

# بهینه‌سازی کشت میکروبی پلی‌هیدروکسی بوتیرات توسط میکروارگانیزم *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ-1041

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش مقاله ۹۰/۹/۱۲

پژوهش‌نفت

سال بیست و دوم

شماره ۶۹

صفحه ۷۳-۸۵ ۱۳۹۱

نریمان منتصر<sup>\*</sup>، امیر حیدری نسب<sup>۱</sup> و مهدی ارجمند<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده فنی مهندسی، گروه مهندسی شیمی

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، دانشکده فنی مهندسی، گروه مهندسی شیمی

narimaneng@yahoo.com

بازده تولید (Yp/s) در گلوکز و کلرید آمونیوم ۳۰ و ۰/۵ gr/L حاصل شد و حداکثر بهره‌دهی (Qp) در گلوکز و کلرید آمونیوم ۵۰ و ۱ gr/L حاصل گردید. همچنین میزان بیوپلیمر به دست آمده از روش آزمایشگاهی با روش آماری پاسخ سطح مقایسه شده و دقت آزمایش‌های انجام شده بررسی گردید. پس از استحصال بیوپلیمر خالص، طیف‌های FT-IR و NMR نیز صحت ماده فوق را تأیید نمود.

واژه‌های کلیدی: بیوپلیمر، پلی‌هیدروکسی بوتیرات، زیست تخریب‌پذیر، پاسخ سطح، *Azotobacter Beijerinckii*، PHB

## مقدمه

در حال حاضر اکثر پلاستیک‌های معمول در بازار از محصولات پتروشیمیایی هستند. این محصولات فرآورده‌های نفتی و ذغال سنگ تولید شده و غیر قابل بازگشت به محیط می‌باشند و تجزیه آنها و بازگشت به محیط چند هزار سال طول می‌کشد. همچنین منابع نفت و ذغال سنگ محدود می‌باشند. به علت پایداری پلاستیک‌های

## چکیده

در آزمایش‌های به‌عمل آمده در این تحقیق از میکروارگانیزم *Azotobacter Beijerinckii* DSMZ 1041 که از بانک میکروبی آلمان تهیه شد، استفاده گردید. بر اساس گزارش‌هایی که قبلاً ارائه شده و آزمایش‌های صورت گرفته مشخص شد که این میکروارگانیزم در شرایطی که منبع کربنی به میزان فراوان در محیط موجود بوده و منبع نیتروژنی محدود باشد، قابلیت تجمع گرانول‌های پلی‌هیدروکسی بوتیرات را دارا است. در این تحقیق منبع نیتروژنی (کلرید آمونیوم) با غلظت‌های ۰/۵ و ۲ gr/L و منبع کربنی (گلوکز) با غلظت‌های ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ gr/L مورد استفاده قرار گرفت و تأثیر غلظت‌های این دو ماده بر وزن خشک توده سلولی، میزان مصرف قند توسط میکروارگانیزم و میزان تولید بیوپلیمر بررسی گردید. بیشترین میزان تولید بیوپلیمر در غلظت گلوکز ۶۰ gr/L و کلرید آمونیوم ۰/۵ gr/L حاصل شد، لازم به ذکر است که غلظت‌های بالاتر گلوکز به علت بازدارندگی، میزان تولید بیوپلیمر را کاهش می‌دهد. بیشترین بازده بیوماس (Yx/s) در گلوکز ۳۰ gr/L و کلرید آمونیوم ۲ gr/L حاصل شد. بیشترین

دیده می‌شود، تولید آنها ۵ تا ۱۰ برابر هزینه بیشتری نسبت به پلیمرهای مشتق شده از نفت خام دارد و چندان مقرون به صرفه نیست. همین مسأله مانعی در تولید انبوه این گونه از پلیمرهای زیستی ایجاد کرده است [۹]. روش‌هایی مانند بهینه‌سازی محیط کشت، استفاده از میکروارگانیسم‌های نو ترکیب و نیز استفاده از سوسترهای ارزان قیمت به کم کردن هزینه‌های تولیدی این بیوپلیمرها کمک می‌کند [۱۰]. از این مواد در کاربردهای پزشکی مثل نخ بخیه، پروتزهای استخوانی، جانشین رگ‌های خونی و نیز در تهیه رنگ‌ها، بطری‌ها، حلال‌ها و لوازم آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود [۱۱].

پلی هیدروکسی بوتیرات توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها و نیز منابع متفاوت کربنی تولید می‌شود. مانند تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات به وسیله گلوکز و پپتون ماهی توسط میکروارگانیسم ازوتوباکتر وینلانندی<sup>۱</sup> و یا تولید پلی هیدروکسی بوتیرات به وسیله ساکاروز توسط میکروارگانیسم ازوهیدروموناس لاتا<sup>۲</sup> و یا تولید کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات - هیدروکسی والرات توسط میکروارگانیسم آزوتوباکتریجریسنسکی<sup>۳</sup> به وسیله گلوکز و یا تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات توسط میکروارگانیسم اشرشیا کولای نو ترکیب<sup>۴</sup> به وسیله گلوکز [۱۲]. همچنین در سال ۲۰۰۸ با استفاده از روغن نخل و اسید پروپیونیک توسط میکروارگانیسم کاپراویدوس نکاتور<sup>۵</sup> پلی‌هیدروکسی بوتیرات تولید گردید [۱۳].

تحقیق حاضر در زمینه امکان‌سنجی و بهینه کردن شرایط تولید بیوپلیمر در راستای کاهش هزینه‌های تولیدی این مواد و همچنین تولید موادی سازگار با محیط زیست و کاهش اثرات زیانبار پلیمرهای مشتق شده از مواد نفتی صورت گرفته است. تولید پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر

متداول در طبیعت و در نتیجه آلودگی‌های زیستی ناشی از آنها، در حال حاضر حساسیت جهانی نسبت به اثرات زیان بار این مواد بر حیات وحش و جنبه زیبایی شهرها و جنگل‌ها رو به افزایش است. از سوی دیگر قیمت بالای انهدام زباله‌های جامد و نیز خطر سوزاندن آنها که موجب انتشار ترکیبات خطرناکی مانند کلرید هیدروژن و سیانید هیدروژن به محیط می‌شود، تا اندازه زیادی این روش‌ها را محدود کرده است [۱ و ۲].

با توجه به این مطالب، چند سالی است که به تولید پلاستیک‌هایی زیست تخریب‌پذیر<sup>۱</sup> که از منابع تجدید شدنی به دست می‌آیند، توجه خاصی شده است. پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها خانواده‌ای از این گونه پلیمرها هستند که هم خاصیت تخریب‌پذیری زیستی دارند و هم از منابع تجدید شدنی یعنی میکروارگانیسم‌ها حاصل می‌شوند. پلی هیدروکسی بوتیرات<sup>۲</sup> مهم‌ترین عضو از خانواده پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها است که به عنوان یک پلی استر زیست تخریب‌پذیر شناخته شده و بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پلی هیدروکسی بوتیرات دارای خواص فیزیکی و شیمیایی شبیه به پلی اتیلن و پلی پروپیلن است و مانند پلاستیک‌های معمولی در زمینه‌های متعددی استفاده می‌شود [۳-۵]. به عنوان مثال می‌توان آن را قالب‌ریزی کرد، توسط پرکن‌های غیر آلی تقویت نمود، به صورت رشته‌هایی به هم تابید یا به شکل ورق درآورد و دارای خواص آب بندی عالی است [۶].

بررسی نقش‌های فیزیولوژیکی پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها اولین بار بر روی باسیلوس مگاتریوم<sup>۳</sup> صورت گرفت و فرمول آن به صورت  $(C_4H_6O_2)_n$  توصیف گردید. ثابت شد که در شرایطی که نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت بالا باشد، میکروارگانیسم به سرعت شروع به تولید و ذخیره این پلیمر می‌کند. به دنبال آن در صورت کاهش منابع کربن در محیط به سرعت این اندوخته را تجزیه می‌نماید. در نتیجه آشکار گردید که پلی‌هیدروکسی بوتیرات به عنوان ترکیب ذخیره‌ای کربن و انرژی برای باکتری محسوب می‌شود که موجب بقای سلول و یا حداقل به تأخیر افتادن مرگ آن در شرایط کمبود کربن و انرژی می‌گردد [۷ و ۸]. برخلاف جذابیت اولیه‌ای که در پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها

1. Biodegradable

2. poly(3-Hydroxybutyrate)

۳. در سال ۱۹۲۶ توسط Maurice Lemoigne صورت گرفت.

4. Azotobacter Vinelandii

5. Azohydromonas Lata

6. Azotobacter Beijerinckii

7. Recombinant Escherichia Coli

8. Cupriavidus Necator

میزان مصرف منبع کربنی (قند) و میزان تولید بیوپلیمر اندازه‌گیری می‌شود [۱۵].

### اندازه‌گیری وزن خشک توده سلولی

رشد توده سلولی توسط میزان جذب نور به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری می‌شود. هر ۱۲ ساعت یک بار ۰/۱ cc از محیط کشت را با ۹/۹ cc آب مقطر رقیق کرده و میزان کدورت توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر<sup>۳</sup> در طول موج ۶۲۰ nm اندازه‌گیری می‌شود. سپس با استفاده از منحنی استاندارد و میزان کدورت به دست آمده در زمان‌های مختلف، وزن خشک توده سلولی محاسبه می‌گردد [۱۶].

### اندازه‌گیری میزان قند مصرفی

برای محاسبه میزان قند مصرفی هر ۱۲ ساعت یک بار ۵ cc از محیط کشت را برداشته و در داخل سانتیفریژ با سرعت چرخش ۳۶۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ min قرار می‌دهیم تا به دو فاز تبدیل گردد. فاز بالایی برای تست میزان قند مورد استفاده قرار می‌گیرد و فاز زیری که ته نشین شده است، برای تست میزان پلیمر تولیدی به کار می‌رود. این روش بر اساس میزان کاهش قند توسط دی‌نیترو سالیسیلیک اسید<sup>۴</sup> صورت می‌پذیرد. میزان جذب محلولی که شامل ۱ cc از سوپرناتانت و ۱ cc از دی‌نیترو سالیسیلیک اسید می‌باشد، توسط اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری می‌گردد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد، قند مورد نظر محاسبه می‌شود [۱۷].

### استخراج بیوپلیمر

برای شناسایی پلی‌استر در ابتدا ۵ cc از محیط کشت برداشته و به مدت ۲۰ min با سرعت چرخش ۳۶۰۰ دور در دقیقه در سانتیفریژ قرار می‌گیرد تا به دو فاز تبدیل شود سپس فاز بالایی برای تست قند استفاده شده و فاز پایینی برای شناسایی نوع و میزان بیوپلیمر به کار می‌رود. در

می‌تواند راهگشای بسیاری از صنایع کشور از جمله صنایع پزشکی، داروسازی و بسته‌بندی مواد غذایی باشد. در حال حاضر این مواد از کشورهای دیگر تهیه می‌گردد.

### مواد و روش آزمایش

#### میکروارگانیزم و شرایط محیط کشت

میکروارگانیزمی که در این تحقیق استفاده می‌شود میکروارگانیزم Azotobacter Beijerinckii DSMZ 1041 از بانک میکروبی آلمان<sup>۱</sup> می‌باشد. محیط کشت شامل مواد زیر است (گرم بر لیتر):  
 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ : ۲/۳،  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : ۲/۹،  $\text{NH}_4\text{Cl}$ : ۱،  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : ۱،  $\text{NaHCO}_3$ : ۰/۵،  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : ۰/۰۱،  
 $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$ : ۰/۰۵، Glucose: ۲ و ۵ میلی لیتر از محلول عناصر کمیاب.

محلول عناصر کمیاب شامل:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : ۲/۲،  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : ۰/۰۸،  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : ۰/۱،  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : ۰/۱،  $\text{K}_2\text{SO}_4$ : ۲/۲،  $\text{H}_3\text{BO}_3$ : ۰/۰۲،  $\text{CuSO}_4$ : ۰/۰۸ می‌باشد [۱۴].  
 مواد ذکر شده باید به صورت جداگانه در دمای  $121^\circ\text{C}$  و فشار ۱/۵ atm به مدت ۲۰ min اتوکلاو شوند و پس از سرد شدن در شرایط استریل در زیر هود به یکدیگر اضافه گردند. محیط کشت باید در ارلن‌های ۱۰۰۰ cc که تنها حاوی ۲۰۰ cc از محیط کشت بوده و بقیه حجم ارلن برای تنفس میکروارگانیزم خالی باشد، تهیه گردد. پس از این مرحله در زیر هود میکروبی و در شرایط کاملاً استریل، میکروارگانیزم از محیط جامد (آگار) به این محیط کشت اضافه شده و تلقیح صورت می‌گیرد. متعاقباً این ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه شیکرانکوباتور در دمای  $30^\circ\text{C}$  و ۱۸۰ دور در دقیقه قرار می‌گیرند تا میکروارگانیزم‌ها به بالاترین میزان فعالیت خود برسند. محیط کشت تخمیر نیز مطابق شرایط بالا ولی با غلظت‌های دلخواه از منابع کربن و نیتروژن ساخته می‌شود. سپس از محیط کشت آماده شده قبل که در آن میکروارگانیزم به رشد و فعالیت بالایی رسیده در محیط کشت تخمیر (محیط کشت با غلظت‌های دلخواه از منابع کربن و نیتروژن) عمل تلقیح صورت می‌گیرد. سپس به مدت ۵ روز و هر ۱۲ ساعت یک بار میزان رشد میکروارگانیزم (وزن خشک توده سلولی<sup>۲</sup>)،

1. DSMZ, medium 81

2. Cell dry weight(CDW)

3. PG Instrument T.80, UK

4. DNS

گام در روش پاسخ سطح، یافتن یک تابع تقریبی مناسب بین ( $y$ ) و مجموعه متغیرهای مستقل می‌باشد. این تابع تقریبی معمولاً یک چند جمله‌ای درجه پایین از متغیرهای مستقل است. در اینجا برای مدل‌سازی از چند جمله‌ای

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

درجه دوم کمک گرفته شد. (معادله ۱)

### روش تهیه پلیمر خالص

برای انجام آزمایش‌های FT-IR و NMR ابتدا باید بیوپلیمر با خلوص بالا تهیه شود. برای این منظور باکتری در زمانی که بیشترین ذخیره پلیمر را دارد (۴۸ ساعت)، به وسیله سانتریفیوژ (Kokusun, Japan) از محیط کشت جدا گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در آونی با دمای  $50^\circ\text{C}$  قرار داده شد تا خشک گردد. سپس سلول خشک به نسبت ۱:۵۰ با کلروفرم مخلوط شده و به مدت ۱۶ ساعت در دستگاه سوکسله در دمای  $60^\circ\text{C}$  قرار داده شد تا دیواره سلولی تخریب و پلیمر درون آن در کلروفرم حل شود. سپس برای حذف قطعات دیواره سلولی، محلول از فیلتر  $0.45$  میکرون عبور داده شد. محلول شفاف حاصل قطره قطره به محلول متانول و آب (۳۰:۷۰) سرد در حالی که روی شیکر قرار دارد، اضافه شد تا محلول شیری رنگ حاصل گردد.

بعد از قرار دادن محلول به حالت سکون و جدا شدن فازها، فاز پایینی جدا شده و در دمای محیط قرار گرفت تا متانول آن بخار شود.

### طیف سنجی مادون قرمز

جهت انجام آزمایش،  $1\text{ mg}$  از بیوپلیمر استخراج شده با  $300\text{ mg}$  برمید پتاسیم به صورت قرص نیمه شفاف درمی‌آید. سپس طیف مادون قرمز با استفاده از دستگاه FTIR طیف سنجی می‌گردد. تابش مادون قرمز توسط ملکول آلی جذب شده و به ارتعاشات ملکولی تبدیل می‌شود که این عمل جذب کوانتایی است. اگرچه طیف مادون قرمز مشخصه تمامی ساختمان ملکولی یک ترکیب

اینجا پس از جداسازی فاز بالایی،  $2\text{ cc}$  کلروفرم و  $2\text{ cc}$  متانول اسیدی (متانول به اضافه ۳٪ اسید سولفوریک) به آن اضافه شده و سپس در ویال حاوی مواد، بسته شده و در حمام آب جوش به مدت ۳ ساعت قرار می‌گیرد. پس از این مرحله محتویات ویال‌ها با  $1\text{ cc}$  آب مقطر رقیق شده و اجازه می‌دهیم تا به ۳ فاز تبدیل شود. فاز زیرین محتوی بیوپلیمر می‌باشد که برای آنالیز توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی جدا می‌گردد [۱۸].

### آنالیز بیوپلیمر

روش اسپکتروفوتومتری<sup>۱</sup> از روش‌هایی است که در گذشته به طور گسترده برای اندازه‌گیری کمی پلی هیدروکسی بوتیرات استفاده می‌شد. این روش که وابسته به میزان تبدیل پلیمر به اسید کروتونیک در دمای بالا در حضور اسید سولفوریک غلیظ می‌باشد، به تدریج با روش‌های دقیق‌تری که از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع به دست آمد، جایگزین گردید. برای اندازه‌گیری بیوپلیمر پلی هیدروکسی آلکانوات از دستگاه گاز کروماتوگراف (Phillips PU4400, US) مجهز به آشکارساز FID<sup>۲</sup> و ستونی با مشخصات  $25\text{ m}$  طول و  $0.25\text{ mm}$  قطر داخلی استفاده شد. دمای محل تزریق و آشکارساز به ترتیب  $250^\circ\text{C}$  و  $280^\circ\text{C}$  تنظیم گردید. هلیوم بعنوان گاز حامل با جریان  $2\text{ ml/min}$  استفاده شد. جریان گاز هیدروژن، نیتروژن و هوا به ترتیب  $30$ ،  $70$  و  $300\text{ ml/min}$  بود و از متیل بنزوات به عنوان استاندارد داخلی استفاده گردید [۱۸].

### روش آماری

برای مقایسه جواب‌های بیوپلیمر به دست آمده از روش آزمایشگاهی با یک روش تئوری، از روش محاسباتی پاسخ سطح<sup>۳</sup> استفاده شد. روش پاسخ سطح، مجموعه‌ای از فنون ریاضی و آماری مفید برای مدل‌سازی و تحلیل مسائلی است که پاسخ مورد نظر تابعی از چندین متغیر است. هدف از به کارگیری این روش، بهینه نمودن پاسخ می‌باشد. در بیشتر مسائل روش پاسخ سطح، ارتباط بین پاسخ و متغیرهای مستقل، نامشخص است. بنابراین اولین

1. Spectrophotometric

2. Flame Ionization Detector

3. Response Surface Methodology (RSM)

۳۰۰ مگاهرتز آنالیز می‌گردد.

### تفسیر نتایج

استفاده از کلرید آمونیوم  $0.5 \text{ gr/L}$  و گلوکز با غلظت‌های  $50, 40, 30 \text{ gr/L}$

در اینجا دمای شیکر انکوباتور  $30^\circ \text{C}$  و دور همزن  $180$  دور بر دقیقه تنظیم می‌شود. در مرحله اول غلظت منبع نیتروژنی (کلرید آمونیوم)  $0.5 \text{ gr/L}$  و غلظت منبع کربنی (گلوکز) در چهار آزمایش مختلف با غلظت‌های  $50, 40, 30 \text{ gr/L}$  و  $60 \text{ gr/L}$  در نظر گرفته می‌شود. در این آزمایشات، بیشترین تولید بیوپلیمر در غلظت گلوکز  $60 \text{ gr/L}$ ، به میزان  $2.95 \text{ gr/L}$  می‌باشد که  $24$  ساعت پس از تلقیح حاصل می‌گردد. در این مدت، حداکثر رشد توده سلولی  $7.5 \text{ gr/L}$  و میزان قند مصرف شده  $14.6 \text{ gr/L}$  می‌باشد. بازده توده سلولی ( $Y_{x/s}$ )  $0.44 \text{ g/g}$ ، بازده تولید ( $Y_{p/s}$ )  $0.202 \text{ g/g}$  و بهره‌دهی ( $Q_p$ ) برابر  $0.123 \text{ g/L.hr}$  به دست می‌آید.

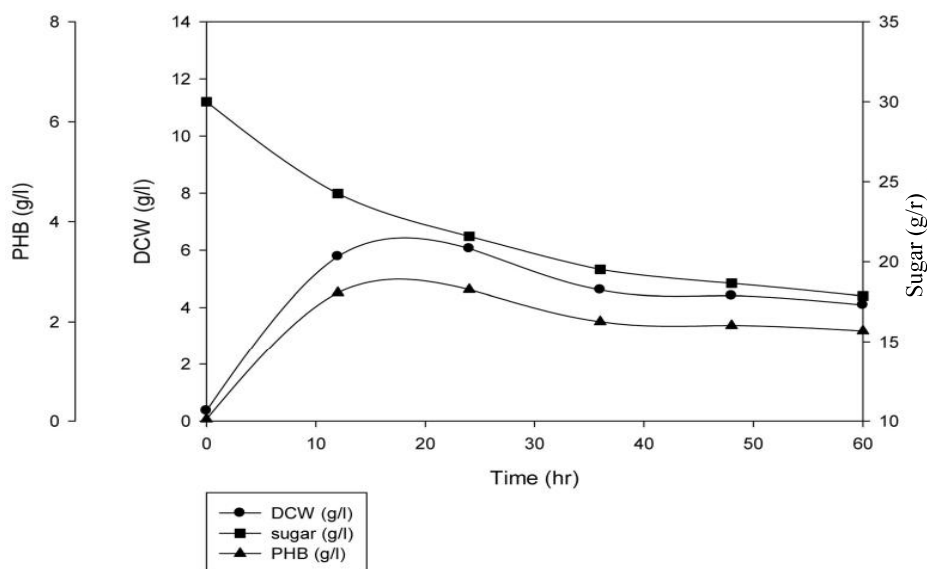
اشکال ۱ تا ۴ میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی را در غلظت  $0.5 \text{ gr/L}$  کلرید آمونیوم و غلظت‌های مختلف گلوکز نشان می‌دهد.

است، ولی بعضی از گروه‌های آلی صرف نظر از سایر قسمت‌های ترکیبی که در آن قرار دارند، دارای فرکانس مشخصی می‌باشند.

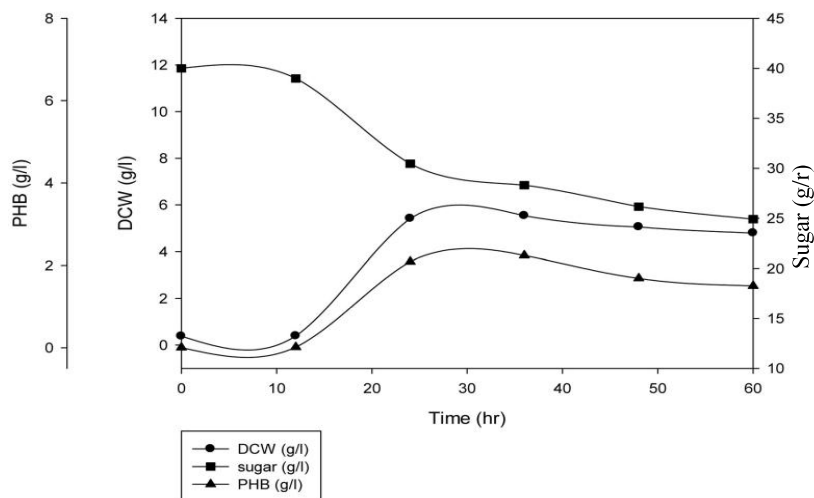
### طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته<sup>۱</sup>

طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای مهم‌ترین و پرکاربردترین فنی است که به وسیله شیمی‌دانان برای تشخیص ساختار ترکیبات آلی و غیر آلی استفاده می‌شود. طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای تنها فن طیف‌نمایی است که برای آن، تمام طیف‌های یک ترکیب تحلیل و تفسیر می‌شود. این تکنیک امروزه یک روش بسیار نیرومند و توسعه یافته برای مشخص کردن ساختمان ملکول‌های پیچیده است. این تکنیک تعداد هسته‌ها را به شکل شیمیایی غیر معادل (هیدروژن‌های غیر معادل) به ما می‌دهد و همچنین اطلاعاتی در مورد محیط اطراف هسته و وضعیت جفت شدن اتم‌ها، اتم‌های ضمیمه و غیره در اختیار ما می‌گذارد.

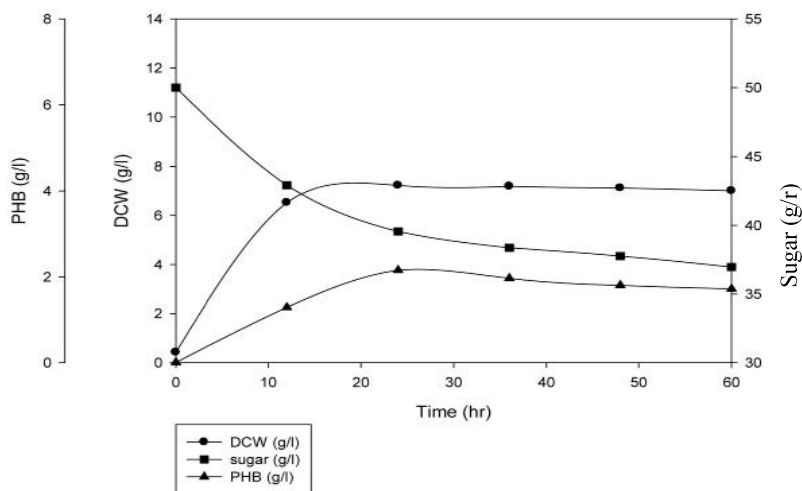
برای انجام این آزمون، بیوپلیمر استخراج شده در کلروفورم دوتریم دار حل شده و با استفاده از دستگاه NMR



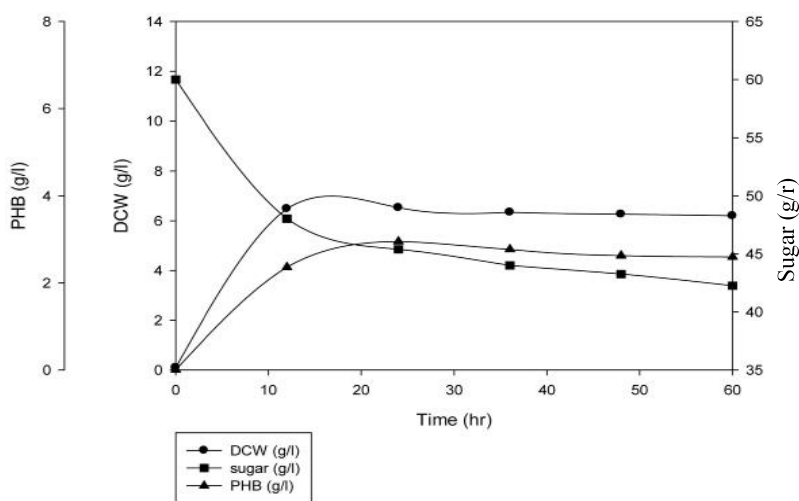
شکل ۱- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم  $0.5 \text{ gr/L}$  و  $30$



شکل ۲- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۴۰ و ۰/۵ gr/L



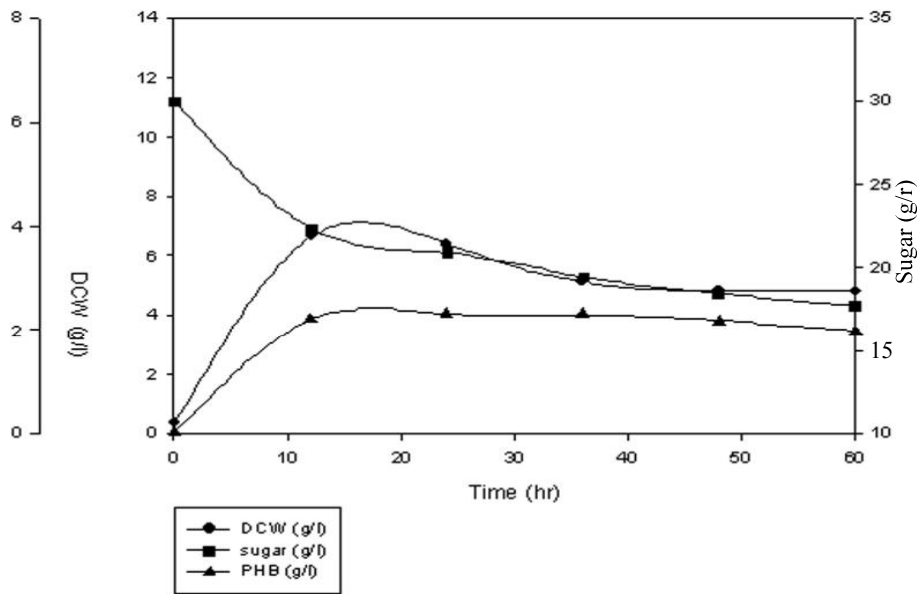
شکل ۳- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۵۰ و ۰/۵ gr/L



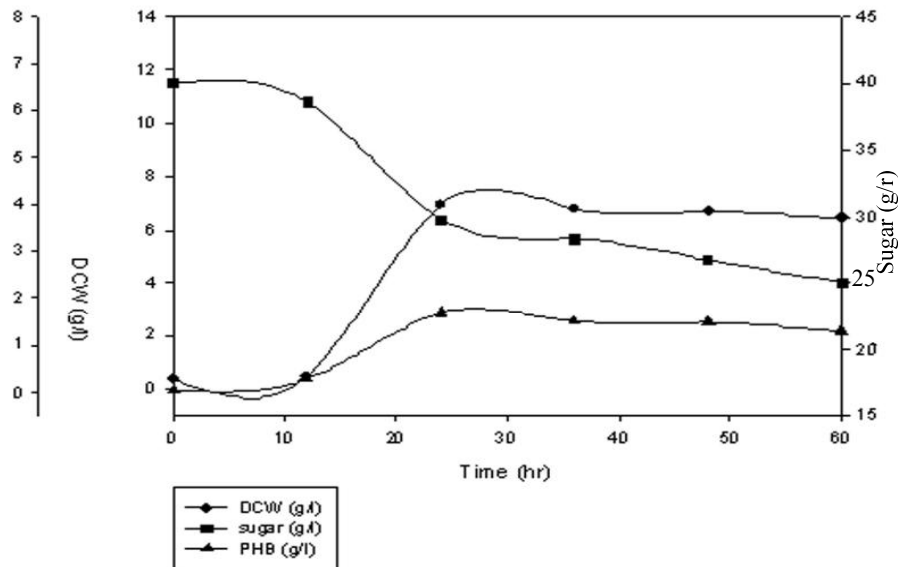
شکل ۴- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۰/۵ gr/L

می‌باشد. همچنین بازده توده سلولی ( $Y_{x/s}$ ) برابر  $0.68 \text{ g/g}$ ، بازده تولید ( $Y_{p/s}$ ) برابر  $0.157 \text{ g/g}$  و بازده تولید ( $Q_p$ ) برابر  $0.104 \text{ g/L.hr}$  به دست می‌آید. اشکال ۵ تا ۸ میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی را در غلظت  $2 \text{ gr/L}$  کلرید آمونیوم و غلظت‌های مختلف گلوکز نشان می‌دهد.

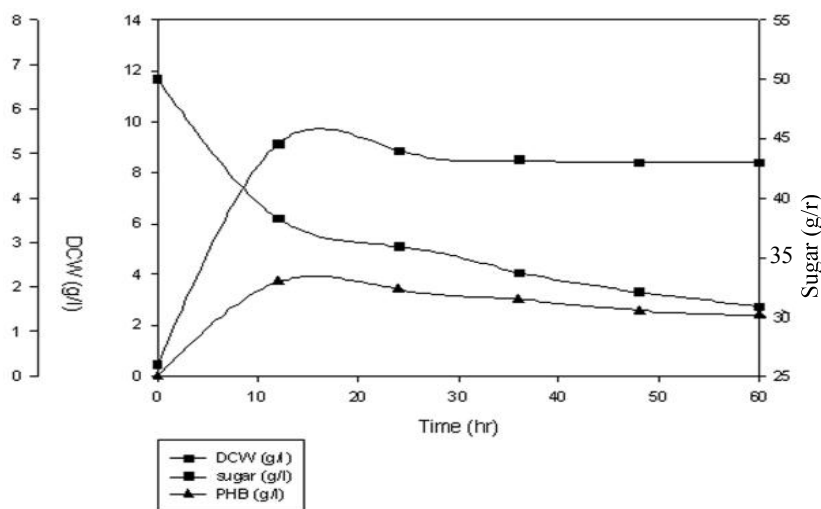
استفاده از کلرید آمونیوم  $2 \text{ gr/L}$  و گلوکز  $50.40.30$  و  $60 \text{ gr/L}$  در این مرحله غلظت منبع نیتروژنی (کلرید آمونیوم)  $2 \text{ gr/L}$  و غلظت منبع کربنی (گلوکز)  $50.40.30$  و  $60 \text{ gr/L}$  در نظر گرفته شد. در این بین، بیشترین تولید بیوپلیمر در غلظت  $60 \text{ gr/L}$  از گلوکز به میزان  $2/49 \text{ gr/L}$  است که ۲۴ ساعت پس از تلقیح حاصل می‌گردد. حداکثر رشد توده سلولی در  $9/37 \text{ gr/L}$  و میزان قند مصرف شده در این مدت  $15/9 \text{ gr/L}$



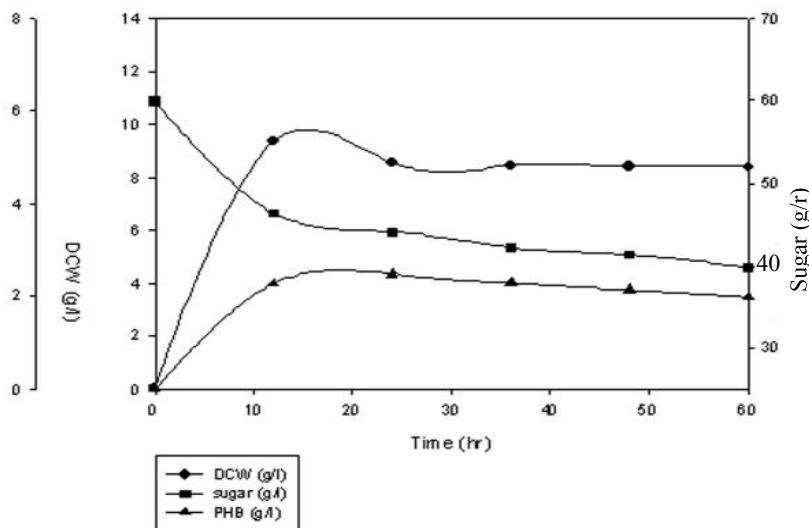
شکل ۵- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم  $30$  و  $2 \text{ gr/L}$



شکل ۶- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم  $40$  و  $2 \text{ gr/L}$



شکل ۷- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۵۰ و ۲ gr/L



شکل ۸- میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی بر حسب زمان به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۲ gr/L

شکل های ۹ تا ۱۲ نمودار سه بعدی و کانتور به دست آمده از غلظت گلوکز ۶۰ gr/L و کلرید آمونیوم ۰/۵ gr/L را نشان می دهد.

#### طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)

مهم ترین قسمت عملی این طیف ناحیه بین  $500\text{ cm}^{-1}$  تا  $4000\text{ cm}^{-1}$  می باشد. همان گونه که در شکل ۱۳ مشاهده می شود، طیف ثبت شده دارای دو باند جذبی قوی در  $1700\text{ cm}^{-1}$  و  $1300\text{ cm}^{-1}$  می باشد که به ترتیب نشان دهنده گروه های C=O و C-O در استر است. البته در این طیف گروه C-H در فرکانس  $3400\text{ cm}^{-1}$  و گروه الکیلی O-H در فرکانس  $3400\text{ cm}^{-1}$  نیز به طور واضح مشخص می باشند.

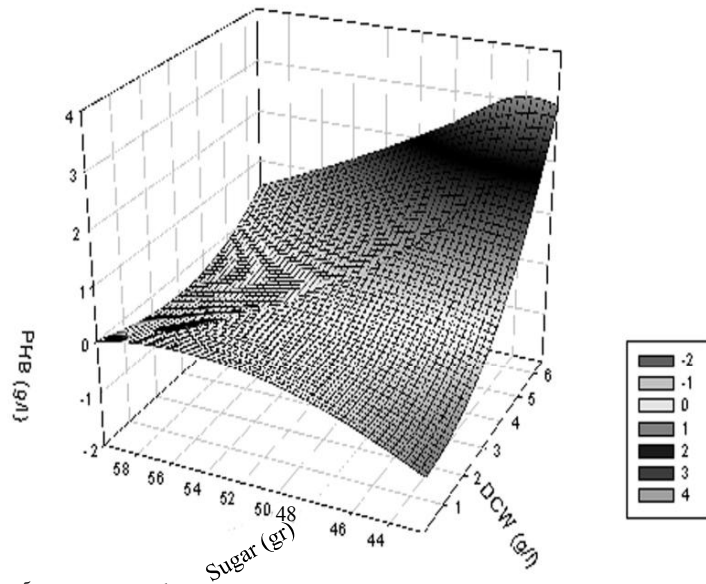
#### روش پاسخ سطحی

ثوابت و پارامترهای روش پاسخ سطح برای دو آزمایشی که بیشترین میزان بیوپلیمر را داشت، محاسبه گردید تا صحت جواب های آزمایشگاهی با مدل ریاضی سنجیده شود. در اینجا  $x_1$  میزان وزن خشک سلولی و در واقع همان میزان توده سلولی و  $x_2$  میزان غلظت قند در هر زمان است و  $Y$  میزان بیوپلیمری است که از روش آماری به دست می آید.  $a, b, c, d, e$  و  $f$  ثوابت معادله می باشند متوسط مربعات رگلاسیون، متوسط مربعات خطا و ضریب همبستگی مدل نیز گزارش شده است و همان طور که مشخص است اختلاف بسیار ناچیزی بین جواب های آزمایشگاهی و تئوری وجود دارد. این اطلاعات در جدول ۱ آورده شده است.

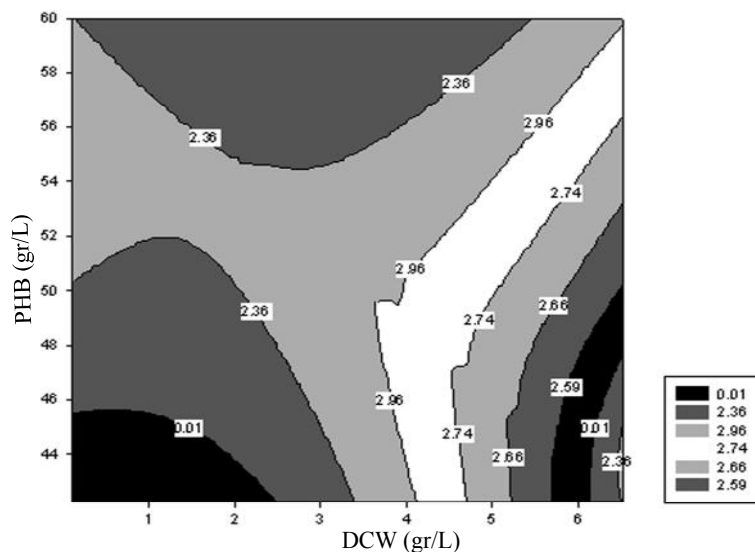


جدول ۱- پارامترهای روش پاسخ سطح

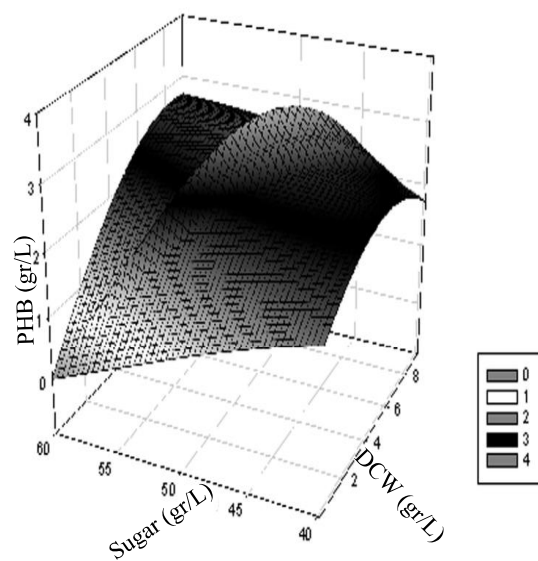
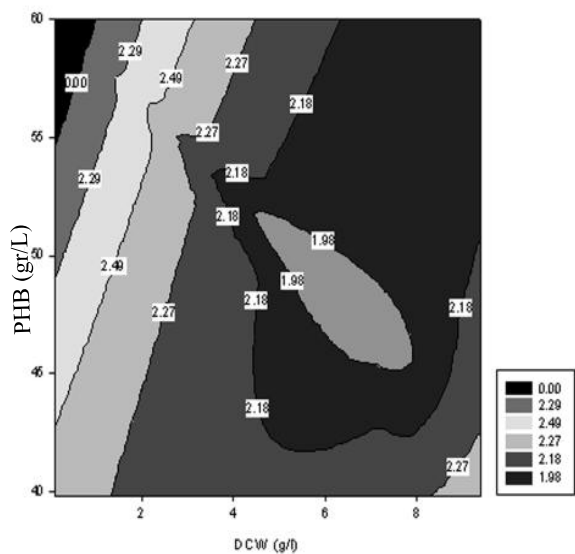
پارامترها	غلظت گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۰/۵ g/L	غلظت گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۲ g/L
a	-۲۲/۶۹۷	-۱۰/۸۶۷
b	-۳/۰۳۹	۱/۵۳۷
c	۱/۴۰۸	۰/۲۷۷
d	۰/۳۹۴	-۰/۱۲
e	-۰/۰۱۷	-۰/۰۰۱۶
f	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳
میانگین مربعات خطا	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۱۹
میانگین مربعات رگرسیون	۱/۵۱۸	۱/۰۸
تطبیق پذیری	۰/۹۹۸۶	۰/۹۹۷۸



شکل ۹- نمودار سه بعدی تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۰/۵ gr/L

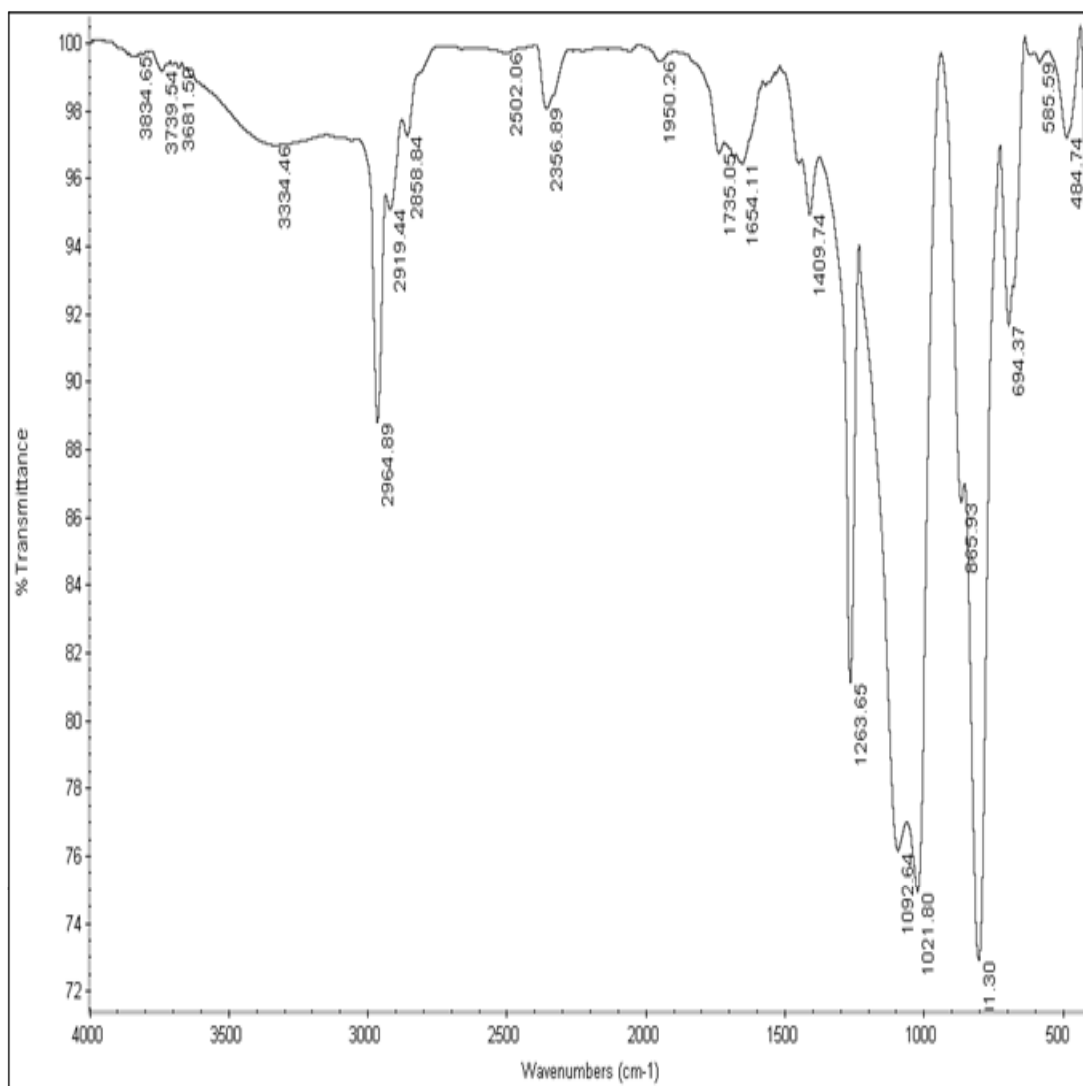


شکل ۱۰- نمودار کانتور تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۰/۵ gr/L



شکل ۱۲- نمودار کانتور میزان تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۲ gr/L

شکل ۱۱- نمودار سه بعدی تولید بیوپلیمر، مصرف قند و رشد توده سلولی به ازای گلوکز و کلرید آمونیوم ۶۰ و ۲ gr/L



شکل ۱۳- طیف حاصل از طیف سنجی مادون قرمز

۰/۱۲ hr به دست آمد.

در بین آزمایش‌های صورت گرفته، حداکثر بازده توده سلولی در غلظت گلوکز ۳۰ gr/l و کلرید آمونیوم ۲ gr/L به میزان ۰/۸۲۵ g/g به دست آمد. حداکثر بازده تولید در غلظت گلوکز ۳۰ gr/L و کلرید آمونیوم ۰/۵ gr/L به میزان ۰/۳۱ g/g می‌باشد و همچنین حداکثر بهره‌دهی تولید در غلظت گلوکز ۵۰ gr/L و کلرید آمونیوم ۲ gr/L، به میزان ۰/۱۷ gr/L.hr حاصل شد.

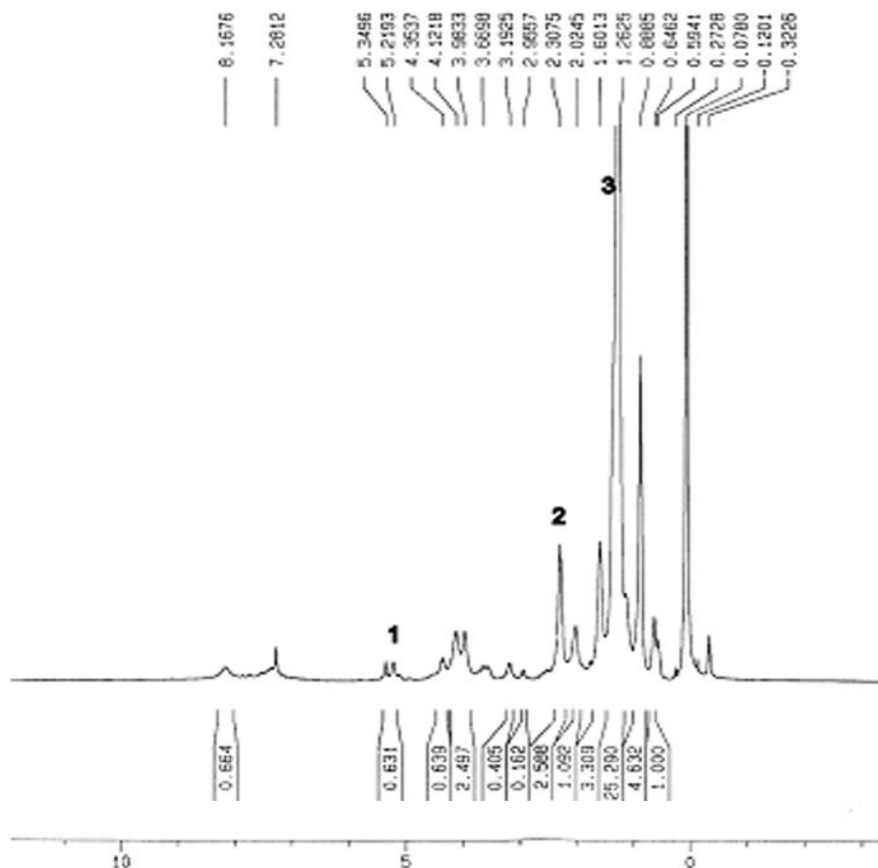
در مطالعه‌ای با استفاده از میکروارگانیسم *Wasturia eutro-* pha ACM 1296 و کاربرد از فروکتوز به عنوان منبع کربنی، میزان بازده سلولی ۰/۳ g/g فروکتوز به دست آمد [۱۹]. در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از باکتری *Ralstonia eutropha* و کاربرد از گلوکز به عنوان منبع کربنی، حداکثر بهره‌دهی پس از ۴۸ ساعت، به میزان ۰/۱۴۲ gr/L hr به دست آمد [۱۰۶]. آزمایش دیگری که توسط باکتری *Capriavidus necator* 545 DSMZ و در محیط گلوکز صورت گرفت، حداکثر بازده تولید ۰/۲۴ gr/L حاصل گردید [۲۰].

### طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته‌ای: (NMR)

برای تشخیص حضور پلیمر P(3 HB) استخراجی از سلول باکتری *Azotobacter beijerinckii* از اسپکترومتری رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (HNMR) استفاده شد. شکل ۱۴ طیف به دست آمده را نشان می‌دهد. طیف HNMR حاصل، حضور پیک‌های شاخص در موقعیت‌های شیمیایی ۱/۲ ppm ( $\text{CH}_3$ )، ۲/۵ ppm ( $\text{CH}_2$ ) و ۵/۲ ppm (CH) را نشان می‌دهد.

### نتیجه‌گیری

در این آزمایش‌ها مشخص شد که بیشترین میزان تولید بیلیمر در غلظت ۶۰ gr/L گلوکز و ۰/۵ gr/L کلرید آمونیوم پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تلقیح حاصل می‌گردد که میزان آن ۲/۹۵ gr/L می‌باشد. حداکثر رشد توده سلولی ۶/۵ gr/L و میزان قند مصرف شده در محیط ۱۴/۶ gr/L است. در این غلظت بازده توده سلولی ( $Y_{x/s}$ ) برابر ۰/۴۴ g/g، بازده تولید ( $Y_{p/s}$ ) برابر ۰/۲ g/g و بهره‌دهی (Qp) برابر gr/L



شکل ۱۴- طیف حاصل از رزونانس مغناطیسی هسته

## مراجع

- [1] Reddy C.S.K., Ghai R., Rashmi and Kalia V.C., "Polyhydroxyalkanoate: an overview, *Bioresource Technology*", 87, pp. 137-146, 2003.
- [2] Shima M., "Biodegradation of plastics", *Current Opinion in Biotechnology.*, 12, pp. 242-247, 2001.
- [3] Sudesh K., Abe H. and Doi Y., "Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates", *progress in polymer science.*, 25, pp.1503-1555, 2000.
- [4] Lee S.Y., "Bacterial polyhydroxyalkanoates", *Biotechnology and Bioengineering.*, 49, pp. 1-14, 1996.
- [5] Khanna S. and Srivastava A.K., "Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate)", *Enzyme and Microbial Technology.*, 30, pp. 1145-1151, 2006.
- [6] Sharma L., Singh A. K., Panda P. and Mallick N., "Process optimization for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium", *Nostoc muscorum* using response surface methodology, *Bioresource Technol.*, 98, pp. 987-993, 2007.
- [7] Mallick N., Gupta S., Panda B. and Sen R., "Process optimization for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production by *Nostoc muscorum*", *Biochemical Engineering Journal.*, 37, pp. 125-130, 2007.
- [8] Anderson A.J. and Dawes E.A., "Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates", *Microbial.*, 54, pp. 450-472, 1990.
- [9] Lenz R.W. and Marchessault R.H., "Bacterial polyesters: Biosynthesis", *Biodegradable plastics and Biotechnology, Biomacromolecules.*, 6, pp.1-8, 2005.
- [10] Li, Rui, Hanxing, Qi and Qingsheng., "The production of polyhydroxyalkanoates in *Recombinant Escherichia coli*", *Bioresource Thecnology.*, 98, pp. 2313-2320. 2000.
- [11] Holmes P.A., "Application of PHB microbial produced biodegradable thermoplastics", *Technol.*, 16, pp. 32-36, 1985.
- [12] Khanna S. and Srivastava A.K., "Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates", *Process Biochemistry.*, 40, pp. 607-619, 2005.
- [13] Lee W.H., Loo C.Y., Nomura C.T. and Sudesh K., "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors", *Bioresource Technology.*, 99, pp. 6844-6851, 2008.
- [14] Kasuya K.i. and Doi Y., "Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surfaces of polyhydroxyalkanoate film", *International Journal of Biological Macromolecules.*, 19, pp. 35-40, 1996.
- [15] Sharma L., Kumar singh A., Panda B. and Mallick B.N., "Process optimization for poly  $\beta$ -hydroxybutyrate production in a nitrogen fixing cyanobacterium", *Nostoc muscorum* using response surface, *Bioresource Technol.*, 98, pp. 987-993, 2007.
- [16] Daneshi A., Younesi H., Ghasempouri M. and Sharifzede M., "Production of biodegradable biopolymer", poly-3-hydroxybutyrate from corn syrup by *Ralstonia eutropha*: Effect of nitrogen source, *Journal of Biotechnology.*, 136, 402-459, 2008.
- [17] Miller G.L., *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*, *Analytical Chemistry.*, 31, 426-8, 1959.

