

افزایش تولید پلی گاما گلوتامیک اسید با تخمیر غیر مداوم و غیر مداوم همراه با خوراک دهی باسیلوس لیکنی فورمیس ATCC 9945^a و بررسی ساختار فیزیکی و شیمیایی آن

مهرداد ابراهیم زاده کوچصفهانی¹، علی بهرامی^{2*}، ولی الله بابایی پور³

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 اسید¹ یک بیوپلیمر سودمند، زیست سازگار و زیست تخریب پذیر 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 هزینه های تولید از راهکارهای مختلفی مثل بهینه سازی محیط کشت با استفاده از ترکیب های ارزان قیمت، توسعه فرایندهای کارآمد کشت غیر مداوم و غیر مداوم همراه با خوراک دهی استفاده شده است. در این پژوهش نخست یک محیط کشت غیر مداوم کارآمد برای تولید پلی گاما گلوتامیک اسید از سویه باکتریایی باسیلوس لیکنی فورمیس ATCC 9945^a توسعه داده شد. سپس با روش خوراک دهی پالسی و بهینه سازی آن، تولید پلی گاما گلوتامیک اسید افزایش داده شد. با توسعه یک محیط کشت بهینه، تولید این محصول در کشت غیر مداوم از 11 g/L به 47 g/L افزایش پیدا کرد. سپس با استفاده از راهبرد خوراک دهی پالسی سترات (پیش ساز γ -PGA) بهینه سازی 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 بهینه سازی خوراک دهی دو پالسی، اثر زمان های خوراک دهی، غلظت محلول ذخیره سترات و زمان افزودن محلول های کلسیم و منگنز روی تولید γ -PGA بررسی و بهینه سازی شدند. در نهایت نیز ساختار شیمیایی پلی گاما گلوتامیک اسید به وسیله FTIR تأیید شد و بررسی خواص شکل شناسی آن با SEM یک نانو - ساختار ایدئال برای کاربردهای زیستی را نشان داد. **کلید واژگان:** تخمیر غوطه ور، محیط کشت E اصلاح شده، راهبرد خوراک دهی پالسی، تخمیر غیر مداوم، γ -PGA.

1 Poly- γ -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 α -PGA و γ -PGA شکل می‌گیرد. ساختار آلفا به‌طور معمول به روش شیمیایی ساخته می‌شود و کاربردهای محدودی دارد. در مقابل، γ -PGA یک پلی-پپتید است که به علت زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری مورد توجه است [1-3]. پلی-گاما گلوتامیک اسید برخلاف پروتئین‌ها، تنها یک نوع اسید آمینه دارد و تفاوت در تعداد گلوتامیک اسید در این زیست‌بسیار² می‌تواند بسیار متفاوت باشد، بنابراین محدوده وسیعی از اوزان مولکولی را در بر می‌گیرد. این زیست‌بسیار به‌عنوان یک عامل حمل و آزادسازی دارو، انحلال و تأثیر دارو را در بافت‌ها بالا برده و خودبه‌خود تجزیه می‌شود. در جراحی، به‌عنوان بخیه و مرهم زخم نیز تأثیرگذار است [4-7].

پلی-گاما گلوتامیک اسید به روش تخمیر باکتریایی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف، مواد اولیه ارزان‌قیمت و با خلوص بالا تولید می‌شود. سویه‌های مولد γ -PGA براساس نیاز به منابع تغذیه‌ای به دو دسته وابسته به گلوتامات و مستقل از گلوتامات تقسیم می‌شوند [8]. اصلی‌ترین محدودیت صنعتی شدن کاربرد γ -PGA هزینه به‌نسبت بالای تولید است. تاکنون، راهبردهای مختلفی برای کاهش هزینه‌های تولید میکروبی γ -PGA از جمله بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید، توسعه محیط کشت‌های ارزان، افزودن پیش‌ساز و تک‌پار³ γ -PGA شامل سیترات و گلوتامات، استفاده از میکروارگانیسم‌های مختلف و توسعه راهبرد خوراک‌دهی کارآمد استفاده شده است [9]؛ البته با تغییر نوع میکروارگانیسم، همه این مطالعات و بهینه‌سازی‌ها باید دوباره انجام شوند.

یکی از محیط کشت‌های معمول برای تولید γ -PGA با سویه باسیلوس لیکنی فورمیس⁴ ATCC 9945، محیط کشت پایه E است. اصلاح محیط کشت، شرایط تخمیر و خوراک‌دهی می‌تواند بهره تولید را افزایش دهد. اصلاح محیط کشت با تغییر مقادیر منابع تغذیه‌ای مؤثر بر محصول‌دهی مثل سیترات و گلوتامات به‌عنوان پیش‌ساز و تک‌پار γ -PGA می‌تواند انجام شود. تنظیم شرایط تخمیر از راه پایش و کنترل دما، pH، نحوه اختلاط و هوادهی صورت می‌گیرد. یک خوراک‌دهی مطلوب با زمان‌بندی مناسب و با استفاده از ترکیب و غلظت مناسب از مواد غذایی انجام می‌شود [10-12].

در این پژوهش، بیشتر عوامل نامبرده برای افزایش میزان محصول به‌طور مقتضی بررسی و تا حد امکان بهینه شده‌اند. از طرفی با توجه به تأثیر سیترات بر تولید محصول (به‌عنوان یکی از ترکیب‌های اصلی در مسیر سوخت‌وسازی تولید گاما پلی گلوتامیک اسید)، از خوراک‌دهی این ترکیب کمک گرفته شده تا γ -PGA بیشتری تولید شود. سیترات به‌عنوان بهترین پیش‌ساز γ -PGA مطرح است، زیرا می‌تواند به‌واسطه ایزوسیتریک اسید⁴ و سپس آلفاکتوگلوکوتارات⁵ در چرخه اسید سیتریک (چرخه کربس⁶)، به ال-گلوتامیک اسید⁷ تبدیل شود. سپس گاما پلی گلوتامیک اسید از این تک‌پار گلوتامیک اسید بسپارش می‌شود [8].

در محیط کشت پایه E بدون MnSO_4 ، قدرت یونی و pH نقش مهمی بر میزان تولید دارد [11]. با بررسی غلظت‌های مختلف MnSO_4 در محیط کشت E، تا 17 گرم بر لیتر زیست‌بسیار γ -PGA گزارش شده است [13]. در pH برابر با 6/5، سیترات نقش تعیین‌کننده‌ای بر افزایش تولید (تا 23 گرم بر لیتر) نشان داده است [14].

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

2 Biopolymer
3 Monomer

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

سیترات جزء مهم ترین منابع کربن شناخته می شود [16؛ 17]. با استفاده از مقادیر مختلف گلیسرول و گلوکز، تولید 29 گرم بر لیتر به دست آمد [18]. با بررسی اثر غلظت های مختلف منابع کربن گلیسرول، گلوکز، فروکتوز، و سوربیتول در محیط E روی تولید γ -PGA، بیشترین تولید برابر با 35/78 گرم بر لیتر با استفاده از گلیسرول گزارش شد [19؛ 20].

کشت غیرمداوم خوراک دهی شده اغلب با راهبرد خوراک دهی پالسی برای افزایش تولید γ -PGA گزارش شده است. با این روش، غلظت گاما پلی گلوتامیک اسید برابر 39 گرم بر لیتر با نرخ محصول دهی 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 کلراید⁸ را شامل می شد [12]. بیشترین مقدار γ -PGA، به کشت غیرمداوم با خوراک دهی در محیط کشت EC مربوط می شود. در تخمیر نامبرده از راهبرد پالسی خوراک دی آمونیوم هیدروژن سیترات⁹ در ساعت های 24، 36، و 48 کمک گرفته شد. حاصل آن غلظت بالای زیست بسپار 53/97 گرم بر لیتر بود [20].

در پژوهش های گذشته برای افزایش محصول دهی، بیشتر از اصلاحات محیط کشت و خوراک دهی های وابسته به زمان استفاده شده است. توسعه محیط کشت جدید به تنهایی برای افزایش تولید چندان ارزان قیمت و موفق نبوده است و خوراک دهی های وابسته به زمان نیز در این زمینه، به نظارت و کنترل پیوسته به وسیله کاربر نیاز دارند. به علاوه، بررسی های تخصصی در مورد بهبود خوراک دهی، بسیار محدود و غیرمتمرکز ارائه و گزارش

شده اند. در ضمن توسعه محیط کشت کم هزینه و کارآمد و بهبود پارامترهای یک راهبرد خوراک دهی پالسی ساده به طور جامع در یک جا برای افزایش محصول دهی بررسی نشده اند. بنابراین در این پژوهش برای افزایش تولید γ -PGA با یک راهبرد ساده و ارزان، همزمان محیط کشت کارآمدتر و ارزان و یک خوراک دهی پالسی ناگهانی و ساده مبتنی بر سیترات که هزینه بر نبوده و با کمترین نیاز به کاربر قابل اجراست، توسعه داده شدند. چنین روندی نخستین بار است که آزمون می شود.

مواد و روش ها

نوع تخمیر و سویه میکروبی استفاده شده

سویه باکتریایی که در کشت های میکروبی این پژوهش به کار رفت، باسیلوس لیکنی فورمیس^a 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 می باشد [11؛ 12]. از کشت میکروبی مایع یا غوطه ور و فرایندهای تخمیر غیرمداوم و غیرمداوم همراه با خوراک دهی در پژوهش استفاده شد.

نحوه آماده سازی مایه تلقیح و محیط کشت اختصاصی آن

با آزمودن ترکیب های مختلفی برای دستیابی به رشد سریع و مناسب باکتری مورد نظر، یک محیط کشت اختصاصی به دست آمد. اجزای این محیط به ازای یک لیتر شامل 0/04 گرم آهن (II) کلراید 6 آب، 0/5 گرم دی پتاسیم 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 ترکیب ها به حجم مورد نظر رسانده شدند. سپس با افزودن هیدروکسید سدیم 6 مولار، pH محلول حاصل برابر مقدار مطلوب 7/4 شد.

8 Ammonium chloride

9 Di-ammonium hydrogen citrate

محیط مایه تلقیح در دمای 121°C و فشار 121 psi به مدت 15 دقیقه سترون شد. یون آهن این محیط در داخل دستگاه اتوکلاو تحت اثر حرارت واکش نشان می داد. بنابراین به صورت جداگانه و به وسیله فیلتر 0/2 میکرون سترون شد.

بانک سلولی پس از افزایش دما از 70°C 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) (Tajhiz) با دمای 37°C و سرعت همزدن 200 rpm قرار داده شد.

نحوه آماده سازی 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، دی پتاسیم هیدروژن فسفات: 0/5، کلرید کلسیم 2 آبه: 0/15، کلرید آهن (II) 6 آبه: 0/04 و سولفات منگنز تک آبه: 0/104 گرم بر لیتر که در مقاله های زیادی آورده شده استفاده شد. با آزمون و خطا بر مقادیر منابع تغذیه ای مؤثر برای افزایش تولید، محیط کشت پایه E اصلاح شد و محیط کشت E اصلاح شده یا ME نامگذاری شد (داده های مربوط به آن آزمایش ها در اینجا آورده نشده اند). فقط مقادیر منابع تغذیه ای شامل گلیسرول، گلوتامات، سیترات و یون آهن (به ترتیب از 80، 20، 12، و 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، دی پتاسیم هیدروژن فسفات: 0/5، کلرید کلسیم 2 آبه: 0/15، کلرید آهن (II) 6 آبه: 0/05 و سولفات منگنز تک آبه: 0/104 بود.

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

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

آماده سازی و برپایی آزمایش های کشت غیرمداوم همراه با خوراک دهی

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

برای افزایش تولید γ -PGA، از خوراک دهی دو پالسی بهینه سازی شده سیترات استفاده شد. برای بهینه سازی خوراک دهی دو پالسی، اثر زمان های خوراک دهی، غلظت محلول استوک سیترات و زمان افزودن محلول های کلسیم و منگنز با روش آزمودن یک عامل در هر زمان روی تولید γ -PGA بررسی و بهینه سازی شدند. سپس در شرایط بهینه، سینتیک تولید γ -PGA، رشد باکتری و مصرف سوبستراهای محیط کشت شامل گلیسرول، سیترات و گلوتامات بررسی شد.

استخراج و سنجش مقدار محصول

به طور معمول پس از 72 ساعت انجام کشت میکروبی، استخراج γ -PGA آغاز می شود. 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 سلول ها، سلول ها راحت تر به هم چسبیده و جداسازی آنها ساده و عملی تر شد. سپس در یک دستگاه سانتریفیوژ (PIT Universal 320) در 11440g به مدت 20 دقیقه، سلول ها 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°C خنک شد. برای جداسازی γ -PGA از این محلول، از 4 برابر نسبت حجمی اتانول 4°C به مایع استفاده شد. بعد از اختلاط کامل الکل با آن، محصول به صورت توده ای جدا شد. از دیالیز با حد جداسازی ناخالصی های زیر 3500 دالتون طی 12 ساعت استفاده شد. یک لیتر آب مقطر و سه بار تعویض آن استفاده شد. در آخر، زیست بسپار با خشک کن انجمادی خشک شده (به مدت دو روز) و وزن آن اندازه گیری شد. این محصول به عنوان نمونه استاندارد برای بررسی های ساختاری بعدی استفاده شد [3؛ 8؛ 22؛ 23]. برای تعیین دقیق غلظت γ -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.

روش های آنالیز

رشد سلولی با اندازه گیری تراکم نوری در 660 نانومتر و وزن خشک سلولی بررسی شد. از محیط کشت تازه بدون سلول به عنوان شاهد استفاده شد. برای اندازه گیری وزن

خشک سلولی، پنج میلی لیتر از محیط کشت برداشته شد. این نمونه در داخل یک لوله آزمایشگاهی (یا فالكون) از پیش توزین شده ریخته شد. با دستگاه سانتریفیوژ به مدت 15 دقیقه و در 11440g، سلول ها رسوب داده شدند. سپس سلول ها با آب مقطر شسته شده و در دمای 105°C (در کوره) خشک شدند تا به وزن ثابتی برسند.

در ادامه، محلول باقیمانده از جداسازی سلول ها برای اندازه گیری 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. اندازه گیری غلظت گلوکاتامات نیز همانند مرجع با کیت آنزیمی بوهرینگر منهایم¹⁰ انجام شد [12].

بررسی ساختار شیمیایی و ریخت شناسی (مورفولوژی)

سطحی نمونه پودری γ -PGA

پس از آنکه نمونه γ -PGA با خشک کن انجمادی کاملاً خشک شد، با آسیاب کردن به صورت پودر تبدیل شد. سپس این پودر با نسبت 0/01 KBr با 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 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} با وضوح $4/\text{cm}$ و سرعت $200\times$ پویش شد. سپس مورفولوژی آن در ابعاد میکرومتر تا نانومتر با میکروسکوپ الکترونی روبشی¹¹ (SEM) (TESCAN VEGA 3 ساخت جمهوری چک) بررسی شد تا شکل و

10 Boehringer Mannheim

11 Scanning Electron Microscopy (SEM)

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

یافته‌ها

افزایش تولید γ -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 γ -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 نمایی فراهم می‌کند، ازاین‌رو زمان بیشتری برای مصرف‌شدن کامل آنها طول می‌کشد. بنابراین انتظار می‌رود با این بهبود محیط کشت، بتوان فاز تولید γ -PGA را طولانی‌تر کرد.

در کشت غیرمداوم باسیلوس لیکنی‌فورمیس در محیط کشت ME $47/2 \pm 0/49$ گرم بر لیتر γ -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 γ -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 γ -PGA، باید قبل از خوراک‌دهی اول زمان مناسبی برای مصرف آنها به‌وسیله سلول‌ها

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 γ -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 γ -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.

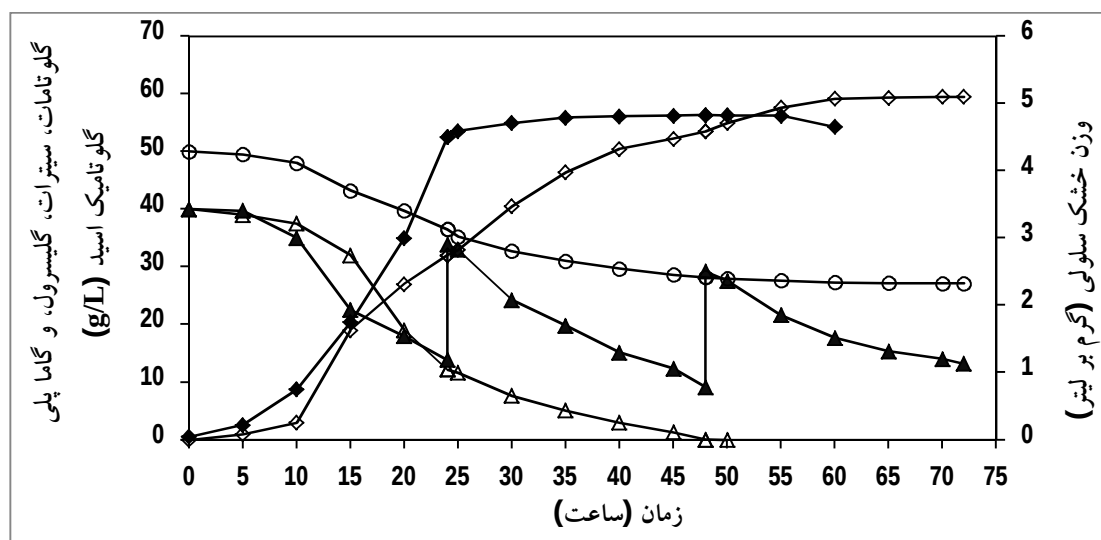
با بررسی اثر غلظت محلول ذخیره خوراک سیترات در غلظت‌های 250، 300، 384 و 400 گرم بر لیتر روی تولید γ -PGA، غلظت 400 گرم بر لیتر بیشترین محصول را داد. بنابراین در یک آزمایش، خوراک دوپالسی سیترات (با غلظت 400 گرم بر لیتر) در محیط کشت ME استفاده شد. برای این منظور مقدار کل 5 میلی‌لیتر از خوراک‌دهی سیترات در ساعات‌های 24 و 48 به کار رفت تا میزان تولید را به بیشینه نزدیک کند. مقدار تولید حاصل‌شده از این آزمایش $58/71 \pm 0/35$ گرم بر لیتر از γ -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 γ -PGA اثر زمان افزودن محلول‌های کلسیم و منگنز (از اجزای جداگانه سترون و اضافه‌شده محیط کشت) در ساعات‌های 0، 8 و 24 ام فرایند کشت میکروبی روی مقدار محصول بررسی شد. افزودن محلول این یون‌ها در آغاز فرایند کشت تولید γ -PGA را تا $59/5$ گرم بر لیتر افزایش داد. شکل-1 سینتیک تولید γ -PGA، رشد سلولی و مصرف سوبستراها

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 چهل‌ام 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 γ -PGA در آغاز وابسته به رشد و سپس مستقل از رشد است. سرعت تولید γ -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 10ام تا ساعت 24 کشت میکروبی،



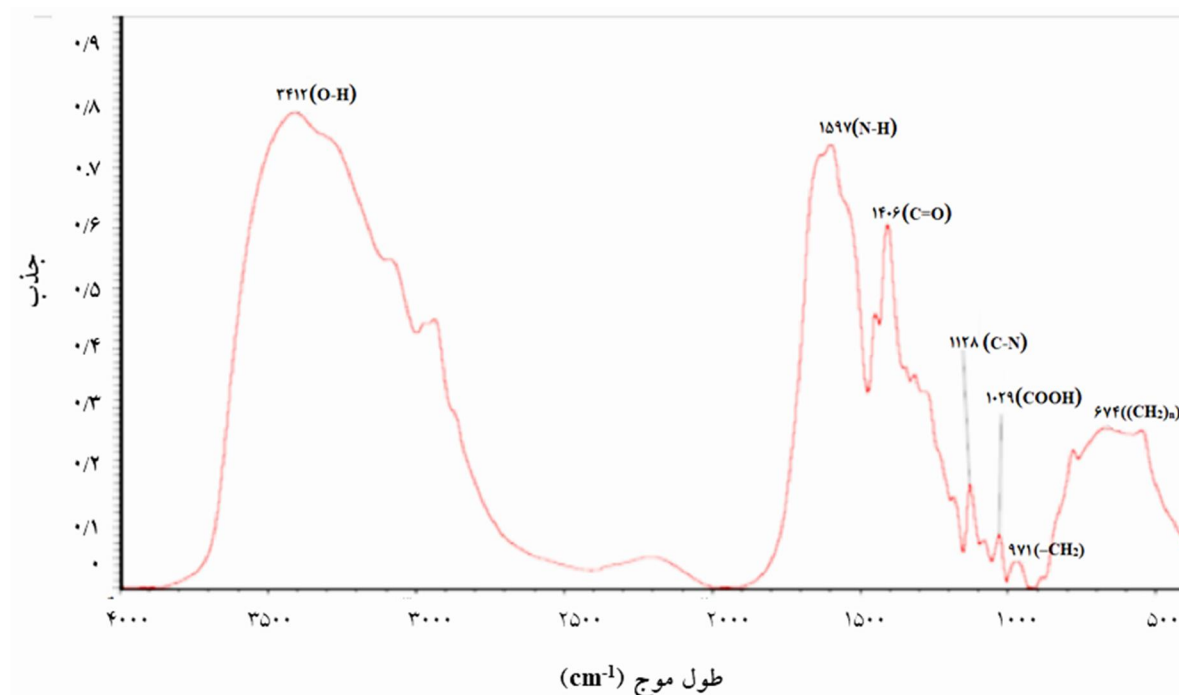
شکل 1 کشت غیرمداوم خوراک‌دهی شده با سیلوس لیکنی فورمیس ATCC 9945^a در محیط کشت E اصلاح شده در ظرف تخمیر نیم‌لیتری با مقدار 5 میلی‌لیتر از خوراک سیترات (با غلظت 400 گرم بر لیتر) در 2 پالس مشابه (در ساعت‌های 24 و 48) با افزودن کلسیم و منگنز در آغاز. تغییرات زمانی مقدار (g/L) وزن خشک سلولی (♦)، ال-گلوتامات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

تشخیص زیست‌بسیار γ -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 γ -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 CH_2 - (احتمالاً در عدد موج 971 cm^{-1})، و بزرگ‌ترین آنها مربوط به $(\text{CH}_2)_n$ با n بزرگ‌تر از 4 (احتمالاً در عدد موج 674 cm^{-1}) است. گروه 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 واقع‌شده در عدد موج 3412 cm^{-1} نشانگر وجود گروه O-H ، در عدد موج 1597 cm^{-1} نشان‌دهنده پیوند N-H ، در 1406 cm^{-1} نمایانگر حضور ترکیب C=O ، در 1128 cm^{-1} آشکارکننده پیوند شیمیایی C-N ، و در 1029 cm^{-1} بیانگر حضور ترکیب COOH

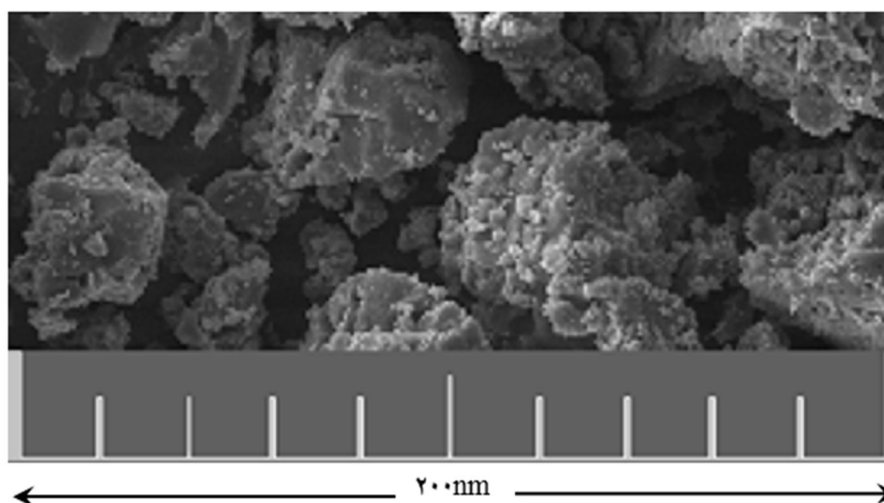


شکل 2 طیف FTIR نمونه پودری γ -PGA

گسترده اغلب تصاویر گرفته‌شده، 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 γ -PGA (شکل 3) نشان داد که ذرات آن، ابعاد متوسط 50 نانومتری دارند. بررسی



شکل 3 تصویر میکروسکوپ الکترونی رویشی 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 میتسوناگا¹² 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 γ -PGA است. بخش عمده سیترات به ال-گلوتمات تبدیل می‌شود که خود، تک‌پار سازنده محصول زیست‌بِسپار است. افزودن سیترات خارج سلولی به صورت خوراک ضمن تقویت چرخه TCA، پس از

تبدیل به گلوتامات، غلظت ال-گلوتمامیک اسید درون سلولی را بالاتر برده و باعث تشکیل بیشتر γ -PGA می‌شود. با توجه به خاصیت چرخه گاما آمینو بوتیرات¹³ (GABA) در ممانعت‌کنندگی تولید با ایجاد تجمع گلوتامات و خاصیت کی‌لیت‌سازی محصول γ -PGA به خصوص در ساعت‌های میانی تخمیر، لازم است غلظت بالایی از سیترات به‌طور ناگهانی در میانه کشت سلول‌ها فراهم شود تا به صورت 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 مورد نیاز 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

فتاح¹⁴ و همکاران در سال 2007 و ژانگ¹⁵ 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 دی‌آمونیم 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 γ -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 γ -PGA صحه گذاشت [24-26؛ 30].

14 Abdel-Fattah
15 Zhang

نتیجه گیری

برای افزایش تولید کشت باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس^a ATCC 9945 و سویه های دیگری که γ -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 γ -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- γ -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- γ -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 γ -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- γ -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 (γ -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 (γ -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 γ -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 (γ -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 (γ -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- γ -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- γ -glutamate. *Microb Biotechnol*. 2013; 6(6):664-74.
- [7] Manocha B, Margaritis A. Production and characterization of γ -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- γ -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- γ -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- γ -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. γ -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- γ -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 γ -poly (glutamic acid) using ^{13}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- γ -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 γ -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 (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. Biosci Biotechnol Biochem. 1992; 56(7):1031-5.
- [23] Do JH, Chang HN, Lee SY. Efficient recovery of γ -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- γ -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 γ -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- γ -glutamic acid from high-viscosity

Production increasing of poly- γ -glutamic acid by batch and fed-batch cultures of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945^a and study of its physical and chemical structure

Mehrdad Ebrahimzadeh Kouchesfahani¹, Ali Bahrami^{*2}, Valiollah Babaeipour³

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- γ -glutamic acid (γ -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 γ -PGA is the high cost of its production. To reduce γ -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 γ -PGA of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945^a. Then, the γ -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 (γ -PGA precursor), γ -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 γ -PGA production were investigated and optimized. Finally, FTIR confirmed the chemical structure of poly gamma glutamic acid, and the study of γ -PGA morphological properties with SEM showed a nanostructure ideal for biological applications.

Keywords Submerged fermentation; Modified E culture medium; Pulse feeding strategy; Batch fermentation; γ -PGA