

# افزایش تولید پلی گاما گلوتامیک اسید با تخمیر غیر مداوم و غیر مداوم همراه با خوراک‌دهی باسیلوس لیکنی فورمیس ATCC 9945<sup>a</sup> و بررسی ساختار فیزیکی و شیمیایی آن

مهرداد ابراهیم‌زاده کوچصفهانی<sup>1</sup>، علی بهرامی<sup>2\*</sup>، ولی‌الله بابایی پور<sup>3</sup>

1- دانشجوی دکتری، مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

2- دانشیار، مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

3- دانشیار، مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: a\_bahrami@mut.ac.ir

پذیرش: 1400/10/20

دریافت: 1400/1/30

## چکیده

پلی گاما گلوتامیک اسید<sup>1</sup> یک بیوپلیمر سودمند، زیست سازگار و زیست تخریب‌پذیر است. چنین خواصی باعث توسعه استفاده از این ترکیب در صنایع مختلف مثل زیست پزشکی، زیست دارویی، زیست فناوری و مهندسی بافت شده است. محدودیت توسعه صنعتی پلی گاما گلوتامیک اسید، هزینه بالای تولید آن است. برای کاهش هزینه‌های تولید از راهکارهای مختلفی مثل بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از ترکیب‌های ارزان قیمت، توسعه فرایندهای کارآمد کشت غیرمداوم و غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی استفاده شده است. در این پژوهش نخست یک محیط کشت غیرمداوم کارآمد برای تولید پلی گاما گلوتامیک اسید از سویه باکتریایی باسیلوس لیکنی فورمیس ATCC 9945<sup>a</sup> توسعه داده شد. سپس با روش خوراک‌دهی پالسی و بهینه‌سازی آن، تولید پلی گاما گلوتامیک اسید افزایش داده شد. با توسعه یک محیط کشت بهینه، تولید این محصول در کشت غیرمداوم از 11 g/L به 47 g/L افزایش پیدا کرد. سپس با استفاده از راهبرد خوراک‌دهی پالسی سترات (پیش‌ساز  $\gamma$ -PGA) بهینه‌سازی شده، تولید محصول به 59/5 g/L افزایش داده شد که از بالاترین مقادیر تولید است و با این سویه گزارش شده است. برای بهینه‌سازی خوراک‌دهی دو پالسی، اثر زمان‌های خوراک‌دهی، غلظت محلول ذخیره سترات و زمان افزودن محلول‌های کلسیم و منگنز روی تولید  $\gamma$ -PGA بررسی و بهینه‌سازی شدند. در نهایت نیز ساختار شیمیایی پلی گاما گلوتامیک اسید به وسیله FTIR تأیید شد و بررسی خواص شکل‌شناسی آن با SEM یک نانو- ساختار ایدئال برای کاربردهای زیستی را نشان داد.

**کلید واژگان:** تخمیر غوطه‌ور، محیط کشت E اصلاح‌شده، راهبرد خوراک‌دهی پالسی، تخمیر غیرمداوم،  $\gamma$ -PGA.

1 Poly- $\gamma$ -glutamic acid

## 1- مقدمه

پلی گلوتامیک اسید (PGA)، یک پلی آمید است که از واحدهای گلوتامیک اسید تشکیل شده است. این پلی آمید با دو ساختار مختلف  $\alpha$ -PGA و  $\gamma$ -PGA شکل می گیرد. ساختار آلفا به طور معمول به روش شیمیایی ساخته می شود و کاربردهای محدودی دارد. در مقابل،  $\gamma$ -PGA یک پلی پپتید است که به علت زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری مورد توجه است [1-3]. پلی گاما گلوتامیک اسید برخلاف پروتئین ها، تنها یک نوع اسید آمینه دارد و تفاوت در تعداد گلوتامیک اسید در این زیست بسپار<sup>2</sup> می تواند بسیار متفاوت باشد، بنابراین محدوده وسیعی از اوزان مولکولی را در بر می گیرد. این زیست بسپار به عنوان یک عامل حمل و آزادسازی دارو، انحلال و تأثیر دارو را در بافت ها بالا برده و خود به خود تجزیه می شود. در جراحی، به عنوان بخیه و مرهم زخم نیز تأثیرگذار است [4-7].

پلی گاما گلوتامیک اسید به روش تخمیر باکتریایی با استفاده از میکروارگانیسم های مختلف، مواد اولیه ارزان قیمت و با خلوص بالا تولید می شود. سویه های مولد  $\gamma$ -PGA بر اساس نیاز به منابع تغذیه ای به دو دسته وابسته به گلوتامات و مستقل از گلوتامات تقسیم می شوند [8]. اصلی ترین محدودیت صنعتی شدن کاربرد  $\gamma$ -PGA هزینه به نسبت بالای تولید است. تاکنون، راهبردهای مختلفی برای کاهش هزینه های تولید میکروبی  $\gamma$ -PGA از جمله بهینه سازی شرایط رشد و تولید، توسعه محیط کشت های ارزان، افزودن پیش ساز و تک پار<sup>3</sup>  $\gamma$ -PGA شامل سیترات و گلوتامات، استفاده از میکروارگانیسم های مختلف و توسعه راهبرد خوراک دهی کارآمد استفاده شده است [9]؛ [10]. البته با تغییر نوع میکروارگانیسم، همه این مطالعات و بهینه سازی ها باید دوباره انجام شوند.

یکی از محیط کشت های معمول برای تولید  $\gamma$ -PGA با سویه باسیلوس لیکنی فورمیس<sup>4</sup> ATCC 9945، محیط کشت پایه E است. اصلاح محیط کشت، شرایط تخمیر و خوراک دهی می تواند بهره تولید را افزایش دهد. اصلاح محیط کشت با تغییر مقادیر منابع تغذیه ای مؤثر بر محصول دهی مثل سیترات و گلوتامات به عنوان پیش ساز و تک پار  $\gamma$ -PGA می تواند انجام شود. تنظیم شرایط تخمیر از راه پایش و کنترل دما، pH، نحوه اختلاط و هوادهی صورت می گیرد. یک خوراک دهی مطلوب با زمان بندی مناسب و با استفاده از ترکیب و غلظت مناسب از مواد غذایی انجام می شود [10-12].

در این پژوهش، بیشتر عوامل نامبرده برای افزایش میزان محصول به طور مقتضی بررسی و تا حد امکان بهینه شده اند. از طرفی با توجه به تأثیر سیترات بر تولید محصول (به عنوان یکی از ترکیب های اصلی در مسیر سوخت و سازی تولید گاما پلی گلوتامیک اسید)، از خوراک دهی این ترکیب کمک گرفته شده تا  $\gamma$ -PGA بیشتری تولید شود. سیترات به عنوان بهترین پیش ساز  $\gamma$ -PGA مطرح است، زیرا می تواند به واسطه ایزوسیتریک اسید<sup>4</sup> و سپس آلفاکتوگلوکوتارات<sup>5</sup> در چرخه اسید سیتریک (چرخه کربس<sup>6</sup>)، به ال-گلوتامیک اسید<sup>7</sup> تبدیل شود. سپس گاما پلی گلوتامیک اسید از این تک پار گلوتامیک اسید بسپارش می شود [8].

در محیط کشت پایه E بدون  $MnSO_4$  قدرت یونی و pH نقش مهمی بر میزان تولید دارد [11]. با بررسی غلظت های مختلف  $MnSO_4$  در محیط کشت E، تا 17 گرم بر لیتر زیست بسپار  $\gamma$ -PGA گزارش شده است [13]. در pH برابر با 6/5، سیترات نقش تعیین کننده ای بر افزایش تولید (تا 23 گرم بر لیتر) نشان داده است [14].

4 Isocitric acid  
5 Alpha-ketoglutarate  
6 Crebs cycle  
7 L-glutamic acid

2 Biopolymer  
3 Monomer

شده‌اند. در ضمن توسعه محیط کشت کم هزینه و کارآمد و بهبود پارامترهای یک راهبرد خوراک‌دهی پالسی ساده به‌طور جامع در یک جا برای افزایش محصول‌دهی بررسی نشده‌اند. بنابراین در این پژوهش برای افزایش تولید  $\gamma$ -PGA با یک راهبرد ساده و ارزان، همزمان محیط کشت کارآمدتر و ارزان و یک خوراک‌دهی پالسی ناگهانی و ساده مبتنی بر سیترات که هزینه‌بر نبوده و با کمترین نیاز به کاربر قابل اجراست، توسعه داده شدند. چنین روندی نخستین بار است که آزمون می‌شود.

#### مواد و روش‌ها

##### نوع تخمیر و سویه میکروبی استفاده‌شده

سویه باکتریایی که در کشت‌های میکروبی این پژوهش به کار رفت، باسیلوس لیکنی فورمیس<sup>a</sup> ATCC 9945 بود که از بانک میکروبی DSMZ تهیه شد. این سویه، یک باکتری هوازی وابسته به گلوتامات با قابلیت بالایی برای تولید خارج سلولی گاما پلی گلوتامیک اسید می‌باشد [11]؛ [12]. از کشت میکروبی مایع یا غوطه‌ور و فرایندهای تخمیر غیرمداوم و غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی در پژوهش استفاده شد.

##### نحوه آماده‌سازی مایه تلقیح و محیط کشت اختصاصی آن

با آزمودن ترکیب‌های مختلفی برای دستیابی به رشد سریع و مناسب باکتری موردنظر، یک محیط کشت اختصاصی به دست آمد. اجزای این محیط به ازای یک لیتر شامل 0/04 گرم آهن (II) کلرید 6 آب، 0/5 گرم دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات، 0/5 گرم منیزیم سولفات 7 آب، 7 گرم آمونیوم کلراید، 30 گرم گلوتامات، 12 گرم سیترات، و 40 گرم گلیسرول بود. با اضافه کردن آب مقطر، این ترکیب‌ها به حجم موردنظر رسانده شدند. سپس با افزودن هیدروکسید سدیم 6 مولار، pH محلول حاصل برابر مقدار مطلوب 7/4 شد.

همچنین غلظت مناسب یون آهن، میزان محصول را تا 34/93 گرم بر لیتر افزایش داده است [15].

سیترات جزء مهم‌ترین منابع کربن شناخته می‌شود [16؛ 17]. با استفاده از مقادیر مختلف گلیسرول و گلوکز، تولید 29 گرم بر لیتر به دست آمد [18]. با بررسی اثر غلظت‌های مختلف منابع کربن گلیسرول، گلوکز، فروکتوز، و سوربیتول در محیط E روی تولید  $\gamma$ -PGA، بیشترین تولید برابر با 35/78 گرم بر لیتر با استفاده از گلیسرول گزارش شد [19؛ 20].

کشت غیرمداوم خوراک‌دهی شده اغلب با راهبرد خوراک‌دهی پالسی برای افزایش تولید  $\gamma$ -PGA گزارش شده است. با این روش، غلظت گاما پلی گلوتامیک اسید برابر 39 گرم بر لیتر با نرخ محصول‌دهی 0/33 گرم بر لیتر در ساعت حاصل شد [21]. در پژوهش دیگری، نرخ تولید تا یک گرم بر لیتر در ساعت افزایش داده شده است. در این مطالعه از خوراک چهار پالسی استفاده شد. خوراک به کار رفته مخلوطی از گلوتامات، سیترات، و آمونیوم کلراید<sup>8</sup> را شامل می‌شد [12]. بیشترین مقدار  $\gamma$ -PGA، به کشت غیرمداوم با خوراک‌دهی در محیط کشت EC مربوط می‌شود. در تخمیر نامبرده از راهبرد پالسی خوراک دی‌آمونیم هیدروژن سیترات<sup>9</sup> در ساعت‌های 24، 36، و 48 کمک گرفته شد. حاصل آن غلظت بالای زیست‌بسیار 53/97 گرم بر لیتر بود [20].

در پژوهش‌های گذشته برای افزایش محصول‌دهی، بیشتر از اصلاحات محیط کشت و خوراک‌دهی‌های وابسته به زمان استفاده شده است. توسعه محیط کشت جدید به‌تنهایی برای افزایش تولید چندان ارزان‌قیمت و موفق نبوده است و خوراک‌دهی‌های وابسته به زمان نیز در این زمینه، به نظارت و کنترل پیوسته به‌وسیله کاربر نیاز دارند. به‌علاوه، بررسی‌های تخصصی در مورد بهبود خوراک‌دهی، بسیار محدود و غیرمتمرکز ارائه و گزارش

8 Ammonium chloride

9 Di-ammonium hydrogen citrate

میلی‌لیتری رسانده شد (حجم مناسب محیط کشت و ظرف تخمیر برای هوادهی و اختلاط بهینه: بدون ذکر داده‌های بهینه‌سازی). سپس pH آن با افزودن حدود 3-4 میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم شش مولار به 7/4 رسانده شد. محلول حاصل سترون‌شده و برای آغاز فرایند تخمیر، مایه تلقیح با نسبت 10 درصد حجمی به آن اضافه شد تا حجم نهایی آن به 50 میلی‌لیتر برسد. سپس در شرایط مناسب: دمای °C 37 و سرعت همزدن بهینه 200 rpm (داده‌های بهینه‌سازی نشان داده نشده‌اند) به مدت 72 ساعت در انکوباتور قرار گرفت.

#### آماده‌سازی و برپایی آزمایش‌های کشت غیرمداوم همراه با خوراک‌دهی

در تخمیر غیرمداوم و مصرف مواد مغذی، مقدار سیترات محیط کشت کاهش پیدا می‌کرد [12]. بنابراین برای ادامه کشت میکروبی و تولید بیشتر  $\gamma$ -PGA، محلول خوراک سترون‌شده سیترات به محیط کشت تخمیر افزوده شد. محلول‌های خوراک این منبع کربن با غلظت‌های مختلفی تهیه شدند. یکی از غلظت‌های معمول، 400 گرم بر لیتر بود که با حل کردن 16 گرم سیترات در آب مقطر و رساندن حجم محلول حاصل به 40 میلی‌لیتر تهیه شد. سپس در دمای °C 121 و فشار 15 psi به مدت 15 دقیقه سترون شد.

برای افزایش تولید  $\gamma$ -PGA، از خوراک‌دهی دو پالسی بهینه‌سازی شده سیترات استفاده شد. برای بهینه‌سازی خوراک‌دهی دو پالسی، اثر زمان‌های خوراک‌دهی، غلظت محلول استوک سیترات و زمان افزودن محلول‌های کلسیم و منگنز با روش آزمودن یک عامل در هر زمان روی تولید  $\gamma$ -PGA بررسی و بهینه‌سازی شدند. سپس در شرایط بهینه، سینتیک تولید  $\gamma$ -PGA، رشد باکتری و مصرف سوبستراهای محیط کشت شامل گلیسرول، سیترات و گلوتامات بررسی شد.

محیط مایه تلقیح در دمای °C 121 و فشار 121 psi به مدت 15 دقیقه سترون شد. یون آهن این محیط در داخل دستگاه اتوکلاو تحت اثر حرارت واکنش نشان می‌داد. بنابراین به صورت جداگانه و به وسیله فیلتر 0/2 میکرون سترون شد. بانک سلولی پس از افزایش دما از °C 70- به دمای محیط با محیط کشت اختصاصی مایه تلقیح مخلوط شد. سپس محلول حاصل برای تکثیر سلولی به مدت 16 ساعت در دستگاه شیکرانکوباتور (JTSL 50-JAL) با دمای °C 37 و سرعت همزدن 200 rpm (Tajhiz) قرار داده شد.

#### نحوه آماده‌سازی محیط کشت تخمیر

در این پژوهش نخست از محیط کشت پایه E با ترکیب سیترات: 12، گلیسرول: 80، گلوتامات: 20، سولفات منیزیم 7 آبه: 0/5، کلرید آمونیوم: 7، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات: 0/5، کلرید کلسیم 2 آبه: 0/15، کلرید آهن (II) 6 آبه: 0/04 و سولفات منگنز تک‌آبه: 0/104 گرم بر لیتر که در مقاله‌های زیادی آورده شده استفاده شد. با آزمون و خطا بر مقادیر منابع تغذیه‌ای مؤثر برای افزایش تولید، محیط کشت پایه E اصلاح شد و محیط کشت E اصلاح شده یا ME نامگذاری شد (داده‌های مربوط به آن آزمایش‌ها در اینجا آورده نشده‌اند). فقط مقادیر منابع تغذیه‌ای شامل گلیسرول، گلوتامات، سیترات و یون آهن (به ترتیب از 80، 20، 12، 0/04 گرم بر لیتر در محیط E تغییر داده شدند. محیط اصلاح شده محتوی مقادیر گرم بر لیتر سیترات: 40، گلیسرول: 50، گلوتامات: 40، سولفات منیزیم 7 آبه: 0/5، کلرید آمونیوم: 7، دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات: 0/5، کلرید کلسیم 2 آبه: 0/15، کلرید آهن (II) 6 آبه: 0/05 و سولفات منگنز تک‌آبه: 0/104 بود.

با افزودن آب مقطر به محتویات محیط کشت، حجم نهایی آن به 42 میلی‌لیتر در ظرف تخمیر (ارلن) 500

### استخراج و سنجش مقدار محصول

به طور معمول پس از 72 ساعت انجام کشت میکروبی، استخراج  $\gamma$ -PGA آغاز می‌شود. در آغاز گرانیوی و چسبندگی محصول، سلول، و محتویات محیط کشت بالا بود. با افزودن HCl شش مولار، محیط کشت اسیدی با pH 2 شد و به دنبال آن با کاهش چسبندگی محتویات محیط کشت و از بین رفتن بار منفی سلول‌ها، سلول‌ها راحت‌تر به هم چسبیده و جداسازی آنها ساده و عملی‌تر شد. سپس در یک دستگاه سانتریفیوژ (PIT Universal 320) در 11440g به مدت 20 دقیقه، سلول‌ها جدا شدند. سپس pH محلول باقیمانده با هیدروکسید سدیم 6 مولار به 7/4 رسانده شد که منجر به ویسکوز شدن مجدد مایع شد. مایع حاصل در یخچال تا دمای  $4^{\circ}\text{C}$  خنک شد. برای جداسازی  $\gamma$ -PGA از این محلول، از 4 برابر نسبت حجمی اتانول  $4^{\circ}\text{C}$  به مایع استفاده شد. بعد از اختلاط کامل الکل با آن، محصول به صورت توده‌ای جدا شد. از دیالیز با حد جداسازی ناخالصی‌های زیر 3500 دالتون طی 12 ساعت استفاده شد. یک لیتر آب مقطر و سه بار تعویض آن استفاده شد. در آخر، زیست‌بسیار با خشک‌کن انجمادی خشک‌شده (به مدت دو روز) و وزن آن اندازه‌گیری شد. این محصول به‌عنوان نمونه استاندارد برای بررسی‌های ساختاری بعدی استفاده شد [3; 8; 22].

[23]. برای تعیین دقیق غلظت  $\gamma$ -PGA تولیدی، از کروماتوگرافی ژل تراوایی (GPC) براساس مرجع استفاده شد [12]. از ستون GMPW و ژل TSK با استفاده از فاز سیال نیترات سدیم پنجاه مولار در این کروماتوگرافی استفاده شد.

### روش‌های آنالیز

رشد سلولی با اندازه‌گیری تراکم نوری در 660 نانومتر و وزن خشک سلولی بررسی شد. از محیط کشت تازه بدون سلول به‌عنوان شاهد استفاده شد. برای اندازه‌گیری وزن

خشک سلولی، پنج میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته شد. این نمونه در داخل یک لوله آزمایشگاهی (یا فالكون) از پیش توزین‌شده ریخته شد. با دستگاه سانتریفیوژ به مدت 15 دقیقه و در 11440g، سلول‌ها رسوب دادند. سپس سلول‌ها با آب مقطر شسته شده و در دمای  $105^{\circ}\text{C}$  (در کوره) خشک شدند تا به وزن ثابتی برسند.

در ادامه، محلول باقیمانده از جداسازی سلول‌ها برای اندازه‌گیری غلظت سیتریک اسید و گلیسرول در تخمیر براساس مرجع استفاده شد [12]. برای این کار، از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دستگاه کروماتوگرافی Hitachi L-3300 RI monitor، ستون تبادل یونی Aminex HPX-87H و به کمک فاز روان سیال سولفوریک اسید با غلظت 0/02 مولار استفاده شد. اندازه‌گیری غلظت گلوتامات نیز همانند مرجع با کیت آنزیمی بوهرینگر منهایم<sup>10</sup> انجام شد [12].

### بررسی ساختار شیمیایی و ریخت‌شناسی (مورفولوژی)

#### سطحی نمونه پودری $\gamma$ -PGA

پس از آنکه نمونه  $\gamma$ -PGA با خشک‌کن انجمادی کاملاً خشک شد، با آسیاب کردن به صورت پودر تبدیل شد. سپس این پودر با نسبت 0/01 با KBr مخلوط شده و (با صفحه آهنی مدور یا دیسک) تحت فشار قرار گرفت تا به صورت قرص در آید. در نهایت ساختار شیمیایی آن و پیوندهای شیمیایی موجود در آن با روش FTIR (مدل NICOLET 800 با سیستم عامل MS-DOS) سنجیده و تحلیل شدند. نمونه پودری در محدوده عدد موج 400 تا  $4000\text{ cm}^{-1}$  با وضوح 4/cm و سرعت 200x پوشش شد. سپس مورفولوژی آن در ابعاد میکرومتر تا نانومتر با میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>11</sup> (SEM) (TESCAN VEGA 3 ساخت جمهوری چک) بررسی شد تا شکل و

10 Boehringer Mannheim

11 Scanning Electron Microscopy (SEM)

داده شود. به همین ترتیب، خوراک‌دهی پس از آن هم باید با فاصله زمانی مناسبی اجرا شود. بنابراین اثر زمان خوراک‌دهی دو پالسی سیترات با مقدار 20 گرم در هر پالس به ازای هر لیتر حجم کاری (مقدار بهینه: بدون ذکر داده‌های بهینه‌سازی) در محیط کشت ME با آزمون و خطا روی تولید  $\gamma$ -PGA بررسی شد. زمان‌های خوراک‌دهی دو پالسی شامل 8 و 24، 24 و 36، 24 و 53، 36 و 53 ساعت پس از شروع فرایند تخمیر با توجه به منحنی رشد باکتری در محیط کشت ME انتخاب شدند. بالاترین مقدار تولید  $\gamma$ -PGA برابر با 56/85 گرم بر لیتر با خوراک‌دهی دوپالسی (محلول ذخیره سیترات با غلظت 384 گرم بر لیتر) در ساعات 24 و 48 به دست آمد.

با بررسی اثر غلظت محلول ذخیره خوراک سیترات در غلظت‌های 250، 300، 384، و 400 گرم بر لیتر روی تولید  $\gamma$ -PGA، غلظت 400 گرم بر لیتر بیشترین محصول را داد. بنابراین در یک آزمایش، خوراک دوپالسی سیترات (با غلظت 400 گرم بر لیتر) در محیط کشت ME استفاده شد. برای این منظور مقدار کل 5 میلی‌لیتر از خوراک‌دهی سیترات در ساعات‌های 24 و 48 به کار رفت تا میزان تولید را به بیشینه نزدیک کند. مقدار تولید حاصل شده از این آزمایش  $58/71 \pm 0/35$  گرم بر لیتر از  $\gamma$ -PGA استخراج شده بود (به نسبت ساعات‌های 8 و 24 خوراک‌دهی در محیط کشت ME که در آن مقدار محصول‌دهی 50/2 گرم بر لیتر بود، مقدار محصول استخراجی بیشتر شد).

برای افزایش بیشتر تولید  $\gamma$ -PGA اثر زمان افزودن محلول‌های کلسیم و منگنز (از اجزای جداگانه سترون و اضافه‌شده محیط کشت) در ساعات‌های 0، 8، و 24 ام‌فرایند کشت میکروبی روی مقدار محصول بررسی شد. افزودن محلول این یون‌ها در آغاز فرایند کشت تولید  $\gamma$ -PGA را تا 59/5 گرم بر لیتر افزایش داد. شکل-1 سینتیک تولید  $\gamma$ -PGA، رشد سلولی و مصرف سوبستراها

اندازه ذرات  $\gamma$ -PGA مشخص شوند. برای این منظور، سطح محصول پودری  $\gamma$ -PGA برای رساناشدن با طلا پوشش داده شد. این دستگاه سطح نمونه را از نظر ریخت‌شناسی به‌طور کامل پوشش کرد.

#### یافته‌ها

#### افزایش تولید $\gamma$ -PGA در محیط کشت E اصلاح‌شده (ME) با خوراک‌دهی پالسی سیترات

محیط کشت E اصلاح شده (ME)، با بررسی آزمون و خطای اثر مقادیر منابع تغذیه‌ای اصلی محیط کشت پایه E با روش آزمون یک عامل در هر دفعه روی افزایش تولید  $\gamma$ -PGA به دست آمد (داده‌های مربوطه ذکر نشدند). مقادیر سیترات و گلوتامات محیط کشت ME نسبت به E افزایش پیدا کرد. افزایش مقدار اولیه این مواد مغذی موردنیاز سلول‌ها، نیاز زیاد به آنها را در فاز رشد نمای فراهم می‌کند، ازاین‌رو زمان بیشتری برای مصرف‌شدن کامل آنها طول می‌کشد. بنابراین انتظار می‌رود با این بهبود محیط کشت، بتوان فاز تولید  $\gamma$ -PGA را طولانی‌تر کرد.

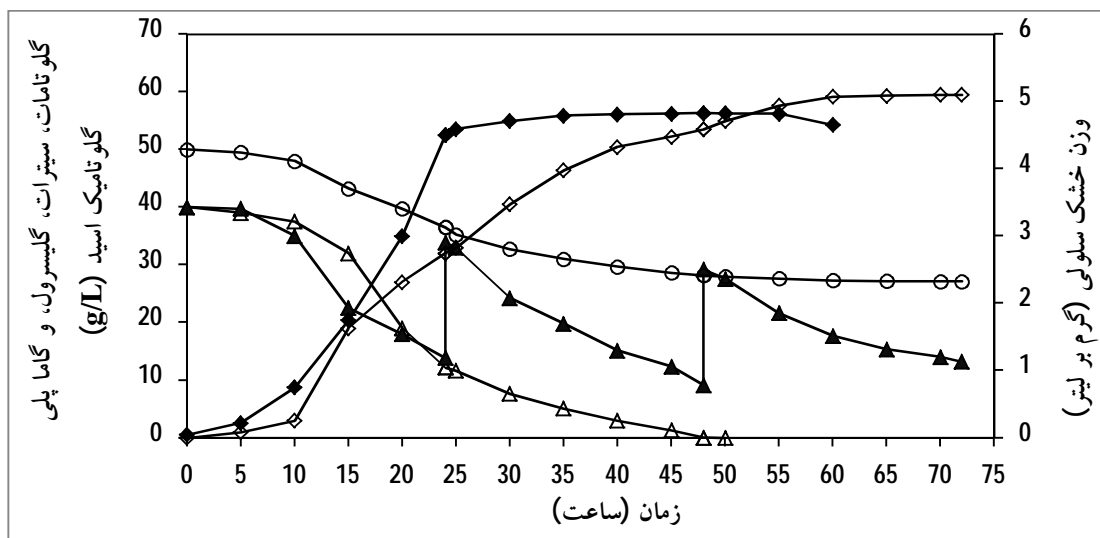
در کشت غیرمداوم باسیلوس‌لیکنی‌فورمیس در محیط کشت ME  $47/2 \pm 0/49$  گرم بر لیتر  $\gamma$ -PGA به دست آمد که حدود 4/5 برابر نسبت به  $11/22 \pm 0/83$  گرم بر لیتر تولید در محیط کشت E بیشتر بود. ازاین‌رو در ادامه پژوهش با توجه به تأثیر زیاد افزایش مقدار سیترات و گلوتامات محیط کشت اولیه روی تولید  $\gamma$ -PGA تصمیم گرفته شد در زمان فرایند تخمیر غیرمداوم برای افزایش بیشتر تولید، خوراک‌دهی سیترات در محیط کشت ME انجام شود.

مقادیر اولیه سیترات و گلوتامات محیط کشت ME نسبت به محیط کشت E بیشتر است. بنابراین برای جلوگیری از تجمع بیش از حد واکنشگرها و به دنبال آن ممانعت‌کنندگی از تولید  $\gamma$ -PGA، باید قبل از خوراک‌دهی اول زمان مناسبی برای مصرف آنها به‌وسیله سلول‌ها

غلظت محصول با شیب بسیار بالاتری (شیب به نسبت ثابتی) تا 32 گرم بر لیتر افزایش پیدا کرد. این ساعت‌ها (10 الی 24) به عنوان قسمت عمده فاز رشد نمایی به شمار می‌روند. بعد خوراک‌دهی اول سیترات (بعد ساعت 24)، افزایش غلظت محصول زیادی مشاهده شد، به طوری که این غلظت تا ساعت چهارم تخمیر به 50/41 گرم بر لیتر می‌رسد. اگرچه بعد آن، نرخ افزایش غلظت محصول کم شده و پس از خوراک‌دهی دوم (بعد ساعت 48) افزایش آنچنان محسوسی در آن دیده نشد. براساس شکل 1، بهره رشد سلولی (X) بین ساعت‌های 0 و 25 تخمیر 4/545 گرم بر لیتر بود. به علاوه در همان بازه زمانی، ضریب بهره محصول‌دهی (Y) براساس مقدار گرم بر لیتر مصرفی واکنشگر سیترات تقریباً برابر 0/17 شد.

شامل گلوتامات، سیترات و گلیسرول را در تغذیه دوپالسی 20 گرم در لیتر سیترات در ساعت‌های 24 و 48 از شروع کشت غیرمداوم باکتری در محیط ME نشان می‌دهد (با مقدار محصول 59/5 گرم بر لیتر).

با توجه به شکل 1، از شروع فرایند تخمیر تولید همراه با رشد سلول اتفاق می‌افتد و تا انتهای فاز سکون هم ادامه پیدا می‌کند. بنابراین تولید  $\gamma$ -PGA در آغاز وابسته به رشد و سپس مستقل از رشد است. سرعت تولید  $\gamma$ -PGA در 10 ساعت اولیه تخمیر کم بوده ولی بعد از آن با سرعت بیشتری زیاد می‌شود. این نکته ممکن است به دلیل بازدارندگی تولید در غلظت به نسبت بالای سیترات، گلوتامات و گلیسرول در ساعت‌های اولیه فرایند تخمیر باشد. از ساعت 10م تا ساعت 24 کشت میکروبی،



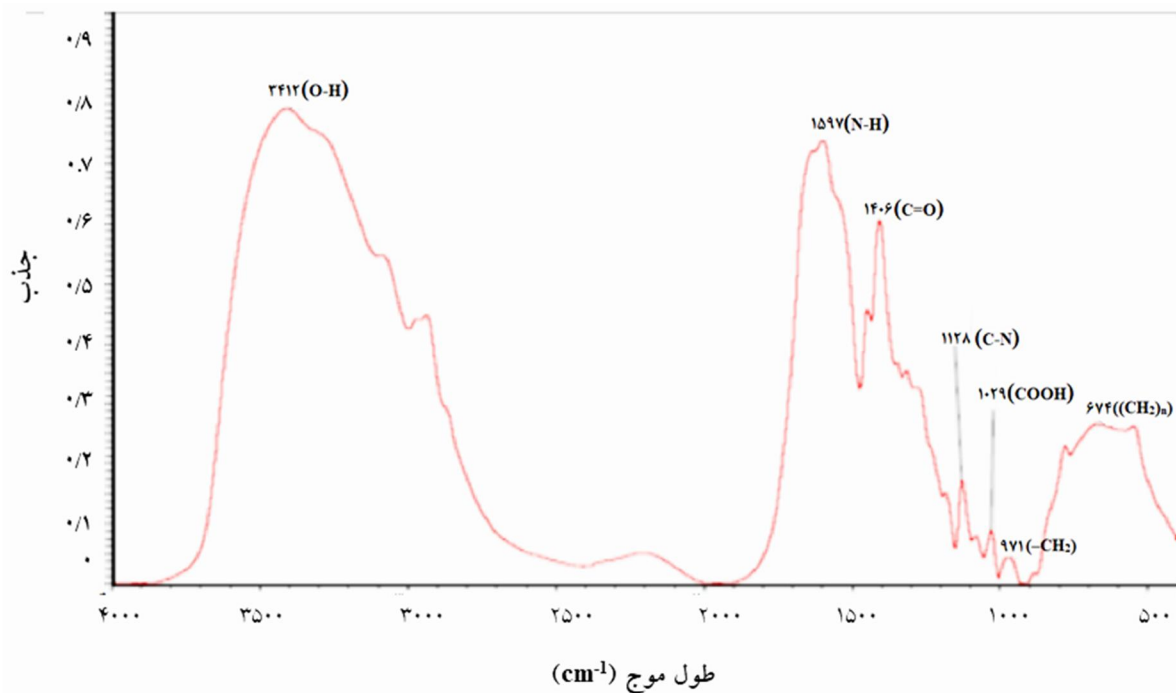
شکل 1 کشت غیرمداوم خوراک‌دهی شده با سیلوس لیکنی فورمیس ATCC 9945<sup>a</sup> در محیط کشت E اصلاح شده در ظرف تخمیر نیم‌لیتری با مقدار 5 میلی‌لیتر از خوراک سیترات (با غلظت 400 گرم بر لیتر) در 2 پالس مشابه (در ساعت‌های 24 و 48) با افزودن کلسیم و منگنز در آغاز. تغییرات زمانی مقدار (g/L) وزن خشک سلولی (◆)، ال-گلوتامات (Δ)، سیترات (▲)، پلی گاما گلوتامیک اسید (◇) و گلیسرول (○)

تشخیص زیست‌بسپار  $\gamma$ -PGA و گروه‌های شیمیایی اصلی تشکیل‌دهنده آن به کار می‌رود. هریک از نقاط پیشینه مشاهده شده در هر طول موج که در یک مقدار

نتایج بررسی ساختار شیمیایی نمونه  $\gamma$ -PGA با FTIR شکل 2 طیف FTIR نمونه پودری را که به شکل قرص درآمده بود، نشان می‌دهد. الگوی این شکل برای

بود. چندین بیشینه هم در اعداد موج کمتر از 1000 دیده می‌شوند. مطلبی که در مورد آنها مشخص است، نشان می‌دهد که کوچک‌ترین آنها مربوط به  $\text{CH}_2$  - (احتمالاً در عدد موج  $971 \text{ cm}^{-1}$ )، و بزرگ‌ترین آنها مربوط به  $(\text{CH}_2)_n$  با  $n$  بزرگ‌تر از 4 (احتمالاً در عدد موج  $674 \text{ cm}^{-1}$ ) است. گروه  $\text{CH}_3$  - هم در حد وسط آنها واقع شده است. این نتایج با مراجع دیگر مطابقت دارند [24-26].

درصد جذب به‌خصوص واقع شده است، یک گروه و پیوند شیمیایی خاصی را که در ترکیب نمونه حضور دارد، آشکار می‌کند. بیشینه واقع شده در عدد موج  $3412 \text{ cm}^{-1}$  نشانگر وجود گروه  $\text{O-H}$ ، در عدد موج  $1597 \text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده پیوند  $\text{N-H}$ ، در  $1406 \text{ cm}^{-1}$  نمایانگر حضور ترکیب  $\text{C=O}$ ، در  $1128 \text{ cm}^{-1}$  آشکارکننده پیوند شیمیایی  $\text{C-N}$ ، و در  $1029 \text{ cm}^{-1}$  بیانگر حضور ترکیب  $\text{COOH}$

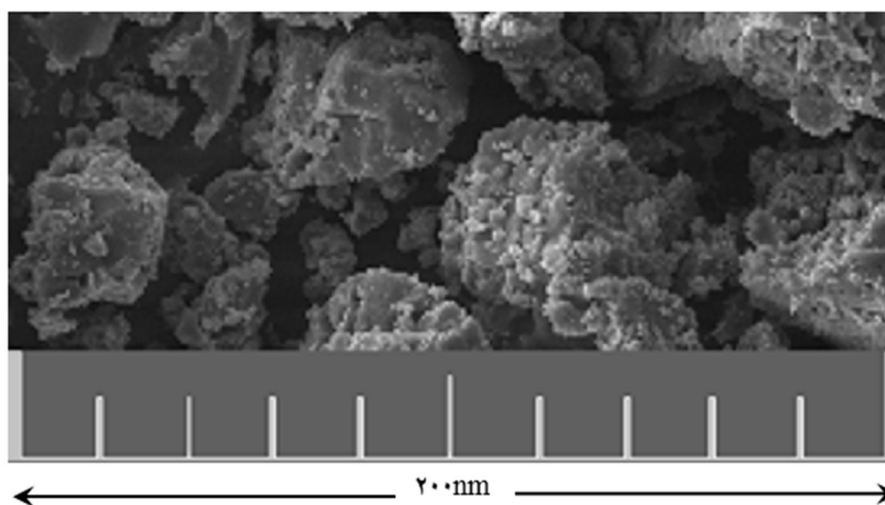


شکل 2 طیف FTIR نمونه پودری  $\gamma$ -PGA

گسترده اغلب تصاویر گرفته شده، نشان از شکل و اندازه تقریباً یکسان عمده ذرات در آنها بود. این ویژگی یک مزیت برای کاربردهای خاصی مثل آزادسازی یکنواخت دارو در بافت‌ها یا اعضای بدن محسوب می‌شود.

نتایج بررسی ریخت‌شناسی سطحی نمونه با میکروسکوپ الکترونی روبشی  
 بررسی ساختار سطح نمونه پودر  $\gamma$ -PGA (شکل 3) نشان داد که ذرات آن، ابعاد متوسط 50 نانومتری دارند. بررسی





شکل 3 تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از پودر گاما پلی گلوتامیک اسید

#### بحث

در اصلاح محیط کشت، معمولاً مقدار ترکیب‌های اصلی مؤثر بر افزایش تولید بیشتر می‌شوند. اما در این پژوهش سعی شده است افزایش ترکیب‌های مؤثر سیترات و گلوتامات در محیط کشت تا یک مقدار محدود شده انجام شود تا در ضمن دستیابی به هدف افزایش تولید تا یک حد بهینه، یک تعادل منطقی بین افزایش تولید و قیمت تمام‌شده مقدار ترکیب‌های استفاده‌شده برقرار شود. چنین روشی در پژوهش میتسوناگا<sup>12</sup> در سال 2016 میلادی نیز مشاهده شد که سعی کرد با اصلاحات جزئی در برخی ترکیب‌های محیط کشت E، محصول را بیشتر کند. در نهایت هم در یک آزمایش جالب با افزایش اندکی در مقدار سیترات (که چندان نیز هزینه‌بر نبود) توانست به تولید بسیار مناسب‌تری نسبت به محیط کشت اصلاح‌نشده دست پیدا کند [19؛ 20]. سیترات یکی از ترکیب‌های مهم موجود در چرخه سیتریک اسید و پیش‌ساز  $\gamma$ -PGA است. بخش عمده سیترات به ال-گلوتامات تبدیل می‌شود که خود، تک‌پار سازنده محصول زیست‌بسیار است. افزودن سیترات خارج سلولی به صورت خوراک ضمن تقویت چرخه TCA، پس از

تبدیل به گلوتامات، غلظت ال-گلوتامیک اسید درون سلولی را بالاتر برده و باعث تشکیل بیشتر  $\gamma$ -PGA می‌شود. با توجه به خاصیت چرخه گاما آمینو بوتیرات<sup>13</sup> (GABA) در ممانعت‌کنندگی تولید با ایجاد تجمع گلوتامات و خاصیت کی‌لیت‌سازی محصول  $\gamma$ -PGA به‌خصوص در ساعت‌های میانی تخمیر، لازم است غلظت بالایی از سیترات به‌طور ناگهانی در میانه کشت سلول‌ها فراهم شود تا به‌صورت یک محرک، هم چرخه گاما آمینو بوتیرات را بی‌اثر کند و هم به‌طور جنبی سبب در دسترس قرارگیری دوباره یون‌های فلزی چسبیده به کی‌لیت که مؤثر بر تولید هستند، شود [1؛ 2؛ 27]. فراهم کردن تغذیه به شکل یک پالس نمی‌تواند غلظت موردنیاز برای کل زمان تخمیر را فراهم کند و اگر برای این منظور منابع تغذیه‌ای با مقادیر خیلی بالا در یک پالس فراهم شوند، خود باعث ممانعت تولید است. بنابراین، خوراک‌دهی دوپالسی مناسب تشخیص داده شد چون تعداد پالس‌های بالاتر از دو نیز خاصیت تحریک‌کنندگی تولید را کاهش می‌دهند. فرضیه مناسب‌تر بودن خوراک‌دهی دوپالسی برای تحریک به افزایش تولید، با توجه به پژوهش‌های ابدل-

13 Gamma-aminobutyrate (GABA)

12 Mitsunaga

فتاح<sup>14</sup> و همکاران در سال 2007 و ژانگ<sup>15</sup> و همکاران در سال 2018 میلادی تأیید می‌شود [28؛ 29]. برای تعیین زمان‌های خوراک‌دهی مؤثر دو پالس سیترات، ساعت‌های متفاوتی آزمون شدند. با توجه به اینکه در محیط کشت اصلاح‌شده مقدار زیادی از سیترات حضور داشت، لازم بود تا با گذشتن ساعت‌های زیادی برای مصرف مواد مغذی، خوراک‌دهی اول انجام شود. برای خوراک اول سیترات، ساعت‌های کمتر از ساعات بیست و چهارم ممانعت تولید ایجاد کرد. خوراک‌دهی دوم نیز از بین ساعت‌های مختلف در ساعت 48 که غلظت سیترات دوباره به شدت کاهش یافته بود، ترجیح داده و انجام شد. این ساعت‌ها با توجه به نوع سویه، ترکیب خوراک و مجموعه شرایط محیطی (محیط کشت استفاده‌شده و غیره) و عملیاتی حاکم بر فرایند تخمیر می‌تواند متفاوت باشد، برای نمونه در پژوهش میتسوناگا و همکاران در سال 2016 میلادی، خوراک‌دهی دی‌آمونوم هیدروژن سیترات با فواصل زمانی 12 ساعته از ساعت 24 کشت میکروبی در یک محیط کشت اصلاح‌شده ترجیح داده شد [20]. سیترات، یکی از اسیدی‌ترین ترکیب‌های حاضر در محیط کشت آزمون‌شده در این پژوهش است. برای اینکه pH بسیار پایین آن، به سلول‌ها آسیب وارد نکرده و یا تولید آنها را کم یا متوقف نکند، بهتر است برای خوراک‌دهی از محلولی از آن استفاده شود که با غلظت و رقت تعدیل‌یافته بتواند سوخت‌وساز سلولها را بهبود بخشد (که در این پژوهش مدنظر قرار گرفت).

در شکل 1 سینتیک تولید محصول و رشد سلولی در کنار مصرف منابع کربن و نیتروژن سیترات، گلوتامات و گلیسرول در بهترین شرایط ممکن این پژوهش برای افزایش تولید به نمایش درآمده‌اند. پالس اول سیترات با مقدار 20 گرم به ازای هر لیتر حجم کاری سبب افزایش ناگهانی چشمگیری در محصول‌دهی شد. پالس دوم در

ساعت 48 نیز به نسبت کوچک‌تری همان اثر را داشت. با توجه به اینکه بعد هر دو پالس رشد سلولی چشمگیری مشاهده نشد، می‌توان گفت آن چنان که به‌طور معمول انتظار می‌رود، این افزایش تولید دلیلش افزایش رشد سلولی نبوده است بلکه به دلایلی از جمله حضور چرخه فرعی گاما آمینو بوتیرات و خاصیت کی‌لیت‌سازی محصول که پیش‌تر توضیح داده شدند، پالس‌های واردشده فقط به‌صورت یک محرک تولید عمل کرده‌اند [1؛ 2؛ 27؛ 29]. این مطلب نشان می‌دهد که  $\gamma$ -PGA به‌عنوان یک متابولیت ثانویه در مناسب‌ترین شرایط در اغلب زمان‌های مرحله تولید سینتیک تولیدی مستقل از سینتیک رشد سلولی داشته و منابع تغذیه‌ای اصلی (به‌خصوص سیترات) به جای آنکه رشد سلول‌ها را بیشتر کنند، براساس نمودارهای سینتیکی رشد، تولید و تغییرات زمانی مصرف منابع کربن و نیتروژن (شکل 1) به‌طور اساسی سبب تولید بیشتر شده‌اند که خود فرضیه تحریک تولید را تأیید می‌کند [1؛ 2].

مطالعات ساختاری شیمیایی و فیزیکی به‌ترتیب نشان‌دهنده ترکیب شیمیایی یکسان محصول با پژوهش‌های پیشین و آشکارکننده شکل فیزیکی آن (تا آنجا که ما می‌دانیم برای نخستین بار) می‌باشند. شکل‌شناسی فیزیکی محصول پودری یک ساختمان بلور مانند را نشان داد. هرچه این ساختار به ابعاد نانومتری نزدیک‌تر باشد (همان‌طور که در مورد این پژوهش صدق می‌کند) با فراهم کردن قابلیت انتقال زیستی و سطح تماس بیشتر، انتقال جرم و تأثیرگذاری بیشتری برای داروهایی که به‌وسیله آن حمل می‌شوند، به همراه خواهد داشت. از طرف دیگر با توجه به ابعاد و ساختمان مشابه بلورهای نانومتری، آزادسازی یکنواخت و یکسان‌تری (در ابعاد مختلف و در طول زمان) برای آنها متصور است. با توجه به پژوهش‌های پیشین می‌توان بر این خصوصیات شیمیایی و فیزیکی  $\gamma$ -PGA صحه گذاشت [24-26؛ 30].

14 Abdel-Fattah

15 Zhang

## نتیجه گیری

برای افزایش تولید کشت باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس<sup>a</sup> ATCC 9945 و سویه های دیگری که  $\gamma$ -PGA را تولید می کنند، با توجه به اینکه رشد سلول یک تابع شبه نمایی و وابسته به زمان را نمایش می دهد، معمولاً خوراک دهی های وابسته به زمان به کار گرفته شده اند. این رویه خوراک دهی با توجه به اینکه اغلب افزایش نیاز به تغذیه با افزایش رشد سلول بخصوص برای تولید بیشتر متابولیت های اولیه مطابقت دارد، در پژوهش های گذشته مؤثرتر از سایر راهکارها فرض شده است. اما  $\gamma$ -PGA به عنوان یک متابولیت ثانویه تولید شده به ویژه با باکتری به کاررفته در این پژوهش، اول اینکه از این قاعده تا حدودی مستثنا بود. دوم خوراک دهی به صورت پالس های ناگهانی با وجود به کارگیری یک محیط کشت اصلاح شده به نسبت ارزان و بهینه، از هزینه های اولیه (مربوط به فراهم آوردن محیط کشت) و فرایندی (مربوط به برپایی آزمایش ها و نیاز به تکنیسین) تا حدود زیادی کاسته و تکرارپذیری آزمایش ها را بیشتر امکانپذیر کرد. ضمن اینکه براساس پژوهش های گذشته، خوراک واردشده به محیط کشت به طور ناگهانی هم محرک افزایش تولید بود و هم در دسترس قرارگیری دوباره یون های مورد نیاز تولید تأثیرگذار بود که بعد چسبیدن به محصول، به نوبه خود به عنوان محدودکننده های ثانویه رشد و تولید عمل می کردند. اهمیت این پژوهش در برجسته کردن آن در مقایسه با گزارش های قبلی در بهبود یک جای عوامل مختلف از جمله شرایط تخمیر، محیط کشت با صرفه اقتصادی و خوراک دهی پالسی مناسب بود. محیط کشت مناسب، رشد و تداوم زیستی و زمان و مقدار تولید سلول ها را بیشتر کرد. به علاوه رشد و مدت تداوم زیستی بیشتر سلول ها با افزایش مصرف منابع تغذیه ای بیشتر، مقادیر تولید ترکیب های سوخت و سازی و محصول را هم افزایش داد. در نهایت اینکه با خوراک دوپالسی بهبودیافته

قابلیت تحریک کنندگی تولید بیشترشده و منابع تغذیه ای مورد نیاز برای تولید بهتر در دسترس سلول ها قرار گرفت تا بالاترین غلظت محصول گزارش شده با این باکتری به دست آمده و توسعه صنعتی فرایند تولید با آن به صورتی ساده و ارزان قیمت فراهم شود. ابعاد محصول پودری در مقیاس نانومتری و با اشکال تقریباً یکسان و یکنواختی گزارش شد. این ابعاد کوچک، آن را در کاربردهای زیستی، دارورسانی و آزادسازی دارو کارآمد کرده، با فراهم کردن سطح تماس در واحد حجم بیشتر تأثیرگذاری دارو را افزایش داده و شکل یکنواخت آن، آزادسازی دارو را یکنواخت تر و قابل کنترل تر می کند.

## تشکر و قدردانی: نگارندگان این مقاله از دانشگاه

صنعتی مالک اشتر تهران برای فراهم کردن تمام امکانات، مواد و دستگاه های استفاده شده در این پژوهش تشکر می کنند.

**تأییدیه اخلاق:** هیچ موردی به وسیله نویسندگان ذکر نشده است.

**تعارض منافع:** هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** مهرداد ابراهیم زاده کوچصفهانی

(نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (40 درصد)؛ علی بهرامی

(نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (40 درصد)؛ ولی الله

بابایی پور (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (20 درصد)

**منابع مالی:** منابع مالی این پژوهش به وسیله دانشگاه

صنعتی مالک اشتر تهران تأمین شده است.

## منابع

- [1] Luo Z, Guo Y, Liu J, Qiu H, Zhao M, Zou W, Li S. Microbial synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. *Biotechnol Biofuels*. 2016; 9(1):134.
- [2] Ogunleye A, Bhat A, Irorere VU, Hill D, Williams C, Radecka I. Poly- $\gamma$ -glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiology*. 2015; 161(1):1-17.

- [13] Cromwick AM, Gross RA. Effects of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A physiology and  $\gamma$ -poly (glutamic acid) formation. *Int J Biol Macromol*. 1995; 17(5):259-67.
- [14] Cromwick AM, Birrer GA, Gross RA. Effects of pH and aeration on gamma-poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. *Biotechnol Bioeng*. 1996; 50(2):222-7.
- [15] Feng J, Shi Q, Zhou G, Wang L, Chen A, Xie X, Huang X, Hu W. Improved production of poly- $\gamma$ -glutamic acid with low molecular weight under high ferric ion concentration stress in *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Process Biochem*. 2017; 56:30-6.
- [16] Troy FA. Chemistry and Biosynthesis of the Poly ( $\gamma$ -D-glutamyl) Capsule in *Bacillus licheniformis* I. PROPERTIES OF THE MEMBRANE-MEDIATED BIOSYNTHETIC REACTION. *J Biol Chem*. 1973; 248(1):305-15.
- [17] Troy FA. Chemistry and biosynthesis of the poly ( $\gamma$ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis* II. Characterization and structural properties of the enzymatically synthesized polymer. *J Biol Chem*. 1973; 248(1):316-24.
- [18] Ko YH, Gross RA. Effects of glucose and glycerol on  $\gamma$ -poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biotechnol Bioeng*. 1998; 57(4):430-7.
- [19] Mitsunaga H, Meissner L, Büchs J, Fukusaki E. Branched chain amino acids maintain the molecular weight of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945 during the fermentation. *J Biosci Bioeng*. 2016; 122(4):400-5.
- [20] Mitsunaga H, Meissner L, Palmen T, Bamba T, Büchs J, Fukusaki E. Metabolome analysis reveals the effect of carbon catabolite control on the poly ( $\gamma$ -glutamic acid) biosynthesis of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *J Biosci Bioeng*. 2016; 121(4):413-9.
- [21] Giannos SA, Shah D, Gross RA, Kaplan DL, Mayer JM. Poly (glutamic acid) produced by bacterial fermentation. In: Dawes EA, [3] Bajaj I, Singhal R. Poly (glutamic acid)—an emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresour Technol*. 2011; 102(10):5551-61.
- [4] Akagi T, Matsusaki M, Akashi M. Pharmaceutical and medical applications of poly-gamma-glutamic acid. In: Amino-acid homopolymers occurring in nature. Berlin: Springer; 2010. pp. 119-53.
- [5] Hsueh YH, Huang KY, Kunene SC, Lee TY. Poly- $\gamma$ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(12):2644.
- [6] Ashiuchi M. Microbial production and chemical transformation of poly- $\gamma$ -glutamate. *Microb Biotechnol*. 2013; 6(6):664-74.
- [7] Manocha B, Margaritis A. Production and characterization of  $\gamma$ -polyglutamic acid nanoparticles for controlled anticancer drug release. *Crit Rev Biotechnol*. 2008; 28(2):83-99.
- [8] Wang Q, Wei X, Chen, S. Production and application of poly- $\gamma$ -glutamic acid. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Elsevier; 2017. pp. 693-717.
- [9] Sirisansaneeyakul S, Cao M, Kongklom N, Chuensangjun C, Shi Z, Chisti Y. Microbial production of poly- $\gamma$ -glutamic acid. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017; 33(9):173.
- [10] Xu Z, Zhang H, Chen H, Shi F, Huang J, Wang S, Song C. Microbial Production of Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid. In: Yang ST, El-Enshasy HA, Thongchul N, editor. Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers. John Wiley & Sons; 2013. pp. 427-40.
- [11] Birrer GA, Cromwick AM, Gross RA.  $\gamma$ -Poly (glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *Int J Biol Macromol*. 1994; 16(5):265-75.
- [12] Yoon SH, Do JH, Lee SY, Chang HN. Production of poly- $\gamma$ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol Lett*. 2000; 22(7):585-8.

- fermentation broth. Trop J Pharm Res. 2017; 16(6):1267-75.
- [27] Cromwick AM, Gross RA. Investigation by NMR of metabolic routes to bacterial  $\gamma$ -poly (glutamic acid) using  $^{13}\text{C}$ -labeled citrate and glutamate as media carbon sources. Can J Microbiol. 1995; 41(10):902-9.
- [28] Abdel-Fattah Y, Soliman N, Berekaa M. Application of Box-Behnken Design for Optimization of Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid Production by *Bacillus licheniformis* SAB-26. Res J Microbiol. 2007; 2(9):664-70.
- [29] Zhang C, Wu D, Qiu X. Stimulatory effects of amino acids on  $\gamma$ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis*. Sci Rep. 2018; 8(1):1-9.
- [30] Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EV, del Pilar Rodriguez-Torres M, Acosta-Torres LS, Diaz-Torres LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. J Nanobiotechnology. 2018; 16(1):1-33.
- editor. Novel Biodegradable Microbial Polymers. Netherlands: Springer; 1990. Nato Science Series E; 186. pp. 457-60.
- [22] Goto A, Kunioka M. Biosynthesis and hydrolysis of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. Biosci Biotechnol Biochem. 1992; 56(7):1031-5.
- [23] Do JH, Chang HN, Lee SY. Efficient recovery of  $\gamma$ -poly (glutamic acid) from highly viscous culture broth. Biotechnol Bioeng. 2001; 76(3):219-23.
- [24] Pereira CL, Antunes JC, Gonçalves RM, Ferreira-da-Silva F, Barbosa MA. Biosynthesis of highly pure poly- $\gamma$ -glutamic acid for biomedical applications. J Mater Sci Mater Med. 2012; 23(7):1583-91.
- [25] Lin B, Li Z, Zhang H, Wu J, Luo M. Cloning and expression of the  $\gamma$ -polyglutamic acid synthetase gene pgsBCA in *Bacillus subtilis* WB600. Biomed Res Int. 2016; Article ID: 3073949.
- [26] Wang F, Liang J, Wang W, Fu D, Xiao W. A new and efficient method for purification of poly- $\gamma$ -glutamic acid from high-viscosity

# Production increasing of poly- $\gamma$ -glutamic acid by batch and fed-batch cultures of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945<sup>a</sup> and study of its physical and chemical structure

Mehrdad Ebrahimzadeh Kouchesfahani<sup>1</sup>, Ali Bahrami<sup>\*2</sup>, Valiollah Babaeipour<sup>3</sup>

1-PhD Student, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

2-Associate Professor, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

3-Associate Professor, Faculty of Chemistry and Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

**\*Corresponding author:** a\_bahrami@mut.ac.ir

P.O. Box: 15875-1774

Phone: +98 (21) 22974604

Fax: +98 (21) 22974604

Received: 2021/4/19

Accepted: 2022/1/10

## ABSTRACT

Poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) is a beneficial, biocompatible, and biodegradable biopolymer. These properties have been led to the development of the use of this compound in various industries such as biomedicine, biopharmaceutical, biotechnology, and tissue engineering. The limitation of the industrial development of  $\gamma$ -PGA is the high cost of its production. To reduce  $\gamma$ -PGA production costs, various strategies are used, such as culture medium optimization using inexpensive compounds, the development of efficient cultivation processes of batch and fed-batch. In this research, first, an efficient batch culture medium was developed to produce  $\gamma$ -PGA of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945<sup>a</sup>. Then, the  $\gamma$ -PGA production increased by the pulsed feeding method and its optimization. By optimal culture medium development, the production of this product in batch culture was increased from 11 g/L to 47 g/L. Then, using the optimized pulsed feeding strategy of citrate ( $\gamma$ -PGA precursor),  $\gamma$ -PGA production was increased to 59.5 g/L, which is one of the highest production values reported with this strain. To optimize two-pulse feeding, the effect of feeding times, stock citrate solution concentration, and time of calcium and manganese solutions addition on  $\gamma$ -PGA production were investigated and optimized. Finally, FTIR confirmed the chemical structure of poly gamma glutamic acid, and the study of  $\gamma$ -PGA morphological properties with SEM showed a nanostructure ideal for biological applications.

**Keywords** Submerged fermentation; Modified E culture medium; Pulse feeding strategy; Batch fermentation;  $\gamma$ -PGA