بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل
دانشکده مهندسی شیمی

جهت اخذ درجه کارشناسي ارشد در رشته مهندسی شیمی

موضوع:

تولید آنزیم لیپاز از سپوس برنج با استفاده از میکروارگانیسم *Aspergillus niger* در بیورآکتور سینی دار

استاد راهنما:
پروفسور قاسم نجف پور

استاد مشاور:
دکتر سلیمان محجوب

اساتید داور:
دکتر علی اصغر قریشی
دکتر مریم خاورپور

نام دانشجو:
سمانه محسنی

اسفند ماه 1390

تقدیم به

پدر بزرگوار و فداکار

و

مادر

دلسوز و مهربان

که در تمام مراحل زندگی پشتیبانم بوده اند.

با تشکر و قدردانی از

استاد بزرگوارم **جناب آقاي پروفسور قاسم نجف پور** که با زحمات بی دریغ و دلسوزانه خویش راهنمایی پایان نامه را بر عهده داشتند و **جناب آقاي دکتر محجوب** که مشاوره پایان نامه را تقبل فرمودند.

چکیده

آنزیم ها کاتالیزور واکنش های بیوشیمیایی هستند که سرعت فرایند های را افزایش می دهند. در میان آنزیم ها، آنزیم لیپاز (تری آسیل گلیسرول هیدرولاز) بعنوان آنزیمی لیپولیتیک کاربرد وسیعی در صنعت شامل: صنایع غذایی، دارویی، شوینده، چرم و تولید بیودیزل دارد. در این پژوهش آنزیم لیپاز بیرون سلولی در حالت تخمیر بستر جامد از سوبسترای سپوس برنج به کمك میکروارگانیسم *Aspergillus niger* NCIM584 در بیوراکتور سینی دار تولید شد. اثر پارامترهای عملیاتی، شامل: دوره زمانی تخمیر، دمای بیوراکتور، رطوبت داخلی بیوراکتور ، رطوبت اولیه سوبسترای جامد، ضخامت بستر سوبسترای جامد و اندازه ی ذرات سوبسترای جامدو نوع سوبسترای جامد و همچنین غنی سازی سوبسترای مورد نظر با منابع کربنی، نیتروژنی و روغن زیتون برای بهینه سازی تولید آنزیم لیپاز در تخمیر حالت جامد، مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت لیپازاستخراج شده پس از 96 ساعت با استفاده از سپوس برنج، در دمای 35°C بیوراکتور، رطوبت 90% بیوراکتور،ضخامت 1.5 سانتی‌متر بستر جامد، اندازه ذرات 0/18-0/335mm سوبسترا، رطوبت اولیه 50% سوبسترای جامد و غنی سازی با مخلوط مخمر وپپتون به عنوان منابع نیتروژنی و همچنین استفاده از روغن زیتون به عنوان محرک بدست امد که میزان متوسط فعالیت برای سینی اول و دوم تحت شرایط اپتیمم به ترتیب عبارت بودند از: 126/099 U/gds، 111/319 U/gds، 111/349U/gds، 140/692 U/gds، 237/848 U/gds، 262/883 U/gds، 227/933 U/gds، 233/806 U/gds و 237/646 U/gds . همچنین پایداری حرارتی انزیم تولید شده و اثر pH بر ان مورد مطالعه قرار

گرفت. نتایج نشان میدهد آنزیم تولید شده در دمای 50°C و pH برابر 6/5 بیشترین فعالیت را داشته است که به ترتیب عبارت بودند از: 240/889 U/gds ، 195/396 U/gds.

واژگان کلیدی: لیپاز، *Aspergillus niger* ، بیوراکتور سینی دار، سپوس برنج، تخمیر بستر جامد

فصل اول: مقدمه

(1-1) کلیاتی در مورد آنزیم ها

واژه انزیم از ترکیب دو لغت یونانی en در و zyme به معنای مخمر در سال 1878 میلادی و به منظور تاکید بر وجود عاملی در مخمر، غیر از خود مخمر، که فرایند تخمیر را است. دانش آنزیم‌شناسی تحول انجام می دهد، اقتباس گردیده عظیمی در صنایع بیوتکنولوژی ایجاد نموده است، بطوریکه به معنای

امروزه از بین 4000 آنزیم شناخته شده حدود 200 نوع آن در صنایع مختلف کاربرد دارند. درآمد حاصل از فروش آنزیم‌های صنعتی تا دهه 60 میلادی تنها چند میلیون دلار در سال بود اما با رشد چشمگیر این صنعت، این درامد در سال 2000 به حدود 1/5 میلیارد دلار رسید. در حال حاضر تامین آنزیم‌های صنعتی در جهان بر عهده 12 تولید کننده عمده و 400 تولید کننده جزء است که 60% این محصولات در اروپا ساخته می شود. آنزیم‌های هیدرولیتیکی چون پروتئازها[1]، آمیلازها[2]، استرازها[3] و لیپازها[4] بخش عمده ای از داد و ستد آنزیم‌های صنعتی (حداقل 75%) را در بر می گیرند و اغلب منشاء میکروبی دارند لیپازها بعد از پروتئازها و کربوهیدرازها در مرتبه سوم بازار جهانی آنزیم قرار دارند و در حدود 5% از کل بازار جهانی آنزیم را به خود اختصاص می دهند[1-3].

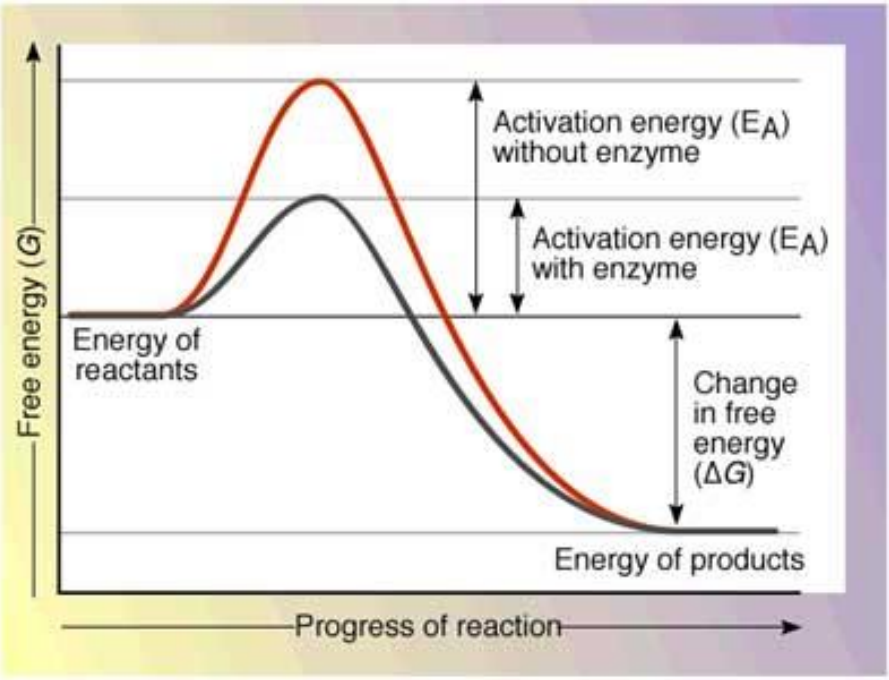
آنزیم‌ها کاتالیزورهای زیست شناختی با ماهیت پروتئینی هستند و توسط موجودات زنده، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می شوند. انجام تمامی واکنش‌ها در سلول زنده به آنزیم خاصی نیازمند است[4].

آنزیم‌ها بزرگترین و تخصصی‌ترین گروه مولکولهای پروتئینی در داخل سلول هستند، آنها ماکرومولکول‌های بزرگی با وزن مولکولی بین 10000تا 1000000 می باشدخصوصیت متمایز کننده یک واکنش آنزیمی این است که این واکنش در داخل یک محدوده واقع در ساختار آنزیم به نام جایگاه فعال، انجام می شود که در آن ریشه‌های اسید آمینه قرار دارند که گروه‌های

[1] Protease
[2] Amylase
[3] Esterase
[4] Lipase

استخلاف شده آنها با سوبسترا واکنش نموده و تبدیل شیمیایی آن را کاتالیز می‌نماید. در واقع جایگاه فعال[5] آنزیمی بصورت شکافی بر روی آنزیم قرار دارد[5-7].

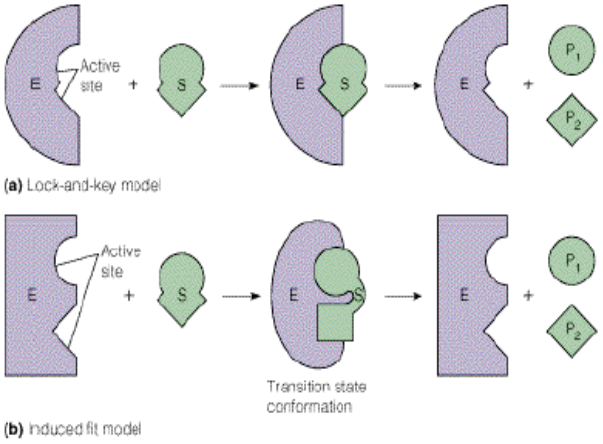
دو مشخصه مهم آنزیم، ماهیت گزینش پذیری و تسهیل سرعت واکنشی می باشد. ماهیت گزینشی بدین معنی است که آنزیم تبدیل ماده شیمیایی را از طریق کانال مشخص کاتالیز می‌کند. بسیاری از واکنش‌ها از لحاظ ترمودینامیکی امکان پذیر است ولی این واکنش‌ها بخودی خود و با سرعت خاص در شرایط عادی وجود آنزیم مناسب این امکان را فراهم دما و فشار رخ نمی‌دهد می‌نماید که واکنش شیمیایی از طریق خاصی کنترل و هدایت شود[5, 8].



شکل 1-1- مکانیزم اثر آنزیم بر روی انرژی واکنش[9]

[5] Active site

دو مدل متفاوت برای اتصال سوبسترا به جایگاه فعال آنزیم پیشنهاد شده است. مدل ساده ای که این خصوصیت را شرح می‌دهد مدل قفل و کلید[6] است، در این مدل آنزیم همانند قفل و سوبسترا همانند کلید عمل می کند در واقع جایگاه فعال آنزیم دقیقا مناسب سوبسترا است. در مقابل در مدل دیگر، اتصال سوبسترا باعث تغییر در ساختارآنزیم می شود تا سوبسترا به بهترین نحوه درون جایگاه فعال قرارگیرد [8-9].



شکل1-2- شماتیک از مدل های ارئه شده برای جایگاه فعال آنزیمی[9]

[6] Lock and key model

نیاز به بیوکاتالیز، استفاده از آنزیم ها را به عنوان کاتالیست در فرایند های صنعتی ضروری می‌نماید، اما برای استفاده از آنزیم‌ها باید شرایط فیزیولوژیکی مناسب باشد، بنابراین تبدیل آنزیم‌ها به کاتالیست‌هایی با قابلیت اجرا تحت شرایط سخت واکنش، چالش مهمی محسوب می شود. برخی ویژگی های مثبت و منفی آنزیم‌ها به عنوان کاتالیست مورد استفاده در فرایندهای صنعتی در جدول 1-1 ارائه شده است[10].

جدول 1-1 خصوصیات آنزیم به عنوان کاتالیست صنعتی[10]

ویژگی های مثبت	ویژگی های منفی
انتخاب پذیری بالا	پیچیدگی مولکولی بالا
فعالیت بالا تحت شرایط ملایم	بالای تولید هزینه
سرعت بالای عملکرد آنزیم	پایداری ضعیف

و بیولوژی مولکولی[7] براساس سازمان بین المللی بیوشیمی (IUBMB) نام رسمی آنزیم‌ها از دو بخش تشکیل می شود. قسمت اول نام سوبسترا یا محصولات واکنش می باشد و قسمت دوم نشان دهنده نوع واکنشی است که کاتالیز می شود[11]. بر این اساس آنزیم‌ها به شش گروه کلی تقسیم بندی می‌شود که در جدول (1-2) ارائه شده است[12].

[7] International Union of Biochemistry and Molecular Biology

جدول 1-2 گروه های آنزیمی[12]

گروه آنزیمی	واکنش کاتالیزوری
اکسیدردوکتازها[8]	کاتالیز واکنش‌های اکسیداسیون و احیا
ترانسفرازها[9]	کاتالیز واکنش‌های انتقال گروه
هیدرولازها[10]	کاتالیز واکنش‌های تجزیه (در حضور آب)
لیپازها[11]	کاتالیز واکنش‌های تجزیه از راه‌هایی جز هیدرولیز و اکسیداسیون
ایزومرازها[12]	کاتالیز واکنش‌های ایزومره شدن
لیگازها[13]	کاتالیز واکنش‌های سنتز

هدف از انجام این تحقیق، تولید آنزیم لیپاز[14] به روش تخمیر حالت جامد با استفاده از میکروارگانیسم *Aspergillus niger* می باشد. یک بیوراکتور سینی‌دار به منظور محقق گشتن این هدف طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. شرایط مختلف بیوراکتور

[8] Oxidoreductase
[9] Transferase
[10] Hydrolases
[11] Lyase
[12] Isomerase
[13] Ligase
[14] Lipase

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، روش‌هاي آزمایشگاهي و اندازه‌گیري، پارامترهای طراحی و عملیاتی 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.

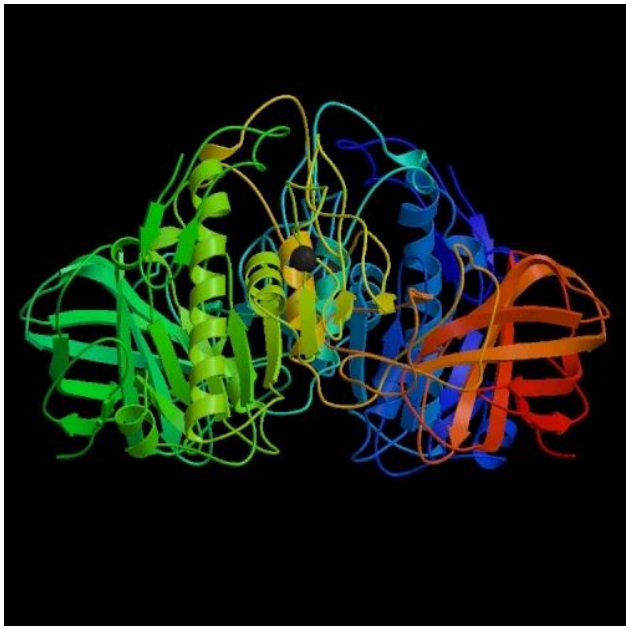
فصل دوم: کلیاتی در مورد لیپازها

لیپازها1)-(2

حدود 100 سال قبل میکروب شناسی به نام آیکمان[15] برای اولین بار ترشح 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 و بطوریکه امروزه سالانه در حدود 1000 مقاله در این مورد منتشر می‌شود، همچنین لیپاز ها سهم برجسته ای در بازار آنزیم دارند و پس از

[15] Eijkmann

پروتئازها و آمیلازها رده سوم فروش جهانی را به خود اختصاص داده اند[1, 13].

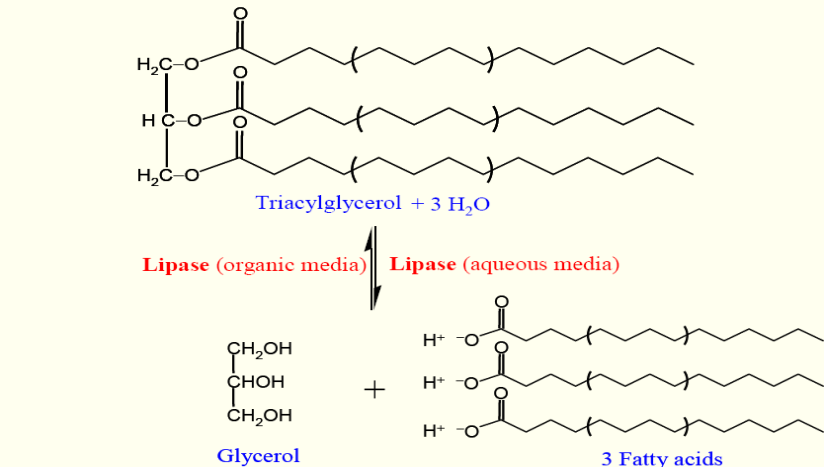


شکل 2-1- تصویر ساختار سه بعدی از لیپاز میکروبی استخراج شده از *Aspergillus orazae*

تری آسیل گلیسرول آسیل هیدرولازها[16] (لیپازها (Ec 3.1.1.3)) کربوکسیل استرازهایی هستند که در محیط های آبی بر روی پیوندهای آسیل گلیسرول تاثیر گذاشته و منجر به آزاد شدن اسید چرب و گلیسرول آنها می‌شوند. سوبسترای طبیعی لیپازها تری آسیل گلیسرول هایی هستند که دارای زنجیر بلند اسید چرب می باشند و از اینرو حلالیت کمی در آب دارند[14-15]. لیپازها واکنش هیدرولیز را در سطح مشترک فاز آبی _چربی کاتالیز می نمایند وبه همین دلیل از کربوکسیل استرازهایی

[16] Triacylglycerol ester hydrolases

مانند پروتئازها که روی سوبسترای محلول در مایع اثر می کنند متفاوت هستند. در کنار این قابلیت، در محیط های کم آب لیپازها قادر به انجام واکنش معکوس نیز می باشند و در این شرایط واکنش های استریفیکاسیون[17]، ترنس استریفیکاسیون[18] و همچنین سنتز پپتیدها و دیگر مواد شیمیایی را انجام می دهند [15-18].

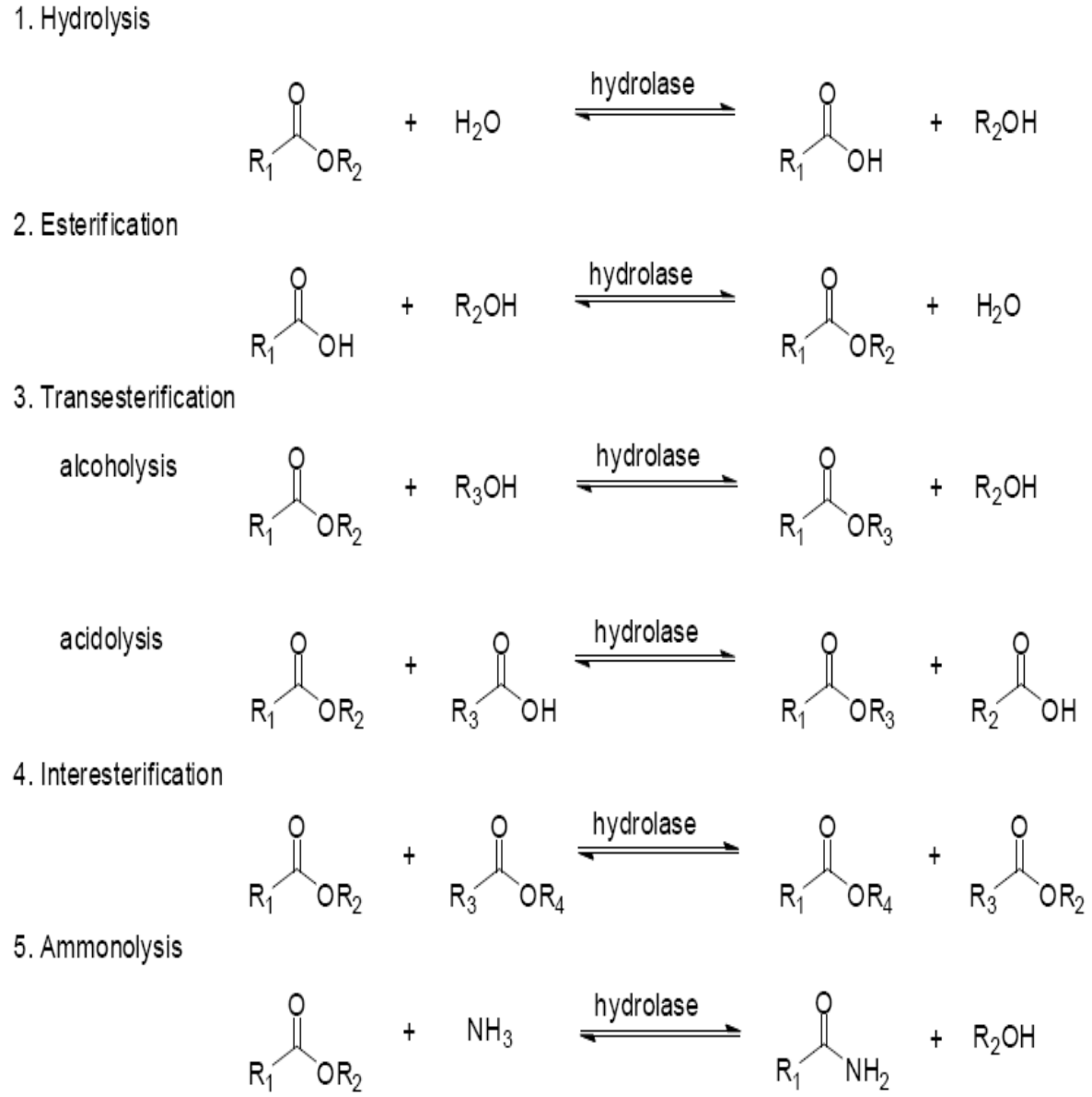


شکل 2-2- واکنش هیدرولیز تری آسیل گلیسرول توسط لیپاز[19]

لیپازها اختصاصیت بالایی در رابطه با ساختار شیمیایی، شکل فضایی مولکول و محل اثر در سوبسترا از خود نشان می‌دهند. با استفاده از میکروارگانیسم هایی چون قارچ‌ها و باکتری‌ها مقادیر زیادی لیپاز تولید شده است و ساختار بلوری بسیاری از آنها مورد بررسی قرار گرفته است . نتایج این مطالعات منجر به مهندسی پروتئین و ایجاد تغیر در

[17] Esterification
[18] Trance esterification

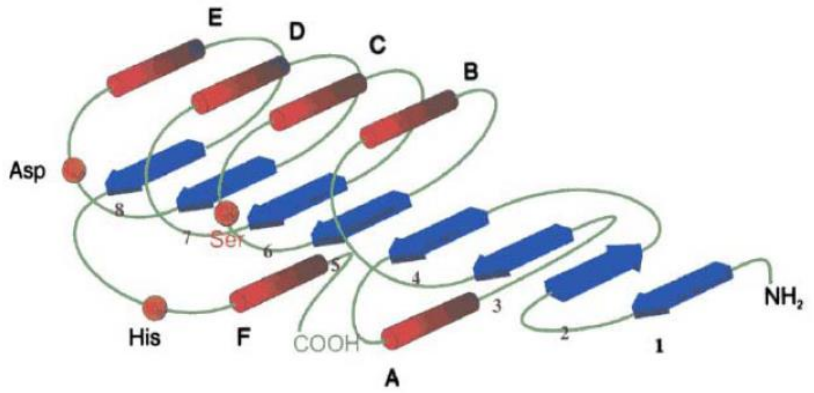
ساختار این آنزیم ها شده است و همچنین نشان داده شده که لیپازها معمولا نیازی به کوفاکتور ندارند و محصولات جانبی نیز تولید نمی کنند[17].



شکل2-3- تعدادی از واکنش های کاتالیز شده توسط لیپازها [17-18]

(2-2) ساختار و عملکرد لیپازها

لیپازها از لحاظ ساختاری عضو خانواده α/β هیدرولازها می‌باشند. خانواده α/β هیدرولازها شامل آنزیم‌های متنوعی مانند: استرهیدرولازها، لیپیدهیدرولازها، تیواسترهیدرولازها، پپتیدهیدرولازها، هالوپراکسیدازها، دهالوژنازها و آنزیم‌های تجزیه کننده پیوند c-c هیدرولازها α/β معمول ساختار است. دارای 8 زنجیره موازی β و تعدادی مارپیچ α است . این 8 زنجیره β صفحه ای را می‌سازند که مایل است و منجر به ایجاد زاویه 90 درجه ای بین اولین زنجیره و آخرین زنجیره β می شود. در دو طرف این زنجیره β زنجیره‌های α قرار می گیرند . این مارپیچ‌ها به صورتی قرار می‌گیرند که اولین و آخرین مارپیچ α در یک سوی صفحه β مرکزی و سایر زنجیره ها ی α در سوی دیگر آن قرار دارند[19-20].



شکل 2-4- ساختار α / β هیدرولاز در لیپازها[15, 19]

بسیاری از اعضای خانواده α/β هیدرولازها دارای ضمائمی هستند که بصورت حلقه‌هایی در بخش کربوکسیلیک پروتئین قرار دارند. این ضمائم که به آنها سرپوش یا کلاهک گفته می‌شود نقش مهمی در شکل گیری آنزیم دارند. آزمایشات مختلف آشکار نموده است که این سرپوش یا کلاهک جایگاه فعال آنزیم را پوشانده و مانع از دسترسی سوبسترا به آن می‌شود. وجود یک سطح مشترک بین آب و روغن منجر به کنار رفتن سرپوش از روی جایگاه فعال آنزیم شده که به این حالت فعال سازی بین سطحی[19] گفته می‌شود. .بنابراین در حالت باز آنزیم[20] ساختار سرپوش در اثر نیروهای آبگریز بوجود آمده در سطح آنزیم کنار می‌رود و سوبسترا به جایگاه فعال متصل می‌شود. در پاره ای از اوقات لیپازهایی نیز یافت می‌شود که دارای ساختار سرپوش بوده، ولی فاقد توانایی فعال سازی بین سطحی می‌باشند[15, 19].

وجود یک سطح مشترک آب–چربی در فعال‌سازی لیپازها نقش مهمی بازی می‌کند. در این زمینه مدلی بنام ورگر[21] پیشنهاد شده است که بر تعادل بین ساختارهای باز و بسته لیپازها در محلول تاکید دارد. به نظر می‌رسد که تنها حالت باز آنزیم در محلول فعالیت داشته باشد. فعالیت کم لیپازها در حضور سوبستراهای محلول در آب بدین وسیله توجیه می‌شود که بدلیل سطح انرژی نامناسب جایگاه فعال آبگریز در محلول آبی،

[19] Interfacial activation
[2] Open lid
[21] Verger

تنها قسمتی زمانیکه سطح آبگریز چربی در محلول وجود ندارد. از مولکول‌های لیپاز حالت باز دارند، بنابراین هنگامی‌که قطره چربی وارد سیستم می شود و یک سطح آبگریز وسیع برای لیپازها ایجاد می شود، لیپازها باز جذب اجتماعات چربی می شوند در این زمان حالات باز و بسته در محلول به تعادل می رسند. این مکانیزم راهی موثر برای تنظیم فعالیت لیپولیتیک را با استفاده از میزان سوبسترا معرفی می کند[15, 19].