نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۴/ سال ۱۳۹۳

خالص‌سازی ایزومرهای اسید لینولئیک مزدوج از طریق استریفیکاسیون انتخابی با لیپاز *کاندیدا رگوزا*

مریم جعفری[*۱]، مهدی کدیور[۲] و سید امیرحسین گلی[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/٤/۲۵

[۱] دانشجوی دکترای گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
[۲] استاد و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
[*]مسئول مکاتبه: Email: mjafari@ag.iut.ac.ir

چکیده

توانایی آنزیم *کاندیدا رگوزا* برای جداسازی دو ایزومر اصلی اسید لینولئیک مزدوج (CLA) شامل ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس و ۱۰- ترانس، ۱۲- سیس در مخلوطی از اسیدهای چرب آزاد این دو ایزومر و ال- منتول مورد بررسی قرار گرفت و به منظور جداسازی این دو ایزومر به طور موثر، بهینه‌سازی شرایط واکنش با استفاده از طرح سطح پاسخ انجام شد. پس از آنالیز داده‌ها با استفاده از طرح دی- اپتیمال، بهترین شرایط برای حداکثر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس با ال- منتول طی یک مرحله استریفیکاسیون به این ترتیب تعیین شدند: مدت زمان واکنش ۲۳/۱۲ ساعت، دمای واکنش ۳۲/٦۵ درجه سانتیگراد، مقدار آنزیمU۱۳۵/٤۰، نسبت مولی CLA به ال-منتول ۱ به ۱/۷ و pH ۷/۷. تحت این شرایط بهینه، کمترین مقدار باقیمانده از ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد واکنش (٦/۷٪) پس از استریفیکاسیون مشاهده شد. این فرایند کارامد برای جداسازی ایزومرهای CLA با استفاده از ال- منتول، قابل اجرا برای تهیه مکمل‌های غذایی است.

واژگان کلیدی: *کاندیدا رگوزا*، اسید لینولئیک مزدوج، ال- منتول، استریفیکاسیون

مقدمه

اسید لینولئیک مزدوج (CLA) مخلوطی از ایزومرهای مختلف اسید لینولئیک می‌باشد که در این بین، دو ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس و ۱۰- ترانس، ۱۲- سیس امروزه توجه بیشتری را به خود معطوف کرده‌اند. مخلوط ایزومرها خصوصیات فیزیولوژیکی متفاوتی از خود نشان داده‌اند که از آن جمله می‌توان به کاهش بروز سرطان، کاهش میزان چربی بدن، جلوگیری از تصلب شرایین و بهبود عملکرد سیستم ایمنی بدن اشاره کرد. در سال‌های اخیر مشخص شده است که ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس دارای فعالیت ضد سرطانی بوده و ایزومر ۱۰- ترانس، ۱۲- سیس در کاهش چربی بدن و افزایش مصرف انرژی شرکت دارد (ها و همکاران ۱۹۹۰؛ سوگانو و همکاران ۱۹۹۸؛ رحمان

و همکاران ۲۰۰۱). این مطالعات اهمیت جداسازی دو ایزومر CLA را به منظور بررسی بهتر و دقیق‌تر خصوصیات فیزیولوژیک آنها مشخص می‌کند که در این زمینه استفاده از روش‌های آنزیمی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. آنزیم‌ها از نظر نوع سوبسترا به طور اختصاصی عمل کرده و به دلیل تفاوت در میزان استریفیکاسیون یا هیدرولیز آنزیمی، امکان جداسازی ایزومرها فراهم می‌شود (هاس و همکاران ۱۹۹۹؛ ناگائو و همکاران ۲۰۰۲؛ یاماچی و همکاران ۲۰۰۳).

در مطالعات اخیر گزارش شده است که لیپازهای *ژئوتریکوم کاندیدم* و *کاندیدا رگوزا* قادر به تشخیص ایزومر ۹- سیس ،۱۱- ترانس بوده و با استفاده از این دو آنزیم می‌توان این دو ایزومر را به طور موثر از یکدیگر جداسازی کرد (یاماچی و همکاران ۲۰۰۳). البته استفاده از لیپاز *ژئوتریکوم کاندیدم* همراه با برخی از مشکلات از جمله راندمان و خلوص پایین هر دو ایزومر بوده و به علاوه این آنزیم نمی‌تواند در تولید محصولات غذایی مورد استفاده قرار گیرد. استریفیکاسیون انتخابی ایزومرهای CLA توسط *کاندیدا رگوزا* و با استفاده از لوریل الکل در مطالعات مورد بررسی قرار گرفته است (ناگائو و همکاران ۲۰۰۲) ولی لوریل الکل اجازه مصرف برای تولید ترکیبات غذایی را ندارد. گزارشاتی در ارتباط بااستفاده از آنزیم *کاندیدا رگوزا* و هیدرولیز انتخابی آسیل‌گلیسرول‌هایی که حاوی دو ایزومر اصلی CLA بوده‌اند نیز وجود دارد که البته خلوص ایزومرهای جداسازی شده با این روش چندان قابل توجه نبوده است (یاماچی و همکاران ۲۰۰۳).

ال- منتول ترکیبی در اسانس نعنا می‌باشد که به طور صنعتی و با روش‌های شیمیایی نیز تولید می‌شود. ال- منتول به عنوان ترکیب قابل دسترس برای تولید مواد غذایی بوده و می‌تواند جایگزین لوریل الکل شود. به علاوه مشخص شده است که آنزیم *کاندیدا رگوزا* استریفیکاسیون اسیدهای چرب آزاد با ال- منتول را موثرتر از سایر لیپازها انجام می‌دهد (شیمادا و همکاران ۱۹۹۹؛ کوبایاشی و همکاران ۲۰۰۳ و ۲۰۰۶).

با توجه به اطلاعات موجود، هیچ گزارش جامع و کاملی در ارتباط با مطالعه همه جنبه‌های این واکنش و تاثیر عوامل موثر بر آن مشاهده نشده است. بنابراین در این تحقیق بهینه‌سازی شرایط واکنش از نظر دما، زمان، مقدار منتول، pH و مقدار آنزیم برای استریفیکاسیون انتخابی ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس اسید لینولئیک مزدوج با منتول توسط آنزیم *کاندیدا رگوزا* مورد بررسی قرار گرفته است تا به این ترتیب شرایط بهینه برای بیشترین خالص‌سازی این ایزومر از سایر ایزومرهای موجود در روغن CLA تجاری صورت پذیرد.

مواد و روش‌ها

روغن CLA حاوی ۳۷/۴۸٪ ایزومر ۹- سیس ،۱۱- ترانس و ۳۶/۸۹٪ ایزومر ۱۰- ترانس ،۱۲- سیس از شرکت Lipid nutrition (هلند) تهیه شد. لیپاز *کاندیدا رگوزا* (لیپاز AY30) از شرکت Acros خریداری شد. آنزیم با غلظت‌های مختلف از ۲ تا ۲۰ واحد فعالیت آنزیم (U) در میلی لیتر بافر فسفات تهیه شده و ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول آنزیمی به مخلوط واکنش اضافه شد. ال- منتول با خلوص ۹۹٪ و استاندارد اسید چربCLA از شرکت سیگما خریداری شدند.

هیدرولیز روغن CLA و تبدیل آن به اسید چرب آزاد

یک لیتر محلول پتاس الکی با غلظت یک نرمال در اتانول ۹۰٪ به داخل بالن حاوی ۱۰۰ گرم روغن CLA اضافه شد. بعد از خروج هوا از داخل بالن از طریق برقراری جریان گاز ازت، درب بالن محکم بسته شده و به مدت یک ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حرارت‌دهی شد. پس از افزودن آب مقطر، ترکیبات غیرقابل صابونی از طریق استخراج با هگزان خارج شده و اسید کلریدریک ٦ نرمال به فاز آبی افزوده شد. اسید چرب

آزاد تولید شده در محیط واکنش با هگزان استخراج شده و پس از عبور از سولفات سدیم، هگزان تحت خلا و در دمای ٤٠ درجه سانتیگراد جداسازی شد.

واکنش استریفیکاسیون

واکنش استریفیکاسیون در مقیاس کوچک و در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری تحت گاز ازت و در دور ثابت ۱۸۰ rpm انجام شد. محیط واکنش شامل اسید چرب آزاد CLA، منتول و محلول آنزیمی بود. دما و مدت زمان واکنش، pH، نسبت مولی اسید چرب به منتول و مقدار آنزیم مطابق با تیمارهای RSM انتخاب شدند.

جداسازی ال-منتیل استر و اسید چرب آزاد از مخلوط واکنش

جداسازی ال-منتیل استر و اسید چرب آزاد از مخلوط واکنش مطابق با روش یانگ و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت. پس از افزودن ۷۰ میلی لیتر پتاس ۰/۵ نرمال (در اتانول ۲۰٪) به حدود ۱۰ گرم از مخلوط واکنش، ال-منتیل استر دو مرتبه با ۲۰۰ میلی لیتر هگزان استخراج شد. اسید چرب باقیمانده در فاز آبی پس از اسیدی کردن این فاز با اسید کلریدریک یک نرمال تا pH حدود ۲ و سپس استخراج با هگزان جداسازی شد. هگزان تحت خلا جداسازی شده و میزان باقیمانده ایزومر ۹-سیس،۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد پس از استریفیکاسیون مورد ارزیابی قرار گرفت که در واقع شاخصی از میزان استریفیکاسیون این ایزومر با ال-منتول خواهد بود.

تعیین ایزومرهای CLA در محیط واکنش با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی

متیل استر اسیدهای چرب با استفاده از روش گلی و همکاران (۲۰۰۹) و با استفاده از BF_3 متانولی تهیه شد. آنالیز متیل استر اسیدهای چرب با دستگاه کروماتوگرافی گازی مدلAgilent 6890N مجهز به آشکارساز FID و ستون HP-88 (طول ۱۰۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت فیلم ۰/۲۰ میکرومتر) انجام شد. برنامه حرارتی به این صورت بود: ۱۷۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و سپس دما تا ۲٤٠ با سرعت ۲/۵ درجه سانتیگراد در دقیقه افزایش داده شده و به مدت ۵ دقیقه در این دما باقی ماند. دمای تزریق ۲۵۰ و دمای آشکارساز ۲٦٠ درجه سانتیگراد بود. نیتروژن با خلوص بالا به عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱- متغیرها و سطوح به کار رفته برای هر کدام به منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش

متغیرها	علامت	سطوح مورد استفاده		
مقدار آنزیم (U/ml فسفات بافر)	X_1	۲	۱۱	۲۰
زمان (ساعت)	X_2	۸	۱٦	۲٤
دما (سانتیگراد)	X_3	۳۰	٤٠	۵۰
منتول (گرم)	X_4	۱/۳۹	۳/٤۷	۵/۵٦
pH	X_5	٦	۷	۸

طراحی آزمایش

در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط واکنش برای جداسازی ایزومر ۹- سیس ،۱۱- ترانس از ایزومر ۱۰- ترانس ،۱۲- سیس، ۵ فاکتور در سه سطح با استفاده از طرح RSM مورد بررسی قرار گرفته و ۳۱ تیمار انجام شد. متغیرهای مورد استفاده و سطوح هر کدام در جدول۱ قابل مشاهده است پارامترها به طور همزمان بهینه شده و برای این منظور از طرح دی- اپتیمال

استفاده شد. پس از انجام تیمارها، آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار Design Expert (7.1.6) صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از آنالیز داده‌ها توسط نرم افزار، آنالیز آماری مدل‌ها به صورت جدول ارائه می‌شود که در جدول ۲ قابل مشاهده است. قبل از استفاده از یک مدل، مناسب بودن یا دقت آن بایستی مورد آزمون قرار گیرد. از جمله روش‌های بررسی اعتبار مدل، آزمون F و همچنین استفاده از ضریب همبستگی یا ضریب تبیین (R^2) است. آنالیز واریانس نشان داد که مدل درجه دوم با p-value بسیار کوچک (<۰/۰۰۱) و مقادیر بالای ضریب همبستگی (R^2=۰/۹۸۳۱)، R^2 تعدیل شده و R^2 پیش‌بینی شده، از لحاظ آماری به طور معنی‌دار با داده-ها منطبق بوده و از اعتبار قابل قبولی برخوردار است. بنابراین مدل مربوط به تولید ال- منتیل استر در سطح احتمال ۹۵ درصد تعیین شد که در معادله [۱] آورده شده است.

$$Y = 47.77149 - 0.28786X_1 - 2.45894X_2 - 2.71032X_3 - 2.17112X_4 + 19.13278X_5 + 5.82514E-004X_1^{\,2} + 2.39060E-003X_1X_2 + 1.43413E-003X_1X_3 + 0.016126X_2X_3 + 0.13197X_3X_5 \quad [۱]$$

بررسی اثر پارامترها و برهمکنش آنها بر میزان تولید ال- منتیل استر

تاثیر میزان آنزیم

مطابق با معادله [۱] و جدول ۳ مقدار آنزیم تاثیر منفی و معنی‌داری بر استریفیکاسیون ایزومر ۹-سیس، ۱۱- ترانس با ال- منتول داشته و دارای اثر متقابل با مدت زمان و دمای واکنش است. شکل ۱ (الف) تاثیر میزان آنزیم و مدت زمان واکنش و اثر متقابل این دو فاکتور بر تولید ال- منتیل استر را در دمای ٤٠ درجه سانتیگراد، مقدار ۳/٤۷ گرم منتول و pH ۷ نشان می‌دهد. مقادیر بسیار زیاد و یا کم از آنزیم تاثیر منفی بر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس دارد. با افزایش میزان آنزیم تا ۱۳۵U، میزان ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد در محیط واکنش کاهش می‌یابد (حدود ۸٪) و سپس با افزایش بیشتر در میزان آنزیم، مقدار این ایزومر مجدداً روند صعودی می‌یابد که نشان دهنده استریفیکاسیون کمتر این ایزومر با ال- منتول در محیط واکنش است.

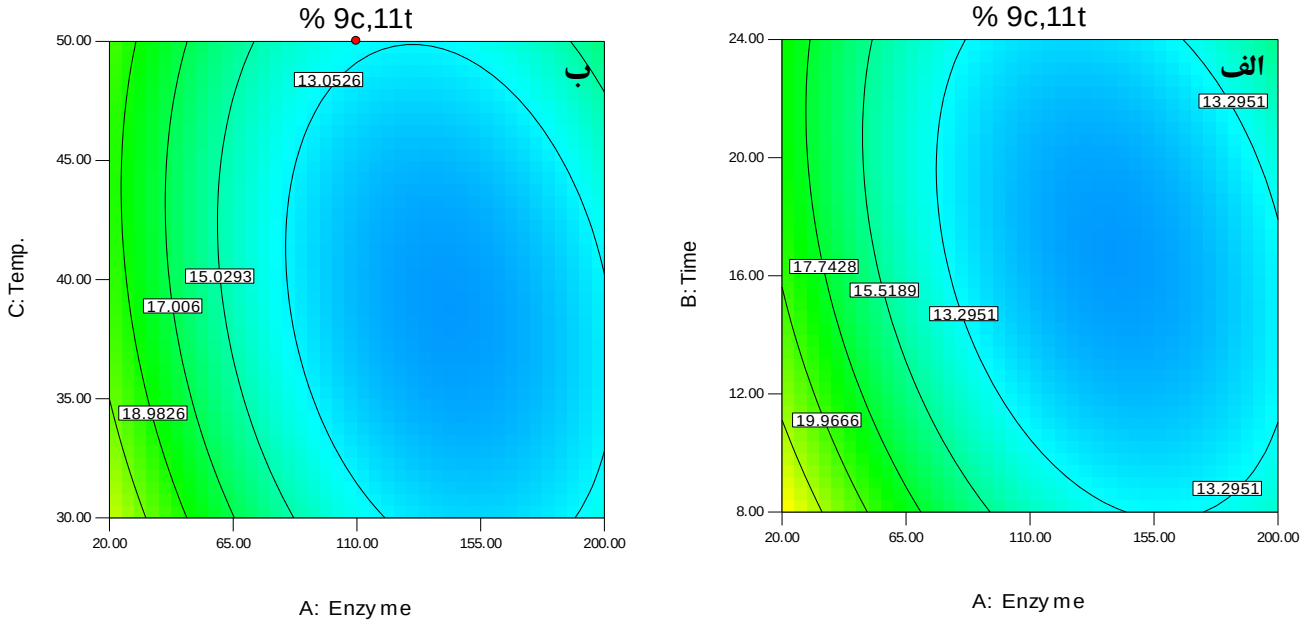
با یک روند مشابه، با افزایش در مدت زمان واکنش، ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد در ابتدا کاهش یافته (که نشان‌دهنده استریفیکاسیون این ایزومر با منتول می‌باشد) و سپس با یک شیب ملایم مجدداً افزایش می‌یابد. این افزایش در حضور مقادیر بیشتر آنزیم (بیش از ۱۳۵U) و نیز زمان طولانی‌تر (۲٤ ساعت) مشهودتر می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که با افزایش آنزیم تا مقدار مشخص (۱۳۵U) میزان استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس با ال- منتول نیز افزایش می‌یابد و بنابراین مقدار این ایزومر در بخش اسید چرب آزاد در محیط واکنش رو به کاهش می‌گذارد. از طرف دیگر افزایش غلظت آنزیم همراه با افزایش در مدت زمان واکنش منجر به افزایش درجه استریفیکاسیون شده و همچنین به دلیل طولانی شدن مدت زمان واکنش، آنزیم فرصت لازم برای عمل کردن بر روی ایزومر ۱۰- ترانس، ۱۲- سیس را علاوه بر ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس خواهد داشت. بنابراین به دلیل رقابت ایجاد شده بین ایزومرها، میزان استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس کاهش یافته و به دنبال آن مقدار این ایزومر در بخش اسید چرب آزاد افزایش می‌یابد. بنابراین با کنترل

شرایط واکنش و بهینه‌سازی پارامترها می‌توان این دو ایزومر را به طور موثر از یکدیگر جداسازی کرد.

تاثیر مقدار آنزیم و دمای واکنش بر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس در pH ۷، ۳/٤۷ گرم منتول و مدت زمان واکنش ١٦ ساعت در شکل ۱ (ب) قابل مشاهده است. مطابق با جدول ۳ دمای واکنش تاثیر معنی‌داری بر استریفیکاسیون ایزومر ۹- ،سیس، ۱۱- ترانس ندارد که می‌تواند به دلیل نزدیک بودن درجه حرارت‌های مورد استفاده به دامنه حرارتی مناسب برای فعالیت آنزیم باشد. با این حال اثر متقابل دمای واکنش با میزان آنزیم از لحاظ آماری تاثیر معنی‌داری بر استریفیکاسیون این ایزومر با ال- منتول دارد. مطابق با شکل ۱ (ب) در هر دمایی در دامنه حرارتی به کار رفته با افزایش در مقدار آنزیم درجه استریفیکاسیون افزایش می‌یابد. انجام واکنش در یک درجه حرارت متوسط (۳۵ تا ٤۰ درجه سانتیگراد) و مقدار آنزیم ۱۳۰-۱٤۰U منجر به حداکثر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس با ال- منتول می‌شود. افزایش در دمای واکنش تا ۵۰ درجه سانتیگراد همراه با افزایش در مقدار آنزیم تا ۲۲۰U منجر به کاهش استریفیکاسیون شده که می‌تواند به دلیل دور شدن از دماهای مناسب‌تر برای فعالیت آنزیم یا استریفیکاسیون سایر ایزومرها به خصوص ایزومر ۱۰- ترانس، ۱۲- سیس باشد.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس ضرایب برآورد شده مدل پیشنهادی

	ضرایب	Prob>F
مدل	-	<۰/۰۰۰۱
β_0	۱۱/۷۰	-
β_1 (آنزیم)	-۳/٤۰	<۰/۰۰۰۱
β_2 (زمان)	-۱/۰۲	۰/۰۱۹۰
β_4 (منتول)	-٤/٦٥	<۰/۰۰۰۱
β_1^2	٤/۷۲	۰/۰۰۱۰
β_{12}	۱/۷۲	۰/۰۰۲۱
β_{13}	۱/۲۹	۰/۰۰٦۱
β_{23}	۱/۲۹	۰/۰۰٥٦
β_{35}	۱/۳۲	۰/۰۰٥٥



شکل ۱- (الف) کانتور دو بعدی تاثیر میزان آنزیم و مدت زمان واکنش و (ب) کانتور دو بعدی تاثیر میزان آنزیم و دمای واکنش و اثر متقابل آنها بر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس

تاثیر مدت زمان واکنش

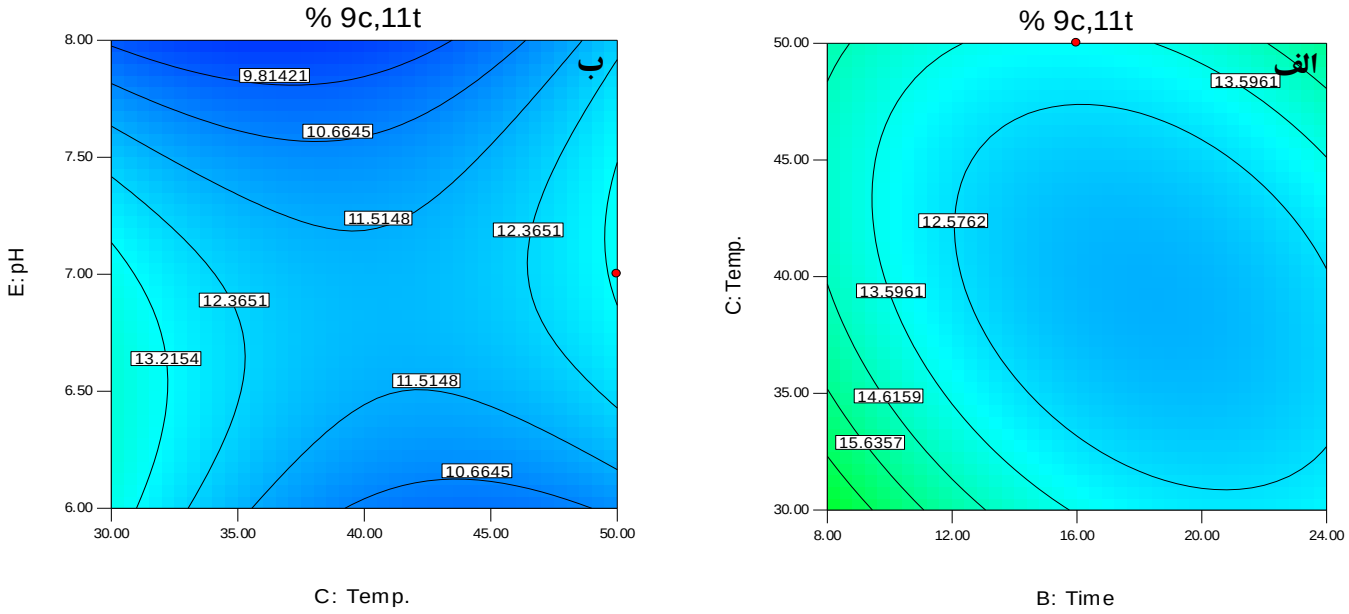
زمان واکنش تاثیر خطی منفی بر استریفیکاسیون ایزومر ۹-سیس،۱۱-ترانس داشته و با دمای واکنش اثر متقابل معنی‌دار دارد. در شکل ۲ (الف) می‌توان مشاهده کرد که با افزایش در زمان واکنش مقدار ایزومر ۹-سیس،۱۱-ترانس در بخش اسید چرب آزاد کاهش یافته ولی یک افزایش جزئی در انتهای نمودار مشاهده می‌شود که می تواند به دلیل استریفیکاسیون ایزومر ۱۰-ترانس،۱۲-سیس با ال- منتول یا به دلیل هیدرولیز منتیل استر تولید شده باشد.

در درجه حرارتهای پایین، با افزایش در مدت زمان واکنش میزان کاهش ایزومر ۹-سیس،۱۱-ترانس در محیط واکنش مشهودتر (حدود ۵٪) از درجه حرارت‌های بالا است (۵۰ درجه سانتیگراد). این نتایج نشان می دهد که ترکیب درجه حرارت‌های بالاتر و مدت زمانهای طولانی‌تر ممکن است منجر به کاهش راندمان جداسازی آنزیمی ایزومرهای ۹-سیس،۱۱-ترانس و ۱۰-ترانس،۱۲-سیس شود. لی و همکاران (۲۰۱۰) نیز روند مشابهی را در تحقیقات خود مشاهده کردند که دلیل آن را طولانی بودن مدت زمان واکنش و هیدرولیز مجدد محصول تولیدی در محیط واکنش گزارش کردند. کوباياشی و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان دادند که ۴۰ ساعت واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد برای جداسازی موثر دو ایزومر CLA مناسب است.

تاثیر درجه حرارت واکنش

همانگونه که در معادله [۱] می‌توان مشاهده کرد دمای واکنش تاثیر معنی‌داری بر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس ندارد که می‌تواند به دلیل نزدیک بودن تقریبی دامنه دمایی به کار رفته با محدوده دمایی مناسب برای فعالیت آنزیم *کاندیدا رگوزا* باشد. با این حال دمای واکنش با pHهای به کار رفته در واکنش دارای اثر متقابل معنی‌دار است. در شکل ۲ (ب) مشخص است که ترکیب تاثیر دما و pH بر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس در pHهای بالاتر (حدود ۸) و درجه حرارت‌های پایین‌تر (۴۰-۳۵ درجه سانتیگراد) مشخص‌تر است. علی‌رغم اینکه درجه حرارت تاثیر معنی‌داری در این تحقیق نشان نداده است ولی مطابق با شکل ۲ با افزایش دما مقدار

ایزومر ۹- سیس،۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد واکنش در ابتدا شروع به کاهش گذاشته و سپس یک افزایش جزئی مشاهده می‌شود که ممکن است به دلیل دورتر شدن از دماهایی باشد که برای فعالیت آنزیم مناسب‌تر است. بابالی و همکاران (۲۰۰۱) و کامیا و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که درجه حرارت مناسب برای فعالیت آنزیم *کاندیدا رگوزا* حدود ۳۵ درجه سانتیگراد است در حالیکه وانگ و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتیگراد منجر به از بین رفتن آنزیم و کاهش استریفیکاسیون CLA با اتانول می‌شود.

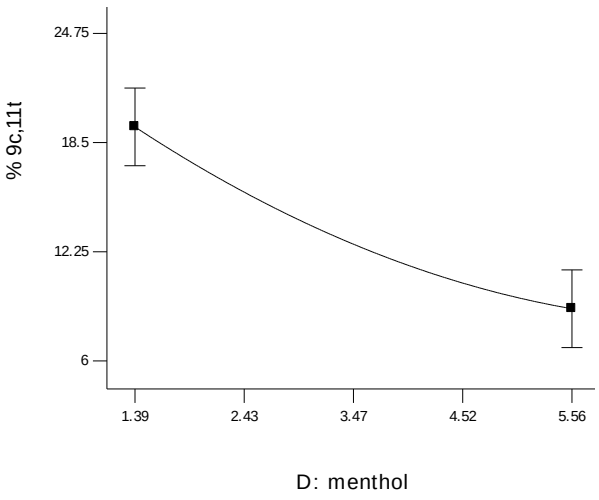


شکل ۲- (الف) کانتور دو بعدی تاثیر درجه حرارت و مدت زمان واکنش و (ب) کانتور دو بعدی تاثیر درجه حرارت و pH و اثر متقابل آنها بر استریفیکاسیون ایزومر ۹-سیس، ۱۱-ترانس

تاثیر نسبت مولی روغن CLA به ال- منتول

طبق معادله [۱] مقدار منتول تاثیر خطی منفی بر ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس داشته و اثر متقابل معنی‌داری با سایر پارامترها ندارد. برای بررسی تاثیر نسبت مولی سوبستراها بر استریفیکاسیون ایزومر ۹-سیس، ۱۱- ترانس، سایر متغیرها شامل زمان و دمای واکنش، مقدار آنزیم و pH ثابت نگه داشته شدند. نسبت مولی سوبستراها در محیط واکنش یکی از پارامترهای بسیار مهم است و در این تحقیق از نسبت مولی ۲ به ۱ تا ۱ به ۲ از CLA به ال- منتول استفاده شد (به ترتیب ۱/۳۹، ۳/٤۷ و ٥/٥٦ گرم منتول). مطابق شکل ۳ با افزایش در مقدار منتول از ۱/۳۹ تا ٥/٥٦ مقدار ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد حدود ۱۰٪ کاهش یافت که به دلیل وجود مقادیر زیاد منتول در محیط واکنش و افزایش شانس واکنش CLA با آن باید دانست. به هر حال جنبه‌های اقتصادی و هزینه‌های خالص‌سازی محصول نهایی را نباید در این زمینه از نظر دور داشت. شی و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که نسبت مولی ال- منتول به بوتیریک انهیدرید تاثیر معنی‌داری بر سنتز ال- منتیل بوتیرات در واکنش آنزیمی با استفاده از لیپاز AY-30 ندارد. وانگ و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند با افزایش در مقدار اتانول، میزان استریفیکاسیون افزایش می‌یابد ولی به

دلیل سمیت اتانول برای آنزیم، با افزودن مقادیر زیادی از اتانول در محیط واکنش، آنزیم از بین می‌رود.



شکل ۳- تاثیر مقدار منتول (گرم) بر استریفیکاسیون ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس

بهینه‌سازی شرایط واکنش

پس از تعیین مدل، برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که با اعمال آنها کمترین مقدار ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد واکنش باقی خواهد ماند، بهینه‌سازی شرایط واکنش با استفاده از نرم افزار انجام شد. برای تأیید صحت شرایط تعیین شده می‌بایست آزمایشی تحت این شرایط انجام داده و نتایج آن را با نتایج پیش‌بینی شده توسط نرم افزار مقایسه کرد. چنان چه اختلاف معنی‌داری بین نتایج واقعی و پیش‌بینی شده وجود نداشته باشد، مدل توصیفی تأیید شده و قابل استفاده برای دیگر شرایط مورد نظر می‌باشد. سطوح بهینه پیش‌بینی شده برای متغیرها توسط نرم افزار به این صورت بود: مدت زمان واکنش ۲۳/۱۲ ساعت، دمای واکنش ۳۲/٦٥ درجه سانتیگراد، مقدار آنزیم۱۳٥/٤٠U، pH ۷/۷ و نسبت مولی۱ به ۱/۷ از CLA به ال- منتول. تحت این شرایط مقدار پیش‌بینی شده برای ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس در بخش اسید چرب آزاد در محیط واکنش برابر با ۷/٥۷٪ بوده و مقدار به دست آمده پس از آزمایش کردن نقطه بهینه در شرایط عملی برابر با ٦/۷۰٪ بود. نتایج نشان داد که مقدار واقعی و مقدار پیش بینی شده برای باقیمانده ایزومر ۹- سیس، ۱۱- ترانس در نقطه بهینه به طور معنی‌داری به هم نزدیک بوده و بنابراین مدل از دقت کافی برای پیش‌بینی نقطه بهینه برخوردار است.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق با استفاده از طرح RSM بهینه‌سازی متغیرهای دخیل در سنتز آنزیمی ال- منتیل استر به منظور جداسازی دو ایزومر اصلی CLA در یک سیستم بدون حلال مورد بررسی قرار گرفت. زمانی که یک ترکیب به منظور استفاده در صنعت غذا تولید می‌شود استفاده از یک سیستم بدون حلال می‌تواند بسیار با ارزش باشد زیرا استفاده از حلال‌های آلی در کاربردهای غذایی بسیار محدود شده است. با وجودی که جداسازی آنزیمی ایزومرهای CLA توسط تعدادی از محققین گزارش شده است ولی مطالعه‌ای که در آن به تفصیل عوامل موثر در این واکنش مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شده باشند دیده نشده است. تحت شرایط بهینه در این تحقیق مقادیر به دست آمده تجربی در توافق با مقادیر پیش‌بینی شده توسط نرم افزار می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که جداسازی انتخابی ایزومرهای CLA با روش آنزیمی پتانسیل تولید ایزومرهای ۹- سیس،۱۱- ترانس و ۱۰- ترانس، ۱۲- سیس را دارا می‌باشند که می‌توانند به عنوان مکمل‌های تغذیه‌ای مورد استفاده قرار بگیرند.

منابع مورد استفاده

Babali BH, Aksoy A, Tüter M and Ustun G, 2001. Enzymatic esterification of (L)-menthol with fatty acids in solvent by a commercial lipase from *Candida rugosa*. Journal of American Oil Chemists Society 78(1): 53-56.

Goli SAH, Miskandar MS, Kadivar M and Keramat J, 2009. The Production of an experimental table margarine enriched with conjugated linoleic acid (CLA): physical properties. Journal of American Oil Chemists Society 110: 1102-1108.

Ha YL, Storkson J and Pariza MW, 1990. Inhibition of benzo[a] pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. Cancer Research 50: 1097-1101.

Haas MJ, Kramer JKG, McNeill G, Scott K, Foglia TA, Sehat N, Fritsche J, Mossoba MM and Yurawecz MP,1999. Lipase- catalyzed fractionation of conjugated linoleic acid isomers. Lipids 34: 979–987.

Kamiya N and Goto M, 1997. How is enzymatic selectivity of menthol esterification catalyzed by surfactant-coated lipase determined in organic media? Ibid 13: 488–492.

Kobayashi T, Nagao T, Kawashima A, Watanabe Y and Shimada Y, 2003. Synthesis of polyunsaturated fatty acid l-menthyl esters through lipase-catalyzed esterification in an organic solvent-free system. Journal of Oleo Science 53: 309–312.

Kobayashi T, Nagao T, Watanabe Y, Yamauchi Y, Negishi S and Shimada Y, 2006. Enrichment of CLA isomers by selective esterification with l-menthol using *Candida rugosa* lipase. Journal of American Oil Chemists Society 83: 93-99.

Li Z, Wang Y, Li J, Wang P, Wei W, Gao Y, Fu C and Dong W, 2010. Dual response surface-optimized synthesis of l-menthyl conjugated linoleate in solvent-free system by *candida rugosa* lipase. Bioresource Technology 101: 1305–1309.

Nagao T, Shimada Y, Yamauchi-Sato Y, Yamamoto T, Kasai M, Tsutsumi K, Sugihara A and Tominaga Y, 2002. Fractionationand enrichment of CLA isomers by selective esterification with *Candida rugosa* lipase. Ibid 79: 303–308.

Rahman SM, Wang YM, Han SY, Cha JY, Fukuda N, Yotsumoto H and Yanagita T, 2001. Effects of short-term administration of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in white and brown adipose tissues of starved/refed Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. Food Research International 34: 515-520.

Shih IL, Hung SH, Chen FY, Ju HY and Shieh CJ, 2007. Optimized synthesis of lipase-catalyzed l-menthyl butyrate by *Candia rugosa* lipase. Food Chemistry 100: 1223–1228.

Shimada Y, Hirota Y, Baba T, Kato S, Sugihara A, Moriyama S, Tominaga Y and Terai T, 1999. Enzymatic synthesis of menthyl esters in organic solvent-free system. Journal of American Oil Chemists Society 76: 1139–1142.

Sugano M, Tsujita A, Yamasaki M, Noguchi M and Yamada K, 1998. Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats. Lipids 33: 521- 527.

Wang Y, Li X, Liang Y, Yang B and Zhang S, 2007.Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 46: 20–25.

Purification of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification with *Candida rugosa* lipase

M Jafari[1*], M Kadivar[2] and SAH Goli[2]

Received: October 09, 2013 Accepted: July 16, 2014
[1]PhD Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[2]Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[*]Corresponding author: E mail: mjafari@ag.iut.ac.ir

Abstract
Ability of *Candida rugosa* for separation of two main conjugated linoleic acid (CLA) isomers including *9-cis,11-trans* and *10-trans,12-cis* was investigated in the mixture of free fatty acids of these isomers and L-menthol. In order to effectively separate two mentioned isomers, optimization of reaction conditions was conducted using response surface methodology (RSM). After data analysis by D-optimal design, the best reaction conditions for maximum esterification of *9-cis,11-trans* isomer with L-menthol after just one step esterification were as follows: reaction time 23.1 h, temperature 32.6°C, enzyme amount 135.4U, molar ratio of CLA oil to L-menthol at 1:1.7 and pH at 7.7. At this optimum point, the lowest amount of *c9, t11*-CLA isomer (6.7%) was observed in free fatty acids fraction. This effective process for purification of CLA isomers using L-menthol could be applicable to produce food supplements.

Key words: *Candida rugosa*, Conjugated linoleic acid, L-menthol, Esterification