

مدلسازی و تعیین پارامترهای سینتیکی تولید بتاگالاکتوزیداز توسط *Bacillus licheniformis* در تخمیر ناپیوسته

سیده الهه موسوی فر^۱، معصومه انوری^۲، غلام خیاطی^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه گیلان

۲- دانشیار گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

۳- دانشیار گروه مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشکده فنی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۶)

چکیده

آنزیم بتاگالاکتوزیداز یکی از مهمترین آنزیم‌های پرکاربرد در سه حوزه ی سلامتی، صنایع غذایی و محیط زیست است، لذا مدلسازی سینتیک تولید این آنزیم می‌تواند در بهینه سازی فرآیند تولید صنعتی آن نقش بسزایی داشته باشد. در این تحقیق ابتدا سینتیک تولید بتاگالاکتوزیداز توسط تخمیر ناپیوسته باکتری *Bacillus licheniformis* در مدت زمان ۲۲ ساعت در محدوده غلظت‌های اولیه ی ۵۰-۲۰ گرم برلیتر از لاکتوز به عنوان گوهرمایه محدود کننده رشد، در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفت. سپس ضمن مشاهده ممانعت کنندگی در بالاترین غلظت این بازه، مدل‌های سینتیکی Logistic و Haldane برای مدلسازی و تعیین پارامترهای سینتیکی تخمیر انتخاب شدند. این مدل‌ها تقریب خوبی از نتایج آزمایشگاهی مصرف گوهرمایه در تمامی فازها و داده‌های رشد میکروبی در فاز رشد نمائی و فاز سکون حاصل کردند، اما در فاز رشد کاهش یافته انحرافات جزئی از داده های آزمایشگاهی مشاهده شد. همچنین نتایج به دست آمده برای فعالیت آنزیمی بتاگالاکتوزیداز نیز انطباق خوبی با داده‌های آزمایشگاهی داشتند و بیشترین انحراف در این داده ها همزمان با اتمام فاز نمائی و شروع فاز کاهش یافته رشد میکروبی (ساعت چهارم از شروع تلقیح) در غلظت‌های اولیه ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر از گوهرمایه مشاهده شد. رگرسیون خطی بین داده های آزمایشگاهی و نتایج به دست آمده از مدل‌ها در تمام غلظت‌های اولیه لاکتوز و برای هر سه متغیر غلظت توده زیستی، غلظت گوهرمایه و فعالیت آنزیمی، بالاتر از ۰/۹۵ به دست آمد.

کلید واژگان: بتاگالاکتوزیداز، تخمیر ناپیوسته، *Bacillus licheniformis*، مدلسازی سینتیکی.

* مسئول مکاتبات: khayati@guilan.ac.ir

۱- مقدمه

آنزیم می باشند، تا کنون مطالعاتی درخصوص مدلسازی و تعیین پارامترهای سینتیکی تولید این آنزیم توسط گونه باکتریای *Bacillus licheniformis* انجام نشده است.

عوامل اقتصادی همواره نقش اصلی را در تولید صنعتی محصولات ایفا می کنند به همین علت پیش از این مطالعات زیادی در ارتباط با انتخاب میکرو ارگانیسم مناسب، گوهر مایه در دسترس و در عین حال ارزان، بهبود شرایط کشت آنزیم‌های گوناگون [۵ و ۹-۱۰] صورت گرفته است. اما مطالعات زیادی در زمینه مدلسازی و تعیین پارامترهای سینتیکی تولید بتاگالاکتوزیداز انجام نشده است [۱۱]. اگرچه تولید صنعتی آنزیم‌ها نیازمند در نظر گرفتن عوامل مهم دیگری چون تغییر مقیاس آزمایشگاهی به صنعتی و هزینه‌های تولید نیز هست اما دستیابی به یک دید اولیه از روند فعالیت‌های آزمایشگاهی به کمک مدلسازی می‌تواند مبنایی برای آغاز یک عملیات صنعتی باشد. در این مطالعه هدف، تعیین قابلیت اجرای یک سیستم ناپیوسته تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز از طریق بررسی پارامترهای سینتیکی تخمیر هوازی *Bacillus licheniformis* به کمک نرم افزار مدلسازی است. به همین منظور مدل‌های غیر ساختاری Logistic و Haldane برای توصیف داده‌های آزمایشگاهی در کشت غوطه ور انتخاب شدند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میکروارگانیسم و محیط کشت

در این مطالعه از باکتری *Bacillus licheniformis* جداسازی شده از خاک‌های منطقه گیلان جهت تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز استفاده شد. به منظور تهیه مایه تلقیح از پیش کشت *nutrient broth* تقویت شده با (درصد وزنی به حجمی) ۱٪ گلوکز و ۰/۵٪ عصاره مخمر استفاده گردید. فرآیند تخمیر ناپیوسته با افزودن حجم مشخصی از پیش کشت به محیط کشت منبع کربنی حاوی ۵ g/l عصاره مخمر، ۱ g/l پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۳ g/l سولفات آمونیوم، ۳ g/l دی پتاسیم هیدروژن فسفات و ۵ g/l پپتون و قند لاکتوز به‌مراه گلوکز آغاز گردید. جهت بررسی اثر غلظت گوهرمایه بر فرآیند تولید توده زیستی و آنزیم از غلظت‌های قند ۲۰،

هیدرولازها به لحاظ کاربرد صنعتی از جمله مهمترین آنزیم‌ها هستند و در بین آنها بتا گالاکتوزیداز یا لاکتاز (EC 3.2.1.32) هیدرولیز لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز نقش مهمی را در صنایع غذایی و داروسازی ایفا می‌کند [۱-۲]. لاکتوز قند اصلی شیر، حلالیت و قدرت شیرین کنندگی کمی دارد. بتا گالاکتوزیداز با هیدرولیز لاکتوز به گلوکز و گالاکتوز درصد شیرینی محصولات را افزایش و از کریستالیزاسیون لاکتوز در محصولات منجمد و تغلیظ شده مانند بستنی و شیر تغلیظ شده جلوگیری می‌کند [۳-۴]. دفع نامناسب پساب کارخانه‌های تولیدکننده فرآورده‌های لبنی بویژه صنایع پنیرسازی، بتاگالاکتوزیداز را از دیدگاه زیست محیطی پر اهمیت نشان می‌دهد [۵]. لذا استفاده از سویه‌های میکروبی مناسب به منظور به کارگیری بهینه این منبع ارزان در جهت تولید انواع فرآورده‌های بیولوژیکی در کاهش هزینه‌های تولید و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی ضروری نشان می‌دهد. با این وجود، آنچه بتا گالاکتوزیداز را به یکی از پرکاربردترین آنزیم‌ها در صنعت تبدیل می‌کند نقش منحصر به فرد آن در سلامت افراد با اختلال عدم تحمل لاکتوز^۱ است. هضم ضعیف لاکتوز در روده‌ها اختلالی است که به دلیل کمبود این آنزیم در بیش از نیمی از مردم جهان به دنبال مصرف مواد لبنی رخ می‌دهد [۶-۷] و مشکلاتی چون نفخ، درد در ناحیه شکم و... را به دنبال دارد [۸] که باید خاطر نشان کرد که تولید مواد لبنی فاقد لاکتوز و فرآورده‌های پروبیوتیک مشکل هضم لاکتوز را از دیدگاه عملی قابل حل کرده است.

بتا گالاکتوزیداز را می‌توان از منابع مختلف گیاهی، حیوانی و میکروارگانیسم‌هایی چون مخمرها، کپک‌ها و باکتری‌ها تولید کرد اما میکروارگانیسم‌ها به دلیل سرعت تولید و هزینه کمتر، در صنعت مناسب‌تر هستند [۵ و ۹]. در انتخاب نوع میکروارگانیسم مناسب جهت تولید این آنزیم باید به استفاده از گونه‌های بی‌خطر برای استفاده انسانی (GRAS)^۲ به دلیل کاربرد دارویی و غذایی این آنزیم در صنعت، توجه شود [۹]. با توجه به اینکه گونه‌های مختلف میکروبی قادر به تولید این

1. Lactose intolerant
2. Generally Recognized As Safe (GRAS)

ساختاری^۱ و غیر ساختاری^۲ اشاره کرد. به طور معمول تعداد پارامترهای سینتیکی مدل های ساختاری کمتر از مدل های غیر ساختاری است، بنابراین محاسبه ی پارامترهای سینتیکی این مدل ها ساده تر و کاربرد صنعتی آن ها بیشتر است [۱۵]. به علاوه، هرچند مکانیزم سلولی کاملی در مدل های غیرساختاری در نظر گرفته نشده است اما این مدل ها تقریب خوبی از نتایج فرآیند های تخمیری می دهند [۱۱]. در بین مدل های غیر ساختاری، مدل های Logistic، Monod و Haldane از جمله معادلات پرکاربرد برای توصیف فرآیندهای رشد میکروبی در کشت های گوناگون از جمله کشت غوطه ور هستند.

Abdi و Naimpor [۱۵] ضمن مطالعات خود نشان دادند که سینتیک رشد میکروبی در کشت غوطه ور را می توان توسط مدل Logistic (رابطه ۱) توصیف کرد. در این مدل سرعت رشد ویژه (μ)، به صورت تابعی از غلظت توده زیستی (X) به کمک ثوابت ماکزیمم غلظت توده زیستی (X_m)، ماکزیمم سرعت رشد ویژه (μ_m) و مستقل از غلظت گوهرمایه محدود کننده بیان می شود.

$$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$$

مدل Haldane یا Andrews (رابطه ۲) از جمله مدل هایی است که به دلیل وجود ترم ممانعت کنندگی در آن، در صورت مشاهده ممانعت کنندگی گوهرمایه در غلظت بالا می تواند مورد استفاده قرار گیرد:

$$\mu = \frac{\mu_m S}{(K_s + S + (S^2/K_i))}$$

در این رابطه S غلظت گوهرمایه محدود کننده رشد (g/l)، K_s ثابت اشباع مونود (g/l) و K_i ثابت ممانعت کنندگی گوهرمایه (g/l) است. در غلظت های پایین گوهرمایه می توان از جمله ی S^2/K_i صرف نظر کرد که در این صورت رابطه ۲ به معادله مونود $\mu = \mu_m S / (K_s + S)$ تبدیل خواهد شد. پارامترهای μ_m ، K_s و K_i از جمله مشخصه های میکروارگانیسم هستند و این امکان وجود دارد که تحت تأثیر دما و pH قرار گیرند [۱۶]. به همین دلیل دما و pH باید در طول فرآیند تخمیر در تمام آزمایش ها ثابت نگه داشته شوند.

۳۰، ۴۰ و ۵۰ گرم بر لیتر لاکتوز در محیط کشت منبع کربنی استفاده شد. سپس کشت در دمای $30^\circ C$ با دور 150 rpm گرمخانه گذاری شد. هر ۲ ساعت یکبار جهت آنالیز میزان قند مصرفی، توده زیستی و میزان آنزیم تولید شده، نمونه گیری از سوسپانسیون تخمیری انجام شد.

۲-۲- آنالیزها

غلظت توده زیستی به روش کدورت سنجی در 620 nm اندازه گیری شد.

به منظور جداسازی آنزیم از سوسپانسیون تخمیری، نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور 7000 rpm سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی حاوی آنزیم استخراج شده جهت سنجش فعالیت آنزیمی استفاده گردید. میزان فعالیت آنزیمی بتاگالاکتوزیداز توسط روش میلر (Miller) [۱۲] اندازه گیری شد. در این روش 0.5 ml اورتونیتروفنیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید (ONPG) 1.0 mM در بافر پتاسیم فسفات به عنوان گوهرمایه به 0.5 ml محلول آنزیمی اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای $30^\circ C$ گرمخانه گذاری شد. واکنش با اضافه کردن 2 ml از محلول سدیم کربنات 0.1 mM متوقف گردید. سپس میزان جذب نوری اورتونیتروفنول (ONP) حاصل از هیدرولیز اورتونیتروفنیل بتا دی گالاکتوپیرانوزید توسط آنزیم بتاگالاکتوزیداز در 415 nm به وسیله ی دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. فعالیت آنزیمی بتاگالاکتوزیداز در واحد (U/ml) بیان شد به طوریکه یک واحد فعالیت بتاگالاکتوزیداز، مقدار آنزیمی که در هر دقیقه مقدار مشخصی (μmol) از اورتونیتروفنول را آزاد کند تعریف گردید.

همچنین از محلول روئی صاف شده سوسپانسیون تخمیری طی روش دی نیتروسالسیلیک اسید [۱۳] میزان قند موجود در نمونه ها اندازه گیری شد. با توجه به اینکه غلظت اولیه گلوکز در محیط کشت نسبت به غلظت اولیه لاکتوز در تمام آزمایش ها کم است لاکتوز به عنوان منبع اصلی کربن برای رشد میکروارگانیسم در نظر گرفته شده است.

۳- مدل های سینتیکی غیرساختاری

فرآیند رشد میکروارگانیسم ها فرآیندی بسیار پیچیده است [۱۴]. از جمله مدل های سینتیکی که برای توصیف این فرآیندها به کار می روند می توان به مدل های سینتیکی

1. Structured
2. Unstructured

ماکزیم رسید. با افزایش زمان گرمخانه گذاری فازهای سکون و مرگ در ادامه فرآیند تخمیر مشاهده شدند.

همانطور که در شکل ۱ دیده می شود هر دو مدل تقریب خوبی از داده های آزمایشگاهی برای تولید توده زیستی و مصرف گوهرمایه در تمامی غلظت های اولیه هستند (R^2 بالاتر از ۹۵ درصد) و فاز رشد نمائی و فاز سکون را به خوبی توصیف کرده اند. اما در فاز رشد کاهش یافته انحراف جزئی از نقاط تجربی در تغییرات غلظت توده زیستی در غلظت های اولیه ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر لاکتوز دیده شد. مطابقت داده ها با نتایج به دست آمده از مدل Logistic در شکل ۱d نشان می دهد که اگرچه در این مدل ترم ممانعت کنندگی دیده نمی شود، اما این مدل داده های غلظت ممانعت کنندگی را در شرایط مطالعه حاضر به خوبی توصیف کرده است.

تولید توده زیستی از نظر تأمین انرژی به سوخت و ساز گوهر مایه بستگی دارد. مطابق با نتایج آزمایشگاهی به دست آمده تولید توده زیستی به خوبی با تغییرات غلظت گوهر مایه مطابقت دارد، به طوریکه گوهرمایه در طول فاز رشد نمائی همزمان با افزایش محصول به شدت افت کرد، افت ناگهانی گوهرمایه در بازه زمانی ۲-۴ و ۶-۲ ساعت پس از شروع تلقیح به ترتیب در غلظت های اولیه ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر (شکل ۱a و ۱c) و ۲۰ و ۵۰ گرم بر لیتر (شکل ۱a و ۱d)، مطابق با رشد سریع توده زیستی در همین بازه ها است. اگرچه تغییرات غلظت توده زیستی و گوهرمایه در تمام غلظت های اولیه برای این میکروارگانیسم تقریباً یکسان است، اما در بالاترین غلظت گوهرمایه (۵۰g/l)، علاوه بر افزایش بازه زمانی فاز رشد نمائی نسبت به غلظت های اولیه ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر کاهش نسبتاً قابل توجهی در سرعت رشد و تولید توده زیستی نسبت به غلظت های اولیه دیگر دیده می شود (شکل ۱d).

به طوری که رشد پس از فاز نمائی، بر خلاف سایر غلظت های اولیه، وارد فاز سکون شده است. دلیل این کاهش نسبی، ممانعت کنندگی گوهرمایه از رشد در غلظت های بالا است. به طور کلی در فرآیندهای تخمیر میکروبی با افزایش غلظت گوهرمایه در محیط، فشار اسمزی بالا می رود تا جایی که می تواند باعث کاهش یا عدم انتقال قند به سلول ها گردد. این امر، محدودیت نرخ رشد و مرگ سلولی را به دنبال خواهد داشت [۱۹]. افزایش بازه زمانی فاز رشد نمائی در غلظت اولیه ۲۰g/l، می تواند به دلیل محدودیت گوهرمایه باشد.

همچنین این پارامترها در کشت هایی با یک گوهرمایه منحصر به فرد ثابت هستند [۱۷].

در تحقیق حاضر، سینتیک تخمیر ناپیوسته توسط مدل رشد سلولی r_x (معادله Maltus)، مدل مصرف گوهرمایه r_s و مدل تشکیل محصول r_p (مدل Luedeking-Piret) [۱۸] بیان شدند (معادلات ۳ تا ۵):

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X$$

$$-r_s = -\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{XS}} \frac{dX}{dt} + m_s X + \frac{1}{Y_{PS}} \frac{dP}{dt}$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X$$

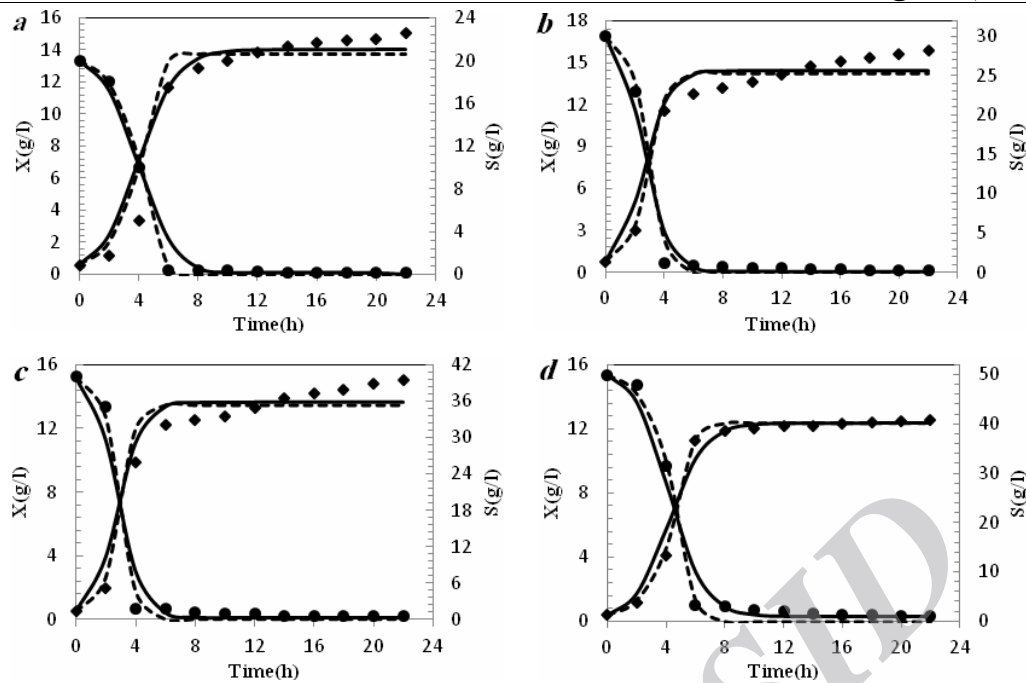
در این روابط P فعالیت آنزیمی بتاگالاکتوزیداز (U/ml)، m_s ضریب بقا ($1/h$)، Y_{XS} ضریب بازدهی توده زیستی ($g\ cells$ Substrate $\backslash g$)، Y_{PS} ضریب بازدهی محصول ($(U/ml)/(g/l\ Substrate)$)، α پارامتر وابسته به رشد ($(U/ml)/(g/l\ cells)$)، β پارامتر غیر وابسته به رشد ($(U/ml)/(g/l\ cells. h)$) در تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز و زمان (h) است. ضرایب Y_{PS} و Y_{XS} طی فرآیند تخمیر برای غلظت اولیه ی مشخصی از گوهرمایه ثابت در نظر گرفته می شوند.

۴- نتایج

به منظور تعیین و بررسی پارامترهای سینتیکی تخمیر غوطه ور *Bacillus licheniformis* با لاکتوز به عنوان منبع کربن جهت تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز، تخمیرهای ناپیوسته با استفاده از محیط کشت هایی با غلظت های اولیه متفاوت لاکتوز (۲۰ تا ۵۰ گرم بر لیتر) انجام شد.

۴-۱- بررسی فرآیند تخمیر

شکل ۱ داده های آزمایشگاهی و نتایج به دست آمده از مدل های Logistic و Haldane برای تغییرات غلظت توده زیستی و گوهرمایه را طی فرآیند تخمیر *Bacillus licheniformis* در محیط کشت هایی با غلظت های اولیه متفاوت از گوهرمایه نشان می دهد. فرآیند رشد در تمام غلظت های اولیه گوهرمایه تقریباً ۲ ساعت پس از شروع تلقیح آغاز شد و پس از آن غلظت توده زیستی برای غلظت های اولیه لاکتوز طی فاز رشد کاهش یافته، تا پایان بازه زمانی در نظر گرفته شده برای فرآیند تخمیر (۲۲ ساعت) به یک مقدار

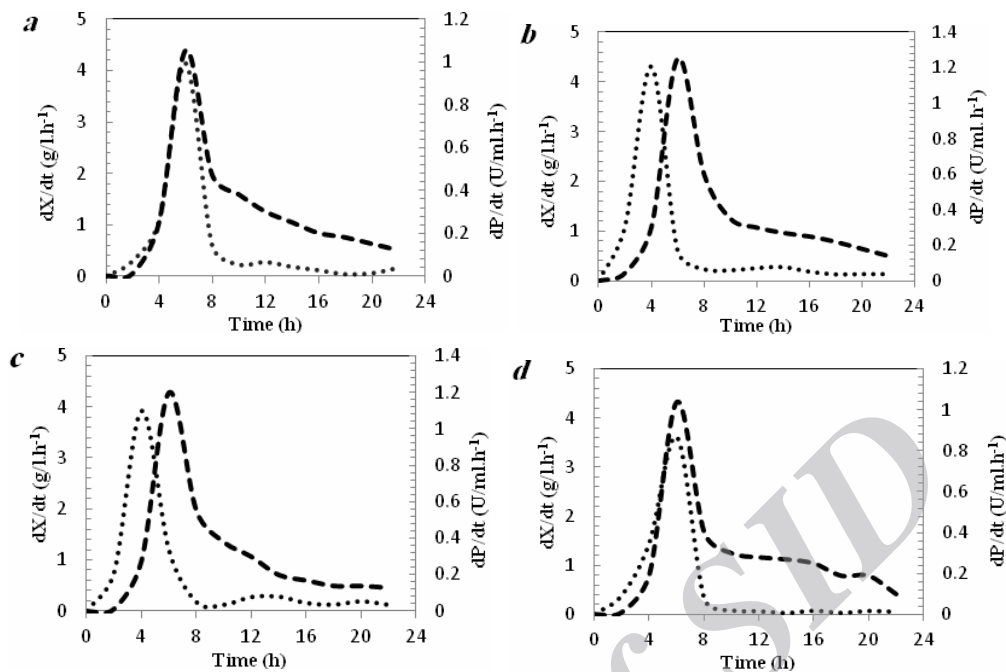


شکل ۱ تغییرات غلظت توده زیستی X (g/l) و گوهرمایه S (g/l) طی فرآیند تخمیر برای غلظت‌های اولیه ۲۰ (a)، ۳۰ (b)، ۴۰ (c) و ۵۰ (d) از گوهرمایه. داده آزمایشگاهی توده زیستی \blacklozenge و گوهرمایه \bullet ، مدل Logistic —، مدل Haldane - - - .

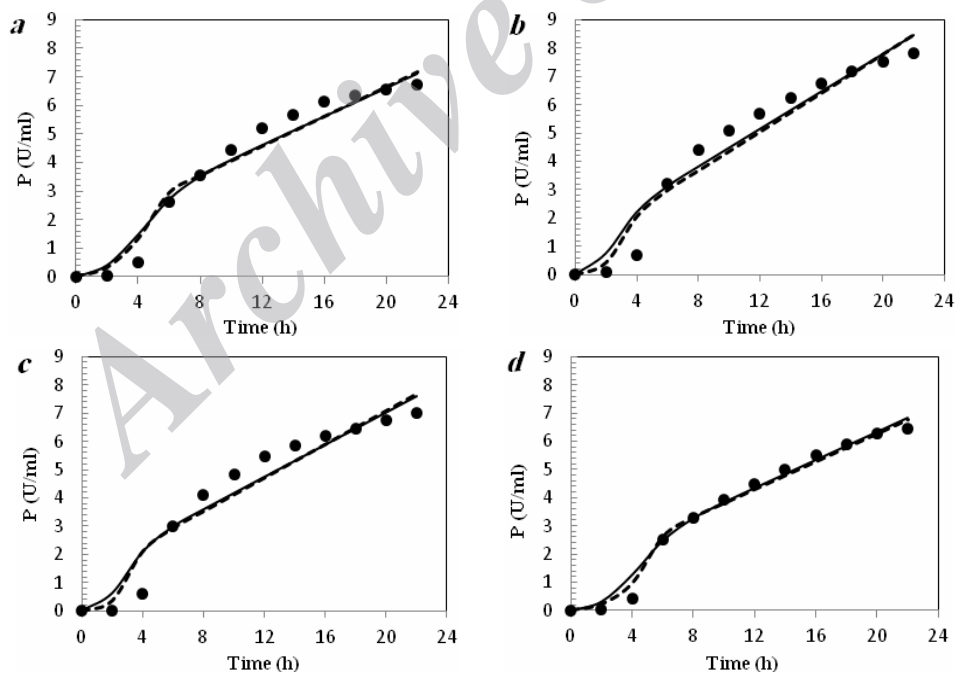
شکل ۳ میزان تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز را طی فرآیند تخمیر برای غلظت‌های مختلف قند لاکتوز نشان می‌دهد. تولید آنزیم به دو صورت وابسته به رشد و نیمه وابسته به رشد انجام می‌گیرد. در حالت نیمه وابسته، تولید آنزیم ممکن است تا فاز سکون نیز ادامه پیدا کند. نتایج نشان داد که میزان تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز در تمام غلظت‌های اولیه گوهر مایه، متناسب با غلظت توده زیستی (شکل ۱) افزایش می‌یابد، به طوری که مقدار تولید آنزیم در فاز رشد نمایی کم و در ادامه فرآیند رشد افزایش می‌یابد. نتایج نشان داد که تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز می‌تواند پس از رشد نمایی میکروبی نیز ادامه داشته باشد. بنابراین تولید محصول نه تنها به سرعت رشد بلکه به غلظت توده زیستی نیز بستگی داشته و از مدل Luedeking–Piret پیروی می‌کند.

تغییرات سرعت تولید توده زیستی و تولید آنزیم نسبت به زمان برای غلظت‌های مختلف گوهرمایه در شکل ۲ نشان داده شده است. با توجه به ثابت بودن دما و pH در طول تخمیر، سرعت رشد تنها متأثر از غلظت گوهرمایه می‌باشد. ماکزیمم سرعت تولید توده زیستی و بتاگالاکتوزیداز در غلظت اولیه ۳۰ g/l از گوهرمایه به دست آمد. همپوشانی نقاط حداکثری سرعت های تولید توده زیستی و بتاگالاکتوزیداز برای غلظت‌های اولیه ۲۰ و ۵۰ گرم بر لیتر (شکل ۲a و ۲d) در ساعت ششم از شروع تلقیح، وابستگی بیشتر تولید محصول به رشد در این غلظت‌ها را نسبت به غلظت های ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر (شکل ۲b و ۲c) نشان می‌دهد. لذا انتظار می‌رود مقدار پارامتر سینتیکی α در رابطه ۵ برای غلظت های اولیه ۲۰ و ۵۰ گرم بر لیتر بزرگتر باشد.

۲-۲- بررسی تولید آنزیم



شکل ۲ تغییرات سرعت های تولید توده زیستی (dX/dt) و تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز (dP/dt) طی فرآیند تخمیر برای غلظت های اولیه ۲۰ (a)، ۳۰ (b)، ۴۰ (c) و ۵۰ (d) از گوهرمایه.



شکل ۳ تغییرات میزان تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز $P(U/ml)$ طی فرآیند تخمیر برای غلظت های اولیه ۲۰ (a)، ۳۰ (b)، ۴۰ (c) و ۵۰ (d) از گوهرمایه. داده آزمایشگاهی ●، مدل Logistic —، مدل Haldane - - -.

متفاوت، در این جدول ارائه شد. از آنجا که نتایج به دست آمده از مدل‌های Logistic و Haldane با نتایج تجربی به خوبی مطابقت داشتند لذا مدل‌های فوق برای بررسی سینتیک رشد و تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز از قند لاکتوز توسط *Bacillus licheniformis* در کشت غوطه ور مناسب تشخیص داده شدند.

جهت مقایسه نتایج به دست آمده از مدل‌های Logistic و Haldane، هر مدل بوسیله یک رگرسیون خطی بین داده‌های آزمایشگاهی و مقادیر تخمین زده شده برای توده زیستی، گوهرمایه و محصول در غلظت‌های اولیه متفاوت از گوهرمایه محاسبه، و مقادیر ضریب همبستگی R^2 در جدول ۱ نشان داده شد. همچنین مقدار متوسط ضریب همبستگی (r) در هر غلظت اولیه گوهرمایه به منظور مقایسه نتایج بین غلظت‌های اولیه

جدول ۱ مقادیر ضریب همبستگی برای مدل‌های Logistic و Haldane

$S_0(g/l)$	Logistic				Haldane			
	X	S	P	r	X	S	P	R
۲۰	۰/۹۶	۰/۹۸۶	۰/۹۷	۰/۹۷۲	۰/۹۵۴	۰/۹۹۸	۰/۹۷۴	۰/۹۷۵
۳۰	۰/۹۶	۰/۹۸	۰/۹۷	۰/۹۷	۰/۹۶	۰/۹۹	۰/۹۵۴	۰/۹۷
۴۰	۰/۹۶	۰/۹۷	۰/۹۴	۰/۹۵۷	۰/۹۶	۰/۹۹۳	۰/۹۴	۰/۹۶۴
۵۰	۰/۹۸۴	۰/۹۸۳	۰/۹۹	۰/۹۸۶	۰/۹۹۶	۰/۹۹۶	۰/۹۸۷	۰/۹۹۳

های Logistic و Haldane با مجموعه معادلات دیفرانسیل ۳-۵ با استفاده از تابع ode45 و به کمک نرم افزار MATLAB 7.8 تعیین گردیدند.

۳-۴- تخمین پارامترها در کشت بسته
مقادیر پارامترهای سینتیکی محاسباتی در جدول ۲ ارائه شده است. مقادیر عددی این پارامترها از حل هم زمان یکی از مدل

جدول ۲. پارامترهای سینتیکی مورد استفاده در مدل‌سازی فرآیند تخمیر جهت تولید بتاگالاکتوزیداز ($m_S = 0$)

$S_0(g/l)$	Logistic						Haldane						
	$m\mu$	X_{max}	Y_{XS}	Y_{PS}	α	β	$m\mu$	K_S	Y_{XS}	Y_{PS}	α	β	K_i
۲۰	۰/۷۸	۱۴/۰۲	۰/۶۶	۰/۸۵	۰/۱۹۶	۰/۰۱۸	۱/۳	۱۰	۰/۶۶	۰/۹۳	۰/۱۸۴	۰/۰۱۹	۳۶
۳۰	۱/۱۴	۱۴/۴۶	۰/۴۶	۰/۶	۰/۱۴۷	۰/۰۲۳	۱/۷	۱۶	۰/۴۵	۰/۷۳	۰/۱۴	۰/۰۲۴	۴۰
۴۰	۱/۱۸	۱۳/۶۶	۰/۳۳	۰/۴۲	۰/۱۶۱	۰/۰۲۱	۱/۸	۱۸	۰/۳۲	۰/۶	۰/۱۵۶	۰/۰۲۲	۵۰
۵۰	۰/۸۳	۱۲/۴۴	۰/۲۴۵	۰/۳۶	۰/۱۹۹	۰/۰۲	۱/۴	۲۹	۰/۲۴	۰/۴۸	۰/۱۹۷	۰/۰۲	۷۶

نیاز به بقا کمتر خواهد شد [۲۱]. Jahic و همکارانش [۲۰] نشان دادند که نیاز کم میکروارگانیزم به بقا در دانسیته سلولی بالا یک ضرورت محسوب می‌شود. لذا تخمین مقادیر بسیار ناچیز برای ضریب بقا با توجه به دستیابی به یک مقدار ماکزیم برای غلظت توده زیستی طی فرآیند تخمیر *Bacillus licheniformis* و بالا بودن مقادیر عددی Y_{XS} و Y_{PS} (جدول ۲)، قابل توضیح است.

مقدار ضریب بقا با استفاده هر دو مدل در تمامی غلظت‌های اولیه گوهرمایه، بسیار ناچیز (تقریباً برابر با صفر) تخمین زده شد. بقا را می‌توان بصورت "انرژی حاصل از متابولیسم گوهرمایه که منجر به رشد سلولی نمی‌شود" تعریف کرد [۲۰]. لذا مقدار $m_S X$ در معادله ۴ میزان گوهرمایه مصرف شده به منظور بقای سلولی حتی در غیاب رشد را نشان می‌دهد. چنانچه گوهرمایه در دسترس به ازای واحد توده زیستی به مقدار کافی در محیط باشد، بازدهی تولید توده زیستی بیشتر و

بیولوژیکی فنول توسط *Pseudomonas putida* [۲۳] نیز دیده شد.

با مقایسه پارامترهای سینتیکی جدول ۲ می‌توان دید که مقادیر محاسباتی پارامترهای مشترک در هر دو دسته از معادلات، تقریباً یکسان بوده و یا تفاوت اندکی دارند. تنها مقدار ماکزیمم سرعت رشد ویژه محاسبه شده از مدل های Logistic و Haldane در هر غلظت، به دلیل تفاوت در ساختار این مدل‌ها متفاوت بود.

بالا بودن سرعت نفوذ در محیط مایع نسبت به محیط جامد باعث می‌شود فرآیند رشد در کشت غوطه ور سریع‌تر رخ دهد اما به همان اندازه تولید توده زیستی و بازده آن در چنین محیطی نسبت به افزایش غلظت بالای قند از حساسیت بیشتری برخوردار است، چراکه وجود آب آزاد در کشت های مایع اثر فشار اسمزی را نسبت به کشت های جامد که آب آزاد کمتری دارند بیشتر می‌کند. بنابراین اثرات نامطلوب غلظت بالای گوهرمایه در کشت غوطه ور محسوس‌تر است [۲۴]. لذا با انتخاب محیط کشت مایع علاوه بر کاهش زمان تخمیر، حساسیت رشد به افزایش غلظت قند این امکان را فراهم می‌کند که در یک بازه کوچکتر از غلظت اولیه بتوان مدل‌های سینتیکی مختلف را بررسی کرد و حساسیت احتمالی را از طریق پارامتر سینتیکی ضریب ممانعت کنندگی تعیین گردد.

۵- نتیجه گیری

در این مطالعه سعی شد تا سینتیک تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز توسط باکتری *Bacillus licheniformis* از طریق مدل‌های Logistic و Haldane و معادلات دیفرانسیل نرخ رشد، مصرف گوهرمایه و تولید محصول مدلسازی شود و پارامترهای سینتیکی تخمین زده شده در این روابط، مورد بررسی قرار گیرند. مقایسه نتایج به دست آمده از مدلسازی و داده های آزمایشگاهی در هر غلظت اولیه از گوهرمایه نشان داد که این مدل‌ها تقریب خوبی از داده‌های آزمایشگاهی به ما می‌دهند. بعلاوه مدل Logistic در غلظت ممانعت کنندگی نیز قادر به توصیف داده‌ها بود. مقدار پارامترهای سینتیکی مشترک در هر دو دسته از معادلات بسیار نزدیک به هم تخمین زده شد. مقدار محاسبه شده ماکزیمم سرعت رشد ویژه (μ_m) از

نتایج به دست آمده از مدل‌های مورد بررسی نشان داد که با افزایش غلظت اولیه لاکتوز، ماکزیمم سرعت رشد ویژه (μ) ابتدا افزایش و سپس در غلظت ممانعت کنندگی کاهش یافت. کاهش سرعت رشد ویژه بیانگر اثر منفی غلظت بالای گوهرمایه بر رشد *Bacillus licheniformis* است. هرچه مقدار عددی سرعت رشد ویژه بالاتر باشد زمان فرآیند تخمیر کوتاه‌تر و دستیابی به ماکزیمم مقدار توده زیستی سریعتر خواهد شد. در نتیجه راندمان کلی بهبود می‌یابد. به همین دلیل مقادیر عددی بالا برای μ_m ($0.78-1/8$) بدست آمده طی تخمیر *Bacillus licheniformis* توسط این مدل‌ها، رشد سریع توده میکروبی را در فاز رشد نمائی توجیه می‌کند. به دلیل تفاوت ساختار مدل‌های Logistic و Haldane [۱۹] و همچنین با توجه به وجود ترم ممانعت کنندگی گوهرمایه در معادله Haldane مقدار μ_m در این معادله از مقدار μ_m به دست آمده از معادله Logistic در هر غلظت اولیه گوهرمایه، بزرگتر است.

همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود ماکزیمم غلظت توده زیستی X_{max} در مدل Logistic، در غلظت اولیه 30 g/l از گوهرمایه به دست آمده است. در غلظت های اولیه متفاوت از گوهرمایه (S_0)، ضریب بازدهی توده زیستی Y_{XS} به صورت تابعی از این غلظت تغییر می‌کند به طوریکه با افزایش S_0 ، Y_{XS} کاهش یافت. مطابق آنچه انتظار می‌رفت α برای غلظت‌های اولیه ۲۰ و ۵۰ گرم بر لیتر نسبت به دو غلظت اولیه دیگر مقدار بالاتری تخمین زده شد. این نتایج نشان دهنده وابستگی تولید آنزیم به رشد میکروارگانیسم در شرایط موجود، در این دو غلظت بیشتر از دو غلظت دیگر است و متعاقباً مقادیر عددی β کوچکتری نیز برای آن‌ها به دست آمد. مقدار ثابت K_i به عنوان معیاری از ممانعت کنندگی در غلظت‌های مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. مقدار K_i در غلظت 50 g/l با ۵۲ درصد افزایش نسبت به مقدار آن در غلظت 40 g/l به ۷۵ گرم بر لیتر رسید این در حالی است که در غلظت‌های پایین‌تر این مقدار از ۲۵ درصد تجاوز نمی‌کند. این درصد افزایش نشان دهنده ممانعت کنندگی در این غلظت نسبت به سایر غلظت‌ها می‌باشد. چنین اثر ممانعت کنندگی گوهرمایه در تولید بیولوژیک سوکسینیک اسید از *Mannheimia succiniciproducens* [۲۲] و تجزیه

- International Food Research Journal. 18: 445-450.
- [6] Rajoka, Muhammad Ibrahim. Khan, Samia. Shahid, Riaz. 2003. Kinetics and Regulation Studies of the Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Different Substrates, Food Technol. Biotechnol. 41(4): 315–320.
- [7] Vasiljevic, T. Jelen, P. 2001. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria, Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2: 75-85.
- [8] Rong. Qiao, ChengYu, Hung. HuiZhang, Du. Guo, ZENG. Ling, Li. Sheng, Ye. 2011. Milk Consumption and Lactose Intolerance in Adults, Biomed Environ Sci. 24: 512–517.
- [9] Akcan, Nurullah. 2011. High level production of extracellular β -galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation, African Journal of Microbiology Research. 5: 4615-4621.
- [10] Hsu, C.A. Yu, R.C. Chou, C.C. 2005. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions, International Journal of Food Microbiology 104: 197–206.
- [11] Choonia, Huzafa S. Lele, S.S. 2013. Kinetic modeling and implementation of superior process strategies for β -galactosidase production during submerged fermentation in a stirred tank bioreactor, Biochemical Engineering Journal, 77: 49–57.
- [12] Miller, J.H. 1972. Assay of β -galactosidase. In: Miller JH, editor. Experiments In Molecular Genetics. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 352-355.
- [13] ASTM (American Society for Testing and Materials). 2009. Standard Test Method for Sugars.
- [14] Khan, Noor Salam. Mishra, Indra Mani. Singh, R.P. Prasad, Basheshwer. 2005. Modeling the growth of *Corynebacterium glutamicum* under product inhibition in L-glutamic acid fermentation, Biochemical Engineering Journal, 25: 173–178.
- [15] Abdi, Reza. Naimpor, Fereshte. 1383. Select the appropriate kinetic models for the study of growth and production in *Streptomyces*, The 9th Conference of

مدل های Logistic و Haldane در هر غلظت، به دلیل تفاوت در ساختار این مدل‌ها متفاوت به دست آمد.

فهرست واژگان لاتین

Lactose intolerant	عدم تحمل لاکتوز
Generally Recognized As Safe (GRAS)	به طور کلی به عنوان امن، به رسمیت شناخته شده
Structured	ساختاری
Unstructured	غیر ساختاری

۶- منابع

- [1] Manera, A. P. Da Costa Ores, J. Amaral Ribeiro, V. André Veiga Burkert, C. Kalil. S. J., 2008, Optimization of the Culture Medium for the Production of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082, Food Technol. Biotechnol. 46 (1): 66–72.
- [2] Oliveira, C. Teixeira, J. A. Lima, N. Da Silva. N. A. Domingues, L. 2007. Development of Stable Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain for Continuous *Aspergillus niger* β -galactosidase Production, , Jornal Of Bioscience And Bioengineering, 103(4): 318–324.
- [3] Awan, M. Siddique. Akbar Khan, Shahzad. Rehman, Z. U. Saleem, Azhar. Rana, S. M. Rajoka, M. I. 2010. Influence of nitrogen sources on production of β -galactosidase by *Aspergillus niger*, African Journal of Biotechnology, 9(20): 2918-2922.
- [4] Domingues, Luc'ilia. Lima, Nelson. Teixeira, José A. 2005. *Aspergillus niger* β -galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor, Process Biochemistry. 40: 1151–1154.
- [5] Laxmi, N. P. Mutamed, M. A. Nagendra, P. S. 2011. Effect of nitrogen sources on production of β -galactosidase from *Bifidobacterium animalis* Bb12 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842 grown in whey under different,

- of *Pichia pastoris* producing a fusion protein, *Bioprocess Biosyst Eng*, 24: 385–393
- [21] Low, E. Uuan W. Chase, Howard A. 1999. The Effect Of Maintenance Energy Requirements On Biomass Production During Wastewater Treatment, *Water Research*, 33(3): 847-853.
- [22] Song, Hyohak . Jang, Seh Hee. Park, Jong Myoung. Lee, Sang Yup. 2008. Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*, *Biochemical Engineering Journal*, 40: 107–115.
- [23] Bakhshi , Zeinab. Najafpour, Ghasem. Kariminezhad, Esmael. Pishgar, Roya. Mousavi, Nafise. Taghizade, Tahere. 2011. Growth kinetic models for phenol biodegradation in a batch culture of *Pseudomonas putida*, *Environmental Technology*, 32(16): 1835-1841.
- [24] Favela-Torres, E. Cordova-Lopez, J. Garda-Rivero, M. Gutierrez-Rojas, M. 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations, *Process Biochemistry*, 33(2): 103-107.
- chemical Angynaryng, Iran University of Science and Technology.
- [16] Gomez, J.M. Caro, I. Cantero, D. 1996. Kinetic equation for growth of *Thiobacillus ferrooxidans* in submerged culture over aqueous ferrous sulphate solutions, *Journal of Biotechnology*, 48: 147-152.
- [17] Al-Qodah, Z. Daghtani, Z. Geopel, Ph. Lafi, W. 2007. Determination of kinetic parameters of α -amylase producing thermophile *Bacillus sphaericus*, *African Journal of Biotechnology*, 6(6): 699-706.
- [18] Luedeking, R. Piret, E.L. 1959. Kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH, *J. Biol. Microbiol. Technol. Eng*, 1: 393–424.
- [19] Phisalaphong, Muenduen. Srirattana, Nuttapan. Tanthapanichakoon, Wiwut. 2006. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 28: 36–43.
- [20] Jahic, M. Rotticci-Mulder, J.C. Martinelle, M. Hult, K. Enfors, S-O. 2002. Modeling of growth and energy metabolism

Archive

Mathematical modeling and Kinetic analysis of β -galactosidase production by *Bacillus licheniformis* in batch cultivation

Mousaviafr, S. E. ¹, Anvari, M. ², Khayati, Gh. ^{3*}

1. M.Sc. in Chemical Engineering, Department, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Rasht Branch of Islamic Azad University, Rasht, Iran

3. Associate Professor, Department of Chemical Engineering, University of Guilan, Rasht, Iran .

(Received: 93/4/18 Accepted: 93/6/26)

β -galactosidase, is one of the most important and widely used enzymes in three areas of health, Food Industry and environment, so kinetic modeling of this enzyme could be playing an important role in the optimization of its industrial production process. First, in this study kinetic of β -galactosidase production by *Bacillus licheniformis* bacteria in batch fermentation was evaluated during 22 hours, in the range of 20-50 g/l of initial lactose concentration as a limiting substrate, at 30 ° C. Then, with the observation of inhibition at the highest concentration of this range, logistic and Haldane kinetic models were selected to model and determine the kinetic parameters of fermentation. These models were obtained a good approximation of the experimental results of substrate utilization in all phases and microbial growth data in the exponential growth phase and the stationary phase, but minor deviations of the experimental data were observed in the decelerating growth phase. In addition, β -galactosidase activity results were in good agreement with experimental data, and the maximum deviation in this data was observed in initial concentrations 30 and 40 g/l of substrate simultaneously with the end of the exponential phase and beginning of decelerating phase of microbial growth (The fourth hours of starting inoculum). The linear regressions between experimental data and results obtained from the models, in all initial concentration of lactose and for each variable biomass concentration, substrate concentration and enzyme activity, was more than 0.95.

Keywords: β -galactosidase, Batch fermentation, *Bacillus licheniformis*, kinetic Modeling.

* Corresponding Author E-Mail Address: khayati@guilan.ac.ir