

## رایزوپوس اوریزا تثبیت یافته بر لوفاسفنجی و نقش آن در تولید لیپاز درون سلولی

هدی خصالی اقطاعی<sup>۱</sup>، سمانه ستاری<sup>۱</sup>، فرزانه وهابزاده<sup>۲\*</sup>

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 (EC ۳,۱,۱,۳) به عنوان عضوی از گروه کربوکسیلیک استر هیدرولازها، کاتالیز آبکافتی تری آسیل گلیسرول 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 نگاهداشت آنزیم لیپاز درون-سلولی است و همچنین فعالیت استریفیکاسیون سلول های کشت یافته به فرم آزاد و تثبیت یافته 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.

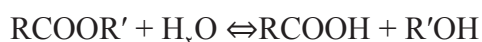
**مواد و روش‌ها:** سلول های رایزوپوس اوریزا تثبیت یافته بر پایه لوفای اسفنجی جهت مقایسه با فرم کشت آزاد سلول تهیه شد. سنجش فعالیت استریفیکاسیون از روش کدورتسنجی و با تعیین میزان اسید چرب باقی مانده در محلول واکنش انجام شد. **یافته‌ها:** بر طبق سنجش‌های انجام شده بیوکاتالیست سلولی به هر دو فرم تثبیت یافته و آزاد در زمان کشت ۴۸ ساعت حداکثر فعالیت استریفیکاسیون دارند. همچنین تثبیت سلولی سبب افزایش فعالیت استریفیکاسیون 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- لوفاسفنجی- لیپاز درون سلولی - غربال‌های مولکولی آب- بوتیل اولئات

### مقدمه

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

هیدرولیز استرهای زنجیره بلند



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

۱,۲. سنتز مستقیم استر از الکل و اسید



در سال‌های اخیر استفاده از فرایندهای بیولوژیکی 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).

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

ویسکوزیته محیط، مواد فعال ساز سطحی، میزان مایع تلقیح از جمله عواملی هستند که بر رشد به فرم پلتی موثر می باشند (۱۰-۱۲)

تثبیت قارچ های رشته ای بر پایه های مناسب یکی از راه های بهبود مشکلات سیستم های قارچی است. در سیستم قارچی رایزوپوس اوریزا تثبیت سبب افزایش مورفولوژی رشد به فرم پلتی می شود همچنین از ترشح آنزیم به خارج سلول جلوگیری و سبب بهبود تولید آنزیم لیپاز به فرم درون سلولی می شود (۶). علاوه بر مزایای ذکر شده تثبیت سلول امکان بازیابی توده زیستی و استفاده متوالی از آن را به سیستم می بخشد (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 (۱۳-۱۵). وانگ<sup>۹</sup> همکارانش در سال ۲۰۰۸ اجزا محیط کشت سیستم سلولی قارچ رایزوپوس کینسیس<sup>۱۰</sup> 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 قارچ های رشته ای توانایی کاتالیز واکنش شکست لیپیدها را داراست. بنابراین سلول های قارچی خشک شده توسط استن را به طور مستقیم می توان در واکنش های 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 آن ها محدود شده است (۲).

از دیدگاه بیوتکنولوژی پیشرفت واکنش های آنزیمی در حضور حلال آلی نسبت به آب، شامل فوایدی از جمله موارد زیر می شود:

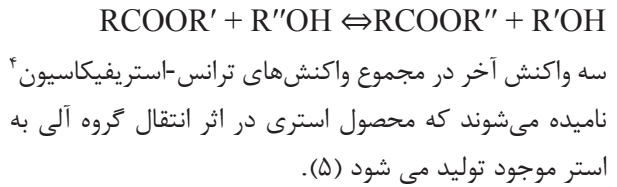
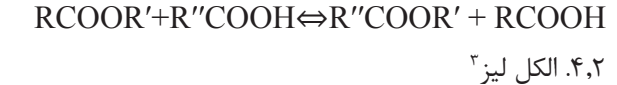
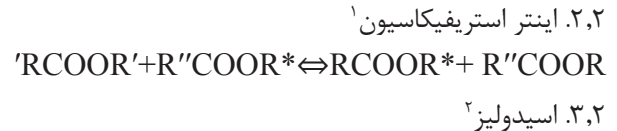
#### حلالیت بالای مواد آلی در بستر غیر آبی.

امکان پیشبرد فرایندهایی که در سیستم آبی به علت محدودیت های سنتیکی و یا ترمودینامیکی امکان پذیر نمی باشد. پایداری بیشتر آنزیم و عدم انحلال آنزیم در حلال آلی که امکان بازیابی و استفاده مجدد از آنزیم را فراهم می کند.

سهولت نسبی جداسازی محصول از حلال آلی نسبت به آبی. افزایش بازدهی سیستم ( به خصوص در ارتباط با سیستم های ویسکوز) ؛ به علت بهبود شرایط انتقال جرمی (۱۷).

۹ -Wang et al.

۱۰ -Rhizopus chinesis



با توجه به حضور گسترده لیپیدها در طبیعت، آنزیم لیپاز در اکثر جانداران به صورت طبیعی تولید می شود. از میان منابع حیوانی، گیاهی و میکروارگانیسم ها؛ آنزیم لیپاز تولیدی توسط منابع میکروبی؛ قارچی و باکتریایی کاربرد گسترده ای در زمینه های 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.

قارچ های رشته ای به صورت گسترده در صنعت جهت تولید محصولاتی مانند اسیدهای آلی، آنزیم، آنتی بیوتیک ها و داروهای کاهش کلسترول استفاده می شوند.<sup>۵</sup> رشد قارچ ها در کشت غوطه ور با توجه به شرایط محیط کشت، مورفولوژی های مختلف از جمله میسلیم<sup>۶</sup>، توده ای<sup>۷</sup> و یا به فرم پلتی<sup>۸</sup> نشان می دهد. 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 می برند، به دور پره های بیوراکتور می پیچند و مسیرهای انتقال مواد غذایی را مسدود می کنند. 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، تنش های اکسیژن، افزودنی های پلیمری،

- ۱ -Interesterification
- ۲ - Acidolysis
- ۳ - Alcoholysis
- ۴ -Transesterification
- ۵ -Morphology
- ۶ -Mycelia
- ۷ Clump
- ۸ Pellet

## پایه تثبیت

لופا اسفنجی به جهت درصد تخلخل بالا، حجم مخصوص بالای حفرها، خواص فیزیکی پایدار، غیر سمی بودن، تجزیه پذیری زیستی، هزینه پایین و سادگی دسترسی بسترهای مناسبی جهت رشد میکروارگانیسم ها به شمار می روند. دیسک های لופا و با شعاع ۱/۵ cm و ضخامت ۰/۲-۰/۴ 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 اسلنت های حاوی محیط کشت جامد (۰/۴ PDA<sup>۱۴</sup> و ۲٪ آگار) انتقال و در دمای ۲۴°C به مدت هفت روز نگه داری می شود (۶). سپس با استفاده از آب مقطر استریل محلول اسپور از کشت جامد تهیه شد و به روش هموسیتمتر شمارش گردید. میزان ۱ ml از محلول با غلظت (spore/ml) ۸ × ۱۰<sup>۸</sup> به ۱۰۰ ml از محیط کشت مایع استریل حاوی ۰/۱ 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 لופا 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 زمان های متفاوت گرم خانه 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. شکل ۱ نمایی از لופا قبل و بعد از تثبیت قارچ رایزوپوس اوریزا می دهد.

## منحنی رشد و تخمین میزان توده زیستی

۱۸ نمونه ارلن حاوی ۵۰ mL محیط کشت پایه، تهیه شده در ارلن ۲۵۰ mL، 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 حاوی ۱۰۸ × 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<sup>۱۵</sup> جداسازی و کاغذ فیلتر حاوی توده زیستی توسط آب

بیودیزل به عنوان یک جایگزین مناسب برای سوخت های فسیلی، با بهبود مشکلات اقتصادی، زیست محیطی و اجتماعی سوخت های فسیلی یکی از سرفصل های مهم در مطالعات اخیر است. از جمله معایب بیودیزل می توان به ویسکوزیته بالای آن نسبت به سوخت های فسیلی اشاره کرد. موتورهای دیزلی جدید با سیستم سوخت رسانی تزریقی، نسبت به تغییرات ویسکوزیته سوخت حساسیت دارند و اختلال ناکافی سوخت و هوا سبب ضعف در کارایی سیستم تزرقی و در نتیجه سوخت ناقص؛ تولید دود، همچنین چسبیدن رینگ، انسداد فیلتر و تولید رسوب در موتور می شود (۱۰). هرچه ویسکوزیته سوخت بالاتر باشد تمایل سوخت به ایجاد مشکلات مذکور بیشتر می شود. 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 گسترده ای در زمینه افزودنی های سوخت های دیزلی دارد و سبب کاهش تغییرات ویسکوزیته سوخت در دماهای پایین می شود. همچنین حضور ۱-بوتیل اولئات در لایه های پلیمری پلی وینیل کلرید (PVC) سبب ایجاد پلیمری با انعطاف پذیری بالا می شود. از سایر موارد کاربرد این استر می توان کاربری به عنوان عامل مقاوم در برابر آب در سیال های هیدرولیک و نیز مصرف آن در صنایع آرایشی و غذایی اشاره کرد (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 در صنایع مختلف، سنتز استر ۱-بوتیل اولئات با استفاده از بیوکاتالیست تولیدی بررسی شد و بازده آن در حضور و عدم حضور جاذب های محصول جانبی جهت دستیابی به حداکثر بازده در شرایط واکنش بررسی شد.

## مواد و روش ها

## مواد

اولئیک اسید، ایزو اکتان از شرکت کارلو اربا ایتالیا<sup>۱۱</sup> نرمال بوتانل، هگزان، و سایر مواد لازم جهت تهیه محیط کشت از شرکت مرک آلمان<sup>۱۲</sup> خریداری شد. روغن زیتون اوجی بلانکا<sup>۱۳</sup> ساخت کشور اسپانیا از منابع محلی تهیه گردید. میکروارگانیزم رایزوپوس اوریزا به فرم کشت جامد با کد (PTCC<sup>۱۷۴</sup>) از مرکز منطقه ای کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه شد.

- ۱۱ - Carlo Erba (Italy)  
 ۱۲ - Merck (Germany)  
 ۱۳ - Houji Blanka

۱۴ -Potato dextrose agar

۱۵ -Wathman

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

### سنتر آنزیمی استر-۱-بوتیل اولئات

سیستم سنتر 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 ۲۰ ml در دمای ۳۷°C و دور ۲۵۰ rpm در حضور دو عدد لوف انجام شد. جهت بررسی پیشرفت واکنش در هر بار نمونه گیری ۲۰ μl از محلول واکنش بررسی شد. آنالیز پیشروی واکنش از طریق روش کدورت سنجی اسید چرب آزاد صورت گرفت. هر یک از آزمایش ها حداقل ۲ بار تکرار شد. نحوه محاسبه بازده واکنش:

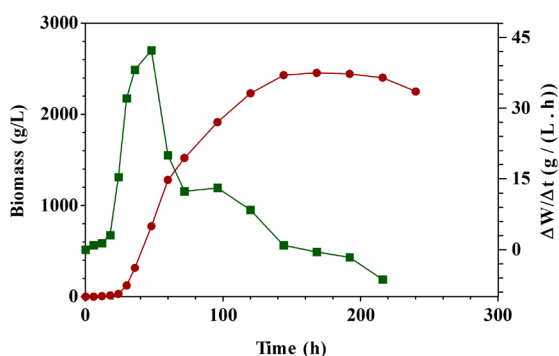
$$(\%) \text{ بازده} = \frac{\text{اسید چرب مصرفی } (\mu\text{mol})}{\text{اسید چرب اولیه } (\mu\text{mol})} \times 100$$

جهت بررسی اثر اضافه کردن غربال های 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.

### نتیجه ها

#### 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 شکل ۲ نمودار رشد میکروبی این میکروارگانیسم ارائه شده است. ۶ ساعت نخست کشت میکروبی منتسب به سازگاری میکروارگانیسم با محیط رشد می باشد و افزایش نمایی رشد پس از گذشت ۱۲ ساعت آغاز و در ۱۴۴ ساعت متوقف می شود.

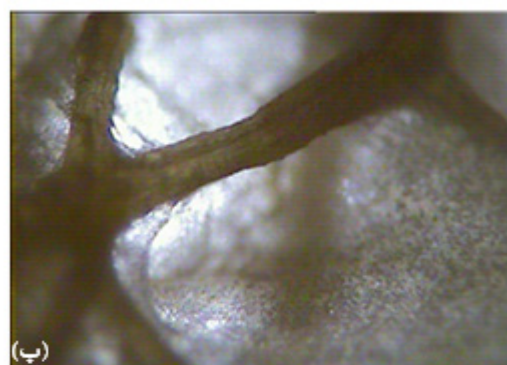
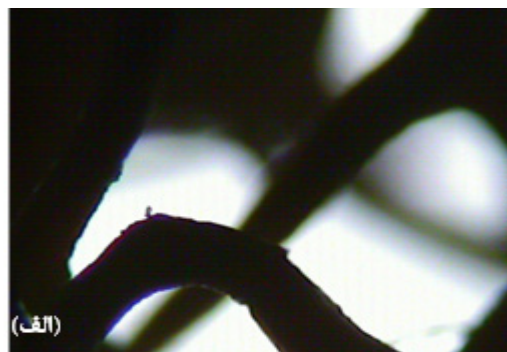


شکل ۲- منحنی رشد و میزان تغییرات توده زیستی قارچ رایزوپوس اوریزا (کشت به فرم سلول آزاد).

مقطر استریل شستشو و سپس در آون در دمای ۷۰°C خشک می شود. سپس با استفاده از دستگاه تعادل رطوبتی<sup>۱۶</sup> با کاهش رطوبت تا مقادیر زیر ۱٪ وزن آن یادداشت می شود.

#### سنجش فعالیت آنزیم لیپاز

فعالیت سنتزی آنزیم تولیدی با استفاده از روش کدورت سنجی سنجیده شد. واکنش سنتر استر جهت تعیین فعالیت شامل ۲ mmol نرمال بوتانول و اولئیک اسید است که با هگزان به حجم ۲ ml می رسد. ۱۰۰ mg از توده سلولی جهت شروع واکنش به ظرف درب دار ۱۰ ml حاوی ۲ ml از مواد واکنش اضافه شده و به مدت ۱/۵ ساعت داخل شکیب در دمای ۳۷°C با دور ۲۵۰ rpm قرار داده شد و سپس میزان اسید چرب مصرف شده طی واکنش سنتر 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 آزمایش ها حداقل دوبار تکرار شد. فعالیت بر حسب واحد U معادل مقدار آنزیمی است که در واکنش سنتر استر، ۱ μmol اسید چرب آزاد را به عنوان سوبسترا بر حسب دقیقه مصرف می نماید، بیان می کند.



شکل ۱ الف- شبکه سلولزی لوف قبل از تثبیت قارچ رایزوپوس اوریزا. ب- شبکه سلولزی لوف بعد از تثبیت قارچ رایزوپوس اوریزا (عکسها توسط میکروسکپ دوربیندار در مقیاس ۳۲ برابر تهیه شده است).

نحوه محاسبه فعالیت ویژه:

نسبتاً بالایی دارد که با حذف آب به عنوان محصول جانبی محدود کننده پیشرفت واکنش این مقدار تا ۹۶٪ بهبود می یابد (جدول ۱).

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

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

### بحث:

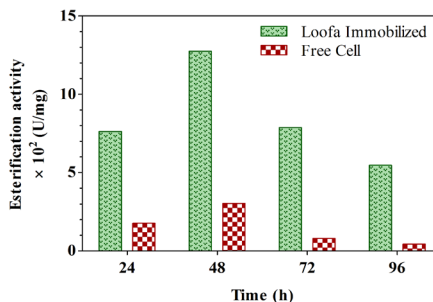
با توجه به شکل ۳ و مطالعات صورت گرفته بر میزان تغییرات توده زیستی، در محدوده نمایی بیشترین میزان افزایش رشد سلول در زمان ۴۸ تا ۶۰ ساعت مشاهده شده است و سپس این روند کاهش می یابد. همچنین در این محدوده زمانی بیشترین میزان تغییرات وزنی نسبت به زمان رشد سلول مشاهده می شود، در نتیجه نیاز سلول به جذب سوبسترا نیز به حداکثر مقدار خود خواهد رسید. بنابراین انتظار می رود تولید آنزیم لیپاز جهت جذب سوبسترای تری گلیسریدی 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 زمان های کشت فعالیت کمتری مشاهده شده است. ترتیب کاهش فعالیت استریفیکاسیون به صورت زیر است:

$$۴۸ < ۷۲ < ۲۴ < ۹۶ : \text{فعالیت استریفیکاسیون}$$

کاهش فعالیت در سلول های آزاد، به علت ترشح مقدار زیادی از آنزیم به محیط کشت سلول است (بر طبق داده های چاپ نشده میزان فعالیت خارج سلولی محاسبه شده برای فرم آزاد بیشتر از فرم تثبیت یافته است). بنابراین تثبیت سلول نقش بسزایی در نگه داشتن آنزیم در داخل دارد. هاما و همکارانش<sup>۱۷</sup> به بررسی اثر تثبیت سلول رایزوپوس اوریزا بر فوم پلی یورتان پرداختند و بهبود فعالیت آنزیم در اثر تثبیت سلول را گزارش کرده اند (۶). با این وجود استفاده از فوم های زیست تخریب ناپذیر در این مطالعات محدودیت های زیست محیطی در مقیاس بالا ایجاد خواهد کرد. در مطالعات کامئو و همکارانش<sup>۱۸</sup> (۳) علاوه بر مقدار فعالیت کمتر بعد از ۹۶ ساعت فعالیت آنزیم رو به کاهش می گذارد علت این تفاوت رفتار را می توان 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.

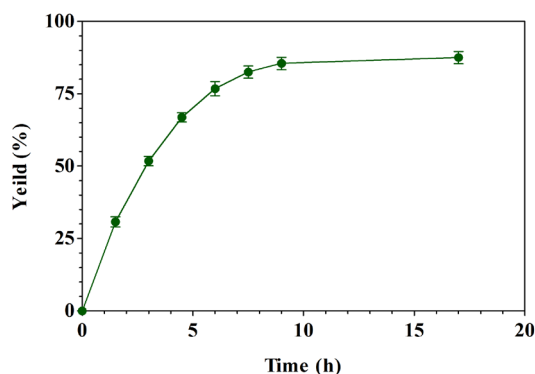


شکل ۳- مقایسه فعالیت لیپاز درون سلولی رایزوپوس اوریزا

بررسی اثر زمان کشت بر میزان فعالیت سنتزی آنزیم لیپاز پس از کشت میکروارگانیزم به فرم آزاد و تثبیت یافته 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 می گذارد. مشاهده می شود فعالیت سنتزی سلول تثبیت یافته در همه زمان های بررسی شده، نسبت به سلول آزاد افزایش قابل ملاحظه ای 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 می گذارد.

### بررسی پیشرفت واکنش سنتز استر

پیشرفت واکنش سنتز استر ۱- بوتیل اولئات در مجاورت بیوکاتالیست تثبیت یافته (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 می گذارد. پس از ۹ ساعت واکنش در بازده ۸۶٪ به تعادل رسیده است و با ادامه زمان واکنش تغییری در بازده مشاهده نمی شود. واکنش سنتز استر در سیستم معرفی شده بازدهی

سرعت تولید آنزیم لیپاز درون سلولی شده است. در بررسی پیشرفت واکنش سنتز استر در مجاورت بیوکاتالیست سلولی (شکل ۴) 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<sup>۱۹</sup> بازدهی سنتز استر ۱-بوتیل اولئات در مجاورت آنزیم لیپاز خارج سلولی رایزوپوس اوریزا را ۷۸٪ پس از ۱۰ ساعت معرفی کرده اند (۴) علت تفاوت بازده در مطالعه حاضر را می توان استفاده از سلول تثبیت یافته و جلوگیری از طبیعت زدایی آنزیم توسط شرایط محیطی ذکر کرد. سنتز استر از یک سو، و از سوی دیگر هیدرولیز آن به علت تجمع محصول جانبی (آب) سبب ایجاد تعادل و عدم پیشروی و افزایش بازده واکنش می شود (۱) که در صورت حذف آب به عنوان محصول جانبی مصرف سوبسترا تا مرز کامل شدن واکنش و بازدهی ۱۰۰٪ پیش می رود.

### نتیجه گیری:

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 می تواند مزایای قابل توجهی از جمله کاهش عوامل تأثیرگذار بر فعالیت آنزیم و کاهش هزینه، که خود یک عامل مهم در عدم کاربرد صنعتی محصولات واکنش های آنزیمی است، داشته باشد. همچنین تثبیت سلول علاوه بر قابلیت بازیابی بیوکاتالیست امکان بهبود فعالیت آنزیم متصل به درون سلولی را فراهم می کند. 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 تثبیت یافته بر لوفای اسفنجی) و غربال های مولکولی آب امکان پذیر است.

### سپاسگزاری:

نویسندگان اول و دوم مراتب قدرانی و سپاس خود را از تلاش های خالصانه سرکار خانم دکتر وهابزاده اعلام می دارند.

## 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 *Penicillium 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. *Catal 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 Polytetrafluoroethylene 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.

