بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل
دانشکده مهندسی شیمی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی شیمی

موضوع:

سنتز آنزیم لیپاز در فرایند تخمیر حالت جامد با استفاده ازمیکروارگانیسم *Rhizopus oryzae* در بیوراکتور سینی‌دار

استاد راهنما:
پروفسور قاسم نجف‌پور

استاد مشاور:
دکتر سلیمان محجوب

نام دانشجو:
زهرا واثقی

بهمن ماه ۱۳۹۰

بسمه تعالی

دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل

دانشکده مهندسی شیمی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی شیمی

موضوع:

سنتز آنزیم لیپاز در فرایند تخمیر حالت جامد با استفاده ازمیکروارگانیسم *Rhizopus oryzae* در بیوراکتور سینی‌دار

استاد راهنما:

پروفسور قاسم نجف‌پور

استاد مشاور:

دکتر سلیمان محجوب

اساتید داور:

دکتر سید علی‌اصغر قریشی

دکتر فرید طالب‌نیا روشن

نام دانشجو:

زهرا واثقی

بهمن ماه ۱۳۹۰

تقدیم به

پدر و مادر دلسوز و فداکارم

و

همسر عزیزم

با تشکر و قدردانی از

استاد عزیز و بزرگوارم **جناب آقای پروفسور قاسم نجف‌پور** که با زحمات بی‌دریغ و دلسوزانه خویش راهنمایی پایان نامه را بر عهده داشتند و **جناب آقای دکتر محجوب** که مشاوره پایان نامه را تقبل فرمودند.

چکیده

سنتز آنزیم لیپاز در فرایند تخمیر حالت جامد با استفاده از میکروارگانیسم *Rhizopus oryzae* و سوبسترای تفاله نیشکر (باگاس) مورد بررسي قرار گرفت. یک بیوراکتور سینی‌دار جدید با کنترل دقیق پارامترهاي فرایندی شامل دما و رطوبت طراحي شده و به منظور تولید آنزیم بیرون سلولي مورد استفاده قرار گرفت. فرایند تخمیر به مدت ۱۲۰ ساعت انجام شد و میزان لیپاز تولیدي به فاصله زماني ۲۴ ساعت در دماهاي مختلف مورد بررسي قرار گرفت. ضایعات/محصولات مختلف کشاورزي شامل باگاس، آرد گندم، آرد ذرت، آرد جو و نیز مخلوط (۵۰:۵۰) این محصولات با باگاس بعنوان سوبسترا مورد استفاده قرار گرفتند. لیپاز تولیدي از باگاس خالص نسبت به بقیه سوبستراها فعالیت بالاتري نشان داده است. علاوه بر این، تأثیر پارامترهاي دماي بیوراکتور، رطوبت بیوراکتور، عمق بستر سوبسترا ، اندازه ذرات و نیز رطوبت اولیه سوبسترا مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داده است که دماي $45^{\circ}C$، رطوبت ۸۰%، عمق بستر ۰/۵cm، اندازه ذرات در محدوده ۰/۳۳۵-۰/۶mm و رطوبت اولیه ۸۰% براي سیني بالایي و ۷۰% براي سیني میاني به تولید لیپاز با حداکثر فعالیت انجامید. همچنین تأثیر غني‌سازي باگاس با منابع کربني و نیتروژني مورد بررسي قرار گرفت. افزایش منابع کربني به سوبسترا مؤثر نبوده در حالیکه با غني‌سازي باگاس با منابع نیتروژني، فعالیت لیپاز تولیدي به طور قابل ملاحظه‌اي افزایش یافت. در میان منابع نیتروژني، اوره بعنوان بهترین ماده غني‌ساز شناخته شد. بعلاوه، روغن‌هاي گیاهي شامل روغن-هاي کانولا، زیتون، سویا و کرچک با غلظت‌هاي مختلف بعنوان محرک رشد در تولید لیپاز مورد استفاده قرار گرفتند. از میان این روغن‌ها روغن‌هاي زیتون و کانولا باعث افزایش فعالیت لیپاز تولیدي شدند. حداکثر فعالیت لیپاز پس از گذشت ۷۲ ساعت تحت تمامي شرایط مطلوب ۲۸۴/۷۵، ۲۴۳/۹۶ و ۶۲/۶۴U/gds به ترتیب براي سیني بالایي، میاني و پایییني بدست آمد. تأثیر دما و pH بر فعالیت لیپاز تولیدي تحت شرایط

مطلوب مورد بررسي قرار گرفت و مشاهده شد كه آنزيم در دماي ۵۰°C و pH برابر ۸ حداكثر فعاليت را داشته است.

واژه‌هاي كليدي: ليپاز، تخمير حالت جامد، بيوراكتور سيني-دار، *Rhizopus oryzae*، فعاليت آنزيم، تفاله نيشكر

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۱- فصل اول: مقدمه	
۱-۱- مقدمه	۱
۲ - فصل دوم: كلياتی در مورد توليد ليپاز در تخمير حالت جامد	
۲-۱- ليپاز	۶
۲-۱-۱- ليپازها بعنوان كاتاليست‌های كاربردی	۸
۲-۱-۲- هيدروليز	۸
۲-۱-۳- استريفيكاسيون	۸
۲-۱-۴- ترنس استريفيكاسيون	۱۰
۲-۱-۵- كاتاليز بر روی سوبستراهای غير طبيعی	۱۱
۲-۲- كاربردهای ليپاز	۱۱
۲-۳- منابع توليد ليپاز	۱۲
۲-۳-۱- قارچ رشته ای	۱۴
۲-۳-۲- مخمر	۱۴
۲-۳-۳- باكتری	۱۵
۲-۴- سوبستراهای مورد استفاده برای توليد ليپاز	۱۵
۲-۴-۱- پسماندهای كشاورزی-صنعتی	۱۶
۲-۴-۱-۱- تفاله نيشكر (باگاس)	۱۶
۲-۵- اندازه گيری فعاليت ليپاز	۱۷
۲-۵-۱- روش تيتراسيون	۱۷
۲-۵-۲- روش رنگ سنجی	۱۷
۲-۵-۳- روش كروماتوگرافی	۱۸
۲-۵-۴- روش هدايت الكتركی	۱۹
۲-۶- تكنولوژی های مورد استفاده در توليد ليپاز	۱۹

۲-۶-۱- تخمیر حالت غوطه ور (SmF) ۱۹
۲-۶-۲- تخمیر حالت جامد (SSF) ۲۰
۲-۶-۳- تاریخچه تاریخی SSF ۲۱
۲-۶-۴- جنبه های مهم SSF ۲۲
۲-۶-۵- محصولات بدست آمده از SSF ۲۳
۲-۶-۵-۱- آنزیم های بدست آمده از SSF ۲۳
۲-۶-۶- مزایا و چالش‌های SSF ۲۵
۲-۶-۷- پیشرفت‌های مهندسی بیوشیمیایی در زمینه تخمیر حالت جامد ۲۶
۲-۶-۸- طراحی بیوراکتور ۲۷
۲-۶-۹- راکتورهای مورد استفاده در تخمیر حالت جامد ۲۸
۲-۶-۹-۱- راکتورهای سینی‌دار ۲۹
۲-۶-۹-۲- راکتورهای آکنده ۳۱
۲-۶-۹-۳- راکتورهای استوانه‌ای دوار ۳۲
۲-۶-۹-۴- راکتورهای بستر سیال ۳۴
۲-۷- مراحل عمومی برای انجام فرایند SSF در داخل بیوراکتور ۳۵
۲-۷-۱- آماده‌سازی سوبسترا ۳۵
۲-۷-۲- آماده‌سازی مایه تلقیح ۳۵
۲-۷-۳- آماده‌سازی بیوراکتور ۳۵
۲-۷-۴- تلقیح کردن و بارگذاری ۳۶
۲-۷-۵- عملکرد بیوراکتور ۳۶
۲-۷-۶- تخلیه ۳۶
۲-۷-۷- فراوری محصولات پایین دست ۳۷
۲-۷-۸- دورریز ضایعات ۳۷
۲-۸- عوامل مؤثر در تولید لیپاز در تخمیر حالت جامد در داخل بیوراکتور ۳۷

فصل سوم: مواد و روش‌ها
۳-۱- تجهیزات مورد استفاده ۳۸
۳-۲- به دست آوردن مشخصات سوبسترا ۳۹
۳-۲-۱- محاسبه میزان خاکستر ۳۹
۳-۲-۲- محاسبه میزان رطوبت ۴۰
۳-۲-۳- محاسبه غلظت پروتئین ۴۰
۳-۲-۴- محاسبه قند موجود در سوبسترا ۴۱
۳-۲-۵- محاسبه اسیدیته چربی موجود در سوبسترا ۴۲

۳-۲-۶- محاسبه اندازه ذرات سوبسترا ۴۳
۳-۳- محیط کشت و میکروارگانیسم ۴۳
۳-۳-۱- میکروارگانیسم ۴۳
۳-۳-۲- محیط کشت ۴۴
۳-۳-۲-۱- محیط کشت مایع ۴۴
۳-۳-۲-۲- محیط کشت جامد ۴۵
۳-۴- تلقیح میکروارگانیسم ۴۶
۳-۵- طراحی بیوراکتور سینی‌دار ۴۶
۳-۶- تخمیر حالت جامد ۴۹
۳-۷- نمونه‌گیری و استخراج آنزیم از باگاس تخمیر یافته ۵۱
۳-۸- اندازه‌گیری فعالیت لیپاز تولید شده ۵۱
۳-۹- اندازه‌گیری بازده تولید لیپاز ($Y_{P/S}$) ۵۳
۳-۱۰- اندازه‌گیری پروتئین کلی لیپاز ۵۳
۳-۱۱- بررسی تأثیر پارامترهای مختلف بر روی تولید لیپاز ۵۳
۳-۱۱-۱- تأثیر نوع سوبسترای جامد ۵۳
۳-۱۱-۲- تأثیر مدت زمان تخمیر ۵۴
۳-۱۱-۳- تأثیر دمای داخل بیوراکتور ۵۴
۳-۱۱-۴- تأثیر رطوبت داخلی بیوراکتور ۵۴
۳-۱۱-۵- تأثیر عمق بستر سوبسترا ۵۴
۳-۱۱-۶- تأثیر رطوبت اولیه سوبسترا ۵۵
۳-۱۱-۷- تأثیر اندازه‌ی ذرات سوبسترا ۵۵
۳-۱۱-۸- تأثیر غنی‌سازی سوبسترا با منابع کربنی و نیتروژنی ۵۵
۳-۱۱-۹- تأثیر روغن‌های گیاهی بعنوان محرک رشد ۵۶
۳-۱۱-۱۱- تأثیر دما بر روی فعالیت و پایداری آنزیم تولید شده ۵۶
۳-۱۱-۱۲- تأثیر pH بر روی فعالیت و پایداری آنزیم تولید شده ۵۶

فصل چهارم: نتایج
۴-۱ محاسبه خصوصیات سوبسترا ۵۷
۴-۱-۱ خصوصیات تفاله‌ی نیشکر (باگاس) ۵۷
۴-۲ منحنی استاندارد فعالیت لیپاز ۵۸
۴-۳- بررسی تأثیر پارامترهای مختلف بر روی تولید لیپاز ۵۸
۴-۳-۱- بررسی تأثیر مدت زمان تخمیر ۵۸
۴-۳-۲- بررسی تأثیر نوع سوبسترای جامد ۶۰

۴-۳-۳- بررسی تأثیر دمای داخل بیوراکتور ۶۱
۴-۳-۴- بررسی تأثیر رطوبت داخلی بیوراکتور ۶۲
۴-۳-۵- بررسی تأثیر عمق بستر سوبسترا ۶۳
۴-۳-۶- بررسی تأثیر رطوبت اولیه سوبسترا ۶۴
۴-۳-۷- بررسی تأثیر اندازه‌ی ذرات سوبسترا ۶۶
۴-۳-۸- بررسی تأثیر غنی‌سازی سوبسترا با منابع کربنی و نیتروژنی ۶۷
۴-۳-۹- بررسی تأثیر روغن‌های گیاهی بعنوان محرک رشد ۶۸
۴-۳-۱۰- بررسی تأثیر دما بر روی فعالیت و پایداری آنزیم تولید شده ۷۱
۴-۳-۱۱- بررسی تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم تولید شده ۷۲

فصل پنجم: نتیجه‌گیری
۵-۱- نتیجه‌گیری ۷۴
۵-۲- پیشنهادها ۷۵
منابع و مراجع ۷۶

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- نمونه‌ای از مسیر واکنش برای واکنش کاتالیز شده آنزیمی	۲
شکل ۲-۱- تصویر ساختار سه بعدی لیپاز بدست آمده از *Rhizopus oryzae*	۶
شکل ۲-۲- واکنش‌های مختلفی که توسط لیپاز در محلول‌های آبی و غیر آبی کاتالیز می‌شوند.	۹
شکل ۲-۳- موقعیت اجزاء سوبسترای جامد و فاز گازی پیوسته در تخمیر حالت جامد شامل قارچ رشته‌ای	۲۱
شکل ۲-۴- شماتیکی از یک راکتور سینی دار	۳۰
شکل ۲-۵- شماتیکی از یک راکتور آکنده	۳۲
شکل ۲-۶- شماتیکی از یک راکتور استوانه‌ای دوار	۳۳
شکل ۲-۷- شماتیکی از یک راکتور بستر سیال	۳۴
شکل ۳-۱- تصویر میکروسکوپی از قارچ *Rhizopus oryzae*	۴۴
شکل ۳-۲- نمایی از بیوراکتور سینی‌دار ساخته شده جهت تولید لیپاز در تخمیر حالت جامد	۴۸
شکل ۳-۳- دیاگرام شماتیک بیوراکتور سینی‌دار. T.I.C: نمایشگر و کنترولر دما، H.I.C.: نمایشگر و کنترولر رطوبت، T.S.: حسگر دما، H.S.: حسگر رطوبت،T: سینی، N: نازل، F: فن و P: پمپ	۴۸
شکل ۳-۴- نمایی از باگاس تخمیر یافته بر روی سینی‌های بیوراکتور. (الف) سینی بالایی و (ب) سینی میانی	۵۰
شکل ۳-۵- نمایی از مایع حاوی آنزیم در سینی پایینی پس از انجام فرایند تخمیر	۵۰
شکل ۳-۶. محلول بدست آمده پس از انجام واکنش آنزیمی، سمت راست: قبل از سانتریفیوژ، سمت چپ: پس از سانتریفیوژ	۵۲
شکل ۴-۱- منحنی استاندارد جهت تعیین فعالیت لیپاز در طول موج ۴۱۰ نانومتر	۵۸
شکل ۴-۲- تأثیر زمان تخمیر بر روی فعالیت لیپاز تولیدی از*Rhizopus oryzae*	۵۹
شکل ۴-۳- تأثیر نوع سوبسترای جامد بر روی فعالیت لیپاز تولیدی از *Rhizopus*	۶۰

oryzae
شکل ۴-۴- تأثیر دمای داخلی بیوراکتور بر روی فعالیت و پروتئین کلی لیپاز تولیدی از *Rhizopus oryzae* ۶۲
شکل ۴-۵- تأثیر رطوبت داخلی بیوراکتور بر روی فعالیت و پروتئین کلی لیپاز تولیدی از *Rhizopus oryzae* ۶۳
شکل ۴-۶- تأثیر عمق بستر سوبسترا بر روی فعالیت و پروتئین کلی لیپاز تولیدی از*Rhizopus oryzae* ۶۴
شکل ۴-۷- تأثیر رطوبت اولیه‌ی سوبسترا بر روی فعالیت و پروتئین کلی لیپاز تولیدی از *Rhizopus oryzae* ۶۵
شکل ۴-۸- تأثیر اندازه‌ی ذرات سوبسترا بر روی فعالیت و پروتئین کلی لیپاز تولیدی از *Rhizopus oryzae* ۶۶
شکل ۴-۹- تأثیر غنی‌سازی باگاس با درصدهای متفاوت از روغن کانولا بر روی فعالیت و بازده لیپاز تولیدی ۶۹
شکل ۴-۱۰- تأثیر غنی‌سازی باگاس با درصدهای متفاوت از روغن زیتون بر روی فعالیت و بازده لیپاز تولیدی ۷۰
شکل ۴-۱۱- تأثیر غنی‌سازی باگاس با درصدهای متفاوت از روغن سویا بر روی فعالیت و بازده لیپاز تولیدی ۷۰
شکل ۴-۱۲- تأثیر غنی‌سازی باگاس با درصدهای متفاوت از روغن کرچک بر روی فعالیت و بازده لیپاز تولیدی ۷۱
شکل ۴-۱۳- تأثیر دما بر روی فعالیت لیپاز تولید شده ۷۲
شکل ۴-۱۴- تأثیر pH بر روی فعالیت آنزیم لیپاز تولید شده ۷۳

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۲-۱- نمونه‌هایی از کاربردهای صنعتی لیپاز	۱۰
جدول ۲-۲- میکروارگانیسم هایی که پتانسیل تولید لیپاز را دارند و در مقالات اخیر ذکر شده اند.	۱۳
جدول ۲-۳- برخی از آنزیم‌های تولید شده در تخمیر حالت جامد	۲۴
جدول ۲-۴- ویژگیها و محدودیت‌های رایج بیوراکتورهای مورد استفاده در تخمیر حالت جامد	۲۹
جدول ۳-۱- ترکیب محیط کشت مایع	۴۵
جدول ۳-۲- ترکیب محیط کشت جامد	۴۶
جدول ۴-۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی باگاس	۵۷
جدول ۴-۲- تأثیر غنی‌سازی سوبسترا با منابع کربنی مختلف بر روی فعالیت و بازده لیپاز تولیدی از *Rhizopus oryzae*	۶۷
جدول ۴-۳. تأثیر غنی‌سازی سوبسترا با منابع نیتروژنی مختلف بر روی فعالیت و بازده لیپاز تولیدی از *Rhizopus oryzae*	۶۸

فصل اول

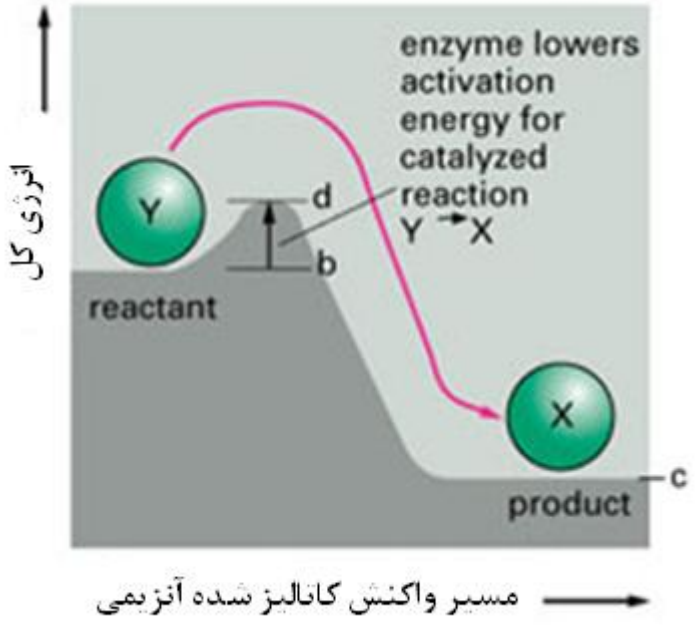
مقدمه

۱-۱- مقدمه

آنزیم‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند سرعت واکنش را تا حدود 10^{7}برابر افزایش دهند. آنزیم مانند یک کاتالیزگر غیر آلی واکنش را با پایین آوردن انرژی فعال‌سازی[1] لازم برای انجام واکنش تسریع می‌کند و برخلاف آن انرژی فعال‌سازی را با جایگزین کردن یک سطح انرژی فعال‌سازی بزرگ با یک سطح انرژی فعال سازی کوچک پایین می‌آورد [۱] (شکل ۱-۱). انجام سریع یک واکنش در موقعیت آزمایشگاهی به شرایط ویژه‌ای مانند دما و فشار بالا نیاز دارد. لذا باید در یاخته که شرایط محیطی در آن کاملا ثابت است و انجام چنین واکنش‌هایی بسیار کند است، مکانیسمی دقیق وجود داشته باشد. این عمل بوسیله آنزیم‌ها صورت می‌گیرد.

کاتالیزورها در واکنشها بدون تغییر می‌مانند، ولی آنزیم‌ها مانند سایر پروتئین‌ها تحت شرایط مختلف پایدار نمی‌مانند. این مواد در اثر حرارت بالا و اسیدها و قلیاها تغییر می‌کنند. کاتالیزورها تاثیری در تعادل واکنش برگشت‌پذیر ندارند، بلکه فقط سرعت واکنش را زیاد می‌کنند تا به تعادل برسند. آنزیم‌ها با کاهش انرژی فعال‌سازی سرعت واکنش شیمیایی را افزایش می‌دهند [۲, ۳].

[1] Activation energy



شکل ۱-۱- نمونه‌ای از مسیر واکنش برای واکنش کاتالیز شده آنزیمی

آنزیم‌ها مولکول‌های پروتئینی هستند که دارای یک یا چند محل نفوذ سطحی (جایگاه‌های فعال) هستند که سوبسترا یعنی ماده‌ای که آنزیم بر آن اثر می‌کند، به این نواحی متصل می‌شود. تحت تاثیر آنزیم‌ها، سوبسترا تغییر می‌کند و به یک یا تعدادی محصول تبدیل می‌شود. از دیدگاه صنعتی، تولید، تغلیظ، استخراج و خالص‌سازی آنزیم‌ها از محیط‌های کشت حاوی *Aspergillus*، *Penecillium*، *Mucor* و *Rhizopus* امکان‌پذیر بوده و تولید آنها دارای توجیه اقتصادی است [۴].

کشف آنزیمها در واقع به پژوهشهای وسیع پاپن و پرسوز[1] وابسته بود. آنان در سال ۱۸۳۳ موفق شدند از جو سبز شده ترکیبی را به نام مالت کشف کنند که نشاسته را به قند مبدل می‌ساخت و این ترکیب را دیاستاز[2] نامیدند که امروزه به نام آنزیم آمیلاز[3] معروف است. [۵].

بیشتر تاریخ بیوشیمی، تاریخ تحقیق آنزیمی است. کاتالیز بیولوژیکی برای اولین بار در اواخر قرن ۱۸ طی مطالعات انجام شده بر روی هضم گوشت توسط ترشحات معده انجام شد و بعدها بوسیله تبدیل نشاسته

[1] Persuz Papen
[2] Diastase
[3] Amylase

به قندهای ساده توسط بزاق ادامه یافت لویی پاستور [1] گفت که تخمیر قند به الکل توسط مخمر بوسیله خمیر مایه کاتالیز می‌شود. بعد از پاستور، ادوارد بوخنر[2] ثابت کرد که تخمیر توسط مولکول‌هایی تسریع می‌گردد که بعد از جدا شدن از سلول‌ها، همچنان فعالیت خود را ادامه می‌دهند فردریک کوهن[3] این مولکولها را آنزیم نامید. جداسازی و کریستالیزه کردن آنزیم اوره‌آز[4] در سال ۱۹۲۶ توسط جیمز سامند[5] منجر به رفع موانع در مطالعات اولیه آنزیم‌شناسی گردید [۶].

آنزیم‌ها ماهیتی پروتئینی دارند و ساختار بعضی ساده یعنی از یک زنجیره پلی‌پپتیدی ساخته شده‌اند و بعضی الیگومر هستند. ساختار بعضی از آنزیم‌ها منحصراً از واحدهای اسید آمینه تشکیل یافته اما برخی دیگر برای فعالیت خود نیاز به ترکیبات غیرپروتئینی دارند که به نام گروه پروستتیک معروف است و این گروه می‌تواند یک فلز یا یک کوآنزیم[6] باشد و با آنزیم اتصال محکمی را برقرار می‌کنند. بخش پروتئینی آنزیم (بدون گروه پروستتیک[7]) آپوآنزیم[8] نام دارد و مجموع آنزیم فعال از نظر کاتالیزوری و کوفاکتور مربوطه مربوطه هولوآنزیم[9] نام دارد.

از ویژگیهای مهم آنزیم‌ها این است که پس از انجام هر واکنش و در پایان آن سالم و دست نخورده باقی می‌مانند و می‌توانند واکنش بعدی را کاتالیز کنند. در یک واکنش ساده آنزیمی، ابتدا آنزیم (E) با ماده اولیه یا سوبسترا (S) ترکیب می‌شود و کمپلکس آنزیم _ سوبسترا می‌دهد در مرحله بعدی با انجام واکنش، فراورده یا محصول (P) ایجاد می‌شود و آنزیم رها می‌گردد [۷-۹]. در زیر نمونه‌ای از واکنش‌های ساده آنزیمی نشان داده شده است.

$$\mathbf{E+S \leftrightarrow ES}$$

$$\mathbf{ES \rightarrow E+P}$$

[1] Louis Pasteur
[2] Edvard Bukhner
[3] Frederick Cohen
[4] Urease
[5] James Samend
[6] Coenzyme
[7] Prosynetic
[8] Apoenzyme
[9] Holoenzyme

هر آنزیم بر سوبسترای ویژه خود اثر کرده و فرآورده ویژه‌ای را تولید می‌کند. به این منظور هر آنزیم ساختار سه بعدی ویژه خود را دارا است که آن را برای انجام فعالیت کاتالیستی مناسب می‌سازد و بخشی از آنزیم که با سوبسترا بند و بست می‌یابد، جایگاه فعال نام دارد و در مورد اتصال آنزیم به سوبسترا الگوهایی ارائه شده‌اند که مدل کوشلند[1] که الگوی القایی نام دارد و حالت دست در دستکش را دارد، نشان می‌دهد. بطوری بطوری که محل اتصال حالت انعطاف‌پذیری دارد [۱۰-۱۲].

حدود ۱۰۰ سال قبل میکروب شناسی به نام آیکمان[2] برای اولین بار ترشح آنزیم لیپاز را توسط تعدادی از باکتری‌ها گزارش نمود. پس از آن فعالیت لیپازها در محلول‌های آلی مشاهده شد و مطالعات بر روی این آنزیم گسترش یافت، بطوریکه امروزه سالانه در حدود ۱۰۰۰ مقاله در این مورد منتشر می‌شود، همچنین لیپازها سهم برجسته‌ای در بازار آنزیم دارند و پس از پروتئازها و آمیلازها رده سوم فروش جهانی را به خود اختصاص داده‌اند [۱۳] . تخمیر حالت جامد و تخمیر حالت غوطه‌ور دو تکنولوژی رایج به منظور تولید آنزیم‌ها و از جمله لیپاز محسوب می‌شوند. هر کدام از این روش‌ها دارای مزایایی است که دیگری فاقد آنست [۱۴].

هدف از انجام این تحقیق، سنتز آنزیم لیپاز[3] به روش تخمیر حالت جامد با استفاده از میکروارگانیسم *Rhizopus oryzae* می‌باشد. یک بیوراکتور سینی‌دار به منظور محقق گشتن این هدف طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفت. شرایط مختلف بیوراکتور به منظور تولید لیپاز با فعالیت بالا مورد بررسی قرار گرفت.

در فصل دوم، به معرفی آنزیم لیپاز و تکنولوژی تخمیر حالت جامد که تولید لیپاز در این تحقیق بر اساس آن صورت گرفته است پرداخته و در ادامه جنبه‌های مهم طراحی و کاربردی بیوراکتورهای مورد استفاده به منظور تولید لیپاز در تخمیر حالت جامد به همراه مروری بر تحقیقات قبلی مورد بررسی قرار گرفت. در فصل سوم مواد، تجهیزات، روش‌های آزمایشگاهی و اندازه‌گیری، پارامترهای طراحی و عملیاتی

[1] Glove Koshland induction
[2] Eijkmann
[3] Lipase

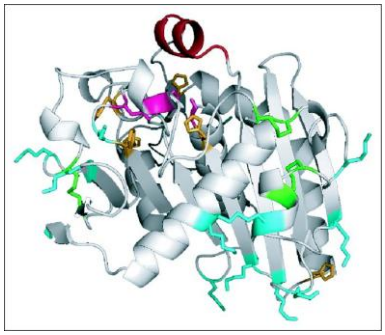
بیوراکتور ساخته شده و تعیین خصوصیات لیپاز تولیدی ارائه شده است. در فصل چهارم نتایج بدست آمده از آزمایش‌های انجام شده ارائه شده و مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. فصل پنجم نیز به نتیجه‌گیری و ارائه پیشنهادهایی برای تحقیقات آینده در این زمینه اختصاص یافته است.

فصل دوم

کلیاتی در مورد تولید لیپاز در تخمیر حالت جامد

۲-۱- لیپاز[1]

لیپازها (هیدرولیز کننده‌های استرهای گلیسرول EC 3.1.1.3) گروهی از آنزیم‌ها هستند که تری آسیل گلیسرول‌ها را به اسیدهای چرب، دی-آسیل گلیسرول‌ها، مونوآسیل گلیسرول‌ها و گلیسرول تبدیل کرده و تحت شرایط معینی، واکنش های معکوسی از قبیل استریفیکاسیون و ترنس استریفیکاسیون را کاتالیز می‌کنند. لیپاز همچنین دارای خواص ویژه‌ای مانند اختصاصی بودن سوبسترا، گزینش پذیری در اثر ساختمان مولکولی[2] و توانایی کاتالیز کردن واکنش‌های ناهمگن در سطح مشترک سیستم‌های محلول و نامحلول در آب می باشد [۱۳-۱۵]. تفاوت لیپاز با استرهای کلاسیک در اینست که سوبستراهای طبیعی آن در آب نامحلول بوده و فعالیت لیپاز تنها هنگامی حداکثر می‌شود که آنزیم جذب سطح مشترک روغن-آب شده باشد [۱۶]. در شکل ۲-۱ تصویر سه بعدی از ساختار لیپاز که از سویه قارچی *Rhizopus oryzae* بدست آمده نشان داده شده است.



شکل ۲-۱- تصویر ساختار سه بعدی لیپاز بدست آمده از *Rhizopus oryzae* [۱۷]

[1] Lipase
[2] Stereospecifity

گرایش روزافزون به تحقیقات در زمینه آنزیم لیپاز طی دهه‌های اخیر به سه دلیل می‌باشد. اولین علت به مبنای مولکولی عملکرد کاتالیستی آنزیم و یا پارادایم لیپاز برمی‌گردد. در واقع، با وجود آنکه لیپازها در آب محلول هستند، واکنش‌هایی را در سطح مشترک لیپید-آب کاتالیز می‌کنند که شامل سوبستراهای لیپیدی غیر محلول می‌باشد. این توانایی لیپاز به علت خاصیت ویژه ساختاری این آنزیم می‌باشد. این ساختار شامل یک واحد اولیگوپپتید[1] بوده که ورودی به جایگاه فعال را تحت پوشش قرار می‌دهد. این درپوش تنها در صورت دسترسی به یک فصل مشترک آب‌گریز مانند یک قطره لیپید حرکت می‌کند. بنابراین تعجب‌آور نیست که لیپازها مانند فسفولیپازها طی سال‌ها بعنوان مدل‌هایی به منظور مطالعه قواعد مربوط به فصل مشترک واکنش‌های کاتالیز شده آنزیمی بکار گرفته می‌شدند [۱۸, ۱۹]. دومین دلیل مربوط به ارتباط دارویی آنزیم مخصوصاً با آثروسلروسیز[2] و هایپرلیپیدمیا[3] و اهمیت آن در تنظیم و متابولیسم می‌باشد، چون محصولات هیدرولیز لیپاز ازقبیل اسیدهای چرب آزاد و دی‌آسیل‌گلیسرول‌ها نقش بسیار مهمی راخصوصاً بعنوان واسطه‌هایی در فعال‌سازی سلول ایفا می‌کنند [۲۰, ۲۱]. اخیراً کشف شده است که لیپازها نه تنها ابزارهای قدرتمندی برای کاتالیز واکنش‌های هیدرولیز هستند بلکه قابلیت کاتالیز واکنش‌های معکوس متعددی مانند استریفیکاسیون، ترنس‌استریفیکاسیون و آمینی شدن[4] را نیز دارا می‌باشند. این بیوکاتالیست‌ها دارای مزایای بسیاری در برابر کاتالیست‌های کلاسیک می‌باشند. در واقع اختصاصی بودن[5]، گزینش‌پزیری محل انجام واکنش[6] و گزینش‌پذیری انانتیو[7] آنها را قادر به کاتالیز واکنش‌هایی با محصولات جانبی کاهش یافته، کاهش هزینه‌های ناشی از پسماند و انجام واکنش تحت شرایط دما و فشار ملایم ساخته است. بر این اساس، اخیراً گرایش‌های بسیاری به استفاده تجاری از لیپاز سوق داده شده است. به علاوه توانایی لیپاز در حفظ کردن فعالیت کاتالیستی خود در محلول‌های آلی، فعالیت این آنزیم بعنوان کاتالیست به منظور تعیین

[1] Oligopeptide
[2] Atherosclerosis
[3] Hyperlipidemia
[4] Aminolysis
[5] Specifity
[6] Regioselectivity
[7] Enantioselectivity