بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده فنی
گروه مهندسی شیمی

ارائه مدل ریاضی مناسب برای سینتیک تولید آنزیم بتا گالاگتوزیداز در کشت غوطه‌ور

از
سیده الهه موسوی‌فر

استاد راهنما
دکتر غلام خیاطی

استاد مشاور
دکتر رضا انصاری خلخالی

شهریور 1393

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

که آنچه دارم در سایه مرارت‌ها و زحمات بی‌دریغ آن‌ها شکل گرفته است.

و خواهران مهربانم

که وجودشان مایه دلگرمی من و تکیه گاهم در مواجهه با مشکلات است.

و تقدیم به

تمام انسان‌های آزاده‌ای که نیک می‌اندیشند

و عقل و منطق را پیشه خود نموده‌اند

و جز رضای الهی و پیشرفت و سعادت جامعه، هدفی ندارند.

سپاس خدای را که سخنوران در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندادند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند، وسلام و درود بر محمد و خاندان پاک او.

و با سپاس از:

استاد گرانقدر و شایسته، جناب آقای دکتر خیاطی که در کمان سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛

استاد فرهیخته و فرزانه، جناب آقای دکتر انصاری خلخالی، که زحمت مشاوره این رساله را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی‌رسید؛

پدر و مادر عزیزم این دو معلم بزرگوار که همواره بر کوتاهی و درشتی من، قلم عفو کشیده و کریمانه از کنار غفلت‌هایم گذشته‌اند و در تمام عرصه‌های زندگی یار و یاوری بی چشم داشت برای من بوده‌اند؛

اساتید فرزانه و دلسوز، جناب آقای دکتر داغبندان و جناب آقای دکتر عباسی که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند.

همچنین از سرکار خانم مهندس علیزاده و جناب آقای مهندس زمانی که در طول مدت پروژه از راهنمایی‌ها و کمک‌های ایشان بهره‌مند شدم نیز سپاسگذاری میکنم.

با تشکر خالصانه خدمت همه معلمان و استادان محترم، بویژه اساتید محترم گروه مهندسی شیمی دانشگاه گیلان که در طول دوران تحصیل جهت آموزش و ارتقای علمی اینجانب زحمت کشیده‌اند و پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت فضیلت و انسانیت آن‌ها بوده‌ام.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
چکیده فارسی	ز
چکیده انگلیسی	ژ
مقدمه	1
فصل اول: کلیات	
1-1- آنزیم‌ها	3
1-1-1- تاریخچه آنزیم شناسی	3
1-1-2- ساختار پروتئینی آنزیم‌ها	4
1-1-3- مزیت آنزیم‌ها نسبت به کاتالیزورهای شیمیایی	4
1-1-4- منابع آنزیمی	5
1-1-4-1- آنزیم‌های میکروبی	5
1-1-4-2- مزیت آنزیم‌های میکروبی	6
1-1-5- طبقه بندی آنزیم‌ها	7
1-1-6- هیدرولازها	7
1-1-7- آنزیم بتا-گالاکتوزیداز	8
1-1-7-1- تاریخچه آنزیم بتا-گالاکتوزیداز	8
1-1-7-2- ساختار بتا-گالاکتوزیداز	8
1-1-7-3- اهمیت آنزیم بتا-گالاکتوزیداز	9
1-1-8- تعیین فعالیت آنزیم	11
1-1-8-1 جذب	12

1-2- میکروارگانیسم‌ها	12
1-2-1- منابع تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز	13
1-2-2- باسیلوس	13
1-2-2-1- جداسازی باسیلوس‌ها از خاک	15
1-2-2-2- *Bacillus licheniformis*	15
1-2-2-3- بیماری‌زایی	15
1-3- تخمیر و رشد میکروبی	16
1-3-1- تخمیر	16
1-3-2- محصولات تخمیر	17
1-3-3- محیط کشت مناسب جهت تخمیر	17
1-3-3-1- منبع کربن	18
1-3-3-2- منبع نیتروژن	19
1-3-4- سوبسترای تخمیر صنعتی	19
1-3-5- استریلیزاسیون محیط کشت	20
1-3-5-1- روش های استریلیزاسیون	21
1-3-5-2- گرمای مرطوب	21
1-3-6- انواع محیط‌های میکروبی	21
1-3-6-1- کشت در بستر جامد	22
1-3-6-2- کشت غوطه‌ور	22
1-3-6-3- مزایای کشت غوطه‌ور	22
1-3-7- انواع سیستم‌های تخمیری	22
1-3-7-1- فرآیندهای بسته	22
1-3-7-2- فرآیندهای ناپیوسته	23

1-3-7-3- فرآیندهای پیوسته 23
1-3-8- رشد میکروبی در سیستم بسته 23
1-3-9- فازهای رشد در کشت بسته 24
1-3-10- اثر عوامل مختلف بر رشد میکروارگانیسم‌ها 26
1-3-10-1- اثر غلظت سوبسترا بر سرعت رشد 26
1-3-10-2- اثر دما بر سرعت رشد 27
1-3-10-3- اثر pH برسرعت رشد 28
1-3-11- اندازه گیری رشد میکروبی بوسیله جذب نوری 28
1-4- مدلسازی 29
1-4-1- مدلسازی و اهمیت آن در فرآیندهای صنعتی 29
1-4-2- مدل‌های ریاضی 31
1-4-2-1- مدل‌های ساختاری 31
1-4-2-2- مدل‌های غیر ساختاری 32

فصل دوم: مروری بر مطالعات و تحقیقات انجام شده

فصل سوم: مواد و روش‌های آزمایشگاهی

3-1- مواد و تجهیزات آزمایشگاهی 45
3-1-1- مواد استفاده شده در آزمایش ها 45
3-1-2- تجهیزات آزمایشگاهی 46
3-2- تخمیر و تولید آنزیم 47
3-2-1- میکرو ارگانیسم 47
3-2-2- تهیه پیش کشت 47

3-2-3- محیط کشت اصلی تخمیر 47
3-2-4- فرآیند تخمیر و تولید آنزیم 47
3-2-5- جداسازی آنزیم 48
3-3- آنالیز ها 48
3-3-1- سنجش غلظت توده زیستی 48
3-3-1-1- اندازه گیری کمی غلظت توده زیستی 49
3-3-2 سنجش فعالیت آنزیمی بتا-گالاکتوزیداز 49
3-3-2-1 اندازه گیری کمی فعالیت آنزیمی بتا-گالاکتوزیداز 49
3-3-2-2 رسم منحنی استاندارد اورتونیترو فنول 50
3-3-3 سنجش غلظت قند باقیمانده 51
3-3-3-1 رسم منحنی استاندارد قند 51

فصل چهارم: نتایج و بحث

4-1- نتایج آزمایشگاهی 54
4-1-1- بررسی میزان تولید بتا-گالاکتوزیداز از باکتری باسیلوس لیکنی فرمیس 54
4-1-2- تعیین زمان مناسب برای گرمخانه‌گذاری کشت میکروبی 54
4-1-3- بررسی منحنی رشد و مصرف سوبسترا در غلظت‌های اولیه متفاوت سوبسترا لاکتوز 55
4-1-4- بررسی منحنی تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در غلظت‌های اولیه متفاوت لاکتوز 58
4-1-5- بررسی منحنی سرعت تولید توده زیستی و آنزیم در غلظت‌های اولیه متفاوت لاکتوز 59
4-1-6- بررسی اثر بازدارندگی سوبسترا 60
4-2- مدلسازی 61
4-2-1- مدلسازی فرآیند تخمیر با استفاده از مدل‌های غیر ساختاری 61
4-2-2- فرضیات مدلسازی فرآیند تخمیر بتا-گالاکتوزیداز 62

4-2-3- تخمین پارامترهای سینتیکی فرآیند تخمیر 63

4-2-4- پیش‌گویی تغییرات رشد، مصرف سوبسترا و تولید محصول با استفاده از مدل‌ها 68

فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادات

5-1- نتیجه گیری 77

5-2- پیشنهادات 78

منابع 79

ضمائم 83

فهرست شکل‌ها

عنوان	صفحه
شکل 1-1: ساختار فضایی مولکول آنزیم بتا گالاکتوزیداز	9
شکل1-2: نمودار تکامل نژادی جنس باسیلوس	14
شکل 1-3: پیوند گلیکوزیدی در قند لاکتوز	19
شکل 1-4: منحنی رشد بسته در فازهای مختلف	26
شکل1-5: وابستگی سرعت رشد ویژه به غلظت سوبسترای محدود کننده	27
شکل 1-6: مراحل مدلسازی در فرآیندهای زیستی	30
شکل 1-7: نمودار مدل لودکینگ-پیرت	33
شکل 1-8: منحنی $1/\mu$ بر حسب $1/S$	36
شکل 1-3: منحنی استاندارد غلظت اورتونیتروفنل در مقابل جذب نوری	50
شکل 3-2: منحنی استاندارد غلظت قند در مقابل جذب نوری	52
شکل 4-1: تغییرات میزان تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز طی فرآیند تخمیر برای غلظت اولیه 40 g/l لاکتوز	55
شکل 4-2: تغییرات غلظت توده زیستی و سوبسترا طی فرآیند تخمیر	56
شکل 4-3: منحنی نیمه لگاریتمی تغییرات غلظت توده زیستی با زمان	58
شکل 4-4: تغییرات میزان تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز طی فرآیند تخمیر	59
شکل 4-5: تغییرات سرعت های تولید توده زیستی و تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز طی فرآیند تخمیر	60
شکل 4-6: تغییرات غلظت توده زیستی و سوبسترا طی فرآیند تخمیر، داده آزمایشگاهی و مدل موزر	69
شکل 4-7: تغییرات میزان تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز طی فرآیند تخمیر، داده آزمایشگاهی و مدل موزر	70
شکل 4-8: تغییرات غلظت توده زیستی و سوبسترا طی فرآیند تخمیر، داده آزمایشگاهی و مدل لجستیک	71
شکل4-9: تغییرات میزان تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز طی فرآیند تخمیر، داده آزمایشگاهی، مدل لجستیک	72
شکل 4-10: تغییرات غلظت توده زیستی و سوبسترا طی فرآیند تخمیر، داده آزمایشگاهی و مدل هالدن	73
شکل 4-11: تغییرات میزان تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز طی فرآیند تخمیر، داده آزمایشگاهی، مدل هالدن	74

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول 4-1: پارامترهای سینتیکی مدل موزر	64
جدول 4-2. پارامترهای سینتیکی مدل لجستیک	65
جدول 4-3: پارامترهای سینتیکی مدل هالدن	66

فهرست علائم و اختصارات

X	غلظت توده زیستی (g/l)
X_0	غلظت اولیه توده زیستی (g/l)
X_{max}	ماکزیمم غلظت توده زیستی (g/l)
P	مقدار فعالیت آنزیمی (U/ml)
P_0	مقدار اولیه فعالیت آنزیمی (U/ml)
S	غلظت سوبسترا (g/l)
S_0	غلظت اولیه سوبسترا (g/l)
μ	سرعت رشد ویژه (h^{-1})
μ_{max}	ماکزیمیم سرعت رشد ویژه (h^{-1})
d	سرعت مرگ سلولی (h^{-1})
A^0	ثابت رابطه آرنیوس برای سرعت رشد
$A^{0'}$	ثابت رابطه آرنیوس برای سرعت مرگ
E	انرژی فعال سازی در رابطه آرنیوس برای سرعت رشد ($kcal.mol^{-1}$)
E'	انرژی فعال سازی در رابطه آرنیوس برای سرعت مرگ ($kcal.mol^{-1}$)
R	ثابت جهانی گازها ($kcal.mol^{-1}K^{-1}$)
T	دمای مطلق (K)
$Y_{X/S}$	ضریب بازدهی توده زیستی (g cells /g Substrate)
$Y_{P/S}$	ضریب بازدهی محصول((U/ml)/(g/l))
m_S	ضریب بقا (h^{-1})
α	پارامتر وابسته به رشد ((U/ml)/(g/l cells))
β	پارامتر غیر وابسته به رشد ((U/ml)/(g/l cells. h))
K_S	ثابت اشباع مونود (g/l)

K_i	ثابت ممانعت کنندگی سوبسترا (g/l)
n	پارامتر توانی مدل موزر
K_T	ثابت معادله تیسر (g/l)
K_C	ثابت معادله کونتویس
R^2	ضریب همبستگی
r_X	سرعت رشد توده زیستی ($g/l\ h^{-1}$)
r_S	سرعت مصرف سوبسترا ($g/l\ h^{-1}$)
r_P	سرعت تولید محصول ($U/ml\ h^{-1}$)
t	زمان (h)
$C_{(ONP)}$	غلظت اورتونیترو فنل (mmol/l)

چکیده

ارائه مدل ریاضی مناسب برای سینتیک تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز در کشت غوطه ور

سیده الهه موسوی‌فر

آنزیم بتا-گالاکتوزیداز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های پرکاربرد در سه حوزه سلامتی، صنایع غذایی و محیط زیست است، لذا مدلسازی سینتیک تولید این آنزیم می‌تواند در بهینه سازی فرآیند تولید صنعتی آن نقش بسزایی داشته باشد. هدف از این تحقیق مدلسازی و تعیین پارامترهای سینتیکی فرآیند تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در کشت غوطه‌ور به کمک مدل‌های ریاضی مناسب می‌باشد. به همین منظور تخمیر بسته آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در کشت غوطه‌ور باکتری *Bacillus licheniformis* در چهار غلظت اولیه متفاوت قند لاکتوز (در محدوده 50-20 گرم بر لیتر)، به عنوان سوبسترای القاء کننده برای تولید این آنزیم صورت گرفت. نتایج نشان داد که در بالاترین غلظت اولیه لاکتوز (50 گرم بر لیتر)، از رشد بوسیله غلظت بالای سوبسترا ممانعت به عمل آمد، بطوریکه میزان فعالیت آنزیم (U/ml 6/46) و تولید توده زیستی (12/6 گرم بر لیتر) در این غلظت نسبت به سایر غلظت‌های اولیه لاکتوز، کمتر بود. پس از دستیابی به نتایج آزمایشگاهی مدل‌های غیر ساختاری مختلفی برای توصیف سینتیک سیستم‌های میکروبی معرفی شدند. با در نظر گرفتن اثر بازدارندگی سوبسترا از رشد سه مدل موزر، لجستیک و هالدن جهت بیان سرعت رشد ویژه باکتری و معادلات دیفرانسیل مالتوس، لودکینگ-پیرت و معادله مصرف سوبسترا به ترتیب برای بیان سرعت رشد باکتری، تولید آنزیم و مصرف سوبسترا استفاده شدند. مقادیر عددی پارامترهای سینتیکی این معادلات از حل هم زمان یکی از مدل‌های موزر، لجستیک و یا هالدن با مجموعه معادلات دیفرانسیل سرعت رشد، مصرف سوبسترا و تولید آنزیم در نرم افزار MATLAB تخمین زده شد. در پایان صحت استفاده از هر یک از سه مجموعه معادلات فوق، با اندازه گیری رگرسیون خطی بین داده‌های آزمایشگاهی و نتایج به دست آمده برای غلظت توده زیستی، غلظت سوبسترا و فعالیت آنزیمی بررسی شد. محاسبه مقادیر بالاتر از 0/95 برای ضریب همبستگی، نشان داد که این مدل‌ها تقریب خوبی از نتایج آزمایشگاهی برای توصیف سینتیک فرآیند تخمیر آنزیم بتا- گالاکتوزیداز را می‌دهند.

واژگان کلیدی: مدلسازی، سینتیک، تولید بتا-گالاکتوزیداز، تخمیر غوطه‌ور

مقدمه

فرآیند زیستی بخش مهمی از صنایع غذایی، شیمیایی و دارویی است. فرآیندهای زیستی با استفاده از سلول‌های میکروبی، حیوانی و گیاهی و ترکیبات وابسته به آن‌ها مانند آنزیم‌ها محصولات جدیدی را تولید و در عین حال با مصرف ضایعات صنایع باعث از بین رفتن پساب‌های مضر می‌شوند. استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تبدیل مواد زیستی به غذاهای تخمیری ریشه در دوران باستان دارد. صنایع گوناگون از فرآیندهای زیستی به منظور تولید طیف گسترده‌ای از محصولات تجاری با ارزش مانند آنتی بیوتیک‌ها، پروتئین‌های درمانی و واکسن، از مواد نسبتاً ارزانی مانند الکل صنعتی وحلال‌های آلی استفاده می‌کنند. آنزیم‌ها و سلول‌های زنده صنعتی پرکاربرد مانند مخمرهای نانوایی و آبجوسازی از محصولات تجاری حاصل از فرآیندهای زیستی هستند [1]. درک عمیق مفهوم فرآوری زیستی نیازمند شناخت واقعی کاربرد بیولوژی و میکروبیولوژی در این دست از فرآیندها است [2].

امروزه آنزیم‌ها و پروبیوتیک‌ها بخش مهمی از فرآورده‌های مورد مصرف در صنعت را تشکیل می‌دهند. گمان می‌رود که در آینده‌ای نه چندان دور، این ترکیبات جایگزین بسیاری از فرآورده‌های متداول امروزی گردند [3]. بتا-گالاکتوزیداز یکی از مهمترین آنزیم های صنعتی است که درصنایع مختلف بویژه صنعت غذا و دارو از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. عوامل اقتصادی همواره نقش اصلی را در تولید محصولات صنعتی از جمله محصولات با ارزش آنزیمی ایفا می‌کنند. به همین دلیل بررسی و تحلیل روند فرآیند تولید پیش از ورود به مقیاس صنعتی بسیار با اهمیت است. امروزه شبیه سازی بوسیله انواع نرم افزارهای مهندسی این مهم را ممکن ساخته است.

در فصل اول این پژوهش کلیاتی در مورد مباحث تئوری از جمله بررسی آنزیم‌ها، ساختمان و کاربرد آن‌ها بخصوص آنزیم بتا-گالاکتوزیداز و معرفی مدل‌های ریاضی مختلف بیان شده است. در فصل دوم مروری بر تحقیقات انجام شده در زمینه مدلسازی و تولید آنزیم بتا-گالاکتوزیداز ارائه شده است. درفصل سوم مواد وروش‌های آزمایش‌ها شرح داده شده است. درفصل چهارم نتایج تحقیقات آزمایشگاهی و نتایج حاصل از مدل‌های مختلف در دو بخش مجزا مورد بحث و بررسی قرار گرفته است و در نهایت داده‌های آزمایشگاهی و نتایج حاصل مدلسازی با یکدیگر مقایسه گردید. فصل پنجم نیز شامل نتیجه گیری کلی می باشد که در پایان آن پیشنهاداتی نیز ارائه گردیده است.

فصل اول

کلیات

1-1- آنزیم‌ها

موجودات زنده به واسطه وقوع انواع گوناگون واکنش‌های بیوشیمیایی توانایی ادامه حیات را کسب می‌نمایند. تقریباً تمامی این واکنش‌ها به وسیله گروهی از ترکیبات حیاتی موسوم به آنزیم‌ها انجام می شوند [3]. آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیستی با ماهیت پروتئینی هستند و بوسیله سلول‌های زنده (حیوانی، گیاهی و میکروبی) تولید می‌شوند. آنزیم‌ها به عنوان کاتالیست های ضروری واکنش‌های شیمیایی در موجودات زنده اعم از گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم ها را با کاهش انرژی فعالسازی به شیوه‌ای بسیار ویژه تسریع می‌کنند. تقریباً هر واکنشی در یک سلول نیازمند حضور آنزیم‌های ویژه است. در حقیقت وظیفه اصلی آنزیم‌ها در سیستم‌های زنده سرعت بخشیدن به عمل شکست پیوندهای شیمیایی است. بنابراین، همانند هر کاتالیزور دیگر، کاتالیزورهای زیستی سرعت واکنش را بدون اینکه خود متحمل تغییر شیمیایی پایداری شوند، افزایش می‌دهند. توانایی کاتالیزوری آنزیم‌ها به دلیل ساختار خاص پروتئینی آن‌ها است [4و 5].

عملکرد مناسب، عدم وجود باقیمانده، حفظ محیط زیست و ... از جمله موارد برتری آنزیم‌ها بر کاتالیزورهای متداول و مرسوم امروزی است. عوامل بسیاری از جمله شرایط نامساعد واکنش، ناپایداری آنزیم در طول فرآیند و یا هزینه های بالایی که تولید آنزیم خالص در مقیاس بالا دربردارد از جمله مشکلاتی است که تولید کنندگان در صنعت تولید آنزیم با آن‌ها روبرو هستند . مهارت‌های نوین در بیوتکنولوژی و نیز مهندسی ژنتیک زمینه‌ای را برای حل این مشکلات فراهم کرده‌اند. آنزیم شناسی، دانش مطالعه آنزیم‌ها، قدمتی برابر با اولین روزهای ظهور دانش بیوشیمی دارد [3].

1-1-1- تاریخچه آنزیم شناسی

این علم از اوایل قرن نوزدهم در جریان اهمیت یافتن فرآیندهای تخمیر، پا به عرصه وجود نهاد. در آغاز با مشاهده عدم انجام واکنش‌های بیوشیمیایی در آزمایشگاه، لوئی پاستور و سایر دانشمندان تصور نمودند که سیستم‌های زنده تحت تأثیر « نیروی حیاتی» هستند که به آن‌ها اجازه عدول از قوانین طبیعی حاکم بر مواد بی جان را می‌دهد. برخی محققین از جمله Justus von leibig پیشنهاد نمودند که فرآیندهای حیاتی تحت تأثیر مواد شیمیایی که در ابتدا «فرمانت» خوانده می‌شد، انجام می‌شوند.

کلمه آنزیم از لغت یونانی en به معنای «در» و Zyme به معنای «مخمر» در سال 1878 به منظور تاکید بر وجود عاملی در مخمر، غیر از خود آن، که فرآیند تخمیر را انجام می‌داد اقتباس گردید. بعدها Edward Buchner نشان داد که شیره عاری از سلول‌های مخمر می‌تواند سنتز اتانل از گلوکز (تخمیر الکلی) را انجام دهد. ترکیب شیمیایی آنزیم‌ها تا سال 1926 به درستی مشخص نشده بود تا اینکه Summer آنزیم اوره‌آز که واکنش هیدرولیز اوره به آمونیاک و دی‌اکسید کربن را کاتالیز می‌نماید به شکل متبلور به دست آورد و ثابت نمود که بلورهای مذکور ماهیت پروتئینی دارند. از آن زمان به بعد مطالعات آنزیم شناسی بطور گسترده‌ای نشان داد که اغلب آنزیم‌ها از جنس پروتئین هستند [3].

1-1-2- ساختار پروتئینی آنزیم‌ها

همانند تمامی پروتئین‌ها، آنزیم‌ها نیز از بیست اسید آمینه طبیعی تشکیل شده‌اند. ساختار فضایی سه بعدی آنزیم‌ها که باعث تسهیل عملیات کاتالیز می‌شود ناشی از نحوه استقرار اسیدهای آمینه در ساختمان آن‌ها است و بسته به نوع واکنش آنزیمی، اختصاصی بودن واکنش را دیکته می‌نماید. علاوه بر اسیدهای آمینه، بسیاری از آنزیم‌ها حاوی یک بخش غیر پروتئینی به نام کوفاکتور هستند که در انجام واکنش‌های شیمیایی آنزیم‌ها، نقش مکملی را ایفا میکنند [3].

1-1-3- مزیت آنزیم‌ها نسبت به کاتالیزورهای شیمیایی

آنزیم‌ها در مقایسه با کاتالیزورهای شیمیایی دارای ویژگی های اختصاصی می‌باشند که در اینجا به برخی از آن ها اشاره می شود [3و4].

1- آنزیم‌ها به طور ویژه عمل کرده و تنها یک یا چند واکنش شیمیایی را کاتالیز می‌کنند.
2- سرعت واکنش آنزیمی بسیار سریعتر از واکنش مشابهی است که با کاتالیست‌های غیر زیستی انجام می‌شود.
3- شرایط واکنش (دما، فشار، pH و ...) برای واکنش آنزیمی بسیار ملایم‌تر است.
4- آنزیم‌ها مولکول‌های نسبتا حساس و ناپایدار می‌باشند لذا در هنگام استفاده از آنها باید مراقبت‌های لازم به عمل آید.
5- واکنش های آنزیمی به ندرت دارای فرآورده‌های جانبی ناخواسته هستند.
6- امکان تنظیم برخی شرایط قابل کنترل در واکنش‌های آنزیمی وجود دارد.

1-1-4- منابع آنزیمی

اکثر آنزیم‌ها را می‌توان از میکروارگانیسم‌ها تولید کرد اما بیشتر آنزیم‌هایی که از نظر اقتصادی حائز اهمیت هستند، توسط تعداد محدودی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها که بر مبنای تجربه مورد استفاده قرار گرفته‌اند عمدتاً آن‌هایی هستند که در صنایع غذایی کاربرد دارند و به عنوان «آلودگی طبیعی غیر مضر[1]» مواد غذایی شناخته می‌شوند.

برخی از آنزیم‌ها مانند لیپتاز پانکراس تریپسین بطور سنتی از منابع حیوانی تهیه می‌شوند. اگرچه امکان تولید این آنزیم‌ها با فعالیت قابل قبول توسط میکروارگانیسم‌ها نیز وجود دارد اما تفاوت‌های ظریفی در آن‌ها وجود دارد که می‌تواند در کاربردشان مؤثر باشد. تلاش دانشمندان در این زمینه به ابداع بهره‌گیری از تکنیک‌های DNA نوترکیب[2] منتهی گردید و به کمک آن موفق به تولید آنزیم‌های حیوانی به روش کلون کردن[3] ژن مورد نظر از پستانداران در باکتری یا مخمر شدند.

گیاهان نیز یکی از منابع سنتی برای تهیه تعداد محدودی از آنزیم‌ها به شمار می‌روند. به عنوان مثال سیستئین پروتئاز از شیره درخت پاپایا، انجیر، آناناس و برخی گیاهان دیگر به دست می‌آید. شیره درختان را می‌توان به کمک نیروی کار غیر ماهر از میوه آن‌ها به دست آورد و مستقیماً به عنوان آنزیم خام مصرف نمود. این شیره غنی از آنزیم است.

به علت محدودیت‌های موجود در تهیه آنزیم‌ها از منابع گیاهی یا حیوانی، تولید آن‌ها از کشت سلول‌های گیاهی یا حیوانی مورد توجه قرار گرفته است. امروزه از نظر تکنیکی، برای رشد و تکثیر انبوه سلول‌های مذکور مشکلی وجود ندارد ولی به لحاظ اقتصادی به نظر نمی‌رسد که این شیوه در آینده نزدیک به عنوان روشی برای تهیه مقادیر زیاد آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. چراکه رشد این سلول‌ها در محیط کشت کند بوده و لذا جلوگیری از آلودگی محیط کشت آن‌ها دشوار است. مشکلات موجود در راه استفاده از فرآورده‌های آنزیمی گیاهی و حیوانی، میکروارگانیسم‌ها را به منابع اصلی آنزیم‌های صنعتی مبدل ساخته است [3].

1-1-4-1- آنزیم‌های میکروبی

میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت مناسب، به سرعت رشد کرده و تعداد زیاد و متنوعی از آنزیم‌های مفید را تولید و ترشح می‌نمایند. امروزه فناوری تولید این میکروارگانیسم‌ها در مقیاس صنعتی به خوبی شناخته شده است. میکروارگانیسم‌ها

[1] Normal harm less contaminants
[2] Recombinant DNA technology
[3] Cloning

دیواره سلولی متنوعی دارند به همین دلیل در بسیاری موارد، آنزیم ترشحی به جای اینکه در محیط کشت رها شود، به صورت مخلوط و همراه با ساختمان‌های غشایی دیده می‌شود. معمولاً صفت ترشحی به آنزیم‌هایی اطلاق می‌شود که از غشای سلول عبور کرده‌اند.

آنزیم‌های ترشحی دارای سه مزیت هستند[3]:

1) به علت ترشح آنزیم به خارج سلول، نیاز به استفاده از تکنیک‌های شکستن دیواره سلولی که به لحاظ صنعتی محدودیت مهم محسوب می‌شود، وجود ندارد.
2) به دلیل اینکه مقدار محدودی از پروتئین به خارج سلول ترشح می‌شود، جداسازی آنزیم مورد نظر از مخلوط ترشحی نسبتاً آسان است. در حالیکه آنزیم‌های درون سلولی را باید از سایر پروتئین‌ها و مواد همراه نظیر اسیدهای نوکلئیک (ماده ژنتیکی درون سلول) جدا نمود.
3) آنزیم‌های ترشحی به دلیل پایداری ساختمانی، نسبت به آنزیم‌های درون سلولی به ندرت ساختار خود را از دست داده و غیر فعال می‌شوند. به این ترتیب از نظر متخصصین آنزیم‌شناسی صنعتی، میکروارگانیسم‌ها به ویژه آن‌ها که آنزیم‌ها را ترشح می‌کنند بهترین مواد خام محسوب می‌شوند.

1-1-4-2- مزیت آنزیم‌های میکروبی

آنزیم‌های میکروبی کاربردهای گسترده‌ای در صنایع مختلف و پزشکی دارند. این دسته از آنزیم‌ها فعال‌تر و پایدارتر از آنزیم‌های گیاهی و حیوانی هستند. علاوه بر این، امکان کشت به مقدار زیاد در یک زمان کوتاه بوسیله تخمیر و حساسیت نسبت به دستکاری ژن، میکروارگانیسم‌ها را به منابع ارزشمندی جهت تولید آنزیم‌ها مبدل ساخته است. اهمیت و کاربردهای آنزیم‌های میکروبی آن‌ها را از نقطه نظر علم بیوتکنولوژی و صنعت برجسته ساخته است. به همین دلیل صنایع گوناگون به منظور تولید آنزیم‌های مختلف در جستجوی گونه‌های جدید میکروبی برای تأمین نیازهای آنزیمی متداول هستند [6]. در انتخاب نوع میکروارگانیسم مناسب جهت تولید آنزیم‌ها با کاربرد دارویی وغذایی در صنعت، توجه به استفاده از گونه های بی خطر برای استفاده انسانی (GRAS[1]) ضروری است [7].

[1] Generally Recognized As Safe