آنزیمی نشان داد که لیپیدهای بازساخته حاصل، پایداری اکسیداتیو کمتری نسبت به تری گلیسریدهای اولیه داشته‌اند و این موضوع احتمالاً به دلیل حضور ترکیبات قطبی است. بررسی‌های انجام شده توسط Gruczynska و Maciaszek در سال ۲۰۰۰ نیز افزایش میزان ترکیبات

بررسی نوآرایی مولکولی روغن‌ها در این پژوهش، با تحقیقات List و همکاران (۱۴)، HandleLo و همکاران (۱۵)، Petrauskaitė و همکاران (۱۶) از نظر آرایش اسیدهای چرب در ساختار مولکول‌های تری‌گلیسرید (جدول ۲) در مجموع، نسبت اسیدهای چرب در موقعیت ۲ تری‌گلیسریدها با مقدار مورد انتظار در ۱,2,3- Random Distribution تئوری توزیع تصادفی (۱,۲,۳- Random Distribution) تطابق فراوانی دارد و با شرایط به کار رفته در فرایند استری کردن، تقریباً نسبت تصادفی $\frac{۳}{۳}/\frac{۳}{۳}$ درصد به دست آمده است.

باتوجه به گرایش جهانی برای مصرف روغن‌های مایع یا نیمه جامد با درجه غیراشباع بالا و محدود کردن دریافت ایزومرهای ترانس و همچنین پتانسیل اقتصادی بالا و سرشت رقبایی و پویای نوآرایی‌های مولکولی، انتظار می‌رود که در آینده نزدیک، تولید چربی‌های بازساخته از طریق فرایند استری کردن، یکی از مطرح‌ترین روش‌های فراوری روغن‌ها و چربی‌ها باشد.

نتایج این تحقیق‌نامه می‌دهد که استفاده از فرایند استری کردن شیمیایی برای دستکاری مولکولی تری‌گلیسریدها و نوآرایی اسیدهای چرب در ساختار مولکولی آن‌ها به منظور تولید مارگارین و شورتنینگ با خواص فیزیکی و عملکردی مورد نظر، در مقایس پایلوت با تجهیزات موجود در خطوط تولید کارخانجات تولید روغن کشور از نظر تکنولوژی امکان‌پذیر است.

سپاسگزاری

از مسئولان محترم انسستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور برای در اختیار گذاشتن بودجه و امکانات لازم برای انجام این پژوهش، از کارخانه روغن نباتی پارس برای در اختیار گذاشتن کنورتور و برخی امکانات آزمایشگاهی، از بخش صنایع غذایی (آزمایشگاه روغن) مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران برای همکاری در آنالیز اسیدهای چرب سپاسگزاری می‌شود.

توجه به میزان چربی جامد فراورده در دماهای مختلف (شکل ۱) به نظر می‌رسد که برای دستیابی به خواص پلاستیکی مشابه روغن‌های نباتی هیدروژنه معمول، باید از چربی جامد (فلیک) بیشتری استفاده کرد. وجود SFC معادل ۱۴ درصد در 10°C (دمای شاخص یخچال) و حدود ۵ درصد در دماهای $33/3^{\circ}\text{C}$ امکان تهیه مارگارین‌های با قوام و خواص رئولوژیکی مناسب در دماهای یخچال و احساس دهانی مطلوب را میسر می‌سازد که این مشخصات با ویژگی‌های SFC فراورده استری شده حاضر مطابقت دارد (۲۶، ۲۷).

استری کردن تصادفی، ترکیب شیمیایی اسیدهای چرب موجود را تغییر نداده است (جدول ۲). اگرچه سعی شد در تهیه فلیک سویا، هیدروژنه کردن به صورت کامل انجام شود، ولی ۳ تا ۴ درصد اسیدهای چرب غیراشباع، همچنان در فلیک باقی ماند. بنابراین، در فراورده حاصل، حدود ۰/۳۶ درصد اسیدهای چرب ترانس مشاهده می‌شود. البته، این مقدار ایزومر ترانس (۰/۵ تا ۰/۰ درصد) به طور طبیعی در بسیاری از مواد غذایی مثل لبیات و پیه گاو وجود دارد (۲۷). از نظر مقررات بین‌المللی، فراورده حاوی کمتر از ۰/۵ درصد اسیدچرب ترانس در هر Serving بدون ترانس محسوب می‌شود (۲۸).

در چربی بازساخته در پژوهش حاضر، نسبت P/S+T حدود ۱/۱۳ است. سازمان‌های FAO و WHO برای این نسبت، مقدار حداقل ۱ را توصیه می‌کنند. از این نظر، فراورده نوآرایی شده، محصولی مناسب است. بررسی محصولات ۱۲ کارخانه تولید روغن نباتی هیدروژنه در ایران در سال ۱۳۸۱ نشان می‌دهد که نسبت فوق برابر ۰/۱۲ و تقریباً یک دهم مقدار توصیه شده جهانی است. به طور میانگین ۰/۷۷ درصد از اسیدهای چرب موجود در این روغن‌ها با آرایش ترانس بوده‌اند و ۰/۲۲ درصد اسید چرب الائیدیک وجود داشته است (۲۹). به طور کلی، ترکیب اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع در فراورده نوآرایی شده به روش استری کردن، نتایج مطلوبی دارد. نتایج حاصل از

• References

1. Namal Senanayake SPJ, Shahidi F. Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods. In: Shahidi, F, editor. Bailey's industrial oil and fat products.vol.3, 6th ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc. 2005: 555-584.
2. Iqbal Bhanger M, Anwar F. Fatty acid composition and contents of trans unsaturated FA in hydrogenated vegetable oils and blended fats from Pakistan. JAOCS 2004; 81(2): 129-134.
3. Juttelstad A. Trans fats: Status and solutions. Food Technol. 2004; 58(1): 20-22.
4. Hunter JE. Dietary levels of trans-fatty acids: basis for health concerns and industry efforts to limit use. Nutr. Res 2005; 25, 499-513.
5. Tarrago-Trani MT, Phillips KM, Lemar LE, Holden JM. New and existing oils and fats used in products with reduced trans fatty acid content. J. Am. Diet Assoc 2006; 106(6): 867-880.
6. Jang ES, Jung MY, Min B. Hydrogenation for low trans and high conjugated fatty acids. Comprehensive Rev. in Food Sci. Food Safety 2005; 1: 22-30.
7. Nielsen K. 2006. Is the quality and cost of food affected if industrially produced trans fatty acids are removed? Atherosclerosis Suppl. 2006; 7: 61-62.
8. Shahidi F, Haman F. Improving life and health with structured lipids. INFORM 2006; 17, 178-180.
9. Gruczynska E, Maciaszek K. Interesterification as a method of modification of properties of lipids. Zywosc 2000; 7 (3 Suppl.), 31-38.
10. Ledochowska E, Wilczynska E. Comparison of the oxidative stability of chemically and enzymatically interesterified fats. Fette/Lipid. 1998; 100(8): 343-348.
11. Hoshina R, Endo Y, Fujimoto K. Effect of triacylglycerol structures on thermal oxidative stability of edible oil. JAOCS 2004; 81(5): 461-465.
12. List GR. Zero trans margarines: Preparation, structure and properties of interesterified soybean oil trisaturate blends. JAOCS 1977; 54(10): 408-411.
13. Chobanov D, Chobanova R. Alterations in glyceride composition during interesterification of mixtures of sunflower oil with lard and tallow. JAOCS 1977; 54: 47-50.
14. Lo YC, Handel AP. Physical and chemical properties of randomly interesterification blends of soybean oil and tallow for use as margarine oils. JAOCS 1983; 60(4): 815-818.
15. List GR, Mounts TL, Orthoefer F. Margarine and shortening oils by interesterification of liquid and trisaturated triglycerides. JAOCS 1995; 72(3): 379-382.
16. List GR, Peloso T, Orthoefer F. Preparation and properties of zero trans soybean oil margarines. JAOCS 1995; 72(3): 383-384.
17. Petrauskaitė V, De Gruyter W, Kellens M, Hughebaert A. Physical and chemical properties of trans-free fats produced by chemical interesterification of vegetable oil blends. JAOCS 1998; 75(4):489-493.
۱۸. نمونه برداری و روش های آزمون روغن ها و چربی های خوراکی استاندارد ملی شماره ۴۹۳، کرج: موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران؛ ۱۳۸۳.
19. Cunniff P, editor. Official methods of analysis of AOAC international, 16th ed., 3rd Revision, Maryland: AOAC International.1997.
20. Firestone D, editor. Official methods and recommended practices of the AOCS, 4th ed., Champaign, IL: American Oil Chemists Society. 1989.
21. Gunstone FD, Harwood JL, Padley FB. The Lipid Handbook. 2nd ed. Chapman & Hall. London. 1994: 594-596, 281-282.
22. Christie WW. In: Hamilton RJ, Rossell JB, editors. Analysis of oils and fats. London: Elsevier Applied Science. 1987; 313-341.
23. Christie WW, Nikolova-Damyanova B, Laakso P, Herslof B. Stereospecific analysis of triacyl-sn – glycerols via resolution of diastereomeric diacylglycerol derivatives by high performance liquid chromatography on silica. JAOCS 1991; 68(10): 695-701.
24. Thomas AE, Scharoun JE, Ralston H. Quantitative estimation of isomeric monoglycerides by thin-layer chromatography. JAOCS 1965; 42(10): 789-792.
25. Rousseau D. Restructuring butter fat through blending and chemical interesterification. 3. Rheology. JAOCS 1996; 73(8): 983-989.
26. Mag TK. Margarine oils, blends in Canada. INFORM 1994; 5(12): 1350-1353.
27. List GR. Decreasing trans and saturated fatty acid content in food oils; Food Technol. 2004; 58(1): 23-31.
28. Food and Drug Administration. Guidance for industry and FDA: Requesting an extension to use existing lable stock after the trans fat labeling. U. S. Department of Health and Human Services. <http://www.cfsan.fda.gov/guidance.html>. 2005
۲۹. زندی پروین، احمدی میترا، خوش طینت خدیجه، رکنی علیرضا، سالار کیا ناهید، شاپر بازار مهناز و همکاران. گزارش وضعیت روغن های خوراکی در ایران، تهران: دبیرخانه شورای غذا و تغذیه کشور. ۱۳۸۲.
- صفحات ۱۶-۳۰.