جداسازی و خالص‌سازی همپارهای لینولئیک اسید مزدوج از روغن گلرنگ

محمد حاجی‌زاده[۱]، ایران عالم‌زاده[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی ونفت، دانشگاه صنعتی شریف

۲- استاد دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۱۷

پیام‌نگار: alemzadeh@sharif.edu

چکیده

لینولئیک اسید مزدوج به مجموعه‌ای از همپارهای فضایی و موقعیتی لینولئیک اسید گفته می‌شود که فعالیت‌های زیستی منحصربه‌فردی، بخصوص در پیشگیری از ابتلا به سرطان و درمان چاقی بروز داده‌اند. دوهمپار ۹سیس۱۱ترانس و ۱۰ترانس۱۲سیس آن از دیدگاه زیست‌شناختی، فعال‌ترین شِما شناخته شده‌اند. هدف از این پژوهش جداسازی و خالص‌سازی دو همپار اساسی از روغن گلرنگ ازطریق روش آنزیمی به‌کمک آنزیم لیپاز کاندیدا رگوزا، بهینه کردن شرایط انجام آزمایش‌ها برای جداسازی بهتر این دو همپار اساسی است. برای خالص‌سازی آنزیمی از دو ماده استریفیکه‌کننده ال- منتول و لوریل الکل به طور جداگانه بهره گرفته شد. بهینه کردن شرایط انجام واکنش با متغیرهای مقدار آنزیم، زمان و نسبت اسیدچرب آزاد به ماده استریفیکه‌کننده ازطریق روش سطح پاسخ (RSM) و برنامه برازش منحنی Table Curve بهره گرفته شد. در خالص‌سازی ازطریق ال- منتول درصد همپار ۹سیس ۱۱ترانس ۵۶٪ و همپار ۱۰ترانس۱۲سیس ۷۷٪ و ازطریق لوریل الکل درصد همپار ۹ سیس ۱۱ترانس ۵۸٪ و همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس ۷۷٪ به‌دست آمد. در خالص‌سازی به‌کمک اوره، همپار ۹سیس۱۱ترانس ۳۲٪ و ۱۰ترانس۱۲سیس ۶۵٪ به‌دست آمد.

کلیدواژه‌ها: لینولئیک اسید مزدوج، روغن گلرنگ، خالص‌سازی آنزیمی، لیپاز.

۱. مقدمه

امروزه ابتلا به ناهنجاریها و بیماری‌هایی چون چاقی، هایپرلیپیدمی، تصلب شرایین، دیابت، سرطان و فشار خون بالا روند صعودی یافته و شیوع آنها در کشورهای صنعتی رو به افزایش است. اگرچه سازوکار دقیق این بیماری‌ها در ارتباط با سبک زندگی افراد چندان روشن نیست، اما به نظر می‌رسد که کیفیت چربی‌های غذایی می‌تواند یکی از عواملی بسیار مهم در این زمینه به شمار آید[۱].

در حال حاضر اسیدهای چرب مزدوج به دلیل تأثیرات مثبتی که در پیشگیری از ابتلا به این بیماری‌ها می‌گذارند، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند. اسیدهای چرب مزدوج آمیزه‌ای از همپارهای موقعیتی و فضایی اسیدهای چرب چند غیر اشباعی با پیوندهای دوگانه مزدوج و یکی از اسیدهای چرب شاخص در این گروه، لینولئیک اسید مزدوج است[۲].

لینولئیک اسید مزدوج (CLA)[1] گروهی از همپارهای موقعیتی و هندسی اسید لینولئیک است که در آن پیوندهای دوگانه به صورت

* تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، مرکزمهندسی بیوشیمی و محیط زیست

1. Conjugated Linoleic Acid

مزدوج قرار گرفته‌اند. منابع طبیعی و مهم CLA، چربی حیوانات نشخوارکننده موجود در گوشت و محصولات لبنی آنهاست. همچنین، مقادیر بسیار کمی از CLA در روغن‌های گیاهی یافت می‌شود که این مقدار در نتیجه فرایندهای بوگیری و هیدروژن‌دارکردن در روغن به وجود می‌آید[۳].

همپارهای ۹سیس۱۱ترانس و ۱۰ترانس۱۲سیس CLA فعال‌ترین همپارها از دیدگاه زیستی به‌شمار می‌آیند که همپار اول به طور طبیعی از طریق زیست‌هیدروژن‌دارکردن اسیدهای چرب غیر اشباع ازطریق باکتری روده‌ای *بوتیرویبریو فیبری‌سولونس* در نشخوارکنندگانی چون گاو، گوسفند، بز وشتر تولید می‌شود. این همپار عامل خواص ضد سرطانی CLA است و بیش از ۹۰٪ CLA در منابع طبیعی را این همپار تشکیل می‌دهد[۴]. همپار ۱۰ترانس۱۲سیس نیز بیشتر عامل وجود خواص ضد چاقی و کاهش وزن CLA است[۵]. مخلوط‌های شیمیایی تولید شده از CLA اغلب حاوی مقادیر زیادی از این دو همپار به نسبت مساوی‌اند[۶].

حدود ۳ گرم CLA در روز لازم است تا نیازهای سلامتی انسان را تامین کند؛ این در حالی است که دریافتی ما از منابع طبیعی حدود ۱۰٪ از این مقدار است و اگر بخواهیم میزان لازم را از طریق مصرف اضافی محصولات لبنی یا گوشت گاو تامین کنیم، میزان کلسترول و چربی‌های دریافتی در رژیم غذایی افزایش بسیار زیادی خواهد داشت. بنابراین، باید CLA را به‌صورت مکمل غذایی به صورت خالص و یا به‌صورت غنی‌سازی در محصولات غذایی فراسودمند چون لبنیات و روغن‌ها وارد کنیم[۷].

خالص‌سازی آنزیمی که با واکنش استری‌کردن همراه باشد، در کنار یک ماده استری‌کننده در جداسازی دو همپار ۹سیس ۱۱ترانس و ۱۰ترانس ۱۲سیس نقش موثری ایفا می‌کند. از آنجا که این دو همپار وظایف خاصی را در بهبود سلامت آدمی بر عهده دارند، جداسازی دو همپار می‌تواند مفید باشد. خالص‌سازی آنزیمی به‌واسطهٔ دو آنزیم *لیپاز کاندیدا رگوزا*[1] و لیپاز *ژئوتریکم کاندیدم*[2] انجام می‌شود که هر آنزیم با توجه به خصوصیات خود نقشی در جداسازی و خالص‌سازی همپارها ایفا می‌کند. آنزیم لیپاز کاندیدا *رگوزا* بر روی جداسازی هر دو همپار عمل می‌کند و می‌تواند بدون هیچ مشکلی در صنعت غذا به کار رود، در حالی‌که لیپاز *ژئوتریکم کاندیدم* فقط بر روی همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس عمل می‌کند و بهره‌گیری از آن در صنعت غذا مشکلاتی پیش می‌آورد[۹و۸].

برخی از این انتخاب پذیری‌ها برای غنی‌سازی انتخابی ایکوزاپنتانوئیک[3] (۲۰:۵) و دکوساهگزائونیک[4] (۲۲:۶) اسیدها و نیز گاما- لینلونیک اسید به‌کار گرفته شده است[۱۰]. واکنش‌های جابجایی اسید چرب با کاتالیست آنزیمی به‌منظور تغییر محتوای اسید چرب گلیسیریدها، سال‌ها در مقیاس صنعتی به‌کار رفته است؛ بنابراین امکان اصلاح آنزیمی روغن‌ها و چربی‌ها در مقیاس صنعتی می‌تواند مورد توجه باشد.

به این سبب که از لیپیدهای غنی از CLA به عنوان مکمل غذایی یا خود غذا استفاده می‌شود، بهتر است آنها را از همپار هایی غنی کنیم که از نظر زیستی فعال‌ترند. لیپازهای انتخاب‌پذیری شناخته شده‌اند، و بیشتر از قارچها و گونه *ژئوتریکم* هستند؛ بسته به ایزوآنزیم‌ها و ایزوله این آنزیم‌ها درجات مختلفی از انتخاب پذیری را برای پیوند دوگانه ۹سیس۱۱ترانس بروز داده‌اند[۱۱].

در تحقیقات وانگ[5] و همکاران و نیز جعفری و همکاران آشکارشده که لیپازهای به‌دست آمده از *ژئوتریکم کاندیدم* و *کاندیدا رگوزا* همپار ۹سیس۱۱ترانس را راحت‌تر از همپار ۱۰ترانس۱۲سیس شناسایی می‌کند. هر چند گزارش شده است که فرایندی که در آن از *ژئوتریکم کاندیدم* استفاده می‌کند دارای معایبی است که از جمله آن‌ها می‌توان به بازیابی کم‌دامنه و میزان خلوص بدست آمده نهایی اشاره کرد. به علاوه، نمی‌توان از آن برای مصارف غذایی استفاده کرد. اما لیپاز بدست آمده از *کاندیدا رگوزا* به نسبت ارزان قیمت‌تر است و به‌طور موثری روی همپار ۹سیس۱۱ترانس عمل می‌کند[۱۲,۱۳].

در پژوهش ناگائو[6] و همکاران به منظور خالص‌سازی دو همپار لینولئیک اسید مزدوج در مقیاس زیاد، در ابتدا مخلوطی از دو همپارCLA با نسبت‌های مساوی را ازطریق لیپاز *کاندیدا رگوزا* استری کردند و در مرحله بعد ازطریق تبلور با اوره در حلال اتانول و تکرار مراحل به خلوص زیاد از همپارهای ۹سیس ۱۱ترانس و ۱۰ترانس ۱۲سیس دست یافتند. آنان در پژوهش دیگری از آنزیم *ریزوموکور میهی*[7] برای استری کردن به‌کمک گلیسرول بهره گرفتند.

1. Candida Rugosa
2. Geotrichum Candidum
3. Eicosapentaenoic
4. Docosahexaenoic
5. Wang
6. Nagao
7. Rhizomucor Miehei

به منظور خالص‌سازی بیشتر بعد از یک مرحله استری کردن، محلول به دست آمده را ازطریق آنزیم *کاندیدا رگوزا* هیدرولیز کردند. در آخر همپارهای لینولئیک اسید مزدوج از طریق تقطیر چند مرحله‌ای جدا شد[۸].

استری کردن CLA به شکل اسید چرب آزاد آن، با لوریل الکل در حضور لیپاز راه موثری در جزء به جزء کردن دو همپار فعال است. کوبایاشی[1] و همکاران نشان دادند که استری کردن اسیدهای چرب آزاد با لیپاز *کاندیدا رگوزا* با ال- منتول بسیار مؤثرتر از لیپازهای دیگر است، به علاوه، اختلاف زیاد بین وزن مولکولی‌های CLA، ال- منتول و استرهای CLA بیش از ۱۰۰ است؛ جداسازی آنها باید با تقطیر در مقیاس زیاد انجام گیرد[۱۴].

محققان وانگ و همکاران ازطریق نوع خاصی از لیپاز از سوش *کاندیدا رگوزا* یعنی لیپاز AY30 ، اقدام به استری کردن توسط اتانول و جداسازی دو همپار کردند. دمای بهینه پیشنهادی آنها ۵۰ درجه سلسیوس و pH پیشنهادی ۶/۵ بود[۱۲].

محققان نیزگودا و واورنزیک[2] با بهره‌گیری از آنزیم کاندیدا سیلندریکا[3] و آزمودن الکل‌های مختلفی چون متانول، ۲- پروپانول، نرول، اتانول، الیل الکل، ال- منتول، ۱- پروپانول، لوریل الکل و ایزوآمیل الکل به استری کردن مخلوط مساوی از همپارهای لینولئیک اسید مزدوج پرداختند. آنان پی بردند که الکل‌های لوریل، ال- منتول و نرول بیشترین بازدهی را در استری کردن اسیدهای چرب داشتند[۱۵].

هدف از انجام این پژوهش، خالص‌سازی دو همپار ۹سیس ۱۱ترانس و ۱۰ترانس ۱۲سیس و بررسی تأثیر متغیرهای واکنشی و دو ماده مختلف استری‌کننده بر افزایش بازده خالص‌سازی این دو همپار اساسی CLA است. برای این منظور از روش سطح پاسخ[4] ازطریق نرم افزار Design-Expert و نیز از برنامه برازش منحنی Table Curve بهره گرفته شد.

۲. مواد و روش‌ها

روغن CLA حاوی۳۳٪ همپار ۹سیس۱۱ترانس و ۳۴٪ همپار ۱۰ترانس۱۲سیس با روش همپارش قلیایی تهیه شد. لیپاز *کاندیدا رگوزا* از شرکت سیگما خریداری شد. ال- منتول و لوریل الکل با خلوص ۹۹٪ از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. بقیه مواد به‌کار رفته در صورت ذکر نشدن، از شرکت مرک خریداری شده‌اند.

۲-۱ واکنش استری کردن به‌منظور خالص‌سازی آنزیمی

آزمایش در یک بالن ۵۰ میلی‌لیتری انجام شد که روی آن با پارافیلم پوشیده شده و لوله گاز نیتروژن از درون آن رد می‌شد. گرمادهی و به هم زدن مخلوط واکنش با گرمکن استیرر انجام شد. ابتدا نسبت‌های مناسب اسید چرب آزاد به ال– منتول (یا لوریل الکل) را برمی‌داریم و وارد بالن می‌کنیم. سپس به اندازه ۲۰٪ وزنی مخلوط، آب وایونیده اضافه می‌کنیم (معمولاً ۱ میلی‌لیتر). مقدار مناسب آنزیم نیز وارد مخلوط می‌شود. دمای هیتر استیرر بر روی ۳۰ درجه سلسیوس و دور استیرر روی ۵۰۰ دور در دقیقه تنظیم می‌شود.

۲-۲ جداسازی فاز استری شده و اسید چرب آزاد از مخلوط واکنش

بعد از گذشت مدت زمان مناسب برای جدا کردن فاز اسید چرب آزاد و فاز استری شده ، ۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۵ نرمال پتاسیم هیدروکسید (۲۰٪ درصد حجمی اتانول) به مخلوط واکنش اضافه می‌کنیم. سپس این مخلوط دو مرتبه توسط هگزان به منظور جداسازی فاز استری شده از مخلوط واکنش، شست و شو داده می‌شود که محل تجمع همپار ۹سیس ۱۱ترانس است. جداسازی با دکانتور انجام شد و فاز باقی مانده (فاز اسید چرب آزاد) بعد از اسیدی شدن به‌کمک هیدروکلریک اسید غلیظ تا pH کمتر از ۲، دو مرتبه با ۱۰۰ میلی لیتر هگزان استخراج می‌شود که این فاز اسید چرب آزاد محل تجمع همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس است. به هر فاز استخراج شده ازطریق هگزان سدیم سولفات خشک اضافه کردیم تا آب مخلوط‌ها را جذب کند و از خشک بودن نمونه از آب اطمینان حاصل شود. سپس حلال هگزان با تبخیرکننده چرخشی تحت خلا، تبخیر شدند[۱۴].

۲-۳ آنالیز نمونه‌ها

متیل استر اسیدهای چرب با استفاده از متانول شامل ۲٪ هیدروکلریک اسید برای فاز اسید چرب آزاد و متانول شامل ۱٪ سدیم متیلات برای فاز استری شده تهیه شد[۸]. آنالیز متیل استر

1. Kobayashi
2. Niezgodan and Wawrzenczyk
3. Candida Cylindracea
4. RSM

اسیدهای چرب با دستگاه کروماتوگرافی گازی- جرمی مدل Agilent 5975c با گاز حامل هلیم و ستون hp5ms (طول ۳۰ متر، قطر ۰/۳۲ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) انجام شد. برنامه دمایی برای نمونه‌های خالص‌سازی شده توسط آنزیم، به این صورت است که در ۱۶۰ درجه سلسیوس شروع و ۳ دقیقه در این دما نگه داشته می‌شود. پس از آن دما به‌صورت 2° c/min افزایش می‌یابد تا به ۲۰۰ درجه سلسیوس برسد؛ در این دما به مدت ۷ دقیقه نگه داشته می‌شود. دمای تزریق کننده روی ۲۷۰ درجه سلسیوس قرار داده می‌شود. گاز حامل هلیم با آهنگ جریان ۱/۲ ml/min و میزان تزریق ۱ μL است.

۲-۴ طراحی آزمایش

در این پژوهش از طراحی RSM با استفاده از نرم‌افزار design-expert نسخه 7.0.0.0 بهره گرفته شد. از برنامه Table Curve برای برازش منحنی نیز استفاده شد. در این پژوهش آزمایش‌ها بر اساس طرح مرکب مرکزی با ۲ فاکتور در سه سطح با ۴ تکرار در نقطه مرکزی مشتمل بر ۱۲ آزمایش بوده است. در مجموعهٔ اول آزمایش‌ها لوریل الکل و در مجموعهٔ دوم از ال- منتول بعنوان ماده استری‌کننده استفاده شد. در آزمایش‌های مربوط به لوریل الکل متغیرهای مستقل شامل مقدار آنزیم (U) و نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل (R) به مقادیر رمزگذاری ۱+ و ۰ و ۱- تبدیل شده‌اند. همچنین، در آزمایش‌های مربوط به ال- منتول متغیرهای مستقل شامل زمان واکنش (hr) و نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول (R) به مقادیر رمزی شده ۱+ و ۰ و ۱- تبدیل شده‌اند. در جدولهای (۱) و (۲) سطوح متغیرها به ترتیب برای لوریل الکل و ال – منتول درج شده است.

جدول ۱. متغیرهای مستقل و سطوح آنها برای طرح مرکب مرکزی برای خالص‌سازی توسط لوریل الکل.

متغیرهای مستقل	سطوح متغیر رمز شده ۱-	۰	۱+
مقدار آنزیم (U)	۲۰	۱۳۵	۲۵۰
نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل	۱/۱۵	۱/۵۸	۲

جدول ۲. متغیرهای مستقل و سطوح آنها برای طرح مرکب مرکزی برای خالص‌سازی توسط ال- منتول.

متغیرهای مستقل	سطوح متغیر رمزی ۱-	۰	۱+
زمان واکنش (hr ساعت)	۳۶	۴۸	۷۲
نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول	۱/۱۵	۲/۰۸	۳

۳. نتایج و بحث

۳-۱ نتایج مربوط به خالص‌سازی با لوریل الکل برای همپار ۱۰ترانس۱۲سیس

پس از آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار، آنالیز آماری مدل‌ها به صورت جدول ارائه می‌شود که در جدول (۳) قابل مشاهده است. قبل از کاربرد یک مدل، مناسب بودن یا دقت آن باید آزموده شود. از جمله روش‌های بررسی اعتبار مدل، آزمون F و نیز استفاده از ضریب همبستگی یا ضریب تعیین (R^2) است. آنالیز واریانس نشان داد که مدل درجه دوم با p-value کوچک (۰/۰۰۳۰) و مقادیر بالای ضریب همبستگی (R^2 =۰/۹۲۰۹) ، R^2 تعدیل شده و R^2 پیش‌بینی شده، از لحاظ آماری به طور معنی دار با داده‌ها منطبق و از اعتبار قابل قبولی برخوردار است. مدل مربوط به تولید این همپار در معادله (۱) آمده است.

$$10trans.12cis = 149.09580 - 0.058590 \times Enz - 102.43318 \times R + 0.040921 \times Enz \times R - (3.78072 \times 10^{-5} \times Enz^2) + 24.91349 \times R^2 \quad (۱)$$

۳-۲ تأثیر مقدار آنزیم و نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل بر همپار ۱۰ترانس۱۲سیس

با توجه به معادله (۱) و شکل (۱) و جدول (۳) می‌توان فهمید که چه در مقادیر آنزیم کم و چه در مقادیر آنزیم زیاد، نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل، تأثیر زیادی بر مقدار همپار ۱۰ترانس۱۲سیس داشته است. در نسبت ۱/۵۸، مقدار آنزیم هیچ تأثیری در خالص‌سازی نداشته است، در صورتی که در نسبت ۱/۱۵، با کاهش مقدار آنزیم، افزایش درصد این همپار

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس ضرایب برآورد شده مدل پیشنهادی برای همپار ۱۰ترانس۱۲سیس.

	ضرایب	Probe>F
مدل	-	۰/۰۰۳۰
ثابت معادله	۴۹/۶۷	-
آنزیم (Enz)	-۰/۵	۰/۶۴۳۸
نسبت (R)	-۷/۸۳	۰/۰۰۰۳
Enz×R	۲	۰/۱۶۳۱
Enz^2	-۰/۵	۰/۷۵۷۷
R^2	۴/۵	۰/۰۲۶۶

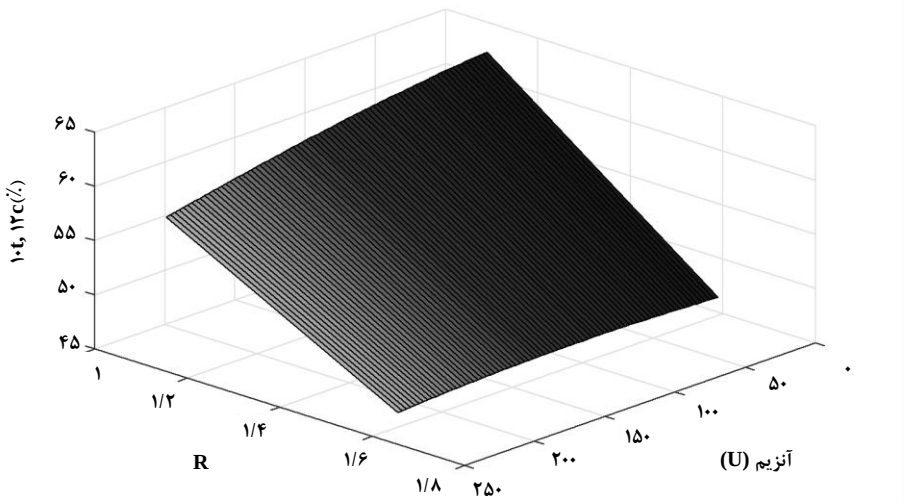
مشاهده می‌شود. علت این امر این است که وقتی نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل زیاد باشد، یعنی مقدار لوریل الکل کم است، که این به نوبه خود باعث می‌شود ماده استری‌کننده در محیط کم باشد و واکنش استری کردن صرف‌نظر از مقدار آنزیم، به خوبی انجام نشود. همچنین دلیل کم بودن بازده خالص‌سازی در حضور مقدار زیاد آنزیم، انباشتگی آنزیم‌های اضافی و ایجاد مزاحمت برای انجام واکنش استری کردن روی این همپار و لوریل الکل است.

بنابراین، برای رسیدن به بازده مطلوب خالص‌سازی، نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل و همچنین مقدار آنزیم باید در مقیاس کم مصرف شود. روند مشابه در نتایج ناگائو و همکاران دیده شد[۸]. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در مقدار آنزیم ۲۰ واحد و نسبت ۱/۱۵ بیشترین مقدار خالص‌سازی به میزان ۶۶٪ حاصل شد.

۳-۳ نتایج مربوط به خالص‌سازی با لوریل الکل برای همپار ۹سیس۱۱ترانس

در این بخش آنالیز واریانس نشان داد که مدل درجه دوم با p-value بسیار کوچک (۰/۰۰۰۱) و مقادیر بالای ضریب همبستگی (R^2 =۰/۹۸۵۷)، R^2 تعدیل شده و R^2 پیش‌بینی شده، از لحاظ آماری به طور معنی دار با داده‌ها منطبق بوده و از اعتبار قابل قبولی برخوردار است. مدل مربوط به تولید این همپار در معادله (۲) آورده شده است.

$$9cis.11trans = 110.46419 - (0.12858 \times Enz) - (66.13861 \times R) + (0.030691 \times R \times Enz) + (1.03970 \times 10^{-4} \times Enz^2) + (18.68512 \times R^2) \quad (۲)$$



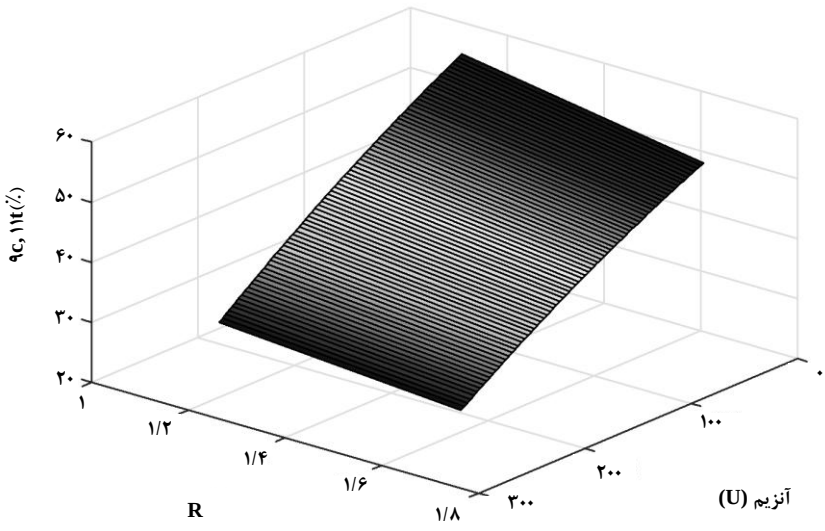
شکل ۱. منحنی سه سطحی از تاثیر مقدار آنزیم و نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل بر درصد تولید همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس.

۳-۴ تأثیر مقدار آنزیم و نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل بر همپار ۹سیس۱۱ترانس

با توجه به معادله (۲) و شکل (۲) و جدول (۴)، این نتیجه استنباط می‌شود که نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل در کل تأثیر خیلی زیادی نداشته است. با این وجود در مقادیرهای آنزیم کم این تأثیر بیشتر خود را نشان می‌دهد. در مقادیر آنزیم کم با کاهش نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل، مقدار همپار ۹سیس ۱۱ترانس بیشتر شده است. مقدار آنزیم مصرفی تأثیر بسیار زیادی در مقدار این همپار بروز داده است، به طوری‌که با کاهش مقدار آنزیم از ۳۰۰ واحد به ۲۰ واحد، درصد همپار از ۴۰٪ به ۵۸٪ افزایش یافته است. افزایش مقدار آنزیم باعث پر شدن فضای محلول می‌شود و از آنجایی که آنزیم *لیپاز کاندیدا رگوزا*، همپار ۹سیس ۱۱ ترانس را زودتر استری می‌کند، آنزیم‌های اضافی با ایجاد مزاحمت و ایجاد خاصیت بازدارندگی، روند استری کردن را دشوارتر می‌کند[۸]. ممکن است با افزایش مقدار آنزیم و افزایش واکنش استری کردن آب زیادی نیز تولید شود و این آب به کاهش فعالیت آنزیم‌ها در واکنش استری کردن انجامد. به همین دلیل، مقدار آنزیم باید به حدی باشد که واکنش استری کردن به مقدار مورد نیاز انجام شود. در مقادیر آنزیم کم (۲۰ واحد)، کاهش نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل، باعث افزایش جداسازی همپار ۹سیس ۱۱ترانس شده است. علت این امر آن است که کاهش نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل موجب افزایش مقدار لوریل الکل در محلول شده است[۱۳]. این نیز به این معناست که لوریل الکل کافی برای انجام واکنش استری کردن در محیط موجود است و واکنش به خوبی انجام می‌پذیرد. همانطور که مشاهده می‌شود، در مقدار آنزیم ۲۰ واحد و نسبت ۱/۱۵ بیشترین مقدار خالص‌سازی به میزان ۵۸٪ حاصل شد.

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس ضرایب برآورد شده مدل پیشنهادی برای همپار ۹سیس۱۱ترانس.

	ضرایب	Probe>F
مدل	-	۰/۰۰۰۱
ثابت معادله	۴۳/۷۱	-
آنزیم (Enz)	-۶/۰۰	۰/۰۰۰۱
نسبت (R)	-۱/۳۳	۰/۰۰۷۶
Enz×R	۱/۵۰	۰/۰۱۱۱
Enz^2	۱/۳۸	۰/۰۳۵۲
R^2	۳/۳۸	۰/۰۰۰۶



شکل ۲. منحنی سه سطحی از تأثیر مقدار آنزیم و نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل بر درصد تولید همپار ۹سیس۱۱ترانس.

۳-۵ نتایج مربوط به خالص‌سازی با ال- منتول برای همپار ۱۰ترانس۱۲سیس

در این بخش، به‌دلیل پراکنده بودن داده‌ها و ضریب همبستگی پایین و مقدار p-value =۰/۴۱۲۳ برای مدل درجه ۲، قرار شد برای برازش منحنی نرم افزار Table Curve به‌کار گرفته شود. معادله به‌دست آمده از این مدل در قالب معادلهٔ (۳) آمده است؛ ضریب همبستگی در مدل ۰/۹۹۹۸۲ است.

۳-۶ تأثیر زمان واکنش و نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول بر همپار ۱۰ترانس۱۲سیس

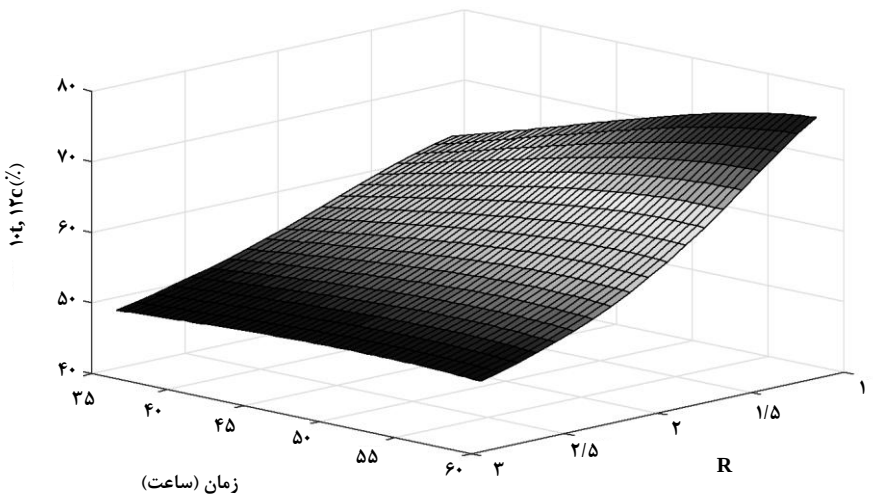
مطابق معادله (۳) و شکل (۳) که تأثیر زمان و نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول را بر روی مقدار همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس نشان می‌دهد، می‌توان پی برد که در نسبت‌های بالای اسید چرب آزاد به ال- منتول، زمان تأثیر ناچیزی بر مقدار این همپار می‌گذارد. در حالیکه در نسبت‌های پایین، شیب تغییرات مقدار همپار نسبت به زمان زیاد می‌شود. علت این امر آن است که آنزیم *لیپاز کاندیدا رگوزا* ابتدا به سرعت روی همپار ۹سیس ۱۱ترانس عمل می‌کند سپس به سراغ همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس می‌رود. تأثیر زمان روی این همپار در نسبت‌های بالای اسید چرب آزاد به ال- منتول با توجه به شکل کم است، زیرا مقدار ال- منتول برای انجام استری شدن کم بوده و زمان زیادی لازم نیست؛ در حالی‌که در نسبت‌های پایین، مقدار ال- منتول بیشتر است و آنزیم زمان زیادی نیاز دارد تا اسید چرب ۱۰ترانس ۱۲سیس را استری کند. در یک مدت زمان ثابت و در نسبت‌های پایین اسید چرب آزاد به ال- منتول، این همپار به مقدار بیشتری جداسازی می‌شود و هرچه این مدت زمان بیشتر باشد جداسازی به حداکثر مقدار خود می‌رسد. روندی مشابه در پژوهش کوبایاشی و همکاران نیز مشاهده شد[۱۴]. همانطور که مشاهده می‌شود در مدت زمان ۶۰ ساعت و نسبت ۱/۱۵ بیشترین مقدار خالص‌سازی به میزان ۷۷٪ حاصل شد.

۳-۷ نتایج مربوط به خالص‌سازی با ال- منتول برای همپار ۹سیس۱۱ترانس

در این بخش نیز به دلیل پراکنده بودن داده‌ها و ضریب همبستگی پایین و مقدار p-value =۰/۸۱۰۶ برای مدل درجه ۲ قرار شد برای برازش منحنی از نرم افزار Table Curve استفاده شود. معادله به دست آمده ازطریق این مدل در قالب معادله (۴) آمده است. ضریب همبستگی در این مدل ۰/۸۲۸۰ است.

$$10trans.12cis = \frac{52.2053+-13.7821R+9.3278R^2+-0.7559Time+0.0162Time^2+-0.00017Time^3}{1+-0.3727R+0.2336R^2+-1.6943\times10^{-6}R^3+-0.00933Time+-1.8799\times10^{-8}Time^2} \quad (۳)$$

$$9cis.11tans = 38.76884332 + \frac{29.65576769}{R^{1.5}} + \frac{-13.5226455}{R^2} \quad (۴)$$



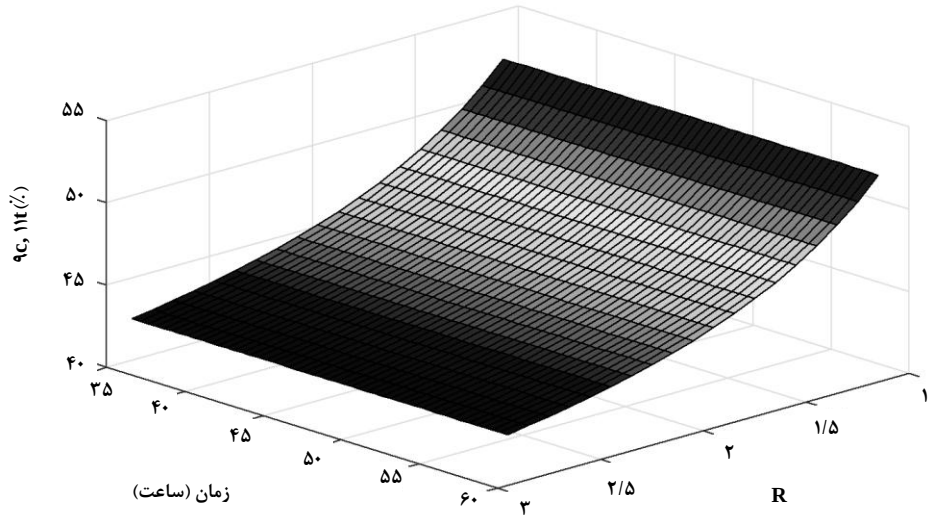
شکل ۳. منحنی سه سطحی از تأثیر زمان و نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول بر درصد تولید همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس.

۳-۸ تأثیر زمان واکنش و نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول بر همپار ۱۰ترانس۱۲سیس

با توجه به معادله (۴) و شکل (۴)، مدت زمان انجام واکنش تأثیری بر خالص‌سازی این همپار ندارد، در حالی‌که با کاهش نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول، درصد این همپار مرتباً در محلول افزایش یافته است. دلیل عدم تأثیر مدت زمان بر این همپار این است که آنزیم *لیپاز کاندیدا رگوزا* ابتدا روی این همپار اثر می‌کند و استری‌شدن را انجام می‌دهد. به همین دلیل، برای استری‌کردن این همپار زمان کوتاهی نیاز است و زمان‌های طولانی‌تر تأثیری در جداسازی نخواهند داشت. دلیل دیگر این اتفاق، خاصیت واکنش پذیری خوب ال- منتول در واکنش استری‌کردن است که می‌تواند به سرعت با اسید چرب واکنش دهد. نیازمندی به زمان را برای جداسازی این همپار کم می‌کند[۱۴]. همانطور که مشاهده می‌شود، در مدت زمان ۶۰ ساعت و نسبت ۱/۱۵ بیشترین مقدار خالص‌سازی به میزان ۵۶٪ حاصل شد.

۳-۹ بهینه‌سازی شرایط واکنش

پس از تعیین مدل، برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که با اعمال آنها بیشترین مقدار همپارهای ۹سیس۱۱ترانس و ۱۰ترانس۱۲سیس به دست می‌آید، بهینه‌سازی توسط نرم‌افزار انجام شد. برای تأیید صحت شرایط تعیین شده باید آزمایشی تحت این شرایط انجام داده و نتایج آن را با نتایج پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار مقایسه کرد. چنانچه اختلاف معناداری بین نتایج واقعی و پیش‌بینی شده برقرار باشد، مدل توصیفی تأیید شده و قابل استفاده برای دیگر شرایط مورد نظر است. سطوح بهینه شده برای متغیرها برای خالص‌سازی توسط لوریل الکل برای همپارهای ۹سیس۱۱ترانس و ۱۰ترانس۱۲سیس به این صورت بود: مقدار آنزیم ۲۰ واحد ، نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل ۱/۱۵. تحت این شرایط مقدار همپار ۹سیس۱۱ترانس ۵۸٪ و مقدار همپار ۱۰ترانس۱۲سیس ۶۶٪ به دست آمد. سطوح بهینه شده برای متغیرها به‌منظور خالص‌سازی توسط ال– منتول برای همپارهای ۹سیس۱۱ترانس و ۱۰ترانس۱۲سیس به این صورت بود: مقدار آنزیم ۲۰ واحد، نسبت اسید چرب آزاد به لوریل الکل ۱/۱۵. تحت این شرایط مقدار همپار ۹سیس۱۱ترانس ۵۶٪ و مقدار همپار ۱۰ترانس۱۲سیس ۷۷٪ به دست آمد.



شکل ۴. منحنی سه سطحی از تأثیر زمان و نسبت اسید چرب آزاد به ال- منتول بر درصد تولید همپار ۹سیس ۱۱ترانس.

مطابق جدول (۵)، با دقت در پژوهش وانگ و همکاران که از آنزیم لیپاز AY30 استفاده کردند، در طی دو مرحله به ۷۵٪ همپار ۹سیس۱۱ترانس و ۷۲٪ همپار ۱۰ترانس۱۲سیس رسیدند که در مقایسه با پژوهش فعلی که در طی یک مرحله به ۵۶٪ و ۷۷٪ همپار ۹سیس۱۱ترانس و ۱۰ترانس۱۲سیس رسیده‌ایم، می‌توان پی برد که در پژوهش فعلی بازدهی قابل قبولی به دست آمده است[۱۲]. همچنین، آنزیم *ریزوموکر میهی* استفاده شده توسط یاماچی[1] و همکاران با تولید ۷۲/۹٪ همپار ۹سیس۱۱ترانس و ۶۵٪ همپار ۱۰ترانس۱۲سیس عملکرد خوبی در مقایسه با پژوهش فعلی داشت[۱۶]. پژوهش‌های نیزگودا و واورنزیک و هاس و همکاران، به ترتیب، با استفاده از آنزیم‌های *کاندیدا سیلندریکا* و *ژئوتریکم کاندیدم* عملکرد ضعیف‌تری نسبت به همپار *کاندیدا رگوزا* که در این پژوهش استفاده شد، داشتند[۱۱,۱۵].

۴. نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش با استفاده از طرح RSM و برازش منحنی Table Curve بهینه‌سازی متغیرهای تأثیرگذار در خالص‌سازی دو همپار ۹سیس۱۱ترانس و ۱۰ترانس۱۲سیس به‌کمک دو ماده استری‌کننده لوریل الکل و ال– منتول مورد بررسی شد. نتایج نشان دادند که خالص‌سازی توسط آنزیم لیپاز *کاندیدا رگوزا* نسبت به بقیه آنزیم‌های مصرفی در این صنعت بازدهی بهتری بروز داد. از آنجا که این آنزیم قابل استفاده در صنایع غذایی است، می‌تواند گزینه مفیدی برای استفاده از مقیاس صنعتی باشد. با مقایسه ماده استری‌کننده ال- منتول و لوریل الکل، می‌توان پی برد که بازده خالص‌سازی ال– منتول بیشتر از لوریل الکل بوده است. با این‌که میزان جداسازی همپار ۹سیس ۱۱ترانس در دو روش یکسان بود اما ال– منتول با ۷۷٪ جداسازی همپار ۱۰ترانس ۱۲سیس در مقابل ۶۶٪ در جداسازی توسط لوریل الکل، عملکرد قابل قبولی بروز داد. همچنین ال– منتول به دلیل مناسب بودن برای سلامتی انسان می‌تواند در مقیاس صنعتی در صنایع غذایی مصرف شود.

جدول ۵. مقایسه نتایج خالص‌سازی آنزیمی با نتایج تحقیقات گزارش شده در منابع علمی.

تعداد مراحل	۱۰ترانس۱۲سیس	۹سیس۱۱ترانس	مخلوط ایزومری اولیه	آنزیم لیپاز	پژوهش
۲	٪۷۲	٪۷۵	۳۱ , ۳۰%	AY30	[۱۲]
۱	٪۶۵	٪۷۲,۹	۳۴ , ۳۳%	ریزوموکور میهی	[۱۶]
۱	٪۶۴,۴	٪۶۸,۴	۴۲ , ۴۴%	کاندیدا سیلندریکا	[۱۵]
۱	٪۴۶	٪۷۱	۳۴ , ۳۴%	ژئوتریکم کاندیدم	[۱۱]
۱	٪۷۷	٪۵۶	۳۴ ,۳۳%	کاندیدا رگوزا	[پژوهش فعلی]

مراجع

[1] Ha, Y. L., Grimm, N. K., Pariza, M. W., "Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37(1), 75-81, (1989).

[2] Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Schaefer, A. L., Kramer, J. K. G., "The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs", Canadian Journal of Animal Science, 77(4), 723-725, (1997).

[3] Chin, S. F., Liu, W., Storkson, J. M., Ha, Y. L., Pariza, M. W., "Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens", Journal of food composition and analysis, 5(3), 185-197, (1992).

[4] Ha, Y. L., Grimm, N. K., Pariza, M. W., "Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid", Carcinogenesis, 8(12), 1881-1887, (1987).

1. Yamauchi

[5] West, D. B., Delany, J. P., Camet, P. M., Blohm, F., Truett, A. A., Scimeca, J., "Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse", American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 275(3), R667-R672, (1998).

[6] Yang, L., Huang, Y., Wang, H. Q., Chen, Z. Y., "Production of conjugated linoleic acids through KOH-catalyzed dehydration of ricinoleic acid", Chemistry and Physics of lipids, 119(1), 23-31, (2002).

[7] Tetens, I., "Scientific Opinion on the safety of conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil"(Clarinol®) as a Novel Food ingredient: EFSA-Q-2008-745, (2010).

[8] Nagao, T., Yamauchi-Sato, Y., Sugihara, A., Iwata, T., Nagao, K., Yanagita, T., Shimada, Y., "Purification of conjugated linoleic acid isomers through a process including lipase-catalyzed selective esterification", Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 67(6), 1429-1433, (2003).

[9] Kobayashi, T., Nagao, T., Kawashima, A., Watanabe, Y., Shimada, Y., "Synthesis of polyunsaturated fatty acid L-menthyl esters through lipase-catalyzed esterification in an organic solvent-free system", Journal of Oleo Science, 53(6), 309-312, (2004).

[10] Foglia, T. A., Sonnet, P. E., "Fatty acid selectivity of lipases: γ-linolenic acid from borage oil", Journal of the American Oil Chemists' Society, 72(4), 417-420, (1995).

[11] Haas, M. J., Kramer, J. K., McNeill, G., Scott, K., Foglia, T. A., Sehat, N., Yurawecz, M. P., "Lipase-catalyzed fractionation of conjugated linoleic acid isomers", Lipids, 34(9), 979-987, (1999).

[12] Wang, Y. H., Li, X. F., Liang, Y. X., Yang, B., Zhang, S. H., "Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 46(1-4), 20-25, (2007).

[13] Jafari, M., Kadivar, M., Goli, S. A. H., Ghiaci, M., "Optimization of lipase-catalyzed fractionation of two conjugated linoleic acid (CLA) Isomers", Journal of the American Oil Chemists' Society, 91(4), 571-578, (2014).

[14] Kobayashi, T., Nagao, T., Watanabe, Y., Yamauchi-Sato, Y., Negishi, S., Shimada, V., "Enrichment of CLA isomers by selective esterification with L-menthol using Candida rugosa lipase", Journal of the American Oil Chemists' Society, 83(2), 93-99, (2006).

[15] Niezgoda, N., Wawrzeńczyk, C., "An efficient method for enzymatic purification of cis-9, trans-11 isomer of conjugated linoleic acid", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 100, 40-48, (2014).

[16] Yamauchi-Sato, Y., Nagao, T., Yamamoto, T., Terai, T., Sugihara, A., Shimada, Y., "Fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective hydrolysis with Candida rugosa lipase", Journal of Oleo Science, 52(7), 367-374, (2003).