مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و هفتم (۱۳۸۰) شماره ۲ (۲۰۵-۱۹۳)

بهینه‌سازی تولید آلژینات توسط *Azotobacter vinelandii* UT15 جدا شده از خاک

جواد حامدی
آزمایشگاه میکروبیولوژی کاربردی ، گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم ، دانشگاه تهران
jhamedi @ khayam.ut.ac.ir
(دریافت: ۷۹/۸/۱۱ ؛ پذیرش: ۸۰/۳/۷)

چکیده

آلژینات پلیمر پلی ساکاریدی متشکل از زیر واحدهاي D- β مانورونات و L- α گولورونات است که کاربردهای متعددی دارد. اگرچه تا به امروز این ترکیبات از منابع جلبکی استخراج شده، ولی اخیراً آلژینات باکتریایی به عنوان محصول تجاری مورد توجه قرار گرفته است. در این تحقیق ۱۰۰ نمونه خاک کشاورزی برای جداسازی *Azotobacter vinelandii* مهمترین باکتری مولد آلژینات از نظر بیوتکنولوژی، کشت شد. برای افزایش احتمال جداسازی *A. vinelandii* روشهایی نیز به کار گرفته شد که شامل فقدان هر گونه منبع نیتروژن در محیط کشت ، افزودن ٪ ۰/۱ فنل، استفاده از اتیلن گلیگول به عنوان تنها منبع کربن محیط و انکوباسیون در $37\ ^{o}C$ بود. با آزمایشهای مرفولوژیک و بیوشیمیایی بر ۱۸ سویه مولد اگزوپلیمر جدا شده، ۱٤ سویه *A. vinelandii* و ٤ سویه *A. chroococcum* شناخته شد. همه این سویه ها در محیط کشت دارای منبع کربن سوکروز، در $30^{o}C$، ۱۸۰rpm به مدت ۹۶ ساعت انکوباسیون شد. پس از جداسازی بیوماس، پلیمر استخراج و غلظت آن اندازه‌گیری شد. در بین ۱۸ سویه مولد آلژینات، *A.vinelandii UT15* بیشترین بازده را داشته است (۱/۵g/l) و تاثیر عوامل محیطی pH، درجه حرارت، سرعت همزن و غلظت و نوع منبع کربن بر تولید آلژینات با این سویه بررسی شده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که بهترین شرایط برای تولید آلژینات pH ۷، درجه حرارت $34^{o}C$، ۱۸۰ rpm و غلظت ۲۰g/l سوکروز بوده است. در این شرایط *A.vinelandii UT15* ۱/۷۳g/l آلژینات تولید کرده است.

واژه‌های کلیدی *: ازتو باکتر وینلندئی، آلژینات، پلی ساکارید، خاک، کاربازول.*

مقدمه

پلی ساکاریدهای خارج سلولی در باکتریها به صورت کپسول یا لایه لزج دیده می‌شوند. این ترکیبات در بعضی موارد در ویرولانس باکتری و/ یا تشکیل بیوفیلم نقش دارند (Gacessa and Rusell, 1990). ازسوی دیگر پلی ساکاریدهایی چون گزانتان و ژلان کاربرد گسترده‌ای در صنعت یافته‌اند (Sime, 1990, Roller and Dea, 1992). پلی ساکاریدهای خارج سلولی آلژینات که توسط گونه های مختلف جنس‌های *Pseudomonas* و *Azotobacter* تولید می‌شود در سالهای‌اخیرموردتوجه‌قرارگرفته‌است (Clementi, 1997, Gacessa, 1998). آلژیناتها از زیر واحدهای β-D-مانورونات و α-L-گولورونات تشکیل شده که درمواردی نیز O– استیله شده است. نسبت و ترادف زیرواحدها در رفتار پلی الکترولیتی و ژلی (Smisdsrod and Dragent,1996, Sime,1990) و نیز خواص ایمونوژنیک (Fujihara *et al*,1992,Otterlie *et al.,*1991,Skjak-Break *et al,*1996,Soon-Shiong *et al.,*1993) این فراورده مؤثر است و بر این اساس می‌توان انواع آلژینات‌های با کاربردهای متنوع را به دست آورد (Clementi,1997). آلژینات‌ها در صنایع غذایی، دارویی، نساجی و ... کاربرد داشته (Clementi, 1997, Soon-Shiong *et al.,* 1993) و توانایی‌های جالبی نیز در جنبه‌های زیست‌پزشکی دارند(Fujihara *et al.,*1992,Otterlei *et al.,*1991,Skjak-break *et al*,1996 (Soon-Shiong *et al*., 1993).

در بین سویه‌های مولد آلژینات *Azotobacter vinelandii* از نظر بیوتکنولوژی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. بیماریزا نبودن و عدم نیاز باکتری به منبع ازت آلی یا معدنی در محیط کشت، که موجب کاهش هزینه‌های تولید پلیمر می‌شود، دلیل دیگر توجه به این باکتری است. با توجه به نیاز کشور به آلژینات که از خارج وارد می‌شود ، این تحقیق با هدف جداسازی *A. vinelandii* مولد آلژینات از خاک و بررسی تأثیر عوامل محیطی مؤثر بر تولید آلژینات انجام شده است.

مواد و روش ها

محیط کشت غنی‌سازی: برای غنی‌سازی *A. vinelandii* ضمن افزودن٪۰/۱ فنل، به جای گلوکز از اتیلن گلیکول به عنوان تنها منبع کربن محیط استفاده شد، ترکیب نهایی محیط مورداستفاده چنین است: KH_2PO_4 0.25 g ,$MgSO_4.7H_2O$ 0.125g, NaCl 0.125g, $FeSO_4.7H_2O$ 0.005g, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.005g, $MnSO_4.4H_2O$ 0.005g,$CaCO_3$ 0.1g ، اتیلن‌گلیکول ۱۰g، فنل ۱g و آب‌مقطر ۱۰۰۰ml. pH محیط‌با NaOH ۰/۱N در ۷/۲ تنظیم شد.

محیط کشت جداسازی: از محیط کشت آگـاردار فاقـد نیتـروژن Skerman و Thompson بـا ترکیـــب زیـــر اســـتفاده شـــد: KH_2PO_4 1g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2g,$CaCl_2.2H_2O$ 0.1g, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.001g، گلوکز ۱۰ g، آگار ۱۵g و آب مقطر ۱۰۰۰ml . pH محیط با NaOH ۱ /N۰ در ۰/۱± ۷/. تنظیم شد (Tchan, 1984).

محیط کشت پایه تخمیر منبع کـربن: KH_2PO_4 0.3g، $CaCl_2$ 0.1g، $MgSO_4.7H_2O$ 0.2g، $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.005g، آگار ۱۰g، بروموتیمول بلو 0.08g و آب مقطر 1000ml. پس ازتهیه محیط پایه و سترون کردن در 121°C به مدت ۱۵ دقیقه ، محلول ٪۱۰ سوبسترای آلی کربنـی مورد نظر با غلظت نهـایی 10g/l در حـلال مناسـب تهیـه و بـا صـافی 0.45µm سـترون شـد، pH=7.1 (Tchan , 1984).

محیط کشت تولید اینوکولـوم و پلیمـر: از محـیط (Obika *et al*., 1993) بـا ترکیـب زیـر استفاده‌شد: NaCl 0.2g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.4g, KH_2PO_4 0.8g, K_2HPO_4 3.2g, Sucrose 20g، $Na_2MoO_4.2H_2O$ 3mg, $FeSO_4.6H_2O$ 20 mg و $CaCO_3$ 0.05g. pH محیط با NaOH ۰/۱N در ۷/۲ تنظیم شد.

غنی سازی: یکصد نمونه از خاکهای کشاورزی اطراف تهران، کرج و برخی نواحی شمال کشور انتخاب و ۵ گرم از هر نمونه در فلاسک‌های ارلن مایر 100ml حاوی 45ml محـیط غنـی‌سـازی تلقیح شد. 5ml از سوسپانسیون حاصل نیزدر 45ml از همین محـیط رقیـق و هـر دو رقـت در 37°C برای جداسازی *A. vinelandii* انکوباسیون شد.

جداسازی: کشت های غنی‌سازی روزانه بررسـی میکروسـکوپی شـد . پـس از مشـاهده رشـد، معمولاً بین ۲ تا ۵ روز، کشت های مثبت در محیط جداسـازی بـه صـورت خطـی کشـت و در 37°C به مدت ۴ روز انکوباسیون شد. کلنی‌های موکوئیدی درشت مولـد پلیمـر خـارج سـلولی، بزرگتر از 2µm، گرم منفی تکی یا دوتایی، ازتوباکترهای مولد آلژینات تلقی شدند. ضمناً وجـود پیگمان سبز فلورسنت نشانه *A. vinelandii* است. در هـر صـورت نشـانه تولیـد پیگمـان قابـل اعتماد نبوده و بر سویه جداشده آزمایشهای فراتر انجام شد.

تشکیل کیست : سویه های جداشده در محیط Skerman, Thompson کـه منبـع کـربن آن ٪۰/۲بوتانل بود کشت و حداقل دو هفته انکوباسیون شد. سـپس سـلولها بـا آکریـدین اورانـژ و میکروسکوپ فلورسانس برای مشاهده کیست‌های سبز رنگ با پوشش قرمز بررسی شد.

تولید پیگمـان: سـویه‌هـای جداشـده بـرای بررسـی تولیـد پیگمـان در محـیط Skerman و Thompson با غلظت $Na_2MoO4.2H_2O$ 1 µg/ml کشت شد. پلیت‌های حاوی کلنی باکتریهـا

در روشنائی روز برای وجود پیگمان‌های قابل نفوذ و با پرتو فرابنفش(364nm) برای پیگمان فلورسنت وارسی شد (Tchan, 1984).

الگوی تخمیر منبع کربن: برای بررسی الگوی تخمیر کربن یکی از منابع کربن رامنوز، کاپریلات، مزو-اینوزیتول، مانیتول و مالونات به محیط کشت پایه اضافه شده و سویه‌های جدا شده در سطح محیط فوق تلقیح و در 30°C تا ۱۴ روز انکوباسیون شد(Tchan,1984).

نگهداری سویه‌ها: برای استفاده معمول سویه‌های جداشده در محیط وینوگرادسکی آگار دارای سوکروز هر ماه تجدید کشت گردید. برای نگهداری بیشتر سویه‌های مولد درمحیط شیبدار وینوگرادسکی آگار در 30°C تا زمانی که ضخامت کشت به حدود1mm برسد نگهداری شد. سپس روی آن کاملاً با پارافین مایع استریل پوشانیده و در 20°C- تا۶ ماه نگهداری شد (Tchan , 1984).

تولید پلیمر: سویه‌های مولد پلیمر در فلاسک‌های ارلن‌مایر100ml حاوی 25ml محیط Obika و همکاران(۱۹۹۳) تلقیح و در 30°C، 180rpm به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شد. 1.5ml از این کشت به عنوان اینولوکوم در فلاسک‌های ارلن‌مایر500ml حاوی 50ml محیط کشت تلقیح و برای تولید آلژینات در30°C ، 180rpm به مدت ۹۶ ساعت انکوباسیون شد.

سنجش وزن خشک: روزانه 5ml از مایع کشت برداشته و در ۸۴۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل در 5ml محلول EDTA 10mM وNaCl 1mM سوسپانسیون و پس از ۲ دقیقه همزدن مجدداً در ۸۴۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد . رسوب سلولی بدون پلیمر حاصل در 5ml آب مقطر سوسپانسیون و در 105°C تا رسیدن به وزن ثابت (معمولاً ۲۴ساعت) نگهداری و وزن خشک سلولی سنجیده شد(Parente *et al*.,1998).

سنجش آلژینات: مایع رویی حاصل از دو مرحله سانتریفوژ قبل با یکدیگر مخلوط و دو بار با اتانول و یکبار با استون مجاور شد. رسوب حاصل در دمای 40°C و فشار کم تا رسیدن به وزن ثابت خشک و مقدار پلیمر توزین شد (Parente *et al.,* 1998). در روش دیگر میزان جذب نور توسط پلیمر در 530nm پس از واکنش با معرف کاربازول اندازه گیری شد (Knutson and Jeanes, 1968). برای سنجش آلژینات 70µl از محلول آبی1mg/ml آلژینات سدیم یا نمونه مجهول بدقت به600µl محلول بورات - اسید سولفوریک سرد شده اضافه شد. پس از هم زدن 20µl محلول کاربازول اضافه شد و میزان جذب نور در طول موج 530nm سنجیده شد. سنجش هر نمونه دوبار تکرار شد. مقدار آلژینات نمونه‌های مجهول با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده به روش فوق محاسبه شد.

بررسی اثر عوامل محیطی بر تولید آلژینات: با استفاده از سویه دارای بیشترین بازده (*A. vinelandii UT15*) و محیط (Obika *et al.*, 1993) اثر عوامل pH (۸-۵)، 25-35°C، 150-240rpm، غلظت‌های ۳۰-۱۰ گرم در لیتر هر یک از کربوهیدرات‌های سوکروز، لاکتوز و گلوکز بر تولید آلژینات بررسی شد.

نتایج

از یکصد نمونه خاک کشت شده در محیط وینوگرادسکی، مجموعاً ۱۸ سویه مولد آلژینات جدا شده است. نتایج آزمایشهای مرفولوژیک و فیزیولوژیک نشان داده که همه این سویه‌ها بزرگتر از ۲ میکروگرم، گرم منفی و مولدکیست بوده و به جنس *Azotobacter* تعلق دارند. اگرچه ویژگی تشکیل کیست در سویه‌ها، که مهمترین صفت تمیزدهنده جنس‌های *Azotobacter* و*Azomonas* است (Tchan,1984)، نشان می‌دهد که این سویه‌ها *Azotobacter* هستند ولی همانگونه که در جدول ۱ نیز دیده می‌شود توانایی تخمیر مانیتول و نیز رشد در 37ºC نیز نشان می‌دهد که این سویه‌ها نمی‌توانند *Azomonas* باشند، زیرا *Azomonas agilis* و *Azomonas insignis* در تخمیر مانیتول ناتوان بوده و اگرچه *Azomonas macrocytogenes* مانیتول مثبت است ولی این گونه و *Azomonas insignis* قادر به رشد در 37ºC نیستند.

جدول ۱- ویژگیهای افتراقی سویه های مولد آلژینات جدا شده از خاک.

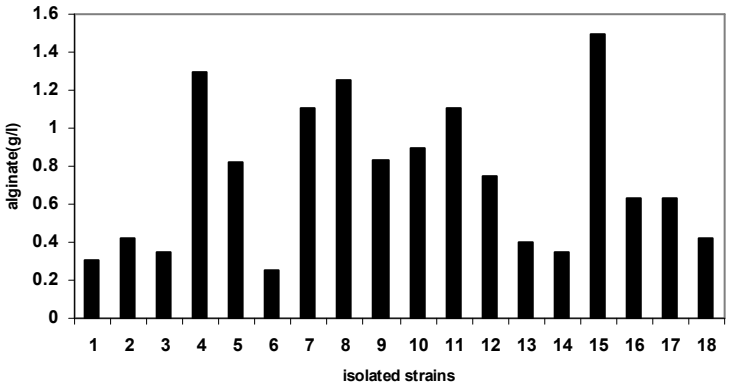
ویژگیهای افتراقی	*A. chroococcum*[1]	*A. vinelandii*[2]
رنگ آمیزی گرم	-	-
وجود کیست	+	+
تولید پیگمان سبز فلورسنت	-	+[3]
تولید پلیمر خارج سلولی	+	+
مصرف منابع کربنی :		
رامنوز	-	+
کاپریلات	-	+
مزو-اینوزیتول	-	+
مانیتول	+	+
مالونات	±	+

۱- سویه های ۲،۶،۱۳و۱۷

۲- سویه های ۱،۵-۳،۱۲-۷،۱۶-۱۴و۱۸

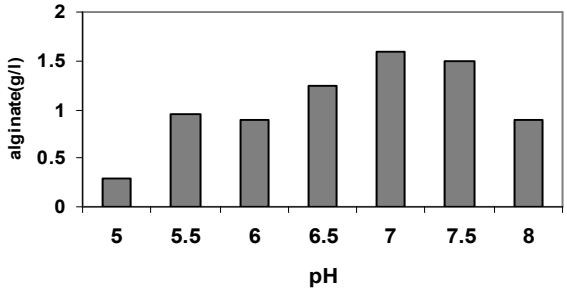
۳- این ویژگی در همه سویه ها دیده نشده است.

با مقایسه وضعیت ۱۸ سویه جدا شده از نظر مصرف منابع کربنی می توان آنها را از نظر گونه طبقه‌بندی کرد. ۱۴ سویه از این ۱۸ سویه که قادر به مصرف رامنوز، کاپریلات، مزو-اینوزیتول، مانیتول و مالونات بودند *Azotobacter vinelandii* نامیده شدند. همه این سویه‌ها قادر به تولید پیگمان سبز فلورسنت نبودند. ۴ سویه دیگر که در مصرف رامنوز، کاپریلات و مزو-اینوزیتول ناتوان بودند *Azotobacter chroococcum* نامگذاری شدند. در جدول ۱ خلاصه نتایج آزمایشهای انجام شده برای شناسایی سویه‌های جدا شده آمده است. نتایج آزمایشهای انجام شده بر مقدار تولید آلژینات توسط ۱۸ سویه در شکل ۱ دیده می‌شود.



شکل ۱- میزان تولید آلژینات در ۱۸سویه ازتوباکتر جدا شده از خاک. سویه‌های ۲، ۶، ۱۳ و ۱۷ *A. chroococcum* **و بقیه سویه ها** *A. vinelandii* است. **سویه ۱۵(***A. vinelandii UT15***) بیشترین تولید آلژینات را داشته است.**

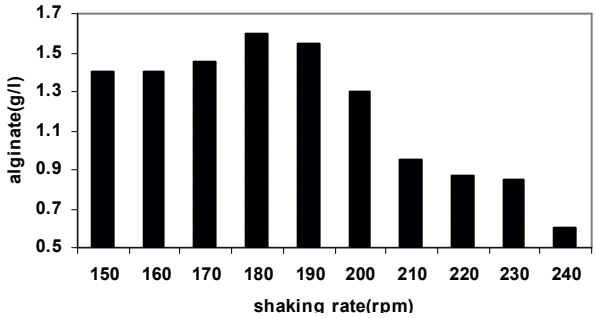
همانگونه که ملاحظه می‌شود به طور کلی سویه‌های *A. vinelandii* آلژینات بیشتری را نسبت به سویه‌های *A. chroococcum* تولید کرده‌اند و از بین این سویه‌ها، سویه *A. vinelandii UT15* بیشترین تولید را داشته است، که اثر عوامل محیطی بر تولید آلژینات با استفاده از این سویه آزمایش شده است. شکل ۲ اثر pH بر تولید آلژینات را نشان می دهد. ملاحظه می‌شود که افزایش pH از ۵ تا ۷ موجب افزایش تولید آلژینات ولی



شکل۲- تأثیر مقدار pH بر تولید آلژینات توسط UT15 *A. vinelandii*.

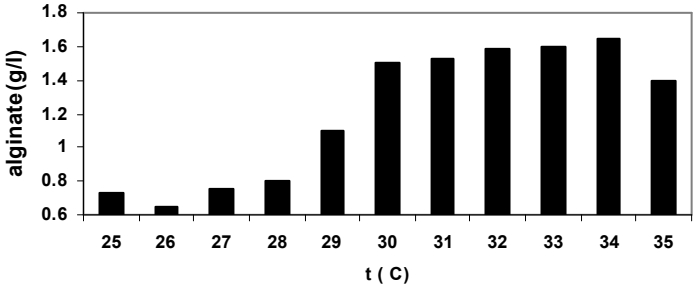
افزایش بیشتر pH موجب کاهش تولید می‌شود. بنابراین pH ۷ ، pH بهینه برای تولید آلژینات توسط *A.vinelandii UT15* است.

نتایج بررسی اثر دور همزن بر تولید آلژینات در شکل ۳ آمده است. مشاهده می‌شود که افزایش دورهمزن تا 180rpm موجب افزایش تولید ولی افزایش شدید دور همزن (بیشتر از ۱۸۰ rpm) موجب کاهش تولید می‌شود. بیشترین تولید آلژینات در 180rpm به دست آمده است.



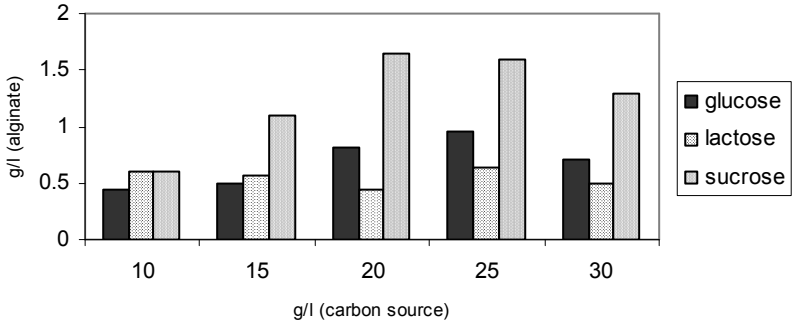
شکل۳- اثر دور همزن بر تولید آلژینات توسط *A. vinelandii* UT15.

نتایج بررسی اثر حرارت بر تولید آلژینات را می توان در شکل ۴ ملاحظه کرد که افزایش دما تا 34°C موجب افزایش تولید پلیمر و پس از آن موجب کاهش تولید شده است.



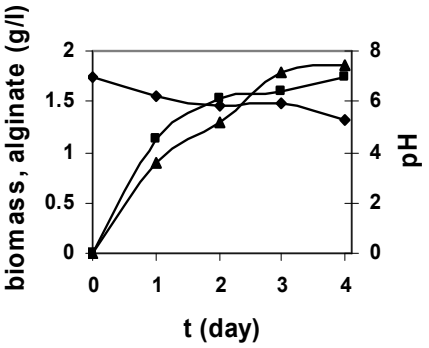
شکل۴- اثر درجه حرارت بر تولید آلژینات توسط *A. vinelandii* UT15.

نتایج بررسی اثر نوع و غلظت منبع کربن بر تولید آلژینات در شکل ۵ آمده است. مشاهده می‌شود که در بین سه منبع کربن آزمایش شده (سوکروز، لاکتوز و گلوکز)، سوکروز مناسب‌ترین است و حداکثر تولید آلژینات(1.65g/l) در این محیط به دست آمده است. در مقایسه لاکتوز و گلوکز، گلوگز موجب تولید آلژینات بیشتری شده است. با بررسی آلژینات تولید شده در غلظت‌های مختلف سوکروز مشاهده می‌شود که در غلظت 20g/l سوکروز بیشترین مقدار آلژینات حاصل شده است.



شکل۵- اثر نوع و غلظت منبع کربن بر تولید آلژینات توسط *A. vinelandii* UT15

درادامهٔ تحقیق با استفاده از نتایج فوق، تولید آلژینات با استفاده از *A. vinelandii UT15* در شرایط بهینه pH ۷ ، 34°C ، 180rpm وغلظت 20g/l سوکروز انجام شد شکل ۶، در این شرایط 1.73g/l آلژینات تولید گردید. همچنین در این نمودار مشاهده می‌شود که تولید آلژینات با رشد باکتری توأم بوده و افزایش بیوماس موجب افزایش تولید آلژینات می‌شود.



شکل۶- تولید آلژینات توسط *A. vinelandii* UT15 در شرایط بهینه pH 7 ، 34°C ، 180rpm وغلظت 20g/l سوکروز. بیوماس(g/l): ▲ ، آلژینات(g/l): ■ ، pH: ◆.

بحث

آلژینات فراوان‌ترین پلی‌ساکارید در جلبک‌های قهوه‌ای است و تا ٪۴۰ وزن خشک سلولی را شامل می‌شود و نقش آن تقویت قدرت و قابلیت انعطاف در بافت‌های جلبک است (Haug *et al.,* 1974). در *A. vinelandii* آلژینات هم به عنوان کپسول در حالت رویشی و نیز بخش عمده پوشش کیست در حالت استراحت در چرخهٔ زندگی باکتری تولید می‌شود (Sadoff,1975). در باکتری پاتوژن فرصت طلب *Pseudomonas aeroginosa*، آلژینات به عنوان کپسول در طی عفونت ریوی در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس تولید می شود (Gacessa and Rusell, 1990). از نظر ساختاری آلژینات های جلبک های قهوه ای و *A. vinelandii* دارای بلوک‌های M و G و MG هستند (Clementi, 1997). ولی آلژینات‌های *P. aeroginosa* و سایر گونه های سودوموناس فاقد بلوک های G هستند (Gacessa, 1998). از سوی دیگر بر خلاف آلژینات‌های جلبکی، آلژینات‌های باکتریایی در2-O و3-O در زیر واحدهای مانورونات استیله شده‌اند (Clementi, 1997, Gacessa, 1998). مقدار نسبی و توزیع زیر واحدهای G و نیز میزان استیلاسیون بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلیمر تأثیر گذاشته و کاربری آن را تغییر می‌دهد. تا به امروز آلژینات‌های تجاری از منابع جلبکی تأمین شده است. ولی باکتریها برای تهیه آلژیناتهای با خواص یکسان و مطلوب مناسبتر از جلبکها هستند، زیرا آلژیناتهای باکتریایی در بیوراکتور و در شرایط کنترل شده تولید می گردد، ولی آلژیناتهای جلبکی از جلبکهای قهوه‌ای موجود در دریا استخراج می‌شود. در جلبک‌ها ترکیب و درصد اسیدهای اورونیک تحت تأثیر شرایط محیطی و فصلی و یا نوع و سن بافت جلبک قرار دارد (Haug and Larson , 1974). به همین دلیل آلژینات‌های باکتریایی در سالهای اخیر به دلایل بیوتکنولوژیک مجدداً مورد توجه قرار گرفته‌اند.

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد، در ایران علی‌رغم کاربرد فراوان آلژینات در صنایع غذایی و دارویی، آلژینات‌های باکتریایی کمتر مطالعه شده و ظاهراً قبل از این تحقیق پژوهشی در مورد جداسازی سویه‌های ازتوباکتر مولد آلژینات و نیز بررسی شرایط تولید این پلیمر انجام نشده است.

در بین ۱۸ سویه مولد پلیمر جداشده *A.vinelandii* UT15 که بیشترین توانایی تولید (1.5 g/l) را داشته برای آزمایشهای فراتر انتخاب و بر این اساس نتایج این آزمایشها شرایط 34°C، pH7، 180rpm و غلظت سوکروز 20g/l به عنوان شرایط بهینه تولید آلژینات تعیین گردید و در این شرایط 1.73g/l آلژینات تولید شده‌است. سویه *A.vinelandii DSM576* مورد مطالعه توسط Clementi و همکاران (۱۹۹۵) دردمای 35°C بیشترین تولید آلژینات را داشته

است ولی این محققین در آزمایشهای خود اثر دماهای 42,40,35,30,23 درجه سانتیگراد را بر تولید بررسی کرده‌اند ولی فواصل دمایی مطالعه شده در تحقیق کنونی 1°Cبوده است. Chen و همکاران (۱۹۸۵) نیز در بررسی تأثیر درجه حرارت بر تولید آلژینات محدوده 27-37°C را بررسی کرده و درجه حرارت 34°C را به عنوان درجه حرارت بهینه گزارش کرده‌اند. از سوی دیگر Vermani و همکاران (۱۹۹۷) در بررسی اثر دمای 25, 30, 37°C بر تولید پلی‌ساکارید، بیشترین تولید را در 30°C مشاهده کرده‌اند. در تحقیق کنونی دور مناسب همزن برای تولید آلژینات 180rpm به دست آمده است. ولی Clementi و همکاران (۱۹۹۵) دور مناسب همزن برای تولید آلژینات را 250rpm گزارش کرده‌اند ولی این محققین دورهای همزن 250-400rpm به فواصل 50rpm را بررسی کرده‌اند و نشان داده‌اند که با افزایش دور همزن از 250rpm تولید آلژینات کم می‌شود، ولی مقادیر سرعت کم همزن که موجب کاهش تولید می‌شود توسط این محققین بررسی نشده است. به طور کلی فرایند تولید آلژینات، فرایندی هوازی است و همزدن مناسب ذخیره کافی اکسیژن و نیز نیتروژن در دسترس *A. vinelandii* می‌گذارد. Chen و همکاران (۱۹۸۵) نیز بیشترین غلظت آلژینات را در مقادیر متوسط دور همزن به دست آورده‌اند و نتیجه گرفته‌اند مقادیر کم و زیاد rpm هر دو برای تولید نامناسب است. در شرایط محدودیت اکسیژن ایجاد شده در اثر شدت کم همزنی یا در اثر ویسکوزیته زیاد محیط کشت، پلیمر دیگر بتاهیدروکسی‌بوتیرات (PHB) تشکیل می‌شود و به همین دلیل مقدار تولید آلژینات کم است (Brovinece and Sutherland,1989). علت کاهش تولید آلژینات در دور همزن زیاد، کمبود منبع کربن به علت هدر رفتن به شکل CO_2 ذکر شده است (Clementi *et al.*, 1995). این وضعیت با آزمایشهای انجام شده در فرمانتور نیز مطابقت دارد زیرا در فشار اکسیژن محلول۵-۱درصد شدت تولید آلژینات افزایش یافته ولی با افزایش آن، میزان تولید مشخصاً کم می‌شود که به علت ناکافی بودن منابع کربوهیدرات است (Parente *et al.*, 1997). در تحقیق کنونی pH بهینه تولید آلژینات ۷ به دست آمده است. Clementi و همکاران (۱۹۹۵) نیز مشاهده کرده‌اند که همزمان با کاهش pH از ۵/۵ تشکیل آلژینات و بیوماس کم شده و کنترل pH بین ۷/۵ - ۶/۵ موجب افزایش تولید آلژینات تا ۲/۵ برابر شده است. Vermani و همکاران (۱۹۹۷) نیز در بررسی اثر محدوده pH ۹-۵ ، pH ۷ را مناسب ترین pH برای تولید پلیمر گزارش کرده‌اند. در بین منابع کربنی آزمایش شده، سوکروز توانایی تولید بیشتری نسبت به گلوکز و لاکتوز داشته است و حداکثر تولید آلژینات ۱/۶۵ g/l در این محیط به دست آمده است. ضمناً غلظت 20g/l سوکروز مناسب‌ترین غلظت برای تولید آلژینات است. Thorat و همکاران (۱۹۹۲) و Horan و همکاران (۱۹۸۳) نیز سوکروز را به عنوان مناسب‌ترین منبع

کربن گزارش کرده‌اند ولی Brovinese و Sutherland (۱۹۸۹) با استفاده از یک سویه بسیار موکوئیدی AX مشاهده کرده‌اند که میزان سلول و پلیمر در محیط حاوی سوکروز بسیار کمتر از محیط حاوی گلوگز است. آنها این تفاوت در ترجیح سوبسترا را به بیان احتمالی یک یا چند جهش در جذب یا تبدیل سوکروز نسبت داده‌اند. Clementi و همکاران (۱۹۹۵) در محیط دارای منبع کربن گلوگز (حاوی ٪۳۳-۲۵ بسته به شرایط فرمانتاسیون) تولیدی مشابه Chen و همکاران (۱۹۸۵) در ٪۳۱ سوکروز به دست آورده اند. Vermani و همکاران (۱۹۹۷) نیز در بررسی سه منبع کربن گلوگز، لاکتوز و سوکروز بیشترین تولید را در محیط حاوی 50g/l سوکروز به دست آورده‌اند.

مقایسه توانایی تولید *Azotobacter vinelandii UT15* با سایر سویه ها : سویه *A. vinelandii UT15* در شرایط بهینه ۷pH ، دمای 34°C، 180rpm و غلظت 20g/l سوکروز 1/73g/l آلژینات تولید کرده است. سویه *A. vinelandii DSM 576* که توسط Clement و همکاران (۱۹۹۵) به کار گرفته شده در شرایط بهینه 1/5g/l آلژینات، سویه *A. vinelandii NCIMB 9068* به کار گرفته شده توسط Lebrun و همکاران (۱۹۹۴) 1/4g/l آلژینات و سویه *A. vinelandii IAM1078* (Obika *et al*., 1993) 3g/l آلژینات تولید کرده است. مقایسه این مقادیر توانایی خاکهای ایران را از نظر امکان جداسازی سویه های *A.vinelandii* با بازده مناسب نشان می‌دهد. هم اکنون در این آزمایشگاه ضمن جستجوی بیشتر برای جداسازی سایر سویه‌های ازتوباکتر از مناطق ایران، جنبه‌های دیگر تولید آلژینات در حال مطالعه است.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از اعتبارات شورای پژوهشی دانشگاه تهران طی طرح شماره ۵۱۳/۱/۴۱۶ انجام شده است، که بدینوسیله از مسئولین محترم معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده علوم قدردانی می‌شود.

Reference

Brovinese, A.C., and Sutherland, I.W., (1989) *Polymer production by a mucoid strain of Azotobacter vinelandii in batch culture*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**, 97-102.

Chen, W.P., Chen. J.Y., Clang. S.C., and Su, C.H., (1985) *Bacterial alginate produced by a mutant of Azotobacter vinelandii*, Appl. Environ. Microbiol.**49**, 543-546.

Clementi, F., (1997) *Alginate production by Azotobacter vinelandii*, Crit., Rev. Biotechnol. **17**(4): 327 - 361.

Clementi, F., Fantozzi, P., Mancini, F., and Moresi , M., (1995) *Optimal conditions for alginate production by Azotobacter vinelandii,* Enzyme Microbial Technol.**17**:983-988.

Fujihara, M., and Nagama, T., (1992) *The effect of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity,* Carbohydr. Res, **224**: 343-347.

Gacessa, P., (1998) *Bacterial alginate biosynthesis, Recent progress and future prospects*, Microbiology, **144**, 1133 - 1143.

Gacessa, P., and Rusell, N.J., (1990) *Pseudomonas infection and alginates biochemistry, genetics and pathology*, Chapaman & Hall.

Haug, A., Larsen, B., and Smidsrod, (1974) *Uronic acid sequence in alginate from different sources*. Carb. Res. **32**, 217-225.

Horan, N.J., Jarman, T.R., and Dawes, E.A., (1983) *Studies on some enzymes of alginic acid biosynthesis in Azotobacter vinelandii grown in continuous culture*, J. Gen. Microbiol. **129**, 2985- 2990.

Knutson, C.A., and Jeanes, A., (1968) *A new modification of the carbazole analysis: Application to heteropolysaccharides*, Analyt. Biochem. **24,** 470-481.

Lebrun, L.O., Junter, G.A., Jouenne, T., and Mignot, L. (1994) *Exopolysaccharide production by free and immobilized microbial cultures*, Enzyme Microbial. Technol., **16**, 1048-1054.

Obika, H., Sakakibara, J., and Kobayashi, Y., (1993) *Direct control of constituents ration a wide range in alginate produced by Azotobacter vinelandii*, Biosci, Biotech. Biochem. **57(2),** 332 - 333.

Otterlei, M.K., Ostgard, G., Skjak - berak, O., Smidsrod, P., Soon - Shoing and Espevik, T., (1991) *Induction of cytokine Production from human monocytes stimulated with alginates* J. Immunother. **10**, 286-291.

Parente, E., Crudle, M.A., Aquino, M., and Clementi , F., (1998) *Alginate production by Azotobacter vinelandii DSM 576 in batch fermentation* . J . Ind . Microbiol. Biotechol , **20**, 171-176 .

Roller, S., and Dea, C.M., (1992) *Biotechnology in the production and modification of biopolymers for food*. Crit. Rev. Biotechnol **12(3),** 261-277.

Tchan, Y.T., *Azotobacteriaceae*, In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 (Eds: Kreig, N. R. and Hoh, J.G.) Williams & Wilkins, 1984, P. 220 -237.

Thorat, S.S., and Ingle, V. M., (1992) *Exopolysaccharide from sugarcane molasses using Azotobacter vinelandii*: *Condition for Production, yield and function Properties*. Indian Sugar, **8**, 297 - 303.

Sadoff, H., L. (1972) *Encystment and germination of Azotobacter vinelandii*, Bacterial. Rev, **39**, 416 -539.

Sime, W. J., (1990) *Alginates*, In: Food Gells, Ed, Peter Harris, Elsevier, 53-77.

Skjak-Break, G., and Sperik, T., (1996) *Application of alginate gels in biotechnology and biomedicine*, Carbohydr. Bur. **14**, 19-25.

Smidsrod, D., Dragent, K. I., (1996) *Chemistry and physical properties of alginates*, Carbohydr. Eur., **14**, 6-13.

Soon-Shiong, P., Feldman, E., Nelson. R., Heintz, R., Yao, Q., Yao, Z., Zheng, T., Merideth, N., Skjak-Break, G., Espevik, T., Smidsrod, O., and Sandford, P.,

(1993) *Long therm reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90,** S843-2847.

Vermani , M.V., kelkarr , S.M., and Kamat M.Y., (1997) *Studies in Polysaccharide Production and growth of Azotobacter vinelandii , MTCC 2459 , a plant rhizosphere isolate* , Lett. Appl . Microbial. **24**, 379-383.