فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دوازدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۸ ص. ۵۲-۴۳

مقاله پژوهشی

تأثیر منابع کربن گلوکز، ساکاروز و لاکتوز بر رشد باکتری آلکالیجنس اوتروفس جهت تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات

عاطفه فرجادمنش[۱]، سید احمد عطائی[۱*]

[۱] گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[*] Email: Ataei@mail.uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۶

چکیده

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها گروهی از پلیمرها می‌باشند که توسط بسیاری از باکتری‌ها، به هنگام ورود به فاز ثابت رشدی و در حضور منابع معدنی تولید می‌شوند. هدف از این پژوهش بررسی محیط کشت‌های مختلف حاوی منابع کربن گلوکز، ساکاروز، لاکتوز، ترکیب این سه منبع کربن بر رشد باکتری آلکالیجنس اوتروفس جهت تولید پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر هیدروکسی بوتیرات-والرات می‌باشد. در این پژوهش به‌منظور تولید هیدروکسی بوتیرات-والرات و بررسی تأثیر منابع مختلف کربنی بر تولید، باکتری آلکالیجنس اوتروفس شناسایی شد. جهت انجام آزمایشات در حالت ناپیوسته‌ی خوراک‌دهی شده اسید استیک و ترکیب اسید پروپیونیک به همراه اسید استیک به‌عنوان منبع اسید چرب فرّار به صورت مرحله‌ای به محیط کشت افزوده شد. محیط کشت‌های مورد نظر همراه با باکتری تلقیح شده جهت گرمارسانی و تولید پلیمر به انکوباتور با دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد، دور ۱۲۰ rpm و زمان ماند سلولی ۷۲ ساعت انتقال داده شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که منبع کربن گلوکز به همراه اسید استیک باعث تولید بیشترین مقدار هیدروکسی بوتیرات-والرات (HB= ۳/۴۸۶۰ g/l وHV=۰/۷۹۴۰ g/l) شده است. همچنین کمترین مقدار تولید هیدروکسی بوتیرات (HB=۲/۳۱۲۴ g/l) مربوط به زمانی است که از ساکارز به‌عنوان منبع کربن و ترکیب اسید استیک و اسید پروپیونیک استفاده شده است. نتایج نشان داد که باکتری آلکالیجنس اوتروفس منبع کربنی گلوکز و منبع اسید چرب اسید استیک را نسبت به سایر منابع کربنی، بیشتر مورد استفاده قرار داده است.

کلیدواژه‌ها: نابع کربنی، باکتری‌های تولید کننده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر، روش‌های کشت سلولی ناپیوسته‌ی خوراک‌دهی‌شده.

۱-مقدمه

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (Polyhydroxybutyrate-PHAs)، گروهی از پلیمر ها می‌باشند که دارای کاربردهای متنوعی از جمله استفاده از آن‌ها در ساخت انواع الیاف، شامپو و مواد آرایشی، انواع صفحات و جایگزین های استخوان (پروتزها)، نخ ها و د ستکش‌های جراحی، زخم‌پوش‌ها، جایگزین عروق خون و انواع فیلم‌های بسته‌بندی، کیسه و ظروف می‌باشد [۲۰]. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (Polyhydroxybutyrate-PHB) نوعی از پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (Polyhydroxybutyrate-PHAs) می‌باشد که به‌عنوان ذخیره‌ی کربن و انرژی ویژه در ارگانیسم‌های متنوعی تحت شرایط اختصاصی به هنگام محدودیت مواد غذایی تولید می‌شود و به‌عنوان منبع داخلی کربن و انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۹]. این پلیمر به لحاظ خواص، بسیار مشابه پلاستیك‌هاي صنعتي پلي‌پروپيلني است و با كمي تغيير مي‌تواند در بسياري موارد جايگزين مناسبي براي اين د ست از پلاستيك‌ها باشد [۱۶]. این انکلوزیون‌های لیپیدی توسط بسیاری از باکتری‌ها، به هنگام ورود به فاز ثابت رشدی تولید. در بعضی از میکروارگانیسم‌ها تا ۹۰-۸۰ درصد وزن خشک سلولی (Cell dry weight-CDW) را هیدروکسی-بوتیرات تشکیل می‌دهد. کنترل و تولید هیدروکسی‌بوتیرات در مقیاس بالا توسط باکتری‌ها امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است. PHB در مایع سیتوپلاسمی به شکل گرانول‌های کریستالی به قطر ۰/۵ میکرومتر بوده و می‌توان آن‌ها را به‌صورت گرانول‌های دست‌نخورده و یا با عصاره‌گیری توسط حلال جدا نمود [۹]. در سال ۱۹۶۸ اطلاعات فني در مورد تخمير در مقياس وسيع و نيز مهارت در زمينه فرايندهاي پليمري افزايش چشمگيري پيدا كرد. در اين زمان شركت ICI (Imperical chemical industries Ltd) باكتري آلكاليجنس اوتروفوس (*Ralstonia eutropha*) (كه با نام‌هاي واترسيا اوتروفا (*Wautersiaeutropha*) و رالستونيا اوتروفا (*Ralstonia eutropha*) نيز شناخته مي‌شود) را كه قادر به توليد و تجمع PHB تا بيش از ۷۰% وزن خشك سلولي است، معرفي كرد [۱۸ و ۲۳]. اين باکتری متعلق به گروه‌های گرم‌منفی کوکسی می‌باشد [۱] و به خانواده بولخوردر یا (Burkholderiaceae) و کلاس β-پروتئو باکتریوم (β-proteobacteria) تعلق دار ند [۱۷]. کمولیتواتوتروف رالستونیا اوترو فا H16 یک باکتریوم بیوتکنولوژیکی است که قادر به ساختن طیف وسیعی از متابولیت‌ها و بیوپلاستیک‌ها از مواد آلی و از هر دو حالت هتروتروفیکی و لیتواتوتروفیکی می باشد [۲۱]. رالستونیا اوتروفا H16 قادر به رشد با هیدروژن مولکولی به‌عنوان دهندهٔ الکترون و انرژي می‌باشد. این سویه مقادیر زیادي پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در خود ذخیره کرده و به‌عنوان یک ارگانیسم مدل براي مطالعهٔ جنبه‌هاي مختلف متابولیسم PHAs مطرح است. ژن‌هاي متعلق به این سویه که مربوط به ساخت PHAs هستند، به‌طور موفقیت‌آمیزي در باکتري‌ها، مخمرها، گیاهان و سلول‌هاي حشرات بیان و همچنین مطالعات زیادي نیز بر روي دست‌ورزي تولید در خود این باکتري متمرکز شده‌اند [۲۲].

سنتز موفق PHA، نه تنها به نوع میکروارگانیسم مورد استفاده، بلکه به شرایط تغذیه‌ای نیز بستگی دارد. انتخاب منبع کربنی مناسب یکی از فاکتورهای کلیدی برای کاهش هزینه‌ی تولید PHA می‌باشد [۲]. لاکتیک اسید و روغن‌های نباتی جزو سوبستراهای مفید برای تولید این پلیمر می‌باشند. رالستونیا اوتروفا همچنین قادر به تولید هموپلیمر P(3HB) ازکربن‌های N-آلکانوات‌ها (N-alkanoates) می‌باشد. مطالعات تولید PHA در شرایط اتوتروف نشان داده است که رالستونیا اوتروفا همچنین می‌تواند از دی‌اکسیدکربن برای تولید P(3HB) استفاده کند [۲۴].

محسنی و همکارانش [۵] در پژوهشی باجداسازي سويه‌اي از باسيلوس سوبتيليس (*Bacillus subtilis*) با محيط كشت گلوكز و عصاره مخمر توانستند در مدت ۷۲ ساعت مقدار ۰/۵۹ گرم به ازاي هر گرم وزن خشك سلول بيوپليمر توليد كنند. بركا (*Berekaa*) و توادی (*Thawadi*) [۷] ثابت كردند كه در باسيلوس مگاتريوم حداكثر توليد PHB هنگامی می‌باشد که از گلوکز به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شده است. بلال (*Belal*) [۶] با مطالعه‌ای در مورد تولید PHB به‌وسیله‌ی رایزوبیوم التی (*Rhizobium elti*) و

سودوموناس استاتزرای (*Pseudomonas stutzeri*) نشان داد که شکر مانیتول (Mannitol) و بعد از آن ساکاروز، به‌عنوان بهترین منابع کربن برای تولید می‌باشند. گوما (*Gomaa*) [۱۱] در تحقیقات خود نشان داد که باسیلوس سوبتیلیس و اشرشیا کولای قادر به تجمع PHA بیش از ۷۰% از وزن خشک سلولی می‌باشند. بوکیکلی (*Borcakli*) و همکارانش [۱۳] با پژوهشی که بر روی تولید پلی‌استرهای میکروبی توسط آلکالیجنس اوتروفس انجام دادند، گزارش کردند که ترکیب لاکتوز و اسید استیک باعث تولیدکوپلیمرهای PHBV، که دارای ۹۷% مولی PHB می‌باشد، می‌شود.

با توجه به نتایج محققان منابع کربن گلوکز، ساکاروز و لاکتوز جزه بهترین منابع برای رشد باکتری آلکالیجنس اوتروفس جهت تولید بهینه کوپلیمرهای PHBV می‌باشند.

برخی از سئوالات پژوهش حاضر شامل موارد زیر بودند:

آیا منابع مختلف کربنی تأثیر متفاوتی بر تولید پلی-هیدروکسی‌بوتیرات توسط باکتری آلکالیجنس اوتروفس خواهند گذاشت؟

آیا افزودن مرحله‌ای اسیدهای چرب نسبت به پژوهش-های دیگر محققان نتایج بهتری را رقم خواهد زد؟

هدف از این پژوهش، تعیین اثر منابع کربن مختلف بر تولید هیدروکسی‌بوتیرات به عنوان یک پلیمر دوستار محیط زیست توسط باکتری آلکالیجنس اوتروفس می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری: تحت شرایط بهینه، مي‌توان PHB را با درصد خلوص ۹۷% و بازدهي ۹۱% از باکتري آلکالیجنس اوتروفس استخراج نمود [۲۵]. سرعت رشد این باکتري از سایر باکتري‌هاي کمولیتواتوتروف بیشتر و در مقیاس صنعتي مفیدتر است [۱۴ و ۱۹]. همچنین با توجه به شرایط رشد آسان و فیزیولوژی و بیوشیمی آن که منجر به سنتز PHA می‌شود مورد مطالعه بسیاری از محققان قرار گرفته است [۱۰]. با توجه به این مزیت‌ها این باکتری از کلکسیون میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) سفارش داده شد.

مشخصات باکتری *آلکالیجنس اوتروفس*: مشخصات و محیط کشت تعریف شده برای باکتری آلکالیجنس اوتروفس، به‌ترتیب در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. پلي‌استرهاي زیست‌تخریب‌پذیر به صورت ذراتي درون سیتوپلاسم باکتري به‌عنوان ذخیره کربن، تحت شرایط نامطلوب رشد همچون محدودیت در نیتروژن، فسفات، منیزیم یا اکسیژن انباشته مي‌شوند [۱۵].

محیط‌های کشت میکروبي و نحوه‌ی تهیه‌ی آن‌ها: در این پژوهش از سه نوع محیط کشت با نام‌های محیط کشت ذخیره، محیط کشت بذر و محیط کشت تخمیر به‌منظور رشد مناسب میکروارگانیسم استفاده شد. ترکیباتی که برای محیط کشت باکتری لازم بود (جدول ۲) به‌عنوان محیط کشت ذخیره‌ی باکتری و محیط کشت بذر نیز به‌صورت ترکیبی از نمک‌های معدنی (جدول ۳) انتخاب شد. هدف از تهیه‌ی کشت بذر، تهیه‌ی توده‌ی سلولی فعال برای تلقیح به محیط کشت تولید می‌باشد.

جدول ۱: مشخصات باکتری *آلکالیجنس اوتروفس*، برگرفته از سایت کلکسیون میکروبی ایران

شماره PTCC	۱۶۱۵
نام	*Alcaligenes eutrophus*
شماره مجموعه‌های دیگر	ACM ۱۲۹۶
اطلاعات	استخراج شده از سویه ATCC ۱۷۶۹۹ و تولید کننده پلی‌هیدروکسی‌بوتیریک‌اسید
محیط کشت	۶۹
شرایط دمایی	۲۸°C
نحوه ارائه	خشک و فریز شده
گروه خطر	۱

جدول ۲: محیط کشت ۶۹ باکتری آلکالیجنس اوتروفس، برگرفته از سایت کلکسیون میکروبی ایران

پپتون (مرک، آلمان)	g ۱۰/۰
عصاره مخمر (مرک، آلمان)	g ۵/۰
NaCl (مرک، آلمان)	g ۵/۰
آب مقطر (بتا شیمی پارس)	۱/۰L
تنظیم pH در ۷/۲ و افزودن ۱/۵ درصد LB آگار (مرک، آلمان)	

جدول ۳: ترکیبات محیط کشت بذر

غلظت (g/l)	ماده
۳/۵	$Na_2HPO_4.12H_2O$ (بایوکم فرانسه)
۱/۵	KH_2PO_4 (مرک، آلمان)
۱/۳۵	$(NH_4)_2SO_4$ (مرک، آلمان)
۰/۱	$MnSO_4.5H_2O$ (مرک، آلمان)
۰/۲	$MgSO_4.7H_2O$ (مرک، آلمان)
۰/۰۸	$ZnSO_4.7H_2O$ (مرک، آلمان)
۲/۲	K_2SO_4 (مرک، آلمان)
۰/۰۲	H_3BO_3 (مرک، آلمان)
۰/۰۸	$CuSO_4.5H_2O$ (مرک، آلمان)
۰/۱	$FeSO_4.7H_2O$ (مرک، آلمان)

محیط کشت سوم که از آن تحت عنوان محیط کشت تخمیر یاد می‌شود، شامل محیط کشت بذر می‌باشد؛ با این تفاوت که منبع کربنی که برای این محیط استفاده می‌شود دارای غلظت بیشتری می‌باشد. منابع کربنی که به این منظور مورد آزمایش قرار گرفت شامل گلوکز، لاکتوز، ساکاروز و مخلوطی از این سه منبع کربنی در نظر گرفته شد. از این منابع کربنی به مقدار g/l ۳۰ و مجدداً از هر کدام آن‌ها به مقدار g/l ۱۰ (به‌منظور تهیه‌ی ترکیبی از سه منبع کربنی) وزن شده و با آب مقطر حل گشته و به ارلن و سپس به اتوکلاو به‌منظور استریل کردن منتقل شد. اسیدهای چرب استفاده شده نیز شامل اسید استیک و مخلوط اسید استیک و اسید پروپیونیک می‌باشد. مقدار استفاده شده از این اسیدها به‌صورت پیشنهادی به‌میزان پنج میلی‌لیتر تعیین شد.

فعال کردن باکتری *آلکالیجنس اوتروفس*: کپسولی که از کلکسیون میکروبی تهیه شده بود در مجاورت شعله قرار گرفت. در این مرحله طبق دستور کاری که در بروشور راهنمای کلکسیون میکروبی نوشته شده بود، عملیات فعال-سازی باکتری انجام گرفت.

کشت باکتری به‌صورت سطح شیبدار در لوله آزمایش: مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت ذخیره به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و مقدار سه گرم آگار به آن اضافه شد و پس از استریل کردن به‌حالت شیبدار در دمای محیط قرار داده شدند. پس از تلقیح باکتری، گرمارسانی در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد و به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. پس از طی این مراحل ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت بذر به دو ارلن منتقل گشت، سپس به هر کدام از ارلن‌ها دو لوپ از باکتری‌هایی که

بر روی اسلنت کشت داده شدند تلقیح شد و مجدداً برای رشد به انکوباتور با دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد و دور ۱۰۰ rpm منتقل شد. دو ارلن حاوی باکتری تلقیح شده بعد از ۲۴ ساعت گرمادهی از انکوباتور خارج شدند.

تعیین سطوح و طراحی آزمایشات به صورت ناپیوسته‌ی خوراک‌دهی شده: به‌منظور بهینه‌سازی شرایط از متغیرها با انواع مختلف و از نرم‌افزار مینی‌تب ۱۶ با استفاده از روش طراحی کامل فاکتوریل (Full factorial design) جهت طراحی آزمایش و تعیین شرایط بهینه استفاده شد. منابع کربن گلوکز (G)، لاکتوز (L)، ساکاروز (S) و مخلوط این سه منبع کربنی به نسبت یکسان (G-L-S) ، برای انجام آزمایشات انتخاب شدند. اسیدهای چرب شامل استیک اسید (AA) و پروپیونیک اسید (PA) و ترکیب استیک اسید و پروپیونیک اسید به نسبت یکسان (AA-AP) به‌عنوان عواملی برای تشخیص بازده تولید پلیمر در شرایط ناپیوسته‌ی خوراک‌دهی شده به‌صورت ارلن‌های لرزان انتخاب شدند. کلیه‌ی متغیرها نیز در زمان ماند ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به متغیرها و نوع آن‌ها، آزمایش‌ها به‌صورت جدول ۴ طراحی شدند.

جدول ۴: طراحی آزمایش انجام شده با استفاده از متغیرها و نوع آن‌ها

شماره آزمایش	منبع کربن	اسید چرب
۱	G	AA-AP
۲	L	AA
۳	S	AA-AP
۴	G-L-S	AA-AP
۵	G-L-S	AA
۶	G	AA
۷	L	AA-AP
۸	S	AA

مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تخمیر و پنج میلی‌لیتر از محیط کشت بذر حاوی باکتری مخلوط شدند. سپس ۱/۲۵ میلی‌لیتر اسید چرب با توجه به طراحی آزمایش به ارلن‌های چهار نوع محیط کشت، با منابع کربن مختلف مشخص شده اضافه گردید. سپس درب ارلن‌ها با پنبه و ورق آلومینیوم پوشانده شده و به انکوباتور در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتیگراد و دور ۱۲۰rpm انتقال داده شد. باقیمانده اسیدهای چرب به‌همان مقدار قبل در دو مرحله‌ی دیگر به محیط‌های کشت اضافه شدند.

تعیین وزن خشک سلولی: با توجه به روش‌های تعیین وزن خشک سلولی در پژوهش‌های عطائی [۴] و شفیعی و همکاران [۳] بعد از طی شدن زمان گرمارسانی ۷۲ ساعت، نمونه‌های آزمایش شده از انکوباتور خارج شده و پنج میلی-لیتر از این نمونه‌ها به لوله‌های آزمایش جهت تعیین وزن خشک سلولی انتقال داده شد. لوله‌های حاوی محیط کشت و پلیمر تولید شده به‌مدت ۲۰ دقیقه درون سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰ rpm قرار گرفت. بعد از عمل سانتریفوژ و ته‌نشینی توده‌ی میکروبی، مایع رویی درون لوله‌های آزمایش دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با پنج میلی‌لیتر آب مقطر به‌حالت تعلیق درآمده و به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm مجدداً سانتریفوژ شد. رسوب حاصل به بشقابک‌های شیشه‌ای که از قبل توزین شده بود منتقل شده و در دمای ۹۰ درجه‌ی سانتیگراد جهت رسیدن به وزن ثابت در آون نگهداری شد. سپس بعد از سرد شدن کامل نمونه‌ها توزین مجدد جهت تعیین وزن خشک سلولی انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار پلیمر: با توجه به روش‌های اندازه‌گیری مقدار پلیمر در پژوهش‌های عطائی [۴] و شفیعی و همکاران [۳] در این پژوهش از کلروفرم و متانول اسیدی برای حل کردن دیواره‌ی سلولی استفاده شد. پس از سانتریفوژ و ته-نشینی توده‌ی سلولی، استانداردهای PHB و PHBV (۱۲% HV) از شرکت مرک الدریچ به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و بعد از آن دو میکرولیتر از نمونه‌ها توسط سرنگ مخصوص آماده شده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. بدین‌منظور از دستگاه کروماتوگرافی گازی دانشگاه شهید باهنر کرمان استفاده شد.

۳-یافته‌ها

پس از تزریق استانداردها و مشخص شدن زمان پیک، تزریق نمونه‌های مربوط به آزمایشات تولید پلیمر انجام شده و سطوح زیر منحنی یادداشت شد. مقادیر تولیدی

هیدروکسی‌بوتیرات و هیدروکسی‌والرات در جدول ۵ آورده شده است.

با استفاده از نتایج داده‌های حاصل ازآزمایشات مربوطه و استفاده از آنالیز روش طراحی کامل فاکتوریل در نرم‌افزار مینی‌تب، مقادیر P_v (جدول ۶ و ۷) محاسبه شد. درجه‌ی اهمیت فاکتورها و انواع آن‌ها با استفاده ازمقدار P_v مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج جدول و ارقام به‌دست آمده برای فاکتورهای مورد بررسی نشان می‌دهد که برای فاکتور منبع کربن مقدار P_v از ۰/۰۱ کوچکتر بوده، در نتیجه تأثیر این فاکتور بسیار بااهمیت بوده و نتیجه‌ی معنی‌داری بر تولید پلیمر دارد. برای فاکتور نوع اسید چرب مقدار P_v ، ۰/۰۱۸ می‌باشد که در نتیجه تأثیر تغییر نوع اسید چرب بر تولید پلیمر بااهمیت می باشد.

با توجه به نمودار میله‌ای ترسیم شده (شکل ۱) این نتایج استنباط می‌شود که از میان منابع کربن گلوکز، لاکتوز، ساکاروز و مخلوط این سه منبع کربن، گلوکز بیشترین تأثیر را بر تولید پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات گذاشته است. بعد از گلوکز مخلوط سه منبع کربن تولید پلیمر بیشتری را نسبت به لاکتوز و ساکاروز داشته است. لاکتوز و ساکاروز تقریباً مشابه به هم عمل کرده و نتایج تقریباً یکسانی داشته‌اند. حضور گلوکز در مخلوط سه منبع کربن باعث شده است که نسبت به لاکتوز و ساکاروز تولید هیدروکسی‌بوتیرات بالاتری داشته باشد. استفاده از منبع کربنی گلوکز باعث شده که نسبت به منبع قندی ساکاروز، ۱۱% افزایش در تولید پلیمر ایجاد شود. مخلوط سه منبع کربنی نیز نسبت به ساکاروز باعث شده تولید هیدروکسی‌بوتیرات حدود ۴% افزایش یابد.

جدول ۵: مقادیر تولیدی هیدروکسی‌بوتیرات و هیدروکسی‌والرات با توجه به متغیرها و نوع آن‌ها

شماره آزمایش	منبع کربن	اسید چرب	HB (g/l)	HV (g/l)	CDW (g/l)
۱	G	AA-AP	۳/۱۵۸۴	۰/۴۹۶۱	۴/۵۰
۲	L	AA	۲/۴۷۳۲	۰/۳۷۰۱	۴/۳۲
۳	S	AA-AP	۲/۳۱۲۴	۰/۳۰۱۲	۵/۰۱
۴	G-L-S	AA-AP	۲/۵۹۲۰	۰/۱۸۴۳	۴/۱۰
۵	G-L-S	AA	۲/۷۰۶۰	۰/۳۸۵۱	۴/۷۶
۶	G	AA	۳/۴۸۶۰	۰/۷۹۴۰	۵/۱۰
۷	L	AA-AP	۲/۳۹۴۶	۰/۲۹۳۴	۴/۰۲
۸	S	AA	۲/۳۴۳۰	۰/۳۶۹۹	۵/۱۸

جدول ۶: مقادیر P_v محاسبه شده برای داده‌های حاصل از نتایج آزمایشات هیدروکسی‌بوتیرات، با استفاده از طراحی کامل فاکتوریل

متغیر	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P_v
منبع کربن	۳/۱۳۱۰	۳/۱۳۱۰	۱/۰۴۳۷	۲۵/۲۲	۰/۰۰۱
اسید چرب	۰/۶۹۷۰	۰/۶۹۷۰	۰/۳۴۸۵	۸/۴۲	۰/۰۱۸

جدول ۷: مقادیر P_v محاسبه شده برای داده‌های حاصل از نتایج آزمایشات هیدروکسی والرات، با استفاده از طراحی کامل فاکتوریل

متغیر	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P_v
منبع کربن	۰/۲۶۶۴	۰/۲۶۶۴	۰/۰۸۸۸	۸۳/۷۸	۰/۰۰۰
اسید چرب	۰/۲۳۸۲	۰/۲۳۸۲	۰/۱۱۹۱	۱۱۲/۳۶	۰/۰۰۰

تأثیر منابع کربن بر تولید کوپلیمر هیدروکسی‌والرات به حضور اسید چرب وابسته می‌باشد. به این دلیل که وجود اسید چرب فرّار در محیط کشت باعث تولید کوپلیمر هیدروکسی‌والرات شده و محیط کشت بدون حضور این اسیدهای چرب تولید والرات نخواهد داشت. از میان منابع کربن گلوکز، لاکتوز، ساکاروز و مخلوط این سه منبع کربن، گلوکز بیشترین تأثیر را بر تولید پلیمر هیدروکسی‌والرات گذاشته است. این نتایج نشان‌دهنده‌ی عملکرد بهتر این منابع کربن در کنار اسیدهای چرب استفاده شده می‌باشد. بدین صورت که در میان این منابع کربن، گلوکز همراه با حضور اسیدهای چرب عملکرد بهتری برای تولید هیدروکسی‌والرات نشان داده است و این نتیجه نشان می‌دهد که با استفاده از مخلوط گلوکز و اسیدهای چرب می‌توان به درصد بالاتری از والرات دست یافت. با استفاده از گلوکز به عنوان منبع مکمل در کنار اسیدهای چرب نسبت به حالتی که از مخلوط سه منبع قندی استفاده شده است، تولید کوپلیمر هیدروکسی-والرات حدود ۲۶ % افزایش یافته است. این نتایج به دلیل کیفیت بهتر قند گلوکز نسبت به سایر منابع قندی می‌باشد. تأثیر اسید استیک نسبت به مخلوط اسید استیک و پروپیونیک اسید بر میزان تولید هیدروکسی‌والرات بیشتر می‌باشد و نتایج بهتری را در آزمایش‌های انجام شده از خود نشان داده است. کوتاهی زنجیره‌ی اسید استیک باعث شده که نتایج تولید پلیمر افزایش یابد. لازم به ذکر است که پروپیونیک اسید در مطالعات دیگر محققان نتایج قابل قبولی نشان داده است و نتایج در این پژوهش صرفاً مقایسه اسید استیک با مخلوط اسید استیک و پروپیونیک اسید می‌باشد و این مسئله تولید والرات به‌وسیله‌ی پروپیونیک را انکار نمی‌کند.

۴-بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش بیشترین مقدار تولید پلیمر پلی‌هیدروکسی-بوتیرات (۳/۴۸۶۰ gr/lit) مربوط به زمانی است که از گلوکز و اسید استیک استفاده شده است. همچنین در این فرایند کمترین مقدار تولید پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (۲/۳۱۲۴ gr/lit) مربوط به زمانی است که از ساکارز به‌عنوان منبع کربن و ترکیب اسید استیک و اسید پروپیونیک استفاده شده است. مقادیر لاکتوز و ساکارز تقریباً مشابه بوده و نشان می‌دهد که این دو منبع کربن عملکرد تقریباً مشابهی داشته‌اند. این نتایج به این دلیل می‌باشد که در میان منابع کربن در نظر گرفته شده، گلوکز نسبت به سایر منابع دارای کیفیت بهتری بوده و در اصطلاح قند قوی‌تری محسوب می‌شود. به‌طور کلی گلوکز به دلیل کیفیت بالا باعث شده که باکتری، ذخیره‌ی درون‌سلولی بهتری انجام داده و در نتیجه بعد از انجام عملیات استخراج میزان پلیمر بیشتری را در سیتوپلاسم خود نگهداری کرده باشد. به این معنی که باکتری منبع کربنی گلوکز را نسبت به سایر منابع کربنی، بیشتر مورد استفاده قرار داده است. درمیان اسیدهای چرب مورد استفاده وجود اسید استیک به تنهایی نتایج بهتری را از خود نشان داده است.

شکل ۱: تأثیر منابع کربن مختلف بر تولید هیدروکسی‌بوتیرات توسط باکتری آلکالیجنس اوتروفس

گوتشمن (*Gutschmann*) و همکارانش [۱۲] در پژوهشی با استفاده از رالستونیا اوتروفا با محیط کشت TSB، روغن‌های گیاهی و نمک‌های معدنی توانستند ۱/۶۵ گرم بر لیتر PHB تولید کنند. بزرگ و همکارانش [۸] با استفاده از ملاس نیشکر به عنوان منبع کربن رالستونیا اوتروفا توانستند ۱/۶۳ گرم بر لیتر PHB تولید کنند. مقایسه نتایج این پژوهش با پژوهش‌های دیگر محققان نشان‌دهنده‌ی این مطلب می-باشد که استفاده از محیط کشت‌های مشابه با پایه گلوکز می-تواند سبب افزایش تولید PHB شود و همچنین می‌توان یا اضافه کردن تدریجی اسیدهای چرب موجب افزایش تولید هیدروکسی‌بوتیرات–والرات شد.

تولید پلیمر PHA بسیار پرهزینه بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نمی‌باشد. استفاده از منابع کربن

ارزان‌قیمت می‌تواند به روند تولید این پلیمر کمک شایانی داشته باشد. استفاده از منابع کربنی که دارای گلوکز بیشتر بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه باشد، همچنین استفاده از فرایند ناپیوسته‌ی خوراک‌دهی شده برای تولید این پلیمر می‌تواند حائز اهمیت باشد. غلظت منبع کربن نیز پارامتری مؤثر بر روند تولید پلیمر می‌باشد. در این پژوهش سعی شده است از غلظتی بهینه (۳۰g/l) با استفاده از نتایج پژوهش‌های گذشته استفاده شود. ولی این نکته حائز اهمیت است که تغییر غلظت و به‌دست آوردن مقداری که از لحاظ اقتصادی نیز مقرون‌به‌صرفه باشد می‌تواند سهم بسزایی در کاهش هزینه‌های تولید داشته باشد. یکي دیگر از راهبردهاي مهم در کاهش قیمت تمام شده‌ی PHB، کاهش هزینه‌هاي استخراج این محصول درون‌سلولي است. با مقایسه‌ی روش‌های استخراج و شرایط آزمایش بهترین روش با توجه به شرایط اقتصادی باید انتخاب شود.

منابع

[۱] احمدی، م، منصوریان، و. ۱۳۹۳، بررسی محیط کشت فراوری شده‌ی خرمای بازیافتی برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات با استفاده از باکتری آلکالیجنس اوتروفس. دومین همایش ملی کشاورزی و منابع طبیعی پایدار، مؤسسه‌ی آموزش عالی مهر اروند: گروه ترویجی دوست‌دارن محیط زیست و انجمن حمایت از طبیعت ایران.

[۲] خواجه‌ئی، ن، اسکندری، م.ه، نیاکوثری، م. ۱۳۹۲، جداسازی لاکتیک اسید باکتری‌های تولید کننده‌ی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها از منابع طبیعی. بیست و یکمین کنگره‌ی ملی علوم و صنایع غذایی ایران، دانشگاه شیراز: انجمن علوم و صنایع غذایی ایران.

[۳] شفیعی، م، عطائی، ا، صدیق مرتضوی، م. ۱۳۹۱، تصفیه‌ی پساب صنایع لبنی (آب‌پنیر) در راستاي تولید پلیمرهاي زیست‌تخریب‌پذیر. همایش ملی مهندسی آب و فاضلاب، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوري پیشرفته‌ی کرمان.

[۴] عطائی، ا. ۱۳۸۷، تعیین شرایط بهینه‌ی تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها با استفاده از سوبستراي ارزان قیمت. رساله‌ی دکتري، دانشگاه تربیت مدرس تهران.

[۵] محسنی، آ، عطائی، ا، فضائلی‌پور، م.ح. ۱۳۹۰. جداسازي سویه‌اي از *Bacillus subtilis* از پساب کارخانه‌ی شیر پگاه کرمان براي تولید پلي‌هیدروکسي‌بوتیرات. نشریه‌ی علوم و مهندسي جداسازي، دوره‌ی سوم، ۲: ۴۱-۳۵.

[6] B. Belal E. 2013. Production of Poly-β-Hydroxybutyric Acid (PHB) by *Rhizobium elti* and *Pseudomonas stutzeri*, Current Research Journal of Biological Sciences, 5: 273-284.

[7] Berekaa M., Thawadi A. 2011. Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer by *Bacillus megaterium SW1-2*: Application of Box-Behnken design for optimization of process parameters, *African Journal of Microbiology Research*, 6: 838-845.

[8] Bozorg A., Vossoughi M., Kazemi A., Alemzadeh I. 2015, Optimal Medium Composition to Enhance Poly-βhydroxybutyrate Production by *Ralstonia eutropha* Using Cane Molasses as Sole Carbon Source, Applied food biotechnology, 2:39-47.

[9] Das, Q., Chowdhury, J.U., Anwar, M.N. 2004, Isolation, Purification and Characterization of Biodegradable Polymer Producing Bacteria Listeria murrayi. Pakistan Journal of Biological Sciences. 7(11): 2018-2021.

[10] Du G., Chen J., Gao H., Chen Y., Lun Sh. 2000, Effects of environmental conditions

on cell growth and poly-b-hydroxybutyrate accumulation in *Alcaligenes eutrophus*, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16: 9-13.

[11] Gomaa E. 2014. Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) By *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol, Brazilian archives of biology and technology, 57: 145-154.

[12] Gutschmann B., Schiewe T., T.H. Weiske M., Neubauer P., Hass R., L. Riedel S. 2019, In-Line Monitoring of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production during High-Cell-Density Plant Oil Cultivations Using Photon Density Wave Spectroscopy, Bioengineering, 6:1-14.

[13] Kocer H., Borcakli M., Demirel S. 2003. Production of Bacterial Polyesters from Some Various New Substrates by *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas oleovorans*, Turkish Journal of Chemistry, 27: 365 - 373.

[14] Kodoma T., Igarashi Y., Minoda Y. 1975, Isolation and culture conditions of a bacterium grown on hydrogen and carbon dioxide, Agr. Biol., 39:77-89.

[15] Lee S.Y., 1996. Review on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnol Bioeng, 49:1-14.

[16] Li, Z., Qi, Q. 2007, The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant Escherichia coli. Bioresource Technology. 98(12): 2313-2320.

[17] Moriuchi R., Dohra H., Kanesaki Y., Ogawa N. 2019, Complete Genome Sequence of 3-Chlorobenzoate-Degrading Bacterium Cupriavidus necator NH9 and Reclassification of the Strains of the Genera Cupriavidus and Ralstonia Based on Phylogenetic and Whole-Genome Sequence Analyses, Frontiers in Microbiology., 10:1-21.

[18] Oeding, V., Schlegel H.G. 1973, Beta-ketothiolase from Hydrogenomonas eutropha H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism, Biochem. J.,134:48-239.

[19] Page W.J., Manchak J., Rudy B.1992, Formation of (3- hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azobactervinelandii UWD*, Appl.Environ.Microbiol, 9:2866-2873.

[20] Pfeffer, J.T. 1992, Solid waste management engineering. First Edition, United States, Prentice Hall, P 10.

[21] Poladyan1 A., Blbulyan B., Sahakyan M., Lenz O., Trchounian A. 2019, Growth of the facultative chemolithoautotroph Ralstonia eutropha on organic waste materials: growth characteristics, redox regulation and hydrogenase activity. Microbial Cell Factories, 18:1-13.

[22] Reinecke F., Steinbuchel A. 2009, *Ralstonia Eutropha* Strain H16 As Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers, J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 16:91-108.

[23] Senior, P.J., Dawes, E.A. 1973, The regulation of poly-β-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*, Biochem. J., 134: 225-238.

[24] Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. 2000, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog. Polym. Sci.; 25(10): 1503-1555.

[25] Williams S., Martin DP. 2002, Applications of PHAs in medicine and pharmacy, in: Y Dio, A Steinbuchel (Eds.), Biopolymers, 10:91-121.

Journal of Developmental Biology
Vol. 12, No. 1, Winter 2020

The effect of glucose, sucrose, lactose carbon sources on the growth of *Alcaligenes eutrophus* for the production of polyhydroxybutyrate

Farjadmanesh, A.[1], Ataei S.A.[1*]

[1] Chemical engineering group, Engineering faculty, Shahid Bahonar university of Kerman, Kerman, Iran

[*] Email: Ataei@mail.uk.ac.ir

Received: 6 May 2019 Accepted: 5 February 2020

Abstract

Background & Objectives: Polyhydroxyalkanates are a group of polymers that are produced by many bacteria when they enter the growing phase in the presence of mineral sources. The Objective of this study is investigattion of the different culture containing carbon sources of glucose, sucrose, lactose, combination of these carbon sources, on the growth of Alcaligenes eutrophus to produce biodegradable polymers of hydroxy butyrate-valerate.

Materials & Methods: In this study Alcaligenes eutrophus was identified In order to producing of hydroxybutyrate-valerate and investigation of the effect of the different carbon sources on the production. To perform experiments, in fed-batch mode, acetic acid and propionic acid combination with acetic acid as a source of volatile fatty acid was added to the culture in a stepwise manner. The culture with inoculated bacteri were transferred to incubator at 32°C, 120 rpm and retention time of 72 hours, for to incubation and polymer production.

Results: The results of this study showed that the source of glucose as carbon with acetic acid produced the highest amount of hydroxybutyrate-valerate (HB= 3.4860 g/l and HV=0.7940 g/l). Also, the lowest amount of hydroxybutyrate production (HB= 2.3124 g/l) is Because of using sucrose as the carbon source and the combination of acetic acid and propionic acid.

Conclusion: The results showed that Alcaligenes eutrophus used carbon source of glucose and fatty acid source of acetic acid more than other sources of carbon.

Keywords: Carbon sources, Polyhydroxyalkanoate producing bacteria, Biodegradable Plastics, Fed-Batch Cell Culture Techniques.