بررسی اثر فاکتورهای مؤثر بر فعالیت آنزیم لیپاز تثبیت شده روی پلیمرهای سنتزی

فرشته حسنی[1]، مریم اوتادی[2]*

[1]دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- صنایع غذایی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[2]عضو هیئت علمی گروه مهندسی شیمی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۱۲

چکیده

فعالیت هر آنزیم، نمایانگر توانایی آن در مصرف سوبسترا و تولید محصول نهایی می باشد، که خود این مساله تابعی از ویژگی های سینتیکی آنزیم، مقدار آنزیم و شرایط محیطی (مثل دما و PH و...) است. آنزیم های تثبیت شده در علوم غذایی، بیوتکنولوژی، داروسازی و شیمی تجزیه کاربرد فراوان دارند. با توجه به پیشرفت روز افزون در دستیابی به روش های مختلف تثبیت آنزیم ها در جهت استفاده بهینه از آن ها، در این تحقیق، به مطالعه فعالیت آنزیم لیپاز تثبیت شده بر روی پلیمر سنتز شده پرداخته شده است. با بررسی فاکتورهای مؤثر بر میزان فعالیت آنزیم در حالت تثبیت شده، از جمله pH، دما، غلظت آنزیم لیپاز و غلظت سوبسترا به تعیین شرایط بهینه با استفاده از روش رویه پاسخ به عنوان یکی از روش های طراحی آزمایش ها پرداختیم که در این راستا بیشترین فعالیت آنزیمی بر اساس پیش بینی نرم افزار معادل ۱۸۳۸/۷۳ U/gr.min محاسبه شد و شرایط بهینه برای بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز در pH برابر ۶/۴ و دمای ۳۱/۶ درجه سانتی‌گراد، غلظت آنزیم و سوبسترا به ترتیب معادل ۰/۱۴ mg/ml و ۹/۹ به دست آمده است.

واژه‌های کلیدی:آنزیم، لیپاز، تثبیت آنزیم، روش رویه پاسخ، طراحی آزمایش‌ها، فعالیت آنزیم

* مسوول مکاتبات : maryamotadi@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

لیپاز(triacylglycerol acylhydrolase, EC ۳,۱,۱,۳)آنزیمی است که توانایی هیدرولیز استرها را دارد و نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسرید به گلیسرول و اسید چرب را ایفا می‌کند(۱۲). در سال های اخیر لیپازها به عنوان ابزارهای کاتالیزوری در واکنش های آلی به دلیل انحلال جنبشی داروهای راسمیک[۱] مورد توجه بیشتری قرار گرفته اند(۷). همچنین این آنزیم برای اصلاح و سنتز سوخت های زیستی و محصولات غذایی و ویژگی سوبسترایی و قابلیت استفاده مجدد آن در حالت تقبیت شده مورد استفاده قرار می گیرند(۱۱و۱۲). تثبیت آنزیم یک استراتژی است که اغلب برای غلبه بر مشکلات به عنوان ثبات ذخیره سازی و توانایی عملیاتی، حرارتی و ترکیبی و امکان استفاده مجدد انجام می گیرد. علاوه بر اثر تثبیت، کیفیت محصولات را می توان با اجتناب از تولید محصولات جانبی و یا واسطه های ناخواسته و جداسازی آسان تر بهبود بخشید(۱۰). آنزیمهای تثبیت شده در مقایسه با آنزیم آزاد به دلیل برخورداری از مزایای چشمگیری مانند پایداری بیشتر، کاربرد پیوسته آنزیم، بازیابی آنزیم، حجم کمتر واکنش، کاهش آلودگی محیط، صرفه اقتصادی و ...اخیرا مورد استفاده بیشتری قرار گرفته اند(۱۱). سطح تماس، میزان تخلخل، آبگریزی و آبدوستی پلیمرها از پارامترهای مهم در تثبیت آنزیم ها هستند. پلیمر مورد استفاده باید غیر سمی باشد و پلیمرهای طبیعی از این نظر مناسب ترند. علاوه بر آن طبیعی بودن منبع تهیه این پلیمرها، امکان دستیابی به آنها را راحتتر می کند. نقطه ضعف استفاده از پلیمرهای طبیعی در فرآیند تثبیت، محدودیت امکان تغییر خواص در رنج وسیع است(۱۳و۲۰). از اینرو بسیاری تحقیقات در این زمینه با استفاده از پلیمرهای سنتزی انجام شده است. جاذب سنتزی که در این تحقیق استفاده شده است، بر پایه سیلیکاژل است. سیلیکاژل با فرمول عمومی Sio_2 xH_2o. به دلیل داشتن قدرت مکانیکی بالا و تحمل رفتار گرمای دارای کاربردهای فراوانی است.هم چنین به عنوان جاذب قطبی تقسیم بندی می شود. در این تحقیق استفاده از روشMIP[۲] با استفاده از پایه سیلیکاژل، جاذب سنتز شده است و در این تحقیق به آن رزین گفته میشود(۲).

از روش های تثبیت می توان روش های رسوب دادن بر روی ژل، میکروکپسوله کردن، پیوند کووالانت و... را نام برد(۴). در این تحقیق از روش جذب سطحی برای تثبیت آنزیم استفاده شده است. در بین آنزیمها، لیپازهای تثبیت شده به منظور تولید انواع مختلفی از چربیها شامل تری آسیل گلیسرول ها، فسفو لیپیدها، لیپیدهای اتر غیر قطبی و غنی سازی آنها با اسیدهای چرب کاربرد فراوانی دارند(۳). در ارتباط با بررسی فعالیت آنزیم لیپاز تثبیت شده بر روی پلیمرهای مختلف اخیرا دانشمندانی همچون Ramdhane Kou Chang و... بررسی هایی انجام دادند که نتایجی مشابه نتایج تحقیق حاضر را در بر داشته است(۵،۶،۸،۱۳،۱۴،۱۵،۱۷،۱۹،۲۰و۲۱).

در این تحقیق با استفاده از نتایج آزمایشگاهی به دست آمده در خصوص فعالیت آنزیم لیپاز، به بررسی فعالیت آنزیمی و تعیین نقطه بهینه آن به صورت تحلیلی- تجربی با استفاده از روش رویه پاسخ می پردازیم. نتایج اولیه آنالیز واریانس اطلاعات بسیار مفیدی در ارتباط با مؤثر بودن یا بی تأثیر بودن هریک از فاکتورها خواهد داد و همچنین درک خوبی از وضعیت اثر تداخلی دو فاکتور روی یکدیگر پیدا خواهیم کرد. در این شرایط با انجام آزمایشهای تجربی لازم، مدلی از نوع تابع درجه دوم برای فعالیت آنزیمی ارائه خواهیم کرد که به خوبی قادر خواهد بود نحوه اثرگذاری تک تک فاکتورهای انتخاب شده را در میزان فعالیت آنزیمی محاسبه نماید. بر اساس تابع بدست آمده می‌توان فعالیت آنزیمی را در سطوح مختلف هر یک از متغیرها بررسی نمود. سپس نقطه بهینه مربوط به بالاترین فعالیت آنزیم تثبیت شده لیپاز را ارائه خواهیم کرد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

این تحقیق تحلیلی-تجربی بوده و در آن متغیرهای انتخابی شامل دما، pH، غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا بوده و دامنه تغییرات هر یک از آن ها که برای بررسی فعالیت آنزیم لیپاز در حالت تثبیت شده انتخاب شده را از منابع متفاوت در محدوده های مناسب استخراج کردیم سپس بر اساس پیشنهاد نرم افزار Design Expert طرحی که شامل ۲۴ آزمایش به همراه ۶ آزمایش تکرار در نقطه میانی است و شامل مقادیر دما، غلظت آنزیم، غلظت

[۱] pro-stereonic
[۲] Molecular imprinting

Archive of SID

www.SID.ir

سوبسترا و pH می باشد انتخاب شده است. با استفاده از این طرح در هر آزمایش میزان فعالیت آنزیم را در مقادیر مختلف دما، pH، غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا در آزمایشگاه اندازه گیری کردیم و با استفاده از روش رویه پاسخ به عنوان یکی از روش های طراحی آزمایش ها به تعیین شرایط بهینه آنزیم پرداختیم. لیپاز مورد استفاده در این پژوهش از نوع لیپاز پانکراسی بوده و از شرکت سیگما تهیه شده است. مشخصات دیگر آن بدین شرح است:

Ec No: Ec ۳,۱,۱,۳ , ۶۹۰ unit/mg , Type (VII) from candida Cylinderance

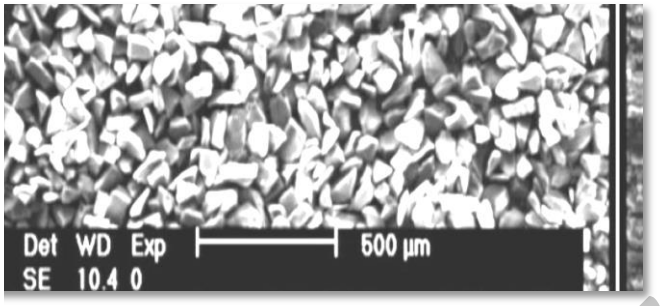
۲-۲- روش تثبیت آنزیم لیپاز

روش تثبیت آنزیم لیپاز مورد استفاده در این تحقیق روش جذب بر روی پلیمر سنتز شده بوده است. پلیمر سنتز شده یک پلیمر نوین بوده که به روش اثرگذاری مولکولی[1] بر پایه سیلیکاژل تهیه شده است(۲). روش آماده سازی پلیمر سنتزی، بر اساس فعال سازی سیلیکاژل (شکل ۱) با اسید کلریدریک و خشک کردن آن و استفاده از حدواسط ۳-مرکاپتوتری‌متوکسی‌سیلان و سپس گرافت کردن کوپلیمر آلیل گلیسیدیل اتر و ایمینو دی استیک اسید بروی سیلیکاژل فعال شده (شکل ۲) در ستون کروماتوگرافی میباشد(۲).

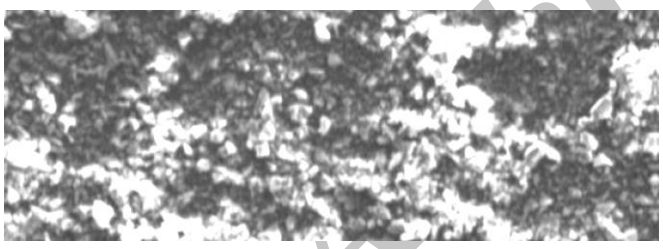
برای تثبیت آنزیم بروی این پلیمر سنتز شده که به آن رزین گفته میشود، محلول ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر از آنزیم لیپاز را ساخته و به ۲ میلی لیتر از آن، مقادیر محلول بافری مورد نظر را اضافه می‌کنیم، آن را به حجم رسانده و سپس ۰/۲ گرم رزین سنتز شده به محلول اضافه می‌کنیم و به مدت ۲ ساعت آن را در دمای محیط مخلوط می‌کنیم. مخلوط حاصل را صاف کرده و رزین جذب آنزیم شده را با مقدار معین از شوینده (اسید نیتریک ۰/۵ مولار) شسته و دوباره هم زده شده و به این ترتیب غلظت آنزیم جذب شده در محلول زیر صافی توسط دستگاه UV-vis تعیین شده است(۲).

شرایط بهینه جذب آنزیم توسط رزین سنتز شده مانند pH، دما، زمان و ... به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته است. داده‌های به کار برده شده در این پروژه در ارتباط با شرایط بهینه جذب آنزیم لیپاز توسط رزین بیانگر این بودکه در pH=۵/۶، درصد بازیافت ۹۳٪ برای آنزیم لیپاز به دست آمد(۲). مطالعه محلول‌های مختلف به همراه رزین سنتز شده نشان داد که با افزایش غلظت، میزان جذب آنزیم توسط رزین نیز افزایش می‌یابد. همچنین بررسی‌های مکرر نشان داد که رزین سنتز شده این قابلیت را دارد که در زمان کمتر از ۲۰ دقیقه، ۸۰٪ از مقداری را که می‌تواند جذب کند را جذب نماید و بهینه دمای جذب آنزیم توسط رزین ۲۵ درجه سانتی‌گراد می باشد. توانایی جذب رزین برای آنزیم لیپاز بررسی شد و ظرفیت جذب در pH بهینه از فرمول زیر محاسبه شد(۲):

q = میلی گرم آنزیم جذب شده بر روی رزین/گرم رزین



شکل ۱- تصاویر SEM از رزین سنتز شده



شکل ۲- تصاویر SEM از سیلیکاژل

۲-۳- روش سنجش فعالیت آنزیمی لیپاز

واحد لیپاز: یک واحد لیپاز مقداری از آنزیم است که تحت شرایط تعریف شده در آزمایش طبق این استاندارد معادل یک میکرومول اسید H^+ در هر دقیقه از بستر آزاد کند. مواد مورد استفاده در آزمایشات تعیین فعالیت آنزیمی شامل موارد زیر است:

- عصاره استرول
- محلول بافر رقیق در pH مشخص
- امولسیون بستر (سوبسترا) که از صمغ عربی (آکاسیا) و روغن زیتون حاصل شده است.

[1] Molecular imprinting

www.SID.ir

سه قسمت از امولسیون بستر و یک قسمت از محلول بافر را مخلوط کرده و سپس ۸ میلی لیتر از این مخلوط را به یک بشر ۱۰۰ منتقل می کنیم و محلول بستر را به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی با دمای مورد نظر نگه می داریم. در زمان صفر ۲ میلی لیتر از آنزیم آماده شده را به محلول بستر اضافه کرده، زمان را سنجش می کنیم. محتوی بشر را با همزن مخلوط کرده و آن را برای مدت زمان تنظیم شده در حمام آبی با دمای مورد نظر نگه داشته و بعد ۴۰ میلی لیتر الکل به آن افزوده و با همزن مخلوط می کنیم بشر را از حمام آب خارج کرده و محتوی آن را با سدیم هیدروکساید ۰,۰۲ نرمال تا رسیدن تا pH مساوی ۸ تیتر می کنیم. حجم سدیم هیدروکساید مصرفی را یادداشت می کنیم(S: حجم تیتراسیون نمونه آنزیم). به موازات این عمل آزمون بدون واکنش آنزیم را با مخلوط کردن ۸ میلی لیتر امولسیون بستر و ۴۰ میلی لیتر الکل و ۲ میلی لیتر آب و سپس سنجش آن تا رسیدن به pH۸ = طبق دستور فوق انجام می دهیم و حجم سدیم هیدروکساید مصرفی در این آزمایش را یادداشت می کنیم(B: حجم تیتراسیون محلول بدون آنزیم). فعالیت آنزیم لیپاز بر حسب واحد لیپاز در گرم از رابطه زیر به دست می آید که طبق آن شرایط بهینه عملکرد آنزیم در حالت تثبیت شده به طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته است و در جدول ۲ ذکر شده است(۲).

$$\text{فعالیت} = \frac{1000kN}{0/001Wt}$$

K: ارزش خالص تیتراسیون (S-B)، N: نرمالیته سدیم هیدروکساید، W: وزن نمونه آنزیم موجود در ۲ میلی لیتر محلول آنزیمی، ۱۰۰۰ تبدیل میلی مول اسید به میکرومول، ۰,۰۰۱ : ضریب تبدبل میلی گرم به گرم، t: زمان

۲-۴- طراحی آزمایش ها

۲-۴-۱- متغیرهای عملیاتی و سطوح مورد بررسی در مدل‌سازی فعالیت آنزیم لیپاز

در این بررسی به دنبال یافتن مدلی هستیم که بتواند میزان فعالیت آنزیم لیپاز (به عنوان تابع هدف) را به چهار فاکتور(متغیر) pH (فاکتور A)، دما (فاکتور B)، غلظت آنزیم (فاکتور C)و غلظت سوبسترا (فاکتور D) ارتباط دهد و براساس آن بتوان میزان تغییر فعالیت آنزیمی را در اثر تغییر هر یک از این فاکتورها به طور هم‌زمان محاسبه نمود و بر اساس آن بتوان بهینه‌سازی مدل مزبور را انجام داد. لذا سطوح چهار متغیر موردنظر با استفاده از روش رویه پاسخ مورد بررسی قرار گرفته و بهینه می‌شوند. متغیرهای عملیاتی مورد نظر و سطوح مورد آزمایش آنها در جدول ۱ آورده شده است که از منبع ۲ استخراج شده است(۲).

جدول ۱- متغیرهای عملیاتی و سطوح مورد بررسی در مدل‌سازی فعالیت آنزیم لیپاز

فاکتور	نام	واحد	نوع	سطح پایین	سطح بالا
A	pH	-	عددی	۴/۵	۷/۵
B	درجه حرارت	°C	عددی	۲۰	۵۰
C	غلظت آنزیم	gr/ml	عددی	۰/۰۱	۰/۱۵
D	غلظت سوبسترا	gr/ml	عددی	۱/۷۹	۱۲/۵

۲-۴-۲- نرم افزار و روش مورد استفاده جهت بهینه‌سازی

یکی از روش‌های طراحی آزمایش‌ها که در بهینه‌سازی متغیرها بسیار کاربرد دارد، روش رویه پاسخ (Response Surface) می‌باشد. این روش مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری است که هدف آن بهینه کردن پاسخ تحت تأثیر متغیرهاست. با توجه به اینکه میزان فعالیت آنزیمی با استفاده از روش کلاسیک (یک عامل در یک زمان) لزوماً منجر به بدست آوردن نقطه بهینه نمی‌شود همچنین قادر به بررسی اثرات تداخلی فاکتورها نیز نمی‌باشد(۱۶). از طرفی نمی‌توان با استفاده از روش کلاسیک اثر یک عامل در یک زمان مدلی عمومی پیشنهاد داد که بتواند فعالیت آنزیم لیپاز را به ۴ متغیر مختلف مورد استفاده در این بررسی مرتبط دانست. بنابراین در این تحقیق روش رویه پاسخ به عنوان روشی دقیق با مبنای آماری قوی، جهت مدل‌سازی و بهینه‌سازی این متغیرها انتخاب شده است. شایان ذکر است که با توجه به توانایی روش رویه پاسخ در بهینه‌سازی، این روش اخیراً در کانون توجه محققین قرار گرفته است(۵و۹).

نرم‌افزار مورد استفاده برای طراحی آزمایش‌ها DX۷ محصول شرکت State Ease می‌باشد. روش رویه پاسخ یکی از متداول‌ترین راه‌های بررسی اثر متغیر بر تابع هدف می‌باشد. در این روش پاسخ غیرخطی سیستم به تغییر متغیرها به خوبی نشان داده می‌شود، از این‌رو با استفاده از روش رویه پاسخ به تحلیل نتایج آزمایش‌ها می‌پردازیم.

بر اساس پیشنهاد نرم افزار ۲۴ آزمایش به همراه ۶ آزمایش تکرار

Archive of SID

www.SID.ir

در نقطه میانی انتخاب شده است. هدف از تکرار آزمایش‌ها در نقاط میانی تخمین خطای آزمایش و امکان بررسی دقت و صحت مدل انتخابی می‌باشد. در مجموع این طرح شامل ۳۰ آزمایش است و میزان فعالیت آنزیم لیپاز مطابق طرح آزمایش ارائه شده توسط نرم افزار، در شرایط مختلف pH، دما، غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا اندازه‌گیری شد که در جدول ۲ به آن ها اشاره شده است.

جدول ۲- نتایج مربوط به فعالیت آنزیم لیپاز در طرح آزمایش انتخاب شده

شماره آزمایش	pH	درجه حرارت (°C)	غلظت آنزیم	غلظت سوبسترا	فعالیت (U/gr.min)
۱	۴/۵	۵۰	۰/۱۵	۱۲/۵	۱۴۸۰
۲	۷/۵	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۷۴۰
۳	۶	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۱۱۹۲
۴	۴/۵	۵۰	۰/۱۵	۱/۷۹	۱۲۰۵
۵	۶	۳۵	۰/۰۸	۱/۷۹	۱۱۰۴
۶	۴/۵	۲۰	۰/۱۵	۱/۷۹	۹۰۹
۷	۶	۳۵	۰/۰۱	۷/۱۴۵	۹۷۵
۸	۴/۵	۲۰	۰/۰۱	۱۲/۵	۱۷۵
۹	۶	۳۵	۰/۱۵	۷/۱۴۵	۱۷۹۲
۱۰	۷/۵	۵۰	۰/۱۵	۱۲/۵	۱۴۳۳
۱۱	۶	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۱۰۹۴
۱۲	۶	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۱۱۸۸
۱۳	۶	۳۵	۰/۰۸	۱۲/۵	۱۶۱۲
۱۴	۷/۵	۲۰	۰/۰۱	۱/۷۹	۲۳۹
۱۵	۶	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۱۱۸۸
۱۶	۷/۵	۵۰	۰/۱۵	۱/۷۹	۹۹۵
۱۷	۴/۵	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۶۴۳
۱۸	۷/۵	۲۰	۰/۱۵	۱۲/۵	۱۳۴۰
۱۹	۴/۵	۵۰	۰/۰۱	۱۲/۵	۲۲۷
۲۰	۶	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۱۱۷۹
۲۱	۶	۲۰	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۷۸۰
۲۲	۶	۵۰	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۹۰۷
۲۳	۴/۵	۵۰	۰/۰۱	۱/۷۹	۹۸
۲۴	۶	۳۵	۰/۰۸	۷/۱۴۵	۱۱۱۵
۲۵	۷/۵	۲۰	۰/۱۵	۱/۷۹	۷۱۵
۲۶	۷/۵	۲۰	۰/۰۱	۱۲/۵	۴۶۰
۲۷	۷/۵	۵۰	۰/۰۱	۱/۷۹	۵۳
۲۸	۷/۵	۵۰	۰/۰۱	۱۲/۵	۲۸۷
۲۹	۴/۵	۲۰	۰/۰۱	۱/۷۹	۹۴
۳۰	۴/۵	۲۰	۰/۱۵	۱۲/۵	۱۱۵۵

Archive of SID

www.SID.ir

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آنالیز واریانس

نرم افزار با درنظر گرفتن فاکتورهای اصلی به تنهایی و یا فاکتورهای اصلی، دوتایی و بالاتر توانایی مدل‌های مختلف را بررسی نموده و بهترین مدل یا مدل‌ها را پیشنهاد می‌کند.نتایج مربوط به آنالیز واریانس داده‌ها و وضعیت اثرگذاری هریک از متغیرهای اصلی و دوتایی در فعالیت آنزیم لیپاز در جدول 3 نشان داده شده است. سطح معناداری و مؤثر بودن یک فاکتور با مقادیر p کمتر از ۰/۱ قضاوت می‌شود.

جدول ۳- نتایج مربوط به آنالیز واریانس داده‌ها برای مدل درجه دوم انتخابی

Source	Sum of		Mean	F	p-value	وضعیت اثرگذاری با توجه به مقدار p
Model	۶۸۰۲۷۹۴/۸۸۳	۱۴	۴۸۵۹۱۳/۹۲۰۲	۱۱۴/۷۷۰۹۱۶	<۰/۰۰۰۱	مدل مناسب
A (pH)	۴۲۳۲	۱	۴۲۳۲	۰/۹۹۹۵۸۱۴	۰/۳۳۳۳	غیر اثرگذار
B (T)	۳۷۱۷۳/۵۵۵۵۶	۱	۳۷۱۷۳/۵۵۵۵	۸/۷۸۰۲۴۴۴۷	۰/۰۰۹۷	اثرگذار
C (Enzyme Conc.)	۳۹۳۴۹۴۷/۵۵۶	۱	۳۹۳۴۹۴۷/۵۵۶	۹۲۹/۴۱۸۸۰۳	<۰/۰۰۰۱	اثرگذار
D (Substrate Conc.)	۴۲۲۲۸۰/۵	۱	۴۲۲۲۸۰/۵	۹۹/۷۴۰۹۵۷۵	<۰/۰۰۰۱	اثرگذار
AB	۲۷۴۷۳/۰۶۲۵	۱	۲۷۴۷۳/۰۶۲۵	۶/۴۸۹۰۲۶۹۸	۰/۰۲۲۳	اثرگذار
AC	۳۱۵۹۵/۰۶۲۵	۱	۳۱۵۹۵/۰۶۲۵	۷/۴۶۲۶۲۶۸۲	۰/۰۱۵۴	اثرگذار
AD	۳۸۷۱۰/۵۶۲۵	۱	۳۸۷۱۰/۵۶۲۵	۹/۱۴۳۲۷۹۳۳	۰/۰۰۸۵	اثرگذار
BC	۱۰۵۱۳۸/۰۶۲۵	۱	۱۰۵۱۳۸/۰۶۲۵	۲۴/۸۳۳۱۸۷۹	۰/۰۰۰۲	اثرگذار
BD	۵۸۸/۰۶۲۵	۱	۵۸۸/۰۶۲۵	۰/۱۳۸۸۹۸	۰/۷۱۴۶	غیر اثرگذار
CD	۵۲۷۸۵/۰۶۲۵	۱	۵۲۷۸۵/۰۶۲۵	۱۲/۴۶۷۶۱۹۷	۰/۰۰۳۰	اثرگذار
A^2	۶۵۱۲۵۴/۷۸۹۷	۱	۶۵۱۲۵۴/۷۸۹۷	۱۵۳/۸۲۳۷۶۵	<۰/۰۰۰۱	
B^2	۳۱۶۲۲۶/۰۶۲۴	۱	۳۱۶۲۲۶/۰۶۲۴	۷۴/۶۹۱۳۲۵۴	<۰/۰۰۰۱	
C^2	۹۴۱۶۳/۳۳۵۱۳	۱	۹۴۱۶۳/۳۳۵۱۳	۲۲/۲۴۱۰۰۱۴	۰/۰۰۰۳	
D^2	۷۰۶۵۷/۵۵۱۰۴	۱	۷۰۶۵۷/۵۵۱۰۴	۱۶/۶۸۹۰۲۹۷	۰/۰۰۱۰	
Residual	۶۳۵۰۶/۵۸۴۰۶	۱۵	۴۲۳۳/۷۷۲۷۱			
Lack of Fit	۵۴۱۷۵/۲۵۰۷۳	۱۰	۵۴۱۷/۵۲۵۰۷۳	۲/۹۰۲۸۶۷۶۲	۰/۱۲۵۵	غیر اثرگذار
Pure Error	۹۳۳۱/۳۳۳۳۳	۵	۱۸۶۶/۲۶۶۶۶۷			
Cor Total	۶۸۶۶۳۰۱/۴۶۷	۲۹				

۳-۲- اثر فاکتورهای اصلی

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است با افزایش pH از ۴/۵ تا حدود ۶ فعالیت آنزیمی افزایش می‌یابد و سپس کاهش می‌یابد. در ارتباط با اثر دما نیز روند مشابهی مشاهده شده است و بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد حاصل شده است و با افزایش غلظت آنزیم و سوبسترا فعالیت آنزیمی افزایش پیدا کرده است. مشابه نتایج بدست آمده در بررسی حاضر در تحقیقات قبلی در خصوص اثرات فاکتورهای اصلی بر فعالیت آنزیم لیپاز تثبیت شده مشاهده شده است (۵،۱۳،۱۴و۱۹).

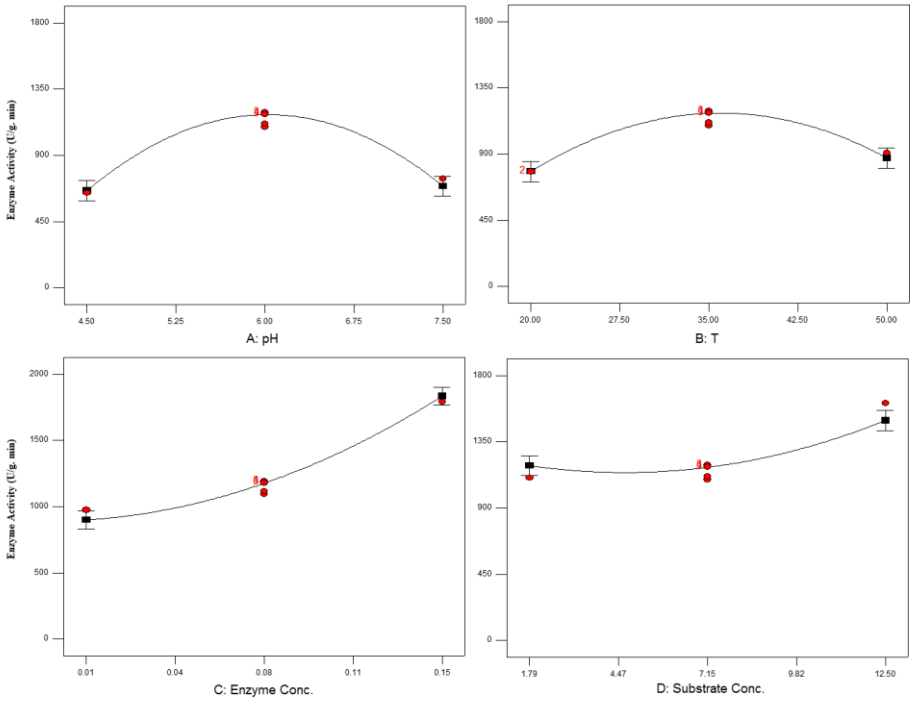
۳-۳- اثر فاکتورهای دوتایی

به منظور بررسی اثر تداخلی فاکتورها نمودارهای سه بعدی مربوطه در شکل‌های ۴ تا ۹ نشان داده شده اند. این نمودارها اثر متغیرهای معنادار و برهم‌کنش آنها را در فعالیت آنزیم لیپاز به عنوان متغیر پاسخ بیان می‌کنند. مطابق شکل ۴ دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۶ منجر به بیشترین فعالیت آنزیمی خواهند شد. با توجه به شکل های ۵ و ۷ می‌توان گفت که در pHها و دماهای مختلف با افزایش غلظت آنزیم فعالیت افزایش یافته است، اما در بین pHها و دماهای مختلف بیشترین فعالیت

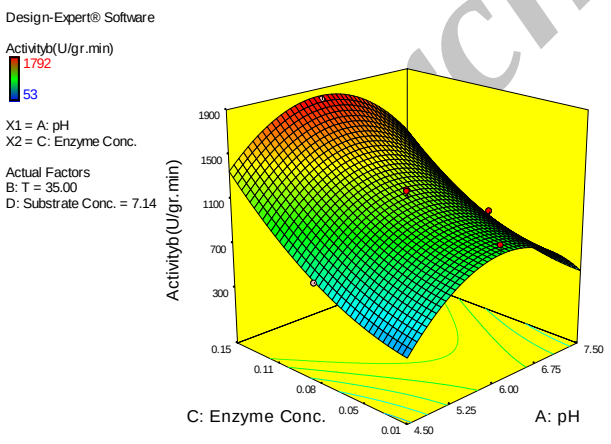
Archive of SID

www.SID.ir

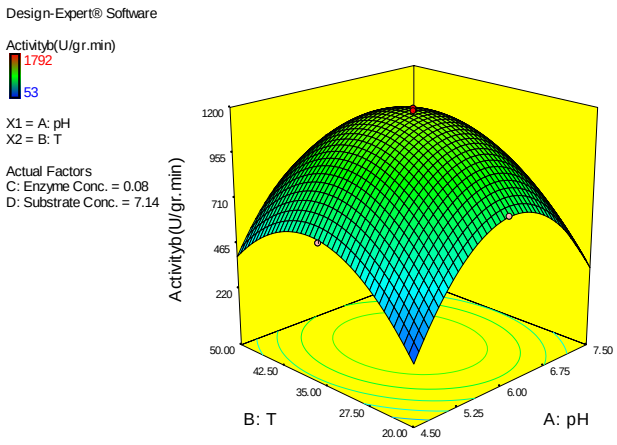
آنزیم در pH برابر ۶ و دمای ۳۵ درجه اتفاق افتاده است و در pHها و دماهای پایین‌تر و بالاتر از این مقادیر فعالیت آنزیم پایین‌تر بوده است. در شکل ۶ نیز مشاهده می شود که با افزایش غلظت سوبسترا در pHهای مختلف فعالیت آنزیمی افزایش می یابد. منحنی زین اسبی شکل ۸ هم بیانگر این است که در دماهای مختلف با افزایش غلظت سوبسترا فعالیت آنزیمی افزایش می یابد و مطابق شکل ۹ بالاترین غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا منجر به بیشترین فعالیت آنزیم لیپاز شده است. همچنین در تحقیقات قبلی نتایج مشابهی در خصوص اثرات فاکتورهای دوتایی بر فعالیت آنزیم لیپاز تثبیت شده مشاهده شده است(۱۴).



شکل ۳- اثر فاکتورهای اصلی pH– دما – غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی

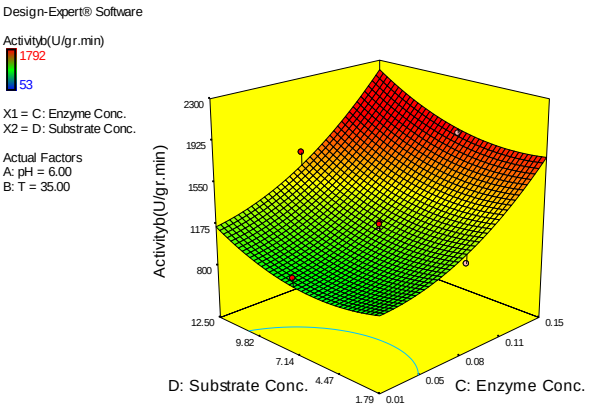


شکل ۵- اثر غلظت آنزیم وpHبر فعالیت آنزیمی

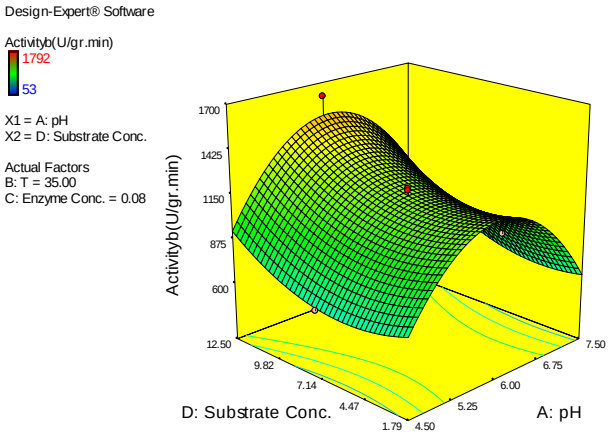


شکل ۴- اثر دما وpHبر فعالیت آنزیمی

www.SID.ir



شکل ۹- اثر غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی



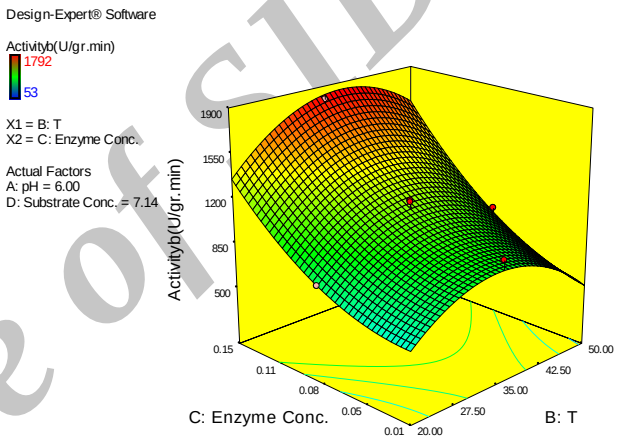
شکل ۶- اثر غلظت سوبسترا و **pH**بر فعالیت آنزیمی

۳-۴- تابع درجه دوم پیشنهادی مربوط به فعالیت آنزیم لیپاز

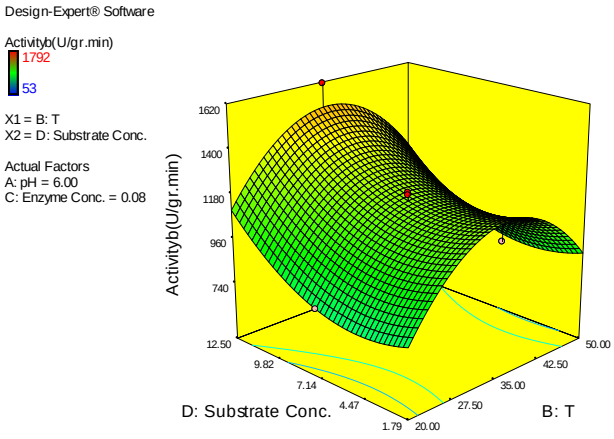
با استفاده از نتایج به دست آمده در آزمایش رویه پاسخ، میزان فعالیت آنزیم لیپاز، با تابع چند جمله‌ای درجه دوم زیر ارائه شده

$$
\begin{aligned}
\text{Activity(U/gr.min)} = {} & -۹۱۵۳/۳۱۶۴۶ \\
& +۲۷۳۸/۷۰۲۹۹ * \text{pH} \\
& +۱۱۷/۱۳۲۳۷ * \text{T} \\
& -۸۰۳/۲۳۷۳۵ * \text{Enzyme Conc.} \\
& -۱۰۰/۰۴۹۱۲ * \text{Substrate Conc.} \\
& -۱/۸۴۱۶۷ * \text{pH} * \text{T} \\
& -۴۲۳/۲۱۴۲۹ * \text{pH} * \text{Enzyme Conc.} \\
& +۶/۱۲۳۵۶ * \text{pH} * \text{Substrate Conc.} \\
& +۷۷/۲۰۲۳۸ * \text{T} * \text{Enzyme Conc.} \\
& -۰/۰۷۵۴۷۵ * \text{T} * \text{Substrate Conc.} \\
& +۱۵۳/۲۲۷۹۶ * \text{Enzyme Conc.} * \text{Substrate Conc.} \\
& -۲۲۲/۸۲۶۵۱ * \text{pH}^۲ \\
& -۱/۵۵۲۷۱ * \text{T}^۲ \\
& +۳۸۹۰۶/۱۹۴۰۶ * (\text{Enzyme Conc.})^۲ \\
& +۵/۷۵۸۸۳ * (\text{Substrate Conc.})^۲
\end{aligned}
$$

است. با استفاده از مدل ارائه شده فوق می‌توان فعالیت آنزیم لیپاز را در شرایط و مقادیر مختلف فاکتورهای pH، دما، غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا (در محدوده مورد بررسی) تعیین نمود.



شکل۷- اثر دما و غلظت آنزیم بر فعالیتآنزیمی



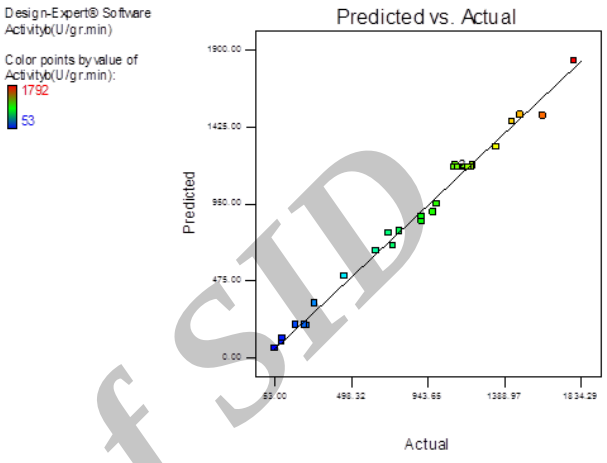
شکل ۸- اثر دما و غلظت سوبسترا بر فعالیت آنزیمی

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۵- بررسی دقت مدل در مقایسه با داده‌های آزمایشگاهی

شکل ۱۰ رابطه بین میزان فعالیت آنزیمی با استفاده از داده‌های آزمایشی و مقادیر به‌دست آمده توسط مدل ارائه شده را نشان می‌دهد.همانطور که مشخص است میزان اختلاف نتایج در این دو حالت در تمامی آزمایش مختلف انجام شده، قابل توجه نبوده است که این مطلب نشان می‌دهد که نتایج مدل و داده‌های آزمایشگاهی مطابقت بسیار خوبی با یکدیگر دارند.



شکل ۱۰- مقایسه میزان فعالیت آنزیمی با استفاده از داده‌های آزمایشی و مقادیر به‌دست آمده توسط مدل

۳-۶- تعیین نقطه بهینه با هدف ماکزیمم کردن فعالیت آنزیمی

تعیین شرایط بهینه که در آن میزان فعالیت آنزیم لیپاز ماکزیمم مقدار باشد براساس مدل به دست آمده و استفاده از نرم افزار Design Expert انجام گرفت. بر اساس روش رویه پاسخ، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی معادل ۱۸۳۸/۷۳ U/gr.min می‌باشد و مقادیر بهینه برای هریک از متغیرهای اصلی که منجر به بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز می‌شود در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول۴- شرایط بهینه فعالیت آنزیم لیپاز

فاکتور	نام	سطح	سطح پایین	سطح بالا
A	pH	۶/۴	۴/۵	۷/۵
B	درجه حرارت	۳۱/۶	۲۰	۵۰
C	غلظت آنزیم	۰/۱۴	۰/۰۱	۰/۱۵
D	غلظت سوبسترا	۹/۹	۱/۷۹	۱۲/۵

۴- نتیجه گیری

از نتایج بدست آمده از داده‌های آزمایشی و مقادیر به‌دست آمده توسط مدل ارائه شده پیداست کهمیزان اختلاف نتایج در این دو حالت در تمامی آزمایش های مختلف انجام شده، قابل توجه نبوده است که این مطلب نشان می‌دهد که نتایج مدل و داده‌های آزمایشگاهی مطابقت بسیار خوبی با یکدیگر دارند.بر اساس روش رویه پاسخ، بیشترین میزان فعالیت آنزیمی معادل ۱۸۳۸/۷۳ U/gr.min می‌باشد و مقادیر بهینه برای هریک از متغیرهای اصلی بدست آمد. در نتیجه می توان گفت روش رویه پاسخ به عنوان روشی دقیق با مبنای آماری قوی، جهت مدل‌سازی و بهینه‌سازی متغیرهاست.

۵- منابع

۱-کمالی، م.۱۳۹۰.مدلسازی عملکرد و رفتار سینتیکی بیوکاتالیزور تثبیت شده (مطالعه موردی آلفا آمیلاز). پایان نامه کارشناسی ارشد،رشته مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران جنوب، دانشکده فنی و مهندسی. ۳۵-۲۷.

۲-ململی، ح.۱۳۸۹. بررسی سینتیک آنزیم لیپاز تثبیت شده بر روی ساپورت های نوین سنتزی. پایان نامه کارشناسی ارشد، رشته مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران مرکزی، ۹۲-۶۸.

۳-Alberghina, L.,Schmid, RD., Verger, R., editors.1991. Lipases: structure, mechanism and genetic engineeringWeinheim: VCH.

۴-Alloue, WAM.,Destain, J.,Medjoub, TE.,Ghalfi, H.,Kabran, P.,Thonart, P.2008. Comparison of Yarrowialipolytica lipase immobilizationyield of entrapment, adsorptionand covalent bond techniques.ApplBiochem Biotechnol,150: 51–63.

۵-Bai, W. Yang., Y.-J., Tao, X., Chen, J.-F., Tan, T.-W.2012. Immobilization of lipase on aminopropyl-grafted mesoporous silica nanotubes for the resolution of (R, S)-1-phenylethanol. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 76(0): 82-88.

۶-Betigeri, S.S., Neau, S.H. 2002. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. Biomaterials, 23(17): 3627-3636.

۷-Bhushan, I., Parshad, R., Qazi, GN., Ingavle, G., Rajan, CR., Ponrathnam, S., et al. 2008. Lipaseenzyme immobilization on synthetic beaded macroporous copolymers forkinetic resolution of

Archive of SID

www.SID.ir

chiral drugs intermediates. Process Biochem,43:321–30.

۸-Chang, S.-F., Chang, S.-W., Yen, Y.-H., Shieh, C.-J.2007. Optimum immobilization of Candida rugosa lipase on Celite by RSM. Applied Clay Science, 37(1–2): 67-73.

۹-Dhake, K.P., Karoyo, A.H., Mohamed, M.H., Wilson, L.D., Bhanage, B.M.2013. Enzymatic activity studies of Pseudomonas cepacia lipase adsorbed onto copolymer supports containing β-cyclodextrin. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 87(0): 105-112.

۱۰-Gomes, FM., Silva, GS., Pinatti, DG., Conte, RA., De Castro, HF.2005.Wood cellulignin as analternative matrix for enzyme immobilization. ApplBiochem Biotechnol,121–124:168255.

۱۱-Goto, M., Kawakita, H., Uezo, K., Tsuneda, S., Saito, K., Goto, M., et al.2006. Esterification oflauricacid using lipase immobilized in the micropores of a hollow-fibermembrane. J Am Oil ChemSoc, 83:13-209.

۱۲-Irmer, S., Potthoff, AP., Kovac, A., Bucher, J., Stadler, P., Haalck, L., et al.2000.Rhizopusoryzae lipase-catalyzed stereospecific esterification of 2-b b: a comparison tocorrespondingtriradylglycerol hydrolysis. Eur J Lipid Sci Technol,102:173–80.

۱۳-Jiang, L., Althoff, EA., Clemente, FR.2008. "De novo computational design of retro-aldol enzymes". Science (journal),319 (5868): 1387–91.

۱۴-Kuo, C.-H., Liu, Y.-C., Chang, C.-M.J., Chen, J.-H., Chang, C., Shieh, C.-J.2012. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe3O4 nanoparticles. Carbohydrate Polymers, 87(4): 2538-2545.

۱۵-Liu, T., Liu, Y., Wang, X., Li, Q., Wang, J., Yan, Y.2011. Improving catalytic performance of Burkholderia cepacia lipase immobilized on macroporous resin NKA. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 71(1–2): 45-50.

۱۶-Montgomery, D.C., Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons.2005.

۱۷-Oliveira, D., Feihrmann, A.C., Rubira, A.F., Kunita, M.H., Dariva, C., Oliveira, J.V.2006. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. The Journal of Supercritical Fluids, 38(3): 373-382.

۱۸-Raviyan, P., Tang, J.,Orellana, L.,Rasco, B.2003.Physicochemical Properties of a Time-Temperature Indicator Based on Immobilization of Aspergillusoryzae_ Amylase in Polyacrylamide Gel as Affected by Degree of Cross-Linking Agent and Salt Content. Journal of Food Science, Vol.68,Nr. 7.

۱۹-Romdhane, I.B.-B., Romdhane, Z.B., Gargouri, A., Belghith, H.2011. Esterification activity and stability of Talaromyces thermophilus lipase immobilized onto chitosan. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 68(3–4): 230-239.

۲۰-Schmitt-Rozieres, M., Vanot, G., Deyris, V., Comeau, LC.1999.Boragoofficinalis oil: fatty acid fractionationby immobilized Candida rugosa lipase. J Am Oil Chem Soc,76:557–62.

۲۱-Sun, J., Jiang, Y., Zhou, L., Gao, J.2010. Immobilization of Candida antarctica lipase B by adsorption in organic medium. New Biotechnology, 27(1): 53-58.

Archive of SID

www.SID.ir