Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره اول، شماره سوم، تابستان ۱۳۹۰

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی یک باکتری بومی تولید کننده بیوپلیمر پلی هیدروکسی آلکانوات (PHA) و بررسی تولید آن تحت شرایط مختلف رشد سلول

زهرا گودرزی[۲]، حسین شهبانی ظهیری*[۱]، کامبیز اکبری نوقابی[۳]، محمد چمنی[۴]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
[۳] استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
[۴] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه وهدف: امروزه با توجه به مصرف بسیار زیاد پلیمرهای مقاوم به تخریب زیستی از جمله انواع پلاستیک ها در بسته بندی مواد غذایی، کالا و همچنین استفاده از کیسه های پلاستیکی برای جابجایی و حمل زباله مشکل بزرگ تجمع ضایعات پلیمری در طبیعت به وجود آمده است. یکی از راه ها برای حل این مشکل تولید پلیمر های زیست تخریب پذیر می باشد.

مواد و روش ها: باکتری تولید کننده پلیمر پلی هیدروکسی آلکانوآت (PHA) از نمونه های محیطی جدا سازی شد. این سویه باکتریایی با روش های شیمیایی و مولکولی از طریق تعیین توالی ژن 16s rDNA شناسایی گردید. تولید PHA توسط این باکتری با استفاده از کروماتوگرافی گازی و ستون HP-۵ تحت شرایط مختلف کشت اندازه گیری شد.

یافته ها: در این مطالعه باکتری بومی تولید کننده PHA بعنوان Bacillus thuringiensis ZK ۸۶ شناسایی گردید. شرایط مناسب برای تولید این پلیمر دمای ۳۷ C^o، pH=۷ و هوادهی در ۱۵۰= rpm تعیین گردید. تحت این شرایط بیشترین میزان تولید حدود ۰/۳۶۷ گرم در لیتر با منبع گلوکز پس از کشت به مدت ۷۲ ساعت بدست آمد و ۳۵٪ از وزن خشک سلولی را پلیمر تشکیل داد.

نتیجه گیری: این مقاله اولین گزارش از تولید PHA توسط سویه باسیلوس تورینجنسیس بومی ایران می باشد که در طی آن شناسایی باکتری تولید کننده و روش های تولید و اندازی گیری میزان و نوع پلیمر تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: باسیلوس، پلی هیدروکسی آلکانوات، پلیمر زیست تخریب پذیر

مقدمه

یکی از راه کارهای مهم برای حل مشکل تجمع ضایعات پلیمری در طبیعت، استفاده از پلیمر های زیست تخریب پذیر است. گروهی از انواع پلیمرهای زیست تخریب پذیر پلی هیدروکسی آلکانوات ها (PHAs) وکوپلیمر های آن ها می باشند (Nderson et al., 1990).

پلی هیدروکسی آلکانوات ها، پلی استرهای هیدروکسی آلکانوات ها هستند و وزن مولکولی آن ها بر حسب نوع میکروارگانیسم و شرایط رشد در محدوده ۲×۱۰^۵ تا ۳×۱۰^۶ دالتن قرار دارند (Lenz et al., 2005). پلی هیدروکسی آلکانوات ها توسط دامنه وسیعی از باکتری ها در شرایط خاص تولید می شوند. تقریبا ۳۰۰ نوع میکروارگانیسم، شامل انواع گرم مثبت و منفی شناسایی شده که قادر به ذخیره سازی انواعی از PHAs از جمله PHB وPHV به عنوان منبع ذخیره کربن در داخل سلول خود می باشند (kim et al.,1998). از ویژگی های پلی هیدروکسی آلکانوات ها می توان به خاصیت زیست تخریب پذیری، سازگاری با سیستم های حیاتی، طبیعت پلی استری و خاصیت ترمو پلاستیکی اشاره کرد

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند
Email: shahbanih@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۲۴

www.SID.ir

Archive of SID

(Brandl et al.,1990). این ویژگی ها سبب کاربرد های فراوان PHAs از جمله برای سنتز شیمیایی مواد فعال نوری که فقط در شکل فضایی خاصی دارای فعالیت های بیولوژیکی اند مثل داروها، جداسازی ایزومر های نوری در کروماتوگرافی، آزاد سازی کنترل شده داروها و حشره کش ها، انواع صفحات و جایگزین های استخوانی (پروتز ها)، نخ و دستکش های جراحی، جایگزین عروق خون و در نهایت بسته بندی شده است (Griffin et al.,1990. Dio et al.,1994). عوامل زیادی در تعیین قیمت PHAs نقش ایفاء می کنند که از جمله آن ها می توان به نوع میکروارگانیسم، قیمت محیط های کشت و روش های جدا سازی و استخراج بیوپلیمر از سلول باکتری اشاره کرد. در راستای این مسئله در این پژوهش بررسی هایی روی باکتری بومی تولید کننده PHA و تاثیر شرایط رشدی شامل دما، pH و منبع کربن محیط کشت باکتری و سرعت بهم زدن شیکر (هوادهی) روی میزان تولید بیوپلیمر انجام گرفت.

مواد و روش ها

مواد

در این پژوهش، از ۳- هیدروکسی بوتیریک اسید برای اندازه گیری کمی ۳-هیدروکسی بوتیرات (3-hydroxy-butyrate,3HB) و از کوپلیمر PHAs که شامل ۸۸ درصد وزنی 3HB و 12 درصد وزنی ۳- هیدروکسی والرات (3-hydroxy-valerate, 3HV) بود برای اندازه گیری کمی 3HV استفاده شد که هر دو محصول شرکت Sigma آمریکا بودند. مواد شیمیایی به کار رفته با خلوص آزمایشگاهی و از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

دستگاه ها

در این پژوهش به منظور شناسایی و اندازه گیری PHAs رنگ نگاری گازی (GC) مدل 6890N/MASS ساخت شرکت Agilent Technology با ستون موئین (HP-5) با قطر داخلی 0.25 mm و طول 30m به کار گرفته شده است.

روش ها

جداسازی باکتری

به منظور یافتن باکتری بومی تولید کننده ی PHAs از خاک های آلوده به پساب کارخانه ی دلستر سازی بهنوش استفاده گردید. پس از تهیه نمونه های خاک، عصاره رقیق خاک تهیه گردید. سپس مقدار ۱ ml از عصاره خاک در پتری های حاوی محیط NA ریخته و به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ C^o انکوبه شد. پس از رشد میکروارگانیسم های مختلف در پتری ها، کشت های مداوم از کلنی های مشخص برای خالص سازی کلنی ها صورت گرفت. با استفاده از رنگ آمیزی سودان سیاه باکتری تولید کننده PHA شناسایی گردید و سپس به محیط تولید PHA برده شد و مقدار PHA تولیدی توسط آن تحت شرایط مختلف رشد باکتری اندازه گیری گردید (Shamala et al., 2003)..

شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

خصوصیات مورفولوژیکی ایزوله طبق کتاب باکتری شناسی Bergey بررسی گردید (Holt jc et al.,1993). شناسایی بیوشیمیایی سویه مورد با توجه به تست های بیوشیمیایی مختلفی شامل کاتالاز، اکسیداز، سیترات، احیا نیترات، نشاسته و حرکت انجام گرفت.

شناسایی مولکولی

آنالیز توالی ژن ۱۶s rRNA به طورگسترده ای برای تعیین گونه های باکتریایی و انجام مطالعات تاکسونومیکی استفاده شده است. ژن ۱۶srRNA باکتریایی شامل ۹ ناحیه ژنی بسیار متغیر[1] هستند که تنوع توالی ها را در بین گونه های باکتریایی نشان می دهند (Soumitesh and Danica, 2007). به این منظور در ابتدا DNA ژنومی باکتری استخراج شد و سپس توسط دو پرایمر یونیورسال باکتریایی پرایمر های مورد استفاده شامل: 27F 5`AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3` و 1492R 5`TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T3` ناحیه ۱۶s rRNA باکتری، با استفاده از دستگاه PCR تکثیر گردید. بعد از این مراحل، ناحیه تکثیر شده ی ۱۶s rRNA تعیین توالی شده و سپس توالی های اسید نوکلئوئیکی مربوطه برای یافتن باکتری های مشابه در این توالی ها در سایت NCBI مورد جستجو قرار گرفت، سپس با استفاده از این توالی های هومولوگ، با استفاده از نرم افزار MEGA 4 شجره مرتبط به این باکتری رسم گردید.

تولید بیوپلیمر

باکتری به منظور رشد مناسب در محیط غنی LB به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و ۱۵۰ rpm رشد داده شد (NaCl 10g, Yeast extract 5g, Tryptone 10g Distilled water 1lit).

1.Hyper variable region

www.SID.ir

Archive of SID

محیط برای به دست آوردن سلول های رسوب یافته سانتریفیوژ شد و با ۱۰ ml آب استریل شده شستشو گردید. باکتری های حاصل برای تولید PHA به محیط مینیمال M_1 که دارای حداقل نیتروژن بود تلقیح گشته و باکتری ها به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷°C و با دور شیکر ۱۵۰rpm در این محیط رشد داده شدند. این محیط از ترکیب اجزای زیر تهیه گردید ($CaCl_2$,$KHPO_4$ 2.3 g, $Na_2HPO_4.12H_2O$ 7.3 g,) $(NH4)_2SO_4$ 1.06 g $MgSO_4.7H_2O$ 10ml Glucose 12 g, 2ml .Microelement Solution 2ml,sterilized (water 1 Liter (kato et al.,1996). به منظور بررسی تاثیر شرایط رشد باکتری در میزان تولید PHA، عوامل فیزیکی و شیمیائی متفاوتی از جمله تاثیردمای محیط کشت شامل ۴۱-۳۷-۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد، pH شامل (۹-۷-۵) و دور همزن (rpm) شامل ۰-۲۰۰-۱۵۰ مورد مطالعه قرار گرفته و در ضمن تاثیر منابع متفاوت کربن در محیط کشت شامل(گلوکز، فروکتوز، مالتوز) نیز بر میزان تولید PHA مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج و تعیین مقادیر PHA

باکتری های کشت شده در محیط M_1 با آب استریل شستشو داده شدند و پس از سانتریفیوژ سلول های رسوب یافته حاصله در دستگاه آون خشک گردیدند. به منظور استخراج PHA مقدار ۲۰ mg از سلول های خشک باکتری را وزن کرده و به آن ۲ ml کلروفرم، ۷۵۰ µl متانول (حاوی ۴ mg/ml /۰اسید بنزوئیک) ،۱۵۰ µl اسید سولفوریک اضافه شد. قبل از بستن در لوله ، یک ورقه تفلون سر لوله گذاشته شد تا از خروج گاز جلوگیری گردد. لوله را به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰°C قرار داده و سپس ۱۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک قرار گرفت، بعد از آن به مدت ۲ ساعت در آب جوش ۱۰۰°C قرار داده شد. در مرحله بعدی ۱ ml آب دو بار تقطیر به نمونه سرد شده افزوده گردیده و به مدت ۱ دقیقه بر روی شیکر شدیدا تکان داده شد، در نهایت بعد از جدایی فازها، فاز پائینی برای بررسی های GC آماده بود. در هر سری از کار مقدار ۱ µl از فاز حاوی PHA به دستگاه GC تزریق گردید. با توجه به تهیه منحنی های استاندارد PHB و PHV مقایسه نمونه ها با استانداردها به منظور برآورد کمی PHB و PHV در نمونه ها صورت گرفت. لازم به ذکر است که در این پژوهش، تمام آزمایش ها سه مرتبه تکرار و نتایج با سطح اطمینان بیش از ۹۰ درصد معنی دار بوده است.

یافته ها و بحث

شناسایی باکتری

خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی خصوصیات مورفولوژیکی ایزوله بر طبق کتاب باکتری شناسی Bergey بررسی گردید (Holt et al.,1993). کلنی های باکتری کرم رنگ کروی و با حاشیه مضرس مشاهده گردیدند. نتایج تست های بیوشیمیایی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱- نتایج خصوصیات بیوشیمیایی باکتری جداسازی شده

Chracteristics	
Morphological characteristics	
Shape	Rod
Motility	+
Gram staining	+
Spore formaition	+
Features of colonies	
Shape	Circulare
Color	Off-white
Physiological characteristics	
Catalase	+
Oxidase	+
Redaction of nitrate	+
SIM	+
Growth temperature	25-41
Nutritional characteristics	
Starch	+
Lesitinase	—
Glucose	+
Fructose	+

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی‌مولکولی

به منظور شناسایی مولکولی ناحیه 16S rRNA باکتری توسط PCR تکثیر شد و محصول PCR توسط شرکت Seq lab آلمان توالی یابی گردید که در شکل شماره ۱ آورده شده است و سپس با استفاده از نرم افزار BLAST توالی های مشابه از بانک ژن موجود در سایت NBCI با باکتری های جداشده مقایسه گردید (*B. thuringiensis*, با 99% ،99% با X5 *cereus* و 99% با MG209 *B.cereus*).

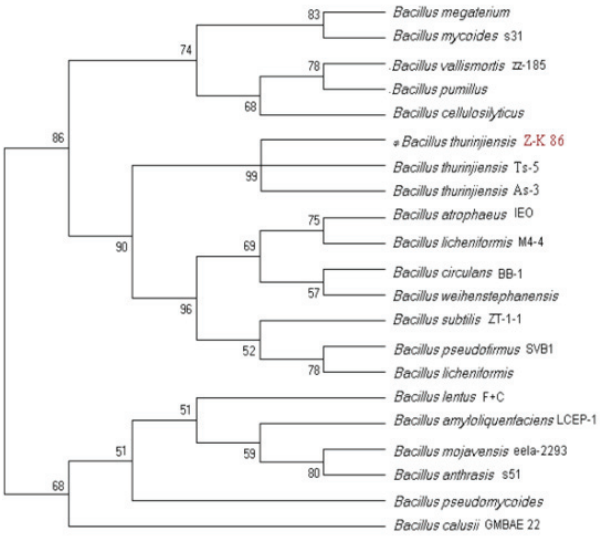
با در نظر گرفتن قرابت تکاملی سویه جداسازی شده تحت عنوان فرضی باسیلوس تورنجینزیس نامگذاری گردید. در نهایت با استفاده از نرم افزار MEGA 4 درختچه ژنتیکی باکتری رسم گردید، که در شکل ۲ قابل مشاهده می باشد.

GACTCTCGTTCGAAGTAGTAGCGAGCTGACGTAAATCGGGCA
ATACCGTCCAATGGGTGCACAAGAGTGGGCAGGGGCGATGAA
AATAGGCCATAATCGGGGCCAAAGGGCCTCAATAGGGTCAGA
TCGGCTTCGGCGGAAAGTTAAAGCTTGGTACGTCAAGTTTTAC
GAGTGGTTGATCGATTACGCTGCGCCCAGGTAGGTATTCACTG
GAGAGTCCAGCCGATGCGTAGCAACGGAACCACTCGGCAATG
TCCTCAGACCCGGCACAGAGTCAGGGTCACACCGGCTAGTGG
TGAAAGCAGGTAACGCCTTCTAAGGGATGACGACGGAGGGCA
CTGGGCTTTCGGAAGTAGTGAGTGCGCCGCAACGAGGCAGTC
AATAAGTTGATCGTGAACAAGAAGGGATTGTTGTCTCAAAATG
CAATCGGCACCGAAAGACCAATCCATGGCAGTTCCACGGTCG
ATTGCGAACGGTGGATGCATAATGGCGCCGACGACCGTGCAT
AATTCTTTGGTGGACGCGCGCGAAATGCGGGTTATTAAGGCCT
GTTACTGGGAGGTGCCAACTCGGCACCCGAAAGTGTAGTCTG
CCTTAAGGTGAAAGGAGAAGACGTGAGTTCAGAGGGTCAAAG
GACCACAAGGAGGTATAGAGATGCGTAAAGTGGCGATGTGTA
CGCGGAGTCACAGTCAATGTCTGGTCTTTCAGCGGAAGCGGT
CCTGATGGTCCCATAGATTAGGACAAACGAGGGGTGCGAAAG
CCCGCCTTTGGGAGATTGTGAATCGTGAGTAGCAAATGCCGCA
TGAGGGGTCCGCCTCACGAATTTACGCATTAAGTCGTGATTTT
AAAGTTCGGACGCCGGCA

شکل ۱- توالی ۱۶s rRNA سویه 68KZ

بررسی تاثیر فاکتورهای فیزیکی و شیمیائی مختلف از قبیل دما، pH و منبع کربن بر روی میزان تولید PHA

با توجه به مزوفیل بودن باکتری باسیلوس امکان رشد و زندگی باکتری در دماهای ۲۰-۵۰ °C امکان پذیر می باشد. لیکن تغییر دمای رشد باکتری به طور مستقیم بر میزان تولید PHA تاثیر گذار است. نتایج نشان داد که باکتری ZK8 در دمای ۲۵ °C رشد کمتر و در نتیجه تولید بیوپلیمر کمتری داشت، اما با افزایش دما به



شکل ۲- درختچه فیلوژنتیکی سویه باکتریائی (Bacillus thuringiensis ZK86) تولید کننده PHA

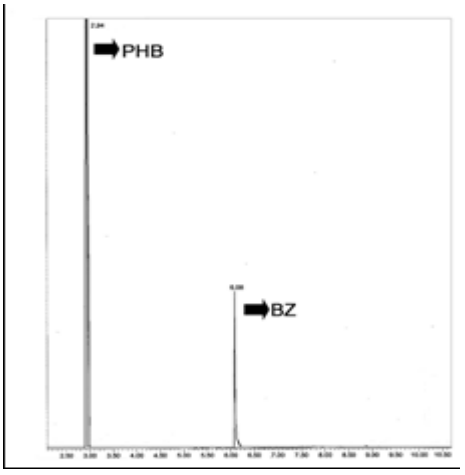
۳۷° C، رشد بیشتر و تولید بیشتری دیده شد به طوری که حداکثر میزان تولید پلیمردر دمای ۳۷° C به میزان ۰/۳۶ گرم در لیتر صورت گرفت. در ادامه با افزایش دما به ۴۱° C میزان تولید نسبت به تولید در دمای ۳۷° C کاهش یافت. تصور می شود علت این پدیده ها از یک سو حساسیت آنزیم های درگیر در تولید بیوپلیمر به حرارت بالا و کاهش فعالیت آن ها می باشد و از سوی دیگر مصرف مقداری از انرژی برای نگهداری سلول ها در دمای بالا می باشد که به این ترتیب میزان تولید کاهش می یابد. نمودارهای GC مربوط به PHA استخراجی در شرایط دمایی مختلف در اشکال ۵،۴،۳،۶ و هم چنین نتایج در جدول۲ و شکل ۷ آورده شده است. با نظر به این که سیستم تخمیری این پژوهش، سیستم غیر مداوم به صورت ارلن لرزان است با تغییر دور شیکر تاثیر مقادیر متفاوت هوا دهی بر تولید PHA بررسی شده که با توجه به هوازی بودن باکتری مورد نظر، در شرایط استاتیک (بدون هم زدن) رشد باکتری مختل و منجر به تولید PHA به صورت بسیار جزئی به میزان ۰/۰۰۱۴ گرم در لیتر گردید در حالی که حداکثر تولید PHA در ۱۵۰ rpm به میزان ۰/۳۶ گرم در لیتر صورت گرفت. نمودارهای GC مربوط به PHA استخراجی در سرعت های متفاوت هوادهی در اشکال شماره ۹،۸ و ۱۰ و هم چنین نتایج در شکل ۱۱و جدول شماره ۳ نشان داده شده است.

معمولا باکتری ها درمحیط های با دامنه ی pH=۵-۷ قادر

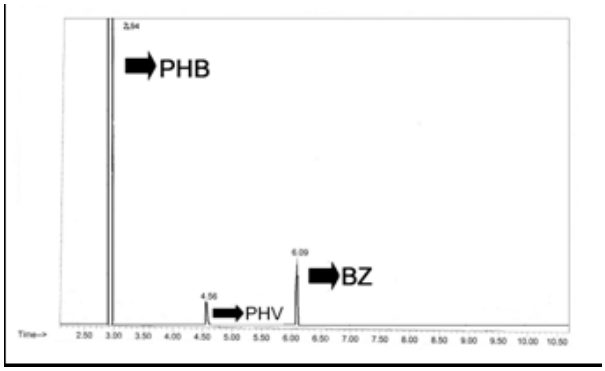
www.SID.ir

Archive of SID

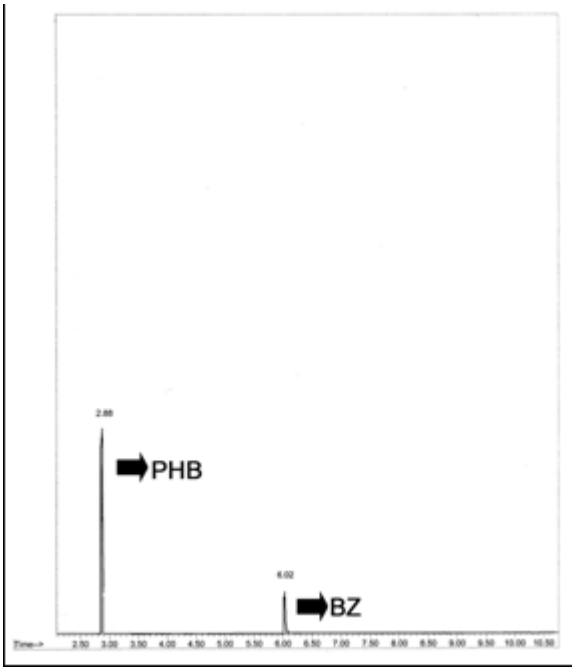
به رشد و زندگی هستند. در تحقیق حاضر تاثیر pH بر رشد باکتری و بالتبع آن تولید PHA به گونه ای است که حداکثر تولید در$pH=7$ به میزان ۰/۳۶گرم در لیتر حاصل گردید. نمودارهای GC مربوط به PHA استخراجی در محیط کشت هایی با pH متفاوت در اشکال ۱۲ و ۱۳ و همچنین نتایج در جدول۴ و شکل ۱۴ آورده شده است. نتایج به دست آمده از مطالعه تاثیر منابع کربن مختلف بر روی تولید بیوپلیمر PHA توسط سویه ZK86 نشان داد که گلوکز، فروکتوز و مالتوز به عنوان سوبسترای تولید PHA می توانند توسط باکتری مورد نظر استفاده قرار گرفته و حداکثر تولید مربوط به منبع کربن گلوکز به میزان ۰/۳۶ گرم در لیتر مشاهده گردید. نمودارهای GC مربوط به PHA استخراجی درمحیط های کشت با منابع کربنی متفاوت در اشکال ۱۶،۱۵و۱۷ و هم چنین نتایج در جدول۵ و شکل ۱۸ نشان داده شده است



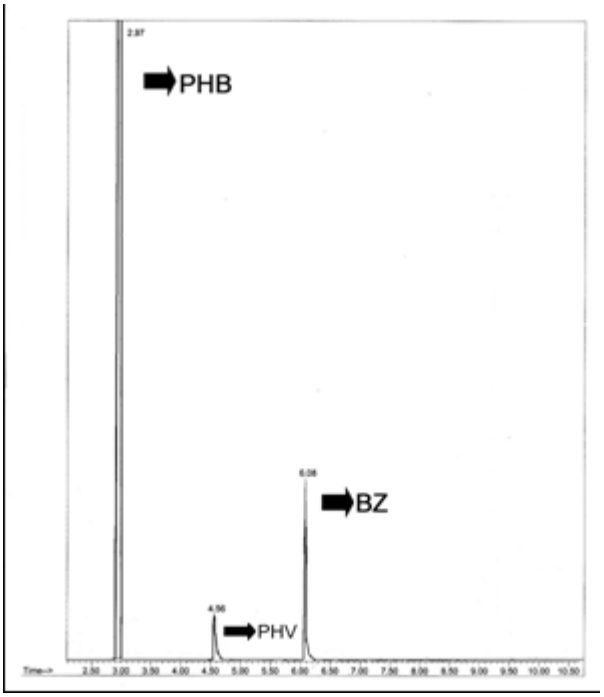
شکل۳- نمودارGC مربوط بهPHA استخراجی در شرایط دماییC ° ۲۵



شکل ۴- نمودارGC مربوط بهPHA استخراجی در شرایط دمایی C ° ۳۰



شکل ۵- نمودار GC مربوط به PHA استخراجی در شرایط دمایی C ° ۲۵



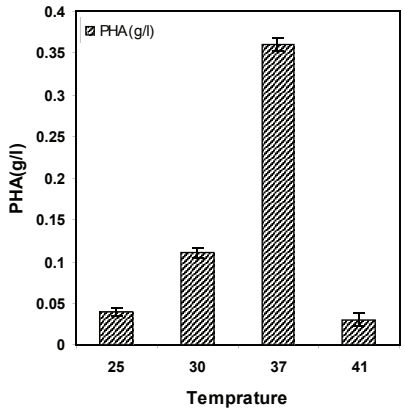
شکل ۶- نمودار GC مربوط به PHA استخراجی در شرایط دمایی ° C ۴۱

www.SID.ir

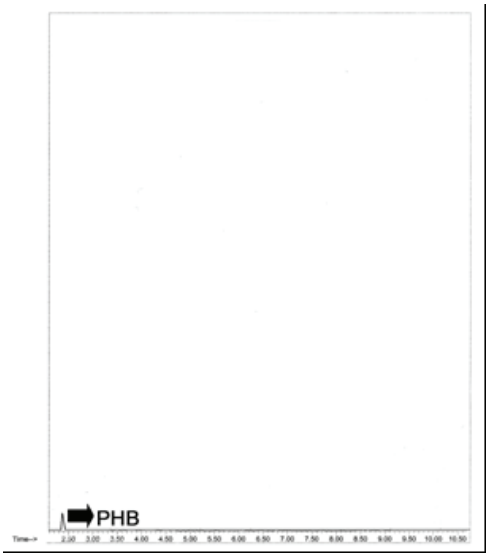
Archive of SID

جدول ۲- میانگین PHA استخراج شده (g/l) از محیط کشت هایی تحت شرایط دمایی متفاوت (سه تکرار)

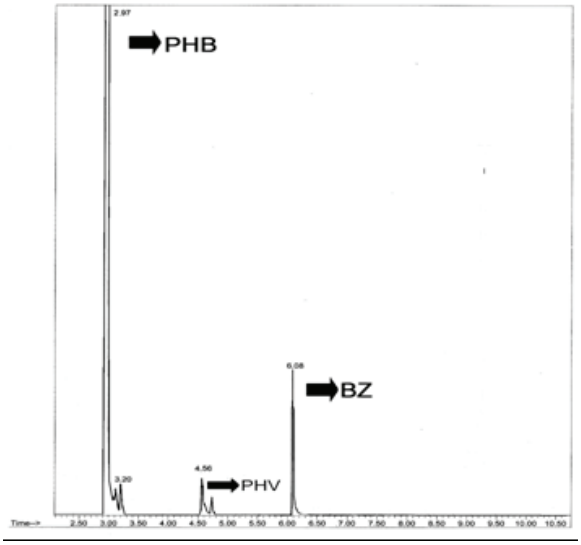
زمان (ساعت) / دما(درجه سانتی گراد)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۲۵	۰/۰۲۱	۰/۰۲۷	۰/۰۳۹	۰/۰۲۷
۳۰	۰/۰۲۷	۰/۰۵۲	۰/۱۱۰۵	۰/۰۹۹
۳۷	۰/۰۵۸	۰/۱۲۶	۰/۳۶	۰/۱
۴۱	۰/۰۲۱	۰/۰۲۷	۰/۰۳	۰/۰۲۱



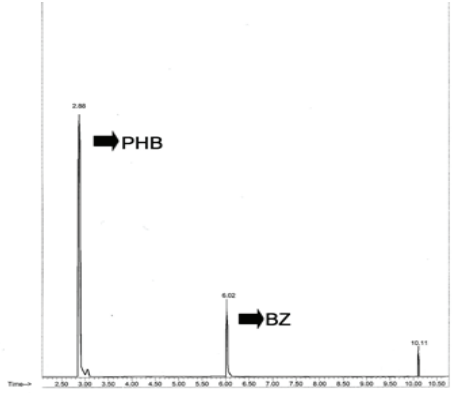
شکل۷- نمودار مربوط به PHA تولید شده تحت شرایط متفاوت دمایی



شکل ۸- نمودار GC مربوط به PHA استخراجی در شرایط ۰ رشد استاتیک و بدون هوادهی و همزدن. همان طور که مشاهده می شود تاثیر هوادهی بر تولید پلیمر حائز اهمیت فراوانی می باشد.



شکل ۹- نمودار GC مربوط به PHA استخراجی در شرایط با دور هوادهی (۱۵۰rpm)



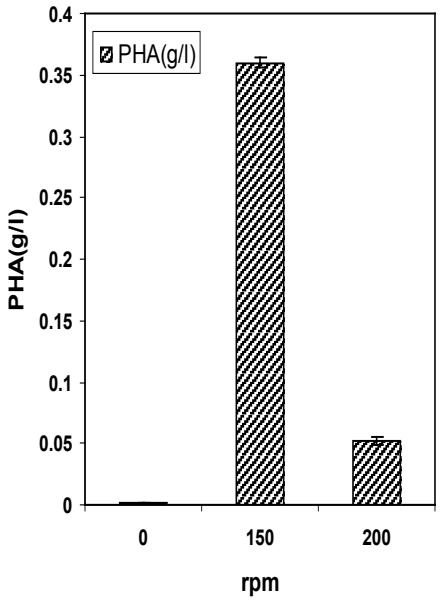
شکل ۱۰- نمودار GCمربوط به PHAاستخراجی در شرایط با دورهوادهی و همزن ۲۰۰rpm

www.SID.ir

Archive of SID

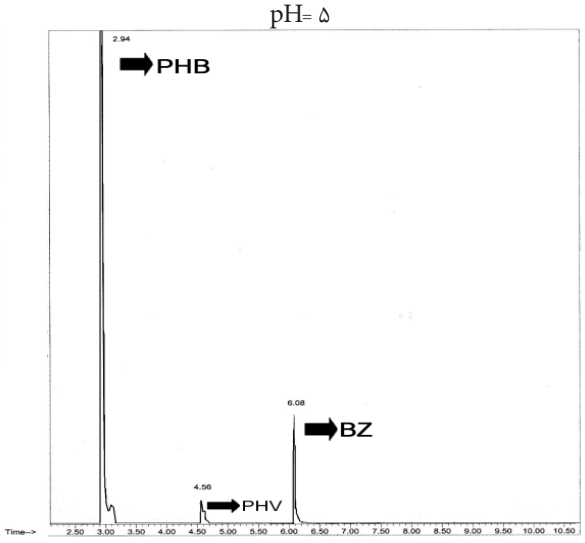
جدول ۳- میانگین PHA استخراج شده (g/l) از محیط کشت هایی تحت شرایط متفاوت به هم زدن محیط کشت (سه تکرار)

زمان (ساعت) / سرعت هم زدن (rpm)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱۲	۰/۰۰۱۴	۰/۰۰۰۹
۱۵۰	۰/۰۵۲	۰/۰۵۸	۰/۳۶	۰/۱
۲۰۰	۰/۰۳	۰/۰۳۹۲	۰/۰۵۲	۰/۰۳۲

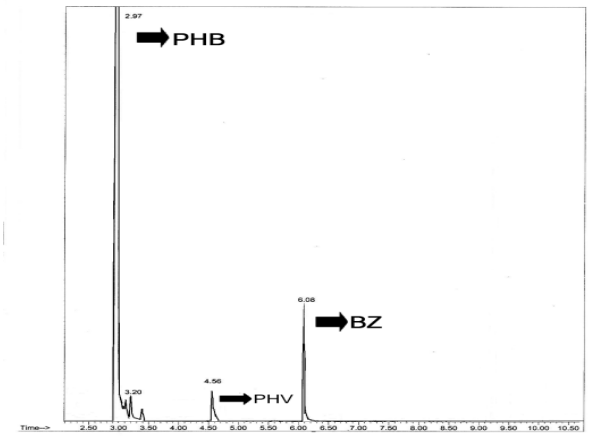


شکل۱۱ - نمودار مربوط به PHA تولید شده تحت شرایط میزان هوادهی متفاوت

شکل ۱۲- نمودار GC مربوط به PHA استخراجی در محیط کشت با pH= ۵



شکل ۱۳- نمودار GC مربوط به PHA استخراجی در محیط کشت با pH= ۷

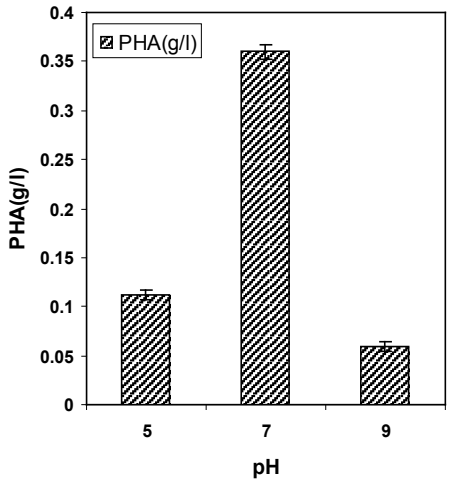


www.SID.ir

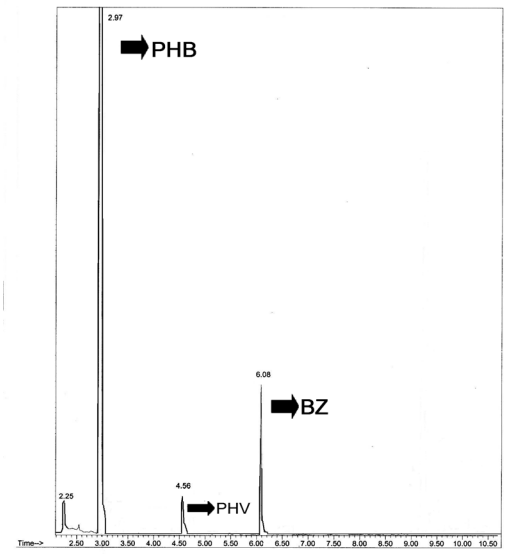
Archive of SID

جدول۴- میانگین PHA استخراج شده (g/l) از محیط کشت هایی با pH های متفاوت (سه تکرار)

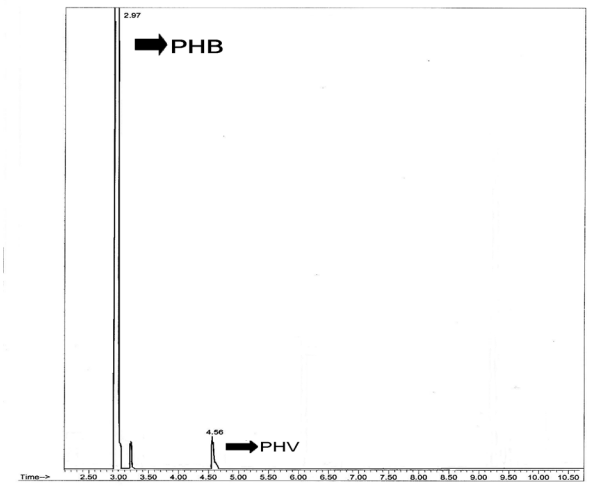
زمان (ساعت) / pH محیط کشت	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۵	۰/۰۲۱	۰/۰۷۸	۰/۱۱۲	۰/۰۶۴
۷	۰/۰۶۱	۰/۱۱۲	۰/۳۶	۰/۱۲۶
۹	۰/۰۲۷	۰/۰۵۲	۰/۰۵۹	۰/۰۲۷



شکل ۱۴ - نمودار مربوط به PHA تولید شده در pH های متفاوت محیط کشت



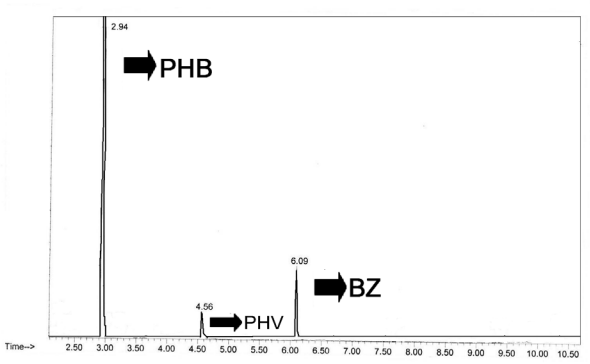
شکل ۱۵- نمودار GC مربوط PHA استخراجی در محیط کشت با منبع کربن گلوکز



شکل ۱۶- نمودار GC مربوط PHA استخراجی در محیط کشت با منبع کربن فروکتوز

www.SID.ir

Archive of SID

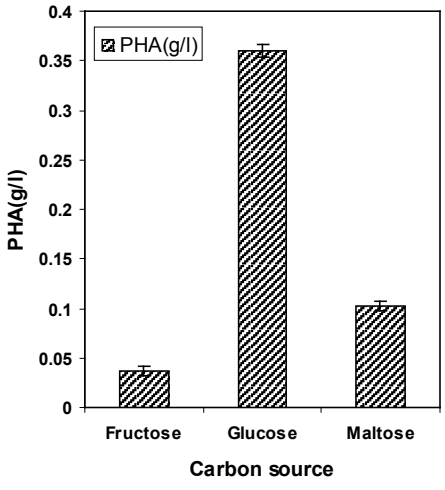


شکل ۱۷- نمودار GC مربوط به PHA استخراجی در محیط کشت با منبع کربن مال توز

مختلف شامل ºC ۲۵، ºC ۳۰، ºC ۳۷ و ºC ۴۱ بر روی میزان تولید PHA مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت با توجه به تولید حداکثری در دمای ۳۷ºC به میزان ۰/۳۶۵ گرم در لیتر دمای بهینه برای تولید بیوپلیمر دمای ºC ۳۷ به عنوان اپتیمم درجه حرارت برای رشد و تولید بیوپلیمر شناسایی شد. تاثیر اولیه pH محیط کشت و میزان هوادهی محیط کشت نشان داد که حداکثر PHA تولیدی به میزان ۰/۳۶۵ و ۰/۳۶۷ گرم در لیتر در محیط کشت های با pH=۷ و rpm= ۱۵۰ صورت می گیرد و از میان منابع کربنی گلوکز، فروکتوز و مالتوز با توجه به تولید حداکثری بیوپلیمر در محیط

جدول ۵- میانگین PHA استخراج شده (g/l) از محیط کشت هایی با منابع کربنی متفاوت (سه تکرار)

زمان (ساعت) / منبع کربن	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
گلوکز	۰/۰۵۸	۰/۱۲۶	۰/۳۶	۰/۱۱
فروکتوز	۰/۰۲۱	۰/۰۲۱۹	۰/۰۳۶۵	۰/۰۲۱
مالتوز	۰/۰۵۲	۰/۰۷۸۱	۰/۱۰۲۲	۰/۰۴۸



شکل ۱۸- نمودار مربوط به PHA تولید شده در محیط کشتهایی با منابع

نتیجه گیری

با توجه به اینکه باکتری Bacillus thuringiensis ZK 86 مورد بررسی در این مطالعه از نوع مزوفیل بود. تاثیر دماهای کشت با منبع کربنی گلوکز به میزان ۰/۳۶۱ گرم در لیتر این منبع کربنی به عنوان منبع کربن بهینه در نظر گرفته شد. نتایج ارائه شده در این مطالعه اولین گزارش از تولید PHA توسط یک سویه باکتریائی بومی جداسازی شده از ایران یعنی Bacillus thuringiensis ZK 86 می باشد. تحقیقات بیشتر در ارتباط با بهینه سازی محیط کشت جهت تولید موثرتر و به صرفه تر این بیوپلیمر باکتریائی با استفاده از منابع ارزان قیمت جایگزین به ویژه محصولات جانبی کشاورزی در دست انجام می باشد که بزودی نتایج آن منتشر خواهد شد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران محترم پژوهشگاه ژنتیک و هم چنین معاونت پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند در خصوص حمایت و در اختیار گذاشتن فضای تحقیقاتی کمال تشکر را داریم.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Clinton Fuller R. Plastics from Bacteria and for Bacteria: Poly (β-hydroxy alkanoates) as Natural Biocompatible, and Biodegradable Polyesters. Advnces in Biochemical Engineering, 1990; 41: 77-93.

2- Doi Y, Microbial Polyesters, Tokyo Institute of Technology,Yokohama, Japan, 1990.

3- Griffin GJL. Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers. Chapman and Hall: London, 1994; 18–47.

4- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative Bacteriology. Williams and Wilkinson, Maryland, 9th ed. 1993; 559-564.

5- Kato M, Fukui T, Doi Y. Biosyntesis of polyester blends by Pseudomanas sp.61-3 from alkanoic acids. Bull Chem Soc, 1996; 69: 515-520.

6- Kim BS and Chang HN. Production of Poly (3-hydroxybutyrate) from starch azotobacter chroocccccum. Biotechnol Lett, 1998; 20: 109-112.

7- Lenz RW and Marchessault RH. Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. Biomacromolecules, 2005; 6 1:1–8.

8- Nderson AJ and Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol Rev, 1990; 54: 450-72.

www.SID.ir