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 زیست‌تخریب‌پذیری و غیر سمی بودن به‌عنوان یک ترکیب زیستی می‌تواند در بسیاری از زمینه‌ها همچون پزشکی و دارورسانی، غذایی، هیدروژل‌ها، لخته سازهای زیستی، جاذب‌های رطوبت، تغلیظ کننده‌ها و پوشش‌های ضد خوردگی مورداستفاده قرار گیرد. به این ترتیب برای بهینه‌سازی تولید آن، در این پژوهش ابتدا تأثیر غلظت منبع نیتروژن به‌عنوان یک منبع تغذیه‌ای مهم روی pH محیط و میزان رشد سلولی موردبررسی قرار گرفت و سپس چگونگی سازوکار تأثیرگذاری روی تولید پلی گاماگلوتامات از گونه‌ی فلاووباکتریوم بررسی شد، و سرانجام برای بهینه‌سازی منبع نیتروژن، پنج منبع نیتروژنی گوناگون (به روش آماری تک فاکتوریلی) ارزیابی و سدیم گلوتامات با بیش‌ترین مقدار تولید (۲۳/۷ گرم بر لیتر) و همچنین ارزان و در دسترس بودن به‌عنوان منبع نیتروژن انتخاب شد.*

واژه‌های کلیدی: *زیست پلیمر؛ پلی گاماگلوتامات؛ گلوتامیک اسید؛ تغییر pH؛ فلاووباکتریوم؛ منبع نیتروژن.*

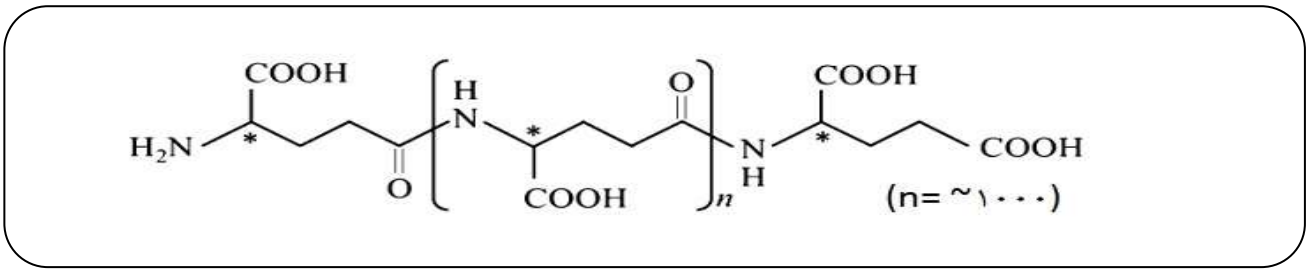
KEYWORDS: *Biopolymer; Poly(gamma)glutamate; Glutamic acid; pH Change;Flavobacterium sp.; Nitrogen source.*

مقدمه

باکتری‌ها می‌توانند طیف گسترده‌ای از زیست‌بسپارها با وظیفه‌های زیستی متنوع، که دارای ویژگی‌های مادی مناسب برای بسیاری کاربردهای صنعتی و پزشکی هستند را تولید کنند. بااین‌حال، زیست‌بسپارها زمانی ازلحاظ اقتصادی مناسب هستند که در هزینه‌های پایین تولید شوند. از میان پلیمرهای باکتریایی، تنها چند پلیمر به‌صورت درون سلولی تولید می‌شوند [۲، ۱]، اما گروه گسترده‌ای از این دست پلیمرها به‌صورت خارج سلولی تهیه می‌شوند. بااین‌حال، زیست‌بسپارهای به‌دست‌آمده از منابع طبیعی برتری‌های

*عهده دار مکاتبات

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



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

قابل‌رقابتی، به‌واسطه تولید پایدارشان از منابع تجدید پذیر، خاصیت زیست‌تخریب‌پذیری و زیست سازگاری‌شان(۱) در مقایسه با پلیمرهای مصنوعی دارند. افزون بر این زیست‌بسپارها از مواد غیر سمی طبیعی تشکیل‌شده‌اند 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) به‌شدت روی ویژگی‌های پلی آمید به دست آمده تأثیرگذار است [۵].

پلی آمیدهای تهیه شده‌ی غیر ریبوزومی 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 ـ ۷]. از این‌رو پلی آمدهای باکتریایی می‌توانند جایگزین تجدید پذیر، غیر سمی و تجزیه‌پذیر زیستی برای پلی آکریلات‌ها باشند [۱۱، ۱۰].

پلی گاماگلوتامات، فراورده پیوند آمیدی گاما ـ 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].

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 متمرکزشده‌اند. در این پژوهش هدف، بهینه‌سازی تولید پلی گاما گلوتامات (PGA) از گونه *فلاوباکتریوم* 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 نیتریت، نیترات پتاسیم شد و آمونیوم کلرید در شرایط بهینه جایگزین شد و سرانجام مقدار وزن خشک فراورده‌ی تولیدی و کیفیت آن موردبررسی 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 [۱۵، ۱۴]

(۱) Biocompatibility

(۲) Poly-γ-glutamate

(۳) ε-poly-l-lysine

(۴) CyanopHycin granule peptide

و این پژوهش اولین گزارش مبنی بر بهینه‌سازی تولید این زیست پلیمر به واسطه‌ی بررسی تأثیر منبع نیتروژن از این سویه می‌باشد.

بخش تجربی

سویه میکروبی

سویه باکتری مورداستفاده در این پژوهش یک باکتری هوازی، غیراسپورزا و گرم منفی می‌باشد که از خانواده فلاووباکتریوم ها[۱] بوده و در پژوهش‌های گذشته پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر جداسازی شده است[۱۴]. این سویه با نام *کرایزئو باکتریوم ایندولوجنس MUT2* در پایگاه داده NCBI (JN831444) ثبت‌شده است[۱۴].

پیش کشت میکروبی

از محیط عمومی ال بی براث[۲] برای تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح استفاده‌شده است. بدین منظور یک میلی‌لیتر از بانک میکروبی ۸۰- درجه سلسیوس به ۱۵۰ میلی‌لیتر ال بی براث 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 بهینه‌شده (گرم بر لیتر) شامل ساکاروز: ۲۱، $NaH_2PO_4.H_2O$: ۹، K_2HPO_4: ۶، NH_4Cl: ۰/۷، $MgSO_4.7H_2O$: ۱ در غلظت یاد شده در آب مقطر حل شد (برای حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد). ترکیب محیط کشت مورداستفاده در پژوهش پیشین *بهرامی* و *همکاران* بهینه‌شده است [۱۵].

تهیه محیط کشت تولید جهت انتخاب نوع منبع نیتروژن

پنج منبع نیتروژن به‌عنوان جایگزینی برای گلوتامیک اسید شامل، سدیم گلوتامات، اوره، سدیم نیتریت، پتاسیم نیترات و آمونیوم کلرید در نظر گرفته شدند. ازآنجایی‌که در محیط کشت بهینه‌شده‌ی پیشین، بهینه منبع نیتروژن افزوده‌شده برای ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ۱/۷۶ گرم بود ازاین‌رو بنا بر محاسبه‌های صورت گرفته برای ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری محیط اختصاصی از پیش تهیه‌شده به ترتیب گلوتامیک اسید ۵/۵۴ گرم، سدیم گلوتامات ۷/۰۵ گرم، اوره ۱/۱۳ گرم، سدیم نیتریت ۲/۶ گرم، پتاسیم نیترات ۳/۸۱ گرم و آمونیوم کلرید ۲/۰۱ گرم افزوده شد. محلول به‌دست‌آمده به علت غلظت بالای منابع نیتروژنی یاد شده pH اسیدی حدود ۳/۵ خواهد داشت که می‌بایست در حالت خنثی یعنی روی ۷ تنظیم شود. با توجه به اینکه اتوکلاو کردن ساکاروز همراه با دیگر ترکیب‌های محیط کشت باعث تغییر رنگ محیط کشت و از دست رفتن کیفیت مواد مغذی آن می‌شود (واکنش قهوه‌ای شدن از نوع میلارد[۳]) [۱۷] در چنین شرایطی برای حل مشکل، محلول ساکاروز غلیظ۲۵۰ گرم بر لیتر تهیه‌کرده و به‌صورت جداگانه اتوکلاو و به اجزای محیط کشت افزوده شد [۱۸]. همچنین در پایان سیتریک اسید در غلظتی همانند گلوتامیک اسید به محیط‌ها به‌عنوان 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 میلی‌لیتر محیط پایه تولید تهیه‌شده، پس از اتوکلاو نمودن محیط‌های مربوطه، در هر ارلن به میزان ۲۵/۲ میلی‌لیتر از محلول غلیظ ساکاروز (۲۵۰ گرم بر لیتر) سترون‌شده در شرایط استریل و زیر هود میکروبی افزوده شد. در پایان میزان (v/v) ٪۶ پیش کشت میکروبی به ارلن‌ها افزوده شد [۱۹].

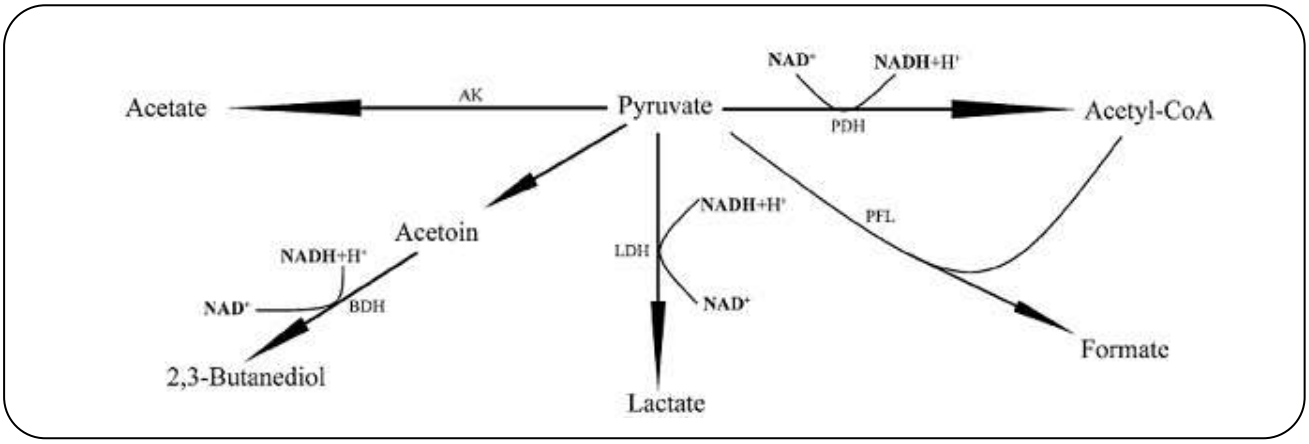
استخراج فراورده

ارلن‌ها به مدت ۹۶ ساعت، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۷۰rpm قرار گرفت [۱۵]. از انکوباتور خارج و ازآنجایی‌که هر ارلن دارای محیط کشت، توده سلولی و فراورده بود، سلول‌ها به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ (شرکت سیگما مدل K16-6 با شماره روتور Nr.12256) جداسازی شدند. سپس به هرکدام از مایع‌های رویی جداشده به‌اندازه‌ی سه برابر حجمی اتانول مطلق ۹۶٪ افزوده شد. و در یخچال ۴+ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از حدود ۱۲ ساعت فراورده‌ی زیست پلیمر در کف ظرف‌های استخراج رسوب‌کرده بود. ظرف‌های 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 به‌طور کامل از الکل جدا شود. فراورده به‌دست‌آمده در محیط آزمایشگاه گذاشته شد تا به طور کامل خشک شود [۱۵].

(۱) Flavobacterium

(۲) LB Broth

(۳) Maillard



شکل ۲ـ مسیر متابولیکی پیرویک اسید [۱۹].

نتیجه‌ها و بحث

به‌طور خلاصه نیتروژن یک محرک مثبت برای تولید زیستی پلی گاماگلوتامات بود و کاهش منبع نیتروژن روی مسیرهای سوخت و سازی شامل گلیکولیز، سوخت و ساز هم‌جریانی و سوخت و ساز انرژی تأثیرگذار است[۲۰]. همان‌گونه که در سوخت و ساز پیروات (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 آلفاکتوگلوتارات به دست آمده از چرخه‌ی سیتریک اسید مشتق می‌شود. منبع کربن طی گلیکولیز به پیروات تبدیل‌شده که سپس پیرووات طی چرخه‌ی سیتریک اسید به آلفاکتوگلوتارات مصرف می‌شود. از سوی دیگر، آلفا کتوگلوتارات 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 واسطهای چرخه‌ی سیتریک اسید (مانند سیتریک اسید، مالئیک اسید یا سوکسینیک اسید) می‌تواند میزان تأمین آلفاکتوگلوتارات را در گونه‌های مستقل از گلوتامات افزایش دهد که درنتیجه آن تولیدگلوتامات مونومر تشکیل‌دهنده‌ی زیست پلیمر پلی گاماگلوتامات نیز افزایش می‌یابد [۱۳].

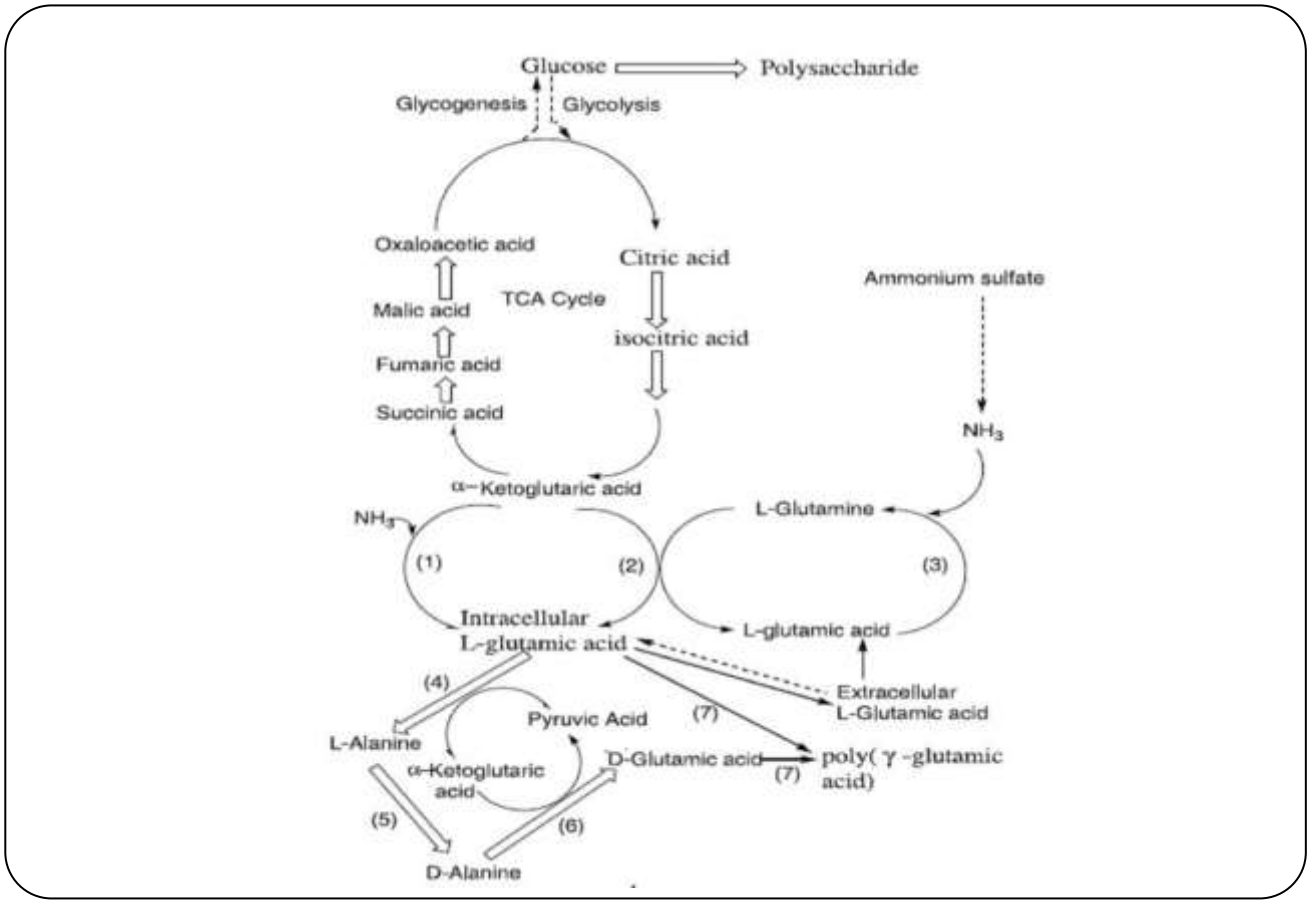
پلی گاما گلوتامات پلیمری پلی آنیونیک است که ممکن است از انانتیومرهای L،D ویا هردوی آن‌ها تشکیل‌شده باشد. بسیار محلول است و می‌توان با الکتروفورز روی کاغذ آن را از دیگر ترکیب‌های طبیعی جدا کرد [۲۲].

تأثیر غلظت منبع نیتروژن روی تولید زیستی پلی گاماگلوتامات

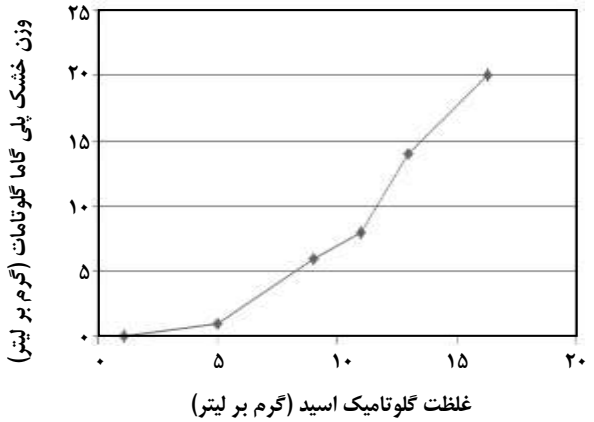
افزودن منبع نیتروژن به محیط کشت به‌طور مؤثری تولید زیستی پلی گاماگلوتامات را افزایش می‌دهد. همان‌گونه که در شکل ۴ نشان داده‌شده است تولید پلی گاماگلوتامات با افزایش غلظت منبع نیتروژن مورداستفاده در مطالعه‌های پیشین *بهرامی* و *همکاران* (گلوتامیک اسید) تا ۲۰ گرم بر لیتر افزایش می‌یابد [۱۵, ۱۴] و همچنین فراورده‌ی به دست آمده کیفیت دلخواه‌تری ازنظر رنگ و نوع عملکرد دارد.

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

میزان زیست توده وpH ، 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



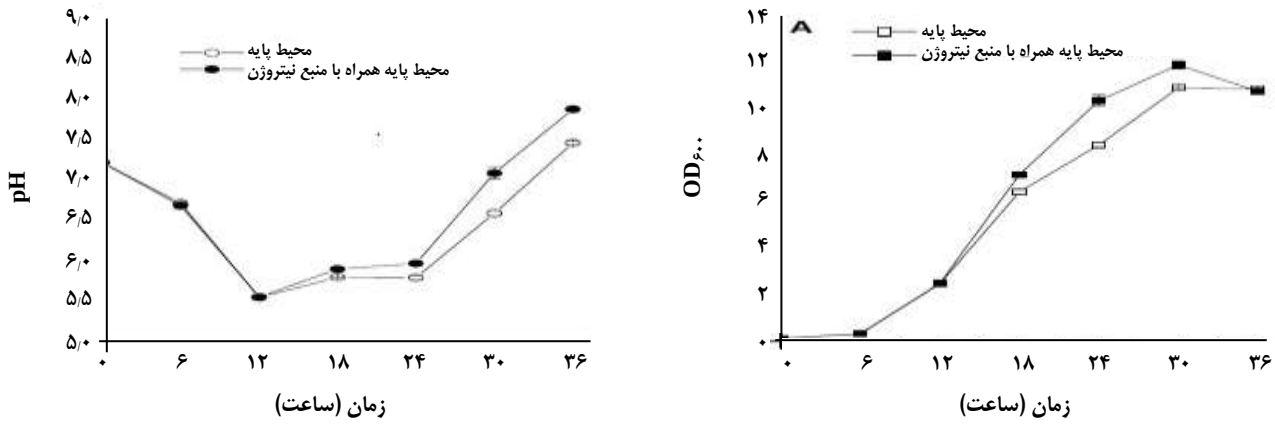
شکل ۳ـ مسیر متابولیکی تولید زیستی گلوتامیک اسید [۲۱].



شکل ۴ـ 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 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. به‌احتمال‌زیاد علت آن تجمع آمونیوم 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 لیکنوفرمیس* به ثبت رسیده است چرا که در این pH هم رشد میکروارگانیسم و هم میزان تولید پلی گاما گلوتامات در شرایط بهینه قرار دارد [۲۴]. این در حالی است که برای باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* بالاترین میزان زیست توده و بازده تولید پلی گاماگلوتامات در pH خنثی ۷ به‌دست‌آمده است [۲۶، ۲۵] اما در مطالعات انجام‌شده به طور معمول مقدار pH برای بهره‌وری



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

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

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 نیتریت، گلوتامیک اسید و اوره بیش‌ترین میزان تولید را داشتند (شکل ۶).

در توجیه نتیجه‌های به دست آمده شایان ذکر است که، فراورده‌ی تولیدی ازنظر 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.

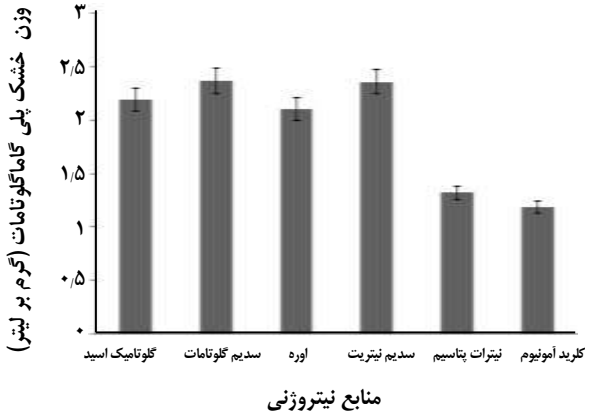
در این راستا *شی* و *همکاران* در سال ۲۰۰۶ میلادی پس از بهینه‌سازی محیط کشت تولید پلی گاما گلوتامات از *باسیلوس سوبتیلیس*، بهترین منبع نیتروژن را گلوتامات معرفی کردند که طی آن بیش‌ترین میزان بازدهی را داشتند [۳۰, ۲۹]. *پرازرتسان* و *همکاران* در سال ۲۰۰۶ میلادی برای تولید زیست پلیمر توسط گونه‌ی *اینتروباکترکلوئاکا* 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 *کرایزئوباکتریوم دانگوئنس* W65 دریافتند که تریپتون بالاترین بازده را برای تولید و رشد نشان می‌دهد[۳۴].

بررسی زیست پلیمر پلی گاما گلوتامات به کمک روش پرتوسنجی فروسرخ

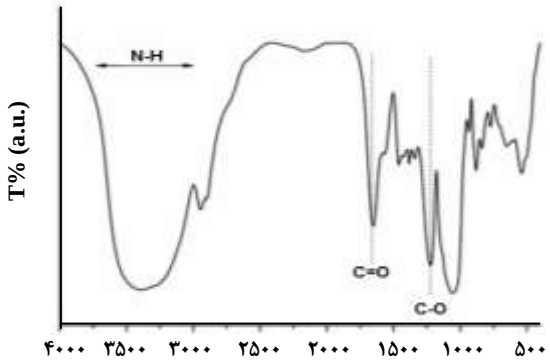
پس از بهینه‌سازی و تولید ترکیب پلی گاماگلوتامات از تخمیر *فلاووباکتریوم* در پژوهش حاضر برای تأیید فراورده‌ی تولیدی توسط پرتوسنجی فروسرخ پتاسیم برمید آنالیز شد که همان‌گونه که از طیف FT-IR آن پیداست (شکل ۷). پیک‌های به دست آمده از پلی آمینواسید پلی گاماگلوتامات شامل گروه C=O اشباع‌شده با دایمر های آلیفاتیک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

جدول ۱ـ 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 نیتریت	۲۱/۵	۲۵/۵	۲۴	۲۳/۶
پتاسیم نیترات	۱۲/۴	۱۶	۱۱/۴	۱۳/۲
آمونیوم کلرید	۱۱/۵	۱۱/۸	۱۲/۵	۱۱/۹



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



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

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 داورسانی، غذایی، هیدروژل ها، 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 این‌که منبع نیتروژن در فرایند 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 نیتریت، نیترات پتاسیم و آمونیوم کلرید و انجام آزمایش‌های تعیین‌شده، به بررسی نتیجه‌ها پرداخته شد. افزودن منبع نیتروژن به محیط پایه تخمیر پلی گاماگلوتامات دارای اثرهای مثبت فراوانی است. به‌طورکلی 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.

اول اینکه کاهش نیتروژن در فاز اولیه تخمیر پلی گاماگلوتامات زمانی که هنوز مقدار کمی پلی گاماگلوتامات تولیدشده است آغاز نمی‌شود، بلکه در مرحله میانی تخمیر زمانی که در محیط اکسیژن حل‌شده 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 گلوتامات (PGA) از گونه باکتریایی *فلاووباکتریوم* ۲۳٫۷ گرم بر لیتر به دست آمد. این بیش‌ترین میزان تولید PGA در محیط کشت پایه حاوی منبع نیتروژن سدیم گلوتامات به دست آمد. نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش می‌تواند در کمک به فرایند صنعتی شدن تولید پلیمر زیستی پلی گاما گلوتامات به‌عنوان یک پلیمر زیستی پرکاربرد در بیشتر صنایع، بسیار مفید واقع شود.

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 Utropha, *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-(γ-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 نوترکیب *باکتریورودوپسین*، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، (۲)**۳۲**: 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*، (۴ _ ۳) **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 Nanopartciles 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 γ-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 (γ-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 (γ-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 (γ-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 γ-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 γ-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-γ-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).