مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره نوزدهم - تابستان ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

رایزوپوس اوریزا تثبیت‌یافته بر لوفا اسفنجی و نقش آن در تولید لیپاز درون‌سلولی

هدی خصالی اقطاعی[1]، سمانه ستاری[1]، فرزانه وهابزاده[2*]

۱-کارشناسی ارشد، گروه مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

۲- استاد یار ، گروه مهندسی شیمی بیوتکنولوژی- صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر ،تهران، ایران

چکیده

سابقه و اهداف: آنزیم لیپاز (۳،۱،۱،۳.EC) به عنوان عضوی از گروه کربوکسیلیک استر هیدرولازها، کاتالیز آبکافتی تری‌آسیل‌گلیسرول را جهت آزاد سازی اسیدهای چرب، گلیسریدها و گلیسرول به عهده دارد. با شناخت توانایی لیپاز جهت کاتالیز واکنش استریفیکاسیون، فصل گسترده‌ای در زمینه کارایی‌های این آنزیم آغاز شده است. قارچ رایزوپوس اوریزا، از جمله منابع میکروبی شناخته شده در تولید آنزیم لیپاز است. تمرکز مطالعه حاضر بر روی تعیین زمان بهینه رشد قارچ جهت تولید و نگه‌داشت آنزیم لیپاز درون-سلولی است و همچنین فعالیت استریفیکاسیون سلول های کشت یافته به فرم آزاد و تثبیت‌یافته مقایسه شد. بیوکاتالیست سلولی تولیدی جهت کاتالیز واکنش سنتز استر نرمال-بوتانول و اولئیک اسید تنظیم شد و پیشرفت واکنش مذکور در حضور و عدم حضور غربال‌های مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: سلول های رایزوپوس اوریزا تثبیت یافته بر پایه لوفای اسفنجی جهت مقایسه با فرم کشت آزاد سلول تهیه شد. سنجش فعالیت استریفیکاسیون از روش کدورتسنجی و با تعیین میزان اسید چرب باقی مانده در محلول واکنش انجام شد.

یافته‌ها: بر طبق سنجش‌های انجام شده بیوکاتالیست سلولی به هر دو فرم تثبیت‌یافته و آزاد در زمان کشت ۴۸ ساعت حداکثر فعالیت استریفیکاسیون دارند. همچنین تثبیت سلولی سبب افزایش فعالیت استریفیماسیون سلولی می‌شود (۴ برابر). ماکزیمم بازده تولید استر پس از برقراری تعادل در ۹ ساعت ۸۶ گزارش شده است که در حضور غربال‌های مولکولی این بازده تا ۹۶ بهبود می‌یابد.

نتیجه‌گیری: تثبیت سلولی اثر به سزایی در بهبود فعالیت سنتزی آنزیم لیپاز درون سلولی دارد. هم چنین زمان کشت سلول از اهمیت ویژه‌ای در تعیین میزان ترشح آنزیم لیپاز به خارج از سلول برخوردار است. حذف آب توسط غربال‌های مولکولی یک روش مناسب جهت افزایش بازده فرایندهای استریفیکاسیون است.

کلمات کلیدی: رایزوپوس اوریزا- لوفا اسفنجی- لیپاز درون سلولی – غربال‌های مولکولی آب– بوتیل اولئات

مقدمه

در سال‌های اخیر استفاده از فرایندهای بیولوژکی در سنتز استرها با توجه به معایب روش شیمیایی، توجه زیادی را به خود جلب نموده است (۱۱). معایبی از جمله استفاده از کاتالیزگرهای اسیدی، نیازمندی به فرایندهای بالادستی پرهزینه، زمان طولانی، دمای بالا و بازدهی اندک در روش شیمیایی قابل توجه هستند که با استفاده از فرایندهای بیولوژیکی که تحت شرایط متعادل زیستی توسط بیوکاتالیست‌ها و با عملکرد اختصاصی آن‌ها بر سوبسترا رخ می‌دهند برطرف خواهند شد (۱۶-۱۴).

آنزیم لیپاز (تری آسیل گلیسرول هیدرولاز (۳،۱،۱،۳ EC) توانایی کاتالیز واکنش هیدرولیز استر (تری آسیل گلیسرول‌های زنجیره بلند) در محیط آبی و سنتز انواع استرها در محیط‌های آلی را دارا است. انواع واکنش های کاتالیز شده توسط آنزیم لیپاز را می‌توان به صورت زیر طبقه بندی کرد.

هیدرولیز استرهای زنجیره بلند

$$RCOOR' + H_2O \Leftrightarrow RCOOH + R'OH$$

واکنش سنتز استر که می‌توان آن را به زیرگروه‌های زیر تقسیم بندی کرد:

۱،۲. سنتز مستقیم استر از الکل و اسید

$$RCOOH + R'OH \Leftrightarrow RCOOR' + H_2O$$

نویسنده مسئول: گروه مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران

پست الکترونیکی :Far@aut.ac.ir

تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۰۷/۲۸
تاریخ پذیرش : ۱۳۹۴/۰۴/۰۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]

۲,۲. اینتر استریفیکاسیون[۱]

$$'RCOOR'+R''COOR^{*} \Leftrightarrow RCOOR^{*}+ R''COOR$$

۳,۲. اسیدولیز[۲]

$$RCOOR'+R''COOH \Leftrightarrow R''COOR' + RCOOH$$

۴,۲. الکل لیز[۳]

$$RCOOR' + R''OH \Leftrightarrow RCOOR'' + R'OH$$

سه واکنش آخر در مجموع واکنش‌های ترانس-استریفیکاسیون[۴] نامیده می‌شوند که محصول استری در اثر انتقال گروه آلی به استر موجود تولید می شود (۵).

با توجه به حضور گسترده لیپیدها در طبیعت، آنزیم لیپاز در اکثر جانداران به صورت طبیعی تولید می‌شود. از میان منابع حیوانی ،گیاهی و میکروارگانیسم‌ها؛ آنزیم لیپاز تولیدی توسط منابع میکروبی؛ قارچی و باکتریایی کاربرد گسترده ای در زمینه‌های بیوتکنولوژی خود نشان داده اند (۵). لیپازهای قارچی به علت هزینه پایین استخراج، مقاومت به pH و حرارت و گزینش پذیری سوبسترا در مقایسه با لیپازهای باکتریایی بیشتر کاربرد دارند.

قارچ‌های رشته ای به صورت گسترده در صنعت جهت تولید محصولاتی مانند اسیدهای آلی، آنزیم، آنتی بیوتیک‌ها و داروهای کاهش کلسترول استفاده می‌شوند.[۵] رشد قارچ‌ها در کشت غوطه‌ور با توجه به شرایط محیط کشت، مورفولوژی‌های مختلف از جمله میسلیوم[۶]، توده‌ای[۷] و یا به فرم پلتی[۸] نشان می‌دهد. بسیاری از تحقیقات بر روی نحوه رشد و اثر آن بر محصول تولیدی صورت گرفته است (۷). در بیوراکتورها فرم رشته ای و توده ای ویسکوزیته محیط را بالا می‌برند، به دور پره‌های بیوراکتور می‌پیچند و مسیرهای انتقال مواد غذایی را مسدود می‌کنند. همه این موارد سبب کاهش بازدهی سیستم خواهد شد (۱۱). فرم پلتی رشد قارچ نه تنها به جهت کاهش ویسکوزیته سیستم و احتمال پوشاندن پره همچنین به جهت بهبود رئولوژی سیستم و افزایش انتقال جرم و اکسیژن و در نتیجه کاهش مصرف انرژی جهت هوادهی و هم زدن؛ به عنوان بهترین مورفولوژی رشد برای فرایندهای صنعتی انتخاب شده است (۱۲). سرعت چرخش انکویاتور (تامین اکسیژن)، مواد محیط کشت، pH، تنش‌های اکسیژن، افزودنی‌های پلیمری، ویسکوزیته محیط، مواد فعال ساز سطحی، میزان مایع تلقیح از جمله عواملی هستند که بر رشد به فرم پلتی موثر می‌باشند (۱۲-۱۰)

تثبیت قارچ‌های رشته‌ای بر پایه های مناسب یکی از راه‌های بهبود مشکلات سیستم‌های قارچی است. در سیستم قارچی رایزوپوس اوریزا تثبیت سبب افزایش مورفولوژی رشد به فرم پلتی می‌شود همچنین از ترشح آنزیم به خارج سلول جلوگیری و سبب بهبود تولید آنزیم لیپاز به فرم درون سلولی می‌شود (۶). علاوه بر مزایای ذکر شده تثبیت سلول امکان بازیابی توده زیستی و استفاده متوالی از آن را به سیستم می‌بخشد (۱۶) .

تعیین محیط کشت سلول اثر بسزایی در تولید آنزیم لیپاز و ترشح آن به خارج از سلول یا نگاه‌داشت آن در درون سلول دارد (۱۵-۱۳). وانگ[۹] همکارانش در سال ۲۰۰۸ اجزا محیط کشت سیستم سلولی قارچ رایزوپوس کینسیس[۱۰] را جهت افزایش آنزیم لیپاز درون سلولی بررسی کردند و دریافتند که روغن زیتون که حاوی مقادیر بالایی از اولئیک اسید است جهت القا آنزیم لیپاز درون سلولی و نیز تولید در مقیاس صنعتی مفید خواهد بود(۱۵).

لیپاز درون سلولی قارچ‌های رشته‌ای توانایی کاتالیز واکنش شکست لیپیدها را داراست. بنابراین سلول های قارچی خشک شده توسط استن را به طور مستقیم می‌توان در واکنش‌های هیدرولیز و سنتز استر به عنوان بیوکاتالیست سلولی استفاده کرد. این روش نیازمند مراحل پیچیده بازیابی آنزیم، تخلیص و تثبیت آنزیم ندارد. لذا به علت سادگی عملکرد و کاهش هزینه اهمیت ویژه در بهینه سازی شرایط صنعتی خواهد داشت. با این وجود به دلیل پایین بودن اکتیویته ویژه سلول های بررسی شده استفاده از آن‌ها محدود شده است (۲).

از دیدگاه بیوتکنولوژی پیشرفت واکنش‌های آنزیمی در حضور حلال آلی نسبت به آب، شامل فوایدی از جمله موارد زیر می‌شود:

حلالیت بالای مواد آلی در بستر غیر آبی.

امکان پیشبرد فرایندهایی که در سیستم آبی به علت محدودیت‌های سنتیکی و یا ترمودینامیکی امکان پذیر نمی‌باشد.

پایداری بیشتر آنزیم و عدم انحلال آنزیم در حلال آلی که امکان بازیابی و استفاده مجدد از آنزیم را فراهم می‌کند.

سهولت نسبی جداسازی محصول از حلال آلی نسبت به آبی.

افزایش بازدهی سیستم (به خصوص در ارتباط با سیستم‌های ویسکوز) ؛ به علت بهبود شرایط انتقال جرمی (۱۷).

---

۱ -Interesterification
۲ - Acidolysis
۳ - Alcoholysis
٤ -Transesterification
٥ -Morphology
٦ -Mycelia
۷ Clump
۸ Pellet
۹ -Wang *et al.*
۱۰ -*Rhizopus chinesis*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]

بیودیزل به عنوان یک جایگزین مناسب برای سوخت‌های فسیلی، با بهبود مشکلات اقتصادی ،زیست محیطی و اجتماعی سوخت‌های فسیلی یکی از سرفصل‌های مهم در مطالعات اخیر است. از جمله معایب بیودیزل می‌توان به ویسکوزیته بالای آن نسبت به سوخت‌های فسیلی اشاره کرد. موتورهای دیزلی جدید با سیستم سوخت رسانی تزریقی، نسبت به تغییرات ویسکوزیته سوخت حساسیت دارند و اختلاط ناکافی سوخت و هوا سبب ضعف درکارایی سیستم تزرقی و در نتیجه سوخت ناقص؛ تولید دود ، همچنین چسبیدن رینگ ،انسداد فیلتر و تولید رسوب در موتور می‌شود (۱۰). هرچه ویسکوزیته سوخت بالاتر باشد تمایل سوخت به ایجاد مشکلات مذکور بیشتر می‌شود. از این رو کاهش تغییرات ویسکوزیته یک راه حل مناسب جهت حل این مشکل است. در میان استرهای تجاری تولید شده ۱-بوتیل-اولئات کارایی گسترده‌ای در زمینه افزودنی‌های سوخت‌های دیزلی دارد و سبب کاهش تغییرات ویسکوزیته سوخت در دماهای پایین می‌شود. همچنین حضور ۱-بوتیل اولئات در لایه‌های پلیمری پلی‌وینیل‌کلرید(PVC) سبب ایجاد پلیمری با انعطاف‌پذیری بالا می‌شود. از سایر موارد کاربرد این استر می‌توان کاربری به عنوان عامل مقاوم در برابر آب در سیال‌های هیدرولیک و نیز مصرف آن در صنایع آرایشی و غذایی اشاره کر د (۱۱). در مطالعه حاضر هدف بهبود فعالیت استریفیکاسیون آنزیم لیپاز درون سلولی رایزوپوس اوریزا ، با استفاده از تکنیک تثبیت سلولی و تعیین زمان کشت مناسب جهت دستیابی به حداکثر فعالیت این آنزیم است. در ادامه با توجه به کارایی گسترده استر ۱-بوتیل اولئات درصنایع مختلف، سنتز استر ۱-بوتیل‌اولئات با استفاده از بیوکاتالیست تولیدی بررسی شد و بازده آن در حضور و عدم حضور جاذب‌های محصول جانبی جهت دستیابی به حداکثر بازده در شرایط واکنش بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد

اولئیک اسید، ایزو اکتان از شرکت کارلو اربا ایتالیا[۱۱] نرمال بوتانل، هگزان، و سایر مواد لازم جهت تهیه محیط کشت از شرک مرک آلمان [۱۲]خریداری شد. روغن زیتون اوجی بلانکا[۱۳] ساخت کشور اسپانیا از منابع محلی تهیه گردید . میکروارگانیزم رایزوپوس اوریزا به فرم کشت جامد با کد (PTCC۵۱۷٤) از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد.

۱۱ - Carlo Erba (Italy)

۱۲ - Merck (Germany

۱۳ -Houji Blanka

پایه تثبیت

لوفا اسفنجی به جهت درصد تخلخل بالا، حجم مخصوص بالای حفرها، خواص فیزیکی پایدار، غیر سمی بودن، تجزیه‌پذیری زیستی، هزینه پایین و سادگی دسترسی بسترهای مناسبی جهت رشد میکروارگانیسم ها به شمار می‌روند. دیسک های لوفا و با شعاع ۱/۵ cm و ضخامت۰/۲-۰/۴ cm بریده شد. پس از آن به مدت ۱ ساعت با آب مقطر جوشانده و هر ۱۵ دقیقه آب آن تعویض شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰°C خشک و تعداد ۱۲ عدد از آن برای هر ۱۰۰ ml محیط کشت توزین شد.

شرایط کشت میکروارگانیزم

جهت تکثیر قارچ رایزوپوس اوریزا ابتدا قارچ خریداری شده توسط لوپ بر روی اسلنت‌های حاوی محیط کشت جامد (۴٪ PDA[۱۴] و ۲٪ آگار) انتقال و در دمای ۲۴ °C به مدت هفت روز نگه داری می‌شود (۶). سپس با استفاده از آب مقطر استریل محلول اسپور از کشت جامد تهیه شد و به روش هموسیتومتر شمارش گردید. میزان ۱ ml از محلول با غلظت (spore/ml) ۸ ۱۰×۵ به ۱۰۰ ml از محیط کشت مایع استریل حاوی۰/۱ g نیترات سدیم، ۰/۱ g پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۰۵ g منیزیم سولفات هفت آبه، ۷g پلی پپتون و ۳g روغن زیتون در ۱۰۰ گرم آب مقطر داخل یک ارلن ۵۰۰ ml ریخته و pH=۵/۶ تنظیم شد (۶). ارلن حاوی لوفا جهت تثبیت سلول و محیط کشت بدون پایه تثبیت برای کشت آزاد سلول تلقیح شد و در دمای ۳۰ °C و ۱۵۰rpm و برای مدت زمان‌های متفاوت گرم‌خانه گذاری شد. پس از مدت زمان مشخص توده قارچی توسط فیلتر از محیط کشت جدا شد و پس از شستشو به روش ذکر شده در مرجع (۶) جهت خشک شدن در آون خلأ در دمای محیط به مدت ۴۸ ساعت نگه داری شد. شکل۱ نمایی از لوفا قبل و بعد از تثبیت قارچ رایزوپوس اوریزا می‌دهد.

منحنی رشد و تخمین میزان توده‌زیستی

۱۸ نمونه ارلن حاوی ۵۰ mL محیط کشت پایه، تهیه شده در ارلن ۲۵۰mL، جهت استریل شدن داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ C° و فشار ۱۵ psi قرار داده شد. پس از سرد شدن محیط کشت استریل تا دمای محیط ۰/۵ ml از محلول اسپور تهیه شده حاوی۱۰۸ × ۲/۵ اسپور به آن تلقیح و در دمای ۳۰°C و دور ۱۵۰rpm داخل شیکر انکوباتور برای مدت زمان مشخص کشت داده شد. محیط کشت سلول توسط فیلتر شماره ۱ واتمن[۱۵] جداسازی و کاغذ فیلتر حاوی توده زیستی توسط آب

۱٤ -Potato dextrose agar

۱۵ -Wathman

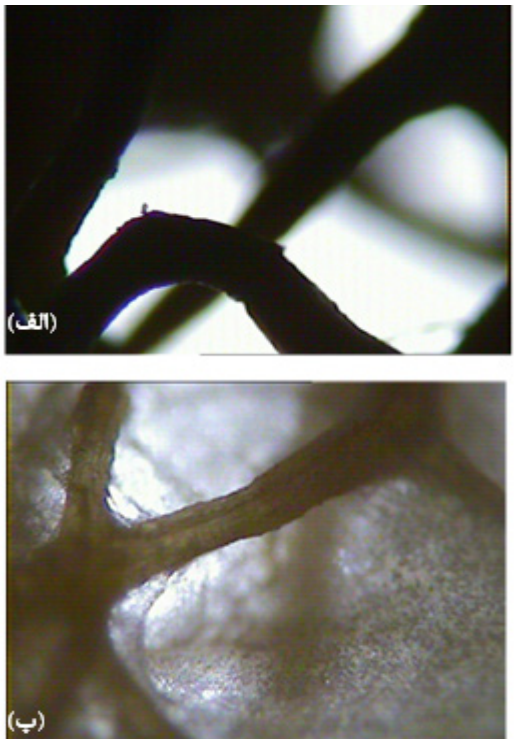
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]

مقطر استریل شستشو و سپس در آون در دمای ۷۰ °C خشک می‌شود. سپس با استفاده از دستگاه تعادل رطوبتی[۱۶] با کاهش رطوبت تا مقادیر زیر ۱٪ وزن آن یادداشت می‌شود.

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

فعالیت سنتزی آنزیم تولیدی با استفاده از روش کدورت‌سنجی سنجیده شد. واکنش سنتز استر جهت تعیین فعالیت شامل ۲ mmol نرمال بوتانول و اولئیک اسید است که با هگزان به حجم ۲ ml می‌رسد. ۱۰۰ mg از توده سلولی جهت شروع واکنش به ظرف درب دار ۱۰ ml حاوی ۲ml از مواد واکنش اضافه شده و به مدت ۱/۵ ساعت داخل شکیر در دمای ۳۷°C با دور ۲۵۰ rpm قرار داده شد و سپس میزان اسید چرب مصرف شده طی واکنش سنتز استر، توسط روش ذکر شده در مرجع (۸) در طول موج ۷۱۵ nm سنجش شد. همه مراحل برای نمونه شاهد بدون آنزیم به صورت همزمان انجام شد و نیز هر کدام از آزمایش‌ها حداقل دوبار تکرار شد. فعالیت بر حسب واحد U معادل مقدار آنزیمی است که در واکنش سنتز استر، ۱μmol اسید چرب آزاد را به عنوان سوبسترا بر حسب دقیقه مصرف می‌نماید، بیان می‌کند.



شکل۱ الف- شبکه سلولزی لوفا قبل از تثبیت قارچ رایزوپوس اوریزا. ب- شبکه سلولزی لوفا بعد از تثبیت قارچ رایزوپوس اوریزا (عکسها توسط میکروسکپ دوربیندار در مقیاس ۳۲ برابر تهییه شده است).

نحوه محاسبه فعالیت ویژه:

$$\text{فعالیت ویژه}\ (U/mg) = \frac{\text{اسید چرب مصرفی}\ (\mu mol)}{\text{وزن بیوکاتالیست}\ (mg) \times \text{زمان}\ (min)}$$

سنتز آنزیمی استر۱-بوتیل اولئات

سیستم سنتز استر مورد بررسی حاوی اولئیک اسید و نرمال بوتانول با نسبت مولی یکسان، هر کدام به میزان ۰/۳ M در ۱۰ ml هگزان به عنوان حلال در ظرف درب دار ۲۰ml در دمای ۳۷°C و دور ۲۵۰ rpm در حضور دو عدد لوفا انجام شد. جهت بررسی پیشرفت واکنش در هر بار نمونه گیری ۲۰ μl از محلول واکنش بررسی شد.آنالیز پیشروی واکنش از طریق روش کدورت‌سنجی اسید چرب آزاد صورت گرفت. هر یک از آزمایش‌ها حداقل ۲ بار تکرار شد. نحوه محاسبه بازده واکنش:

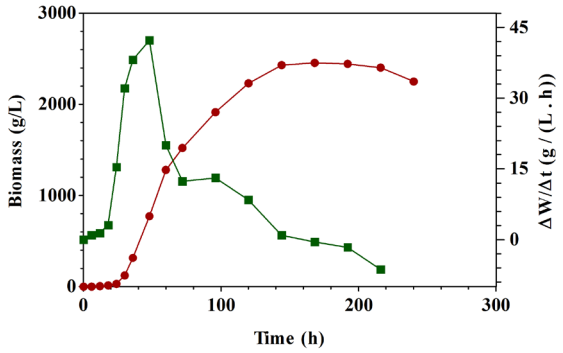
$$\text{بازده}\ (\%) = \frac{\text{اسید چرب مصرفی}\ (\mu mol)}{\text{اسید چرب اولیه}\ (\mu mol)} \times 100$$

جهت بررسی اثر اضافه کردن غربال‌های مولکولی به محلول واکنش بر بازده پس از خشک کردن محیط واکنش توسط ۱۰ g غربال مولکولی به مدت ۱۲ ساعت میزان ۴ g غربال مولکولی به محیط کشت واکنش اضافه شد و بازده نهایی محاسبه شد.

نتیجه‌ها

منحنی رشد قارچ رایزوپوس اوریزا

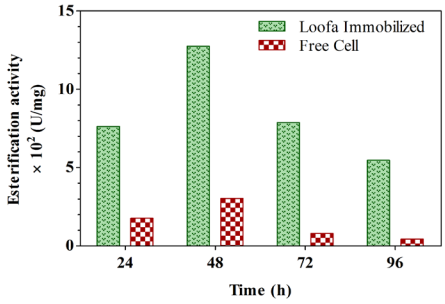
جهت دست‌یابی به زمان تولید آنزیم لیپاز توسط سلول رایزوپوس اوریزا، منحنی رشد سلول در حضور روغن زیتون به عنوان منبع کربنی رشد و عامل القای آنزیم لیپاز رسم شده است. در شکل۲ نمودار رشد میکروبی این میکروارگانیسم ارائه شده است. ۶ ساعت نخست کشت میکروبی منتسب به سازگاری میکروارگانیسم با محیط رشد می‌باشد و افزایش نمایی رشد پس از گذشت ۱۲ ساعت آغاز و در ۱۴۴ ساعت متوقف می‌شود.



شکل ۲-منحنی رشد و میزان تغییرات توده زیستی قارچ رایزوپوس اوریزا (کشت به فرم سلول آزاد).

۱۶ -Moisture balance Model (AMB-350)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]



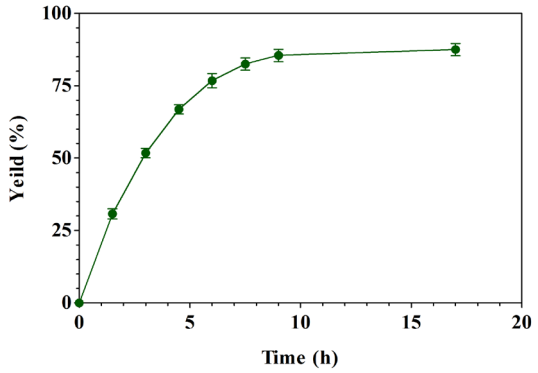
شکل ۳- مقایسه فعالیت لیپاز درونسلولی رایزوپوس اوریزا

بررسی اثر زمان کشت بر میزان فعالیت سنتزی آنزیم لیپاز

پس از کشت میکروارگانیزم به فرم آزاد و تثبیت‌یافته در زمان مشخص، میزان فعالیت نسبی آنزیم اندازه گیری و در شکل ۳ رسم شد. بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز مربوط به زمان ۴۸ ساعت گزارش شده است و پس از آن فعالیت استریفیکاسیون درون سلولی رو به کاهش می‌گذارد. مشاهده می‌شود فعالیت سنتزی سلول تثبیت یافته در همه زمان‌های بررسی شده، نسبت به سلول آزاد افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. همچنین بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز مربوط به زمان ۴۸ ساعت گزارش شده است و پس از آن فعالیت استریفیکاسیون درون سلولی رو به کاهش می‌گذارد.

بررسی پیشرفت واکنش سنتز استر

پیشرفت واکنش سنتز استر ۱-بوتیل اولئات در مجاورت بیوکاتالیست تثبیت‌یافته (در زمان ۴۸ ساعت) و بر طبق شرایط ذکر شده در حضور حلال آلی هگزان انجام شد و نتایج آن در شکل ۴ رسم شد.



شکل ۴- پیشرفت واکنش سنتز استر ۱-بوتیل اولئات در حضور دو قطعه بیوکاتالیست سلولی

واکنش با سرعت اولیه نسبتاً بالایی آغاز و سپس رو به کاهش می‌گذارد. پس از ۹ ساعت واکنش در بازده ٪ ۸۶ به تعادل رسیده است و با ادامه زمان واکنش تغییری در بازده مشاهده نمی‌شود. واکنش سنتز استر در سیستم معرفی شده بازدهی نسبتاً بالایی دارد که با حذف آب به عنوان محصول جانبی محدود کننده پیشرفت واکنش این مقدار تا ٪۹۶ بهبود می‌یابد (جدول ۱) .

جدول -۱مقایسه بازده واکنش در حضور و عدم حضور جاذب آب

شرایط واکنش	بازده (٪)
در عدم حضور غربال مولکولی	۸۶
در حضور غربال مولکولی	۹۶

بحث:

با توجه به شکل ۳ و مطالعات صورت گرفته بر میزان تغییرات توده زیستی، در محدوده نمایی بیشترین میزان افزایش رشد سلول در زمان ۴۸ تا ۶۰ ساعت مشاهده شده است و سپس این روند کاهش می‌یابد. همچنین در این محدوده زمانی بیشترین میزان تغییرات وزنی نسبت به زمان رشد سلول مشاهده می‌شود، در نتیجه نیاز سلول به جذب سوبسترا نیز به حداکثر مقدار خود خواهد رسید. بنابراین انتظار می‌رود تولید آنزیم لیپاز جهت جذب سوبسترای تری‌گلیسریدی نیز در این محدوده زمانی به حداکثر مقدار خود برسد. بر طبق مطالعات انجام شده بر فعالیت آنزیم لیپاز (شکل ۳) بیشترین فعالیت آنزیم در طول دوره رشد برای هر دو فرم کشت، در زمان کشت ۴۸ ساعت مشاهده شد. که با مصرف سوبسترا در شکل ۲ مطابقت دارد. به طور نسبی اگر فعالیت در این زمان ٪۱۰۰ در نظر گرفته شود سایر زمان‌های کشت فعالیت کمتری مشاهده شده است. ترتیب کاهش فعالیت استریفیکاسیون به صورت زیر است:

فعالیت استریفیکاسیون : ۴۸> ۷۲> ۲۴> ۹۶

کاهش فعالیت در سلول های آزاد، به علت ترشح مقدار زیادی از آنزیم به محیط کشت سلول است (بر طبق داده‌های چاپ نشده میزان فعالیت خارج سلولی محاسبه شده برای فرم آزاد بیشتر از فرم تثبیت‌یافته است). بنابراین تثبیت سلول نقش بسزایی در نگه‌داشت آنزیم در داخل دارد. هاما و همکارانش[۱۷] به بررسی اثر تثبیت سلول رایزپوس اوریزا بر فوم پلی‌یورتان پرداختند و بهبود فعالیت آنزیم در اثر تثبیت سلول را گزارش کرده‌اند (۶). با این وجود استفاده از فوم‌های زیست تخریب ناپذیر در این مطالعات محدودیت‌های زیست محیطی در مقیاس بالا ایجاد خواهد کرد. در مطالعات کامئو و همکارانش[۱۸] (۳) علاوه بر مقدار فعالیت کمتر بعد از ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم رو به کاهش می‌گذارد علت این تفاوت رفتار را می‌توان به عدم حضور روغن زیتون در محیط کشت نسبت داد که بر طبق مرجع (۶) سبب افزایش میزان و

۱۷ -Hama *et al.*

۱۸ -Cameo *et al.*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]

سرعت تولید آنزیم لیپاز درون سلولی شده است.

در بررسی پیشرفت واکنش سنتز استر در مجاورت بیوکاتالیست سلولی (شکل۴) واکنش با سرعت نسبتاً بالایی آغاز و سپس این سرعت کاهش میابد و نهایتاً بازده ثابت مشاهده شده است (۹ ساعت بازدهی ۸۶٪) علت کاهش سرعت کاهش سوبسترا، تجمع محصول جانبی و اثرات بازدارندگی سوبسترای الکلی است (۲-۴). قامقوی و همکارانش[۱۹] بازدهی سنتز استر ۱-بوتیل اولئات در مجاورت آنزیم لیپاز خارج سلولی رایزپوس اوریزا را ٪۷۸ پس از ۱۰ ساعت معرفی کرده اند (۴) علت تفاوت بازده در مطالعه حاضر را می‌توان استفاده از سلول تثبیت‌یافته و جلوگیری از طبیعت زدایی آنزیم توسط شرایط محیطی ذکر کرد. سنتز استر از یک سو، و از سویی دیگر هیدرولیز آن به علت تجمع محصول جانبی(آب) سبب ایجاد تعادل و عدم پیشروی و افزایش بازده واکنش می‌شود (۱) که در صورت حذف آب به عنوان محصول جانبی مصرف سوبسترا تا مرز کامل شدن واکنش و بازدهی ۱۰۰٪ پیش می‌رود.

نتیجه‌گیری:

با توجه به کاربرد فراوان استرها در صنایع مختلف در این مطالعه به بررسی سیستم سلولی قارچ جهت تولید آنزیم لیپاز و استفاده از آن در سنتز استر ۱–بوتیل اولئات پرداخته شد. استفاده از سلول به جای آنزیم خالص می‌تواند مزایای قابل توجهی از جمله کاهش عوامل تأثیرگذار بر فعالیت آنزیم و کاهش هزینه، که خود یک عامل مهم در عدم کاربرد صنعتی محصولات واکنش‌های آنزیمی است، داشته باشد. همچنین تثبیت سلول علاوه بر قابلیت بازیابی بیوکاتالیست امکان بهبود فعالیت آنزیم متصل به درون سلولی را فراهم می‌کند. زمان و محیط کشت سلول یک فاکتور مهم جهت دست‌یابی به فعالیت آنزیمی بالا است. همچنین سنتز استر با بازدهی ۹۶٪ در مجاورت بیوکاتالیست سلولی (رایزوپوس اوریزا تثبیت‌یافته بر لوفای اسفنجی) و غربال‌های مولکولی آب امکان پذیر است.

سپاسگزاری:

نویسندگان اول و دوم مراتب قدرانی و سپاس خود را از تلاش‌های خالصانه سرکار خانم دکتر وهابزاده اعلام می‌دارند.

۱۹ -Ghamghui *et al.*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]

منابع:

1. Baron AM, Sarquis M, Baigori M, Mitchell D, Kreiger N, Comparative Study of The Synthesis of n-Butyl-oleate Using a Crude Lipolytic Extract of Penicillum Coryophilum in Water Restricted Environments. J Mol Catal B: Enzym, 2005, 34, 25-32.
2. Chen JP, Wang JB, Wax Ester Synthesis By Lipase-catalyzed Esterification with Fungal Cells Immobilized on Cellulose Biomass Support Particles, Enzyme Microb Technol, 1997, 20, 615-622.
3. Essamri M, Deyris V, Comeau L, Optimization of Lipase Production by Rhizopus Oryzae and Study on The Stability of Lipase Activity in Organic Solvents, J Biotechnol, 1998, 60, 103-97.
4. Ghamgui H, Chaabouni MK, Gargouri Y, 1-Butyl Oleate Synthesis by Immobilized Lipase from Rhizopus Oryzae: A Comparative Study between n-Hexane and Solvent-free System, Enzyme Microb Technol, 2004, 35, 355-363.
5. Hasan F, Ali Shah A, Hameed A, Industrial Applications of Microbial Lipases, Enzyme Microb Technol, 2006, 39, 235-251.
6. Hama S, Tamalampudi S, Fukumizu T, Miura K, Yamaji K, Kondo A, Fukuda H, Lipase Localization in Rhizopus Oryzae Cells Immobilized within Biomass Support Particles for Use as Whole-Cell Biocatalysts in Biodiesel-Fuel Production. J Biosci Bioeng, 2006, 101, (4) 328–333.
7. Krull R, Wucherpfennig T, Esfandabadi ME, Melzer G, Hempel DC ,Kampen I, Kwade A, Walisko R, Wittmann C,Characterization and Control of Fungal Morphology for Improved Production Performance in Biotechnology. J Biotechnol, 2013,163, 112-123.
8. Kwon DY, Rhee JS, A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay, JAOCS, 1986, 63,.1287-1290
9. Liao W, Liu Y, Frear C, Chen S, A New Approach of Pellet Formation of a Filamentous Fungus Rhizopus oryzae. Bioresource Technol, 2007, 98, 3415-3423.
10. Okullo A, Temu AK, Ogwok P, Ntalikwa JW, Physico-Chemical Properties Of Biodiesel from Jatropha and Castor Oils. IJRER, 2012, 2,47-52 .
11. Orrego CE Valencia JS, Zapata C, Candida rugosa Lipase Supported on High Crystallinity Chitosan as Biocatalyst for the Synthesis of 1-Butyl Oleate. Cattal Lett, 2009,122, 312-329.
12. Papagianni M, Fungal Morphology and Metabolite Production in Submerged Mycelial Processes. Biotechnol Adv. 2004; 22,189-259.
13. Razak CNA, Musani R, Basri M, Salleh AB, Characterization of Membrane-Bound Lipase from a Thermophilic Rhizopus oryzae Isolated from Palm Oil Mill Effluent, JAOCS, 1999,171-174 ,76 .
14. Salah RB, Ghamghui H, Miled N, Mejdoub H, Gargouri Y, Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of Rhizopus Oryzae, Biosci Bioeng, 2007,103 (4) 368-372.
15. Wang, D, Xu Y, Shan T, Effects of Oils and Oil-related Substrates on the Synthetic Activity of Membrane-bound Lipase from Rhizopus Chinensis and Optimization of the Lipase Fermentation. Media, J Biochem Engin 41, 2008,30-37 .
16. Wang SG, Zhang WD, Li Z, Ren ZQ, Liu HX, Lipase Immobilized on the Hydrophobic Polytetrafluoroethene Membrane with Nonwoven Fabric and Its Application in Intensifying Synthesis of Butyl oleate. Appl Biochem Biotechnol 2010, 162, 2015-2026.
17. Zaks A, Klibanov AM, Enzyme-catalyzed Processes in Organic Solvents, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1985, 82, 3192-3196.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.19.12.4]