



## مقایسه عملکرد سلول های آزاد و تثبیت شده باسیلوس لیکنی فورمیس

### در تولید پروتئاز قلیایی

محمد مشهدی کریم<sup>۱</sup>، مهرداد آذین\*<sup>۲</sup>، سید لطیف موسوی گرگری<sup>۳</sup>، میثم سرشار<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری، آدانشیار، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری،  
<sup>۲</sup> استاد، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه بیوتکنولوژی، آکارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

#### چکیده

سابقه و هدف: پروتئازها گروه مهمی از آنزیم های صنعتی هستند که امروزه به طور گسترده ای در صنایع مختلف مانند صنایع شوینده، چرم، دارویی و غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. این مطالعه با هدف تثبیت سلول های باسیلوس لیکنی فورمیس در گویچه های آلژینات کلسیم، بررسی اثر آن بر میزان تولید پروتئاز قلیایی و تأثیر عوامل مختلف بر پایداری گویچه های انجام شد.

مواد و روش ها: در ابتدا سلول های زنده باسیلوس لیکنی فورمیس در داخل گویچه های آلژینات کلسیم تثبیت شدند. بیوکاتالیست های تثبیت شده به منظور تولید پروتئاز قلیایی مورد استفاده قرار گرفتند. میزان تولید پروتئاز قلیایی در دو حالت تخمیر توسط سلول های تثبیت شده و غوطه ور با یکدیگر مقایسه شدند. تأثیر میزان پرشدگی سلولی در گویچه ها بر میزان تولید آنزیم مورد مطالعه قرار گرفت. pH و دمای اپتیمم فعالیت آنزیمی نیز تعیین گردید. علاوه بر این تأثیر عواملی مانند pH، زمان عمل آوری بیدها و تیمار با گلوکارآلدئید بر پایداری گویچه ها نیز بررسی گردید.

یافته ها: در این مطالعه میزان تولید و بهره وری پروتئاز قلیایی در سلول های تثبیت شده نسبت به حالت آزاد به ترتیب ۷۴ و ۵۴ درصد افزایش نشان داد. در مورد میزان پرشدگی گویچه ها نیز بهترین تولید در میزان پرشدگی ۵ درصد به دست آمد. pH و دمای اپتیمم فعالیت آنزیمی به ترتیب ۸ و ۶۵ درجه سانتی گراد تعیین گردید. بیشترین پایداری گویچه ها توسط عمل آوری در pH ۷/۴ و زمان ماند یک ساعت در کلرور کلسیم مشاهده شد. تیمار گویچه ها با گلوکارآلدئید نه تنها تأثیری بر افزایش پایداری شان نداشت بلکه کاهش پایداری را به دنبال داشت.

نتیجه گیری: استفاده از سلول های تثبیت شده باسیلوس لیکنی فورمیس در بیدهای آلژینات کلسیم می تواند موجب افزایش بهره وری تولید پروتئاز قلیایی نسبت به روش سلول های آزاد شود. از طرفی عدم نیاز به تهیه مکرر مایه تلقیح برای شروع هر تخمیر بسته می تواند منجر به کاهش هزینه های تولید آنزیم نیز گردد.

واژگان کلیدی: باسیلوس لیکنی فورمیس، پروتئاز قلیایی، تثبیت سلول، آلژینات کلسیم

پذیرش برای چاپ: فروردین ۱۳۹۰

دریافت مقاله: دی ۱۳۸۹

## مقدمه

مناسب ترین روش ها برای تثبیت سلول به دام اندازی (Entrapment) سلول ها در آلزینات کلسیم است. زیرا این تکنیک ساده و ارزان بوده و آلزینات سدیم نیز یک ماده بیولوژیکی غیرسمی و در دسترس می باشد. به همین دلیل می تواند به عنوان یک ماتریکس مناسب برای تثبیت بیومولکول ها و میکروارگانیسم ها استفاده گردد (۱۱). این مطالعه با هدف تثبیت سلول های باسیلوس لیکنی فورمیس در گویچه های کلسیم آلزینات، بررسی اثر آن بر میزان تولید پروتئاز قلیایی و همچنین تاثیر عوامل مختلف بر پایداری آن ها انجام گرفت.

## مواد و روش ها

الف) تهیه سویه استاندارد: سویه تولید کننده پروتئاز قلیایی باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC1525 از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه گردید. باکتری بر روی محیط شیب دار Brain Heart Infusion Agar با pH ۷/۴ و دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و هر ماه یک بار تجدید کشت گردید. ب) تهیه مایه تلقیح: به این منظور ابتدا یک لوپ کامل از سویه انتخاب شده به ارلن حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت آبگوشت قلب و مغز گوساله (Brain Heart infusion Broth) استریل با pH ۷/۴ تلقیح و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و بر روی شیکر - انکوباتور با دور ۱۵۰ rpm گرم گذاری گردید. سپس حجم مشخصی از محیط کشت تلقیح (بسته به میزان پرشدگی (Stuffing rate)) به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. به کمک سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی از سلول های رسوب یافته ایجاد و به عنوان مایه تلقیح برای تثبیت مورد استفاده قرار گرفت. تلقیح محیط های کشت تولیدی توسط سلول های آزاد به طور مستقیم از محیط کشت تلقیح شده ۱۶ ساعته صورت گرفت (۱۱).

ج) تثبیت سلول ها در گویچه های آلزینات کلسیم: سلول های باسیلوس لیکنی فورمیس PTCC1525 با کمی تغییر در روش پیشنهاد شده آناپورنا (Annapurna) و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در گویچه های آلزینات کلسیم تثبیت شدند (۱۲). به طور خلاصه، محلول سدیم آلزینات ۳ درصد با حل کردن آلزینات سدیم (با

پروتئازها یکی از مهم ترین آنزیم های هیدرولیتیک هستند. این آنزیم ها از اجزای ضروری تشکیل دهنده همه اشکال حیات بر روی زمین شامل پروکاریوت ها، قارچ ها، گیاهان و حیوانات می باشند. از این میان میکروارگانیسم ها به دلیل رشد سریع، نیاز به فضای محدود برای کشت و قابلیت دستکاری ژنتیکی آسان به منظور تولید آنزیم های جدید با خواص متفاوت، منابع ترجیحی تولید پروتئازها هستند (۳-۱). پروتئازهای قلیایی میکروبی قسمت اعظم بازار جهانی آنزیم ها را به خود اختصاص داده اند. برای نمونه دو سوم سهم آنزیم ها در صنایع شوینده مربوط به پروتئازهای قلیایی می باشد. این آنزیم ها به دلیل تنوع بیوشیمیایی و کاربردهای گسترده در صنایع دباغی، غذایی، پزشکی، شوینده و فرآیندهایی از قبیل تیمار فاضلاب، بازیافت نقره، تولید پروتئین هیدرولیز شده، بیوسنتز، تجزیه زیستی و بیوترانسفورمیشن اهمیت دارند (۶-۳). پروتئازهای قلیایی به وسیله طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها شامل باکتری ها، کپک ها، مخمرها و همچنین بافت های پستانداران تولید می شوند (۷). اما با این وجود، جستجوی مقالات با قاطعیت نشان می دهد که امروزه باکتری ها محبوب ترین منبع تولید تجاری پروتئازهای قلیایی می باشند (۸). مطالعات نشان داده است که از میان تمامی باکتری های جداسازی شده برای استفاده در صنایع مختلف، اعضای جنس باسیلوس به ویژه گونه های باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لیکنی فورمیس تولید کننده های تجاری بهتر آنزیم پروتئاز هستند (۴). فرآورده های میکروبی به طور معمول به وسیله سلول های آزاد یا سلول های تثبیت شده تولید می گردند. استفاده از سلول های تثبیت شده به عنوان کاتالیست های صنعتی در مقایسه با فرآیندهای تخمیر با سلول های آزاد مزیت هایی دارد. از آن جمله می توان به قابلیت جداسازی توده سلولی از محیط کشت برای استفاده مجدد، تسهیل عملکرد مداوم برای یک دوره طولانی و افزایش بهره وری اشاره نمود. فرآیند تثبیت می تواند بر روی بسترهای مختلفی مانند کلسیم آلزینات، کاپاکاراگینان، پلی آکریل آمید، آگار و ژلاتین انجام گیرد. از طرفی انتخاب ماتریکس و تکنیک مناسب برای به حداقل رساندن معایب این روش ضروری می باشد (۹ و ۱۰). یکی از

ویسکوزیته متوسط، شرکت سیگما) در آب جوش تهیه گردید. سپس سوسپانسیون سلولی تهیه شده در مرحله قبل، برای تثبیت در کپسول‌های آلژینات کلسیم به محلول خنک شده آلژینات سدیم اضافه و به خوبی مخلوط گردید. سپس مخلوط به دست آمده به سرنگ استریل ۲۰ میلی‌لیتری انتقال یافته و از ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری به داخل بشر حاوی محلول کلرید کلسیم ۰/۳ مولار در حال چرخش ریخته شد. برای تشکیل نهایی گویچه‌ها، هم‌زدن به مدت ۳۰ دقیقه پس از چکانده شدن آخرین قطره از مخلوط ادامه یافت. محلول حاوی گویچه‌ها به منظور عمل‌آوری (curing) به مدت یک ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. سپس محلول کلرید کلسیم تخلیه و گویچه‌ها دو بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند. از گویچه‌های تهیه شده به عنوان مایه تلقیح برای محیط کشت تولید استفاده گردید.

(د) بررسی اثر  $pH$  و زمان عمل‌آوری بر پایداری گویچه‌ها: در ابتدا گویچه‌ها با دو زمان عمل‌آوری ۱ و ۲۴ ساعت تهیه شدند. سپس محیط‌های کشت با  $pH$  های ۷/۴، ۸، ۸/۵ و ۹ ساخته و در حجم‌های ۵۰ میلی‌لیتری به درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردیدند. این محیط‌های کشت با گویچه‌های تهیه شده تلقیح شدند به طوری که برای هر  $pH$ ، ۳ تکرار با گویچه‌ها با زمان عمل‌آوری یک ساعت و ۳ تکرار با گویچه‌ها با زمان عمل‌آوری ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. ارلن‌ها به مدت ۲ هفته بر روی شیکر - انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm گرم‌گذاری گردیدند. سپس هر ۲۴ ساعت یک بار وضعیت پایداری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین هر ۴۸ ساعت یک‌بار نیز محیط کشت کهنه با محیط کشت تازه با  $pH$  معین تعویض گردید. برای تهیه محیط‌های کشت با  $pH$  های ۷/۴، ۸، ۸/۵ و ۹ بافر Tris-HCl و برای  $pH$  ۹ از بافر Carbonate-Bicarbonate استفاده شد.

(ه) بررسی اثر غلظت‌های مختلف گلوکارآلدئید بر پایداری گویچه‌ها: پس از تهیه گویچه‌ها و ۱ ساعت عمل‌آوری در کلرید کلسیم، گویچه‌ها دو بار با محلول سالیین استریل شستشو و به قسمت‌های مساوی تقسیم شدند. در شرایط استریل هر قسمت به یکی از بشرهای حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۵، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ درصد از گلوکار آلدئید انتقال یافته (از هر

غلظت ۳ تکرار) و به مدت ۲۰ دقیقه هم‌زده شدند. گویچه‌ها پس از شستشوی مجدد به درون محیط کشت با  $pH$  ۷/۴ انتقال یافتند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm به مدت یک هفته گرم‌گذاری شدند. در طول این مدت پایداری گویچه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت (۱۳).

(و) بررسی اثر میزان پرشدگی در میزان تولید آنزیم: برای این منظور گویچه‌ها در ۴ میزان پرشدگی مختلف ۱٪، ۵٪، ۱۵٪ و ۳۰٪ (از هر کدام سه تکرار) ساخته و به محیط تولید انتقال داده شدند. پس از ۴۸ ساعت گرم‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm، از نظر میزان تولید آنزیم مورد سنجش قرار گرفتند. (ز) مقایسه تولید و بهره‌وری سلول‌های تثبیت شده و آزاد: در ابتدا سه ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت با  $pH$  ۷/۴ به وسیله سلول‌های آزاد و سه ارلن نیز توسط سلول‌های تثبیت شده (با میزان پرشدگی ۵٪) کشت داده شدند. از کشت‌های آزاد و تثبیت شده در زمان‌های مشخص نمونه‌برداری و میزان آنزیم تولید شده آن‌ها تعیین گردید. سپس نقطه زمانی که در آن بالاترین تولید و بهره‌وری ایجاد می‌گردد در هر دو گروه مشخص و با یکدیگر مقایسه شد (۱۰).

(ح) تعیین  $pH$  بهینه فعالیت آنزیمی: در ابتدا سوبسترای مورد استفاده برای سنجش آنزیمی با  $pH$  های ۷/۴، ۸، ۸/۵، ۹ و ۹/۵ تهیه گردید. برای  $pH$  های ۷/۴، ۸، ۸/۵ و ۹ از بافر Tris-HCl و برای  $pH$  ۹/۵ از بافر Carbonate-Bicarbonate استفاده شد. سنجش محلول رویی محیط کشت پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm، در هر  $pH$  و با ۳ تکرار انجام گرفت (۱۴).

(ط) تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیمی: در ابتدا دمای سوبسترا به دماهای مورد نظر رسانده شد (دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۵۵، ۶۰، ۶۵، ۷۰، ۷۵، ۸۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد). سپس محلول رویی به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای مورد نظر در بن ماری گرم‌گذاری شد. با توجه به اطلاعات به دست آمده، دمای بهینه فعالیت آنزیمی تعیین گردید (۱۴).

(ی) سنجش پروتئاز فلیایی: برای این منظور از روش Kunitz استفاده شد (۱۵). به طور خلاصه، پس از پایان زمان انکوباسیون،

جدول ۱: اثر زمان عمل آوری\* بر پایداری گویچه ها در دامنه های مختلف pH.

pH محیط کشت	زمان عمل آوری در کلرید کلیم	زمان ماندگاری گویچه ها** (شبه روز)
۷/۴	۱ ساعت	۱۵
	۲۴ ساعت	۱۵
۸	۱ ساعت	۱۲
	۲۴ ساعت	۷
۸/۵	۱ ساعت	۵
	۲۴ ساعت	۱
۹	۱ ساعت	۴
	۲۴ ساعت	۱

\*دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور همزن ۱۵۰ rpm.

\*\*نمونه هایی که کمتر از ۵۰ درصد از گویچه ها شکسته بود، پایدار در نظر گرفته شد.

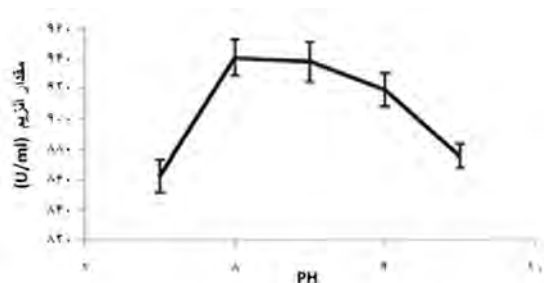
جدول ۲: بررسی اثر گلو تار آلدئید بر پایداری گویچه ها.

غلظت گلو تار آلدئید (درصد)	زمان ماندگاری (شبهانه روز)
۰/۰۵	۱
۰/۱	۱
۰/۳	۱
۰/۵	۱
۰/۷	۲
۱	۲
شاهد (۰ درصد)	۶

تیروزین، میزان تیروزین (اسید آمینه آروماتیک) آزاد موجود در محلول و میزان فعالیت آنزیمی موجود در یک میلی لیتر از محلول رویی محیط کشت محاسبه گردید. هر واحد آنزیمی، مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که بتواند تحت شرایط آزمایش در مدت یک دقیقه، یک میکروگرم تیروزین را آزاد کند.

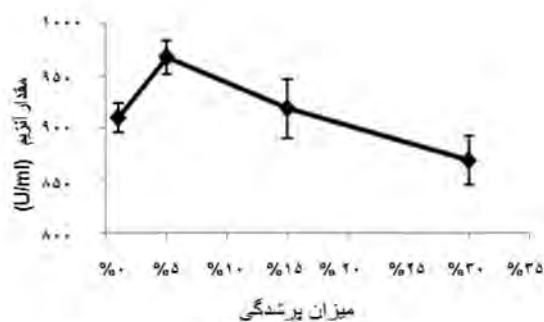
### نتایج

الف) بررسی اثر pH بر پایداری گویچه ها: نتایج نشان دادند که با بالا رفتن pH پایداری گویچه ها کاهش می یابد (جدول ۱). بنابراین گویچه ها برای استفاده در دامنه های pH قلیایی در مدت زمان بالا مناسب نبودند. همچنین گویچه ها با یک ساعت عمل آوری نسبت به گویچه ها با ۲۴ ساعت عمل آوری از پایداری بالاتری برخوردار بودند.



نمودار ۲: اثر pH بر میزان فعالیت آنزیمی در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد.

محیط کشت تولید به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی محیط کشت به ۱ میلی لیتر از محلول همستن کازئین (Hammarsten Casein) یک درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در بن ماری شیکر دار با ۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری گردید. در نهایت واکنش با اضافه کردن ۱/۵ میلی لیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به آن خاتمه یافت. برای تهیه شاهد نیز تمام مراحل مشابه با لوله های نمونه مورد سنجش بود، با این تفاوت که در ابتدا به محلول رویی TCA اضافه گردید (توقف فعالیت آنزیمی)، سپس بعد از چند دقیقه محلول کازئین ۱ درصد به آن اضافه شد. در مرحله بعد لوله های نمونه و شاهد به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ گردیدند. نقطه جذب محلول رویی لوله های تست نسبت به لوله های شاهد در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. با تطابق نقطه جذب به دست آمده با نمودار استاندارد



نمودار ۱: اثر میزان پرشدگی بر تولید آنزیم.

در میلی لیتر در ساعت گزارش گردید. در نتیجه بهره‌وری در سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد حدود ۵۴ درصد افزایش نشان می‌دهد. با توجه به این نتایج بهترین زمان برای تعویض محیط کشت تولید مصرف شده با محیط کشت تولید تازه (به منظور استفاده مجدد از گویچه‌ها برای به کارگیری در تکرار تخمیر بسته)، ۳۵ ساعت بود (نمودارهای ۴ و ۵).

### بحث

مطالعات مختلف نشان داده است که به طور قابل توجهی میزان محصول و بهره‌وری در مورد تولید پروتئازهای قلیایی با روش تثبیت، بالاتر از حالت سلول‌های آزاد است. از طرفی می‌توان از سلول‌های تثبیت شده برای چندین تخمیر بسته (batch) به عنوان مایه تلقیح استفاده نمود و دیگر به تهیه مایه تلقیح در ابتدای هر مرحله نیاز نمی‌باشد. به عنوان نمونه آدینارایانا (Adinarayana) و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از سلول‌های باسیلوس سوبتیلیس PE-11 تثبیت شده در گویچه‌های آلژینات کلسیم و روش تکرار تخمیر بسته، بهره‌وری ۱۵/۱۱ واحد آنزیم بر میلی لیتر بر ساعت را به دست آوردند که این میزان نسبت به روش سلول‌های آزاد ۷۹/۰۳ درصد بیشتر بود. همچنین این محققان گزارش کردند که گویچه‌ها در محیط کشت تولید دارای ۹ pH برای ۹ بار تخمیر بسته، در مدت ۲۴ ساعت و بدون تخریب و از هم پاشیدگی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۰). پتومارتی (Potumarthi) و همکاران در سال ۲۰۰۷ شرایط تثبیت سلول‌های باسیلوس لیکنی فورمیس NCIM-2042 را در گویچه‌های آلژینات کلسیم

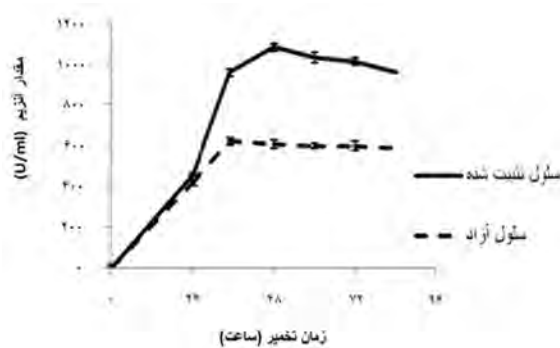
(ب) ارزیابی تیمار گویچه‌ها با گلوکارآلدئید: نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با گلوکارآلدئید در غلظت‌های مورد بررسی نه تنها پایداری را افزایش نداد بلکه موجب کاهش آن نیز شده است (جدول ۲).

(ج) ارزیابی اثر میزان پرشدگی بر میزان تولید آنزیم: تأثیر میزان پرشدگی در مقدار تولید آنزیم در چهار نسبت ۱٪، ۵٪، ۱۵٪ و ۳۰٪ بررسی شد. نتایج نشان داد که در حالت ۵٪ تولید آنزیم (۹۶۷ U/ml) نسبت به حالات دیگر در سطح بالاتری قرار دارد (نمودار ۱).

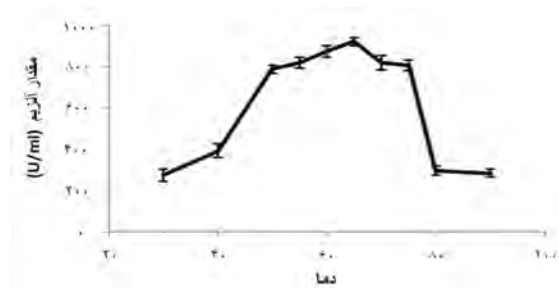
(د) pH بهینه فعالیت آنزیمی: میزان فعالیت آنزیمی در دامنه‌های pH نشان داد که فعالیت آنزیم در pH ۸ و ۸/۵ تقریباً یکسان و بیشینه است (نمودار ۲). با افزایش pH تا ۹ نیز کاهش بسیار کمی در فعالیت آنزیمی مشاهده شد. اما با افزایش pH به ۹/۵ شیب نزولی فعالیت آنزیمی زیادتر بود.

(ه) دمای بهینه فعالیت آنزیمی: نتایج نشان داد که بهترین دامنه دمایی برای فعالیت آنزیم بین ۵۰ تا ۷۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (نمودار ۳). دمای بهینه فعالیت آنزیم ۶۵ درجه سانتی‌گراد محاسبه گردید و آنزیم حتی در ۷۵ درجه سانتی‌گراد نیز حدود ۸۸ درصد فعالیت خود را نسبت به ۶۵ درجه سانتی‌گراد حفظ کرده بود.

(و) مقایسه میزان تولید و بهره‌وری در سلول‌های تثبیت شده و آزاد: نتایج نشان داد که بالاترین میزان تولید سلول‌های آزاد پس از ۳۵ ساعت، ۶۲۳ واحد آنزیم در میلی لیتر و در سلول‌های تثبیت شده پس از ۴۸ ساعت، ۱۰۸۳ واحد در میلی لیتر است. این میزان حدود ۷۴ درصد بیشتر از سلول‌های آزاد بود. بنابراین در این مطالعه بالاترین بهره‌وری در هر دو حالت پس از ۳۵ ساعت و برای سلول‌های آزاد و تثبیت شده به ترتیب برابر با ۱۷/۸ و ۲۷/۴ واحد



نمودار ۴: مقایسه میزان تولید پروتئاز توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده.



نمودار ۳: اثر دما بر میزان فعالیت آنزیمی در pH ۸/۵.

از آن جایی که پروتئاز قلیایی تولید شده در این پژوهش، از نظر pH و دمای اپتیمم (به ترتیب ۸ و ۶۵ درجه سانتی گراد) بسیار شبیه به پروتئاز تجاری آلکالاز تولید شده توسط شرکت Novozyme می باشد، از این رو در صورت تولید انبوه می تواند به عنوان جایگزین مناسبی برای این آنزیم باشد.

### نتیجه گیری

استفاده از سلول های تثبیت شده باسیلوس لیکنی فورمیس در گویچه های آلزینات کلسیم دارای مزایایی چون عدم نیاز به تهیه مکرر مایه تلقیح برای شروع هر سیکل، کاهش هزینه ها و نیز افزایش بهره وری تولید پروتئاز قلیایی نسبت به روش سلول های آزاد می باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مسئولان و مدیران سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به ویژه پژوهشکده زیست فناوری به دلیل حمایت های مالی و تأمین امکانات مورد نیاز این تحقیق کمال تشکر و امتنان را دارند.



نمودار ۵: مقایسه بهره وری توسط سلول های آزاد و تثبیت شده.

بهینه سازی نمودند. محققین یاد شده نشان دادند که در محیطی با pH ۹/۵، گویچه های ایجاد شده برای ۱۲ سیکل ۴۸ ساعته به روش تکرار تخمیر بسته و بدون از هم پاشیدگی می تواند مورد استفاده قرار گیرد (۱۱). در مطالعه حاضر نیز گویچه ها با شرایطی مشابه با تحقیقات یاد شده تهیه شدند. اما بر خلاف نتایج به دست آمده در پژوهش های قبلی، در این مطالعه پایداری گویچه ها در دامنه های pH بالاتر از ۸ به شدت کاهش نشان داد. به طوری که گویچه ها در محیط کشت با pH ۹ بیش از ۴ روز دوام نیاوردند. اما در pH ۷/۴، گویچه ها تا ۱۵ روز پایداری خوبی داشتند. بنابراین pH محیط کشت تولید برابر با ۷/۴ در نظر گرفته شد. زمان مناسب عمل آوری گویچه ها نیز یک ساعت محاسبه گردید.

یافته های پژوهش حاضر نشان داد که تیمار گویچه ها با غلظت های مختلف محلول گلو تار آلدئید موجب کاهش پایداری آن ها می شود. در پژوهش جاری تأثیر میزان پرشدگی در بیدها بر میزان تولید پروتئاز قلیایی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. بالاترین تولید در میزان پرشدگی ۵ و ۱۰ درصد به ترتیب برابر با ۹۴۰ و ۹۶۷ واحد در میلی لیتر بوده است. میزان پرشدگی نشان دهنده مقدار سلول هایی است که درون گویچه ها جای داده شده اند. بنابراین مشخص است زمانی که این نسبت افزایش یابد نشت سلول ها و در نتیجه تخریب گویچه ها نیز افزایش می یابد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، میزان پرشدگی ۵ درصد برای تهیه گویچه ها مورد استفاده به منظور تولید آنزیم به روش تثبیت سلولی انتخاب گردید. مقایسه میزان تولید و بهره وری به دست آمده در روش تثبیت شده و آزاد نیز نشان داد که این میزان در حالت اول نسبت به حالت دوم به ترتیب ۷۴ و ۵۴ درصد افزایش داشته است.

## References

1. Deepti A, Pankaj P, Tushar B, Shridhar P. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem*, 2004; 39(8): 977-981.
2. Wu TY, Mohammad AW, Jahim JMd, Anuar N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microb Tech*, 2006; 39(6): 1223-1229.
3. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002; 60(4): 381-395.
4. Jellouli K, Bougatef A, Manni L, Agrebi R, Siala R, Younes I, Nasri M. Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio metschnikovii* J1. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2009; 36(7): 939-948.
5. Bhaskar N, Sudeepa ES, Rashmi HN, Selvi AT. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus*-CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresour Technol*, 2007; 98(14): 2758-2764.
6. Sareen R, Mishra P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008; 79(3):399-405.
7. Singh J, Batra N, Sobti RC. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem*, 2001; 36(8-9): 781-785.
8. Genckal H. Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp. A Dissertation Submitted to the Graduate School in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of MASTER OF SCIENCE, ?zmir Institute of Technology, 2004.
9. Beshay U. Production of alkaline protease by *Teredinobacter turnirae* cells immobilized in calcium alginate beads. *Afr J Biotechnol*, 2003; 2(3):60-65.
10. Adinarayana K, Jyothi B, Ellaiah P. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. *AAPS PharmSci Tech*, 2005; 6(3): 391-397.
11. Potumarthi R, Subhakar Ch, Pavani A, Jetty A. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. *Bioresour Technol*, 2007; 99(6): 1776-1786.
12. Jetty A, Gangagni rao A, Sarva rao B, Madhavi G, Ramakrishna SV. Comparative studies of air lift and fluidized bed reactors for streptomycin production by immobilized cells of *Streptomyces bikiniensis* ATCC 11062. *Chem Biochem Eng*, 2005; 19: 179-184.
13. Yukio Kawaguti H, Ferrari Buzzato M, Castilho Orsi D, Tiemi Suzuki G, Harumi Sato H. Effect of the additives polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production. *Process Biochem*, 2006; 41(9): 2035-2040.
14. Shrinvas D, Naik GR. Characterization of alkaline thermostable keratinolytic protease from thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *Inter Biodeterior Biodegrad*, 2011; 65(1):29-35.
15. Kunitz M. Crystalline soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties. *J Gen Physiol*, 1947; 30(4): 291-310.



## Comparison of function of immobilized and free *Bacillus licheniformis* cells in production of alkaline protease

Mohammad Mashhadi-Karim<sup>1</sup>, Mehrdad Azin<sup>2</sup>, Seyyed Latif Mousavi Gargari<sup>3</sup>,  
Meysam Sarshar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>M.Sc., Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Science, Shahed University, Tehran, Iran.

<sup>4</sup>M.Sc., Molecular Biology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

---

### Abstract

**Background and Objective:** Proteases are an important group of industrial enzymes, which are widely used in different industries such as detergent, leather tanning, pharmaceutical, and food industries. The aim of this study was to immobilize *Bacillus licheniformis* cells in calcium alginate beads and study of its effects on the amount of alkaline protease production. Effects of several different conditions on stability of the beads were also examined.

**Material and Methods:** *Bacillus licheniformis* cells were immobilized in calcium alginate beads and were used for production of alkaline protease. The amount of enzyme production was compared in immobilized and free-cell fermentation. Effect of stuffing rate (%) on the enzyme production was studied. Optimum pH and temperature of enzyme activity were also determined. Furthermore, effects of pH, curing time and treating the beads by glutaraldehyde on stability of the beads were examined.

**Results:** In this study the amount of production and productivity of protease in immobilized cells state showed an increase of 74% and 54% in comparison to free cells state, respectively. The highest amount of the production of the enzyme was obtained in stuffing rate of 5% (v/v). Optimum pH and temperature of the enzyme activity were determined 8 and 65 °C, respectively. The highest stability of the beads was observed at curing time of 1 hour at pH of 7.4. Treating the beads by glutaraldehyde was detrimental to their stability.

**Conclusion:** Use of immobilized cells of *Bacillus licheniformis* in calcium alginate beads on the one hand, can increase productivity of the alkaline protease in comparison to free cells method, and on the other hand, reduces the cost of the enzyme production because of eliminating the need of preparation of inoculum for the new batches.

**Keywords:** *Bacillus licheniformis*, Alkaline protease, Cell Immobilization, Calcium Alginate.