

بهینه‌سازی اینتراستریفیکاسیون آنزیمی چربی کوهان شتر تحت شرایط دی‌اکسیدکربن فوق‌بحرانی به منظور تهیه شبه کره کاکائو

هاجر شکرچی زاده (دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان)

h.shekarchizadeh@ag.iut.ac.ir

دکتر مهدی کدیور

kadivar@cc.iut.ac.ir

چکیده

استریفیکاسیون آنزیمی چربی کوهان شتر و تری استئارین در حضور آنزیم لیپوزیم TL IM در محیط دی‌اکسید کربن فوق‌بحرانی انجام شد. پنج متغیر فشار، دما، مدت زمان، درصد آب و نسبت چربی کوهان شتر به تری استئارین مورد استفاده در سه سطح مختلف مورد بررسی قرار گرفتند تا بهترین شرایط برای تهیه شبه کره کاکائو مشخص شود. نتایج به دست آمده از واکنش‌هایی که در شرایط مختلف متغیرها انجام شده و سپس با روش پاسخ سطح RSM بهینه‌سازی شد. نتایج نشان می‌دهد که همه متغیرهای مورد بررسی بر میزان تری‌گلیسریدهای اصلی تشکیل دهنده شبه کره کاکائو یعنی POP، POS و SOS و در نتیجه راندمان آن مؤثر می‌باشند، بطوری که فشار ۱۰ مگاپاسکال، دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان واکنش ۲/۵ ساعت، میزان آب ۱۰ درصد وزن سوبسترا و نسبت ۱ به ۱/۱۶ چربی کوهان شتر به تری استئارین، بهترین سطوح متغیرهای مورد بررسی برای تهیه بهینه شبه کره کاکائو می‌باشند.

کلمات کلیدی

اینتر استریفیکاسیون آنزیمی، دی‌اکسید کربن فوق‌بحرانی، چربی کوهان شتر، شبه کره کاکائو، RSM

۱. مقدمه

اصطلاح اینتراستریفیکاسیون اغلب برای توصیف واکنشهایی استفاده می‌شود که شامل جابه‌جایی گروه‌های آسپیل بین یک استر و یک اسید(اسیدولیز) ، یک استر و یک الکل(آلکولیز) و یا یک استر با استر دیگر (ترانس‌استریفیکاسیون یا تغییر استری) می‌باشد. ترانس‌استریفیکاسیون منجر به برهم خوردن ترتیب اسیدهای چرب در یک مولکول تری‌گلیسرید می‌شود که اینترا استریفیکاسیون یا استریفیکاسیون درون مولکولی گفته می‌شود و یا سبب جابه‌جایی اسیدهای چرب بین تری‌گلیسریدها تا رسیدن به تعادلی که همه ترکیبات ممکن تشکیل شده باشند می‌شود که معنای خاص اینتراستریفیکاسیون می‌باشد [۱۱]. بر اساس نوع کاتالیزور مصرفی، فرآیند اینتراستریفیکاسیون به دو نوع شیمیایی و آنزیمی تقسیم بندی می‌شود. در اینتراستریفیکاسیون شیمیایی می‌توان از اسیدها، بازها یا نمک‌های آنها و فلزات در حدود ۰/۱ درصد وزنی روغن، به عنوان کاتالیزور استفاده کرد. چنانچه از آنزیم به عنوان کاتالیزور در واکنش اینتراستریفیکاسیون استفاده شود به آن اینتراستریفیکاسیون آنزیمی گویند. اینتراستریفیکاسیون آنزیمی در مقایسه با شیمیایی چندین مزیت دارد که شرایط ملایم واکنش و در نتیجه مصرف کمتر انرژی و آسیب کمتر به محصولات و مواد اولیه، امکان عملکرد اختصاصی آنزیم و همچنین راندمان کاتالیزوری بالاتر از جمله این مزیت‌ها می‌باشد. [۱۰].

کره کاکائو به میزان ۲۵-۳۶ درصد در شکلات‌ها وجود دارد و عامل اصلی تشکیل بافت، ایجاد عطر و طعم و ظاهر خاص در شکلات‌ها است. تری‌گلیسریدهای متقارن POP، POS و SOS ، حدود ۸۰ درصد تری‌گلیسریدهای کره کاکائو را تشکیل داده و. به همین دلیل کره کاکائو دارای دامنه ذوب کوتاهی است به طوریکه در 32°C - 30°C نرم و در 35°C - 32°C ذوب می‌شود. قیمت متفاوت کره کاکائو و عدم ثبات در تأمین به موقع آن ، صنعت قنادی را وادار به پیدا کردن جایگزین‌هایی برای کره کاکائو کرده است که می‌تواند به تثبیت قیمت کره کاکائو نیز منجر گردد [۱۵].

هر ماده‌ای، گاز یا مایع، که در فشاری بالاتر از فشار بحرانی (Pc) و در دمایی بالاتر از دمای بحرانی (Tc) قرار گیرد، سیال فوق بحرانی نامیده می‌شود. وقتی نقطه بحرانی به دست آید، تمایز بین فازهای مایع و گاز کم می‌شود به طوری که خواصشان در نقطه بحرانی مشابه می‌شود. بالاتر از فشار و دمای بحرانی افزایش فشار باعث افزایش چگالی سیال فوق بحرانی می‌شود ولی هرگز دو فازی شدن (فاز گاز و فاز مایع) در سیال فوق بحرانی به وجود نمی‌آید [۱۴]. دی اکسید کربن فوق بحرانی (SC-CO₂) به علت داشتن دمای بحرانی کم ۳۱/۱ درجه سانتی‌گراد و فشار بحرانی ۷۳/۸ بار، سازگاری با محیط زیست و نیز باقی نماندن حلال در محصول نهایی به عنوان یک سیال فوق بحرانی مهم و متداول مورد استفاده قرار می‌گیرد. سیال‌های فوق بحرانی به علت داشتن خواص فیزیکی ویژه به عنوان حلال و جایگزین حلال‌های آلی در واکنش‌های شیمیایی استفاده شده‌اند.

مشخص نمودن مقادیر مناسب متغیرهای مؤثر در آزمایش را بهینه‌سازی گویند. در صورتیکه تعداد متغیرها زیاد باشد، رویه جواب به صورت یک رابطه ریاضی بر حسب متغیرها بیان می‌شود. به عملیات یافتن یک تابع ریاضی بین متغیرها و پاسخ، مدل‌سازی گفته می‌شود. برای ساخت مدل یک رابطه فرضی بین Y و متغیرهای مستقل (x₁, x₂, ..., x_k) در نظر گرفته می‌شود [۲].

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_j X_j + \sum \beta_{jj} X_j^2 + \sum \beta_{jk} X_j X_k$$

که در آن Y پاسخ سامانه X_{ijk} متغیرهای سامانه، β_0 = ضریب رگرسیون برای ضریب ثابت، β_j = ضریب رگرسیون برای جملات خطی، β_{jj} = ضریب رگرسیون برای جملات مربع، β_{jk} = ضریب رگرسیون برای جملات برهم‌کنش است. پس از مشخص شدن مدل مناسب، مقدار پاسخ را در کلیه‌ی سطوح متغیرها بر اساس مدل انتخابی محاسبه کرده و مقدار بهینه‌ی که در آن حداکثر پاسخ به دست می‌آید مشخص می‌شود.

در این پژوهش اینتراستریفیکاسیون آنزیمی چربی کوهان شتر و تری‌استرین در محیط سیال فوق بحرانی به منظور تهیه شبه کره کاکائو انجام شد. در این بررسی متغیرهای متفاوتی در نظر گرفته شده که در نهایت با استفاده از روش آماری پاسخ سطح ، بهینه سازی و تعیین سطوح مطلوب هر متغیر انجام شده است.

۲. مواد و روش ها

به منظور بررسی و بهینه سازی واکنش اینتراستریفیکاسیون آنزیمی چربی کوهان شتر و تری استتارین تحت شرایط دی اکسید کربن فوق بحرانی به منظور تهیه شبه کره کاکائو، پنج متغیر فشار، دما، زمان، درصد آب و نسبت تری استتارین به چربی کوهان شتر، هر یک در سه سطح طبق جدول ۱ تعیین شدند. با استفاده از طراحی فاکتوریل جزئی در قالب طرح CCD، ۳۲ تیمار مختلف بر اساس سطوح متغیرهای مورد بررسی (جدول ۲) مشخص شد و سپس واکنشها بر اساس تیمارهای تعیین شده انجام شد.

جدول ۱- متغیرها و سطوح اندازه گیری

سطوح					متغیرها
+ α = ۲	+۱	۰	-۱	- α = -۲	کد
۳۱۰	۲۴۰	۱۷۰	۱۰۰	۳۰	فشار (bar)
۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	دما (°C)
۷	۵/۵	۴	۲/۵	۱	زمان (h)
۲۰	۱۵	۱۰	۵	۰	آب (%)
۱:۲	۱:۱	۱:۰/۵	۱:۰/۲۵	۱:۰/۱۲۵	نسبت تری استتارین به چربی کوهان شتر (mg به μ l)

اینتراستریفیکاسیون آنزیمی به روش غیرمداوم و با استفاده از دستگاه سیال فوق بحرانی انجام شد. برای این منظور بر اساس تیمارهای تعیین شده به وسیله طرح مکعب مرکزی، مقادیر لازم از چربی کوهان شتر، تری استتارین، آنزیم و آب در سل مخصوص دستگاه ریخته شد و پس از وارد کردن مگنت مغناطیسی به داخل سل، درب آن بسته شده و در گرمخانه آبی دستگاه قرار داده شد. پس از تنظیم دمای لازم، با باز کردن کپسول دی اکسید کربن، فشار مورد نظر تنظیم شده و با قرار دادن دور مگنت بر روی ۱۵۰ دور در دقیقه، زمان شروع واکنش تعیین شد. پس از گذشت مدت زمان لازم، سل دستگاه از گرمخانه خارج شده و سریعاً با استفاده از یخ دمای آن کاهش داده شد. برای جدا کردن چربی و آنزیم، مخلوط واکنش را در هگزان حل کرده و با عبور از صافی میلی پور ۰/۴۵ میکرون، آنزیم از چربی استری شده جدا شد. با استفاده از گاز ازت، هگزان از نمونه حذف و چربی باقی مانده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان آزمایشات بعدی نگهداری شد.

از آنجاییکه سه تری گلیسرید POP، POS و SOS سه تری گلیسرید اصلی کره کاکائو می باشند، لذا درصد این سه تری گلیسرید و پس از آن راندمان شبه کره کاکائوی حاصل به عنوان فاکتور هدف مورد بررسی قرار می گیرند. راندمان تولید شبه کره کاکائو به صورت زیر محاسبه می شود:

$$\text{راندمان} = ۱۰۰ \times \frac{\text{وزن شبه کره کاکائوی حاصل}}{\text{وزن مخلوط چربی}} \quad (۱)$$

جدول ۲- تیمارهای انتخابی مطابق طرح مکعب مرکزی

مشاهدات	فشار (bar)	دما (°C)	زمان (hr)	درصد آب	نسبت چربی ها
	X1	X2	X3	X4	X5
۱	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۰	۰	۰	۰	۰
۳	۱	-۱	۱	-۱	۱
۴	۱	۱	-۱	۱	-۱
۵	-۱	-۱	۱	-۱	-۱

۰	۰	۰	۰	-۲	۶
۰	۰	۰	-۲	۰	۷
۰	۰	۰	۰	۰	۸
۱	۱	-۱	-۱	۱	۹
۱	-۱	۱	۱	-۱	۱۰
-۱	۱	۱	۱	-۱	۱۱
-۱	-۱	۱	۱	۱	۱۲
-۲	۰	۰	۰	۰	۱۳
-۱	-۱	-۱	-۱	۱	۱۴
۱	۱	۱	-۱	-۱	۱۵
۰	۰	۰	۰	۲	۱۶
۰	-۲	۰	۰	۰	۱۷
۰	۰	۰	۰	۰	۱۸
۰	۰	۰	۰	۰	۱۹
۱	۱	۱	۱	۱	۲۰
-۱	۱	۱	-۱	۱	۲۱
۲	۰	۰	۰	۰	۲۲
۰	۰	۰	۲	۰	۲۳
۰	۰	۲	۰	۰	۲۴
۰	۲	۰	۰	۰	۲۵
۰	۰	-۲	۰	۰	۲۶
-۱	۱	-۱	-۱	-۱	۲۷
-۱	-۱	-۱	۱	-۱	۲۸
۰	۰	۰	۰	۰	۲۹
۱	-۱	-۱	-۱	-۱	۳۰
۱	-۱	-۱	۱	۱	۳۱
۱	۱	-۱	۱	-۱	۳۲

تجزیه و تحلیل نتایج واکنش آنزیمی تحت شرایط سیال فوق بحرانی، در چهار بخش تجزیه واریانس و مدل سازی فرآیند، رسم نمودارهای کانتور دو بعدی، تعیین شرایط بهینه برای حصول بهترین نمونه و در نهایت پیش بینی مقادیر متغیرهای هدف در شرایط بهینه به کمک نرم افزار آماری Minitab version 14 انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث

در جدول ۳ نتایج حاصل از اندازه گیری راندمان آورده شده است. آنچه که برای تهیه شبه کره کاکائو لازم است، دانستن اثر کلی متغیرها بر مجموعه تری گلیسریدی می باشد که مجموعه اثر متغیرها در مدل تعریفی برای راندمان وجود دارد. در نتیجه در ادامه مدل توصیفی راندمان به طور کامل بررسی می شود.

به منظور تهیه مدلی که اثر متغیرهای مورد بررسی را بر روی راندمان توصیف کند، ابتدا باید مشخص کرد هر یک از موارد تعیین شده اعم از درجه یک، درجه دو و اثر متقابل در چه سطحی معنی دار شده اند. که این مطلب با بررسی P مربوط به

هر یک (جدول ۴) مشخص می‌شود. در این بررسی مدل مربوط به فاکتور راندمان در سطح احتمال ۹۰٪ تعیین شده است.

مدل مربوط به راندمان محصول استری شده:

$$Y = 54/8787 - 26/2354 X1 - 22/5329 X12 - 16/9729 X42 - 34/1176 X1X5 - 21/2775 X3X4 + 23/8801 X4X5$$

مدل ۱

جدول ۳- راندمان واکنش آنزیمی به منظور تهیه شبه کره کاکائو جدول ۴- ضرایب برآورد شده از تجزیه واریانس

راندمان		فاکتور	شماره تیمار	درصد راندمان
P	ضریب	متغیر		
۰/۰۰۰	۵۴/۸۷۹	ثابت (β 0)		۶۲/۱۱
۰/۰۰۹	۲۶/۲۳۵-	(β 1)		۶۱/۶۲
۰/۹۰۸	۰/۹۷۵-	(β 2)		۲۶/۳۷
۰/۳۸۸	۷/۳۸۸-	(β 3)		۵۵/۸۳
۰/۱۹۱	۱۱/۴۳۳	(β 4)		۵۳/۰۲
۰/۳۵۶	۵/۲۵۲-	(β 5)		۵۶/۳۹
۰/۰۱۹	۲۲/۵۳۳-	(β 11)		۵۶/۵۲
۰/۵۰۹	۱۶/۹۷۳-	(β 22)		۶۰/۳۸
۰/۷۳۴	۲/۸۴۸-	(β 33)		۳۱/۰۸
۰/۰۶۲	۱۶/۹۷۳-	(β 44)		۳۷/۳۲
۰/۲۴۷	۸/۹۹۶	(β 55)		۳۲/۸۱
۰/۷۷۶	۳/۲۰۲	(β 12)		۲۰/۹۳
۰/۷۹۹	۲/۸۶۷	(β 13)		۵۱/۶۲
۰/۶۷۸	۴/۶۷۷-	(β 14)		۶۳/۹۵
۰/۰۲۸	۳۴/۱۱۸-	(β 15)		۳۵/۱۶
۰/۴۹۷	۷/۷۰۲	(β 23)		۳۱/۳۳
۰/۸۶۷	۱/۸۵۲-	(β 24)		۳۲/۶۸
۰/۷۷۲	۴/۰۰۹-	(β 25)		۶۰/۰۵
۰/۰۷۹	۲۱/۲۷۷-	(β 34)		۶۱/۶۳
۰/۸۱۵	۳/۲۳۶	(β 35)		۲۲/۷۸
۰/۰۹۸	۲۳/۸۸۰	(β 45)		۲۶/۲۳
				۶۲/۶۷
				۶۵/۲۰
				۵۲/۷۲
				۵۶/۲۶
				۷۳/۳۶
				۵۶/۰۲
				۵۳/۸۷
				۷۳/۲۷
				۳۷/۶۶
				۲۲/۲۳
				۶۰/۱۲

برای بررسی اثر متقابل هر دو متغیر بر روی فاکتور هدف مورد نظر، نمودارهای کانتور دو بعدی آنها رسم می‌شود. برای رسم این منحنی‌ها سه متغیر ثابت فرض شده و چگونگی تغییر همزمان دو متغیر دیگر تعیین می‌شود.

با توجه به شکل‌های ۱ و ۲- الف به خوبی افزایش راندمان با افزایش فشار مشاهده می‌شود و در فشاری حدود ۱۰ مگاپاسکال راندمان شبه کره کاکائوی حاصل به بالاترین میزان می‌رسد ولی با ادامه افزایش فشار، راندمان کاهش می‌یابد. در ارتباط با چگونگی اثر فشار بر واکنش‌ها مطالعات بسیاری صورت گرفته و نتایج نشان می‌دهند که فشار با تأثیر مستقیم و غیر مستقیم بر روی آنزیم و همچنین تأثیر بر روی حلالیت ترکیبات واکنش دهنده سبب تغییر شرایط واکنش می‌شود [۱].

فشار سبب تغییر ساختار و عملکرد آنزیم و در نتیجه فعالیت آن می‌شود. ایکوشیما و همکاران در سال ۱۹۹۵ به بررسی

اثر CO_2 بر فعالیت لیپاز پرداخته و برای این منظور ساختار دوم آنزیم در محیط $SC-CO_2$ و واکنش‌های بین آنزیم و CO_2 را مورد مطالعه قرار دادند. آنها چنین گزارش کردند که با افزایش فشار تا محدوده فشار بحرانی، ساختار پروتئینی که بر روی جایگاه فعال آنزیم قرار دارد جابه جا شده و با آشکار شدن جایگاه فعال، فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد [۵]. هارتمن و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز افزایش فعالیت آنزیم تا ۱۰۳ بار را گزارش کرده و دلیل کاهش فعالیت آنزیم در فشارهای بالاتر از آن را به تشکیل کربنات‌ها نسبت داده‌اند [۴]. با افزایش فشار دانسیته CO_2 تغییر می‌کند که منجر به واکنش بین آنزیم و CO_2 می‌شود. کربنات‌ها از واکنش بین CO_2 و گروه‌های آمینی موجود در سطح آنزیم به وجود آمده و سبب غیر فعال شدن آنزیم می‌شوند [۱]. به نظر می‌آید در کاهش ایجاد شده در راندمان شبه کره کاتئوی حاصل به واسطه افزایش فشار عامل دیگری نیز مؤثر باشد که آن کاهش نسبت توزیع سوبسترا در فاز مایع به دلیل افزایش فشار می‌باشد. از آنجا که آنزیم در $SC-CO_2$ نامحلول می‌باشد لذا آنزیم در فاز جداگانه‌ای نسبت به $SC-CO_2$ قرار دارد. با افزایش فشار حلالیت سوبسترا در $SC-CO_2$ به شدت افزایش می‌یابد و لذا میزان سوبسترای موجود در فاز آنزیمی کاهش می‌یابد که در نهایت به کاهش واکنش آنزیمی و کاهش راندمان شبه کره کاتئو منجر می‌شود [۷].

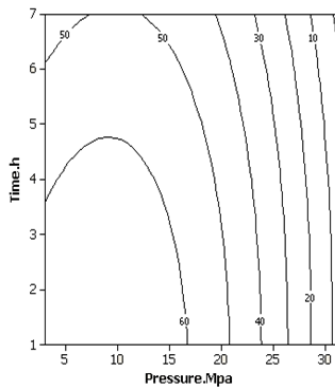
با در نظر گرفتن این عوامل چنین به نظر می‌آید که در فشار حدود ۱۰ مگاپاسکال آنزیم به خوبی فعالیت کرده و با هیدرولیز اسیدهای چرب موقعیت ۱ و ۳ تری‌گلیسریدهای POP و SSS درصد آنها در محیط کاهش یافته و در مقابل با قرار گیری اسید استئاریک آزاد شده بر روی موقعیت‌های ۱ و ۳ مونوگلیسریدهای حاصل از هیدرولیز، درصد SOS و POS در محیط بالا رفته که در نتیجه راندمان شبه کره کاتئوی حاصل افزایش می‌یابد. در مقابل با استفاده از فشارهای بالاتر با کاهش فعالیت آنزیم و کاهش چربی کوهان شتر و تری استئارین موجود در فاز آنزیمی به واسطه افزایش حلالیت آنها در $SC-CO_2$ ، راندمان کاهش می‌یابد.

در شکل‌های ۲ و ۳- الف با استفاده از نمودارهای کانتور دو بعدی، اثر دما بر راندمان و چگونگی تغییر دما به همراه تغییر دیگر متغیرها نشان داده شده است. آنچه در این اشکال قابل مشاهده است وجود راندمان مطلوب تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سپس کاهش راندمان در دماهای بالاتر می‌باشد. آنچه بدون در نظر گرفتن این نمودارها انتظار می‌رود افزایش راندمان با افزایش دما به واسطه افزایش فعالیت آنزیم می‌باشد ولی مشاهده می‌شود که در این واکنش با افزایش دما به بالاتر از $50^\circ C$ ، راندمان کاهش یافته است. از آنجایی که آنزیم مورد استفاده در این واکنش (آنزیم Lipozyme TL IM) آنزیمی تثبیت شده و مقاوم به حرارت تا دماهای $80^\circ C$ می‌باشد [۱۲]، لذا کاهش راندمان در دماهای بالاتر از $50^\circ C$ به دلیل واسرشت شدن آنزیم و تغییر ساختار سوم و لذا غیر فعال شدن آن نمی‌باشد و به احتمال زیاد کاهش راندمان در دماهای بالا به دلیل کاهش دانسیته CO_2 می‌باشد چراکه با افزایش دما دانسیته CO_2 کاهش می‌یابد. با کاهش دانسیته CO_2 ، حلالیت ترکیبات در $SC-CO_2$ کاهش می‌یابد و در نتیجه واکنش آنزیمی به خوبی انجام نشده و سبب کاهش راندمان می‌شود. برای انجام یک واکنش آنزیمی مطلوب در محیط $SC-CO_2$ باید واکنش دهنده‌ها توزیع مناسبی بین فاز آنزیمی و فاز $SC-CO_2$ داشته باشند و چنانچه به هر دلیلی نسبت توزیع واکنش دهنده‌ها در این فازها تغییر کند، واکنش به صورت بهینه انجام نخواهد شد و لذا راندمان کاهش می‌یابد [۱۳].

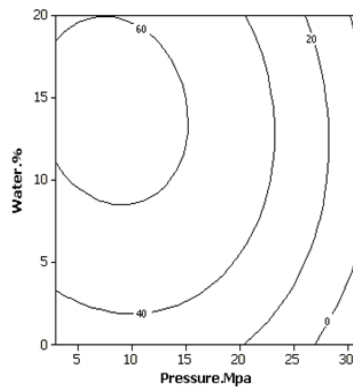
برای بررسی اثر زمان واکنش بر راندمان و نحوه تغییر آن با دیگر متغیرها، نمودارهای کانتور دو بعدی آن در شکل‌های ۳ و ۱-ج نشان داده شده است. با مشاهده شکل‌های بالا مشخص می‌شود که با افزایش مدت زمان واکنش راندمان شبه کره کاتئوی حاصل کاهش می‌یابد و بهترین مدت زمان واکنش برای رسیدن به راندمانی مطلوب، ۳ ساعت می‌باشد. با توجه به نتایج بررسی‌های کیم و همکاران در سال ۲۰۰۴ که افزایش مهاجرت آسیل با افزایش مدت زمان واکنش آنزیمی در محیط $SC-CO_2$ را گزارش کرده‌اند، می‌توان کاهش راندمان شبه کره کاتئوی حاصل با افزایش زمان واکنش را به افزایش مهاجرت آسیل نسبت داد [۶]. همانطور که قبلاً اشاره شد در حدود ۹۰ درصد اسید اولئیک در موقعیت ۲ تری‌گلیسریدهای کره کاتئو قرار دارد. برای تهیه شبه کره کاتئو از چربی کوهان شتر، حفظ اولئیک اسیدهای موجود در موقعیت ۲ تری‌گلیسریدهای چربی کوهان شتر ضروری می‌باشد. به همین منظور از آنزیم اختصاصی موقعیت ۱ و ۳ استفاده شده است. چنانچه طی واکنش به دلیلی اسید اولئیک از موقعیت ۲ به موقعیت‌های ۱ یا ۳ منتقل شود (مهاجرت آسیل)، لذا درصد این اسید چرب در موقعیت ۲ و در نتیجه میزان POP، POS و SOS کاهش می‌یابد که در نهایت شبه کره کاتئویی با راندمان پایین‌تر تولید خواهد شد.

در شکل‌های ۱-ب، ۲-ب، ۳-ب و ۴ نمودارهای مربوط به اثر متقابل درصد آب و دیگر متغیرها و نحوه اثر آن بر راندمان قابل مشاهده است. آب آنزیم مورد استفاده قبل از واکنش با استفاده از خشک کن تصعیدی کاهش یافته و آب چربی کوهان شتر مصرفی نیز با استفاده از اوپوراتور تحت خلأ به طور کامل جدا شد تا بتوان میزان آب مناسب برای واکنش را با افزودن مقادیر مختلف آب به سامانه بررسی کرد. در یک واکنش آنزیمی وجود آب برای فعالیت آنزیم ضروری می‌باشد و آنزیم در محیط کاملاً خشک نمی‌تواند فعال شده و واکنش هیدرولیز و استریفیکاسیون را انجام دهد ولی برای فعالیت بهینه آنزیم، میزان آب موجود در سامانه بسیار مهم است. وجود مقادیر بالای آب سبب غلبه واکنش هیدرولیز بر استریفیکاسیون شده و لذا راندمان واکنش استریفیکاسیون کاهش می‌یابد. اینکه چه مقدار آب برای یک واکنش مناسب می‌باشد، مقدار مشخصی نیست و بسته به نوع آنزیم، نوع ترکیبات واکنش دهنده و مقدار آب اولیه موجود در سامانه متفاوت می‌باشد [۳]. با توجه به نمودارهای مربوطه مشخص می‌شود که برای رسیدن به راندمان مناسب در تهیه شبه کره کاکائو از چربی کوهان شتر و تری استئارین حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد وزنی بر اساس وزن واکنش دهنده‌ها، آب لازم است. مسئله‌ای که در تعیین آب مورد نیاز باید به آن توجه کرد مدت زمان واکنش می‌باشد. با دقت در منحنی‌های شکل ۳-ب به خوبی مشخص می‌شود که میزان آب لازم در زمان‌های مختلف یکسان نمی‌باشد. نکته جالبی که از این نمودارها قابل مشاهده است آن است که در ساعات اولیه واکنش به دلیل خشک بودن کامل آنزیم و اجزای روغنی واکنش، به درصد آب بالاتری جهت رسیدن به راندمان مطلوب نیاز می‌باشد چرا که آنزیم برای فعالیت خود به آب نیاز دارد و لذا باید آب بیشتری به محیط اضافه کرد تا آنزیم بتواند فعالیت بهینه خود را انجام دهد. اما با گذشت زمان مشاهده می‌شود که میزان آب مورد نیاز کاهش می‌یابد که دلیل آن تولید آب در اثر واکنش هیدرولیز در محیط واکنش می‌باشد که نیاز آنزیم به آب را تأمین می‌نماید به طوریکه باید آب کمتری به محیط اضافه کرد. چنانچه در واکنش‌های با زمان طولانی‌تر از آب به میزان زیاد استفاده شود، نسبت هیدرولیز به اینتر استریفیکاسیون افزایش یافته و در نتیجه درصد تری گلیسریدهای مطلوب کاهش و در مقابل درصد دی و منو گلیسریدها و اسیدهای چرب آزاد افزایش می‌یابد و لذا سبب کاهش راندمان می‌شود [۹].

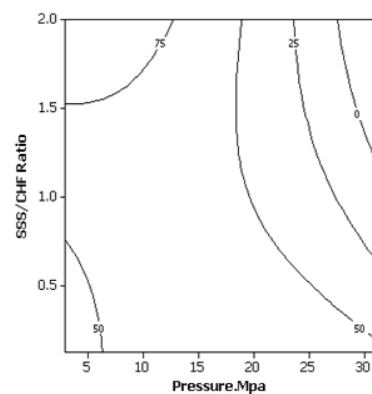
برای بررسی نسبت مناسب تری استئارین به چربی کوهان شتر و به منظور تعیین اثر متقابل آن با دیگر متغیرها نمودارهای اشکال ۱-الف، ۲-ج، ۳-ج و ۴-ج بررسی می‌شود. بر اساس شکل ۱-الف مشخص می‌شود که نسبت مناسب چربی‌ها برای راندمان مطلوب به فشار مورد استفاده وابسته است. به طوریکه در فشارهای پایین باید از نسبت بالای تری استئارین استفاده کرد و با افزایش فشار، استفاده از نسبت‌های بالاتر چربی کوهان شتر ضرورت پیدا می‌کند. به نظر می‌رسد در فشارهای پایین حلالیت تری استئارین در دی اکسید کربن فوق بحرانی در مقایسه با چربی کوهان شتر به شدت کاهش می‌یابد لذا در فشارهای پایین تری استئارین به خوبی هیدرولیز نمی‌شود تا در مرحله بعد اسیدهای چرب آزاد بر روی موقعیت‌های منوگلیسریدهای حاصل قرار گیرند و در نتیجه در این فشارها استفاده از نسبت بالای چربی کوهان شتر، راندمان را کاهش می‌دهد. با افزایش فشار حلالیت تری استئارین افزایش یافته و برای رسیدن به راندمانی مطلوب باید از نسبت‌های بالاتر چربی کوهان شتر استفاده کرد. برای تهیه شبه کره کاکائو از چربی کوهان



ج

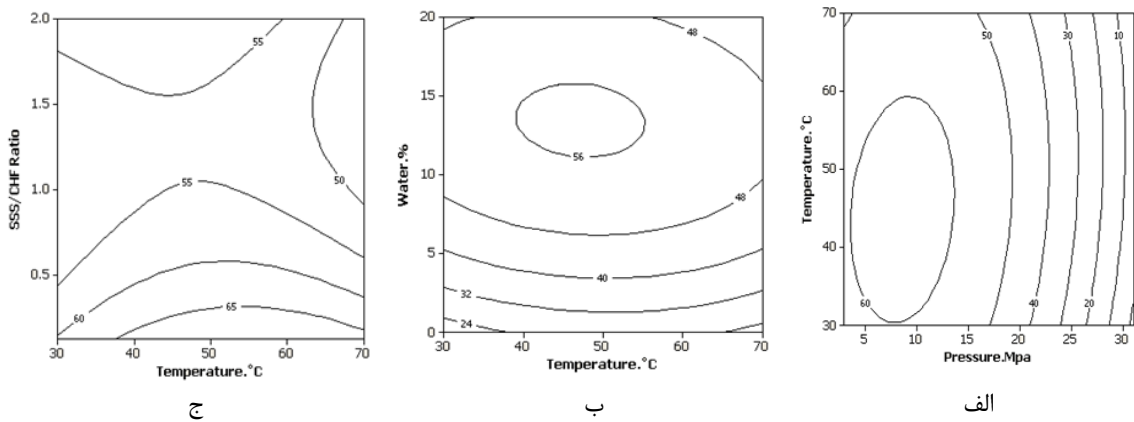


ب

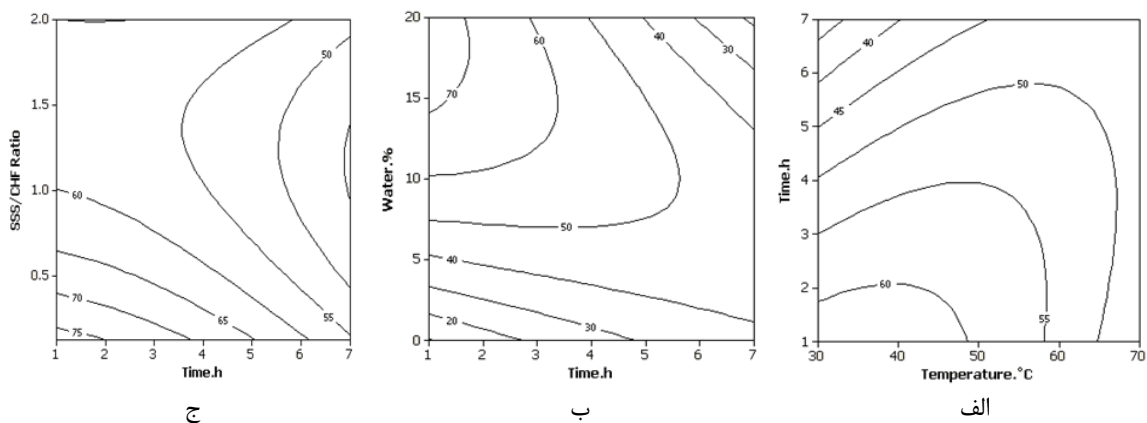


الف

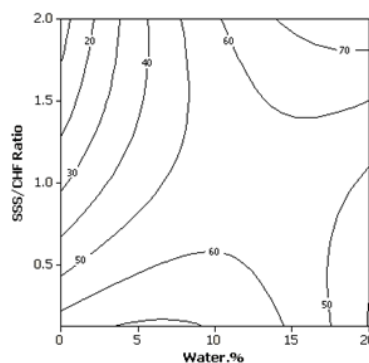
شکل ۱- الف: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل فشار و نسبت تری استتارین به چربی کوهان، ب: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل فشار و میزان آب، ج: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل دما و نسبت تری استتارین به چربی کوهان



شکل ۲- الف: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل فشار و دما، ب: کانتور دو بعدی راندمان در مقابل دما و میزان آب، ج: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل دما و نسبت تری استتارین به چربی کوهان



شکل ۳- الف: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل دما و زمان، ب: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل زمان و میزان آب، ج: نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل زمان و نسبت تری استتارین به چربی کوهان.



شکل ۴- نمودار کانتور دو بعدی راندمان در مقابل میزان آب و نسبت تری استتارین به چربی کوهان

شتر لازم است درصد اسید استتاریک محیط افزایش پیدا کند لذا نسبت تری استتارین به منظور افزایش درصد اسید استتاریک استفاده می شود و چربی کوهان شتر با تأمین هر سه اسید چرب پالمیتیک، استتاریک و اولئیک نقش اصلی را در تأمین تری گلیسریدهای

محیط داشته و لذا کاهش راندمان طی کاهش چربی کوهان شتر محیط در شرایطی که هر دو جزء حلالیت مناسبی دارند قابل توجه است [۸]. با در نظر گرفتن کلیه متغیرها در کنار نسبت چربی‌ها مشخص می‌شود که بهترین نسبت برای راندمان مطلوب نسبت ۰/۵: ۱ و ۱:۱ تری استتارین به چربی کوهان شتر می‌باشد.

در مرحله بعدی پس از تعیین مدل، برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که در نتیجه به کارگیری آنها بهترین محصول از واکنش به دست خواهد آمد، بهینه سازی انجام می‌شود. برای تأیید صحت شرایط تعیین شده می‌بایست آزمایشی در این شرایط انجام داده و نتایج آن را با نتایج پیش بینی شده توسط نرم افزار مقایسه کرد. چنانچه اختلاف معنی‌داری بین نتایج واقعی و پیش بینی شده وجود نداشته باشد، مدل توصیفی تأیید شده و قابل استفاده برای دیگر شرایط مورد نظر می‌باشد.

جدول ۵- سطوح بهینه متغیرها

متغیر	فشار (MPa)	دما (C°)	زمان (h)	آب (%)	نسبت چربی‌ها
سطح بهینه	۱۰	۴۲	۲/۵	۱۰	۱/۱۶: ۱

نقطه بهینه برای واکنش آنزیمی تحت شرایط سیال فوق بحرانی به منظور تهیه شبه کره کاکائو از چربی کوهان شتر به در جدول ۵ نشان داده شده است. چنانچه به سطوح تعیین شده متغیرها توجه شود، مطابقت آنها با آنچه که پیشتر مورد بررسی قرار گرفت مشخص می‌شود. برای تأیید صحت این شرایط آزمایشی با همین سطوح انجام شد که نتایج آن در جدول ۶ آمده است.

جدول ۶- مقادیر پیش بینی شده و واقعی فاکتورهای هدف

فاکتور هدف	POP (%)	POS (%)	SOS (%)	راندمان
مقدار پیش‌بینی شده	۲۳/۸۷	۴۳/۵۱	۳۲/۵۱	۶۸/۰۵
مقدار واقعی	۲۱/۵۶	۴۱/۴۴	۳۶/۹۹	۶۶/۸۵

۴. نتیجه گیری

با مقایسه نتایج به دست آمده از واکنش و مقادیر پیش بینی شده مشخص می‌شود که مدل تعیین شده به خوبی می‌تواند برای توصیف شرایط واکنش آنزیمی تحت شرایط دی اکسید کربن فوق بحرانی به منظور تهیه شبه کره کاکائو مورد استفاده قرار گیرد. فشار ۱۰ مگاپاسکال، دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان واکنش ۲/۵ ساعت، میزان آب ۱۰ درصد وزن سوبسترا و نسبت ۱ به ۱/۱۶ چربی کوهان شتر به تری استتارین، بهترین سطوح متغیرهای مورد بررسی برای تهیه بهینه شبه کره کاکائو می‌باشند.

۵. منابع و مراجع

- [1] Celebi, N., Yildiz, N., Demir, A. S. and Calimli, A. Optimization of benzoin synthesis in supercritical carbon dioxide by response surface methodology (RSM). *J. Supercrit. Fluids*, Nr. 47, 2008, pp. 227- 232.
- [2] Cochran, W. G. and Cox, G. M. *Experimental Design. Chapter 8A, PP. 335-371. John Wiley, New York, 1957.*
- [3] Hakoda, M., Shiragami, N., Enomoto, A. and Nakamura, K. Effect of moisture on enzymatic reaction in supercritical carbon dioxide. *Bioprocess Biosyst. Eng*, Nr. 24, 2002, pp. 355-361.
- [4] Hartmann, T., Meyer, H. H. and Scheper, T. The enantioselective hydrolysis of 3-hydroxy-5-phenyl-4-pentenoic acid ethylester in supercritical carbon dioxide using

- lipases. Enzyme. Microb. Tech*, Nr. 28, 2001, pp. 653-660.
- [5] Ikushima, Y., Saito, N., Arai, M. and Blanch, H. W. Activation of a Lipase Triggered by Interactions with Supercritical Carbon Dioxide in the Near-Critical Region. *J. Phys. Chem*, Nr. 99, 1995, pp. 8941-8144.
- [6] Kim, I. H., KO, S. N., Lee, S. M., Chung, S. H., Kim, H., Lee, K. T. and Ha, T. Y. Production of structured lipids by lipase-catalyzed acidolysis in supercritical carbon dioxide: Effect on acyl migration. *JAOCS*, Nr. 81, 2004, pp. 537-541.
- [7] Nagesha, G. K., Manohar, B. and Sankar, K.U. Enzymatic esterification of free fatty acids of hydrolyzed soy deodorizer distillate in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*, Nr. 32, 2004, pp. 137- 145.
- [8] Ostborn, H. T. and Akoh, C. C. Enzymatically modified beef tallow as a substitute for cocoa butter. *JAOCS*, Nr. 67, 2002, pp. 2480-2485.
- [9] Rezaei, K. and Temelli, F. Lipase-catalyzed hydrolysis of canola oil in supercritical carbon dioxide. *JAOCS*, Nr. 77, 2000, pp. 903-909.
- [10]Rousseau, D. and Marangoni, A. G. The effects of interesterification on physical and sensory attributes of butterfat and butterfat-canola oil spreads. *Food Res. Int.*, Nr. 31, 1999, pp. 381-388.
- [11]Senanayake, N. and Shahidi, F. Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods. PP. 555-585. In: F. Shahidi (Ed), *Baileys Industrial Oil and Fat Products*. Vol.III. A John Wiley & Sons, INC., New York, 2005.
- [12]Sessa, D. J. Derivation of a Cocoa Butter Equivalent from Jojoba Transesterified Ester via a Differential Scanning Calorimetry Index. *J. Sci. Food Agric*, Nr. 72, 1996, pp. 295-298.
- [13]Shishikura, A., Fujimoto, K., Suzuki, T. and Arai, K. Improved Lipase-Catalyzed Incorporation of Long-Chain Fatty Acids into Medium-Chain Triglycerides Assisted by Supercritical Carbon Dioxide Extraction. *JAOCS*, Nr. 71, 1994, pp. 961-967.
- [14]Temelli, F. and Guclu-ustunday, O. Supercritical technologies for further processing of edible oils. PP. 397-432. In: F. Shahidi (Ed), *Baileys Industrial Oil and Fat Products*. Vol.V. A John Wiley & Sons, INC., New York, 2005.
- [15]Zaidul, I. S. M., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. and Smith, R. L. Blending of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extracted palm kernel oil fractions and palm oil to obtain cocoa butter replacers. *J. Food Eng*, Nr. 78, 2007, pp. 1397-1409.