Archive of SID

بهینه‌سازی شرایط تولید APA ـ۶ به‌وسیله‌ی سلول E. coli ATCC۱۱۱۰۵ تثبیت شده در ژل کلسیم آلژینات

علی وزیری یزدی، مریم اوتادی*+، فاطمه سلطانی
تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی شیمی و بیوتکنولوژی

علی‌اکبر سیف کردی، آزاده خیرالعموم
تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

چکیده: سلول E. coli ATCC۱۱۱۰۵ حاوی آنزیم پنی سیلین G آسیلاز (PGA) در ژل کلسیم آلژینات تثبیت شده و از بیوکاتالیست حاصل برای انجام واکنش هیدرولیزنمک پتاسیم پنی‌سیلین G (Pen G) به ٦-آمینوپنی سیلانیک اسید (٦-APA) وفنیل استیک‌اسید (PAA)مورداستفاده قرار می‌گیرد. ٦-APA ماده واسطه کلیدی در تولید آنتی بیوتیک‌های نیمه سنتزی است که در صنایع دارویی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. عامل‌های متفاوتی بر سرعت انجام این واکنش آنزیمی دخالت دارند که از مهم‌ترین آنها غلظت سلول‌ها در هر گویه کلسیم آلژینات می‌باشد. این عامل و عامل‌های مؤثر دیگر مثل دما، pH، غلظت سوبسترا و غلظت آنزیم برای بیوکاتالیست تهیه شده بهینه شده‌است. در شرایط بهینه به‌دست آمده (۱۵۰ گویه کلسیم آلژینات حاوی سلول‌های تثبیت شده در ۵۰ml بافر pH۷/۵، ۱۰۰mM، Tris-HCl حاوی ۲ درصد سوبسترا در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد) میزان پایداری آنزیم تثبیت شده نیز در استفاده‌های مکرر بررسی شده است. بیوکاتالیست حاصل نتیجه‌های بهتری نسبت به موردهای مشابه تثبیت این سلول نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: تثبیت سلول، پنی سیلین G آسیلاز، آلژینات، ٦-آمینوپنی سیلانیک اسید.

KEY WORDS: *Cell immobilization, PGA, Alginate, 6-APA.*

مقدمه

آنزیم‌هایی که به‌عنوان بیوکاتالیست در فرایندهای متفاوت استفاده می‌شوند اغلب توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. به علت سختی و پر هزینه بودن حصول یک آنزیم ایزوله و بازیابی آن، از تثبیت آنزیم یا سلول محتوی آنزیم[1] استفاده می‌شود. برای دستیابی به مزایای آنزیم‌های تثبیت شده، تلاش‌های زیادی در سال‌های اخیر در جهت ارایه روش‌های متفاوت تثبیت انجام گرفته است. استفاده از روش‌های تثبیت، مرحله پرهزینه جداسازی و خالص‌سازی آنزیم را حذف می‌کند [۱-۴]. برای یک بیوکاتالیست ویژه امکان تثبیت آنزیم خالص‌سازی شده و تثبیت سلول حاوی آنزیم وجود دارد. هنگامی که تنها یک آنزیم در انجام یک واکنش شیمیایی دخیل باشد، و یا انجام واکنش آنزیمی در غیاب مواد بازدارنده و تخریب کننده اهمیت داشته باشد، از تثبیت آنزیم ایزوله و خالص‌سازی شده استفاده می‌شود. در غیر این صورت استفاده از تثبیت سلول به‌دلیل راحتی تهیه سلول، حذف عملیات پرهزینه و

www.SID.ir

Archive of SID

*شکیل خالصی‌سازی آنزیم، امکان تکثیر سلول در پایه تثبیت، حداقل دناتـوره شدن آنزیم به‌علت قرار داشتن در محیط طبیعی و حفاظت آنزیم به‌وسیله‌ی غشای سلول از نیروهای برشی به مراتب راحت‌تر و به صرفه تر است [۵–۷]. در تثبیت سلول حاوی آنزیم مزیت امکان انجام واکنش‌های چند مرحله‌ای کاتالیز شونده به‌وسیله‌ی یک آنزیم و واکنش‌هایی که نیاز به کوفاکتور دارند نیز وجود دارد [۵]. از طرفی تولید فراورده‌های ناخواسته و وارد شدن برخی پروتئین‌ها و سایر متابولیت‌های سلولی از معایب تثبیت سلول نسبت به آنزیم است [۳].

در تثبیت سلول‌ها، پلیمر مورد استفاده باید غیرسمی باشد و پلیمرهای طبیعی از این نظر مناسب‌ترند. افزون بر آن طبیعی بودن منبع تهیه این پلیمرها، امکان دستیابی به آنها را راحت‌تر می‌کند. ضعف پلیمرهای طبیعی در فرایند تثبیت، محدودیت امکان تغییر ویژگی‌های آنها در گستره وسیع است [۵ و ۸]. یکی از مهم‌ترین پلیمرهای طبیعی که در تثبیت سلول و آنزیم کاربرد بسیاری دارد آلژینات است. مزیت عمـده آلژینات نسبت بـه سایـر پلیمرهای طبیعی، سهولت ژل شدن آن در دمای معمولی است که آن‌را برای تثبیت سلول‌های حساس به دما مناسب می‌کند [۸]. افزون بر این، روش تثبیت سلول در آلژینات یک روش ساده و آسان و بدون اثرهای جانبی برای سلول است. تحقیقات متعددی در جهت تثبیت سلول‌ها و آنزیم‌های متفاوت در ژل آلژینات انجام گرفته و این تحقیقات در زمینه بهینه‌سازی شرایط واکنش‌های آنزیمی همچنان ادامه دارد.

آسیل‌دار کردن پنی‌سیلین G توسط آنزیم PGA از واکنش‌های مهم آنزیمی برای تهیه ۶-APA (ماده واسطه کلیـدی در تولیـد آنتی‌بیوتیک‌های نیمه سنتزی مانند آمپی‌سیلین و آموکسی سیلین) است. سلول E. coli قادر به تولید این آنزیم در دیواره سلولی خود است، و با توجه به اهمیت این آنزیم، تلاش‌های زیادی در جهت تثبیت آنزیم و سلول تولید کننده آن در پلیمرهای متفاوت انجام شده است. *Hsiau* و *همکاران* گونه مشابهی را در ژل پلی اکریل آمید تثبیت کردند. مقاومت مکانیکی بالا و خنثی بودن نسبت به حمله‌های میکروبی، استفاده از پلیمرهای سنتزی را توجیه می‌کند [۵]. *Babu* و *Panda* سلول‌های E.coli را به‌وسیله‌ی گلوتارآلدهید و سیانوژن کلرید تثبیت کردند [۳]. سمیت این مواد استفاده از آنها را محدود می‌کند ولی گلوتارآلدهید بیشتر همراه با روش‌های تثبیت برای کاهش نشت سلول به‌کار می‌رود [۶]. *Wang* و *همکاران* گونه دیگری از سلول E.coli را به روش جذب سطحی

*E-mail:mm-otady@yahoo.com+

(۱) Whole-cell enzyme

تثبیت کردند [۷]. اشکال عمده این روش نشت سلول از حامل است. *Castillo* و *همکاران* این سلول را در ژلاتین تثبیت کردند و مشاهده کردند که ساختار ژلاتین مقاومت انتقال جرم را به‌شدت افزایش می‌دهد [۹].

در این تحقیق، گونه E. coli ATCC ۱۱۱۰۵ حاوی آنزیم PGA در دیواره سلولی را در ژل کلسیم آلژینات به روش پلیمریزه شدن در سطح مشترک تثبیت کرده ایم. مزایای پلیمر طبیعی آلژینات و سادگی روش تثبیت مورد استفاده، کمترین اثر جانبی را بر سلول تثبیت شده و آنزیم داخل آن خواهد داشت. با استفاده از این بیوکاتالیست تثبیت شده، واکنش آسیل‌دار کردن پنی سیلین G برای تولید انجام شده و با بهینه سازی شرایط واکنش مانند دمـا، pH، غلظت سعی در بالا بـردن بازده واکنش شـده است. نتیجه‌های به‌دست آمده تولید میزان بیشتری از ۶-APA را نسبت به تحقیقات پیشین نشان می‌دهند و این نشان می‌دهد که تثبیت سلول حاوی آنزیم PGA روش خوبی برای کاهش هزینه تولید ۶-APA است.

مواد و روش‌ها

گونه‌ی E. coli ATCC ۱۱۱۰۵ از شرکت DMSZ (آلمان) تهیه شده است. همچنین نمک پتاسیم پنی سیلین G از شرکت آنتی بیوتیک‌سازی ایران تهیه شده و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های Sigma و Merck خریداری شده است.

سوسپانسیون سلولی

گونه‌ی E. coli ATCC۱۱۱۰۵ در محیط کشت Nutrient broth با ۲۵–۱۵ درصد گلیسیرول در دمای ۷۰– درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شود. سلول در زمان استفاده از این محیط روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شده و سپس سلول رشد کرده به محیط پیش کشت با ترکیب ۲/۵ درصد yeast extract که pH آن به‌وسیله‌ی سود M ۰/۱ روی ۷/۰ تنظیم شده است، تلقیح شده و ۲۴ ساعت روی شیکر (۲۲۰rpm) قرار می‌دهیم. سلول رشد کرده در این محیط را به‌نسبت ۱۰ درصد (v/v) به محیط کشت اصلی با ترکیب ۱ گرم بر لیتر NH_4Cl، ۰/۵ گرم بر لیتر yeast extract، ۲ گرم بر لیتر PAA، ۰/۳ گرم بر لیتر $MgSO_4$، ۰/۱ گرم بر لیتر K_2HPO_4 که pH آن به‌وسیله‌ی سود روی ۷/۰ تنظیم شده است، اضافه شده

www.SID.ir

Archive of SID

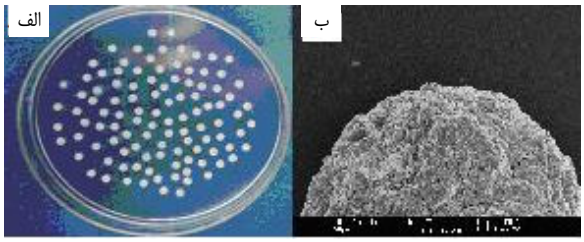
و دوباره آن‌را ۲۴ ساعت روی شیکر(۲۲۰ rpm) قرار می‌دهیم. در این شرایط سلول ذکر شده حداکثر تولید آنزیم PGA را دارد [۱۰]. رشد کرده در بافر فسفات ۱۰۰mM ،pH ۸/۰ معلق کرده و تا قبل از تثبیت در دمای ۰ تا ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شوند.

تثبیت سلول‌ها

روش استفاده شده برای تثبیت سلول‌های رشد داده شده در ژل کلسیم آلژینات بر اساس روش ارایه شده توسط *J. E. Faster* و *G. F. Bickerstaff* است [۶]. اساس روش افزودن محلول سدیم آلژینات حاوی تعلیق سلولی به محلول حاوی یون کلسیم می‌باشد که در طی آن پلیمریزه شدن در سطح مشترک سریع انجام شده و گویه‌های کلسیم آلژینات تشکیل می‌شوند. پس از آن یون‌های کلسیم در گویه‌های تشکیل شده نفوذ کرده و باعث تشکیل ژل در درون گویه‌ها می شوند. ژل حاصل از نظر بیوشیمیایی خنثی بوده و پایداری مکانیکی خوبی دارد.

محلول سدیم آلژینات با افزودن میزان ۴ درصد (w/v) از پودر سدیم آلژینات در بافر ۷/۵ pH، ۱۰۰ mM، Tris-HCl تهیه می‌شود. بافرهای قوی مانند بافر فسفات و سیترات، به‌دلیل تشکیل کمپلکس با یون‌های کلسیم و حل کردن گویه ها برای کار با آلژینات‌ها مناسب نیستند. محلول سدیم‌آلژینات تهیه شده به آرامی و به مدت حداقل ۲ ساعت به‌وسیله‌ی همزن مغناطیسی همزده می‌شود تا به‌طور کامل یکنواخت شده و حباب‌های هوا نیز خارج شوند. این محلول استریل شده و برای تثبیت سلول، با نسبت‌های معین با تعلیق سلولی تهیه شده ترکیب شده و به‌وسیله‌ی همزن مغناطیسی به‌طور کامل یکنواخت می‌شود. سپس این مخلوط به‌وسیله‌ی سرنگ استریل به داخل محلول کلسیم کلراید ۰/۱۵ M استریل که به‌وسیله‌ی همزن مغناطیسی به آرامی همزده می‌شود، چکانده می‌شود. فاصله سر سرنگ تا سطح محلول کلسیم کلرید در همه موارد ثابت و حدود ۱۰ سانتی‌متر است. در این حالت سلول‌ها در داخل گویه‌های تشکیل شده محبوس می‌شوند. گویه‌های تشکیل شده به مدت یک ساعت در این محلول باقی می‌مانند تا پایدار شوند. پس از آن گویه ها از محلول جدا شده و به‌وسیله‌ی محلول (Salin) ۰/۹ درصد NaCl و بافر ۷/۵ pH، ۱۰۰ mM، Tris-HCl برای حذف سلول‌های تثبیت نشده، شستشو داده می‌شوند. همه این عملیات برای حفظ شرایط سلول، زیر هود استریل انجام می‌شود. گویه‌های آماده شده تا زمان استفاده در محیط واکنش در بافر و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شوند.

سلول‌ها پس از رشد به‌وسیله‌ی سانتریفوژ (۴۰ دقیقه، ۰ تا ۴ درجه سانتی‌گراد، ۶۰۰۰ گرم) از محیط کشت جدا شده و سلول‌های شکل ۱ گویچه‌های تثبیت سلول E. coli درون گویه‌های کلسیم آلژینات را نشان می‌دهد. در قسمت ب، تخلخل بالای سطح

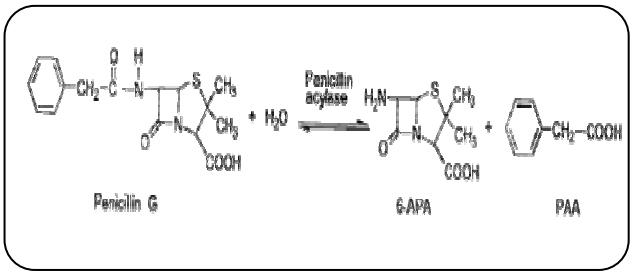


شکل ۱ـ الف ـ گویه های کلسیم آلژینات حاوی سلول E. coli تثبیت شده و ب ـ الکترون میکروسکوپی از سطح یک گویه کلسیم آلژینات حاوی سلول تثبیت شده.

گویه‌های کلسیم آلژینات، تسهیل کننده نفوذ سوبسترا و فراورده از جداره گویه هاست.

آبکافت پنی سیلین G

آنزیم PGA طبق واکنش زیر، آبکافت نمک پتاسیم پنی سیلین G را به فراورده‌های 6-APA و PAA کاتالیز می‌کند.



روش‌های اندازه گیری فعالیت آنزیم بر پایه تعیین میزان یکی از این فراورده‌ها است. واکنش در مجاورت آنزیم PGA (به‌صورت گویه‌های کلسیم آلژینات حاوی سلول‌های E. coli تثبیت شده) در راکتور Stirred با حجم ۵۰ میلی‌لیتر بافر ۱۰۰ mM، Tris-HCl و غلظت معین سوبسترا و به‌صورت Batch انجام می‌شود.

میزان فعالیت آنزیم با اندازه گیری میزان فراورده‌ی تولید شده با استفاده از دو روش *p*H-stat و *Balasingham* قابل تعیین است. در روش *p*H-stat میزان PAA تولید شده، با استفاده از میزان

www.SID.ir

Archive of SID

بازی که برای ثابت نگه‌داشتن pH محلول نیاز است، تعیین می‌شود [۵]. در روش *Balasingham* معرف پارادیمتیل آمینو بنزآلدهید با گروه‌های آمینواسید موجود در ۶-APA تشکیل

می‌شود. در بهینه سازی هر پارامتر، سایر شرایط ثابت نگه‌داشته شده و واکنش آبکافت با مقدارهای متفاوت پارامتر بهینه شونده انجام می‌شود. میزان تولید فراورده در هر آزمایش اندازه گیری شده و بهترین مقدار یک پارامتر از روی حداکثر تولید فراورده تعیین می‌شود. فعالیت آنزیم PGA به‌صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای تولید یک میکرومول ۶-APA در دقیقه تعریف می‌شود. درصد تبدیل سوبسترا (Conversion) به صورت تعداد مول‌های ۶-APA تولید شده نسبت به تعداد مول‌های اولیه سوبسترا تعریف می‌شود.

نتیجه‌ها و بحث

تولید آنزیم PGA توسط سلول E. coli بعد از ۲۴ ساعت به حداکثر می‌رسد. هم‌زمان با افزایش تولید آنزیم، pH محیط نیز بالا می‌رود تا حداکثر به ۷٫۸۵ می‌رسد. سلول‌های حاوی آنزیم به‌وسیله‌ی سانتریفوژ جدا سازی شده و در بافر فسفات ۷٫۸ pH، ۱۰۰mM نگه‌داری می‌شوند تا فعالیت آنزیم درون آنها کاهش پیدا نکند. تعلیق سلولی حاصل تا مدت ده روز فعالیت خود را تا میزان ۹۰ درصد برای انجام واکنش بالاحفظ می‌کند.

مقایسه دو روش اندازه گیری فعالیت آنزیم

فعالیت آنزیم PGA را می‌توان به دو روش pH-stat و *Balasingham* اندازه‌گیری کرد. واکنش آبکافت پنی‌سیلین G حساسیت زیادی به pH محیط دارد و از آنجایی که در روش pH-stat برای اندازه گیری فراورده در تمام مدت واکنش pH ثابت نگه‌داشته می‌شود، بنابراین، این روش فعالیت آنزیم را کمی بالاتر نشان خواهد داد. افزون بر این در روش *Balasingham*، نمونه گیری‌های متعدد در زمان‌های متفاوت حجم محلول واکنش را کاهش داده و در نتیجه‌ها خطا ایجاد می‌کند. آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق به روش pH-stat اندازه‌گیری شده است و برخی از آزمایش‌ها به روش *Balasingham* نیز برای اطمینان، دوباره انجام شده اند. در هر دو روش نتیجه‌های مشابهی با تفاوت به تقریبا ۳ درصد به‌دست آمده است.

کمپلکس زرد رنگی می‌دهد که با اندازه گیری آن میزان فراورده تعیین می‌شود [۱۱].

به منظور حداکثر ساختن تولید فراورده، شرایط واکنش مثل دما، pH، تعداد گویه‌ها، غلظت سوبسترا و غلظت ژل بهینه

بهترین نسبت تعلیق سلولی به محلول سدیم آلژینات

استفاده از مقدارهای متفاوت محلول سدیم آلژینات و تعلیق سلولی برای تهیه گویه های تثبیت سلول به روش گفته شده، باعث تغییر در غلظت آنزیم موجود در گویه ها می‌شود. با استفاده از این گویه ها واکنش آبکافت انجام می‌شود. نتیجه‌های به‌دست آمده در شکل ۲ نشان داده شده اند. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، با افزایش نسبت تعلیق سلولی به محلول سدیم آلژینات تا ۰٫۷۵ میزان تولید فراورده افزایش پیدا می‌کند. افزایش میزان سلول درون هر گویه باعث افزایش میزان آنزیم در یک حجم معین شده و در نتیجه میزان فعالیت هر گویه افزایش می‌یابد. با افزایش بیشتر این نسبت، تولید فراورده کاهش پیدا می‌کند. این کاهش به این دلیل است که با افزایش تعداد سلول‌ها در هر گویه، ممانعت انتقال جرم سوبسترا برای رسیدن به قسمت‌های مرکزی گویه‌ها بیشتر می‌شود. و تعداد زیاد سلول‌ها باعث پر شدن حفره‌های پلیمر برای عبور سوبسترا می‌باشد. در این حالت تنها سلول‌هایی که در نزدیکی دیواره خارجی گویه‌ها قرار دارند در واکنش آبکافت شرکت می‌کنند و در نتیجه بازده واکنش کاهش می‌یابد. بنابراین، بهترین نسبت تعلیق سلولی به محلول آلژینات ۰٫۷۵ تعیین می‌شود.

اثر pH

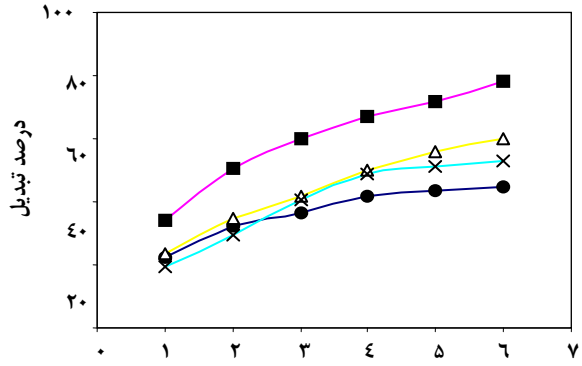
تغییرهای pH اثرهای قابل توجهی در سرعت واکنش‌های آنزیمی و فعالیت آنزیم دارد. به‌طور کلی هر آنزیمی فقط در یک گستره pH ویژه بهترین عملکرد را از خود نشان می‌دهد. بنابراین، یکی از مهم‌ترین پارامترهایی که باید در واکنش‌های آنزیمی بهینه شود، pH محیط واکنش است. در واکنش آبکافت پنی سیلین G، محصول اسیدی PAA و دپروتونه شدن آن، که باعث کاهش pH محیط واکنش می‌شود، اهمیت بررسی pH را افزایش می‌دهد.

برای بهینه‌سازی pH در یک سری آزمایش با شرایط یکسان و pH های متفاوت واکنش آبکافت را انجام داده ایم. همان‌طور که نتیجه‌ها در شکل ۳ نشان می‌دهند، بالاترین درصد تبدیل در pH ۷٫۵ حاصل شده است. افزایش یا کاهش pH از این مقدار باعث کاهش در بازده واکنش و درصد تبدیل سوبسترا می‌شود. در

www.SID.ir

Archive of SID

مورد آنزیم آزاد pH بهینه ۷/۰ تعیین شده است [۱۰] و تثبیت کردن آنزیم در یک غشای پلیمری باعث جابه‌جایی کوچکی در pH بهینه می‌شود. این جابه‌جایی ظاهری به‌علت تداخل گروه‌های باردار پلیمر مورد استفاده برای تثبیت و یون‌های هیدروژن موجود



شکل ۲ـ اثر نسبت تعلیق سلولی به محلول سدیم آلژینات بر واکنش آبکافت پنی‌سیلین G. واکنش در pH ۷/۵ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با تعداد ۱۵۰ گویه تثبیت سلولی و غلظت سوبسترای ۲ درصد انجام شده است و نسبت تعلیق سلولی به محلول آلژینات سدیم (x) ۱/۲۵، (Δ) ۱/۰ ، (■) ۰/۷۵ ، (●) ۰/۵ می‌باشد.

آنزیم را نسبت به تغییرهای احتمالی pH محلول واکنش پایدارتر می‌کند و این مسأله اهمیت استفاده از سیستم های تثبیت را به وضوح نشان می‌دهد [۱۱].

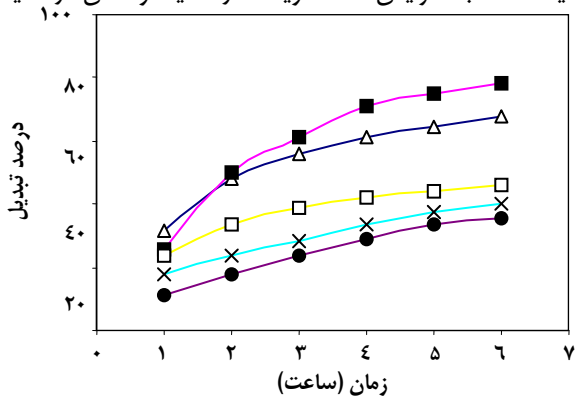
اثر غلظت سوبسترا

غلظت‌های بالای سوبسترای پنی‌سیلین G برای آنزیم PGA دارای خاصیت بازدارندگی است، بنابراین افزایش بیش از حد غلظت سوبسترا در واکنش آبکافت، باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود [۲ و ۱۰]. نتیجه‌های حاصل از آزمایش‌های هیدرولیز پنی‌سیلین G در مجاورت آنزیم تثبیت شده با استفاده از غلظت‌های متفاوت سوبسترا از ۸–۱ درصد در شکل ۴ نشان داده شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش غلظت Pen G تا ۲ درصد میزان بازده واکنش و درصد تبدیل افزایش نشان می‌دهد. افزایش غلظت سوبسترا بیش از ۲ درصد به علت بازدارندگی غلظت سوبسترا برای آنزیم، باعث کاهش درصد تبدیل شده و بنابراین، غلظت سوبسترای ۲ درصد به‌عنوان بهترین غلظت در شرایط موجود تعیین می‌شود. این نتیجه گیری برای میزان آنزیم در محلول سوبسترا است. اگر ماتریس مورد استفاده از نظر الکتریکی خنثی باشد ممکن است هیچ جابه‌جایی در pH بهینه عملکرد آنزیم مشاهده نشود. جابه‌جایی pH بهینه برای عملکرد آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد، تاثیر زیادی بر فعالیت آنزیم ندارد و در عوض موجود در محیط واکنش است و با تغییر غلظت آنزیم ممکن است غلظت سوبسترای بهینه تغییر کند. بنابراین، برای غلظت بهینه آنزیمی تعیین شده، غلظت بهینه سوبسترا ۲ درصد خواهد بود.

اثر تعداد گویه ها

تعداد گویه‌ها در محیط واکنش نشان دهنده غلظت آنزیم در محیط است. با افزایش تعداد گویه‌ها در محیط واکنش در حقیقت



شکل ۳ـ اثر pH بافر در محلول واکنش بر آبکافت پنی سیلین G. واکنش در نسبت تعلیق سلولی به محلول سدیم آلژینات ۰/۷۵ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با تعداد ۱۵۰ گویه تثبیت سلولی و غلظت سوبسترای ۲ درصد انجام شده است و pH محلول بافر (Δ) ۷/۰ ، (■) ۷/۵ ، (□) ۸/۰ ، (x) ۸/۵ ، (●) ۹/۰ است.

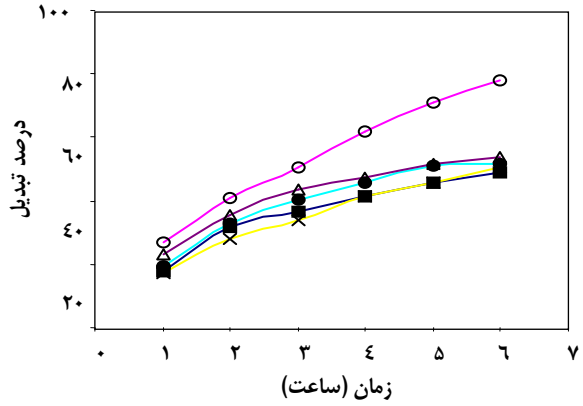
غلظت آنزیم در محیط افزایش می‌یابد. نتیجه‌های حاصل از بهینه سازی تعداد گویه ها در ۵۰ میلی‌لیتر محیط واکنش در شکل ۵ نشان داده شده است. واضح است که بالاترین درصد تبدیل درتعداد ۱۵۰ گویه حاصل می‌شود.

در واکنش آبکافت Pen G هر دو فراورده‌ی تولید شده دارای خاصیت بازدارندگی نسبت به آنزیم PGA دارند. بنابراین افزایش دادن غلظت آنزیم، در ابتدای واکنش باعث تولید و تجمع فراورده‌ها شده و بازدارندگی ایجاد شده باعث کاهش چشم‌گیر سرعت واکنش و در نتیجه درصد تبدیل نهایی سوبسترا خواهد شد. از سوی دیگر، افزایش تعداد گویه ها در غلظت ثابت سوبسترا باعث

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش غلظت سوبسترای موجود برای هر آنزیم خواهد شد و این مسأله نیز باعث کاهش درصد تبدیل می‌شود. بنابراین، به دلیل این‌که غلظت سوبسترا و آنزیم اثر مستقیم روی مقدارهای بهینه هم دارند، مقدارهای بهینه تعیین شده برای شرایط موجود است و با تغییر یکی از شرایط باید مقدار بهینه دیگری نیز دوباره تعیین شود. در نهایت تعداد ۱۵۰ گویه در محیط واکنش تعریف شده، بهترین غلظت آنزیم را به‌دست می‌دهد و به‌عنوان غلظت بهینه



شکل ۴ـ اثر غلظت سوبسترا بر درصد تبدیل پنی سیلین G در واکنش آبکافت. واکنش در نسبت تعلیق سلولی به محلول سدیم آلژینات ۰/۷۵ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با تعداد ۱۵۰ گویه تثبیت سلولی و pH ۷/۵ انجام شده است و غلظت سوبسترا در محلول واکنش (■) ۱ درصد ، (○) ۲ درصد، (x) ۴ درصد، (●) ۶ درصد، (Δ) ۸ درصد است.

بازده واکنش و درصد تبدیل سوبسترا می‌شود، بر فعالیت آنزیم نیز اثر دارد. از طرفی آنزیم‌ها در دماهای بسیار بالا ناپایدار هستند و اگر مدت زیادی در دمای بالا قرار بگیرند دناتوره شده و فعالیت خود را از دست می‌دهند. بنابراین، لازم است که دمای بهینه با در نظر گرفتن هر دو عامل تعیین شود.

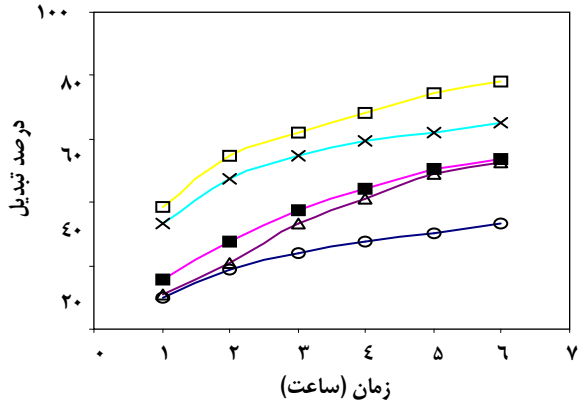
شکل ۶ نتیجه‌های آزمون‌های انجام شده برای تعیین دمای بهینه را نشان می‌دهد. دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بالاترین درصد تبدیل سوبسترا را در شرایط یکسان نشان می‌دهد، ولی با توجه به این‌که استفاده مکرر آنزیم تثبیت شده از هدف‌های اصلی تثبیت آنزیم است، و دمای بهینه این آنزیم در حالت آزاد ۳۷ درجه سانتی‌گراد گزارش شده است [۱۰] و آنزیم تثبیت شده نیز در این دما فعالیت خوبی نشان می‌دهد. بنابراین، در دو دمای ۴۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد پایداری آنزیم در استفاده‌های مکرر اندازه گیری شده و دمای بهینه آنزیم تعیین می‌شود.

آنزیم تعریف می‌شود. در این شرایط غلظت بهینه سوبسترا ۲ درصد خواهد بود.

اثر دما

به‌طور کلی دما اثر افزایش دهنده زیادی بر سرعت واکنش‌های آنزیمی با تغییر سینتیک واکنش و کاهش مقاومت انتقال جرم دارد. بالا بردن دما افزون بر افزایش سرعت که باعث افزایش

شکل ۷ نتیجه‌های حاصل از استفاده مکرر آنزیم تثبیت شده را در دو دما نشان می‌دهد. هر Batch واکنش در شرایط بهینه (تعداد ۱۵۰ گویه در ml ۱۵۰ محلول سوبسترای ۲ درصد) انجام می‌شود. پس از انجام هر بار واکنش، گویه های حاوی سلول تثبیت شده جمع آوری شده و در محلول $0/15M\ CaCl_2$ تا قبل از استفاده مجدد نگه‌داری می‌شوند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، آنزیم تثبیت شده در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد افزون بر فعالیت بالاتر، پایداری بیشتری نیز نشان می‌دهد. سلول‌های تثبیت شده در این دما تا Batch ۲۵ مکرر، تا حدود ۹۰ درصد



شکل ۵ ـ اثر تعداد گویه‌های تثبیت سلولی در درصد تبدیل واکنش آبکافت پنی سیلین G. واکنش در نسبت تعلیق سلولی به محلول سدیم آلژینات ۰/۷۵ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۵ و غلظت سوبسترای ۲ درصد انجام شده است و تعداد گویه ها (○) ۵۰ ، (■) ۱۰۰ ، (□) ۱۵۰ ، (x) ۲۰۰ ، (Δ) ۲۵۰ است.

فعالیت اولیه خود را حفظ می‌کنند. بنابراین، دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه تعیین شده است.

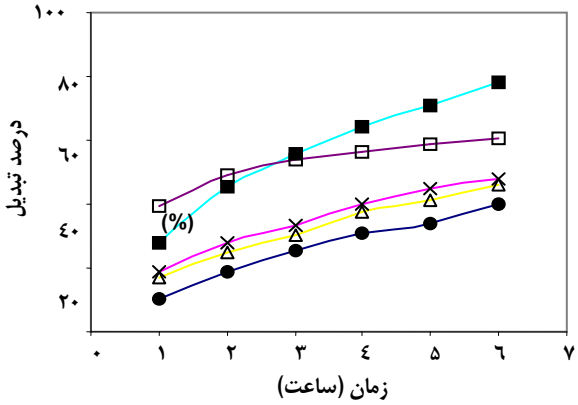
نتیجه‌گیری نهایی

www.SID.ir

Archive of SID

سلول E. coli یکی از مهم‌ترین منابع تولید کننده آنزیم PGA است. این آنزیم کاربرد زیادی در صنایع داروسازی به‌عنوان بیوکاتالیست برای تولید ۶-APA که ماده اولیه برای تولید آنتی بیوتیک‌های نیمه سنتزی است، دارد. تثبیت کردن این آنزیم به صورت آنزیم آزاد و یا سلول حاوی آنزیم، و استفاده مکرر از آن در تولید ۶-APA با توجه به هزینه بسیار زیاد جداسازی و خالص سازی آنزیم، می‌تواند از نظر اقتصادی برای صنایع مربوط دارای اهمیت بسیاری باشد.

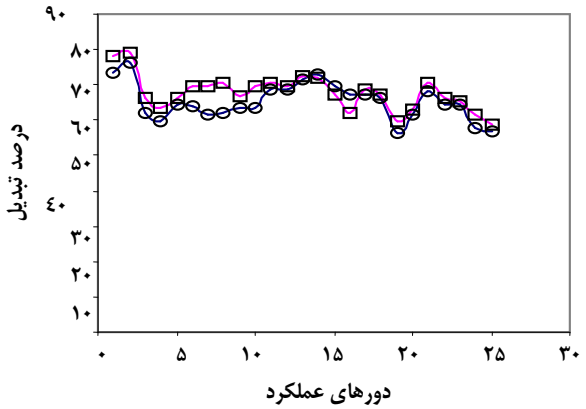
محققان بسیاری در این زمینه تلاش کرده اند و آنزیم و یا سلول حاوی آنزیم این واکنش را در حامل‌های متفاوتی مانند پلیمرهای طبیعی و سنتزی تثبیت کرده‌اند. با توجه به اهمیت زیاد



شکل ۶ـ اثر دما بر درصد تبدیل سوبسترا در واکنش آبکافت پنی‌سیلین G. واکنش در نسبت تعلیق سلولی به محلول آلژینات سدیم ۰/۷۵ و pH ۷/۵ ، با تعداد ۱۵۰ گویه تثبیت سلولی و غلظت سوبسترای ۲ درصد انجام شده است و دمای انجام واکنش (●) ۳۰ ، (Δ) ۳۵ ، (x) ۴۰ ، (■) ۴۵ ، (□) ۵۰ ، بر حسب درجه سانتی‌گراد است.

پس از بهینه سازی شرایط انجام واکنش برای تولید فراورده، می‌توان دریافت که نتیجه‌های به‌دست آمده در این تحقیق نسبت به موردهای مشابه تثبیت همین سلول بازده بیشتری نشان داده است [۵]. بنابراین استفاده از این شرایط می‌تواند در زمان یکسان تولید فراورده‌ی ۶-APA بیشتری کند.

شرایط بهینه تعیین شده برای تثبیت آنزیمِ داخل سلول با شرایطی که برای آنزیم آزاد تعریف شده است تفاوت اندکی دارد. دلیل این مسأله وجود ژل پلیمری در اطراف سلول و افزایش مقاومت انتقال جرم برای عبور سوبسترا و فراورده‌ها و افزایش مقاومت آنزیم به دماست. این مسأله باعث افزایش کمی در زمان



شکل ۷ـ سنجش پایداری گویه های تثبیت سلولی در استفاده های مکرر. واکنش در نسبت تعلیق سلولی به محلول سدیم آلژینات ۰/۷۵ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۵ با تعداد ۱۵۰ گویه تثبیت سلولی و غلظت سوبسترای ۲ درصد انجام شده است.

واکنش می‌شود ولی در نهایت درصد تبدیل قابل قبولی از سوبسترا را خواهیم داشت. در شرایط بهینه تعیین شده سلول تثبیت شده در استفاده های مکرر پایداری خوبی نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

www.SID.ir

Archive of SID

نویسندگان مقاله از شرکت آنتی بیوتیک‌سازی ایران برای تهیه پنی‌سیلین G و از جناب آقای دکتر حمیدرضا زمانی‌زاده ریاست محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران به‌خاطر همکاری و پشتیبانی ایشان تشکر می‌نمایند.

تاریخ دریافت: ۸۳/ ۲/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٤/ ۱۰/۵

مراجع

[1] Erarslan, A., Guray, A., *J.Chem. Tech. Biotechnol.,* **51**, 181 (1991).

[2] Hegde, M. M., Thadani, S. B., Singh, U., Naik, S. R., *Hind. Antibiot. Bull.,* **39**, 1 (1997).

[3] Babu, P. S. R., Panda, T., *Enzyme. Microb. Technol.,* **13,** 676 (1991).

[4] Castillo, E., Rodriguez, M., Casas, L., Quintero, R., Lopez-Munguia, A., *Enzyme Microb. Technol.,* **13,** 127 (1991).

[5] Hsiau, L.T., Lee, W.C., Wang, F.S., *App. Biochem. Biotech.,* **62,** 303 (1997).

[6] Bickerstaff, G. F., "Immobilization of Enzymes & Cells", Chapter 1, University of Paisley, Scotland, UK., pp. 1-10 (1997).

[7] Wang, A. A., Mulchandani, A., Chen, W., *Biotechnol. Prog.,* **17,** 407 (2001).

[8] Thu, B., Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., "Immobilized Cells: Basics and Applications", Department of Biotechnology, University of Trondheim, Norway, p.p.19-29, (1996).

[9] Prabhune, A. A., Rao, B. S., Pundle, A. V., Siva Raman, H., *Enzyme. Microb. Technol.,* **14**, 161 (1992).

[10] Kheirolomoom, A., Arjmand, M., Fazelinia, H., Zakeri, A., *Biochem. Eng. J.,* **8,** 223 (2001).

[11] Arroyo, M., Torres-Bacete, J., Torres-Guzman, R., Mata, I., Castillon, M. P., Acebal, C., *Biotechnol. Appl. Biochem.,* **32**, 173 (2000).

www.SID.ir