مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و دو - بهار ۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

# تولید آنزیم توسط باسیلوس در محیط کشت غوطه ور

**حمید تبیانیان[۱]، بهزاد اطروشی[۲،*]، علی کرمی [۱]، حمید باباولیان[۳]**

۱. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا(...عج)، تهران، ایران.

۲. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات ویروس شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا(...عج)، تهران، ایران.

## چکیده

**سابقه و هدف:** پروتئازها رده ای از آنزیم ها می باشد و به دلیل نقش های فیزیولوژیک و کاربردهای تجاری موقعیت بسیار ارزشمندی دارند. پروتئازهای قلیایی ایجاد توسط شده توسط گونه های جنس *Bacillus* به دلیل ثبات حرارتی و پایداری که در pH های متفاوت دارند از اهمیت ویژه ای برخوردارند. در این تحقیق که با هدف بررسی مقایسه ای دو روش کشت بسته و نیمه پیوسته در محیط کشت غوطه ور برای تولید آنزیم پروتئاز قلیایی با سوبسترای گلوکز ۲، ۱۰ و ۲۰ درصد انجام شد.

**مواد و روش ها:** باکتری ها از جنس *Bacillus* از خاک های قلیایی استان گیلان جداسازی و پس از غربال گری بررسی تولید آنزیم به طور هم زمان در دو روش کشت بسته و نیمه پیوسته از نظر تولید آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** بررسی مقایسه ای دو سیستم در بهترین حالت نشان از تولید ۲/۳ برابری در کشت نیمه پیوسته با گلوکز۲ درصد U/ml ۰/۲۰۷ در مقایسه با U/ml ۰/۰۸۸ در کشت بسته بوده و حاکی از برتری این روش بر روش بسته است.

**نتیجه گیری:** سویه *Bacillus* جدا سازی شده توان تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در هر دو روش کشت را دارد اما فعالیت آنزیمی در کشت نیمه پیوسته در مقایسه با کشت بسته ۲/۳ برابر بیش تر بود.

**کلمات کلیدی:** آنزیم، کشت غوطه ور، *Bacillus*

## مقدمه

آنزیم ها به عنوان بیوکاتالیست هایی شناخته می شوند که بسیاری از واکنش های شیمیایی را انجام می دهند و به صورت تجاری در غذا ، پاک کننده ها ، داروها و صنایع شیمیایی کاربرد دارند. حدود بیش از ۳۰۰۰ آنزیم مختلف که تا به حال شناخته شده اند(۴).

پروتئازها رده ای از آنزیم ها هستند که با توجه به نقش های فیزیولوژیک و کاربردهای تجاری موقعیت خیلی مهمی دارند. به دلیل اینکه از لحاظ فیزیولوژیک مورد نیاز ارگانیسم های زنده هستند در طیف وسیعی از منابع طبیعی همانند گیاهان، جانوران و میکرو ارگانیسم ها وجود دارند. پروتئازها دو نقش سنتیکی و پروتئولیتیکی را بازی می کنند (۱۴, ۱۱).

پروتئازها از نظر اختصاصیت عمل کرد به سه گروه اسیدی، خنثی و قلیایی تقسیم می شوند. پروتئازهای قلیایی از نظر فیزیولوژیک و تجاری گروه مهمی از آنزیم ها هستند که به عنوان افزودنی در پاک کننده ها کاربرددارند که ۴۰درصد از کل فروش آنزیم ها و ۸۹درصد از سهم فروش پروتئازها را به خود اختصاص می دهند(۱،۵).

تمام میکرو ارگانیسم ها برای رشد بهینه، از الگوی توزیع طبیعی پیروی می کنند که مبتنی بر وابستگی به pH است. اکثراین میکرو ارگانیسم ها درمحدوده pH خنثی رشد می کنند. با دوریPH از محدوده خنثی، جمعیت میکرو ارگانیسم ها هم کاهش می یابد(۷).

از میان انواع پروتئازها، پروتئازهای قلیایی تولید شده توسط گونه های جنس Bacillus به دلیل ثبات حرارتی و پایداری که در pH های متفاوت دارند از اهمیت ویژه ای در صنایع شوینده برخوردارند. علاوه بر این اعضا این جنس قابلیت بالایی در تولید و ترشح مقادیر بسیار زیاد آنزیم دارند که ناشی از فعالیت های فیزیولوژیک آن ها می باشد(۲).

تولید این آنزیم با هردو روش کشت غوطه ور و تخمیر در بستر جامد و هم چنین به روش بسته و نیمه پیوسته انجام می شود.

مسئول نویسنده: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران،
پست الکترونیکی: tebyan.hamid@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۵

تخمیرهای صنعتی به صورت ناپیوسته، نیمه پیوسته و پیوسته انجام می شود. کشت نیمه پیوسته روشی است که به طور گسترده در صنعت برای تولید آنزیم استفاده می شود و می تواند توده ی زیستی با غلظت بالا را با سرعت رشد کم ترکیب کند. با تغییر های غلظت سوبسترا می توان شرایط رشد و تولید محصول را کنترل کرد چون سوبسترا می تواند به طور مستقیم بر روی وضعیت فیزیولوژیکی میکروارگانیسم تاثیر گذارد (۱۶،۱۵ ).

تحقیق حاضر با هدف مطالعه اثر غلظت گلوکز بر تولید آنزیم پروتئاز قلیایی به طور هم زمان در شرایط مشابه به دو روش کشت بسته و نیمه پیوسته و ارزیابی مقایسه ای تولید در هر دو سیستم انجام پذیرفت.

## مواد و روش ها

### جداسازی میکروارگانیسم

تعداد ۱۵ نمونه خاک ازمناطق جنوبی استان گیلان شامل منجیل ، لوشان و رودبار که برخوردار از خاک های قلیایی بودند تهیه ودر کیسه های پلی اتیلن استریل به آزمایشگاه انتقال یافت. سپس ۱ gr ازهر نمونه در ۹ ml آب مقطر استریل در لوله آزمایش سوسپانسیون تهیه شد وبه مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت ۸۰ $^{\circ}c$ حرارت داده شد. سپس از هریک از لوله ها ۰/۱ میلی لیتر به محیط نوترینت آگار منتقل و توسط میله شیشه ای سرکج به روش Spread plating کشت داده شدند و پلیت ها به مدت ۲۴ساعت در۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری شدند. سپس کلنی ها از نظر واکنش گرم و آزمایش های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند.(۶)

### غربال گری سویه های تولید کننده آنزیم

جهت بررسی سویه های تولید کننده آنزیم تمامی باسیلوس ها در محیط کشت skim milk powder(۲۰گرم در لیتر) و آگار (۲۰گرم در لیتر) به روش نقطه ای کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ساعت نگه داری شد. تولید هاله شفاف اطراف کلونی نشان دهنده ی تولید انزیم پروتئاز است(۸).

### شناسایی گونه های مولدآنزیم

تایید شناسایی گونه ها براساس بررسی لام میکروسکوپی، رنگ آمیزی گرم و اسپور و آزمایش های بیوشیمیایی در سطح جنس انجام شد. بدین منظور آزمایش های ژلاتیناز، هیدرولیز کازئین، کاتالاز، هیدرولیز لستین، اوره آز، تجزیه سیترات، احیای نیترات، هیدرولیز نشاسته و تخمیر قندها انجام پذیرفت(۶،۸).

### تهیه پیش کشت

به منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی از محیط کشت حاوی گلوکز (۱۰گرم در لیتر ) ، پپتون (۵گرم در لیتر ) ، عصاره مخمر ( ۵گرم در لیتر ) ، کازئین ( ۲گرم در لیتر ) ، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (۱گرم در لیتر ) ، سولفات منیزیم ۷ آب ( ۰/۲ گرم در لیتر) به ازای ۵۰ میلی لیتر تهیه شد و pHمحیط برابر ۱۰ با استفاده از pHمتر تنظیم گردید(۱۳).

### تخمیر غوطه ور به روش بسته و نیمه پیوسته با گلوکز ۲درصد

با این حال دو محیط کشت حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر ، گلوکز (۱۰گرم در لیتر) ، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (۱گرم در لیتر)، کازئین (۱درصد) ، سولفات منیزیم (۰/۲گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم ۱/۵درصد (وزنی حجمی)تهیه شد و pHآن به ۹ تنظیم شد. سپس ارلن ها در اتوکلاو در درجه حرارت ۱۲۱$^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. سپس از محیط پیش کشت میزان ۱۵درصد (حجمی/حجمی ) با کدورت مناسب ($OD_{600nm}$= ۰/۶) به ان اضافه شد. سپس به فاصله زمانی ۳ ساعت به یک ارلن ۱۰میلی لیتر محلول گلوکز ۲ درصد(۲۰گرم در لیتر) و به ارلن دیگر ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد(۱۰).

### تخمیر غوطه ور به روش بسته و نیمه پیوسته با گلوکز ۱۰درصد

با این حال دو محیط کشت حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر ، گلوکز (۱۰گرم در لیتر) ، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (۱گرم در لیتر)، کازئین (۱درصد) ، سولفات منیزیم (۰/۲گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم ۱/۵درصد تهیه شد و pHآن به ۹ تنظیم شد. سپس ارلن ها در اتوکلاو در درجه حرارت ۱۲۱$^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. سپس از محیط پیش کشت میزان ۱۵درصد (حجمی/حجمی ) به ان اضافه شد. سپس به فاصله زمانی ۳ ساعت به یک ارلن ۱۰میلی لیتر محلول گلوکز ۱۰ درصد(۱۰۰گرم در لیتر) و به ارلن دیگر ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد(۱۰).

### تخمیر غوطه ور به روش بسته و نیمه پیوسته با گلوکز ۲۰درصد

با این حال دو محیط کشت حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر ، گلوکز (۱۰گرم در لیتر) ، دی پتاسیم هیدروژن فسفات (۱گرم در لیتر)، کازئین (۱درصد) ، سولفات منیزیم (۰/۲گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم ۱/۵درصد تهیه شد و pHآن به ۹ تنظیم شد. سپس ارلن ها در اتوکلاو در درجه حرارت ۱۲۱$^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. سپس از محیط پیش کشت میزان ۱۵درصد (حجمی/حجمی ) به ان اضافه شد. سپس به فاصله زمانی ۳ ساعت به یک ارلن ۱۰میلی لیتر محلول گلوکز ۱۰ درصد(۲۰۰گرم در لیتر) و به ارلن دیگر ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد(۱۰).

### اثر پارامترهای محیطی بر تولید آنزیم در محیط غوطه ور

**به روش کشت بسته**

تولید آنزیم در دوره های زمانی ( ۱۲ ،۲۴ ،۳۶ ،۴۸ ،۶۰)ساعت و pH (۷ ،۸ ،۹ ،۱۰ ،۱۱) و حجم تلقیح با در صدهای حجمی ( ۵ ،۱۰ ،۱۵ ،۲۰ ،۲۵) و سولفات آمونیوم با درصدهای وزنی ( ۰،۱/۵ ،۱/۵ ،۲ ،۲/۵) در کشت بسته مورد بررسی قرار گرفت و بهترین بستر از نظر بیش ترین مقدار تولید آنزیم، برای کشت نیمه پیوسته انتخاب شد.

**استخراج آنزیم**

بدین منظور ابتدا محیط کشت مایع از کاغذ صافی فیلتر شده و در لوله های آزمایش ریخته و پس از سانتریفوژ به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور ،از محلول رویی به عنوان محلول خام حاوی آنزیم جهت ارزیابی فعالیت آنزیمی استفاده شد.

**سنجش فعالیت آنزیم**

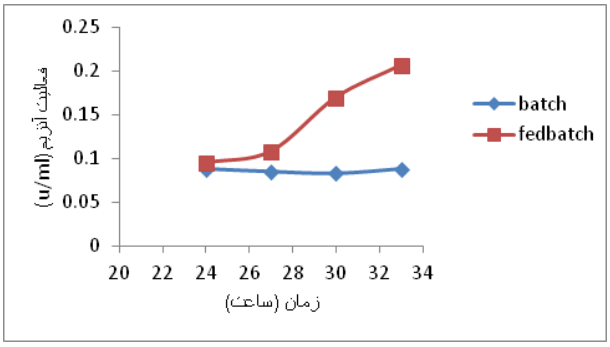
این آزمایش با سوبسترای کازئین انجام شد. بدین ترتیب µl ۲۰۰ ازمحلول خام حاوی آنزیم برداشته و به ml ۲ از محلول سوبسترای کازئین (حاوی ۲۰ گرم کازئین در ml ۱۰۰۰ Tris) اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۵°C گرم خانه گذاری شد. سپس به منظور توقف واکنش آنزیمی ml ۲/۵ محلول TCA (۵٪ TCA، ۹٪ استات و ۹٪ اسید استیک) اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس لوله ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و سپس جذب نوری نمونه ها در طول موج ۳۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این میان یک لوله شاهد حاوی ml ۰/۲ اب مقطر وml ۲سوبسترای کازئین وml ۲/۵ محلول TCA تهیه شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به صورت مقدار آنزیمی که بتواند یک میلی گرم تیروزین را در دقیقه تولید نماید، تعریف گردید. مقدار تیروزین حاصله با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید(۳, ۱۳).

## یافته ها

نتایج حاصل از آزمایش های بیوشیمیایی تایید کننده تعلق باکتری جداسازی شده به جنس باسیلوس بود.در آزمایش های انجام شده در کشت بسته و نیمه پیوسته افزایش فعالیت آنزیم در کشت نیمه پیوسته مشاهده شد. جدول و شکل های(۱،۲و۳ نتایج حاصله را نشان می دهد و همین طور شکل ۴ غلظت های مختلف را نشان می دهد.

| زمان | فعالیت انزیمی Batch | فعالیت انزیمی Fed-Batch |
|---|---|---|
| ساعت ۲۴ شروع | ۰/۰۸۸ U/ml | ۰/۰۹۵ U/ml |
| ساعت ۲۷ از شروع | ۰/۰۸۵ U/ml | ۰/۱۰۸ U/ml |
| ساعت ۳۰ از شروع | ۰/۰۸۳ U/ml | ۰/۱۷۰ U/ml |
| ساعت ۳۳ ازشروع | ۰/۰۸۸ U/ml | ۰/۲۰۷ U/ml |

جدول۱-نتایج تخمیر غوطه ور به روش نیمه پیوسته با گلوکز ۲درصد

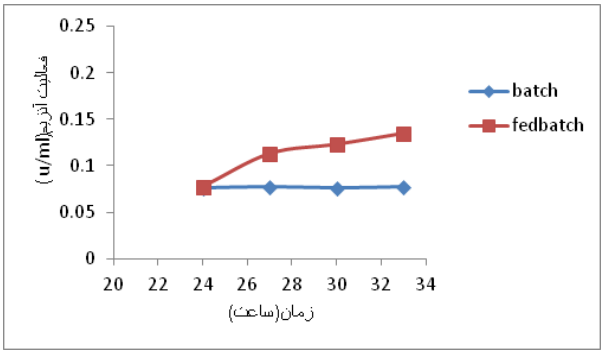



شکل۱-مقایسه کشت بسته با کشت نیمه پیوسته گلوکز۲درصد

با توجه به نمودار برتری تولید آنزیم در کشت نیمه پیوسته با گلوکز ۲ درصد مشاهده می شود که رفته رفته با گذشت زمان با غذادهی ثانویه، فعالیت آنزیمی با شیب تند افزایش می یابد.

| زمان | فعالیت انزیمی Batch | فعالیت انزیمی Fed-Batch |
|---|---|---|
| ساعت ۲۴ شروع | ۰/U/ml۰۷۶ | ۰/U/ml۰۷۷ |
| ساعت ۲۷ از شروع | ۰/۰۷۷ U/ml | ۰/U/ml۱۱۳ |
| ساعت ۳۰ از شروع | ۰/U/ml۰۷۶ | ۰/۱۲۳ U/ml |
| ساعت ۳۳ ازشروع | ۰/U/ml۰۷۷ | ۰/U/ml۱۳۵ |

جدول۲-نتایج تخمیر غوطه ور به روش نیمه پیوسته با گلوکز ۱۰درصد



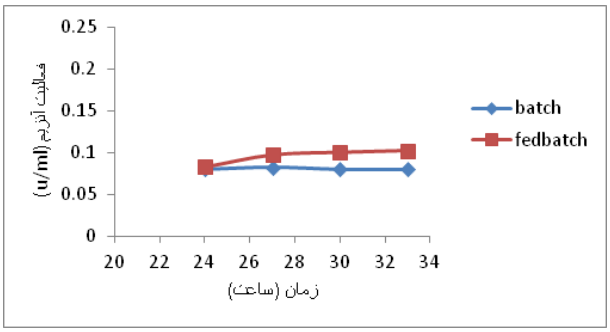

شکل۲-مقایسه کشت بسته با کشت نیمه پیوسته گلوکز ۱۰درصد

همان طور که در شکل نشان داده شده است در کشت نیمه پیوسته با غذادهی گلوکز ۱۰درصد به فاصله زمانی ۳ ساعت افزایش فعالیت آنزیم

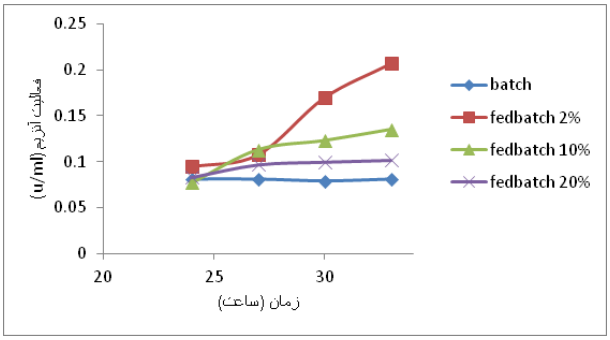
حاصل گردید.

| زمان | فعالیت انزیمی Batch | فعالیت انزیمی Fed-batch |
|---|---|---|
| ساعت ۲۴ شروع | ۰/۰۸۰ U/ml | ۰/۰۸۳ U/ml |
| ساعت ۲۷ از شروع | ۰/۰۸۲ U/ml | ۰/۰۹۷ U/ml |
| ساعت ۳۰ از شروع | ۰/۰۸۰ U/ml | ۰/۱ U/ml |
| ساعت ۳۳ ازشروع | ۰/۰۸۰ U/ml | ۰/۱۰۲ U/ml |

جدول۳-نتایج تخمیر غوطه ور به روش نیمه پیوسته با گلوکز ۲۰درصد




شکل۳-مقایسه کشت بسته با کشت نیمه پیوسته گلوکز ۲۰درصد




شکل۴-مقایسه کشت بسته با کشت نیمه پیوسته در غلظت های مختلف

همان طور که در شکل نشان داده شده است در روش کشت نیمه پیوسته در مقایسه با کشت بسته افزایش فعالیت آنزیم مشاهده شده است. افزایش فعالیت آنزیم در کشت نیمه پیوسته با غلظت گلوکز۲ درصد با شیب تند و در کشت نیمه پیوسته با غلظت گلوکز ۱۰ درصد شیب ملایم و در کشت نیمه پیوسته با غلظت گلوکز ۲۰درصد شیب کندی مشاهده شد.

## بحث

کشت نیمه پیوسته روشی است که به طور گسترده در صنعت برای تولید آنزیم استفاده می شود. راکتور نیمه پیوسته می تواند با روش های مختلف به وسیله ی تنظیم میزان تغذیه با استفاده از پیش خور ویا کنترل فیدبک عمل کند. با تغییر های غلظت سوبسترا می توان شرایط رشد و تولید محصول را کنترل کرد چون سوبسترا می تواند به طور مستقیم بر روی وضعیت فیزیولوژیکی میکروارگانیسم تاثیر گذارد( ۱۵ , ۹ ).

طی آزمایش هایی که Jasvirو همکاران به روش تخمیر غوطه ور به روش نیمه پیوسته روی *Bacillus sphaericus*با غذادهی گلوکز ۵ درصد انجام دادند حداکثر فعالیت آنزیم به فاصله زمانی ۶ ساعت غذادهی ثبت شد(۲/۴۴۶ U/ml). بررسی کشت نیمه پیوسته با غلظت های مختلف طی یک دوره زمانی نشان داد که وجود و یا عدم وجود گلوکز در محیط کشت در توان تولید پروتئاز تعیین کننده می باشد و افزایش غلظت مواد غذایی در غذادهی منجر به کاهش تولید آنزیم شد. نتایج این تحقیق با نتایج jasvir singh مطابقت دارد (۱۲) .

در این تحقیق، آزمایش های کشت نیمه پیوسته با غلظت گلوکز ۲، ۱۰و ۲۰ درصد حداکثر فعالیت آنزیم در ساعت ۳۳ از شروع تخمیر مشاهده شد(به ترتیب۰/۲۰۷ U/ml، ۰/۱۳۵ U/ml، ۰/۱۰۲ U/ml).

نتایج به دست آمده از آزمایش حاکی از این است که با اضافه کردن منبع کربن، با گذشت زمان غلظت توده ی سلولی نیز افزایش یافته و در نتیجه توان تولید آنزیم بالا می رود. با اضافه کردن گلوکز با غلظت ۲ درصد افزایش فعالیت آنزیم با شیب تند حاصل گردید. در غلظت های بالاتر گلوکز افزایش فعالیت آنزیم وجود دارد ولی روند افزایش کندتر شده است و غلظت بالاتر گلوکز خود باعث محدودیت رشد ارگانیسم شده است. نتایج به دست آمده از آزمایش های کشت نیمه پیوسته با محلول گلوکز ۱۰ و ۲۰ درصد نشان دهنده ی این است که غذادهی با غلظت بالای گلوکز باعث کاهش توان تولید آنزیم و طولانی تر شدن زمان تخمیر می شود. هم چنین غلظت بالا باعث افزایش فشار اسمزی و کاهش اکسیژن رسانی به میکروارگانیسم شده و محدودیت رشد و کاهش فعالیت آنزیمی را برای میکروارگانیسم به دنبال داشته است

## نتیجه گیری

سویه *Bacillus* جدا سازی شده از خاک های قلیایی استان گیلان قادر به تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در هر دو روش کشت بسته و نیمه پیوسته بود اما فعالیت آنزیمی در کشت نیمه پیوسته در مقایسه با کشت بسته ۲/۳ برابر بیش تر بود.

## سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از کمک های مالی و آزمایشگاهی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان کمال امتنان را دارند.

## منابع

1.Akcan N and Uyar F, Production of extracellular alkaline protease from Bacillus subtilis RSKK96 with solid state fermentation. Eurasia J Biosci, 2011; 5: 64-72.

2.Asokan S and Jayanthi C, Alkaline protease production by Bacillus licheniformis and Bacillus coagulans. J Cell .T research, 2010; 10: 2119.

3.Beg QK, Sahai V, and Gupta R, Statistical media optimization and alkaline protease production from Bacillus mojavensis in a bioreactor. Process Bioche, 2003; 39: 203-209.

4.Chellappan S, Jasmin C, Basheer SM, Elyas KK, Bhat SG, and Chandrasekaran M, Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine Engyodontium album BTMFS10 under solid state fermentation. Process Bioche, 2006; 41: 956-961.

5.Gençkal H, Studies on alkaline protease production from bacillus sp. 2004.

6.Joo H-S, Kumar CG, Park G-C, Kim KT, Paik SR, and Chang C-S, Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from Bacillus horikoshii. Process Bioche, 2002; 38: 155-159.

7.Kumar CG and Takagi H, Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnol Advan, 1999; 17: 561-594.

8.Mehrotra S, Pandey PK, Gaur R, and Darmwal NS, The production of alkaline protease by a Bacillus species isolate. Bioresource Technol, 1999; 67: 201-203.

9.Naidu KSB and Devi KL, Optimization of thermostable alkaline protease production from species of Bacillus using rice bran. A J Biotechnol, 2005; 4: 724-726.

10.Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, and Pandey A, Comparative evaluation of neutral protease production by Aspergillus oryzae in submerged and solid-state fermentation. Process Bioche, 2005; 40: 2689-2694.

11.Singh J, Batra N, and Sobti RC, Serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus sp. SSR1. Process Bioche, 2001; 36: 781-785.

12.Singh J, Vohra RM, and Sahoo DK, Enhanced production of alkaline proteases by Bacillus sphaericus using fed-batch culture. Process Bioche, 2004; 39: 1093-1101.

13.Uyar F and Baysal Z, Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated Bacillus sp. under solid state fermentation. Process Bioche,2004; 39: 1893-1898.

14.Wang S-L, Chio Y-H, Yen Y-H, and Wang C-L, Two novel surfactant-stable alkaline proteases from Vibrio fluvialis TKU005 and their applications. Enz and Microbial Technol, 2007; 40: 1213-1220.

15.Yamanè T and Shimizu S, *hFed-batch techniques in microbial processes*, in *Bioprocess Parameter Control*. 1984, Springer Berlin Heidelberg. p. 147-194.

16.Yang J-K, Shih I-L, Tzeng Y-M, and Wang S-L, Production and purification of protease from a Bacillus subtilis that can deproteinize crustacean wastes. Enzy and Microbial Technol, 2000; 26: 406-413.