



Optimization on Operating Condition for Amino Acids Extraction by Supercritical Carbon Dioxide

A. Armion¹, A. Vaziri^{2*}, B. Honarvar³, R. Fazaeli⁴, N. Esfandiari⁵

1- Ph. D. Student of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor of Chemical Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Associate Professor of Chemical Engineering, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

4- Assistant Professor of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5- Assistant Professor of Chemical Engineering, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Email: a.vaziri@srbiau.ac.ir

Abstract

This research aimed to investigate optimum operating condition for selective extraction of free amino acids by supercritical carbon dioxide (SFE). OVAT experiment design technique is used, setting temperature and pressure as variables and setting time at 60 minute as constant. Results show that SFE has good efficiency in extraction of alanine, glycine, serine, glutamic acid and histidine while showing unsatisfactory results on others under the chosen operating conditions for this study. Experimental extraction results are plots in excel software which shows maximum selectivity and yield for glutamic acids at ($P=14$ Mpa $T=20$ °C) and for glycine at ($P=16$ Mpa $T=60$ °C) and for alanine, serine and histidine at ($P=20$ Mpa $T=60$ °C). The highest extraction yield (3.5%) was achieved at conditions where glutamic acid, the most abundant amino acid in the sample, had the highest extraction yield.

Received: 25 June 2023
Accepted: 15 August 2023
Page Number: 74-89

Keywords:

Supercritical Extraction,
Carbon Dioxide,
Co-Solvent,
Amino Acid,
Extraction

Please Cite this Article Using:

Armion, A., Vaziri, A., Honarvar, B., Fazaeli, R., & Esfandiari, N. (2024). Optimization on Operating Condition for Amino Acids Extraction by Supercritical Carbon Dioxide. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 23(135), 74-89, [In Persian].



بهینه‌سازی شرایط عملیاتی استخراج اسیدهای آمینه با کربن دی‌اکسید فوق بحرانی

آرمیون^۱، علی وزیری^{۲*}، بیژن هنرور^۳، رضا فضائلی^۴، نادیا اسفندیاری^۵

- ۱- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۲- استادیار مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۳- دانشیار مهندسی شیمی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
- ۴- استادیار شیمی فیزیک، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- ۵- استادیار مهندسی شیمی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

پیام‌نگار: a.vaziri@srbiau.ac.ir

چکیده

هدف از این تحقیق تعیین شرایط بهینه برای استخراج گزینش‌پذیر آمینواسیدهای آزاد به روش استخراج فوق بحرانی است. دو متغیر دما، فشار با انتخاب زمان ثابت ۶۰ دقیقه در این راستا و با استفاده از سامانه طراحی آزمایش یک متغیر در یک زمان، مطالعه شد. در گام اول مشخص شد که شگرد استخراج فوق بحرانی صرفاً نسبت به پنج آمینواسید آلانین، گلیسین، سرین، هیستیدین و گلوتامیک اسید استخراج گزینش‌پذیر داشته و نسبت به سایر آمینواسیدها در بازه عملیاتی مورد مطالعه، عملکرد استخراجی ضعیفی دارد. پس از به دست آمدن داده‌های تجربی، در نرم‌افزار اکسل مدل کرداری داده‌ها تهیه شد، که نشان‌دهنده بالاترین سطح گزینش‌پذیری و بازده استخراج برای گلوتامیک اسید در فشار ۱۴ مگاپاسکال و دمای ۲۰ درجه سلسیوس، برای گلیسین در فشار ۱۶ مگاپاسکال و دمای ۶۰ درجه سلسیوس و برای آلانین، سرین و هیستیدین در فشار ۲۰ مگاپاسکال و دمای ۶۰ درجه سلسیوس بود. بالاترین بازده استخراج (۳/۵٪) در شرایط بهینه استخراج گلوتامیک اسید است که بالاترین درصد در نمونه را دارد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۴
شماره صفحات: ۷۴ تا ۸۹

کلیدواژه‌ها:

استخراج فوق بحرانی،
کربن دی‌اکسید،
حلال کمکی،
آمینواسید،
استخراج

* تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده نفت و مهندسی شیمی
استناد به مقاله:

آرمیون، امین، وزیری، علی، هنرور، بیژن، فضائلی، رضا، و اسفندیاری، نادیا. (۱۴۰۳). بهینه‌سازی شرایط عملیاتی استخراج اسیدهای آمینه با کربن دی‌اکسید فوق بحرانی، نشریه مهندسی شیمی ایران، ۲۳(۱۳۵)، ۷۴-۸۹.

۱. مقدمه

اسیدهای آمینه، واحدهای تشکیل‌دهنده پروتئین در بدن موجودات زنده هستند. پروتئین‌ها از ترکیب توالی اسیدهای آمینه تشکیل می‌شوند؛ روی هم رفته ۲۲ اسید آمینه پروتئین‌زا وجود دارد که از میان آن‌ها ۹ اسید آمینه ضروری، ۹ اسید آمینه غیرضروری و ۴ اسید آمینه نیمه ضروری هستند [۵-۱].

اسیدهای آمینه دارای ارزش غذایی، مزه، عملکرد درمانی و خاصیت شیمیایی هستند و این خواص باعث شده تا بتوان از آن‌ها در داروسازی، صنعت غذا و نیز کشاورزی استفاده کرد. حدود ۶۶٪ اسیدهای آمینه تولیدشده تجاری در صنعت غذا استفاده می‌شود که حدود ۳۱٪ از آن به‌عنوان مکمل غذا در دارو، مواد بهداشتی و مواد شیمیایی است. سه روش تولید صنعتی آمینواسیدها شامل تولید شیمیایی، فناوری تخمیر میکروبی و استخراج از پروتئین است. جداسازی آمینواسیدها از آنالیت اولیه و حلال‌های به‌کاررفته در این مرحله یکی از مهم‌ترین مراحل تولید محصول نهایی است [۱۰-۶].

بیشتر حلال‌های به‌کاررفته در صنعت، سمی و آتش‌گیر هستند؛ این حلال‌ها برای محیط زیست می‌تواند مشکلات متعددی ایجاد کند و نیازمند هزینه زیاد برای کنترل این آلودگی‌ها شود. جداسازی حلال از محصول نهایی و نیاز به بازیافت حداکثری آن به‌سبب گران‌قیمت بودنشان در اغلب مواقع و همچنین مشکلات محیط زیستی فوق‌الذکر، تحقیقات علمی را به‌سمت گسترش حلال‌های سبز سوق داد. سازگارترین حالت با محیط زیست برای یک فرایند استفاده‌نکردن از حلال است؛ این در حالی است که بیشتر فرایندها وابسته به حلال‌ها هستند. از جمله حلال‌های سبز می‌توان به آب، سیالات فوق بحرانی و مایعات یونی اشاره کرد. در این بین، کربن دی‌اکسید فوق بحرانی و مایعات یونی دارای جذابیت بیشتری هستند. در بسیاری از فرایندهای صنعتی مهندسی شیمی، نیاز به کاهش غلظت یک یا چند جزء درگیر در فرایند وجود دارد و یا این‌که هدف خالص‌سازی یک یا چند جزء از میان توده محلول است، که غالب این فرایندها می‌تواند فیزیکی باشد. برای این اهداف، روش‌های گوناگونی می‌توان به‌کار برد که تقطیر جزء روش‌های متداول است.

باتوجه به خواص فیزیکی و شیمیایی محصولات و همچنین نیاز به رسیدن به استانداردهای خاص در محصول نهایی در جداسازی

برخی مواد، باتوجه به امکان تخریب مواد مؤثره در دمای بالا و فرایند بازیابی حلال نمی‌توان از فرایند تقطیر استفاده کرد. از روش‌های مطرح برای جای‌گزینی فرایندهای استخراج معمول، استخراج به‌وسیله سیال فوق بحرانی کربن دی‌اکسید است.

باتوجه به ماهیت غیر قطبی کربن دی‌اکسید در استخراج ترکیبات قطبی، کربن دی‌اکسید فوق بحرانی عملکرد ضعیفی از خود نشان می‌دهد. برای رفع این نقص از حلال‌های کمکی قطبی استفاده می‌شود [۱۴-۱۱].

تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از روش استخراج با سیال فوق بحرانی انجام گرفته‌است، که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

هنرور و همکارانش در سال ۲۰۱۸ از فرایند استخراج فوق بحرانی برای جداسازی آمینواسیدهای آزاد ملاس چغندر قند و نیشکر استفاده کردند؛ تأثیر مشخصه‌های مختلف مانند فشار، دما و زمان استخراج اندازه‌گیری و بهینه شد. نتایج نشان داد که برای ملاس چغندر فشار ۱۸/۴ مگاپاسکال و دمای ۴۳ درجه سلسیوس و زمان استخراج ۷۶ دقیقه دارای بهترین است که تحت شرایط بهینه درصد استخراج آمینواسیدهای آزاد ۴۲ درصد برای آسپارتیک‌اسید، ۶۳ درصد برای گلوتامیک‌اسید، ۴۶ درصد برای آلانین و ۳۱ درصد برای لیزین بود [۱۵].

در سال ۲۰۱۸ رادفر و همکاران طی تحقیقی برای جداسازی آل-کارتینین به کمک فرایند استخراج فوق بحرانی از قارچ صدفی با حلال کربن دی‌اکسید و کمک حلال اتانول چهار مشخصه عملیاتی را بهینه کردند که نتیجه آن بازده استخراج ۵۵ درصدی بر مبنای وزن بود [۱۶].

در سال ۲۰۱۲ آرنایز و همکارانش استخراج فوق بحرانی آمینواسیدهای آزاد را بر روی برگ کلم بروکلی انجام دادند که نتایج آنان در مقایسه با سایر روش‌های استخراج از نظر بازده بالاتر بود و همچنین گزینش‌پذیری بسیار بالاتری نسبت به تعدادی از آمینو اسیدها گزارش شد [۱۷].

در تحقیق برنال و همکاران که در اصل برای مقایسه ارزش غذایی بین گونه‌های اصلاح ژنتیک شده جو و سویا بود، پس از استخراج آمینواسیدهای هر دو گونه طبیعی و اصلاح‌شده به کمک فرایند استخراج فوق بحرانی به‌وسیله دستگاه کروماتوگرافی جرمی نمونه‌ها آنالیز و مشخص شد که گونه‌های طبیعی در بردارنده آمینواسیدهای

هدف بیشتر است و ارزش غذایی بیشتری دارد [۱۸]. استخراج آمینواسیدها از پودر تخم لاک‌پشت دریایی به‌وسیلهٔ چوان تینگ شن، از جمله تحقیقات مفید در این زمینه بود که از نتایج بارز آن می‌توان به افزایش بازده استخراج با خیساندن نمونه در آب اشاره کرد [۱۹]. کانگ و همکاران ضایعات ماهی تن را استخراج کردند که نتایج مشخص کرد که علاوه‌بر حضور اسیدهای چرب، آمینواسیدهای آزاد مانند لوسین، گلوتامیک اسید، لیزین، ال‌پرولین و تورین از این ضایعات قابل فراوری است [۲۰]. ودارمن و همکاران در تمرکز بر روی استخراج آمینواسید به‌وسیلهٔ فرایند فوق بحرانی تلاش کردند تا برای افزایش انحلال آمینواسید قطبی در کربن‌دی‌اکسید ناقطبی هر دو سر قطبی آمینواسید (گروه اسیدی و آمینی) را پوشش دهند [۲۱]. تحقیق حاضر به بررسی تأثیر مشخصه‌های عملیاتی دما و فشار بر روی امکان انجام استخراج گزینش‌پذیر آمینواسیدهای مورد مطالعه می‌پردازد و همزمان شرایط بهینه را برای حداکثر بازده استخراج و گزینش‌پذیری هر یک از آمینواسیدها تعیین می‌کند. از نکات متمایز در این تحقیق می‌توان به هدف‌گذاری برای تعیین شرایط بهینه برای استخراج فوق بحرانی تک‌تک اسیدهای آمینهٔ قابل استخراج با این شگرد اشاره کرد که می‌توان آن را نگرشی نوین نسبت به تحقیقات پیشین دانست که تلاش بر افزایش بازده استخراج نسبت به مخلوط تمام آمینواسیدها داشتند.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد شیمیایی

کربن‌دی‌اکسید (CAS number ۱۲۴-۳۸-۹) با خلوص ۹۹/۹۹ درصد از شرکت ایران-ابوغداده تهیه شد (شیراز، ایران). اتانول (CAS number ۶۴-۱۷-۵) و متانول (CAS number ۶۷-۵۶-۱) با خلوص ۹۹/۸ درصد و دی‌کلرومتان (CAS number ۷۵-۰۹-۲) با خلوص ۹۹/۵ درصد از نمایندگی شرکت مرک آلمان خریداری شد. آب مقطر (CAS number ۷۷۳۲-۱۸-۰۵) با TDS صفر برند زلال استفاده شد (تهران، ایران).

۲-۲ نمونه

مواد خام به‌کاررفته برای استخراج از یک نمونه شاهد غنی از

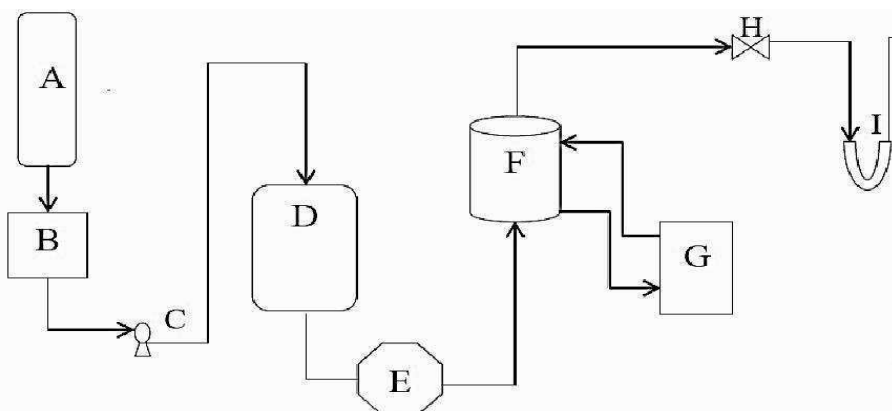
۲-۳ تجهیز آزمایشگاهی

استخراج با دستگاه طراحی و ساخته‌شدهٔ گروه مهندسی شیمی دانشگاه آزاد مرودشت انجام گرفت. تجهیز مورد استفاده متشکل از یک کپسول ۲۰ کیلویی کربن‌دی‌اکسید مایع است که در مرحلهٔ بعد، یک چیلر خنک‌کننده برای رساندن دمای CO₂ ورودی به پمپ به دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس تعبیه شده‌است. پمپ پیستونی با نیروی محرکهٔ هوای فشرده برند هاسکل آمریکا مدل MSHP-71 با حداکثر فشار تولیدی ۶۰ مگاپاسکال است. سیال پس از افزایش فشار در پمپ به‌وسیلهٔ لوله‌های فشار بالا به‌داخل سل استخراج هدایت می‌شود. سل استخراج به حجم ۲۰۰ سانتی‌متر مکعب از جنس سیلندر فولاد زنگ‌نزن طراحی شده که دو انتهای آن به‌صورت پیچی قابلیت مسدود و بازشدن دارد. در کنگی دو طرف پیستون مجرای برای ورود و خروج در نظر گرفته شده که با توری مش معین برای جلوگیری از خروج جامد پوشش داده می‌شود. کلیت محفظهٔ استخراج در داخل یک هیتر برای کنترل دمایی قرار دارد. در دو طرف محفظهٔ استخراج شیرهای کنترلی و شیرهای فشارشکن قرار گرفته، همچنین یک شیر اطمینان و یک شیر تخلیهٔ اضطراری نیز تعبیه شده‌است.

در خروجی محفظهٔ استخراج پس از شیر فشارشکن یک لوله U شکل برای به دام‌اندازی آنالیت استخراج شده وجود دارد که برای عملکرد بهتر با دی‌کلرومتان پر می‌شود. از آسیاب نانو برند NARYA مدل MPM با سرعت چرخش ۶۰۰ دور در دقیقه که دارای کاپ‌های فولادی سخت‌کاری شده، بودند برای نانوذره‌سازی پودر مرحلهٔ نانو استفاده شد که پس از زمان ۱۵ دقیقه پودر نانو در دسترس بود.

۲-۴ آنالیز دستگاهی آنالیت استخراجی با روش LC-MS-MS

آنالیز آنالیت استخراجی با دستگاه کروماتوگراف مایع با کارایی بالا که در خروجی با دو شناساگر جرمی ادغام‌شده، انجام شد. دستگاه



شکل ۱. طرحواره تجهیز آزمایشگاهی (a) کپسول کربن دی‌اکسید (b) چیلر خنک‌کننده (c) پمپ (d) مخزن ذخیره کربن دی‌اکسید (e) فشارسنج (f) سلول استخراج (g) گرم‌کننده (h) شیر انبساط (i) لوله یو شکل تله‌اندازی.

Figure 1. The experimental set up (a) CO₂ Cylinder (b) Refrigerator (c) Reciprocating Pump (d) CO₂ loading tank (e) Barometer (f) Extraction cell (g) Heater (h) Joule-Thomson Valve (i) U-Shape trapping Tub.

کانال‌زنی جلوگیری شود. نیز، اضافه‌شدن ذرات شیشه، سطح در تماس ذرات و حلال را افزایش می‌دهد و به بهبود بازده استخراج کمک می‌کند. باتوجه‌به گنجایش محفظه استخراج در هر بارگذاری ۵ گرم از نمونه بارگذاری می‌شود. برای اطمینان مجدد از عدم خروج ذرات جامد، نمونه داخل یک توری با مش ۱۰۰ ریخته می‌شود. سپس مقدار معین آب برای خیساندن و درصورت نیاز، حلال کمکی انتخابی به نمونه اضافه و درب محفظه استخراج به‌صورت پیچی بسته و آب‌بندی می‌شود؛ به‌نحوی که در فشار عملیاتی هیچ‌گونه نشتی نداشته باشد.

برای شروع فرایند شیر خروجی کپسول باز می‌شود و کربن دی‌اکسید به‌داخل چیلر برای خنک‌سازی هدایت می‌شود؛ فشار اولیه کپسول ۵ مگاپاسکال است که با خنک‌شدن تا دمای ۲۰- درجه سلسیوس به‌صورت مایع به پمپ می‌رسد. بعد از دادن زمان کافی برای رسیدن به دمای ۲۰- درجه سلسیوس شیر ورودی محفظه استخراج را باز و پمپ تزریق را فعال و فشار را در حد از قبل تعیین‌شده تنظیم می‌کنیم. باتوجه‌به قرارگیری محفظه استخراج در داخل هیتر با تنظیم دمای هیتر در دمای مورد نظر، زمان کافی برای رسیدن به حالت پایدار دمایی و استخراجی به سامانه داده می‌شود. پس از سپری‌شدن زمان مد نظر شیر خروجی محفظه استخراج که خروجی آن به داخل ظرف یو U شکل برای جمع‌آوری نمونه هدایت شده، باز می‌شود. در داخل ظرف جمع‌آوری، مقداری دی‌کلرومتان برای به‌دام‌اندازی نمونه ریخته می‌شود. پس از تخلیه محفظه استخراج با

ساخت شرکت AB sciex مدل API 3000 است و جداسازی در ستون MPC18 با ارتفاع ۲۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات پرشده با مشخصات ۵ میکرومتر، ۱۰۰ آنگستروم و تخلخل سطحی ۳۶۰ m²/g فوق خالص ۹۹/۹۹۹ درصد سیکا انجام گرفت.

- فاز حمل‌کننده: مخلوط ۵۰ درصد حجمی - حجمی استونیتریل و آب دیونیزه.

- نرخ جریان فاز حمل‌کننده: ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه.

- دمای عملیاتی: معادل دمای محیط.

- حجم نمونه تزریقی: معادل ۲۰ میکرولیتر.

شناساگرهای جرم از قبل با آمینواسیدهای خالص کالیبره شده‌بودند و پیک‌های مربوطه هر آمینواسید با غلظت معین در کتابخانه دستگاه برای شناسایی کمی و کیفی هر آمینواسید تعریف شده‌بود.

۳. بحث و نتیجه‌گیری

۳-۱ تیمار و بارگذاری نمونه

در مرحله تیمار، نمونه قرص‌ها ابتدا در هاون، خرد و سپس به‌وسیله توری با مش ۷۰ الک می‌شود تا از خردشدن ذرات تا حد مورد نظر اطمینان شود. پس از سایش کامل نمونه در داخل هاون و رساندن اندازه تمام ذرات به اندازه الک مش ۷۰ مقدار ۱۰ گرم دانه‌های شیشه‌ای به قطر ۰/۵ میلی‌متر با پودر خردشده مخلوط می‌شود تا از به‌هم فشردشدن و ایجاد جامد صلب در فشار بالا و هم‌چنین

با کارایی بالا، از نو آنالیز شد. نتایج به‌دست‌آمده در اغلب موارد بیش از ۹۵٪ با مقادیر برجسب روی محصول انطباق داشتند که در نتیجه با در نظر گرفتن حدود مجاز خطای آزمایش مقادیر قیدشده شرکت سازنده به‌عنوان مبنای عمل و محاسبات قرار گرفت. جدول (۱) و شکل (۲) نشان‌دهنده نتایج آنالیز به‌همراه داده‌های بر روی قرص است.

شست‌وشوی ظرف U شکل به‌وسیله دی‌کلرومتان، نمونه استخراج‌شده در ظرف نهایی جمع‌آوری می‌شود.

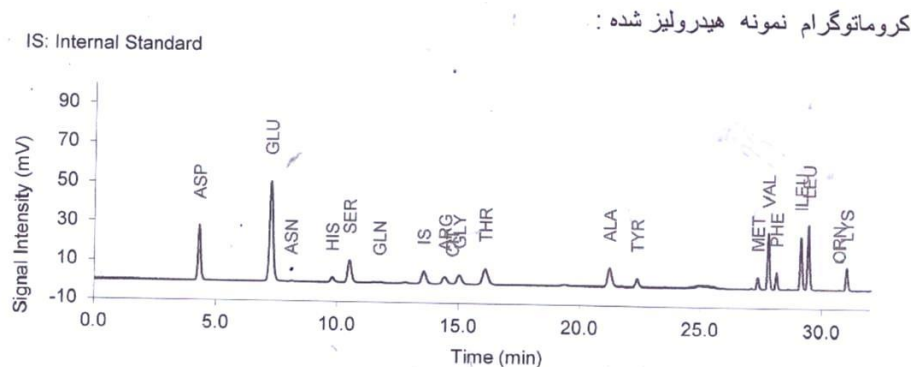
۳-۲ آنالیز نمونه اولیه

باتوجه به انتخاب قرص‌های مکمل غذایی تجاری به‌عنوان ماده اولیه در بردارنده آمینواسید برای راستی‌آزمایی داده‌های ادعایی شرکت نصب‌شده بر روی محصول، قرص به‌وسیله دستگاه کروماتوگراف مایع

جدول ۱. داده‌های مقایسه‌ای تجاری و تست مجدد آزمایشگاهی.

Table 1. Comparatives data for primary sample traditional data vs laboratory test.

	HPLC RESULT	COMPANY DATA
	mg/serving	mg/serving
alanine	151	160
arginine	79	77
aspartic acid	337	352
cysteine	-	66
glutamic acid	880	907
glycine	58	48
histidine	52	63
isoleucine	195	210
leucine	329	352
lysine	288	316
methionine	57	70
phenylalanine	111	110
proline	-	209
serine	156	162
threonine	215	214
tryptophan	-	46
tyrosine	102	102
valine	185	204
	3202	3676



شکل ۲. کردار کروماتوگرام نمونه اولیه.

Figure 2. Chromatogram chart for primary sample.

هر وعده شامل ۴ قرص مجموعاً به جرم ۵۶۰۰ میلی‌گرم است که ۳۶۰۰ میلی‌گرم آن را آمینواسید تشکیل می‌دهد. این قرص‌ها از شیر ساخته شده‌اند که با هیدرولیز پروتئین‌های آن‌ها به آمینواسیدهای سازنده شکسته شده‌اند.

۳-۳-۳ تعریف مفاهیم

باتوجه به اهداف از پیش تعیین‌شده این مقاله، مفاهیم زیر برای بیان و مقایسه آماری عملکرد باتوجه به تحقیقات پیشین و نیازهای اختصاصی تحقیق حاضر تعریف شد.

۳-۳-۱ ترکیب درصد جرمی

$$m\% = \frac{\text{Aimed Amino Acid Mass}}{\text{Whole Amino Acid Mass}} \quad (1)$$

در مورد نمونه اولیه برابر است با جرم آمینواسید مد نظر موجود در نمونه، تقسیم بر کل آمینواسید موجود در نمونه (m_p). در نمونه‌های استخراجی برابر است با جرم آمینواسید مد نظر، تقسیم بر کل جرم آمینواسید استخراج شده (m_e).

۳-۳-۲ گزینش پذیری

برابر است با نسبت ترکیب درصد آمینواسید مد نظر در محلول استخراجی به ترکیب درصد همان آمینواسید در نمونه اولیه که در اینجا با عنوان مفهوم گزینش‌پذیری از آن نام برده خواهد شد.

$$S = \frac{m_e}{m_p} \quad (2)$$

مقدار یک برای این مفهوم، نشان‌دهنده مساوی بودن غلظت در ماده اولیه و آنالیت استخراجی است. مقادیر کمتر از یک به معنای پایین بودن غلظت در آنالیت نسبت به ماده اولیه است؛ هرچه این مقدار به سمت صفر میل کند استخراج نسبت به آن ماده گزینش‌پذیری کمتری دارد و نشان‌دهنده عدم استخراج و کاهش غلظت است.

مقادیر بزرگ‌تر از یک، نشان‌دهنده تغلیظ است؛ برای مثال مقدار ۲ در این مفهوم نشان‌دهنده ۲ برابر شدن غلظت در آنالیت استخراجی است. هرچه این عدد بزرگ‌تر باشد، استخراج نسبت به آن ماده گزینش‌پذیرتر بوده است.

۳-۳-۳ درصد استخراج جزئی E_p

نسبت درصدی جرم آمینواسید استخراج‌شده به میزان جرم همان آمینواسید در نمونه اولیه

$$E_p = \frac{\text{mg Aimed Amino Acid in Extract}}{\text{mg Aimed Amino Acid in Sample}} \times 100 \quad (3)$$

۳-۳-۴ درصد استخراج کل E_T

نسبت درصدی کل جرم آمینواسیدهای استخراج‌شده به میزان کل جرم آمینواسید در نمونه اولیه

$$E_T = \frac{\text{mg Whole Extract Amino Acid}}{\text{mg Whole Sample Amino Acid}} \times 100 \quad (4)$$

۳-۴ طراحی آزمایش

در یک جمع‌بندی کلی و باتوجه به نتایج تمام آزمایش‌های انجام‌شده، استخراج گزینش‌پذیر بر روی پنج مورد از آمینواسیدهای مورد بررسی امکان‌پذیر بود و سایر آمینواسیدها دارای گزینش‌پذیری کمتر از ۱ و یا در بعضی موارد نزدیک به صفر در آنالیت استخراجی نسبت به نمونه اولیه بوده‌اند؛ باتوجه به مطلب بالا، تحقیق بر روی پنج آمینواسید آلانین، گلاسین، سرین، هیستیدین و گلوتامیک اسید متمرکز شد. در این بین آلانین، هیستیدین و سرین با رفتار مشابه در یک دسته تقسیم بندی شدند، هم‌چنین باتوجه به رفتار گلاپسین سازنده دسته دوم بودند و گلوتامیک‌اسید نیز رفتار ویژه خود را داشت. در ادامه به بررسی پاسخ‌های رفتاری این سه دسته در برابر مشخصه‌های عملیاتی فشار و دما که به صورت اجمالی در جدول (۲) آمده‌است، پرداخته می‌شود. برای این منظور ۹ مرحله آزمایش طراحی شد که پوشش‌دهنده فشارهای ۱۲، ۱۶، ۲۰ مگاپاسکال و دماهای ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درجه سانتیگراد هر دو با خطای عملیاتی ۱ +/- درصد طبق جدول (۳) است. حد پایین دما باتوجه به این‌که ورود کربن‌دی‌اکسید به فاز بحرانی از دمای ۳۳ درجه سلسیوسی است، برای ارزیابی رفتار استخراجی در دمای زیر و نزدیک به بحرانی دمای ۲۰ درجه سلسیوس انتخاب شد و باتوجه به حساسیت دمایی آمینواسیدها و احتمال تجزیه در دمای بالای ۶۰ درجه سلسیوس، این دما به عنوان حد بالای دما انتخاب شد. حداکثر فشار عملیاتی مجاز برای تجهیز فوق بحرانی ۲۰ مگاپاسکال توصیه شده بود که به عنوان حد بالای فشار انتخاب شد و برای حصول اطمینان از حضور

چهار، بالاترین میزان تغلیظ را شاهد بودیم. نکته مهم در رفتار این گروه حساسیت دمایی بود: هیستیدین و سرین همان‌گونه که در شکل‌های (۳) تا (۶) نشان داده شده با کاهش دما از ۶۰ به ۴۰ درجه سلسیوس گزینش‌پذیری و میزان استخراج با تغییر و کاهش ناگهانی به صفر میل می‌کند؛ حال آن‌که با کاهش فشار از ۲۰ Mpa به ۱۶ Mpa با وجود کاهش میزان گزینش‌پذیری همچنان شاهد استخراج گزینش‌پذیر و افزایش غلظت این دو اسیدآمینه در آنالیت استخراجی نسبت به نمونه اولیه هستیم. لازم به ذکر است که با کاهش فشار به ۱۲ مگاپاسکال استخراج هیستیدین به صفر میل کرد و گزینش‌پذیری سرین به ۱/۶ کاهش یافت. درمورد این دسته می‌توان بیان کرد که بیشتر از فشار، حساسیت دمایی دارند و صرفاً در دماهای بالا قابل استخراج هستند؛ هرچند در

در ناحیه فوق بحرانی فشار ۱۲ مگاپاسکال به‌عنوان حد پایین فشار قرار داده شد. عامل زمان برای تمام مراحل مساوی و برابر ۶۰ دقیقه در نظر گرفته شد که با توجه به گزارش‌ها در تحقیقات پیشین، زمان کافی را برای رسیدن به تعادل بین حلال و حل‌شونده تأمین می‌کند.

۴. بررسی تأثیر مشخصه‌های عملیاتی فشار و دما بر روی گزینش‌پذیری و بازده استخراج

۱-۴ رفتار استخراجی آلانین، هیستیدین و سرین و تعیین شرایط بهینه برای این گروه

بیشترین گزینش‌پذیری برای این دسته در بالاترین دما و فشار عملیاتی به دست آمد؛ بدین ترتیب که با گزینش‌پذیری نزدیک به

جدول ۲. نتایج گزینش‌پذیری و بازده استخراج به تفکیک آمینواسیدهای هدف در نمونه‌های استخراج شده به همراه تکرار آزمایش‌ها.

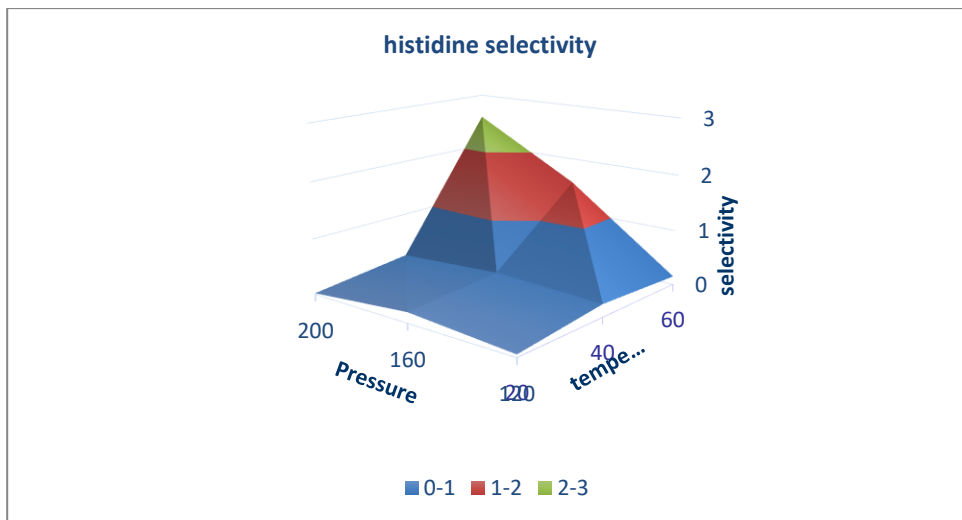
Table 2. Selectivity and yield result for aimed amino acid and test repeat report.

	T=20 °C P=12Mpa	T=40 °C P=12Mpa	T=60 °C P=12Mpa	T=20 °C P=16Mpa	T=40 °C P=16Mpa	T=60 °C P=16Mpa	T=20 °C P=20Mpa	T=40 °C P=20Mpa	T=60 °C P=20Mpa
Alanine selectivity	0.35	0.38	1.01	0.49 0.48	0.27	0.9	1.07	0.54	1.74 1.69
Alanine yield	1.25	0.59	1.47	1.61 1.6	0.59	1.25	3.19	1.36	2.62 2.59
Histidine selectivity	0.05	0.23	0.15	0.19 0.19	0.31	1.55	0.02	0.2	2.57 2.61
Histidine yield	0.19	0.36	0.22	0.63 0.63	0.66	2.15	0.06	0.5	3.86 3.9
Serine selectivity	0.99	0.48	1.63	0.58 0.55	0.72	1.91	0.43	0.47	2.41 2.4
Serine yield	3.57	0.73	2.37	1.93 1.89	1.54	2.66	1.29	1.18	3.63 3.62
Glycine selectivity	1.66	2.06	2.12	2.21 2.16	2.03	5.97	1	2.32	5.12 5.03
Glycine yield	5.99	3.17	3.08	7.3 7	4.33	8.3	2.98	5.8	7.71 7.6
Glutamic acid selectivity	3.58	3.58	2.98	3.5 3.6	3.2	2.46	3.51	3.57	1.71 1.62
Glutamic acid yield	12.93	5.52	4.34	11.61 11.84	6.84	3.42	10.54	8.9	2.58 2.49

جدول ۳. کران بالا و پایین متغیرها.

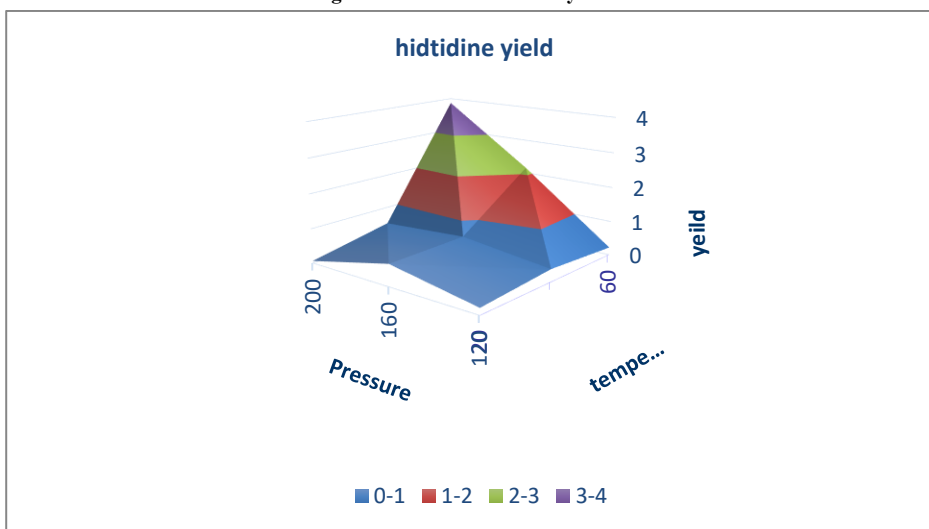
Table 3. Factors at low levels and high levels.

Variable	Symbol	Unit	High	Low
Pressure	P	Mpa	20	12
Temperature	T	°C	60	20
Time	t	Min	60	60



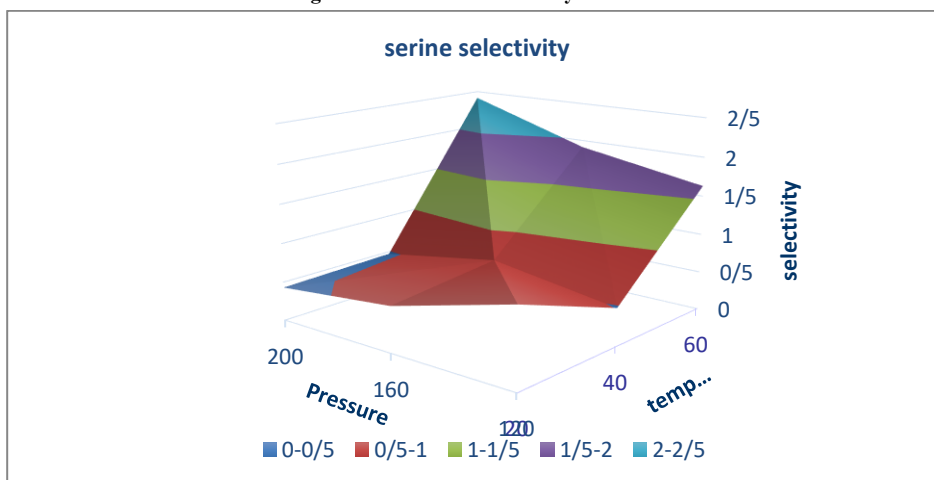
شکل ۳. کردار گزینش‌پذیری هیستیدین.

Figure 3. Histidine selectivity chart.



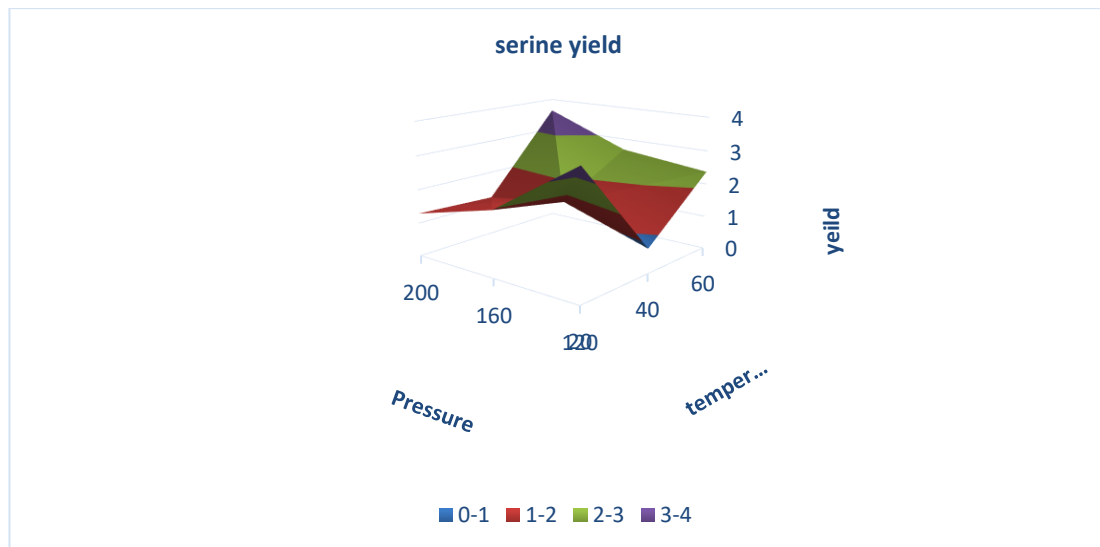
شکل ۴. کردار بازده استخراج هیستیدین.

Figure 4. Histidine extraction yield chart.



شکل ۵. کردار گزینش‌پذیری سرین.

Figure 5. Serine selectivity chart.



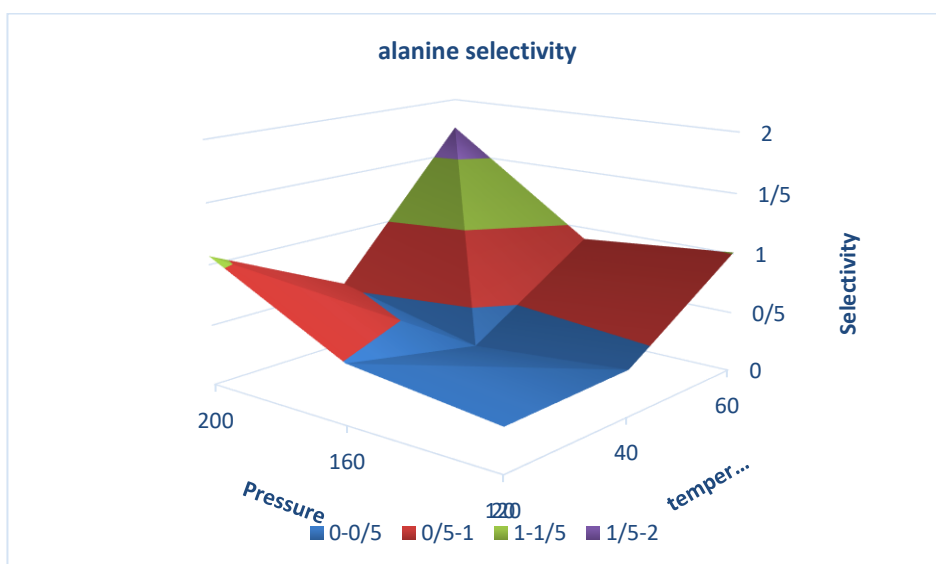
شکل ۶. کردار بازده استخراج سرین.
 Figure 6. Serine extraction yield chart.

بازده‌ای از فشار استخراج، گزینش‌پذیری از خود نشان می‌دهند. استخراج ترکیبات قطبی‌تر شود.

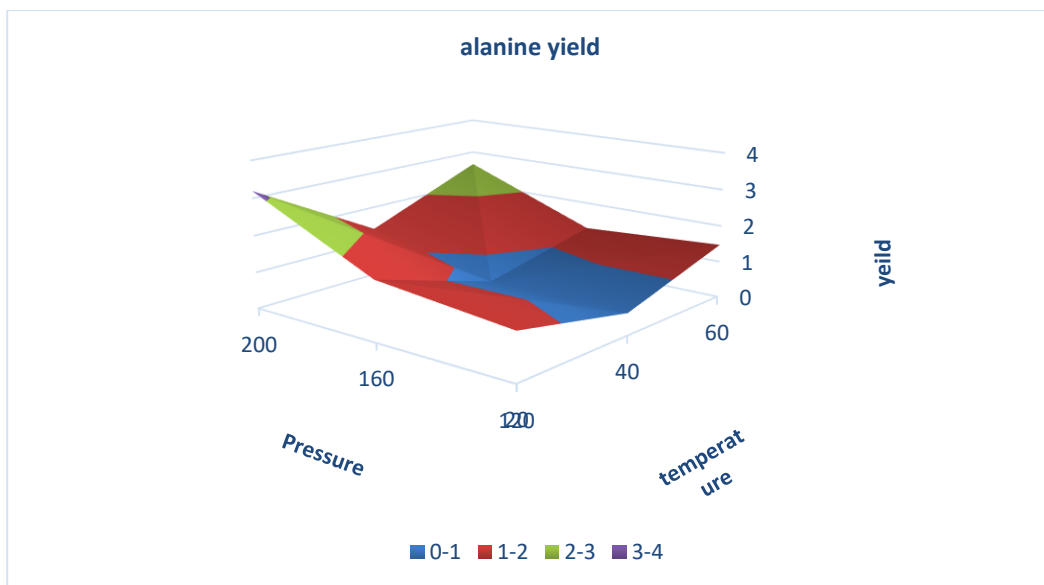
آلانین طبق شکل‌های (۷) و (۸) با کاهش دما در این دسته، برخلاف هیستیدین و سرین حد قابل قبول از استخراج و گزینش‌پذیری اتفاق می‌افتد و اعداد به سمت صفر میل کنند. طبق رابطه گیدینگ که نشان‌دهنده ارتباط بین قدرت حلالیت سیال فوق بحرانی با فشار بحرانی و چگالی سیال را نشان می‌دهد، بر اساس این رابطه با افزایش فشار بحرانی (Pc) و یا چگالی (ρ) میزان قدرت حلالیت سیال (δ) افزایش می‌یابد؛ که می‌تواند منجر به

$$\delta = 1.25 P_c^{\frac{1}{2}} \left(\frac{\rho}{\rho_1} \right) \quad (5)$$

با کنترل قدرت حلالیت کربن دی‌اکسید، می‌توان استخراج‌های گزینش‌پذیر انجام داد؛ زیرا با هر قدرت حلالیت مشخص دسته‌ای از ترکیبات با قطبیت مشابه استخراج می‌شود.



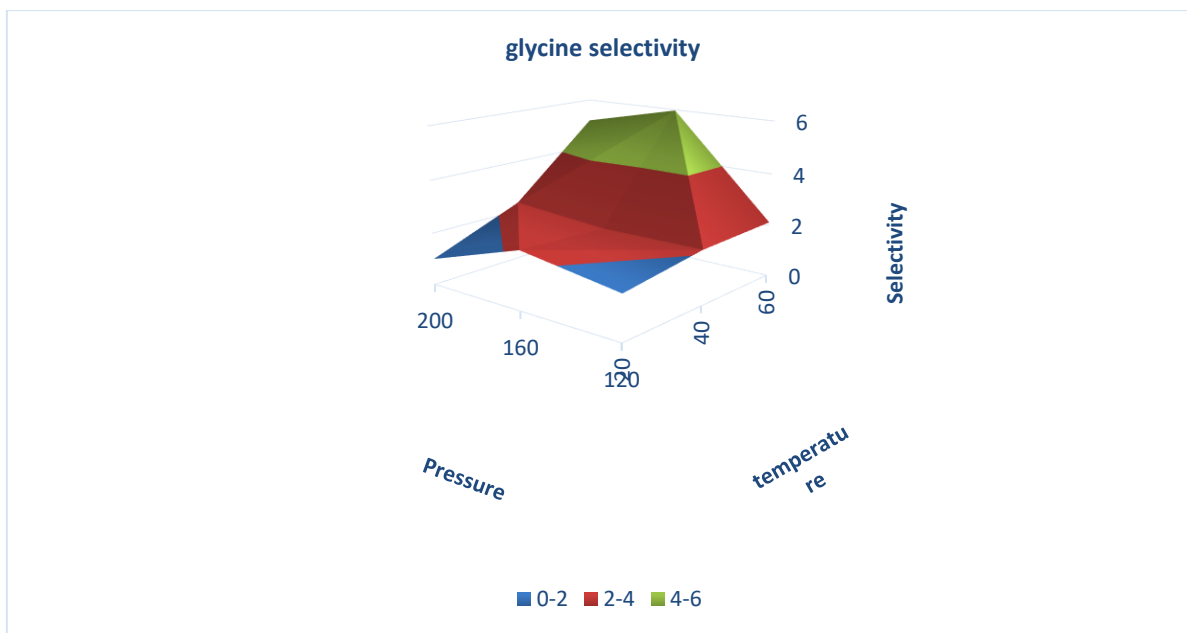
شکل ۷. کردار گزینش‌پذیری آلانین.
 Figure 7. Alanine selectivity chart.



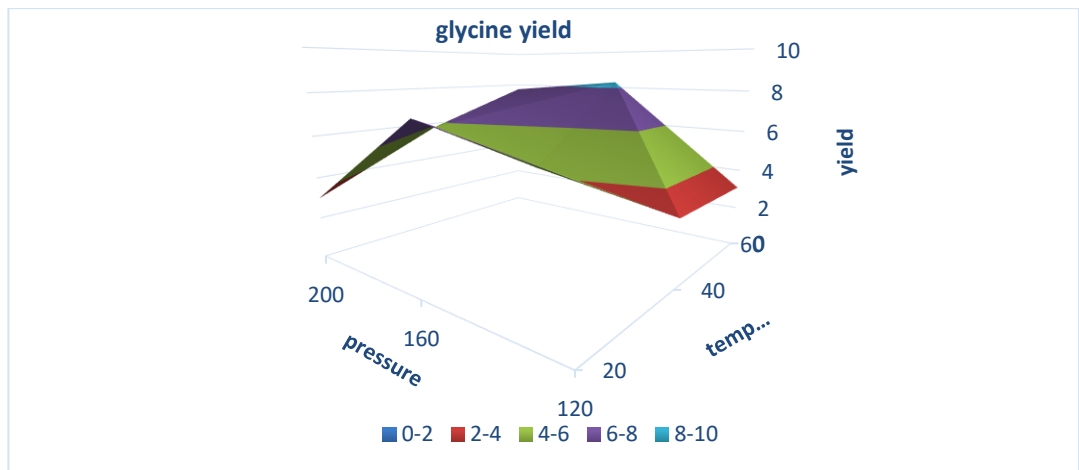
شکل ۸. کردار بازده استخراج آلانین.
 Figure 8. Alanine extraction yield chart.

۸/۳ درصد است. در مورد گلیسین باتوجه به شرایط بهینه استخراج متفاوت با دسته اول می‌تواند جداسازی گزینش پذیر با انتخاب این شرایط عملیاتی اتفاق بیافتد.

۲-۴ رفتار استخراجی گلیسین و تعیین شرایط بهینه بهترین گزینش پذیری و بازده استخراج طبق شکل‌های (۹) و (۱۰) برای گلیسین در دمای 60°C و فشار ۱۶ Mpa بار به دست آمد. حد بالای گزینش پذیری برای گلیسین ۵/۹۷ و بازده استخراج



شکل ۹. کردار گزینش پذیری گلیسین.
 Figure 9. Glycine selectivity chart.

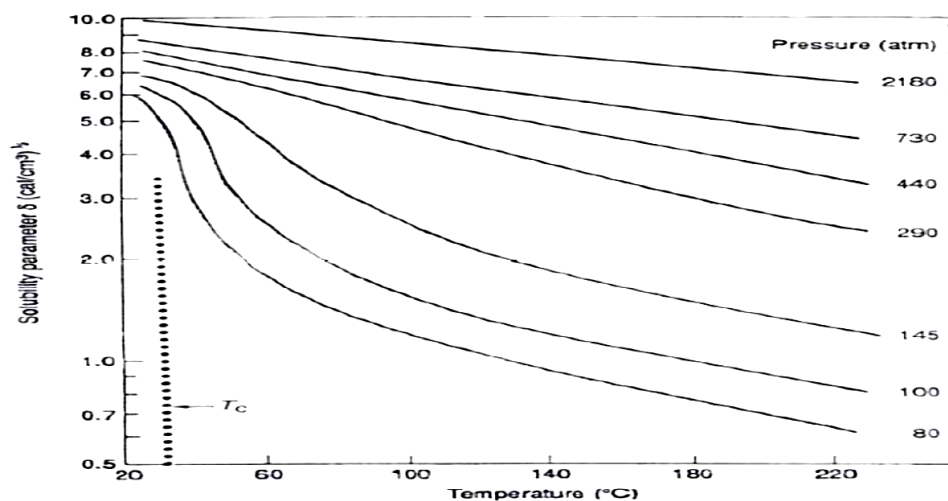


شکل ۱۰. کردار بازده استخراج گلیسین.

Figure 10. Glycine extraction yield chart.

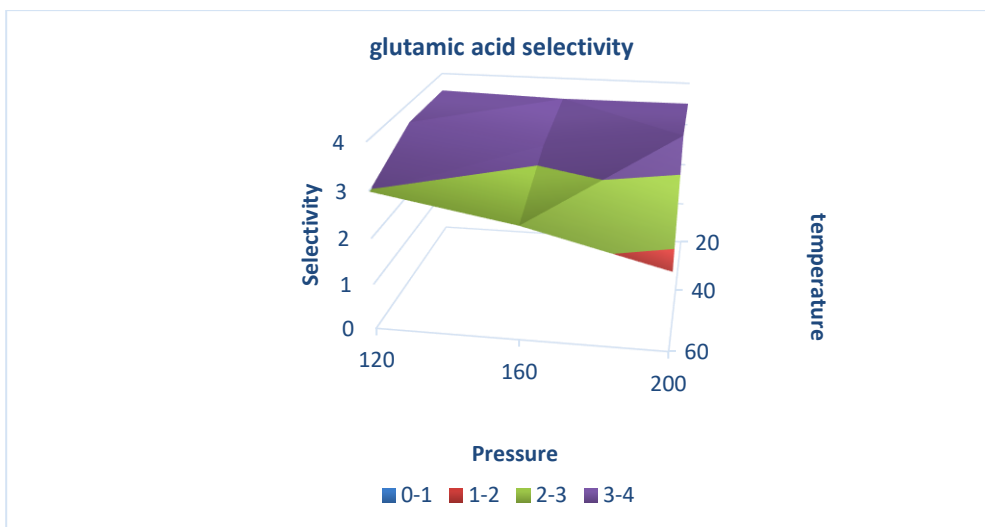
اسید در سیال فوق بحرانی کربن دی‌اکسید گزارش شده است. در توضیح این رفتار می‌توان به این نکته اشاره کرد که میزان حلال‌پوشی جزء حل‌شونده در مایعات مقدار معینی است؛ حال آن‌که در سیالات فوق بحرانی می‌توان با تغییر فشار و دما، توان حال پوششی حلال را تغییر داد. طبق شکل (۱۱) که نمایشگر کردار هیلدبراند برای اثر دما و فشار در حالت فوق بحرانی است، با افزایش فشار در دمای یکسان و یا کاهش دما در فشار یکسان می‌توان ترکیبات با پلاریته و جرم مولکولی بالاتر استخراج کرد. از این خاصیت می‌توان برای استخراج انتخابی که منجر به تولید محصول با ارزش اقتصادی بیشتر می‌شود، بهره جست [۲۲].

۳-۴ رفتار استخراجی گلوتامیک اسید و تعیین شرایط بهینه گلوتامیک اسید برخلاف ۴ آمینواسید قبلی، رفتار کاملاً متفاوتی از خود نشان داد؛ به طوری که بالاترین حد‌گزینش‌پذیری طبق شکل‌های (۱۲) و (۱۳) به میزان ۳/۵ و استخراج ۱۲/۹ درصدی در پایین‌ترین دما و فشار عملیاتی به دست آمد و با افزایش دما و فشار به خصوص دما، گزینش به شدت کاهش می‌یابد؛ در این مورد نیز حساسیت دمایی چندین برابر حساسیت فشار است. در مورد گلوتامیک اسید بازده استخراج عکس‌العمل شدیدتری نسبت به گزینش‌پذیری به شرایط عملیاتی داشته، بدین ترتیب که بازده استخراج نسبت به حالت غیر بهینه ۵ برابر می‌شود. در مقاله منتشرشده و در، نتایج مشابهی در خصوص رفتار عملکردی گلوتامیک



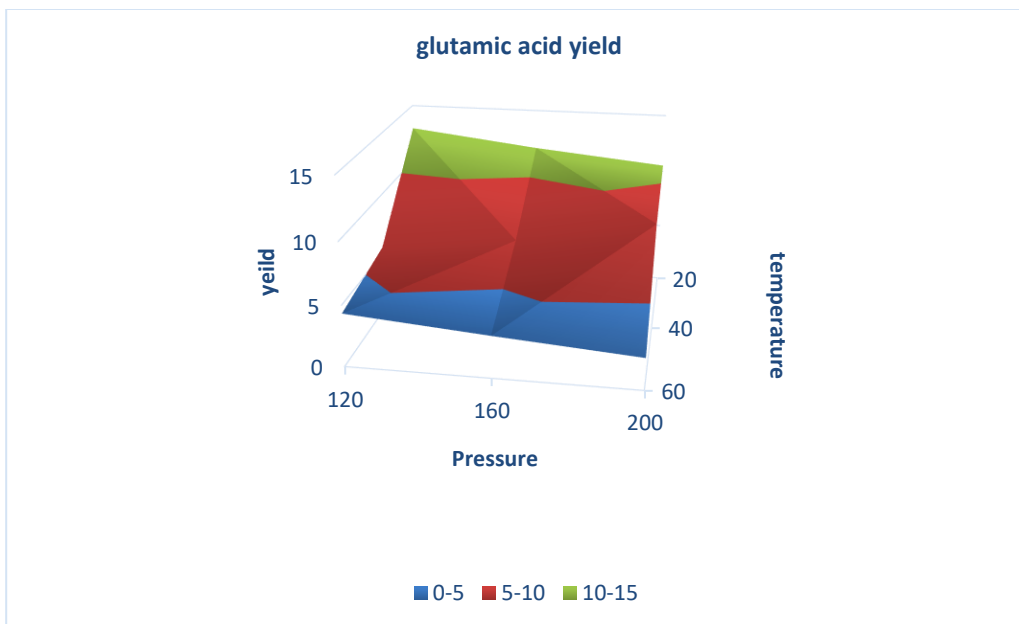
شکل ۱۱. مشخصه حلالیت هیلدبراند بر حسب دما و فشار در سیال فوق بحرانی دی‌اکسید کربن [۲۲].

Figure 11. Hildebrand solubility parameter in terms of temperature and pressure in carbon dioxide supercritical fluid [22].



شکل ۱۲. کردار گزینش‌پذیری گلوتامیک اسید.

Figure 12. Glutamic acid selectivity chart.



شکل ۱۳. کردار بازده استخراج گلوتامیک اسید.

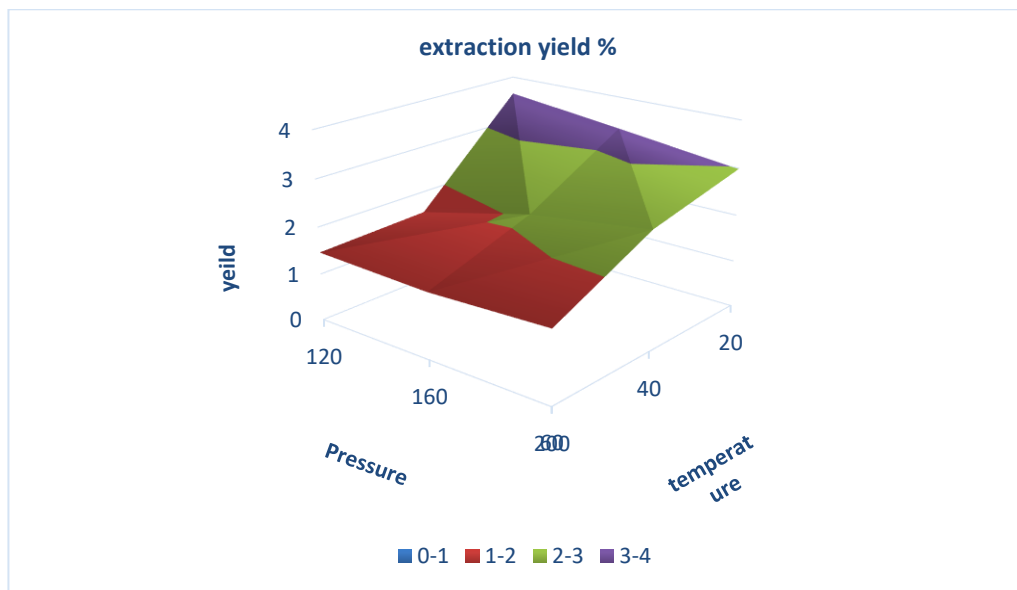
Figure 13. Glutamic acid extraction yeild chart.

عملیاتی بهینه برای رسیدن به بالاترین درصد استحصال، کاملاً به ترکیب درصد نمونه اولیه بستگی دارد و نمی‌تواند یک حکم کلی درمورد تمام مواد حاوی آمینواسید صادر کرد. در مقاله یون کانگ و همکاران و چون تینگ شن و همکاران نیز نتیجه‌گیری مشابهی در استخراج آمینواسیدهای آزاد از پسماند صنعتی ماهی تن به‌دست آمده‌است.

۴-۴ بررسی تأثیرات شرایط عملیاتی بر کل میزان استخراج بالاترین درصد استخراج طبق شکل (۱۴) در پایین‌ترین دما و فشار عملیاتی به‌دست آمد؛ لیکن نکته مهم در گزارش این مورد ترکیب درصد نمونه اولیه است. باتوجه به داده‌های پیشین به‌دست‌آمده، معلوم شد که هر یک از آمینواسیدها در شرایط عملیاتی خاصی که با یکدیگر هم منطبق ناست بازده استخراج بالاتری از خود نشان می‌دهد؛ از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت که تعیین شرایط

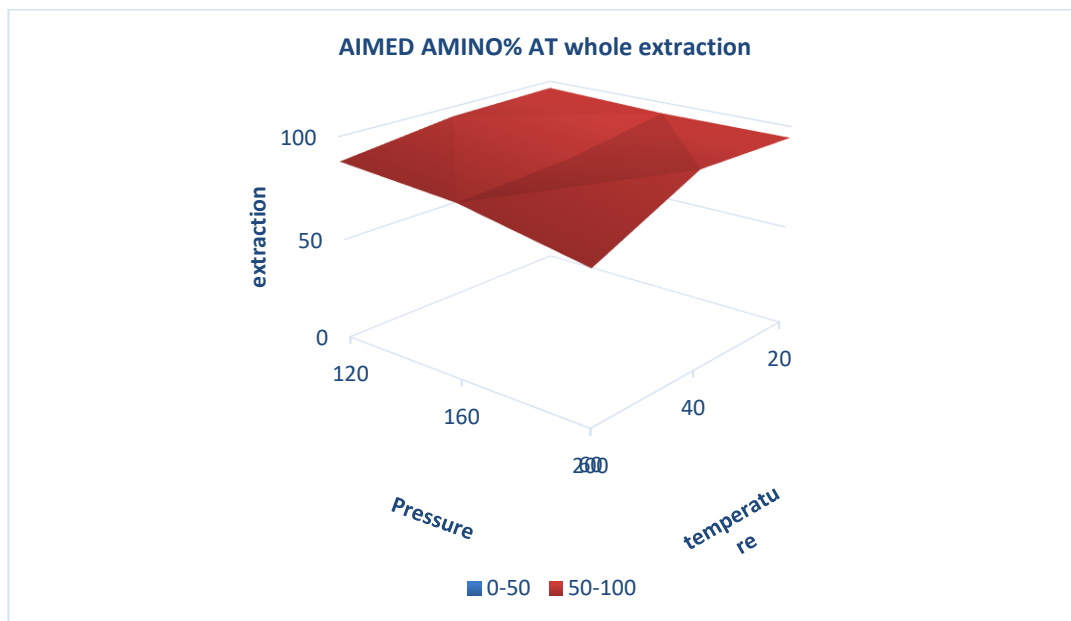
شرایط عملیاتی بهینه این آمینواسید ترکیب درصد آمینواسیدهای انتخابی نیز افزایش یافته و بالعکس. گزارش مشابهی به دست و درمن و همکاران در مورد حد پایین انحلال‌پذیری والین، پرولین و آسپارتیک اسید انجام گرفته‌است.

در شکل (۱۵) ترکیب درصد پنج آمینواسید بررسی شده در این تحقیق از کل آمینواسیدهای استخراجی مقایسه شده‌است. در استخراج‌ها ۷۱٪ تا ۹۵٪ آمینواسیدهای استخراجی مربوط به این پنج آمینواسید است. البته باتوجه به این که در نمونه اولیه ترکیب درصد گلوتامیک اسید بالاترین میزان را دارد، با نزدیک شدن به



شکل ۱۴. بازده کلی استخراج.

Figure 14. Total extraction yield chart.



شکل ۱۵. ترکیب درصد وزنی آمینواسیدهای هدف در آنالیت استخراجی.

Figure 15. Chemical composition of aimed amino acid at extracted analyte.

۵. نتیجه‌گیری

در این تحقیق تأثیر مشخصه‌های عملیاتی بر استخراج فوق بحرانی اسیدهای آمینه با حلال کربن دی‌اکسید سنجیده شد. استخراج بر روی مخلوط از پیش تیمار شده آمینواسیدهای آزاد انجام گرفت. برای راستی‌آزمایی ترکیب درصد مخلوط اولیه یک‌بار دیگر با دستگاه آنالیز شد که نتایج انطباق ۹۵ درصدی را نشان می‌داد. انتخاب شرایط عملیاتی یکسان به ما در مقایسه دقیق‌تر تأثیرات مستقیم این افزودنی‌ها کمک کرد. از ۲۰ آمینواسید موجود در مخلوط اولیه، تقریباً در تمام آزمایش‌ها صرفاً موفق به استخراج آلانین، گلیسین، سرین، هیستیدین و گلوتامیک اسید شدیم و در مورد ۱۵ آمینواسید باقی‌مانده، استخراج به‌میزان کم و قابل صرف نظر بود؛ می‌توان بیان کرد که روش استخراج فوق بحرانی برتری نسبی در این ۵ گونه داشته و برای ۱۵ گونه باقی‌مانده روش خوبی برای استخراج نبوده‌است. پس از به‌دست‌آمدن داده‌های تجربی، در نرم‌افزار اکسل مدل کرداری داده‌ها تهیه شد که نشان‌دهنده بالاترین سطح گزینش‌پذیری و بازده استخراج برای گلوتامیک اسید در فشار ۱۴ مگاپاسکال و دمای ۲۰ درجه سلسیوس، برای گلیسین در فشار ۱۶ مگاپاسکال و دمای ۶۰ درجه سلسیوس و برای آلانین، سرین و هیستیدین در فشار ۲۰ مگاپاسکال و دمای ۶۰ درجه سلسیوس بود. باتوجه به اختلاف چشم‌گیر شرایط عملیاتی بهینه هر دسته، می‌توان از این شرایط برای استخراج گزینش‌پذیر هر یک از آمینواسیدهای مورد مطالعه، بهره برد. بالاترین بازده استخراج (۳.۵٪) در شرایط بهینه استخراج گلوتامیک اسید کسب شد که بالاترین درصد در نمونه را دارد.

مراجع

- [1] Bornas, M., & Esfandiari, N. (2022). Experimental Study Extraction Active Ingredients of Eryngium Billardieri Using Supercritical Carbon Dioxide. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 21(122), 52-62. In Persian.
- [2] Esfandiari, N. (2015). Production of micro and nano particles of pharmaceutical by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 100, 129-141.
- [3] Picos-Salas, M. A., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Valdez-Torres, B., Angulo-Escalante, M. A., López-Martínez, L. X., Delgado-Vargas, F., & Heredia, J. B. (2021). Supercritical CO₂-ethanol extraction of oregano (*Lippia graveolens*) phenolic compounds with antioxidant, α -amylase and α -glucosidase inhibitory capacity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(4), 3480-3490.
- [4] Putra, N. R., Rizkiyah, D. N., Zaini, A. S., Machmudah, S., & Yunus, M. A. C. (2021). Solubility of catechin and epicatechin from *Arachis Hypogea* skins wastes by using supercritical carbon dioxide-ethanol and its optimization. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 2031-2038. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00797-3>
- [5] Esfandiari, H., honarvar, b., & Esfandiari, N. (2020). Laboratory study of extraction of valuable substances from carob plant using supercritical fluid with combination of ultrasound waves. *Chemical Engineering of Iran*, 19(109), 37-49. In Persian.
- [6] Albakry, Z., Karrar, E., Mohamed Ahmed, I. A., Ali, A. A., Al-Maqtari, Q. A., Zhang, H., Wu, G., & Wang, X. (2023). A comparative study of black cummin seed (*Nigella sativa* L.) oils extracted with supercritical fluids and conventional extraction methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2429-2441. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01802-7>
- [7] Zou, X., Liu, Y., Tao, C., Liu, Y., Liu, M., Wu, J., & Lv, Z. (2018). CO₂ supercritical fluid extraction and characterization of polysaccharide from bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 35-44.
- [8] Dutta, S., & Bhattacharjee, P. (2017). Microencapsulation of enzyme-assisted supercritical carbon dioxide extract of small cardamom by spray drying. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 310-319.
- [9] Boselli, E., Caboni, M. F., & Lercker, G. (2001). Extraction and purification of free cholesterol from some egg-containing food by on-line supercritical fluid extraction – solid-phase extraction. *European Food Research and Technology*, 212(2), 244-246. <https://doi.org/10.1007/s002170000206>
- [10] Weder, J. K. (1980). Effect of supercritical carbon dioxide on proteins. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 171(2), 95-100.
- [11] Barajas-Álvarez, P., Castillo-Herrera, G. A., Guatemala-Morales, G. M., Corona-González, R. I., Arriola-Guevara, E., & Espinosa-Andrews, H. (2021). Supercritical CO₂-ethanol extraction of oil from green coffee beans: Optimization conditions and bioactive compound identification. *Journal of Food Science and Technology*, 1-10.

- [12] Jitrangsri, K., Chaidedgumjorn, A., & Satiraphan, M. (2020). Supercritical fluid extraction (SFE) optimization of trans-resveratrol from peanut kernels (*Arachis hypogaea*) by experimental design. *Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 1486-1494. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04184-9>
- [13] Hart, A., Anumudu, C., Onyeaka, H., & Miri, T. (2022). Application of supercritical fluid carbon dioxide in improving food shelf-life and safety by inactivating spores: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 59(2), 417-428. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05022-7>
- [14] Kasraei, M., Esfandiari, N., & honarvar, b. (2020). Laboratory study of extraction of essential oil from coke plant using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering of Iran*, 19(110), 33-41 In Persian.
- [15] Varaee, M., Honarvar, M., Eikani, M. H., Omidkhah, M. R., & Moraki, N. (2019). Supercritical fluid extraction of free amino acids from sugar beet and sugar cane molasses. *The Journal of Supercritical Fluids*, 144, 48-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.10.007>
- [16] Radfar, S., & Ghoreishi, S. M. (2018). Experimental extraction of L-Carnitine from oyster mushroom with supercritical carbon dioxide and methanol as co-solvent: Modeling and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 140, 207-217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.014>
- [17] Arnáiz, E., Bernal, J., Martín, M., Nozal, M., Bernal, J., & Toribio, L. (2012). Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves. *Journal of chromatography A*, 1250, 49-53.
- [18] Bernal, J. L., Nozal, M. J., Toribio, L., Diego, C., Mayo, R., & Maestre, R. (2008). Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. *J Chromatogr A*, 1192(2), 266-272. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.047>
- [19] Shen, C.-T., Hsu, S.-L., & Chang, C.-M. J. (2008). Co-solvent-modified supercritical carbon dioxide extractions of cholesterol and free amino acids from soft-shell turtle fish egg. *Separation and Purification Technology*, 60(2), 215-222. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.08.014>
- [20] Kang, K.-Y., Ahn, D.-H., Jung, S.-M., Kim, D.-H., & Chun, B.-S. (2005). Separation of protein and fatty acids from tuna viscera using supercritical carbon dioxide. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(4), 315-321. <https://doi.org/10.1007/BF02931848>
- [21] Vedaraman, N., Brunner, G., Srinivasa Kannan, C., Ramabrahmam, B. V., & Rao, P. G. (2004). Solubility of N-CBZ derivatised amino acids in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 30(2), 119-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2003.07.005>
- [22] Weder, J. K. (1984). Studies on proteins and amino acids exposed to supercritical carbon dioxide extraction conditions. *Food Chemistry*, 15(3), 175-190.