

## تولید و بهینه‌سازی پلی‌هیدروکسی آلکانوات (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)) به وسیله جدایه *Aeromonas sp. EBA118* جدا شده از خاک به روش تک متغیره



زمزم جوادی، معصومه بحرینی\* و محمدرضا شریف مقدم

ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

### چکیده

در این پژوهش با هدف جداسازی باکتریهای بومی تولیدکننده پلی‌هیدروکسی آلکانوات، خاک چندین منطقه کشاورزی اطراف مشهد مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها خالص سازی و سپس با استفاده از روشهای رنگ آمیزی سودان سیاه B و آکریدین اورنج نمونه های تولید کننده PHAs جدا شدند. از میان ۳۱ سویه جداسازی شده ۲ گونه به‌عنوان تولیدکننده پلیمرهای پلی‌هیدروکسی آلکانوات شناسایی شدند. جدایه EBA118 با داشتن بیشترین میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات به عنوان سویه منتخب برگزیده و تولید پلیمر در آن بهینه گردید. به‌منظور افزایش تولید، بهینه‌سازی دومارحله‌ای انجام شد. ابتدا برای افزایش توده سلولی مقادیر غلظت منبع نیتروژن و نوع آن، غلظت گلوکز، pH، دما و میزان هوادهی در محیط اولیه بهینه‌سازی شدند. در مرحله دوم بهینه‌سازی که به‌منظور افزایش تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات انجام شد از محیط ثانویه که دارای مقادیر بیشتری از گلوکز بود استفاده شد. در این تحقیق فاکتورهای نسبت کربن به نیتروژن، pH، دما و میزان هوادهی بهینه و تأثیر آنها در تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات بررسی گردید. عصاره مخمر با غلظت ۷g/l، گلوکز با غلظت ۵g/l، pH=۸، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و میزان هوادهی ۷۵ درصد شرایط حاصل‌شده از بهینه‌سازی مرحله اول بودند؛ در مرحله دوم بهینه‌سازی که با هدف افزایش تولید پلیمر انجام شد نسبت کربن به نیتروژن با مقدار ۳:۱، pH=۷، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و هوادهی ۸۰ درصد به ترتیب به‌عنوان بهترین شرایط انتخاب شدند. نتایج طیف سنجی نشان داد پلیمر پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید شده توسط جدایه *Aeromonas sp. EBA118* از نوع هموپلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات خالص نیست و احتمالاً نوعی کوپلی استر PHBHHx است.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، پلی‌هیدروکسی آلکانوات، *آئروموناس هیدروفیلا*

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۰۲، پست الکترونیکی: mbahreini@um.ac.ir

### مقدمه

پذیری آنها، باعث آسیبهای جدی به طبیعت و کاهش ذخایر سوختهای فسیلی شده است. برای مقابله با این عواقب نامناسب دانشمندان به دنبال پیدا کردن منابع و راه کارهای جدیدی برای تولید پلاستیکهایی هستند که دارای قابلیت تجزیه پذیری زیستی باشند (۷، ۲۷).

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات ((P(3HB)) معمول‌ترین نوع

پلاستیک یکی از مهم‌ترین ساخته‌های دست بشر است که نقش مهمی را در زندگی انسان بازی می‌کند و تحول بسیار زیاد و شگرفی را در جوامع انسانی به وجود آورده است که ناشی از تنوع‌پذیری فوق‌العاده و قابلیت تولید فراوان آنها می‌باشد. از نیمه دوم قرن بیستم به بعد پلاستیکها به مهم‌ترین ابزار مورد استفاده در سرتاسر جهان تبدیل شدند، اما استفاده بیش از حد و عدم قابلیت تجزیه

آنها می‌توان به صنایع پزشکی (تولید ستهای بخیه جراحی، پینهای ارتوپدی، استتها)، کشاورزی (حمل‌کننده آفت‌کشاها و بذرها)، داروسازی (انتقال‌دهنده‌های داروها) و صنایع بسته‌بندی اشاره کرد (۹ و ۳۹). باوجود مزایای بسیار زیاد این بیوپلیمر، به علت هزینه بالای تولید هنوز نتوانسته‌اند آنها را جایگزین کامل پلاستیکهای سنتزی نمایند. بنابراین تلاشهایی برای یافتن منابع کربنی ارزان، تجدیدپذیر و قابل دسترس صورت گرفته است که از جمله این منابع کربنی می‌توان به ضایعات کشاورزی، دانه‌های روغنی، آب‌پنیر، CO<sub>2</sub>، کاغذهای باطله، ملاس چغندرقتند، زیلوز و غیره اشاره کرد (۷، ۱۹، ۲۶ و ۳۰).

PHA یک گرانول ذخیره‌ای است که در شرایط نامساعد غذایی در باکتری تولید می‌شود. البته هر شرایط نامساعدی موجب تولید این ترکیبات نمی‌شود فقط در صورتی‌که ازدیاد منابع کربنی را در کنار محدودیت عناصر ضروری مثل نیتروژن، فسفر، منیزیم و غیره را داشته باشد متابولیسم مرکزی سلول به سمت تولید PHA متمایل می‌شود. باکتریهای زیادی توانایی تولید PHA را دارا هستند که می‌توان از آرکی باکتریها، انواع باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت و سیانوباکتریها نام برد (۳ و ۷).

در کارهایی که باهدف جداسازی و شناسایی تولیدکنندگان PHA تاکنون توسط سایرین انجام شده است گروههای مختلفی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی شناسایی شده‌اند که بیشتر سویه‌هایی از جنس *Bacillus* می‌باشند (۵)، ۳۲ و ۳۳). اما باکتریهای دیگری مثل *Ralostenia* ، *Staphylococcus cohnii* ، *Azotobacter chroococcum* ، *Methylobacterium spp.* ، *Micrococcus luteus* و *Aeromonas hydrophila* نیز جداسازی شده‌اند (۶، ۲۳، ۲۵، ۳۲، ۳۶ و ۴۲). بسیاری از باکتریهای شناسایی شده قادر به سنتز PHB هستند و فقط تعداد کمی قادر به تولید کوپلی استر PHBHHx می‌باشند که *Aeromonas hydrophila* و *Aeromonas caviae* بهترین سویه‌های

پلیمرهای تجزیه‌پذیر زیستی است که به‌وسیله میکرو ارگانیسم‌ها در طبیعت تولید می‌شود (۳۸). این پلیمر P(3HB) ناپایدار است و این باعث محدودیت در به کارگیری آن در کارهای مختلف شده است (۳۱)، برای حل این مشکل آن را همراه با دیگر ترکیبات استفاده می‌کنند. پلی‌هیدروکسی آلکانواتها (PHAs) یکی از این ترکیبات جدید است که توسط باکتریها تولید می‌شوند. کوپلیمرهای هیدروکسی آلکانواتها حاوی انواع واحدهای هیدروکسی آلکانوات (HA) همراه با هیدروکسی بوتیرات می‌باشند. از جمله این کوپلیمرها می‌توان به PHBV (یک کوپلی استر خطی آلیفاتیک است)، P(3HB co 3HHx) (دارای زنجیره جانبی پروپیل است) و ترپلیمرها (دارای سه نوع متفاوت از مونومرها می‌باشند) اشاره کرد (۱۷).

PHA یک پلی‌استر خطی فعال نوری با خواصی مشابه پلی‌اتیلن است و از واحدهای مونومری ۳ هیدروکسی آلکانوات (3HA) تشکیل شده است (۲۷ و ۳۸)، و تاکنون حدود ۱۵۰ واحد مونومری PHA شناسایی شده است (۲۴ و ۳۷). بر طبق ساختار، مونومرها PHA به سه نوع دسته بندی می‌شود: PHA با زنجیره کوتاه (SCL)، PHA با زنجیره متوسط (MCL) و PHA با هر دو نوع زنجیره. با تغییر در ساختار مونومرهای سازنده PHA می‌توان طیف وسیعی از پلی‌استرها را تولید کرد که دارای خواص متفاوتی می‌باشند (۲۵، ۳۸ و ۴۰).

یکی از خواص منحصر به فرد PHAs توانایی تجزیه زیستی آنها در محیطهای متفاوت است (۳۸). از جمله خواص دیگری که برای پلی‌هیدروکسی آلکانواتها ذکر شده است می‌توان به ترموپلاستیک بودن، سازگاری زیستی و غیر سمی بودن، ایزو تاکتیک و خاصیت نوری، غیر محلول در آب و دانسیته بالا، میزان تبلور بالا، غیرقابل نفوذ بودن نسبت به گازها، پیروالکترونیک بودن، قابلیت تجزیه‌پذیری و داشتن گروههای فعال اشاره کرد (۹ و ۴۰). بیوپلاستیکها تاکنون در صنایع مختلفی به کار گرفته شده‌اند که از جمله

دقیقه به همان شکل حفظ شد. بعد از خروج رنگ اضافی، پلیت‌ها با اتانول خالص شسته و کلنی‌هایی که اطراف آنها سیاه رنگ شده بود به عنوان تولیدکننده PHA شناخته شد (۳۴) و (۴۱).

از کلنی‌هایی که بهترین نتیجه را در رنگ‌آمیزی سودان سیاه داشت کشت ۴۸ ساعته تهیه شد و ۱۰  $\mu\text{l}$  از آن را به یک لوله اپندورف که محتوی ۵۰  $\mu\text{l}$  آکریدین اورنج بود اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۳۰ درجه قرار داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید؛ رسوبات حاصل جمع‌آوری و در آب مقطر حل گردید و از آنها گسترش تهیه و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (BX51, Olympus, Japan) در طول موج ۴۶۰nm بررسی شد. حضور گرانول‌های زردرنگ در داخل سلول‌ها نشان‌دهنده حضور PHA بود (۱۸ و ۲۲).

**شناسایی جدایه:** برای شناسایی جدایه از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی استفاده شد. بررسی مشخصات فنوتیپی و انجام آزمون‌های تشخیص اولیه، شامل رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز بر روی جدایه انجام گردید و سپس DNA جدایه به روش جوشاندن استخراج شد (۲۸). DNA ژنومی استخراج شده از کشت شبانه با استفاده از آغازگرهای عمومی ۲۷ F و ۱۴۹۲R که مربوط به ژن *16s rRNA* است به روش PCR تکثیر شد. ۵۰  $\mu\text{l}$  محلول واکنش PCR (GeNet Bio -Macrogen, South Korea) شامل: بافر (۱۰ X) ۵  $\mu\text{l}$ ،  $\text{MgCl}_2$  (۲۵mM) ۶  $\mu\text{l}$ ، dNTPs (۳/۴۳  $\mu\text{l}$ ، ۱۰mM) ۱  $\mu\text{l}$ ، آغازگرها (۱۰ pmol) هر یک ۳/۴۳  $\mu\text{l}$ ، آنزیم تک پلی‌مراز (۵U) ۰/۵۷۱  $\mu\text{l}$ ، DNA ۲  $\mu\text{l}$  و مابقی تا ۵۰  $\mu\text{l}$  آب اضافه شد.

برنامه دمایی واکنش PCR که شامل، واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴ دقیقه برای یک سیکل، واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز قطعه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه برای ۳۰ سیکل

شناخته شده در این مورد هستند (۱۵). *Aeromonas hydrophila* اولین بار توسط Kobayashi و همکاران به عنوان تولیدکننده PHA مطرح گردید و نشان داده شد که این باکتری با استفاده از اسیدهای چرب زنجیره بلند قادر به تولید کوپلی استر PHBHHx به صورت تصادفی با مونومرهای 3-hydroxybutyrate (HB) و 3-hydroxyhexanoate (HHx) می‌باشد (۲۰) و از این جهت از لحاظ تولید پلی استرهای قابل کاربرد در صنعت اهمیت پیدا کرد.

امروزه با توجه به مشکلات زیست محیطی، تولید بیوپلاستیک اهمیت زیادی دارد ولی هنوز به دلیل گران بودن ماده خام نمی‌توانند به صورت انبوه تولید کنند. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی جدید تولیدکننده PHA با استفاده از منبع کربن گلوکز از خاکهای اطراف مشهد بود تا بتوان از آنها در تولید بیوپلاستیک از یک منبع ارزان قیمت مثل گلوکز حاصل از هیدرولیز کاغذهای باطله بهره برد.

## مواد و روشها

**نمونه‌برداری و جداسازی:** از خاکهای مختلف کشاورزی در شهر مشهد و اطراف آن نمونه‌برداری از عمق ۵ سانتیمتری از سطح انجام شد و به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها پس از رقت‌سازی بر روی محیط نوترینت آگار (NA) کشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و سپس کلنی‌های غیرمشابه تشکیل شده به لحاظ شکل ظاهری جدا و در محیط NA خالص‌سازی گردید.

کلنی‌های خالص شده جهت شناسایی توانایی تولید PHA در پلیت‌های محتوی محیط NA + ۱ درصد گلوکز کشت و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ درجه گرم‌گذاری شد. سپس برای تشخیص باکتری‌های تولیدکننده، محلول الکلی سودان سیاه B به کلنی‌های باکتریایی اضافه و پلیت‌ها برای ۳۰

وگسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای یک سیکل در برنامه PCR گنجانده و توسط دستگاه ترمال سایکلر (Bio RAD t100 thermal cycler, USA) انجام شد. پس از پایان یافتن PCR جهت اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر ۵ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد در کنار ladder الکتروفورز گردید.

محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال گردید. قرابت فیلوژنتیکی جداییه با سویه‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و Ez-Taxon مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار MEGA (Version 7) انجام شد. همچنین با استفاده از الگوی Neighbour-joining دسته‌بندی توالیها صورت گرفت و درخت فیلوژنی آن رسم گردید.

**بهینه‌سازی تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات:** محیط ۱ Syn بهینه شده بعد از رشد ۲۴ ساعته در دور ۱۰۰۰۰ rpm برای مدت ۱۰ min تحت سانتیفریوژ قرار گرفت و رسوبات حاصل از آن به محیط ۲ Syn انتقال و سپس به مدت ۴۸ ساعت گرما گذاری شدند. نتایج فاکتورهای بهینه‌سازی شده در پایان هر مرحله با محاسبه وزن خشک رسوب پلیمر بعد از استخراج کامل پلیمر ارزیابی شد. عواملی که برای این مرحله مورد بهینه‌سازی قرار گرفتند شامل نسبت منبع کربن به نیتروژن (۱:۱، ۱:۱.۵، ۲:۱، ۳:۱، ۴:۱، ۱۰:۱)، pH (۶، ۷، ۸ و ۹)، دما (۲۰، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و میزان هوادهی (۵۰، ۷۵ و ۸۰ درصد) بود.

**محیط کشت:** رشد سلولی بر روی تولید پلیمر PHA اثر منفی می‌گذارد که برای حذف این تأثیر از دو نوع محیط کشت در دو مرحله استفاده شد. syn۱ در مرحله اول برای ایجاد توده سلولی مورد استفاده قرار گرفت و محیط ۲ Syn که به لحاظ منبع نیتروژن دارای محدودیت است برای مرحله دوم به کار گرفته شد (۸). ترکیبات محیط syn۱ عبارت بودند از گلوکز (۱۰ g/l)، عصاره مخمر (۱g/l)، آمونیوم کلرید (۲g/l)، پتاسیم فسفات (۲g/l)، دی سدیم فسفات (۰/۶g/l)، منیزیم سولفات (۰/۲g/l)، کلسیم کلرید (۰/۰۰۰۲۰g/l) و عوامل تریس (۱۰ml/l). عوامل تریس شامل سولفات روی (۱/۳mg/l)، سولفات آهن (۰/۲mg/l)، هیدرات آمونیوم مولیبدات (۰/۶mg/l) و بوریک اسید (۰/۶mg/l) بود. محیط syn۲ فقط در مقدار گلوکز (۴۰g/l) با محیط syn۱ متفاوت بود.

**استخراج پلیمر PHA از سلولهای باکتری:** استخراج پلیمر به روش Hahn (حلالهای کلروفرم و سدیم هیپوکلریت) انجام شد. ابتدا محیط تولید Syn۲ در دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتیفریوژ قرار گرفت و بعد از حذف محلول رویی و شستشو رسوب با آب مقطر مجدداً تحت سانتیفریوژ با شرایط قبلی قرار گرفت (۱۳). به ازای هر گرم رسوب سلولی به‌دست‌آمده ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم و ۵۰ میلی‌لیتر سدیم هیپوکلریت ۳۰ درصد (نسبت ۱:۱) اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۳۰ درجه قرار داده شد. سپس محلول به خوبی تکان داده شد تا دو فاز کلروفرم و سدیم هیپوکلریت از هم جدا شوند. جهت جدا سازی فازها نمونه در ۸۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ گردید. فاز کلروفرم جداشده با کمک حرارت تبخیر و میزان رسوب حاصل توزین شد.

**بهینه‌سازی تولید توده سلولی:** برای بهینه‌سازی تولید توده سلولی عوامل زیر مورد بررسی قرار گرفتند که عبارت بودند از: نوع منبع نیتروژن (عصاره مخمر، نترات آمونیوم و اوره)، غلظت منبع نیتروژن (۵ و ۷ g/l)، غلظت گلوکز

**بررسی با طیف‌سنجی FT-IR:** برای بررسی گروههای عاملی پلیمر استخراج شده با طیف سنج FT-IR (Thermo Nicolet AVATAR 370, USA) بررسی شد. از نمونه

شناسایی مورفولوژیکی نشان داد جدایه EBA118 یک باکتری میله‌ای شکل گرم منفی بدون اسپور و کاتالاز مثبت می‌باشد. در شناسایی مولکولی با استفاده از تکنیک PCR و توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار آنالین Ez-Taxon، مشخص گردید که جدایه EBA118 با شماره دسترسی MK397790 در بانک اطلاعات ژنی NCBI دارای ۹۸/۱۹ درصد تشابه با باکتری *Aeromonas hydrophila* می‌باشد. برای این منظور توالیهای مشابه با توالی *Aeromonas hydrophila* استخراج و پس از هم‌ریف کردن توالیها با استفاده از Clustal W، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA V 6.0 و براساس روش Neighbour joining رسم شد (شکل ۳).

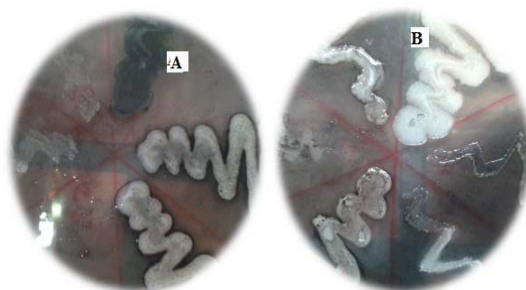
تحقیقات انجام شده بر روی تولید PHA توسط *Aeromonas hydrophila* تاکنون با استفاده از اسیدهای چرب بوده است و تاکنون از گلوکز به تنهایی برای تولید PHA توسط *Aeromonas hydrophila* استفاده نشده است. در این تحقیق با هدف استفاده از ضایعات حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذهای باطله از منبع کربن گلوکز به تنهایی استفاده شد و جهت بهینه‌سازی محیط کشت از تخمیر دو مرحله‌ای استفاده گردید.

در مرحله اول از محیط syn1 برای افزایش توده سلولی استفاده شد و عواملی مثل نوع منبع نیتروژن، میزان منبع کربن و نیتروژن، pH، دما و میزان هوادهی بررسی گردید. نتایج بهینه‌سازی منبع نیتروژن نشان داد از میان سه ترکیب عصاره مخمر، نترات آمونیوم و اوره، عصاره مخمر با غلظت ۷ g/l بیشترین توده سلولی را تولید می‌کند (شکل A-۴). از گلوکز که به عنوان تنها منبع کربن استفاده شده بود سه غلظت مختلف بررسی گردید که از بین آنها غلظت ۵ g/l بیشترین میزان توده سلولی را تولید کرد (شکل B-۴). علاوه بر این نتایج نشان داد که میزان تولید در pH=۸، دمای ۲۰ درجه و میزان هوادهی ۷۵ درصد افزایش می‌یابد (شکل‌های C-۴، D-۴ و E-۴).

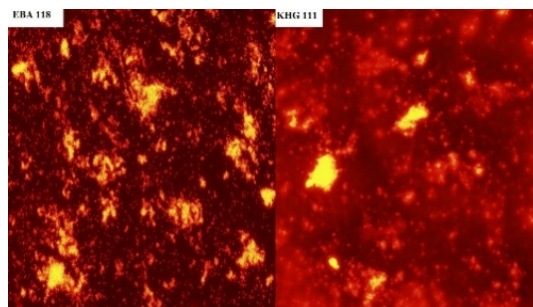
تولید شده به همراه ماده مرجع KBr قرصی تهیه و در بازه  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  تحت تابش نور قرار گرفت (۱۸ و ۳۴).

## نتایج

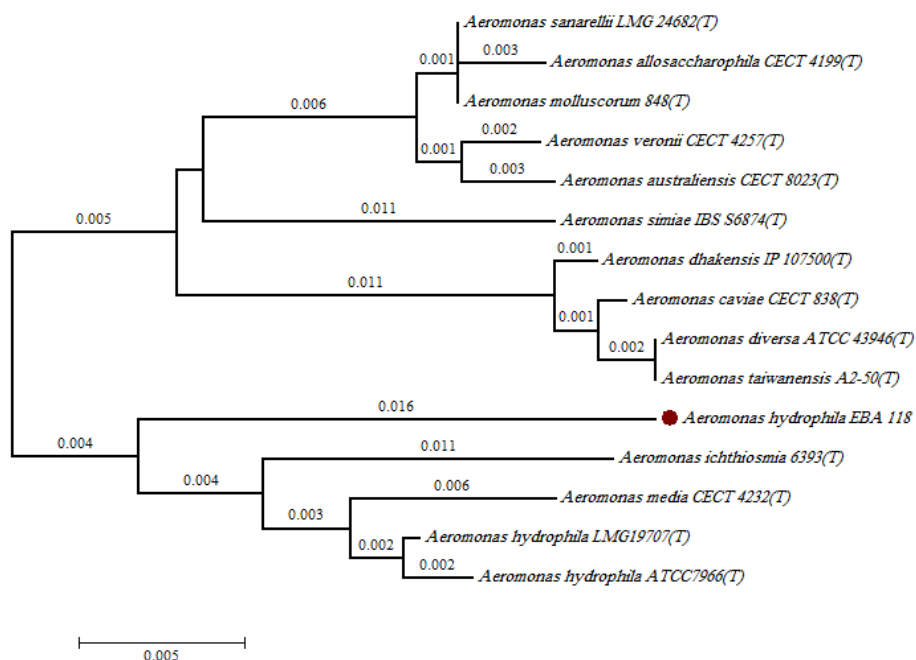
از خاکهای بررسی شده در مجموع ۳۱ نمونه باکتریایی که قادر به تولید بیوپلیمر بودند جدا سازی شد و از بین آنها دو نمونه که در تست سودان سیاه پاسخ بهتری نسبت به بقیه داشتند انتخاب گردیدند. جهت اطمینان از تولید PHA نمونه‌های جدا شده با کمک رنگ‌آمیزی فلورسانس با آکریدین اورنج مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید دو جدایه EBA118 و KHG111 بیشترین میزان تولید پلیمر PHA را دارند که در ادامه جدایه EBA118 انتخاب گردید (شکل ۱ و ۲).



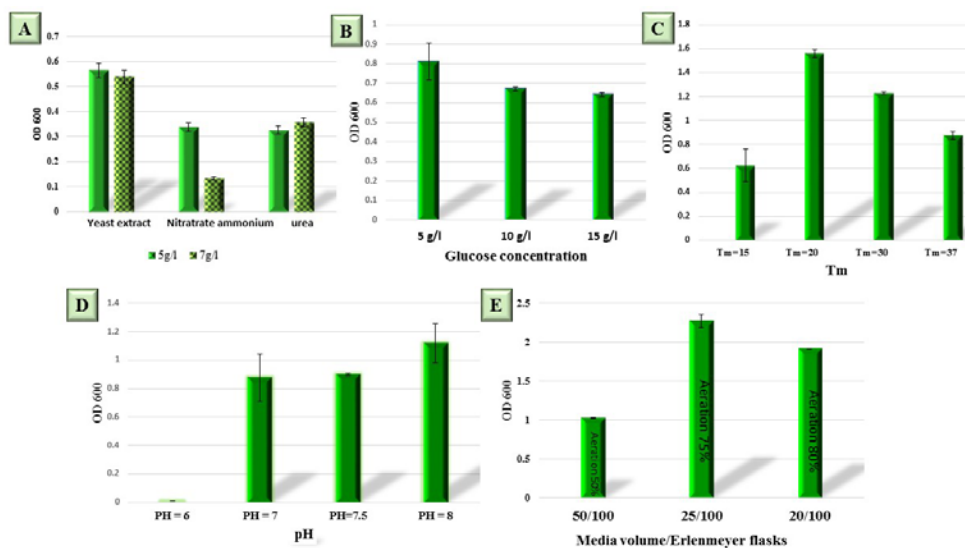
شکل ۱- پلیتهای رنگ‌آمیزی شده با سودان سیاه. (A) بیشترین میزان تولید (B) کمترین میزان تولید



شکل ۲- تصویر میکروسکوپ فلورسانس دو نمونه KHG111 و EBA118 رنگ‌آمیزی شده با استفاده از آکریدین اورنج. نقاط نارنجی نشان دهنده نواحی تجمع پلیمرهای PHA می‌باشد.



شکل ۳- رسم درخت فیلوژنتیکی جدایه EBA118 با استفاده از نرم‌افزار MEGA V 6.0 و براساس روش Neighbour joining



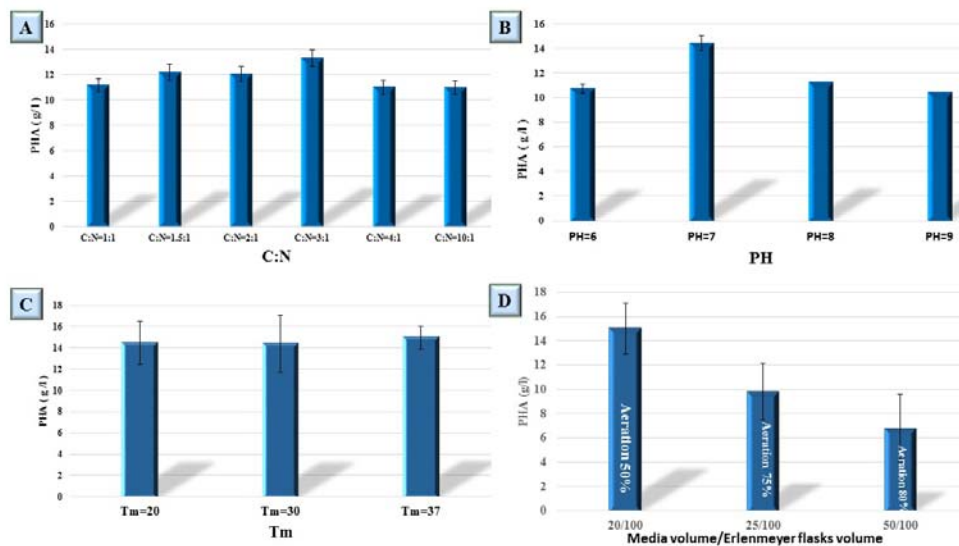
شکل ۴- نتایج بهینه‌سازی تولید توده سلولی در محیط (A. syn) بهینه‌سازی نوع و میزان منبع نیتروژن. (B. بهینه‌سازی میزان منبع گلوکز. (C. بهینه‌سازی دما. (D. بهینه‌سازی میزان pH. (E. بهینه‌سازی میزان هوادهی.

شده بیشترین میزان تولید پلیمر PHA در نسبت ۱:۳ (g/l) حاصل شد (شکل A-۵) و در بررسی میزان تولید بیوپلیمر در pH های مختلف نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید در pH ۷ با مقدار ۱۴/۴۴ g/l حاصل می‌گردد (شکل B-۵). در بهینه‌سازی دما نتایج نشان داد تفاوت

در مرحله دوم با هدف بهینه‌سازی تولید بیوپلیمر، بیوس حاصل از محیط syn1 به محیط syn2 منتقل و تأثیر فاکتورهای نسبت کربن به نیتروژن، pH، دما و میزان هوادهی بر روی تولید پلیمر بررسی گردید. در بررسی نسبت کربن به نیتروژن (C:N) از بین شش مورد مطالعه

پلیمر در هوادهی ۸۰ درصد مشاهده شد که معادل ۱۴/۹۹ g/l بود (شکل D-۵).

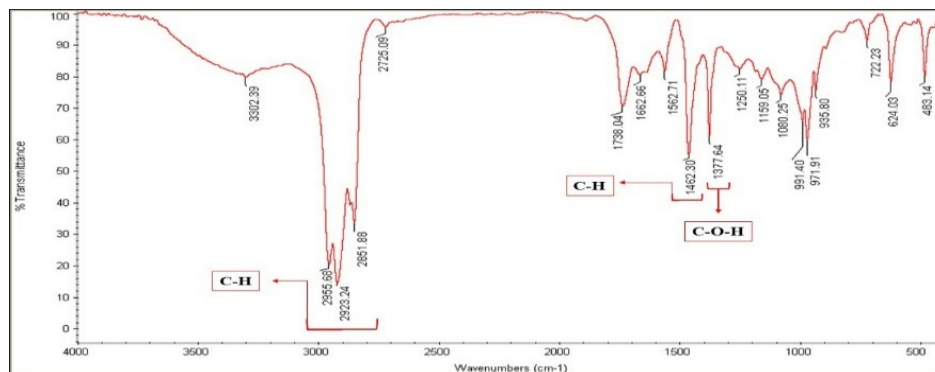
معنی‌داری بین سه دمای ۲۰، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد وجود ندارد و بیشترین میزان تولید در دمای ۳۷ درجه با مقدار ۱۴/۹۴ g/l مشاهده شد (شکل C-۵). بیشترین تولید



شکل ۵- نتایج بهینه‌سازی تولید PHAs در محیط *syn2* (A) بهینه‌سازی نسبت C:N (B) بهینه‌سازی pH (C) بهینه‌سازی دما (D) بهینه‌سازی میزان هوادهی

حضور گروه C-H در  $CH_3$  است؛ باندهای  $1377\text{ cm}^{-1}$  و  $1462\text{ cm}^{-1}$  نیز به ترتیب نشان‌دهنده C-O-H و C-H نامتقارن در ناحیه  $CH_3$  است. در نمونه استاندارد طیف قوی در ناحیه  $1726\text{ cm}^{-1}$  حضور  $C=O$  را نشان می‌دهد در حالی که طیف در ناحیه  $1282\text{ cm}^{-1}$  مربوط به C-H است. در نمونه های PHB خالص پیکها در محدوده  $649\text{ cm}^{-1}$ – $340\text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود. در حالی که در این نمونه تفاوت بود که تأیید می‌کند نمونه یک هموپلیمر نیست.

پلیمر PHA تولید شده توسط جدایه EBA118 جهت بررسی نوع آن توسط دستگاه FT-IR طیف‌سنجی گردید. مقایسه نتایج به دست آمده با طیف نمونه استاندارد PHB شرکت سیگما نشان داد که پلیمر تولید شده به وسیله جدایه EBA118 از نوع هموپلیمر PHB خالص نیست و احتمالاً نوعی کوپلیمر است (شکل ۶). در نمونه تولید شده به وسیله این جدایه، ۱۲ پیک مهم که نشان دهنده باندهای قوی در ناحیه  $488\text{ cm}^{-1}$ – $3000\text{ cm}^{-1}$  است مشاهده شد که نشان‌دهنده



شکل ۶- طیف FT-IR پلیمر تولید شده به وسیله نمونه EBA118 باندهای قوی در ناحیه  $3000\text{ cm}^{-1}$ – $2851\text{ cm}^{-1}$  نشان‌دهنده حضور گروه C-H در  $CH_3$  و باندهای  $1377\text{ cm}^{-1}$  و  $1462\text{ cm}^{-1}$  نیز به ترتیب نشان‌دهنده C-O-H و C-H نامتقارن در  $CH_3$  است

## بحث

و نشان داد عصاره مخمر از بین سایر منابع نیتروژنی (عصاره گوشت، عصاره مالت، آمونیوم سولفات، پپتون و عصاره مخمر) بیشترین تأثیر را بر روی رشد باکتری *Bacillus subtilis* دارد (۳۳). Aly و همکارانش که تولید PHA را در باکتریهای مختلف بررسی می‌کردند نیز نشان دادند عصاره مخمر بهترین تأثیر را بر روی تولید بیومس دارد (۳).

در بررسی میزان pH بر روی تولید بیومس مشخص گردید pH محیط  $\text{Syn}1$  در طی ۲۴ ساعت رشد اولیه جدایه به اندازه دو واحد کاهش یافته و باکتری پس از رشد شرایط محیط را اسیدی می‌کند و مقدار آن را به ۶ می‌رساند که این می‌تواند رشد بیشتر در  $\text{pH} = 8$  را توجیه کند. از طرفی جنس *آروموناس* در شرایط قلیایی قادر به رشد می‌باشد، بنابراین اگر میزان pH اولیه در حد خنثی و یا کمی پایین تر باشد شرایط در حین رشد برای باکتری کاملاً نامناسب شده و تولید بیومس کاهش می‌یابد. در بررسی انجام شده بر روی باکتری *Azomonas macrocytogenes* بهینه تولید در  $\text{pH} = 9$  (۱۲) و بر روی باکتری *Bacillus cereus MM7* در  $\text{pH} = 7$  به عنوان مقدار بهینه به دست آمده است (۳). اما در مورد باکتریهای دیگر عمدتاً مقادیر اسیدی pH به عنوان بهترین pH گزارش شده است (۴).

دمای بهینه باکتری *Aeromonas hydrophila* در کتاب مرجع Bergey بین ۲۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد ذکر شده است که این کاملاً با نتایج حاصل از مطالعه حاضر که دمای بهینه ۲۰ درجه را نشان داد مطابقت دارد (۱۶). در دو تحقیق جداگانه که بر روی *Bacillus cereus MM7* و *Azomonas macrocytogenes* انجام شد دمای ۳۷ درجه را به عنوان دمای بهینه معرفی کرده‌اند (۳ و ۱۳). در پایان مرحله اول با در نظر گرفتن تمامی شرایط بهینه حاصل شده می‌توان نتیجه گرفت که فاکتور منبع نیتروژن و دما بیشترین تأثیر را در تولید بیومس داشتند و با بهینه‌سازی شرایط کشت میزان تولید بیومس تا ۴ برابر افزایش یافت.

بیشتر کارهای انجام شده با *Aeromonas hydrophila* برای تولید PHA با استفاده از اسیدهای چرب همچون اسید اولئیک و یا اسید اولئیک همراه با گلوکز بوده است (۱۰ و ۳۵) و با توجه به اینکه تاکنون از منبع گلوکز به تنهایی برای تولید پلیمر توسط *Aeromonas hydrophila* استفاده نشده است در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت و شرایط تولید به روش دو مرحله‌ای بهینه‌سازی گردید. گلوکز در بسیاری از کارها توسط باکتریهای مختلف برای تولید PHA به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار گرفته است و نشان داده شده است که نسبت به سایر منابع کربنی برای تولید PHA بهتر بوده است. Chen و همکاران نشان دادند که باکتری *آروموناس هیدروفیلا* در حضور گلوکز نسبت به اسید لوریک بیومس بیشتری را تولید می‌کند که مشابه نتایج حاضر می‌باشد (۱۰). Shah در بررسی پنج منبع کربن گلوکز، سوکروز، مالتوز، فروکتوز و لاکتوز بیشترین میزان تولید را هنگامی مشاهده کرد که گلوکز را به عنوان منبع خود برگزیده بود (۳۳). Panigrahi و همکارانش نیز منابع گلوکز، فروکتوز، مالتوز و سلولز را در چند باکتری جداسازی شده بررسی کردند و بهترین شرایط را در حضور گلوکز مشاهده کردند (۲۹). Aly و همکارانش نیز نشان دادند که از بین پنج نوع منبع کربن مختلف، گلوکز با غلظت ۵ g/l بیشترین میزان بیومس را تولید می‌کند (۳). نتایج این تحقیق نشان داد جدایه EBA118 قادر است بیشترین بیومس را با غلظت ۵ گرم بر لیتر گلوکز تولید کند. همچنین مشاهده گردید عصاره مخمر با غلظت ۷ g/l بهتر از دو منبع نیتروژنی دیگر میزان رشد جدایه را افزایش می‌دهد و مشخص گردید افزایش نسبت نیتروژن به کربن در این مرحله باعث افزایش توده سلولی می‌شود، که می‌توان نتیجه‌گیری کرد حضور انواع آمینواسیدها و ویتامینهای موجود در عصاره مخمر باعث افزایش رشد می‌شوند (۲). Shah نتایجی مشابه نتایج حاضر به دست آورد



موجب ایجاد شرایط نامناسبی می‌شود که برای تولید پلیمر مطلوب می‌باشد. Kulkarni و همکاران و Aly و همکاران نیز دمای بهینه ۳۷ درجه را برای باکتریهای *Halomonas campisalis* MCM B-1027 و *Bacillus cereus* به ترتیب به دست آوردند (۳ و ۲). Hamieh و همکارانش در دو باکتری *Lactobacillus acidophilus* و *Bacillus thurnigiensis* بیشترین میزان تولید PHB را در میزان هوادهی ۸۰ درصد (۵۰/۲۵۰ml) مشاهده کردند و نشان دادند اکسیژن و هوادهی اثر افزایشی بر روی تولید پلیمر دارد که مشابه نتایج تحقیق حاضر بود (۱۴). در دومین مرحله بهینه‌سازی، دو فاکتور pH و هوادهی بیشترین تأثیر را در تولید بیوپلیمر داشتند و میزان تولید پلیمر به ۱۴/۹۹ رسید که ۴۴/۱۳ درصد افزایش را نشان می‌دهد و مشابه نتایج Lu و همکاران است که با بهینه‌سازی شرایط توانستند ۴۵ درصد تولید پلیمر را در باکتری *Aeromonas hydrophila* CGMCC0911 افزایش دهند (۲۵). Chauhan و همکاران با بررسی دو باکتری *Bacillus cereus* و *Ralstonia eutrophus* نشان دادند در بهترین شرایط میزان ۰/۵۹ و ۰/۶۹ تولید پلیمر را به ترتیب دارند (۶). Shen و همکاران با استفاده از لجن فعال که مقدار کمی سدیم لورات به آن اضافه شده بود توانستند ۱/۵ کوپلی استر PHBHHx را با استفاده از میکروبیهای موجود در لجن تولید کنند (۳۵).

در پژوهش حاضر نتایج طیف سنجی نشان داد پلیمر PHA تولید شده توسط جدایه EBA118 از نوع هموپلیمر PHB خالص نیست و احتمالاً نوعی کوپلی استر PHBHHx است (۳۳ و ۳۴) که جدایه EBA118 توانسته است در غیاب اسیدهای چرب و تنها در حضور گلوکز آن را بسازد. سویه های *Aeromonas hydrophila* و *Aeromonas caviae* معمولاً جزو بهترین سویه های شناخته شده برای تولید PHBHHx با زنجیره متوسط در مقیاس صنعتی می‌باشند (۴۳). برای تولید این ترکیب توسط این باکتریها از اسیدهای چربی همچون لوریک‌اسید

تولید بیوپلیمر در مرحله دوم رشد به میزان مواد غذایی در محیط کشت بستگی دارد و نسبت C:N در میزان تولید تأثیر زیادی دارد. مختارانی و همکاران معتقدند با افزایش بیش از حد مواد غذایی در محیط رشد باکتری فعالیت باکتری محدود شده و باعث مصرف پلیمر تولید شده توسط باکتری می‌شود (۲). سایرین نیز معتقد هستند وقتی نسبت کربن به نیتروژن کاهش می‌یابد میزان بیشتری از کوانزیم A به چرخه کربس می‌رسد و تعداد واحدهای 3HB نسبتاً کاهش می‌یابد و با افزایش نسبت کربن به نیتروژن یعنی افزایش غلظت سوبسترای کربن نسبت به غلظت نیتروژن از رشد میکروبی ممانعت می‌کند و سنتز PHB شروع می‌شود (۸، ۱۸ و ۳۶). در پژوهش حاضر نسبت C:N، ۳:۱ به دست آمد در حالی که Chen و همکاران نسبت کربن به نیتروژن را ۱۰:۱ برای اولئیک‌اسید در باکتری *Aeromonas hydrophila* NIU01 به دست آوردند و Wei و همکاران در باکتری *Cupriavidus taiwanensis* 184 نسبت کربن به نیتروژن ۸:۱ را به دست آوردند (۸ و ۴۲). در مطالعاتی که به‌وسیله Panigrahi و همکارانش در گونه‌ای از *Bacillus* انجام شد بیشترین میزان تولید در نسبت C:N، ۲۰:۱ مشاهده شد (۲۹).

در بررسی pH مشخص گردید باکتری با رشد در محیط ۲ Syn مقدار pH محیط را کاهش داده و اسیدی می‌کند. اسیدی شدن pH هر چند برای رشد توده سلولی مناسب نیست اما این شرایط نامناسب ایجاد شده در افزایش تولید پلیمر مؤثر است و بیشترین میزان پلیمر در pH 7 تولید شد. Chen و همکاران نیز برای تولید پلیمر توسط باکتری *Aeromonas hydrophila* در فرمانتور از pH ۶٫۵ استفاده کردند که با نتایج حاضر مشابه است (۸). در مطالعات انجام‌شده به وسیله سایرین بر روی گونه‌های *Bacillus* ۷ pH به‌عنوان بهینه گزارش شده است (۳، ۲۹). با توجه به اینکه طیف دما برای باکتری *Aeromonas hydrophila* ۲۰-۲۸ درجه است اما تولید بهتر پلی‌مر در دمای ۳۷ درجه مشاهده شد که نشان دهنده این است که افزایش دما

سازگارپذیری و خواص فیزیکی همچون انعطاف‌پذیری و قدرت تحمل فشارهای زیاد نسبت به هموپلیمرها و امکان استفاده از آنها در بخش‌های مختلف صنعتی مثل تولید ایمپلنت‌های پزشکی و ابزارهای مهندسی بافت اهمیت بیشتری دارند و این ویژگی باعث شده است تا توجهات زیادی برای تولید صنعتی آنها انجام شود. از طرفی تحقیقات انجام شده نشان داده است باکتری *Aeromonas hydrophila* قادر به تولید این نوع هتروپلیمر می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد جدایه EBA118 که یک *Aeromonas sp* می‌باشد بدون نیاز به استفاده از اسیدهای چرب می‌تواند از گلوکز به تنهایی استفاده کند و کو پلی استر PHBHHx را تولید کند. در نتیجه به راحتی می‌توان از باطله‌های کاغذ که فراوان و ارزان هستند استفاده کرد و علاوه بر تولید یک ترکیب مفید و دوستدار محیط زیست به پاک‌سازی محیط زیست نیز کمک کرد.

#### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر تأمین کلیه امکانات این تحقیق (گرنه شماره ۳/۳۳۶۳۲) تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

و اولئیک اسید استفاده می‌کنند و منابع کربن همچون گلوکز را نیز به محیط اضافه می‌کنند که باعث تغییر در نسبت مونومرهای 3HB و HHx می‌شوند (۲۵). Doi و همکاران و Chen و همکاران معتقدند که حضور اسیدهای چرب زنجیره بلند برای سنتز PHA توسط ائروموناس هیدروفیلا ضروری می‌باشد (۱۰ و ۱۱)، اما در پژوهش حاضر مشخص گردید که باکتری بدون حضور اسید چرب نیز می‌تواند PHA بسازد. Lu و همکاران معتقد هستند که گلوکز نقش مهمی را در رشد سلول و تجمع PHBHHx بازی می‌کند و در غلظتهای کمتر از ۱۰ g/l باعث افزایش درصد مونومرهای HHx می‌شود (۲۵). نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه EBA 118 برای تولید کوپلی استر از گلوکز تنها نیز می‌تواند استفاده کند که این می‌تواند راه کار جدیدی برای استفاده از منابع کربن ارزانتر همچون آب‌پنیر (۳۰)، زیلوز (۱۹) و باطله‌های کاغذ (۱ و ۲۶) باشد و بدین ترتیب یکی از مشکلات اساسی در تولید PHAs که هزینه زیاد ماده اولیه آن می‌باشد را کاهش داد (۲۵)، ۳۲، ۳۸ و ۴۳.

#### نتیجه‌گیری

هتروپلیمرهایی همچون PHBHHX به سبب زیست

#### منابع

- ۱- شعاعی پرچین ن، بحرینی م، موسوی م، ۱۳۹۴، بهینه‌سازی تولید پلی‌هیدروکسی آلکانواتها از گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ توسط باکتری *Cupriavidus necator* ATCC 17699. پایان‌نامه کارشناسی ارشد.
- ۲- مختارانی ن، گنجی دوست ح، خالقی سرنامی م، برقی م، ۱۳۸۷، تأثیر ترکیبات ازت بر تولید هیدروکسی آلکانواتها با استفاده از لجن فعال. مجله علوم و تکنولوژی محیط زیست، جلد ۱۰، شماره ۳، ص ۸۵-۹۲.
- ۳- Aly MM, Albureikan MO, El Rabey H, Kabli SA. 2013. Effects of culture conditions on growth and poly-β-hydroxybutyric acid production by *Bacillus cereus* MM7 isolated from soil samples from Saudi Arabia. Life Science Journal. 10):1884-1891
- ۴- Babu J, Nath SB, Kodali VP., 2014. Isolation, Screening and Extraction of Polyhydroxybutyrate (PHB) producing bacteria from Sewage sample. International Journal of Pharm Tech Research. 6(2):850-7.
- ۵- Charen T, Vaishali P, Kaushalya M, Amutha K, Ponnusami V, Gowdhaman D., 2014. Isolation and identification of Polyhydroxybutyrate producing bacterial strain (*Bacillus thuringiensis* GVP) from chlorine contaminated soil. International Journal of ChemTech Research. 6(5):3197-202.
- ۶- Chauhan P, Prajapati C, Shah G., 2013. Production and Recovery of Polyhydroxybutyrate (PHB) from Various Microorganisms and Homology Modeling of Acetyl CoA Acetyltransferase. Advanced

- BioTech. 12(12):06-11.
- 7- Chee JY, Yoga SS, Lau NS, Ling SC, Abed RMM, Sudesh K., 2010. Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. Technology and education Topics in Applied microbiology and applied Biotechnology. 1395-404.
  - 8- Chen BY, Hung JY, Shiao TJ, Wei YH., 2013. Exploring two-stage fermentation strategy of polyhydroxyalkanoate production using *Aeromonas hydrophila*. Biochemical Engineering Journal. 78: 80-84.
  - 9- Chen GQ., 2010. Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. Plastics from bacteria: Springer. 17-37.
  - 10- Chen GQ., Zhang G., Park SJ., Lee SY., 2001 Industrial scale production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Applied Microbiology and Biotechnology. 57, 50-55.
  - 11- Doi Y., Kitamura S., Abe H., 1995. Microbial synthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) Macromolecules, 28, 4822-4828.
  - 12- Elsayed NS, Aboshanab KM, Boulwafa MM, Hassouna NA., 2013.  $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a promising *Aeromonas macrocytogenes* bacterial isolate P173. African Journal of Microbiology Research, 7(43), 5025-5035.
  - 13- Hahn SK, Chang YK, Kim BS, Lee KM, Chang HN., 1993. The recovery of poly (3-hydroxybutyrate) by using dispersions of Sodium Hypochlorite solution and Chloroform. Biotechnology techniques. 7(3):209-12.
  - 14- Hamieh A, Olama Z, Holail H., 2013. Microbial production of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic using agro-industrial waste products. Global Advanced Research Journal of Microbiology. 2(3):54-64.
  - 15- Han J, Qiu YZ, Liu DC, Chen GQ., 2004. Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. FEMS Microbiology Letters. 239:195-201 .
  - 16- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST., 1994. Bergey's manual of Determinative Bacteriology Ninth edition. USA: Williams & Wilkins.
  - 17- Javadi A ,Pilla S, Gong S, Turng LS., 2011. Biobased and Biodegradable PHBV Based Polymer Blends and Biocomposites: Properties and Applications. Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications. 372-96.
  - 18- Kalaivani R, Sukumaran V., 2013. Isolation and identification of new strains to enhance the production of biopolymers from marine sample in Karankura, Tamil Nadu. European Journal of Experimental Biology. 3(3):56-64.
  - 19- Khanna, Shilpi, and Ashok K Srivastava. 2005. 'Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates', *Process Biochemistry*, 40: 607-19.
  - 20- Kobayashi G. Shiotani T. Shima Y. Doi Y., 1994. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA440, pp. 410-416. In: Doi Y. Fukuda K., (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers. Elsevier, Amsterdam.
  - 21- Kulkarni SO, Kanekar PP, Nilegaonkar SS, Sarnaik SS, Jog JP., 2010. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)(PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. Bioresource technology.101(24):9765-71.
  - 22- Kumar BS, Prabakaran G., 2006. Production of PHB (bioplastics) using bio-effluent as substrate by *Alcaligenes eutrophus*. Indian Journal of Biotechnology. 5(1):76-9.
  - 23- López-Cortés A, Lanz-Landázuri A, García-Maldonado JQ., 2008. Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. Microbial ecology. 56(1):112-20.
  - 24- Lu J, Tappel RC, Nomura CT., 2009. Mini-review: biosynthesis of poly hydroxyalkanoates. Journal of Macromolecular Science. 49(3):226-48.
  - 25- Lu XY, Wu Q, Chen GQ., 2004. Production of poly (3- hydroxybutyrate – co – 3 - hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in *Aeromonas hydrophila* CGMCC 0911. Applied microbiology and biotechnology.64.۵-۴۱:(۱)

- 26- Milani Rad N, Mousavi SM, Bahreini M, Saljoughi E., 2017. Use of membrane separation in enzymatic hydrolysis of waste paper, Korean J. Chem. Eng. 34(3):768-772.
- 27- Miyasaka H, Akiyama H, Okuhata H, Tanaka S, Onizuka T., 2013. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from Carbon dioxide by recombinant *Cyanobacteria*: INTECH Open Access Publisher.
- 28- Pang L, Zhang X-H, Zhong AY, Chen AJ, Li AY, Austin AB., 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. Letters in Applied Microbiology. 43:249-255.
- 29- Panigrahi S, Badveli U, Vadodaria MS, Ladva K, Shah VR, Parikhl AR, et al., 2013. Screening, isolation and quantification of PHB-producing soil bacteria. International Journal of Engineering Science Invention. 2(9):01-6.
- 30- Pantazaki, Anastasia A, Christos P Papaneophytou, Agathi G Pritsa ,Maria Liakopoulou-Kyriakides, and Dimitrios A Kyriakidis. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8', *Process Biochemistry*, 44: 847-53.
- 31- Rathi DN, Amir HG, Abed RMM ,Kosugi A, Arai T, Sulaiman O, et al., 2013. Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simplified polymer recovery by a novel moderately halophilic bacterium isolated from hypersaline microbial mats. Journal of applied microbiology. 114(2):384-95.
- 32- Ray, Subhasree, and Vipin Chandra Kalia. 2017. Microbial cometabolism and polyhydroxyalkanoate co-polymers. Indian journal of microbiology, 57: 39-47.
- 33- Shah KR., 2014. Optimization and production of Polyhydroxybutarate (PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(5):377-87.
- 34- Shah K., 2012. FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by a locally isolated novel *Bacillus* sp. AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat, India. Journal of Biochemical Technology. 3(4):380-3.
- 35- Shen XW, Yang Y, Jian J, Wu Q, Chen GQ., 2009. Production and characterization of homopolymer poly(3-hydroxyvalerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4. Bioresource Technology. 100(18):4296-9.
- 36- Srilakshmi S, RAO CR., 2012. Studies on screening, isolation and molecular characterization of PHB producing *Staphylococcus* SPP. International Journal of Integrative sciences, Innovation and Technology. 1(5):24-31.
- 37- Sudesh K., 2012. Polyhydroxyalkanoates from palm oil: biodegradable plastics: Springer Science & Business Media.
- 38- Sudesh K, Abe H, Doi Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Progress in Polymer Science.
- 39- Verlinden RA, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD, Radecka I., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal of applied microbiology. 102(6):1437-49.
- 40- Walle Gv van der, De Koning G, Weusthuis R, Eggink G., 2001. Properties, modifications and applications of biopolyesters. Biopolyesters: Springer. 263-91.
- 41- Wang JG, Bakken LR., 1998. Screening of soil bacteria for poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. Microbial ecology. 35\ ۰۱-۹۴:(۱)
- 42- Wei Y-H, Chen W-C, Huang C-K, Wu H-S, Sun Y-M, Lo C-W, et al. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. International journal of molecular sciences. 2011;12(1):252-65.
- 43- Zhao, M, Z Li, W Zheng, Z Loua, and G.Q Chen. 2006. Crystallization and initial X-ray analysis of polyhydroxyalkanoate granule-associated protein from *Aeromonas hydrophila*. PhD Thesis.

## **Production and optimization of Polyhydroxyalkanoate (poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)) by *Aeromonas* sp. EBA 118 isolated from soil using one factor at a time methodology**

**Javadi Z., Bahreini M. and Sharifmoghadam M.R.**

Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

### **Abstract**

In this study, the polyhydroxyalkanoate producing bacteria were isolated from soils of Mashhad countryside. Using, staining methods, Black Sudan B and Acridine Orange, the suitable isolates have been separated. To increase the polyhydroxyalkanoate production, optimizing has been done in two stages. In the first stage, different nitrogen resource, glucose density, pH, temperature and aeration have been optimized in order to increase the biomass. In the second stage, the ratio of carbon to nitrogen, pH, temperature and amount of aeration have been optimized in order to increase polyhydroxyalkanoate production. Among the 31 isolates, 20 isolates have been recognized as the polyhydroxyalkanoate producer. *Aeromonas* sp. EBA 118 by producing the highest amount of the polyhydroxyalkanoate polymer has been chosen as the selected object. Yeast extract 7g/l, glucose 5g/l, pH=8, temperature of 20°C and 75% aeration were the optimal conditions for the highest production of biomass. The optimal conditions in the second stage aiming the increase of the polyhydroxyalkanoate polymer production were the ratio of carbon to nitrogen 0.35, pH=7, temperature of 37°C and 80% aeration. The results of FT-IR spectroscopy showed that the polymer produced by EBA118 isolate is not the kind of the pure polyhydroxybutyrate, but is probably a kind of copolymer PHBHHx.

**Key words:** *Aeromonas hydrophila*, optimization, polyhydroxyalkanoates