

بررسی سازوکار اثر منبع نیتروژن موجود در محیط کشت روی pH محیط و تولید پلی گاماگلوتامات توسط فلاووباکتریوم

اسماء چگنی، علی بهرامی*، مجتبی خانی

تهران، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، گروه مهندسی شیمی

محمد داوود غفاری

تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان

چکیده: پلی گاماگلوتامات، زیست پلیمر پلی آمیدی متشکل از واحدهای گلوتامیک اسید است که به علت خاصیت زیست تخریب پذیری و غیر سمی بودن به عنوان یک ترکیب زیستی می تواند در بسیاری از زمینه ها همچون پزشکی و دارورسانی، غذایی، هیدروژل ها، لخته سازهای زیستی، جاذب های رطوبت، تغلیظ کننده ها و پوشش های ضد خوردگی مورد استفاده قرار گیرد. به این ترتیب برای بهینه سازی تولید آن، در این پژوهش ابتدا تأثیر غلظت منبع نیتروژن به عنوان یک منبع تغذیه ای مهم روی pH محیط و میزان رشد سلولی مورد بررسی قرار گرفت و سپس چگونگی سازوکار تأثیرگذاری روی تولید پلی گاماگلوتامات از گونه ی فلاووباکتریوم بررسی شد، و سرانجام برای بهینه سازی منبع نیتروژن، پنج منبع نیتروژنی گوناگون (به روش آماری تک فاکتوریلی) ارزیابی و سدیم گلوتامات با بیش ترین مقدار تولید (۲۳۷ گرم بر لیتر) و همچنین ارزان و در دسترس بودن به عنوان منبع نیتروژن انتخاب شد.

واژه های کلیدی: زیست پلیمر؛ پلی گاماگلوتامات؛ گلوتامیک اسید؛ تغییر pH؛ فلاووباکتریوم؛ منبع نیتروژن.

KEYWORDS: Biopolymer; Poly(gamma)glutamate; Glutamic acid; pH Change; Flavobacterium sp.; Nitrogen source.

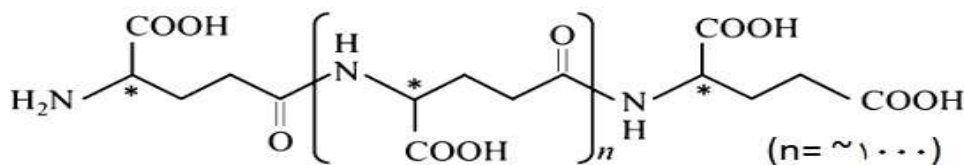
مقدمه

که در هزینه های پایین تولید شوند. از میان پلیمرهای باکتریایی، تنها چند پلیمر به صورت درون سلولی تولید می شوند [۱، ۲]، اما گروه گسترده ای از این دست پلیمرها به صورت خارج سلولی تهیه می شوند. با این حال، زیست بسپارهای به دست آمده از منابع طبیعی برتری های

باکتری ها می توانند طیف گسترده ای از زیست بسپارها با وظیفه های زیستی متنوع، که دارای ویژگی های مادی مناسب برای بسیاری کاربردهای صنعتی و پزشکی هستند را تولید کنند. با این حال، زیست بسپارها زمانی از لحاظ اقتصادی مناسب هستند

*عهد دار مکاتبات

+E-mail: a_bahrami@mut.ac.ir



شکل ۱- ساختار کلی یک زنجیره پلی آمیدی [۶].

با توجه به مطالعه‌های انجام شده روی تولید این زیست پلیمر از این سویه توسط بهرامی و همکاران [۱۴] و همچنین خانی و همکاران [۱۵] در سال‌های گذشته، بررسی سازوکار تأثیر منبع نیتروژن روی تولید این زیست پلیمر در محیط کشت تولید و pH محیط، لازمه‌ی تکمیل این مطالعه‌ها می‌باشد. از سوی دیگر با توجه به بهینه‌سازی‌های انجام شده روی ترکیب محیط کشت و تعیین مقدار بهینه منبع نیتروژن مورد نیاز این سویه و انجام طرح‌های آماری، در این پژوهش برای صنعتی کردن فرایند به روش تک فاکتوریل منبع‌های نیتروژنی جایگزین در همان مقدار بهینه مورد بررسی قرار گرفتند.

امروزه بیش‌تر مطالعه‌ها بر روی تولید پلی گاماگلوتامات با استفاده از سویه‌های وابسته به گلوتامات خارجی متمرکز شده‌اند. در این پژوهش هدف، بهینه‌سازی تولید پلی گاما گلوتامات (PGA) از گونه *فالویاکتریوم* است که پتانسیل مناسبی در تولید این زیست پلیمر داشته و تولید خارج سلولی دارد، اما تاکنون بهینه‌سازی و بررسی میزان تولید با منابع و نیتروژنی گوناگون در مورد آن صورت نگرفته است. به همین منظور برای بهینه‌سازی شرایط تولید زیست پلیمر میکروبی تولیدی از این سویه ابتدا مقدار غلظت منبع نیتروژن و تأثیر آن روی pH محیط و میزان رشد سلولی بررسی شد و سپس منبع نیتروژن گلوتامیک اسید با منابع نیتروژنی ارزان‌تر مانند سدیم گلوتامات، اوره، سدیم نیتريت، نترات پتاسیم شد و آمونیوم کلرید در شرایط بهینه جایگزین شد و سرانجام مقدار وزن خشک فراورده‌ی تولیدی و کیفیت آن مورد بررسی قرار گرفت.

نوآوری پژوهش

سویه مورد استفاده در این پژوهش برای اولین بار توسط بهرامی و همکاران در سال ۱۳۹۰ میلادی در پایگاه داده‌ی NCBI ثبت شده [۱۴، ۱۵]

قابل‌رقابتی، به‌واسطه تولید پایدارشان از منابع تجدید پذیر، خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری‌شان^(۱) در مقایسه با پلیمرهای مصنوعی دارند. افزون بر این زیست‌بسپارها از مواد غیر سمی طبیعی تشکیل شده‌اند و به طور ذاتی زیست سازگار در نظر گرفته می‌شوند [۳]. پلی آمیدها، پلیمرهای سنتزی شامل پیونددهنده‌های آمیدی هستند، به‌طوری‌که توسط واکنش تراکمی بین یک گروه آمینو و یک بخش از گروه کربوکسیل تشکیل می‌شوند (شکل ۱) [۴]. طول زنجیره‌ی کربنی بین پیوندهای آمیدی (اغلب ۲ تا ۱۲) به شدت روی ویژگی‌های پلی آمید به دست آمده تأثیرگذار است [۵].

پلی آمیدهای تهیه شده‌ی غیر ریوزومی گروه مجزایی از زیست پلیمر شامل:

✓ دو نوع پلی آمید خارج سلولی:

• پلی گاما گلوتامات^(۲) (PGA)

• اپسینون پلی ال لایزین^(۳) (PL)

✓ یک نوع پلی آمید داخل سلولی:

• سیانوفسین پپتید گرانول^(۴) (CGP) [۷]

PL از خود ویژگی‌های آنتی باکتریایی نشان داده است، PGA نیز می‌تواند در هر دو شکل ترشح‌شده یا کپسولی وجود داشته باشد. ویژگی‌های شیمیایی PGA و CGP ها با مقداری کاهش در میزان آرژنین همانند ویژگی‌های پلی آکریلات تهیه شده‌ی شیمیایی با کاربرد گسترده است [۹ - ۷]. از این رو پلی آمدهای باکتریایی می‌توانند جایگزین تجدید پذیر، غیر سمی و تجزیه‌پذیر زیستی برای پلی آکریلات‌ها باشند [۱۱، ۱۰].

پلی گاماگلوتامات، فراورده پیوند آمیدی گاما - کربوکسیل و آلفا آمین بین ایزومرهای L و D گلوتامیک اسید است [۱۲]. پژوهش‌های گسترده‌ای بر روی سویه‌های زیادی از *باسیلوس* ها برای تولید پلی گاماگلوتامیک اسید صورت گرفته است [۱۳].

(۱) Biocompatibility

(۲) Poly- γ -glutamate

(۳) ϵ -poly-l-lysine

(۴) CyanopHycin granule peptide

۷/۰۵ گرم، اوره ۱/۱۳ گرم، سدیم نیتريت ۲/۶ گرم، پتاسیم نترات ۳/۸۱ گرم و آمونیوم کلرید ۲/۰۱ گرم افزوده شد. محلول به دست آمده به علت غلظت بالای منابع نیتروژنی یاد شده pH اسیدی حدود ۳/۵ خواهد داشت که می بایست در حالت خنثی یعنی روی ۷ تنظیم شود. با توجه به اینکه اتوکلاو کردن ساکاروز همراه با دیگر ترکیب های محیط کشت باعث تغییر رنگ محیط کشت و از دست رفتن کیفیت مواد مغذی آن می شود (واکنش قهوه ای شدن از نوع میلارد^(۳)) [۱۷] در چنین شرایطی برای حل مشکل، محلول ساکاروز غلیظ ۲۵۰ گرم بر لیتر تهیه کرده و به صورت جداگانه اتوکلاو و به اجزای محیط کشت افزوده شد [۱۸]. همچنین در پایان سیتریک اسید در غلظتی همانند گلوتامیک اسید به محیطها به عنوان پیش ساز اضافه شد.

تلقیح محلول ساکاروز و مایه تلقیح به محیط کشت

با توجه به اینکه در هر ارلن نیم لیتری به میزان ۱۰۰ میلی لیتر محیط پایه تولید تهیه شده، پس از اتوکلاو نمودن محیط های مربوطه، در هر ارلن به میزان ۲۵/۲ میلی لیتر از محلول غلیظ ساکاروز (۲۵۰ گرم بر لیتر) سترون شده در شرایط استریل و زیر هود میکروبی افزوده شد. در پایان میزان (v/v) ۶٪ پیش کشت میکروبی به ارلن ها افزوده شد [۱۹].

استخراج فراورده

ارلن ها به مدت ۹۶ ساعت، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۷۰ rpm قرار گرفت [۱۵]. از انکوباتور خارج و از آنجایی که هر ارلن دارای محیط کشت، توده سلولی و فراورده بود، سلولها به وسیله سانتریفیوژ (شرکت سیگما مدل K16-6 با شماره روتور Nr.12256) جداسازی شدند. سپس به هر کدام از مایع های رویی جدا شده به اندازه ی سه برابر حجمی اتانول مطلق ۹۶٪ افزوده شد و در یخچال +۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از حدود ۱۲ ساعت فراورده ی زیست پلیمر در کف ظرف های استخراج رسوب کرده بود. ظرف های استخراج از یخچال بیرون آورده شد و تا حد امکان، از مایع بالایی خارج شد و باقیمانده ته هر ظرف سانتریفیوژ شد تا زیست پلیمر به طور کامل از الکل جدا شود. فراورده به دست آمده در محیط آزمایشگاه گذاشته شد تا به طور کامل خشک شود [۱۵].

و این پژوهش اولین گزارش مبنی بر بهینه سازی تولید این زیست پلیمر به واسطه ی بررسی تأثیر منبع نیتروژن از این سویه می باشد.

بخش تجربی

سویه میکروبی

سویه باکتری مورد استفاده در این پژوهش یک باکتری هوازی، غیر اسپورزا و گرم منفی می باشد که از خانواده فلاوو باکتریوم ها^(۱) بوده و در پژوهش های گذشته پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر جداسازی شده است [۱۴]. این سویه با نام *کرایتو باکتریوم ایندولوجنس MUT2* در پایگاه داده NCBI (JN831444) ثبت شده است [۱۴].

پیش کشت میکروبی

از محیط عمومی ال بی برات^(۲) برای تهیه ی مایه ی تلقیح استفاده شده است. بدین منظور یک میلی لیتر از بانک میکروبی ۸۰- درجه سلسیوس به ۱۵۰ میلی لیتر ال بی برات سترون افزوده شد و به مدت ۱۲ ساعت در همزن انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با دور ۱۷۰ rpm قرار گرفت [۱۶].

محیط کشت اختصاصی تولید زیست پلیمر

محیط کشت بهینه شده (گرم بر لیتر) شامل ساکاروز: ۲۱، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: ۱، K_2HPO_4 : ۹، $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: ۱، NH_4Cl : ۷ (برای حجم ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد). ترکیب محیط کشت مورد استفاده در پژوهش پیشین بهرامی و همکاران بهینه شده است [۱۵].

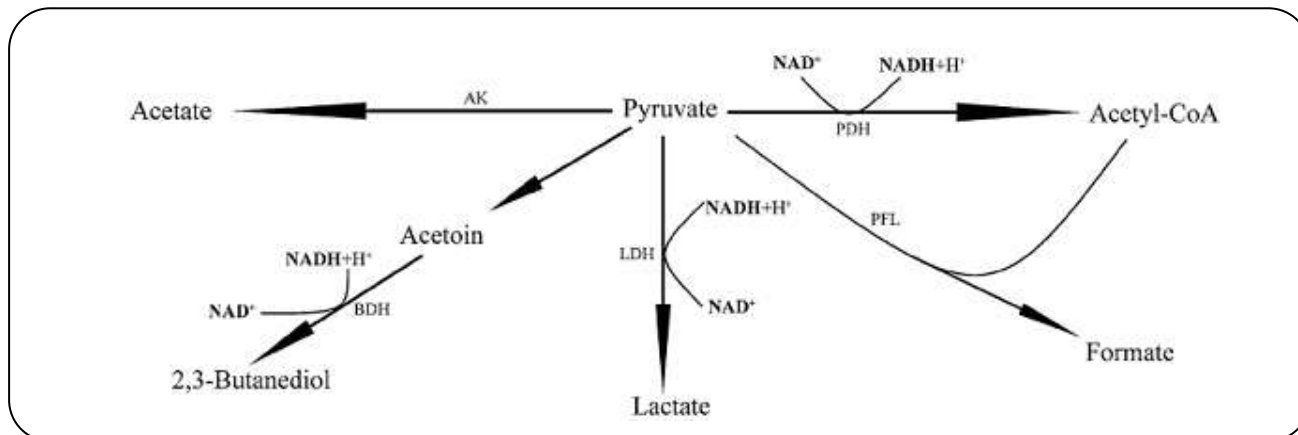
تهیه محیط کشت تولید جهت انتخاب نوع منبع نیتروژن

پنج منبع نیتروژن به عنوان جایگزینی برای گلوتامیک اسید شامل، سدیم گلوتمات، اوره، سدیم نیتريت، پتاسیم نترات و آمونیوم کلرید در نظر گرفته شدند. از آنجایی که در محیط کشت بهینه شده ی پیشین، بهینه منبع نیتروژن افزوده شده برای ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط کشت ۱/۷۶ گرم بود از این رو بنا بر محاسبه های صورت گرفته برای ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری محیط اختصاصی از پیش تهیه شده به ترتیب گلوتامیک اسید ۵/۵۴ گرم، سدیم گلوتمات

(۱) Flavobacterium

(۳) Maillard

(۲) LB Broth



شکل ۲- مسیر متابولیسی پیرویک اسید [۱۹].

نتیجه‌ها و بحث

به‌طور خلاصه نیتروژن یک محرک مثبت برای تولید زیستی پلی گاماگلوتامات بود و کاهش منبع نیتروژن روی مسیره‌های سوخت و سازی شامل گلیکولیز، سوخت و ساز هم‌چریانی و سوخت و ساز انرژی تأثیرگذار است [۲۰]. همان‌گونه که در سوخت و ساز پیرووات (شکل ۲) روشن است که، فومارات و لاکتات با کاهش منبع نیتروژن افزایش می‌یابد درحالی‌که تهیه ۲ و ۳ بوتان دی ال کاهش می‌یابد. مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهند که بهترین منبع نیتروژن در محیط تخمیر پلی گاماگلوتامات، گلوتامیک اسید بوده که منبعی بسیار گران و دور از دسترس است [۱۵]. نیتروژن یک ترکیب زیستی فعال مهم در سلول است و سه عمل زیستی را در سلول بر عهده دارد: الف) به‌عنوان منبعی برای رشد سلول عمل می‌کند ب) پذیرنده نهایی الکترون برای تولید انرژی است و ج) سبب اتلاف مقدار اضافی انرژی برای موازنه فرایند اکسایش احیا می‌شود که، افزون بر این موارد روی سوخت و ساز اسیدهای آلی هم تأثیرگذار است [۱۹].

سویه‌های مستقل از گلوتامات برای تولید پلی گاماگلوتامات باید گلوتامات را درون سلول تهیه کنند. بنابراین، سطح گلوتامات داخلی می‌تواند عامل کلیدی در محدود کردن تولید در سویه‌های مستقل باشد. گلوتامیک اسید از آلفاکتوگلوئارات به دست آمده از چرخه‌ی سیتریک اسید مشتق می‌شود. منبع کربن طی گلیکولیز به پیرووات تبدیل شده که سپس پیرووات طی چرخه‌ی سیتریک اسید به آلفاکتوگلوئارات مصرف می‌شود. از سوی دیگر، آلفا کتوگلوئارات به صورت مستقیم پیش ساز گلوتامات بوده که سرانجام، چرخه‌ی سیتریک اسید را به تولید زیستی پلی گاماگلوتامات مرتبط می‌کند

(شکل ۳). بنابراین این امر می‌تواند بیانگر این باشد که دستیابی به حد واسطه‌های چرخه‌ی سیتریک اسید (مانند سیتریک اسید، مالئیک اسید یا سوکسینیک اسید) می‌تواند میزان تأمین آلفاکتوگلوئارات را در گونه‌های مستقل از گلوتامات افزایش دهد که در نتیجه آن تولید گلوتامات مونومر تشکیل‌دهنده‌ی زیست پلیمر پلی گاماگلوتامات نیز افزایش می‌یابد [۱۳].

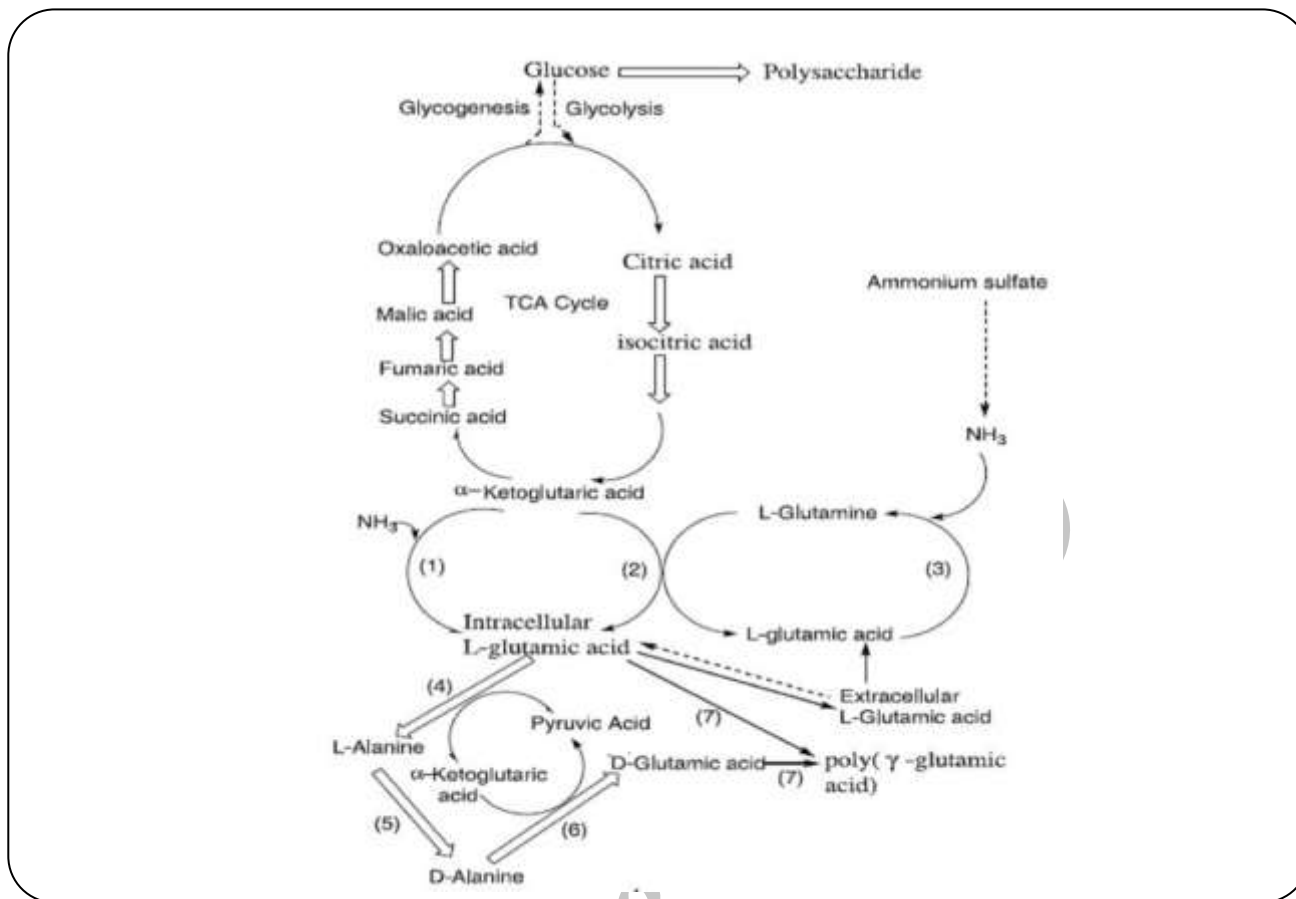
پلی گاما گلوتامات پلیمری پلی آنیونیک است که ممکن است از انانتیومرهای L,D ویا هردوی آن‌ها تشکیل شده باشد. بسیار محلول است و می‌توان با الکتروفورز روی کاغذ آن را از دیگر ترکیب‌های طبیعی جدا کرد [۲۲].

تأثیر غلظت منبع نیتروژن روی تولید زیستی پلی گاماگلوتامات

افزودن منبع نیتروژن به محیط کشت به‌طور مؤثری تولید زیستی پلی گاماگلوتامات را افزایش می‌دهد. همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است تولید پلی گاماگلوتامات با افزایش غلظت منبع نیتروژن مورد استفاده در مطالعه‌های پیشین بهرامی و همکاران (گلوتامیک اسید) تا ۲۰ گرم بر لیتر افزایش می‌یابد [۱۴، ۱۵] و همچنین فرآورده‌ی به دست آمده کیفیت دلخواه‌تری از نظر رنگ و نوع عملکرد دارد.

تأثیر منبع نیتروژن روی رشد سلولی و pH در حین تخمیر پلی گاماگلوتامات

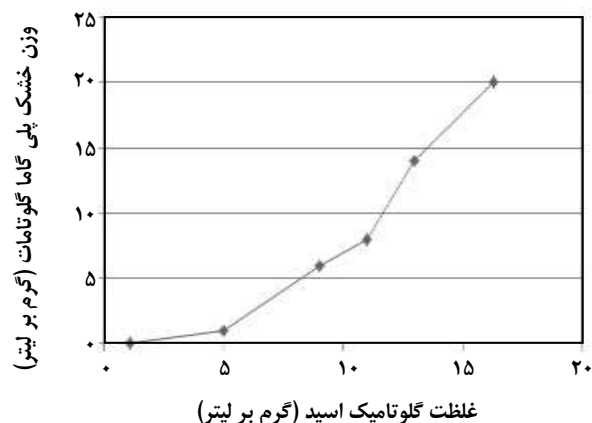
میزان زیست توده و pH، دو شاخص اساسی برای رشد سلولی و فعالیت آن هستند. شکل ۵ نشان می‌دهد که عملکرد رشد سلولی در محیط کشت‌های با و بدون منبع نیتروژن در مرحله‌های اولیه



شکل ۳- مسیر متابولیسی تولید زیستی گلوتامیک اسید [۲۱].

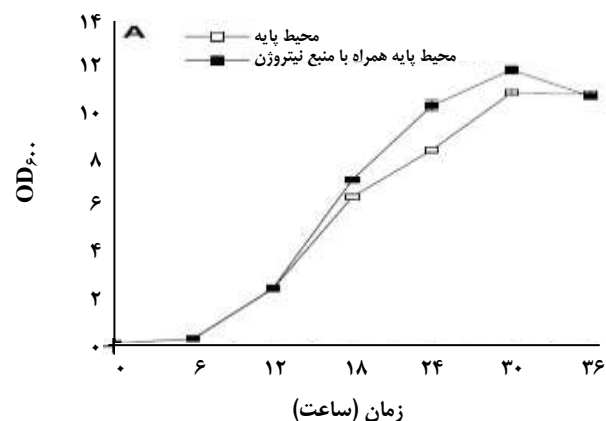
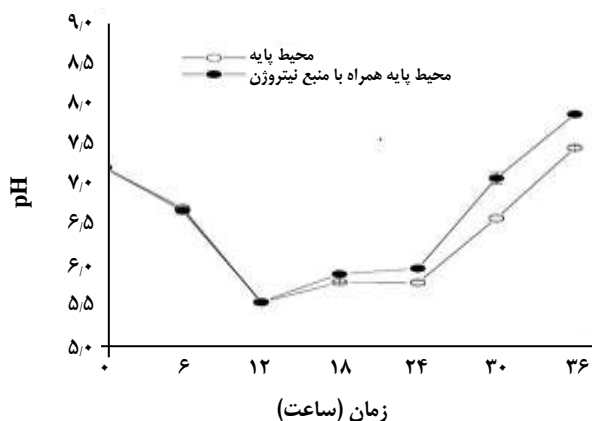
تغییر pH مایع بین محیط‌های پایه و محیط پایه همراه با منبع نیتروژن در مراحل اولیه تخمیر تا ۱۲ ساعت همانند بود، اما روند افزایش از ۱۲ تا ۳۶ ساعت در محیط پایه همراه با منبع نیتروژن بسیار تندتر از محیط پایه بود، به احتمال زیاد علت آن تجمع آمونیم به دست آمده از نیترات در محیط مایع است (شکل ۵).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که مقدار pH محیط نقش مهمی در استفاده از گلوتامات و تولید زیست پلیمر پلی گاماگلوتامات دارد [۲۳]. تا به امروز گزارش‌های زیادی مبنی بر بررسی کنترل pH در فرایند تخمیر گاما پلی گلوتامیک اسید به ثبت رسیده است، برای نمونه pH برابر با ۶/۵ برای باکتری *باسیلوس لیکنوفر میس* به ثبت رسیده است چرا که در این pH هم رشد میکروارگانیسم و هم میزان تولید پلی گاماگلوتامات در شرایط بهینه قرار دارد [۲۴]. این در حالی است که برای باکتری *باسیلوس سوتیلیس* بالاترین میزان زیست توده و بازده تولید پلی گاماگلوتامات در pH خنثی ۷ به دست آمده است [۲۵، ۲۶] اما در مطالعات انجام شده به طور معمول مقدار pH برای بهره‌وری



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های گوناگون، محیط پایه تا محیط پایه حاوی ۲۰ g/L گلوتامیک اسید، روی مقدار تولید پلی گاماگلوتامات.

تخمیر پلی گاماگلوتامات همانند است اما در آغاز ۱۲ ساعت محیط دارای منبع نیتروژن مقدار زیست توده بیشتری نسبت به محیط بدون منبع نیتروژن تولید کرده است. همانند رشد سلولی، روند



شکل ۵ - تغییر pH و میزان رشد سلولی در طول زمان در محیط پایه تولید و محیط پایه همراه با منبع نیتروژن تولید.

در این راستا شی و همکاران در سال ۲۰۰۶ میلادی پس از بهینه‌سازی محیط کشت تولید پلی گاما گلوتامات از *باسیلوس سوتیلیس*، بهترین منبع نیتروژن را گلوتامات معرفی کردند که طی آن بیش‌ترین میزان بازدهی را داشتند [۳۰، ۲۹]. *پرازتسان* و همکاران در سال ۲۰۰۶ میلادی برای تولید زیست پلیمر توسط گونه‌ی *اینتروباکتر کلوئاکا* WD7 بهترین منبع نیتروژن را آمونیوم کلرید معرفی کردند اما با وجود رشد سلولی مناسب، موجب کاهش تولید زیست پلیمر مربوطه می‌شد [۳۲، ۳۱]. *چانجووان* و همکاران برای بهینه‌سازی شرایط تولید زیست پلیمر از سویه *گومفیدیوس روتیلوس* جداشده از هاگدان یک قارچ تازه خریداری‌شده از یک بازار محلی در چین به بیش‌ترین بازده تولید زیست پلیمر مربوطه و بیش‌ترین وزن خشک سلولی در حضور پودر دانه سویا به‌عنوان منبع نیتروژن دست یافتند [۳۳]. *ویجی* و همکاران پس از بهینه‌سازی شرایط کشت تولید زیست پلیمر از سویه *کرایئوباکتریوم دانگوتنس* W65 دریافتند که تریپتون بالاترین بازده را برای تولید و رشد نشان می‌دهد [۳۴].

بررسی زیست پلیمر پلی گاما گلوتامات به کمک روش پرتوسنجی فرسوخ

پس از بهینه‌سازی و تولید ترکیب پلی گاما گلوتامات از تخمیر *فلاووباکتریوم* در پژوهش حاضر برای تأیید فراورده‌ی تولیدی توسط پرتوسنجی فرسوخ پتاسیم برمید آنالیز شد که همان‌گونه که از طیف FT-IR آن پیداست (شکل ۷). پیک‌های به دست آمده از پلی آمینواسید پلی گاما گلوتامات شامل گروه C=O اشباع‌شده با دایمر های آلیفاتیک کربوکسیلیک اسید و

از گلوتامات در نظر گرفته نشده است. بنابراین از آنجایی که ممکن است pH بهینه برای انتقال گلوتامات، در راستای pH بهینه برای رشد میکروارگانیسم و سنتز پلی گاما گلوتامات نباشد، نمی‌توان در طول فرایند تخمیر pH را روی مقدار خاصی، ثابت در نظر گرفت [۲۴، ۲۵، ۲۷، ۲۸].

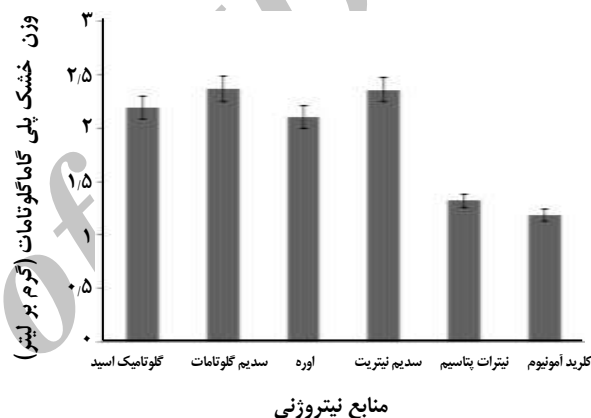
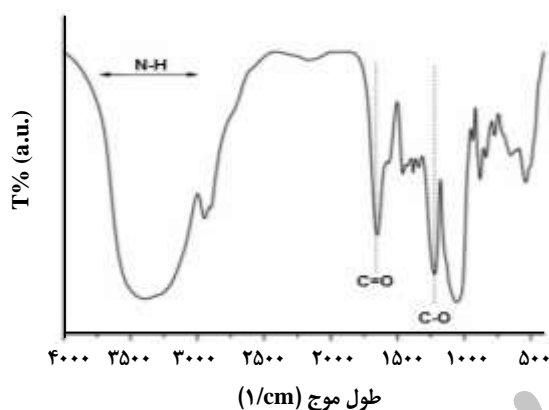
پس از خشک شدن فراورده‌های متنوعی پدید آمدند که از نظر کمیت، کیفیت، رنگ، چسبندگی و شکل ظاهری به طور کامل باهم متفاوت بودند. محیط‌هایی که دارای کمبود منبع نیتروژن بودند فراورده‌هایی بسیار چسبنده، متراکم و تیره‌رنگ تولید کردند. گستره وزنی فراورده‌ی تولیدی از کشت‌های گوناگون به شرح زیر است:

همان‌گونه که در نتیجه‌های جدول ۱ آورده شده، پس از افزودن منابع نیتروژنی گوناگون به محیط کشت در حد موردنیاز، به ترتیب سدیم گلوتامات، سدیم نیتريت، گلوتامیک اسید و اوره بیش‌ترین میزان تولید را داشتند (شکل ۶).

در توجیه نتیجه‌های به دست آمده شایان ذکر است که، فراورده‌ی تولیدی از نظر کیفیت و عملکرد ترکیب مناسبی نبود زیرا اوره به‌کاررفته در آن به‌عنوان منبع نیتروژن سبب خروج بسیاری مواد محیط کشت همراه با زیست پلیمر استخراج‌شده بود، به‌این‌ترتیب باوجود میزان تولید معقول نیز به‌عنوان منبع نیتروژن انتخاب نشد. به‌این‌ترتیب سرانجام پس از بررسی‌هایی دامنه‌دار این دست و با توجه به اینکه سدیم گلوتامات هم از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه بوده و هم در دسترس می‌باشد به‌عنوان مناسب‌ترین منبع نیتروژن برای تولید پلی گاما گلوتامات از گونه *فلاووباکتریوم* انتخاب شد.

جدول ۱- آنالیز زیست پلیمر تولیدی طی جایگزین کردن منابع نیتروژنی نامبرده (g/L).

شرایط: ۳۰ درجه سلسیوس، ۹۶h و ۱۷۰rpm				
منبع نیتروژن	آزمایش شماره ۱	آزمایش شماره ۲	آزمایش شماره ۳	میانگین
گلوتامیک اسید	۲۰،۵	۲۱،۶	۲۳،۷	۲۱،۹
سدیم گلوتامات	۲۳،۱	۲۱،۹	۲۶،۱	۲۳،۷
اوره	۲۱،۲	۱۹،۷	۲۲،۳	۲۱
سدیم نیتريت	۲۱،۵	۲۵،۵	۲۴	۲۳،۶
پتاسیم نیترات	۱۲،۴	۱۶	۱۱،۴	۱۳،۲
آمونیم کلرید	۱۱،۵	۱۱،۸	۱۲،۵	۱۱،۹



شکل ۷ - پرتو FT-IR پتاسیم برمید، پلی گاماگلوتامات تولیدشده تحت شرایط بهینه.

تخمیر پلیمرهای زیستی از گونه میکروارگانیسم‌ها، از پارامترهای بسیار مهم می‌باشد. در این پژوهش پس از انتخاب منابع نیتروژنی جایگزین گلوتامیک اسید، شامل سدیم گلوتامات، اوره، سدیم نیتريت، نیترات پتاسیم و آمونیم کلرید و انجام آزمایش‌های تعیین‌شده، به بررسی نتیجه‌ها پرداخته شد. افزودن منبع نیتروژن به محیط پایه تخمیر پلی گاماگلوتامات دارای اثرهای مثبت فراوانی است. به‌طور کلی نیتروژن دو نقش در سوخت و ساز میکروارگانیسم‌ها دارد، اول اینکه نیتروژن جایگزین اکسیژن است و به‌عنوان پذیرنده الکترون برای میکروارگانیسم‌های بی‌هوازی عمل می‌کند و دوم اینکه نیتروژن به‌عنوان منبع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ما معتقدیم که نیتروژن به‌عنوان یک گیرنده الکترون و تأمین‌کننده کمبود اکسیژن حل‌شده در حین تخمیر پلی گاما گلوتامات عمل می‌کند. این فرضیه بر اساس نتیجه‌های تجربی است.

شکل ۶ - تغییر منابع نیتروژنی جایگزین و میزان فراورده تولیدی از آن‌ها.

گروه C-O اختصاص‌یافته به دایمر کربوکسیلیک اسید و همچنین یک گروه آمیدی است که پیک ایجادشده در ۳۴۰۰ مربوط به این گروه N-H است. با مقایسه این پرتو با پرتو اصلی ترکیب پلی گاماگلوتامات، ترکیب تولیدی ما اثبات شد و به تأیید رسید.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت پلی گاماگلوتامات در بسیاری از زمینه‌ها مانند پزشکی و دارورسانی، غذایی، هیدروژل‌ها، جاذب‌های رطوبت، حامل داروها، پوشش‌های ضد خوردگی و همچنین زیست‌تخریب‌پذیر بودن و سازگاری آن با محیط‌زیست، در این پژوهش به بررسی شرایط محیط کشت تولید پلیمر زیستی پرکاربرد پلی گاما گلوتامات از گونه فلاووباکتریوم برای افزایش تولید آن پرداخته شد. با توجه به این که منبع نیتروژن در فرایند

۲۳/۷ گرم بر لیتر به دست آمد. این بیشترین میزان تولید PGA در محیط کشت پایه حاوی منبع نیتروژن سدیم گلوتمات به دست آمد. نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش می‌تواند در کمک به فرایند صنعتی شدن تولید پلیمر زیستی پلی گاما گلوتمات به‌عنوان یک پلیمر زیستی پرکاربرد در بیشتر صنایع، بسیار مفید واقع شود.

اول اینکه کاهش نیتروژن در فاز اولیه تخمیر پلی گاماگلوتمات زمانی که هنوز مقدار کمی پلی گاماگلوتمات تولید شده است آغاز نمی‌شود، بلکه در مرحله میانی تخمیر زمانی که در محیط اکسیژن حل شده وجود نداشت صورت گرفت. شاهد دیگر این فرضیه این است که pH در مراحل نهایی تخمیر افزایش می‌یابد، خواهد بود. سرانجام پس از بررسی نتیجه‌ها، بیشترین میزان تولید پلی گاما گلوتمات (PGA) از گونه باکتریایی *فلاووباکتریوم*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴

مراجع

- [1] Pham T.H., Webb J.S., Rehm B.H., [The Role of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by Pseudomonas Aeruginosa in Rhamnolipid and Alginate Production as Well as Stress Tolerance and Biofilm Formation](#), *Microbiology*, **150**: 3405-3413 (2004).
- [2] Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J., [Role of Polysaccharides in Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Development](#), *Current Opinion in Microbiology*, **10**: 644-648 (2007).
- [3] Alemzadeh I., [The Study on Microbial Polymers: Pullulan and PHB](#), *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **28**(1): 13-21 (2009).
- [4] Schneider J., Wendisch V.F., [Biotechnological Production of Polyamines by Bacteria: Recent Achievements and Future Perspectives](#), *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**: 17-30 (2011).
- [5] Adkins J., Pugh S., McKenna R., Nielsen D.R., [Engineering Microbial Chemical Factories to Produce Renewable Biomonomers](#), *Frontiers in Microbiology*, **3**: 313- (2012).
- [6] Ashiuchi M., Yamamoto T., Kamei T., [Pivotal Enzyme in Glutamate Metabolism of Poly-g-Glutamate-Producing Microbes](#), *Life*, **3**: 181-188 (2013).
- [7] Oppermann-Sanio F., Steinbüchel A., [Occurrence, Functions and Biosynthesis of Polyamides in Microorganisms and Biotechnological Production](#), *Naturwissenschaften*, **89**: 11-22 (2002).
- [8] Joentgen W., Groth T., Steinbüchel A., Hai T., Oppermann F., [Polyaspartic Acid Homopolymers and Copolymers: Biotechnical Production and Use Thereof](#), *US 6180752 B1* (1998).
- [9] Schwanborn M., Joentgen W., [Chemical Synthesis of Polyaspartates. a Biodegradable Alternative to Currently Used Polycarboxylate Homo-and Copolymers](#), *Chimica Oggi*, **16**: 36-40 (1998).
- [10] Oppermann-Sanio F.B., Steinbüchel A., [Cyanophycin](#), *Biopolymers Online*, 10.1002/3527 (2003).
- [11] Voss I., Diniz S.C., Aboulmagd E., Steinbüchel A., [Identification of the Anabaena sp. Strain PCC7120 Cyanophycin Synthetase as Suitable Enzyme for Production of Cyanophycin in Gram-Negative Bacteria Like Pseudomonas p Utida and Ralstonia e Utopha](#), *Biomacromolecules*, **5**: 1588-1595 (2004).

- [12] Sun K., Kasperski A., Tian Y., Chen L., [Modelling of the Corynebacterium Glutamicum Biosynthesis Under Aerobic Fermentation Conditions](#), *Chemical Engineering Science*, **66**: 4101-4110 (2011).
- [13] Zhang H., Zhu J., Zhu X., Cai J., Zhang A., Hong Y., Huang J., Huang L., Xu Z., [High-level Exogenous Glutamic Acid-Independent Production of Poly-\(\$\gamma\$ -glutamic acid\) with Organic Acid Addition in A New Isolated Bacillus Subtilis C10](#), *Bioresource Technology*, **116**: 241-246 (2012).
- [14] Ghafari M., Bahrami A., Rasooli I., Arabian D., Ghafari F., [Bacterial Exopolymeric Inhibition of Carbon Steel Corrosion](#), *International Biodeterioration & Biodegradation*, **80**: 29-33 (2013).
- [15] Khani M., Bahrami A., Ghafari M.D., [Optimization of Operating Parameters for Anti-Corrosive Biopolymer Production by Chryseobacterium Indologenes MUT. 2 Using Central Composite Design Methodology](#), *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, (2015).
- [۱۶] خوانچه زر سیروان، هاشمی نجف آبادی سمیره، محمدیان موسی آبادی جعفر، خلیل زاده رسول، اسفندیار سمانه، بهینه سازی شرایط کشت باکتری اشرشیا کولی برای اصلاح تولید قطعه C-D نو ترکیب باکتریورودوپسین، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۳۲(۲): ۹۳ تا ۱۰۱ (۱۳۹۲).
- [۱۷] خواجوی رامین، مفتاحی امین، جهانگیریان اصفهانی ابراهیم، ستاری مرتضی، سنتز سلولز میکروبی از سویه بومی و بررسی شبکه نانو الیافی به دست آمده از ساکاریدهای گوناگون، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۳ - ۴) ۳۱ : ۷۹ تا ۹۳ (۱۳۹۱).
- [18] Osman M., Eid M., Khattab O., Abd-El All S., El-Hallouty S., Mahmoud D., [Optimization and Spectroscopic Characterization of the Biosynthesized Silver/Chitosan Nanocomposite from Aspergillus deflectus and Penicillium Pinophilum](#), *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences (JCBPS)*, **5**: 2643-2655 (2015).
- [19] Li X., Gou X., Long D., Ji Z., Hu L., Xu D., Liu J., Chen Sh., [Physiological and Metabolic Analysis of Nitrate Reduction on Poly-Gamma-Glutamic Acid Synthesis in Bacillus Licheniformis WX-02](#), *Archives of microbiology*, **196**: 791-799 (2014).
- [20] Mohajer D., Tayebee R., [Influence of Nitrogen Bases on Epoxidation of Cyclooctene with Sodium Periodate Catalysed by Manganese \(III\) Porphyrins](#), *Iran. J. Chem. Chem Eng. (IJCCE)*, **18**(1): 27-29 (1999).
- [21] Kumar R., Vikramachakravarthi D., Pal P., [Production and Purification of Glutamic Acid: A Critical Review Towards Process Intensification](#), *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **81**: 59-71 (2014).
- [22] Hosseini S.A., Yaghmaei S., Mousavi S.M., Jadidi A.R., [Biodesulfurization of Dibenzothiophene by a Newly Isolated Thermophilic Bacteria Strain](#), *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **25**(3): 67-71 (2006).

- [23] Kamali M., Ghorashi S.A.A., Asadollahi M.A., [Controllable Synthesis of Silver Nanoparticles Using Citrate as Complexing Agent: Characterization of Nanoparticles and Effect of pH on Size and Crystallinity](#), *Iran. J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **31**(4): 21-29 (2012).
- [24] Cromwick A.M., Birrer G.A., Gross R.A., [Effects of pH and Aeration on \$\gamma\$ -poly \(Glutamic Acid\) Formation by *Bacillus Licheniformis* in Controlled Batch Fermentor Cultures](#), *Biotechnology and Bioengineering*, **50**: 222-227 (1996).
- [25] Wu Q., Xu H., Ying H., Ouyang P., [Kinetic Analysis and pH-Shift Control Strategy for Poly \(\$\gamma\$ -glutamic acid\) Production with *Bacillus Subtilis* CGMCC 0833](#), *Biochemical Engineering Journal*, **50**: 24-28 (2010).
- [26] Shoja A.S., Khalilzadeh R., Sanaei H.R., ["Optimizing of SCP Production from Sugar Beet Stillage Using Isolated Yeast,"](#) (1998).
- [27] Mitsunaga H., Meissner L., Palmen T., Bamba T., Büchs J., Fukusaki E., [Metabolome Analysis Reveals the Effect of Carbon Catabolite Control on the Poly \(\$\gamma\$ -glutamic acid\) Biosynthesis of *Bacillus Licheniformis* ATCC 9945](#), *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **121**(4): 413-419 (2016).
- [28] Zhang D., Xu Z., Xu H., Feng X., Li S., Cai H., Wei Y., Ouyang P., [Improvement of Poly \(\$\gamma\$ -glutamic acid\) Biosynthesis and Quantitative Metabolic Flux Analysis of a Two-Stage Strategy for Agitation Speed Control in the Culture of *Bacillus Subtilis* NX-2](#), *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **16**: 1144-1151 (2011).
- [29] Shi F., Xu Z., Cen P., [Optimization of \$\gamma\$ -Polyglutamic Acid Production by *Bacillus Subtilis* ZJU-7 Using a Surface-Response Methodology](#), *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **11**: 251-257 (2006).
- [30] Ye-wei Z., Xue-tuan W., Zhong-bo H., Ming-fang L., Lin X., Hui-zhou L., [Optimization of \$\gamma\$ -Polyglutamic Acid Production by *Bacillus licheniformis* P-104](#), *The Chinese Journal of Process Engineering*, **2**: 020 (2012).
- [31] Yokoi H., Natsuda O., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y., [Characteristics of a Biopolymer Flocculant Produced by *Bacillus sp.* PY-90](#), *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **79**: 378-380 (1995).
- [32] Yan S., Yao H., Chen Z., Zeng S., Xi X., Wang Y., He N., Li Q., [Poly- \$\gamma\$ -glutamic Acid Produced from *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876 as a Potential Substitute for Polyacrylamide in the Sugarcane Industry](#), *Biotechnology Progress*, (2015).
- [33] Gao C., Wang Z., Su T., Zhang J., Yang X., [Optimisation of Exopolysaccharide Production by *Gomphidius Rutilus* and Its Antioxidant Activities in Vitro](#), *Carbohydrate Polymers*, **87**: 2299-2305 (2012).
- [34] Liu W., Wang K., Li B., Yuan H., Yang J., [Production and Characterization of an Intracellular Bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 Cultured in Low Nutrition Medium](#), *Bioresource technology*, **101**: 1044-1048 (2010).