



(Research Paper)
Biological Journal of Microorganism
11th Year, No. 42, Summer 2022
Received: April 16, 2021
Accepted: July 3, 2021

Effects of Different Strain Immobilization Methods on Protease Production of *Aeromonas Hydrophila* MSB16

Matia Sadat Borhani*

Biology Department, Faculty of Sciences, University of Gonbad Kavous, Golestan, Iran, msadat.borhani7@gmail.com

Abstract

Introduction: Microbial strain immobilization has some benefits like the repeatability and cost-effectiveness of strain recovery in the fermentation process. The present study aimed to investigate the effects of *Aeromonas hydrophila* MSB16 immobilization on its protease production.

Materials and Methods: The best method for immobilizing MSB16 was selected using five different polymers including alginate, alginate-polyvinyl alcohol, alginate-polyvinyl alcohol-calcium carbonate, alginate- γ -Al₂O₃ nanoparticles, and carboxymethylcellulose. The best immobilization method was selected based on the ability of protease production of immobilized cells through the one-factor-at-a-time approach. Then, the selected method was optimized using the surface response methodology (RSM). Finally, the data were analyzed by Design Expert 11 software and the analysis of variance.

Results: According to the results of RSM, the immobilized strain in a polymer containing 3% alginate - 3% polyvinyl alcohol - 3% calcium carbonate showed the highest protease production (205/32 U/mL). The second-order model was statistically significant based on the *F*-values

*Corresponding Author

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2021.128199.1382](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.128199.1382)



https://bjm.ui.ac.ir/article_25800.html

(25.95) and *p*-values (0.0001). The high determination coefficient (0.9584) and the non-significance lack of fit (0.7818) confirmed the accuracy of the model. The MSB16 protease production was affected by calcium carbonate and polyvinyl alcohol concentrations and had an inverse relationship with calcium carbonate.

Discussion and Conclusion: The statistical optimization of the MSB16 immobilization method led to a 2.13-fold increase in its protease production than the free cells.

Key words: Strain Immobilization, Sodium Alginate, Polyvinyl Alcohol, Calcium Carbonate, Response Surface Methodology

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال یازدهم، شماره ۴۲، تابستان ۱۴۰۱، صفحه ۳۲-۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۲

اثر روش‌های مختلف تثبیت سویه بر تولید پروتئاز آئروموناس هیدروفیلا MSB16

ماتیا سادات برهانی*: استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گلستان، ایران، msadat.borhani7@gmail.com

چکیده

مقدمه: تثبیت سویه‌های میکروبی دارای مزایایی مانند قابلیت تکرار و هزینه کمتر بازیافت سویه در فرایند تخمیر است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر تثبیت سویه آئروموناس هیدروفیلا MSB16 بر توانایی تولید پروتئاز آن بود.

مواد و روش‌ها: بهترین روش تثبیت سویه MSB16، از میان ۵ روش مختلف و با استفاده از پلیمرهای آلژینات، آلژینات - پلی وینیل الکل، آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم، آلژینات - نانوذره گاما آلومینیوم اکسید و همچنین کربوکی متیل سلولز انتخاب شد. مینای انتخاب بهترین روش تثبیت، میزان تولید پروتئاز سویه تثبیت شده در مقایسه با سویه تثبیت نشده به صورت مطالعه یک فاکتور در یک زمان است. سپس فاکتورهای مؤثر در روش تثبیت انتخاب شده، با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ، بهینه‌سازی شدند. آنالیز داده‌های مربوط به روش شناسی سطح پاسخ با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 11 و آزمون تحلیل واریانس بررسی شد.

نتایج: براساس نتایج روش شناسی سطح پاسخ، بالاترین میزان تولید پروتئاز توسط سویه تثبیت شده، در پلیمر حاوی ۳ درصد آلژینات - ۳ درصد پلی وینیل الکل - ۳ درصد کربنات کلسیم به دست آمد ($205/32 \text{ U/mL}$). مدل درجه دوم به دست آمده، براساس مقدار $F(25/59)$ و مقدار $p(0/001)$ از نظر آماری معنادار بود. بالابودن ضریب تشخیص ($0/9584$) و معنادار نبودن تست عدم برازش ($0/7818$) صحت مدل را تأیید می‌کرد. تولید پروتئاز تحت تأثیر غلظت کربنات کلسیم و پلی وینیل الکل قرار می‌گرفت و با غلظت کربنات کلسیم رابطه معکوس داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی آماری عوامل مؤثر بر تثبیت سویه MSB16 به روش آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم به افزایش ۲/۱۳ برابری تولید پروتئاز نسبت به سلول‌های میکروبی آزاد و تثبیت نشده منجر شد.

واژه‌های کلیدی: تثبیت سویه، آلژینات سدیم، پلی وینیل الکل، کربنات کلسیم، روش شناسی سطح پاسخ

* نویسنده مسئول مکاتبات



2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan

This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)



[10.22108/BJM.2021.128199.1382](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.128199.1382)



[20.1001.1.23225173.1401.11.42.2.1](https://doi.org/20.1001.1.23225173.1401.11.42.2.1)

مقدمه

پروتئازها یکی از مهم‌ترین گروه آنزیم‌های صنعتی‌اند که امروزه در صنایع بسیاری از جمله تولید شوینده‌ها، صنایع غذایی، دارویی، چرم، ابریشم و همچنین بازیافت ضایعات پروتئینی استفاده شده‌اند. میکروارگانیسم‌ها به‌خصوص باکتری‌ها از منابع اصلی تولید پروتئازها در صنعت محسوب می‌شوند. علت این امر، تولید خارج سلولی اغلب پروتئازهای باکتریایی، ساده‌تر بودن دستکاری ژنتیکی سویه میکروبی و بهینه‌سازی شرایط کشت آن برای افزایش تولید آنزیم است (۱).

محصولات میکروبی می‌توانند توسط سلول‌های آزاد یا سلول‌های تثبیت‌شده تولید شوند. گفتنی است تثبیت سلول می‌تواند بر رشد، فیزیولوژی و فعالیت متابولیکی یک سلول و در نتیجه بر بازده تولید محصولات میکروبی مؤثر باشد (۲). یکی از دلایل افزایش تولید محصولات میکروبی توسط سلول‌های تثبیت‌شده، افزایش تراکم سلول‌ها در راکتور صنعتی است. همچنین، تثبیت سلول‌های میکروبی به دلیل امکان استفاده مکرر سلول‌ها در فرایند تخمیر، پایداری طولانی مدت آنها، کاهش شستشوی سلول‌ها از راکتور و در نهایت هزینه کمتر بازیافت سویه، بر کاهش هزینه تمام‌شده آنزیم‌های صنعتی بسیار مؤثر است (۳).

به‌منظور تثبیت سلول‌ها، روش‌های متنوعی موجود است که به‌طور کلی می‌توان آنها را به چهار گروه اصلی شامل اتصال یا جذب به حامل جامد^۱، گیرافتادن درون یک ماتریکس (بستر) منفذدار^۲، اتصال سلول‌ها به‌صورت خودبه‌خودی یا با استفاده از عوامل متصل‌کننده^۳ و محدود کردن سلول‌ها بین حامل‌های مختلف^۴ تقسیم‌بندی کرد (۴). از میان روش‌های نامبرده، روش گیرافتادن درون یک بستر منفذدار، به دلیل سادگی

و پایداری بیشتر سلول‌های تثبیت‌شده در طول زمان، بیشتر شایان توجه قرار گرفته است (۵). نتایج مطالعات گذشته نشان داده‌اند سویه‌های میکروبی تثبیت‌شده توسط روش گیرافتادن درون یک بستر منفذدار می‌توانند برای مدت طولانی‌تر زنده باقی بمانند یا افزایش چشمگیری در تولید آنزیم نسبت به سلول‌های آزاد داشته باشند (۶ و ۷)؛ با وجود این، انتخاب بستری که سلول‌های میکروبی در آن قرار می‌گیرند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵). غیرقابل محلول بودن، غیرقابل تجزیه بودن، غیرسمی بودن، ارزان بودن و پایداری بودن در برابر صدمات مکانیکی و شرایط مختلف فیزیوشیمیایی، از جمله خصوصیات است که باید برای انتخاب بستر منفذدار مدنظر قرار گیرد. پلیمرهای آلی از جمله موادی‌اند که بیشتر خصوصیات بیان‌شده را دارند. از میان پلیمرهای آلی که در فرایند تثبیت سلول‌های میکروبی نتایج خوبی به همراه داشته‌اند می‌توان به آلژینات، آگار، آگارز، پلی وینیل الکل، چیتosan و کربوکسی متیل سلولز اشاره کرد (۸). با وجود این، بستر مناسب در تثبیت سلول‌های میکروبی باید به‌طور مجزا برای هر سویه میکروبی به نحوی انتخاب شود که سویه تثبیت‌شده نسبت به سلول‌های آزاد، علاوه بر تولید بالای محصول خود، از پایداری مناسبی نیز برخوردار باشد؛ برای مثال، در مطالعه کومار^۵ و واتس^۶ (۲۰۱۰) تولید پروتئاز توسط سویه *باسیلوس سوبتیلیس*^۷ در حالت سلول‌های آزاد و تثبیت‌شده به روش گیرافتادن در پلیمرهای مختلف از جمله ژلاتین، پلی آکریل آمید، کلسیم آلژینات و آگار بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان دادند بالاترین میزان تولید پروتئاز، کمترین میزان نشست سلول و بالاترین تعداد تکرار فرایند تخمیری تنها توسط سلول‌های تثبیت‌شده در

ژلاتین صورت می‌گیرد (۹).

علاوه بر انتخاب نوع بستر، شرایط فیزیکی و شیمیایی مختلف مانند دما، pH، میزان سلول‌های میکروبی و غلظت استفاده‌شده از مواد بستر، بر پایداری یا عملکرد سلول‌های میکروبی محصورشده در بستر منفذدار مؤثرند؛ بنابراین، در فرایند تثبیت سلول‌های میکروبی، باید دو عامل مهم نوع بستر و بهینه‌سازی شرایط آن در نظر گرفته شود (۱۰). متأسفانه مطالعات اندکی در زمینه بهینه‌سازی تثبیت سویه‌های میکروبی مولد پروتئاز با استفاده از روش‌های آماری صورت گرفته و بیشتر مطالعات به صورت تک عاملی (یک فاکتور در یک زمان) بوده است؛ از جمله این مطالعات، می‌توان به مطالعه پوتومارتی^۸ و همکاران (۲۰۰۸) اشاره کرد که در آن متغیرهای مؤثر بر تولید پروتئاز قلیایی باسیلوس لیکن فورمیس^۹ NCIM-2042 توسط روش پلاکت بورمن^{۱۱} غربالگری و ۴ متغیر غلظت سدیم آلژینات، غلظت کلسیم کلرید، سرعت هم‌زنی و میزان سلول‌های تثبیت‌شونده (مایه تلقیح) توسط روش فاکتوریل کامل^{۱۱} بهینه‌سازی شدند. نتایج این مطالعه نشان دادند سلول‌های میکروبی تثبیت‌شده تا ۱۲ بار به صورت پایایی بدون نشستن بیدها، تولید پروتئاز خوبی نسبت به سلول‌های آزاد نشان داشتند (۱۱). روش تک عاملی به دلیل ساده‌بودن اجرای روش و کارآمد بودن در غربالگری فاکتورهای مؤثر بر یک فرایند، بسیار مفید است؛ اما استفاده از روش‌های آماری مانند روش‌شناسی سطح پاسخ، به دلیل تکرارپذیری و صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها، رهیافتی ایده‌آل به منظور بهینه‌سازی شرایط فرایند تثبیت یا تولید یک محصول صنعتی محسوب می‌شود (۱۲). همچنین، برخلاف روش تک عاملی، این رهیافت قادر است با بررسی تعداد کمی از آزمایشات به میانگین بین متغیرهای مختلف مؤثر بر فرایند پی ببرد (۱۳).

بنابراین در مطالعه حاضر، ابتدا اثر ۵ روش مختلف تثبیت از نوع گیرافتادن درون یک بستر منفذدار، بر تولید پروتئاز آئروموناس هیدروفیلا MSB16 بررسی شد. بسترهای مطالعه‌شده شامل سدیم آلژینات، سدیم آلژینات - پلی وینیل الکل، سدیم آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم، سدیم آلژینات - نانوذره گاما آلومینیوم اکسید و کربوکی متیل سلولز بود. سپس فاکتورهای مؤثر در بهترین روش تثبیت انتخاب‌شده، با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ و با به کارگیری طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شدند. شایان ذکر است تاکنون گزارشی درباره تولید پروتئاز توسط سویه‌های تثبیت‌شده با سدیم آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم، سدیم آلژینات - نانوذره آلومینیوم و کربوکی متیل سلولز داده نشده است.

مواد و روش‌ها

سویه میکروبی و روش کشت: سویه آئروموناس هیدروفیلا MSB16 در مطالعه قبلی از پساب کارخانجات سوسیس (اصفهان) با استفاده از محیط کشت آگاردار پودر شیر بدون چربی (اسکیم میلک) ۲ درصد جداسازی شده بود (۱۴). شماره دستیابی توالی 16s rDNA این سویه در پایگاه داده‌ای GenBank برابر با KT006757 است. برای تهیه کشت خالص از باکتری جداسازی‌شده، از محیط تریپتیک سوی آگار استفاده شد. همچنین، به منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی به محیط کشت تولید پروتئاز، یک لوپ پر از کشت خالص باکتری مدنظر، در ۵ میلی‌لیتر محیط تریپتیک سوی براث کشت داده شد. محیط تلقیح‌شده، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا زمانی در انکوباتور نگهداری شد که جذب نوری محیط کشت در طول موج ۶۳۰ nm معادل نیم مک فارلند (۰/۱۳ - ۰/۰۸) معادل CFU/mL

استریل قرار گرفت (۱۶).

تثبیت سویه با استفاده از آلژینات سدیم - پلی

وینیل الکل - کربنات کلسیم: برای تثبیت سویه با استفاده

از آلژینات سدیم - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم، ابتدا ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری دارای کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 10^{-2}$ CFU/mL)، در ۵ میلی‌لیتر از استوک آلژینات ۵ درصد - پلی وینیل الکل ۳ درصد به‌صورت سوسپانسیون در آمد و سپس به مخلوط حاصل، ۱ میلی‌لیتر کربنات کلسیم ۳ درصد اضافه شد. مخلوط پلیمر و باکتری با استفاده از سرنگ انسولین استریل به‌صورت قطره‌قطره به ۴۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۲ مولار اضافه شد. سویه تثبیت‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سرم فیزیولوژی استریل قرار گرفت (۱۷).

تثبیت سویه با استفاده از آلژینات سدیم - نانوذره

گاما آلومینیوم اکسید: به‌منظور تثبیت سویه با استفاده از

آلژینات سدیم و نانوذره گاما آلومینیوم اکسید (- γ Al_2O_3)، ابتدا رسوب سلولی حاصل از ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری دارای کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 10^{-2}$ CFU/mL)، با استفاده از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد. به رسوب باکتری، ۵ میلی‌لیتر محلول نانوذره گاما آلومینیوم اکسید، اضافه و سپس مخلوط حاصل روی شیکر به مدت یک شب قرار داده شد تا نانوذرات به سطح میکروب متصل شوند. سپس سوسپانسیون سلولی در ۵ میلی‌لیتر آلژینات سدیم ۵ درصد حل شد. درنهایت، مخلوط پلیمر و باکتری با استفاده از سرنگ انسولین استریل به‌صورت قطره‌قطره به ۴۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۲ مولار اضافه شد. سویه تثبیت‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سرم

$10^8 \times 10^{-2}$ شود. به‌منظور بررسی اثر تثبیت سلول‌های میکروبی بر تولید پروتئاز، از محیط کشت مایع تولید پروتئاز حاوی ۲ درصد پودر شیر بدون چربی استفاده شد. این محیط کشت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در اتوکلاو استریل شد. بعد از تلقیح ۱ درصد حجم بر حجم از مایه تلقیح میکروبی آماده‌شده به محیط کشت تولید پروتئاز، گرمخانه‌گذاری (انکوباسیون) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت با سرعت هم‌زنی ۱۸۰ دور بر دقیقه انجام شد.

تثبیت سویه با استفاده از آلژینات سدیم: برای تثبیت

سویه با استفاده از پلیمر آلژینات سدیم، ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری دارای کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 10^{-2}$ CFU/mL) در ۵ میلی‌لیتر محلول آلژینات سدیم ۵ درصد به‌صورت سوسپانسیون در آمد. مخلوط پلیمر و باکتری با استفاده از سرنگ انسولین استریل به‌صورت قطره‌قطره به ۴۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۲ مولار از ارتفاع ۱-۲ سانتی‌متری اضافه شد. سویه تثبیت‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سرم فیزیولوژی استریل قرار گرفت (۱۵).

تثبیت سویه با استفاده از آلژینات سدیم - پلی

وینیل الکل: برای تثبیت سویه با استفاده از آلژینات

سدیم - پلی وینیل الکل، همانند روش قبلی از ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری دارای کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 10^{-2}$ CFU/mL) استفاده شد؛ با این تفاوت که از استوک مخلوط آلژینات ۵ درصد و پلی وینیل الکل ۳ درصد استفاده شد. سپس مخلوط پلیمر و باکتری با استفاده از سرنگ انسولین استریل به‌صورت قطره‌قطره به ۴۵ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۰/۲ مولار از ارتفاع ۱-۲ سانتی‌متری اضافه شد. سویه تثبیت‌شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سرم فیزیولوژی

فیزیولوژی استریل قرار گرفت.

تثبیت سویه با استفاده از کربوکسی متیل سلولز:

به منظور تثبیت سویه با استفاده از کربوکسی متیل سلولز، ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری دارای کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 1-2$ CFU/mL)، در ۵ میلی لیتر کربوکسی متیل سلولز ۲ درصد سوسپانسیون شد. مخلوط پلیمر و باکتری در نهایت به صورت قطره قطره به ۴۵ میلی لیتر محلول کلرید فریک 0.05 مولار اضافه شد. سویه تثبیت شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در سرم فیزیولوژی استریل قرار گرفت (۱۸).

غربالگری بهترین روش تثبیت سویه میکروبی:

به منظور انتخاب بهترین روش تثبیت سویه میکروبی، میزان تولید پروتئاز در سویه میکروبی تثبیت نشده (گروه کنترل) و تثبیت شده، بعد از گرمخانه گذاری (انکوباسیون) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت با سرعت هم زنی ۱۸۰ دور بر دقیقه بررسی شد. سپس سلول‌های میکروبی تثبیت شده از محیط

کشت تولید با استفاده از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه از مابقی محیط کشت جدا شدند و در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت یک ماه دوباره به محیط کشت تولید پروتئاز با همان شرایط قبلی تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت با سرعت هم زنی ۱۸۰ دور بر دقیقه گرمخانه گذاری شدند. سپس میزان تولید پروتئاز دوباره سنجش شد. هدف از این کار، بررسی پایداری سویه میکروبی تثبیت شده برای تولید پروتئاز در پلیمر آلی بود.

بهینه سازی فرایند تثبیت سویه میکروبی با استفاده

از روش شناسی سطح پاسخ: به منظور شناسایی و بهینه سازی فاکتورهای مؤثر در تثبیت سویه میکروبی، از روش شناسی سطح پاسخ با به کارگیری طرح مرکب مرکزی استفاده شد. مقادیر گذشته و مورد آزمایش سه فاکتور مؤثر انتخاب شده، در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل مؤثر بر تثبیت سویه میکروبی براساس مقادیر گذشته و واقعی

شماره متغیر	نام متغیر	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_1	غلظت آلزینات (درصد)	۱/۵	۳	۴/۵	۶	۷/۵
X_2	غلظت پلی وینیل الکل (درصد)	۱/۵	۳	۴/۵	۶	۷/۵
X_3	غلظت کرینات کلسیم (درصد)	۱/۵	۳	۴/۵	۶	۷/۵

کشت تولید پروتئاز با همان شرایط قبلی تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت با سرعت هم زنی ۱۸۰ دور بر دقیقه گرمخانه گذاری شد. سپس میزان تولید پروتئاز سنجش شد.

در نهایت، نتایج به دست آمده به صورت یک معادله درجه دوم بر طبق معادله شماره ۱ به دست آمد که رابطه متغیر وابسته یا پاسخ (مقدار پروتئاز تولید شده توسط

هر فاکتور در پنج سطح و با استفاده از ۲۰ آزمایش طرح مرکب مرکزی با شش تکرار در نقطه مرکزی بررسی شدند. در هر آزمایش که غلظت متفاوتی از مواد استفاده شده در تثبیت را داشت، سویه میکروبی به روش ذکر شده در بخش ۲-۴ تثبیت شد. سپس سویه تثبیت شده ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در سرم فیزیولوژی استریل قرار گرفت. سپس به محیط

سویه تثبیت‌شده) و متغیرهای مستقل را توصیف کند.

در معادله ۱، b_0 عدد ثابت، b_1 ضرایب خطی ($b_1, b_2, \dots$)

b_{ii} ضرایب درجه دوم (b_{11}, b_{22}, b_{33}) و b_{ij} ضرایب

میانکنشی ($b_{12}, b_{13}, b_{23}, \dots$) هستند.

$$Y(\text{response}) = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j < i} b_{ij} X_i X_j \quad 1$$

سنجش فعالیت آنزیمی: برای اندازه‌گیری فعالیت

آنزیم پروتئاز از روش رنگ‌سنجی با استفاده از معرف فولین سیو کالتو بر طبق پروتکل با کمی تغییرات استفاده شد (۱۹). بدین منظور، ابتدا رسوب باکتری با استفاده از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از مابقی محیط کشت حاوی آنزیم پروتئاز خارج سلولی باکتری جدا می‌شود. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به ۲۵۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای آنزیم شامل ۰/۶۵ درصد کازئین حل‌شده در فسفات بافر سالین (pH ۷/۲) اضافه و اجازه داده شد تا واکنش آنزیمی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ادامه یابد. سپس به‌منظور متوقف کردن واکنش آنزیمی، ۲۵۰۰ میکرولیتر از محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط واکنش اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای حصول اطمینان از توقف واکنش آنزیمی نگهداری شد. با توجه به اینکه میزان تولید پروتئاز بر مبنای فعالیت آنزیم در هیدرولیز پروتئین کازئین و به عبارت بهتر میزان آزادسازی تیروزین از سوبسترای آنزیم تخمین زده می‌شود،

مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا باقی‌مانده پروتئین هضم‌نشده رسوب داده شود. سپس به ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به‌دست‌آمده حاوی تیروزین آزاد، ۲۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۰/۵ مولار و ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیو کالتو ۱۰ درصد اضافه شد. مخلوط حاصل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، نگهداری و سپس جذب نوری آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر بررسی شد. با توجه به تعریف، یک واحد فعالیت آنزیمی (U/mL) به مقداری از آنزیم اطلاق می‌شود که باعث آزادسازی ۱ میکروگرم تیروزین در دقیقه در شرایط واکنش شود. به‌منظور محاسبه میزان پروتئاز تولیدی از معادله ۲ استفاده شد.

در این معادله، مقدار x براساس فرمول رگرسیون نمودار استاندارد تیروزین و جذب نوری خوانده‌شده به دست می‌آید. در مورد نمونه کنترل منفی دقیقاً مراحل سنجش آنزیمی نمونه‌های آزمایش انجام شد؛ با این تفاوت که به‌جای آنزیم در لوله کنترل منفی ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه شده است.

$$\text{فعالیت آنزیم} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{\text{حجم واکنش} * \text{مقدار تیروزین آزاد شده} (x)}{\text{حجم آنزیم} * \text{زمان واکنش} * \text{حجم کووت}} \quad 2$$

رسم منحنی استاندارد تیروزین: با استفاده از منحنی

استاندارد تیروزین در غلظت‌های مشخص، می‌توان فرمولی به دست آورد که از روی جذب نمونه خود، به میزان تولید یا فعالیت آنزیم پروتئاز در نمونه پی ببریم.

برای این کار به استوک ۱/۱ میلی‌مولار تیروزین نیاز است. با توجه به اینکه جرم مولی تیروزین ۱۸۱/۱۹ (گرم بر مول) است، ۱۰ میلی‌لیتر از استوک ۱/۱ میلی‌مولار آن با حل کردن تقریباً ۰/۰۰۲ گرم تیروزین در آب مقطر به

دست می آید. برای رسم منحنی استاندارد تیروزین، باید
ابتدا غلظت های مختلف تیروزین را مطابق جدول ۲ تهیه

جدول ۲- تهیه غلظت های مختلف تیروزین به منظور رسم منحنی استاندارد (۱۹)

نمونه	استوک ۱/۱ میلی مولار تیروزین (μL)	آب دیونیزه (μL)	غلظت تیروزین (μg/mL)	غلظت تیروزین (mM)
۱	۰	۱۰۰۰	۰	۰
۲	۱۰	۹۹۰	۲	۰/۰۱۱
۳	۲۵	۹۷۵	۵	۰/۰۲۷
۴	۵۰	۹۵۰	۱۰	۰/۰۵۵
۵	۱۰۰	۹۰۰	۲۰	۰/۱۱
۶	۲۰۰	۸۰۰	۴۰	۰/۲۲
۷	۲۵۰	۷۵۰	۵۰	۰/۲۷۵
۸	۳۰۰	۷۰۰	۶۰	۰/۳۳۱
۹	۴۰۰	۶۰۰	۸۰	۰/۴۴۱
۱۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰	۰/۵۵۱
۱۱	۱۰۰۰	۰	۲۰۰	۱/۱

در روش سنجش آنزیم پروتئاز با استفاده از جذب نوری به هریک از غلظت های تهیه شده تیروزین، ۲/۵ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۰/۵ مولار و سپس ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو اضافه می شود. سپس لوله ها در شرایط تاریکی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. بعد از اتمام مدت زمان انکوباسیون، جذب هریک از لوله ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده شد. داده های مربوط به جذب هریک از غلظت های مختلف تیروزین، روی محور yها و غلظت های مختلف تیروزین، روی محور xها قرار گرفت و معادله رگرسیون آن در برنامه Excel محاسبه شد. گفتنی است هر غلظت تیروزین در ۳ تکرار، اندازه گیری و جذب لوله ۱ به عنوان بلانک در نظر گرفته می شود.

بررسی های آماری: تمامی آزمایشات به منظور بررسی های آماری به صورت سه تکرار انجام شد. نتایج

به دست آمده با استفاده از تست آزمون تحلیل واریانس^{۱۲} و تست دانکن^{۱۳} با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS 22, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) بررسی شد. تفاوت معنادار آماری بین نتایج گروه کنترل و تست هنگامی گزارش شد که p -value کمتر از ۰/۰۵ به دست آمد. طراحی آزمایشات روش شناسی سطح پاسخ و نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Design Expert نسخه ۱۱ (Stat-Ease, Minneapolis, USA) به دست آمد.

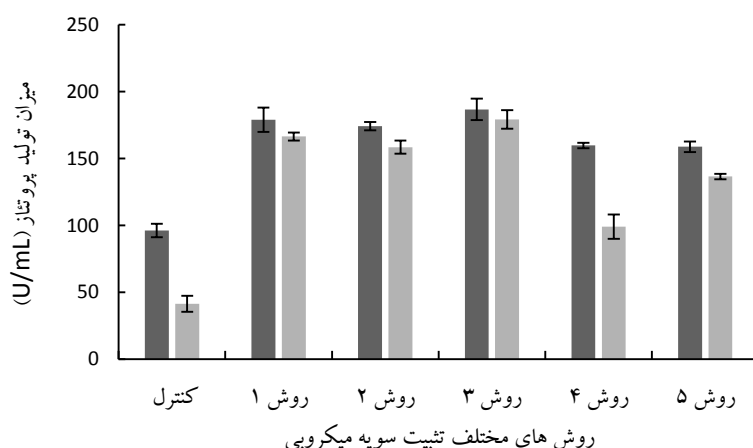
نتایج

انتخاب بهترین روش تثبیت با استفاده از مطالعه تک عاملی: نتایج مربوط به اثر تثبیت سویه MSB16 بر تولید پروتئاز در شکل ۱ آورده شده است. میزان تولید پروتئاز توسط سویه تثبیت نشده برابر با ۹۶/۲ U/mL به دست

وینیل الکل - کربنات کلسیم ($186/6 \text{ U/mL}$) به دست آمد. پایین‌ترین میزان تولید پروتئاز خارج سلولی، توسط سلول‌های تثبیت‌شده در پلیمرهای سدیم آلزینات - نانوذره گاما آلومینیوم اکسید ($159/6 \text{ U/mL}$) و کربوکسی متیل سلولز ($158/7 \text{ U/mL}$) به دست آمده است. پایین‌ترین میزان تولید آنزیم بعد از گذشت یک ماه نیز در سوئیه تثبیت‌شده در پلیمرهای سدیم آلزینات - نانوذره گاما آلومینیوم اکسید مشاهده شده است (U/mL ۹۹). با توجه به نتایج مطالعه تک عاملی، بهترین روش تثبیت سوئیه MSB16 پلیمر سدیم آلزینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم در نظر گرفته شد.

آمد. این میزان تولید آنزیم، با گذشت زمان، حدود $2/3$ برابر کاهش یافت ($41/3 \text{ U/mL}$)؛ درحالی‌که تولید پروتئاز توسط سوئیه‌های تثبیت‌شده نسبت به سوئیه تثبیت‌نشده افزایش نشان داده است و همچنین با وجود اینکه تمامی سوئیه‌های تثبیت‌شده بعد از گذشت یک ماه، کاهش در تولید پروتئاز نشان دادند، میزان کاهش آنها نسبت به سوئیه تثبیت‌نشده کمتر بود.

مطابق شکل ۱، تولید آنزیم پروتئاز خارج سلولی توسط سلول تثبیت‌شده MSB16 به خوبی در تمام بسترهای تثبیت بررسی شده، صورت گرفته است؛ با وجود این، از میان پلیمرهای مطالعه‌شده، بالاترین میزان تولید پروتئاز با استفاده از پلیمر سدیم آلزینات - پلی



شکل ۱- اثر روش‌های مختلف تثبیت سوئیه میکروبی MSB16 بر تولید آنزیم پروتئاز. سدیم آلزینات (روش ۱)، سدیم آلزینات - پلی وینیل الکل (روش ۲)، سدیم آلزینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم (روش ۳)، سدیم آلزینات - نانوذره گاما آلومینیوم اکسید (روش ۴) و کربوکسی متیل سلولز (روش ۵). در هر روش، ستون‌های سفید بیان‌کننده تولید آنزیم با استفاده از سوئیه تازه تثبیت‌شده و ستون‌های هاشورزده تولید آنزیم با استفاده از سوئیه تثبیت‌شده بعد از گذشت یک ماه است.

بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در روش تثبیت سوئیه با

استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ: در مرحله بعد، غلظت آلزینات، پلی وینیل الکل و کربنات کلسیم با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ بهینه‌سازی شد (جدول ۳). نتایج آزمایشات طرح مرکب مرکزی نشان دادند سوئیه تثبیت‌شده در پلیمر حاوی آلزینات ۳ درصد

- پلی وینیل الکل ۳ درصد - کربنات کلسیم ۳ درصد، بالاترین میزان تولید پروتئاز ($205/32 \text{ U/mL}$) را نشان داده است (جدول ۳)؛ درحالی‌که در مطالعه تک عاملی، میزان تولید پروتئاز با استفاده از پلیمر سدیم آلزینات ۵ درصد - پلی وینیل الکل ۳ درصد - کربنات کلسیم ۳ درصد حدود $186/6 \text{ U/mL}$ به دست آمده بود.

جدول ۳- نتایج مربوط به آزمایشات روش شناسی سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی

شماره آزمایش	X ₁	X ₂	X ₃	پروتئاز (U/mL)
	آلژینات (%)	پلی وینیل الکل (%)	کربنات کلسیم (%)	
۱	۳	۳	۳	۲۰۵/۳۲
۲	۶	۳	۳	۱۹۷/۴۸
۳	۳	۶	۳	۱۹۹/۲۷
۴	۶	۶	۳	۱۹۵/۵
۵	۳	۳	۶	۱۸۷/۶۳
۶	۶	۳	۶	۱۹۴/۲۸
۷	۳	۶	۶	۱۹۰/۷۸
۸	۶	۶	۶	۱۹۹/۳۸
۹	۱/۵	۴/۵	۴/۵	۱۹۸/۶۱
۱۰	۷/۵	۴/۵	۴/۵	۱۹۷/۳
۱۱	۴/۵	۱/۵	۴/۵	۱۹۴/۲۹
۱۲	۴/۵	۷/۵	۴/۵	۱۹۴/۹۸
۱۳	۴/۵	۴/۵	۱/۵	۲۰۰/۵
۱۴	۴/۵	۴/۵	۷/۵	۱۹۱/۵۵
۱۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۱۹۹/۳۵
۱۶	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۱۹۹/۱۲
۱۷	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۱۹۶/۴۵
۱۸	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۱۹۹/۲۵
۱۹	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۱۹۸/۱۶
۲۰	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۲۰۰/۱۸

به دست آمده در معادله ۳ آمده است. در این معادله، X₁ برابر با غلظت آلژینات، X₂ معادل غلظت پلی وینیل الکل و X₃ معادل غلظت کربنات کلسیم است.

$$\text{پروتئاز (U/mL)} = + (۱۹۸/۷۵) + (۰/۱۰۵۲ * X_1) + (۰/۱۰۱۱ * X_2) - (۲/۹۷ * X_3) + (۰/۷۵۲۵ * X_1 X_2) + (۳/۳۶ * X_1 X_3) + (۲/۰۳ * X_2 X_3) - (۰/۲۴۹۱ * X_1^2) - (۱/۴۲ * X_2^2) - (۹۳/۱۴ * X_3^2) \quad ۳$$

ضریب تشخیص (۰/۹۵۸۴) و معنادار نبودن تست عدم برازش (فقدان تناسب) نیز صحت مدل به دست آمده را نشان می دهند (جدول ۴). مقدار ضریب تشخیص نشان می دهد در ۹۵/۸۴ درصد موارد، تغییرات پاسخ به خوبی

از میان مدل های پیشنهادی توسط نرم افزار Design Expert برای متغیر پاسخ (تولید پروتئاز در سویه تثبیت شده)، مدل درجه دوم مناسب ترین مدل پیشنهادی بود ($p\text{-value} < ۰/۰۰۱$). مدل چند جمله ای درجه دوم

نتایج آنالیز واریانس داده های مربوط به روش طرح مرکب مرکزی در جدول ۴ آورده شده است. مقادیر F (۲۵/۵۹) و $p < ۰/۰۰۱$ مربوط به مدل، معنادار بودن آماری مدل به دست آمده را تأیید می کنند. بالابودن

آماري مقدار p به دست آمده برای X_2^2 می‌توان گفت غلظت پلی وینیل الکل نیز جزء فاکتورهای مؤثر محسوب می‌شود.

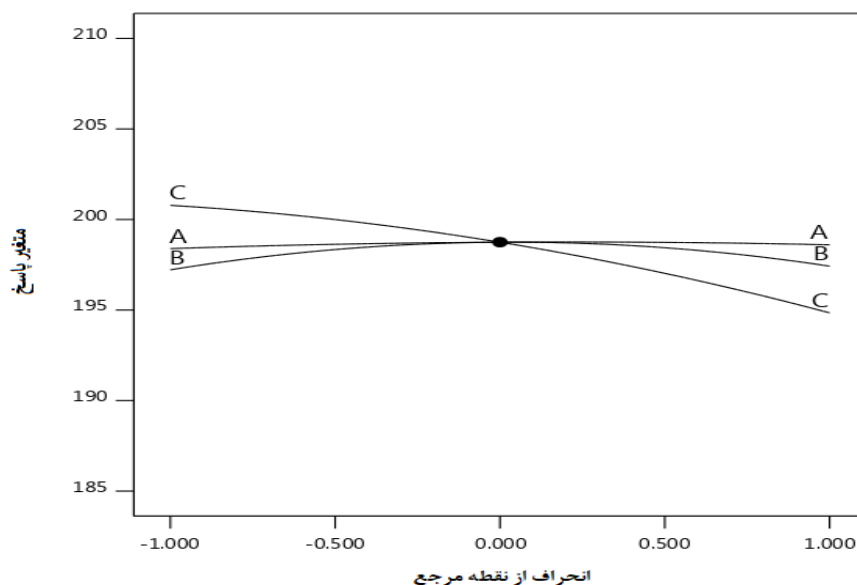
با مدل توضیح داده می‌شوند. براساس مقادیر p فاکتورهای بررسی شده در روش تثبیت، غلظت کربنات کلسیم به شدت در تولید پروتئاز سویه تثبیت شده تأثیرگذار بوده است. همچنین با توجه به معناداربودن

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس تولید پروتئاز سویه *آئروموناس هیدروفیلا* MSB16 تأثیر گرفته از متغیرهای مستقل در طول آزمایش بهینه‌سازی

ضرایب رگرسیون	معناداربودن آماری	مقدار P	مقدار F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	عامل
	+	$<0/0001$	۲۵/۵۹	۳۱/۸۷	۹	۲۸۶/۶۳	مدل
+۰/۱۰۵۲	-	۰/۷۳۴۸	۰/۱۲۱۴	۰/۱۵۱۲	۱	۰/۱۵۱۲	غلظت آلژینات (X_1)
+۰/۱۰۱۱	-	۰/۷۴۴۸	۰/۱۱۲۰	۰/۱۳۹۵	۱	۰/۱۳۹۵	غلظت پلی وینیل الکل (X_2)
-۲/۹۷	+	$<0/0001$	۹۶/۶۸	۱۲۰/۴۱	۱	۱۲۰/۴۱	غلظت کربنات کلسیم (X_3)
+۰/۷۵۲۵	-	۰/۰۸۵۶	۳/۶۴	۴/۵۳	۱	۴/۵۳	X_1X_2
+۳/۳۶	+	$<0/0001$	۷۲/۴۱	۹۰/۱۸	۱	۹۰/۱۸	X_1X_3
+۲/۰۳	+	۰/۰۰۰۴	۲۶/۶۰	۳۳/۱۳	۱	۳۳/۱۳	X_2X_3
-۰/۲۴۹۱	-	۰/۴۱۶۷	۰/۷۱۷۸	۰/۸۹۴۰	۱	۰/۸۹۴۰	X_1^2
-۱/۴۲	+	۰/۰۰۰۷	۲۳/۴۳	۲۹/۱۸	۱	۲۹/۱۸	X_2^2
-۰/۹۳۱۴	+	۰/۰۱	۱۰/۰۴	۱۲/۵۰	۱	۱۲/۵۰	X_3^2
				۱/۲۵	۱۰	۱۲/۴۵	باقی مانده
	-	۰/۷۸۱۸	۰/۴۷۷۴	۰/۸۰۴۹	۵	۴/۰۲	فقدان تناسب
				۱/۶۹	۵	۸/۴۳	خطای خالص
					۱۹	۲۹۹/۲۸	خطای کلی

پرشیدگی به غلظت‌های بررسی شده کربنات کلسیم واکنش بیشتری نشان داده است و با تولید پروتئاز رابطه عکس دارد. همچنین، متغیر پاسخ (تولید پروتئاز) علاوه بر غلظت کربنات کلسیم به غلظت پلی وینیل الکل نیز حساس بوده است.

نمودار پرشیدگی به دست آمده از مدل پیشنهادی، اطلاعات بیشتری را درباره اثر فاکتورهای بررسی شده بر تولید پروتئاز سویه تثبیت شده به دست می‌دهد (شکل ۲). طبق این نمودار، تولید پروتئاز توسط سویه تثبیت شده، به دلیل انحنا و شیب بیشتر در نمودار

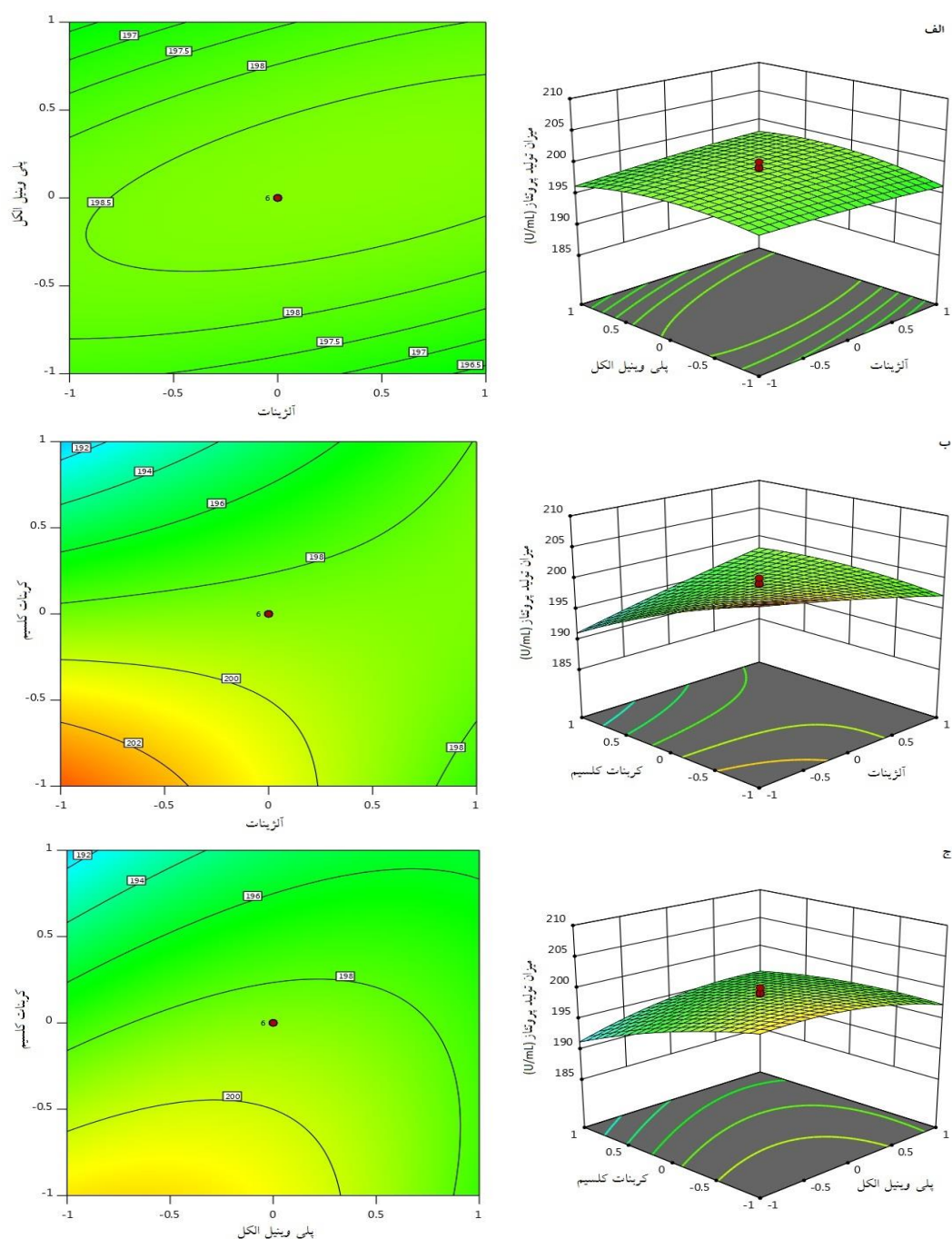


شکل ۲- نمودار پرشیدگی به منظور مقایسه اثر تمام متغیرهای مستقل مؤثر بر تثبیت سویه MSB16 در سدیم آلزینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم در نقطه مرکزی. در این شکل A، B و C به ترتیب برابر با آلزینات، پلی وینیل الکل و کربنات کلسیم است.

ب و ۳-ج به خوبی مشخص است که کاهش غلظت کربنات کلسیم (محدوده ۳-۱/۵ میلی مولار)، به افزایش تولید پروتئاز توسط سویه تثبیت شده منجر شده است. همچنین در شکل ۳-الف مشخص است در مقایسه با پلی وینیل الکل محدوده وسیع تری از آلزینات می تواند در تثبیت سویه استفاده شود؛ به طوری که بر تولید آنزیم تأثیر نگذارد. محدوده غلظت آلزینات بهتر است از ۱/۵ درصد (معادل عدد ۱- در شکل ۳-الف) بیشتر باشد.

نمودارهای دوبعدی و سه بعدی اثر میانکنش متغیرهای مستقل بررسی شده بر تولید پروتئاز، در شکل ۳ نشان داده شده اند.

در این نمودارها قسمت های آبی و سبز، محدوده مربوط به مقادیر کمتر تولید آنزیمی و قسمت های زرد و نارنجی محدوده مربوط به مقادیر بالاتر تولید آنزیمی را نشان می دهند. این نمودارها نیز می توانند اطلاعاتی را درباره محدوده تأثیرگذاری فاکتورها بر متغیر پاسخ در اختیار بگذارند؛ برای مثال، با توجه به شکل های ۳-



شکل ۳- نمودارهای دوبعدی و سه‌بعدی اثر میانکنش متغیرهای مستقل بررسی شده بر تولید پروتئاز توسط سویه MSB16 تثبیت شده در سدیم آلژینات - پلی وینیل الکل - کرینات کلسیم. الف) اثر میانکنش غلظت آلژینات و غلظت پلی وینیل الکل، ب) اثر میانکنش غلظت آلژینات و غلظت کرینات کلسیم، ج) اثر میانکنش غلظت پلی وینیل الکل و غلظت کرینات کلسیم بر فعالیت آنزیم

بحث و نتیجه‌گیری

همواره یکی از چالش‌های مهم مواجه شده در فرایندهای تخمیر میکروبی در صنعت، کاهش هزینه‌های

مربوطه بوده است. در این راستا، تکنولوژی تثبیت سویه، کمک کننده است؛ زیرا هزینه‌های مربوط به نگهداری مایه تلقیح میکروبی به محیط‌های کشت، به‌علت

پایداری بیشتر سویه میکروبی در گذر زمان و همچنین با افزایش قابلیت تکرارپذیری فرایند تخمیر، کاهش می‌یابد. با توجه به راحت‌تر بودن جمع‌آوری سویه‌های میکروبی تثبیت شده بعد از اتمام فرایند تخمیر، هزینه‌های مربوط به خالص‌سازی محصول نیز کاهش می‌یابد (۲۰). با وجود این مزایا، گاهی تثبیت سویه میکروبی با تأثیر بر عواملی مانند تغییرات در کشش سطحی و فشار اسمزی، در دسترس بودن آب و اجزای محیط کشت، مورفولوژی سلول و نفوذپذیری غشای سلولی، می‌تواند بر رشد، فیزیولوژی و فعالیت متابولیکی سلول میکروبی و در نتیجه بر بازده تولید محصولات میکروبی برای افزایش یا کاهش تولید محصول مؤثر باشد؛ بنابراین در این مطالعه، اثر روش‌های مختلف تثبیت سویه میکروبی MSB16 بر توانایی تولید پروتئاز آن بررسی شده است.

نتایج رهیافت تک عاملی این مطالعه نشان دادند تولید آنزیم پروتئاز خارج سلولی توسط سلول تثبیت شده MSB16 در بسترهای مختلف (یعنی سدیم آلزینات، سدیم آلزینات - پلی وینیل الکل، سدیم آلزینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم، سدیم آلزینات - نانوذره گاما آلومینیوم اکسید و کربوکسی متیل سلولز) بیشتر از میزان آنزیم تولید شده توسط سلول‌های تثبیت نشده صورت می‌گیرد؛ برای مثال، تولید آنزیم پروتئاز توسط سویه تثبیت شده در آلزینات، افزایش حدود ۸۶ درصد را نسبت به سلول‌های آزاد نشان داده است. نتیجه مشابهی در مطالعه آدیناریا^{۱۴} و همکاران (۲۰۰۵) گزارش شد که در آن تولید پروتئاز توسط سویه تثبیت شده باسیلوس سوبتیلیس PE-11 در آلزینات، حدود ۷۹/۰۳ درصد بوده است که نسبت به دیگر پلیمرهای استفاده شده توسط آنها مانند کاراگینان، پلی آکریل آمید، آگار - آگار و ژلاتین، کارآمدتر بود

(۲۱). علت تولید بیشتر آنزیم توسط سلول‌های تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد را می‌توان به افزایش غلظت سلول‌ها در اثر تثبیت و در نتیجه افزایش بازده تولید محصول مرتبط دانست. همچنین، میزان تولید پروتئاز در سویه‌های تثبیت شده در مطالعه حاضر، بعد از گذشت یک ماه بیشتر از سویه تثبیت نشده بود. این نتایج تأیید می‌کنند تثبیت سویه MSB16 می‌تواند در کاهش هزینه‌های تولید آنزیم پروتئاز مؤثر باشد.

همچنین ترکیب پلیمر آلزینات و پلی وینیل الکل، بستر مناسبی برای تثبیت سویه مدنظر بوده است؛ به طوری که تولید پروتئاز را نسبت به سلول‌های آزاد حدود ۸۱ درصد بهبود بخشید. در مطالعه دانگ^{۱۵} و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده شد تثبیت سویه‌های اکسیدکننده آمونیوم توسط آلزینات - پلی وینیل الکل نسبت به آلزینات به تنهایی، به افزایش پایداری سویه‌ها در pH قلیایی و هنگام استفاده مکرر از سویه تثبیت شده منجر می‌شود؛ به طوری که سلول‌های تثبیت شده در آلزینات، به راحتی در pH قلیایی و بعد از ۵ بار استفاده آسیب می‌دیدند. این در حالی است که سلول‌های تثبیت شده در آلزینات - پلی وینیل الکل، علاوه بر پایداری بیشتر در استفاده مکرر از سویه و در pH قلیایی، توانایی بهتری برای اکسیداسیون آمونیوم داشتند (۲۲). به همین دلیل پلیمر آلزینات - پلی وینیل الکل یکی از پلیمرهای بررسی شده در این مطالعه بوده است؛ با وجود این، در مطالعه حاضر افزودن پلی وینیل الکل به آلزینات برای تثبیت سویه MSB16، باعث کاهش اندک در میزان تولید پروتئاز شده است. این امر می‌تواند به دلیل انعطاف‌پذیری بیشتر و استحکام کمتر بیدهای حاصل از آلزینات به تنهایی باشد که اجازه انتقال راحت‌تر مواد را به بید فراهم می‌کند (۱۶).

در بین روش‌های مختلف تثبیت، سلول‌های تثبیت‌شده در بیدهای آلژینات - نانوذره گاما آلومینیوم اکسید، نسبت به روش‌های دیگر، بعد از گذشت یک ماه کاهش بیشتری از تولید پروتئاز نشان داده‌اند؛ علت این امر نیز می‌تواند به خاصیت ضد میکروبی نانوذرات نسبت داده شود (۲۳).

از میان روش‌های بررسی‌شده تثبیت، بالاترین میزان تولید پروتئاز با استفاده از پلیمر آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم به دست آمد. بر طبق مطالعه وانگ^{۱۶} و همکاران (۲۰۱۴) بیدهای آلژینات حاوی کربنات کلسیم، شکلی مشابه منافذ کندوی عسل دارند که به تسهیل انتقال سوبسترا و مواد غذایی به سلول‌های تثبیت‌شده در بید منجر می‌شوند. این موضوع علت بالاتر بودن نرخ تولید آنزیم توسط سویه MSB16 را در روش آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم نسبت به آلژینات - پلی وینیل الکل توضیح خواهد داد (۲۴).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مرحله غربالگری روش تثبیت، در مرحله بعد، فاکتورهای مؤثر بر روش تثبیت سویه با استفاده از ترکیب پلیمری آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم با روش‌شناسی سطح پاسخ بررسی شدند. نتایج آزمایشات طرح مرکب مرکزی نشان دادند سویه تثبیت‌شده در پلیمر حاوی ۳ درصد آلژینات - ۳ درصد پلی وینیل الکل - ۳ درصد کربنات کلسیم، بالاترین میزان تولید پروتئاز (۲۰۵/۳۲ U/mL) را داشته است. به عبارت دیگر، در مقایسه با تثبیت سویه MSB16 با روش ذکرشده در مطالعه کورکوتاس^{۱۷} و همکاران (۲۰۰۴)، یعنی استفاده از پلیمر حاوی ۵ درصد آلژینات - ۳ درصد پلی وینیل الکل - ۳ درصد کربنات کلسیم (۱۸۶/۶۳ U/mL)، تولید پروتئاز حدود ۱۹

درصد و نسبت به سویه میکروبی تثبیت‌نشده (U/mL ۹۶/۲) حدود ۱۳۱ درصد (۲/۱۳ برابر) افزایش یافته است. این نتایج نشان می‌دهند روش تثبیت گزارش‌شده در مطالعه کورکوتاس و همکاران (۲۰۰۴)، برای تثبیت مناسب بوده است و همچنین روش‌شناسی سطح پاسخ استفاده‌شده در مطالعه حاضر، توانسته است هم غلظت آلژینات مصرفی و هزینه‌های مربوطه را کاهش و هم با بهینه‌سازی غلظت مواد استفاده‌شده در این روش، میزان تولید آنزیم پروتئاز را افزایش دهد.

با توجه به نتایج آنالیز واریانس، از میان متغیرهای بررسی‌شده، غلظت کربنات کلسیم اثر معناداری بر تولید پروتئاز توسط سویه MSB16 دارد. همچنین، میانگین بین غلظت آلژینات و کربنات کلسیم ($p < ۰/۰۰۰۱$) و میانگین بین غلظت پلی وینیل الکل و کربنات کلسیم ($p\text{-value} = ۰/۰۰۰۴$) از نظر آماری معنادار بود. همچنین، تولید پروتئاز توسط سویه تثبیت‌شده، به دلیل انحنا و شیب بیشتر در نمودار پرشیدگی به غلظت‌های بررسی‌شده کربنات کلسیم واکنش بیشتری نشان داده است و می‌توان گفت با آن تقریباً رابطه عکس دارد؛ دلیل این امر را می‌توان اینگونه توضیح داد که کربنات کلسیم بر pH اثرگذار است (۱۶). با توجه به اینکه سویه بررسی‌شده تنها می‌تواند در محدوده pH خنثی یا کمی قلیایی تولید پروتئاز کند، احتمالاً معکوس بودن رابطه غلظت کربنات کلسیم و تولید پروتئاز توسط سویه مدنظر به همین دلیل بوده است. همچنین، متغیر پاسخ (تولید پروتئاز) علاوه بر غلظت کربنات کلسیم به غلظت پلی وینیل الکل حساس بوده است.

پیشنهاد می‌شود روش‌های دیگر تثبیت که افزایش چشمگیری در تولید پروتئاز سویه تثبیت‌شده داشتند نیز

term storage of *pseudanabaena galeata* (cyanobacteria) in the laboratory. *Journal of phycology*. 1997; 33 (6): 1073-76.

- (7) Shrinivas D, Kumar R, Naik GR. Enhanced production of alkaline thermostable keratinolytic protease from calcium alginate immobilized cells of thermoalkalophilic *Bacillus halodurans* JB 99 exhibiting dehairing activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2012; 39 (1): 93-98.
- (8) Borin GP, de Melo RR, Crespim E, Sato HH, Contesini FJ. An overview on polymer gels applied to enzyme and cell immobilization. *Polymer Gels*. 2018; 63-86.
- (9) Kumar R, Vats R. Protease production by *Bacillus subtilis* immobilized on different matrices. *New York Science Journal*. 2010; 3 (7): 20-24.
- (10) Klein J, Ziehr H. Immobilization of microbial cells by adsorption. *Journal of biotechnology*. 1990; 16 (1-2): 1-15.
- (11) Potumarthi R, Subhakar C, 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. *Bioresource Technology*. 2008; 99 (6): 1776-86.
- (12) Tari C, Genckal H, Tokatlı F. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. 2006; 41 (3): 659-65.
- (13) Baş D, Boyacı IH. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of food engineering*. 2007; 78 (3): 836-45.
- (14) Borhani MS, Etemadifar Z, Jorjani E. Evaluation of *Aeromonas Hydrophila* MSB16 Protease Production in Response to Low-Intensity Electric Current, Surfactants, and Nanoparticles. *Biological Journal of Microorganism*. 2020; 8 (32): 1771-78.

با استفاده از روش‌شناسی سطح پاسخ بررسی شوند. همچنین پیشنهاد می‌شود اثر روش تثبیت آلژینات - پلی وینیل الکل - کربنات کلسیم برای تولید دیگر آنزیم‌های کاربردی استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسنده مقاله از دکتر زهرا اعتمادی‌فر، عضو هیئت علمی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان، به پاس همکاری‌شان تشکر و قدردانی می‌کند.

References

- (1) 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 Pharm SciTech*. 2005; 6 (3): 391-97.
- (2) Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas AA. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food microbiology*. 2004; 21 (4): 377-97.
- (3) Junter GA, Jouenne T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. *Biotechnology advances*. 2004; 22 (8): 633-658.
- (4) Martins SC, Martins CM, Fiúza LM, Santaella ST. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African journal of biotechnology*. 2013; 12 (28): 4412-18.
- (5) Zacheus OM, Iivanainen EK, Nissinen TK, Lehtola MJ, Martikainen PJ. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Water Research*. 2000; 34 (1): 63-70.
- (6) Romo S, Pérez-Martínez C. The use of immobilization in alginate beads for long-

- (15) Anwar A, Qader SA, Raiz A, Iqbal S, Azhar A. Calcium alginate: a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. *World Applied Sciences Journal*. 2009; 7 (10): 1281-86.
- (16) Wani PA, Olamide AN, Rafi N, Wahid S, Wasiu IA, Sunday OO. Sodium Alginate/Polyvinyl Alcohol Immobilization of *Brevibacillus brevis* OZF6 Isolated from Waste Water and Its Role in the Removal of Toxic Chromate. *Biotechnology Journal International*. 2016; 31: 1-10.
- (17) Cho SH, Lim SM, Han DK, Yuk SH, Im GI, Lee JH. Time-dependent alginate/polyvinyl alcohol hydrogels as injectable cell carriers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2009; 20 (7-8): 863-876.
- (18) Chandran P, Das N. Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. *Biodegradation*. 2011; 22 (6): 1181-89.
- (19) Cupp-Enyard C. Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*. 2008; 19: 899.
- (20) Ramakrishna SV, Prakasham RS. Microbial fermentations with immobilized cells. *Current Science*. 1999: 87-100.
- (21) 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 Pharm SciTech*. 2005; 6 (3): 391- 97.
- (22) Dong Y, Zhang Y, Tu B. Immobilization of ammonia-oxidizing bacteria by polyvinyl alcohol and sodium alginate. *Brazilian journal of microbiology*. 2017; 48 (3): 515-21.
- (23) Rheima AM, Anber AA, Abdullah HI, Ismail AH. Synthesis of Alpha-Gamma Aluminum Oxide Nanocomposite via Electrochemical Method for Antibacterial Activity. *Nano Biomedicine and Engineering*. 2021; 13 (1):1-5.
- (24) Wang HQ, Hua F, Zhao YC, Li Y, Wang X. Immobilization of *Pseudomonas* sp. DG17 onto sodium alginate–attapulgit–calcium carbonate. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2014; 28 (5): 834-42.

¹- Immobilization on solid carrier surfaces

²- Entrapment within a porous matrix

³- Cell flocculation (Aggregation)

⁴- Mechanical containment behind a barrier

⁵- Kumar

⁶- Vats

⁷- *Bacillus subtilis*

⁸- Potumarthi

⁹- *Bacillus licheniformis* NCIM-2042

¹⁰- Plackett–Burman design

¹¹- Full factorial design

¹²- ANOVA

¹³- Duncan's multiple range

¹⁴- Adinarayana

¹⁵- Dong

¹⁶- Wang

¹⁷- Kourkoutas