

Enhancement of Poly(β -hydroxybutyrate) Production from Methanol by *Methylobacterium Exorquens* Using Mixed Substrates

Z. Beagom Mokhtari-Hosseini, E. Vasheghani-Farahani*, and S.A. Shojaosadati

Biotechnology Group, Department of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University,

P.O. Box: 14115-143, Tehran, Iran

Received 14 July 2010, accepted 5 January 2011

ABSTRACT

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB), produced by several species of bacteria, has attracted great attention as a biodegradable and biocompatible compound with almost similar properties of polypropylene. Unfortunately, its use is currently limited due to high production costs. One of the most common methods for overcoming this constraint is the use of inexpensive substrates, like methanol. Another strategy which involves the increase in carbon yield which can directly affect the production costs. One method to increase carbon yield is the use of mixed substrates. Therefore, for PHB production the effects of three sources of carbon, ethanol, sodium acetate, and glucose were studied as substrates in different concentrations mixed with methanol. It was found that PHB concentration and PHB content increased by addition of ethanol and acetate, but glucose addition did not have any significant effect on PHB production. Calculation of carbon yield under the best condition indicated that it increased about 3 times by addition of acetate.

Key Words:

methanol,
methylobacterium
exorquens,
Poly- β -hydroxybutyrate (PHB),
mixed substrate,
carbon yeild

(*)To whom correspondence should be addressed.

E-mail: evf@modares.ac.ir

افزایش تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول به وسیله متیلوباکتریوم اکستروکوئنس و سوبسترای مخلوط

زهرا بیگم مختاری حسینی، ابراهیم واشقانی فراهانی*، سید عباس شجاع الساداتی

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۴۳-۱۴۱۱۵

دریافت: ۸۹/۴/۲۳، پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک گرماترم زیست سازگار و زیست تخریب پذیر است که به وسیله چند گونه از باکتری ها تولید می شود. این گرماترم به دلیل خواص مشابه با پلی پروپیلن بسیار مورد توجه واقع شده است. این پلیمر کاربردهای گسترده ای در صنعت، پزشکی و کشاورزی دارد. با وجود مزایای زیاد نسبت به پلیمرهای پتروشیمیایی، استفاده از آن به علت هزینه بری تولید محدود شده است. یکی از روش های معمول رفع این مشکل، استفاده از سوبسترای ارزان قیمت مانند متانول است. راهکار دیگر، افزایش مقدار بازده کربنی است که به طور مستقیم بر هزینه تولید مؤثر است. استفاده از سوبسترای مخلوط یکی از روش های افزایش بازده کربنی است. در این مطالعه، اثر سه منبع کربنی اتانول، سدیم استات و گلوکوز با سه غلظت متفاوت به عنوان سوبسترای مخلوط بر تولید PHB بررسی شده است. نتایج نشان می دهد، افزودن اتانول و سدیم استات غلظت و مقدار PHB را افزایش می دهد و اضافه کردن گلوکوز اثر قابل ملاحظه ای بر مقدار تولید PHB ندارد. محاسبه بازده کربنی در بهترین حالت نشان می دهد، افزودن سدیم استات به عنوان سوبسترای مخلوط بازده کربنی را تا سه برابر افزایش می دهد.

واژه های کلیدی

متانول،

متیلوباکتریوم اکستروکوئنس،

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB)،

سوبسترای مخلوط،

بازده کربنی

* مسئول مکاتبات، پیام نگار:

evf@modares.ac.ir

مقدمه

پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) ترکیبی درون سلولی است که به عنوان منبع ذخیره کربن و انرژی در چند نوع باکتری تولید می‌شود [۵-۱]. این پلیمر زیست تخریب پذیر و زیست سازگار است که خواصی مشابه پلی پروپیلن دارد [۸-۶]. به دلیل این ویژگی ها، PHB در پزشکی، دامپزشکی، داروسازی، مهندسی بافت، کشاورزی و صنعت کاربردهای فراوانی دارد [۹، ۱۰]. با وجود مزایای زیاد، هزینه زیاد تولید PHB نسبت به پلاستیک های مشتق شده از نفت، استفاده از آن را، به ویژه در صنایع بسته بندی، محدود کرده است. عوامل متعددی بر هزینه تولید PHB مؤثرند. یکی از مهم ترین عوامل، منبع کربن است. هزینه منبع کربن حدود ۴۰ درصد قیمت تمام شده PHB را به خود اختصاص می دهد. یکی از منابع کربن ارزان قیمت که در کشور ما به دلیل ذخایر بزرگ گاز به وفور و به آسانی تولید می شود، متانول است.

از دیگر عوامل مهم و مؤثر بر هزینه تولید، مقدار بهره دهی کلی تولید است. هر چه مقدار بهره دهی (مقدار تولید در واحد زمان در واحد حجم) بیشتر باشد، هزینه تولید کمتر می شود. بازده کربنی تولید از جمله عواملی است که اثر مستقیم بر مقدار بهره دهی دارد. بازده کربنی بستگی به نوع سوبسترا، ریزسازواره، (میکروارگانیسم) نوع کشت، سرعت رشد و شرایط محیطی کشت دارد [۱۱]. طبق نظریه آرایه شده توسط Babel و همکاران، یکی از راه کارهای افزایش بازده کربنی تولید، استفاده از سوبسترای مخلوط است [۱۲، ۱۳].

متیلوباکتریوم اکستروکوننس یک متیلوتروف اختیاری مولد رنگ دانه صورتی است که می تواند از متانول که یک سوبسترای ارزان قیمت است، به عنوان تنها منبع کربن استفاده کند. این باکتری برای تولید انواع محصولات از جمله PHB استفاده شده است [۱۸-۱۴].

بررسی مطالعات و گزارش های موجود نشان می دهد، تاکنون در زمینه اثر استفاده از سوبسترای مخلوط بر مقدار بازده کربنی هیچ مطالعه تجربی انجام نشده است. بنابراین در پژوهش حاضر، اثر استفاده از سوبسترای مخلوط بر مقدار رشد باکتری متیلوباکتریوم اکستروکوننس، PHB تولید شده به وسیله آن و بازده کربنی حاصل بررسی شد. بدین منظور اثر سه سوبسترا با غلظت های متفاوت به عنوان سوبسترای مخلوط با متانول بر تولید PHB مورد بررسی قرار گرفت.

تجربی

مواد و روش ها

ریزسازواره، نگه داری و تهیه بذر (مایه تلقیح)

سلوله میکروبی متیلوباکتریوم اکستروکوننس DSMZ 1340 از مجموعه

میکروبی DSMZ آلمان خریداری شد. بانک میکروبی این باکتری (کشت ۳۶ ساعته در محیط معدنی به علاوه ۱۰ v/v گلیسرین) به شکل ویال های ۷۵ mL در دمای 80°C - نگه داری شد. محیط بذر با ترکیب جدول ۱ که در مطالعه پیشین برای رشد این باکتری بهینه شده بود [۱۷]، در یک ارلن ۲۵۰ mL به مقدار ۱۰۰ mL تهیه شد. محیط حاصل با یکی از ویال های بانک میکروبی تلقیح و به مدت ۳۶ h در دمای 30°C و شدت تکان دهی ۲۰۰ rpm گرمادهی شد.

شرایط کشت

برای بررسی کارایی سوبسترای مخلوط، از سامانه ارلن لرزان در فرایند ناپیوسته استفاده شد. فرایند در دو مرحله رشد و تولید با حجم کاری یکسان انجام شد.

مرحله رشد باکتری

محیط کشت با ترکیب بهینه [۱۷] (جدول ۱) تهیه، با ۱ (v/v) از کشت بذر تلقیح و سپس در دمای 30°C و شدت تکان دهی ۲۰۰ rpm به مدت ۴۸ h گرمادهی شد. سلول های رشد یافته، در شرایط سترون در دستگاه مرکزگریز قرار داده شده و با سرم فیزیولوژی سترون شست و شو داده شدند. تعلیق حاصل مجدداً در دستگاه مرکزگریز قرار گرفته و با سرم سترون به حجم مورد نیاز رسانده شد (برای هر ارلن مرحله بعد ۱ mL تعلیق میکروبی مورد نیاز است).

جدول ۱ - ترکیب بهینه محیط کشت باکتری متیلوباکتریوم اکستروکوننس DSMZ 1340 [۱۷].

| مقدار | اجزای محیط کشت |
|-------|---|
| ۰/۶۰ | CH ₃ OH (% v/v) |
| ۱/۷۵ | (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) |
| ۰/۶۸ | KH ₂ PO ₄ (g/L) |
| ۶/۱۴ | Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O (g/L) |
| ۰/۱۰ | MgSO ₄ . 7H ₂ O (g/L) |
| ۲۰/۰۰ | FeSO ₄ . 7H ₂ O (mg/L) |
| ۲۰/۰۰ | CaCl ₂ . 2H ₂ O (mg/L) |
| ۵/۰۰ | MnSO ₄ . H ₂ O (mg/L) |
| ۱/۵۰ | ZnSO ₄ . 7H ₂ O (mg/L) |
| ۰/۰۴ | Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O (mg/L) |
| ۰/۰۴ | CuSO ₄ . 5H ₂ O (mg/L) |
| ۰/۶۰ | CoCl ₂ . 6H ₂ O (mg/L) |
| ۰/۲۰ | H ₃ BO ₃ (mg/L) |

مرحله تولید محصول

بررسی انواع سوبسترای مخلوط در این مرحله انجام شد. محیط کشت بدون منبع کربن مطابق ترکیب جدول ۱ تهیه شد. به منظور بررسی اثر سوبسترای مختلف و ترکیب آنها با متانول با غلظت‌های متفاوت (غلظت‌ها براساس مفاهیم نظری ارایه شده توسط Babel و همکاران [۱۳] انتخاب شد). منبع کربن در ۱۴ حالت مختلف موجود در جدول ۲، به محیط اضافه شد و ۱ mL از تعلیق میکروبی تهیه شده در مرحله رشد به هر ارلن اضافه شد. کربن دهی ارلن‌ها طبق جدول ۲ هر ۴۸ h یک مرتبه انجام شد. پس از ۱۲۰ h مقدار PHB تولید شده در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

روش‌های شناسایی

وزن خشک سلولی (CDW) با استفاده از روش وزن سنجی اندازه‌گیری شد. در این روش، حجم دقیقی از محیط کشت در دستگاه مرکزگریز قرار گرفته و رسوب حاصل پس از شست و شو تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۹۰°C قرار داده شد. مقدار PHB نیز با دستگاه رنگ‌نگار گازی با استفاده از روش Brauneegg و همکاران [۱۹] معین شد. در این روش ۵ mL از محیط کشت در دستگاه مرکزگریز قرار گرفت و محلول رویی دور ریخته شد. ۲ mL کلروفرم و ۱ mL محلول ۴ درصد سولفوریک

اسید در متانول به ماده زیستی ته نشین شده اضافه شد. ترکیب حاصل به مدت ۴ h در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد تا واکنش استری شدن مونومر هیدروکسی بوتیرات انجام شود. پس از اتمام فرایند و خنک شدن لوله‌ها ۱ mL آب دو بار تقطیر به محصول واکنش اضافه و به شدت به مدت ۱۰ min تکان داده شد. پس از دو فاز شدن محلول، محلول رویی که شامل متانول و آب است و فصل مشترک دو فاز دور ریخته شد. ۱ mL از محلول زیری که کلروفرم حاوی متیل استر در آن تشکیل شده است، به دستگاه GC تزریق شد. دستگاه GC مورد استفاده Philips 4410 PU با آشکار ساز FID بود که در آن جداسازی به وسیله ستون موینه‌ای از جنس سیلوکسان، با سرعت جریان گاز حامل ۳۵ mL/min انجام شد. برنامه داده شده به دستگاه عبارت از دمای آشکار ساز ۲۸۰°C، دمای محل تزریق ۲۵۰°C، دمای ستون ۷۵°C به مدت ۲ min، سرعت افزایش دمای اولیه ۱۰°C/min، دمای اولیه بالای ستون ۱۰۰°C، زمان ماندن در دمای اولیه ۰/۵ min، سرعت افزایش دمای ثانویه ۳۵°C/min، دمای ثانویه بالای ستون ۲۰۰°C و زمان ماندن در دمای ثانویه ۰/۵ min بود.

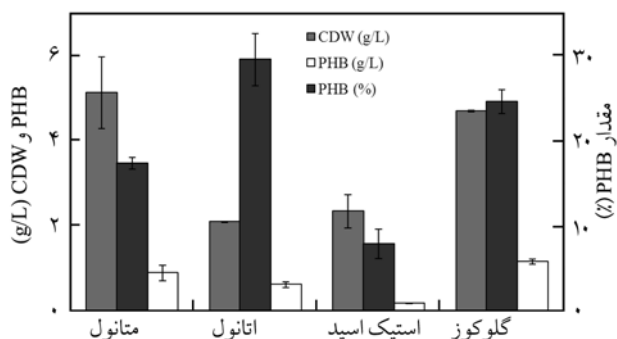
نتایج و بحث

بررسی نوع منبع کربن

متیلوباکتریوم اکستروکونئس یک متیلوتروف اختیاری است، بنابراین قابلیت استفاده از سوبستراهای چندکربنی را نیز دارد. برای بررسی قابلیت رشد باکتری و تولید PHB از سایر منابع کربنی و مقایسه آنها با متانول، چهار منبع کربن، متانول، اتانول، سدیم استات و گلوکوز ارزیابی شدند. بدین منظور مطابق روش کار بیان شده، باکتری رشد داده شد و مقدار وزن خشک سلول، محتوای PHB موجود در سلول و غلظت PHB معین شد. نتایج حاصل در شکل ۱ مقایسه شده است. همان‌طور

جدول ۲ - منابع کربن بررسی شده به عنوان سوبسترای مخلوط.

| ردیف | کد | متانول (v/v %) | اتانول (v/v %) | سدیم استات (g/L) | گلوکوز (g/L) |
|------|-------|----------------|----------------|------------------|--------------|
| ۱ | M | ۷۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ |
| ۲ | E | ۰/۰ | ۷۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ |
| ۳ | A | ۰/۰ | ۰/۰۰ | ۷/۴۰ | ۰/۰۰ |
| ۴ | G | ۰/۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۲۲/۲۰ |
| ۵ | M+E1 | ۰/۵ | ۰/۲۵ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ |
| ۶ | M+E2 | ۰/۵ | ۰/۵۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ |
| ۷ | M+E3 | ۰/۵ | ۰/۱۰ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ |
| ۸ | M+A1 | ۰/۵ | ۰/۰۰ | ۷/۸۵ | ۰/۰۰ |
| ۹ | M+A2 | ۰/۵ | ۰/۰۰ | ۳/۷۰ | ۰/۰۰ |
| ۱۰ | M+A3 | ۰/۵ | ۰/۰۰ | ۷/۴۰ | ۰/۰۰ |
| ۱۱ | M+G1 | ۰/۵ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۵/۵۵ |
| ۱۲ | M+G2 | ۰/۵ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۱۷/۱۰ |
| ۱۳ | M+G3 | ۰/۵ | ۰/۰۰ | ۰/۰۰ | ۲۲/۲۰ |
| ۱۴ | M+E+A | ۰/۵ | ۰/۵۰ | ۳/۷۰ | ۰/۰۰ |



شکل ۱ - مقایسه رشد متیلوباکتریوم اکستروکونئس DSMZ 1340 و تولید PHB به وسیله آن در منابع کربن مختلف.

است. در این شرایط اتانول به دلیل سمیت از رشد باکتری جلوگیری می کند. با توجه به این که PHB در شرایط نامساعد رشد و در شرایط وجود کربن اضافی تجمع می یابد، بیشترین تجمع PHB در این حالت قابل توجیه است.

سديم استات به عنوان سوبسترای مخلوط

اثر افزودن سدیم استات با سه نسبت مولی ۱ به ۱، ۴ به ۱ و ۲ به ۱ استات به متانول در مقایسه با متانول خالص در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد، رشد باکتری، تجمع و غلظت PHB در سدیم استات با غلظت کم (نسبت مولی ۱ به ۴ سدیم استات به متانول) نسبت به متانول خالص کاهش می یابد. اما، با افزایش غلظت سدیم استات در سوبسترای مخلوط مقدار رشد، تجمع و غلظت PHB افزایش نشان می دهد. بیشترین تجمع و غلظت PHB در نسبت مولی ۱ به ۱ مشاهده می شود که سه برابر حالت متانول خالص است. این نتیجه اثر مثبت سوبسترای مخلوط سدیم استات و متانول بر تولید PHB در غلظت زیاد سدیم استات را نشان می دهد. علت افزایش تولید PHB در سدیم استات به دلیل مهارشدن چرخه TCA به وسیله سدیم استات است. با توجه به مسیر تولید PHB در باکتری ها، در استفاده از استیل کو آ (Ac-CoA) بین چرخه کربس و چرخه PHB رقابت وجود دارد [۲۰، ۲۱]، هنگام وجود سدیم استات اضافی در محیط، چرخه کربس مهار شده و چرخه PHB فعال می شود. بنابراین، مقدار تجمع و تولید PHB افزایش می یابد.

گلوکوز به عنوان سوبسترای مخلوط

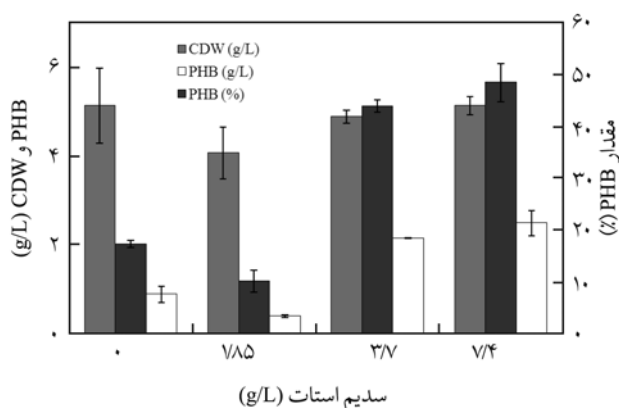
اثر افزودن گلوکوز در سه نسبت مولی ۱ به ۱، ۴ به ۱ و ۲ به ۱ گلوکوز به متانول در مقایسه با متانول خالص بر رشد سلول، تجمع و غلظت PHB

که در این شکل مشاهده می شود، باکتری به دلیل این که یک متیلوتروف اختیاری است، قابلیت استفاده از همه این منابع را دارد. بیشترین رشد در متانول، بیشترین درصد تجمع در اتانول و بیشترین غلظت PHB در گلوکوز مشاهده می شود. ویژگی قابلیت استفاده از منابع کربن متفاوت یک مزیت با ارزش برای فرایندهایی است که از این باکتری استفاده می کنند. زیرا، اگر شرایطی پیش آید که نتوان سوبسترای فرایند را تأمین کرد، با اندک تغییرات می توان از سوبسترای جایگزین استفاده کرد. با توجه به امکان رشد باکتری در سایر منابع کربنی، در این مطالعه برای افزایش تولید PHB، از راه کار به کارگیری سوبسترای مخلوط با متانول استفاده شده است.

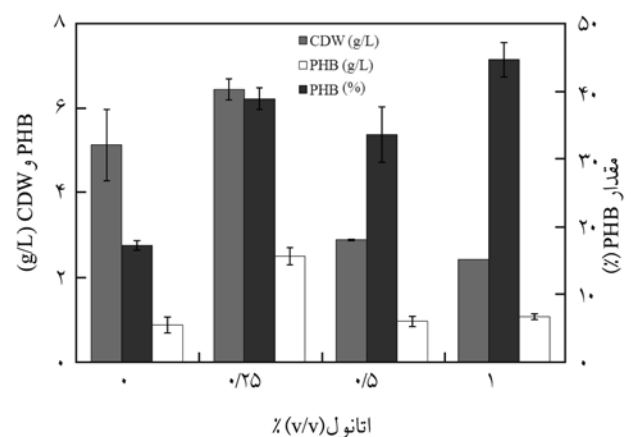
بررسی اثر استفاده از سوبسترای مخلوط

اتانول به عنوان سوبسترای مخلوط

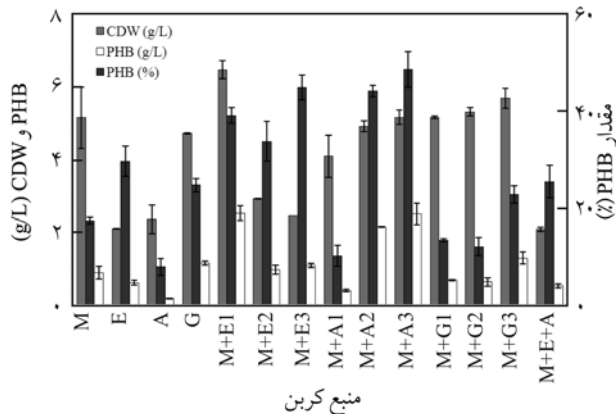
شکل ۲ اثر غلظت اتانول را بر درصد تجمع، غلظت PHB و رشد باکتری نشان می دهد. در این شکل نتایج حاصل از سه نسبت حجمی ۱ به ۱، ۲ به ۱ و ۱ به ۲ اتانول به متانول (با درصد حجمی ۰/۵ متانول و درصدهای حجمی ۰/۲۵، ۰/۵ و ۷/۰ اتانول در محیط کشت) با حالت بدون سوبسترای مخلوط مقایسه شده است. طبق نتایج حاصل افزودن اتانول درصد تجمع PHB و غلظت آن را در همه نسبت ها افزایش می دهد. اما، مقدار رشد باکتری تنها در حالتی که غلظت اتانول نصف غلظت متانول است، بیشتر شده و در بقیه نسبت ها کاهش یافته است. این نتیجه احتمالاً به دلیل سمیت اتانول است، یعنی اگر غلظت آن در محیط از حدی بیشتر شود، رشد باکتری را مهار می کند. بیشترین مقدار غلظت PHB در نسبت ۱ به ۲ اتانول به متانول به دست آمده است. همان طور که در شکل مشاهده می شود، بیشترین تجمع PHB در نسبت ۲ به ۱ اتانول به متانول



شکل ۳- اثر افزودن سدیم استات به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و مقدار PHB.



شکل ۲- اثر افزودن اتانول به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و محتوای PHB.

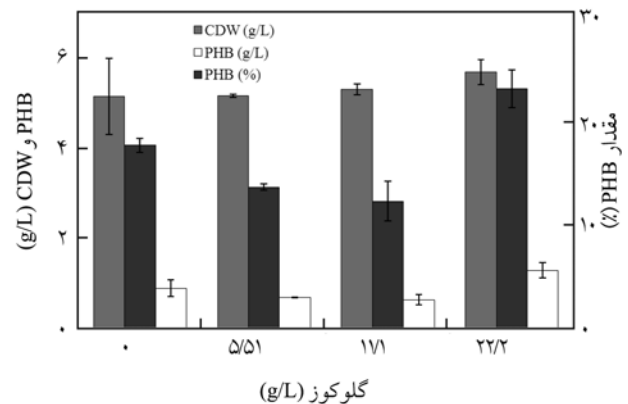


شکل ۵- مقایسه اثر سوبستراهای مخلوط بر CDW، غلظت و مقدار PHB.

کربن اضافی در محیط است که منجر به تولید PHB می‌شود. با توجه به نتایج حاصل استفاده از گلوکوز به عنوان سوبسترای مخلوط از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. زیرا، در اثر افزودن مقدار زیادی گلوکوز تولید PHB اندکی افزایش یافته است.

مقایسه کل سوبستراهای مخلوط

نتایج به دست آمده از بررسی اثر سوبسترای مخلوط در جدول ۳ و شکل



شکل ۴- اثر افزودن گلوکوز به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و مقدار PHB.

در شکل ۴ نشان داده شده است. فقط در نسبت مولی ۱ به ۱، مقدار رشد باکتری، تجمع و غلظت PHB نسبت به حالت متانول خالص کمی افزایش یافته است. در سه حالت مورد بررسی، مقدار رشد تغییر محسوسی نسبت به حالت متانول خالص ندارد. اما، مقدار تجمع PHB در غلظت‌های کمتر گلوکوز نسبت به حالت شاهد کاهش یافته و در غلظت زیاد گلوکوز افزایش می‌یابد. این افزایش احتمالاً به دلیل وجود

جدول ۳- مقایسه اثر سوبستراهای مخلوط بر وزن خشک سلول (CDW)، غلظت و مقدار پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB).

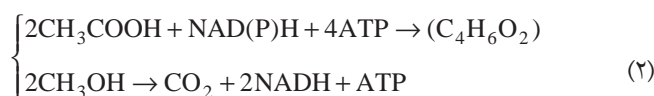
| کد | منبع کربن موجود در محیط کشت | CDW (g/L) | مقدار PHB (%) | غلظت PHB (g/L) |
|-------|----------------------------------|-----------|---------------|----------------|
| M | متانول | ۵/۱۴±۰/۸۴ | ۱۷/۳۹±۰/۶۷ | ۰/۹۰±۰/۱۸ |
| E | اتانول | ۲/۱۰±۰/۰۱ | ۲۹/۶۰±۳/۰۸ | ۰/۶۲±۰/۰۷ |
| A | سدیم استات | ۲/۳۵±۰/۳۹ | ۷/۹۲±۱/۷۶ | ۰/۱۸±۰/۰۱ |
| G | گلوکوز | ۴/۷۱±۰/۰۲ | ۲۴/۶۶±۱/۴۱ | ۷/۱۶±۰/۰۶ |
| M+E1 | اتانول: متانول ۲:۱ v/v | ۶/۴۶±۰/۲۴ | ۳۹/۰۱±۱/۶۲ | ۲/۵۲±۰/۲۰ |
| M+E2 | اتانول: متانول ۱:۱ v/v | ۲/۹۲±۰/۰۱ | ۳۳/۶۷±۴/۱۲ | ۰/۹۸±۰/۱۲ |
| M+E3 | اتانول: متانول ۱:۲ v/v | ۲/۴۴±۰/۰۱ | ۴۴/۷۹±۲/۵۴ | ۷/۰۹±۰/۰۶ |
| M+A1 | سدیم استات: متانول ۴:۱ mol/mol | ۴/۰۸±۰/۵۸ | ۱۰/۱۹±۲/۱۳ | ۰/۴۱±۰/۰۳ |
| M+A2 | سدیم استات: متانول ۲:۱ mol/mol | ۴/۹۰±۰/۱۵ | ۴۴/۰۳±۱/۲۱ | ۲/۱۶±۰/۰۱ |
| M+A3 | سدیم استات: متانول ۱:۱ mol/mol | ۵/۱۵±۰/۲۰ | ۴۸/۵۶±۳/۶۵ | ۲/۵۰±۰/۲۸ |
| M+G1 | گلوکوز: متانول ۴:۱ mol/mol | ۵/۱۶±۰/۰۴ | ۱۳/۴۴±۰/۲۹ | ۰/۶۹±۰/۰۱ |
| M+G2 | گلوکوز: متانول ۲:۱ mol/mol | ۵/۳۹±۰/۱۲ | ۱۲/۱۰±۱/۸۸ | ۰/۶۴±۰/۱۱ |
| M+G3 | گلوکوز: متانول ۱:۱ mol/mol | ۵/۶۸±۰/۲۷ | ۲۲/۷۶±۱/۸۱ | ۷/۳۰±۰/۱۶ |
| M+E+A | متانول + سدیم استات * + اتانول # | ۲/۰۹±۰/۰۵ | ۲۵/۳۸±۲/۳۳ | ۰/۵۳±۰/۰۶ |

* نسبت ۱ به ۴ سدیم استات به متانول؛ #، نسبت حجمی ۱ به ۱ اتانول به متانول.

کربن که صرف تولید PHB شده به مول های کربن موجود در سوبسترای مصرف شده، در حالت مخلوط سدیم استات و متانول سه برابر حالت متانول خالص است. Babel [۱۳] استفاده از مخلوط سوبستراها را این طور توجیه می کند: با توجه به منبع کربن و انرژی و مسیرهای سوخت و ساز، تولید PHB با مصرف انرژی، (یا) توان کاهشی یا با تولید آنها همراه است. در مورد اول (به منظور تولید انرژی مصرفی یا توان کاهشی مورد نیاز تولید PHB)، باید سوبسترای اضافی اکسید شود. بنابراین، رسیدن به بازده نظری سوخت و ساز کربن ممکن نیست. مثلاً برای تولید PHB از متانول معادله (۱) برقرار است [۱۳]:



در حالتی که از مخلوط استیک اسید (استات) و متانول استفاده می شود، یکی از آنها اسکلت کربنی را می سازد و دیگری انرژی یا توان کاهشی مورد نیاز اولی را فراهم می کند:



اگر NAD(P)H و NADH معادل در نظر گرفته شود (از نظر انرژی و به عنوان سوبسترای برای واکنش های احیایی، مثل AcAc-CoA ردوکتاز)، حدود ۸۰٪ منبع کربن جفت سوبسترای استیک اسید - متانول، می تواند به PHB تبدیل شود [۱۳]. البته همان طور که نتایج این پژوهش نشان می دهد، به طور عملی این وضعیت رخ نمی دهد، ولی با بهبود سویه های ریزسازواره، بهینه سازی محیط کشت و شرایط محیطی می توان به این وضعیت دست یافت.

نتیجه گیری

با توجه به ویژگی مایلو تروف اختیاری بودن باکتری مایلو بکتریوم اکستروکوتنس DSMZ 1340، این باکتری قابلیت رشد و تولید PHB در منابع کربن اتانول، سدیم استات و گلوکوز را دارد. استفاده از منابع کربن مختلف با غلظت های متفاوت به عنوان سوبسترای مخلوط با متانول نشان می دهد، استفاده از سوبسترای مخلوط با غلظت مناسب مقدار تولید PHB را افزایش می دهد. به دلیل مهار شدن چرخه کربس به وسیله سدیم استات و به همراه آن فعال شدن چرخه تولید PHB، یکی از بهترین سوبستراها سدیم استات است که در نسبت مولی ۱ به ۱ با متانول، بازده کربنی تولید PHB را بیش از سه برابر افزایش می دهد.

جدول ۴ - مقایسه سوبسترای مخلوط سدیم استات و متانول با متانول خالص.

| منبع کربن | متانول + استات | متانول |
|--|----------------|--------|
| سدیم استات اضافه شده به محیط در سه مرحله (g/L) | ۲۷۸۵ | - |
| سدیم استات مصرف شده (g/L) | ۱۰۵۰ | - |
| سدیم استات مصرف شده (mol) | ۰/۱۲۸ | - |
| متانول اضافه شده به محیط در سه مرحله (g/L) | ۱۷۸۵ | ۲۳/۷۰ |
| متانول مصرف شده (g/L) | ۹۴۵ | ۱۷/۸۴ |
| متانول مصرف شده (mol) | ۰/۲۹۵ | ۰/۵۵۸ |
| توده زیستی تولید شده (g/L) | ۵/۱۵ | ۵/۱۴ |
| PHB تولید شده (g/L) | ۲/۵۱ | ۰/۹۰ |
| HB (C ₄ H ₆ O ₂) تولید شده (mol) | ۰/۰۲۹ | ۰/۰۱۰ |
| مقدار توده زیستی باقی مانده (g/L) | ۲/۶۴ | ۴/۲۴ |
| مقدار توده زیستی (C ₄ H ₈ O ₂ N) باقی مانده (mol) | ۰/۰۲۶ | ۰/۰۴۲ |
| Y _{X/Methanol} (g/g) | ۰/۵۴ | ۰/۲۹ |
| Y _{PHB/Methanol} (g/g) | ۰/۲۶ | ۰/۰۵ |
| Y _{X/Acetate} (g/g) | ۰/۴۹ | - |
| Y _{PHB/Acetate} (g/g) | ۰/۲۴ | - |
| مقدار کربن در سوبسترای مصرف شده (mol) | ۰/۵۵۱ | ۰/۵۵۸ |
| مقدار کربن مصرف شده برای تولید PHB (mol) | ۰/۱۱۶ | ۰/۰۴۲ |
| بازده کربنی تولید PHB (mol/mol) | ۰/۲۱۱ | ۰/۰۷۵ |
| مقدار کربن مصرف شده برای توده زیستی باقی مانده ^۱ (mol) | ۰/۱۰۴ | ۰/۱۶۳ |
| بازده کربنی تولید توده زیستی باقی مانده (mol/mol) | ۰/۱۸۸ | ۰/۲۹۲ |

^۱- وزن توده زیستی باقی مانده = تفاضل وزن کلی توده زیستی از PHB درون آن.

۵ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۵ بهترین نتایج سوبسترای مخلوط مربوط به نسبت مولی ۱ به ۱ سدیم استات به متانول و نسبت حجمی ۱ به ۲ اتانول به متانول است.

محاسبه بازده کربنی

همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، یکی از بهترین ترکیب های سوبسترای مخلوط، ترکیب نسبت مولی ۱ به ۱ سدیم استات به متانول (M+A3) است. طی فرایندی که در مدت ۱۲۰ h انجام شد، به دلیل سمیت متانول، منابع کربن در فواصل زمانی ۴۸ h یک مرتبه به محیط کشت اضافه شدند. بازده تولید توده زیستی و PHB در دو حالت نسبت مولی ۱ به ۱ سدیم استات به متانول و متانول خالص در جدول ۴ مقایسه شده است. مطابق نتایج، بازده کربنی تولید PHB، یعنی تعداد مول های

مراجع

1. Suriyamongkol P., Weselake R., Narine S., Moloney M., and Shah S., Biotechnological Approaches for the Production of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms and Plants - A Review, *Biotechnol. Adv.*, **25**, 148-175, 2007.
2. Mokhtarani N., Ganjidust H., Vasheghani Farahani E., and Khaleghi Sarnamy M., Effect of Volatile Fatty Acids in Production of Polyhydroxyalkanoates by Activated Sludge, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **21**, 83-90, 2008.
3. Ganjidust H., Vasheghani Farahani E., Borghai M., and Mokhtarani N., Effects of Natural Polymers and Chemical Coagulants on the Dewatering of Sewage Sludge, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **17**, 353-357, 2004.
4. Mohamadbigi Kh. and Vasheghani Farahani E., Comparison of Different Biopolymers Performance in Water Treatment, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **18**, 285-290, 2005.
5. Ataei S.A., Vasheghani-Farahani E., Shojaosadati S.A., and Abdol Tehrani H., Isolation of PHA Producing Bacteria from Date Syrup Waste, *Macromol. Symp.*, **269**, 11-16, 2008.
6. Sudesh K., Abe H., and Doi Y., Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters, *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503-1555, 2000.
7. Lenz R.W. and Marchessault R.H., Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology, *Biomacromolecules*, **6**, 1-8, 2005.
8. Ayorinde F.O., Saeed K.A., Price E., Morrow A., Collins W.E., McInnis F., Pollack S.K., and Eribo B.E., Production of Poly(β -hydroxybutyrate) from Saponified Vernonia Galamensis Oil by *Alcaligenes Eutrophus*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 46-50, 1998.
9. Shishatskaya E.I., Biomedical Investigations of Biodegradable PHAs, *Macromol. Symp.*, **269**, 65-81, 2008.
10. Chiellini D.F., Piras A.M. and Chiellini E., Polymeric Materials for Bone and Cartilage Repair, *Prog. Polym. Sci.*, **35**, 403-440, 2010.
11. Choi J. and Lee S.Y., Factors Affecting the Economics of Polyhydroxyalkanoate Production by Bacterial Fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 13-21, 1999.
12. Babel W., The Mixed Substrate Concept, Applied for Microbial Syntheses of Metabolites, *Biotech. Adv.*, **8**, 261-275, 1990.
13. Babel W., Peculiarities of Methylophs Concerning Overflow Metabolism, Especially the Synthesis of Polyhydroxyalkanoates, *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 141-148, 1992.
14. Bourque D., Pomerleau Y., and Groleau D., High-cell-density Production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from Methanol by *Methylobacterium Exorquens*: Production of High-molecular-Mass PHB, *Appl. Microbiol. Biot.*, **44**, 367-376, 1995.
15. Kim P., Kim J.H., and Oh D.K., Improvement in Cell Yield of *Methylobacterium* sp. Reducing the Inhibition of Medium Components for Poly- β -hydroxybutyrate Production, *World J. Microb. Biot.*, **19**, 357-361, 2003.
16. Suzuki T., Yamane T., and Shimizu S., Mass Production of Poly- β -hydroxybutyric Acid by Fully Automatic Fed-batch Culture of *Methyloph*, *Appl. Microbiol. Biot.*, **23**, 322-329, 1998.
17. Mokhtari-Hosseini Z.B., Vasheghani-Farahani E., Heidarzadeh-Vazifekhoran A., Shojaosadati S.A., Karimzadeh R., and Khosravi Daran K., Statistical Media Optimization for Growth and PHB Production from Methanol3 by a Methylophic Bacterium, *Bioresour. Technol.*, **100**, 2436-2443, 2009.
18. Mokhtari-Hosseini Z.B., Vasheghani-Farahani E., Shojaosadati S.A., Karimzadeh R., and Heidarzadeh-Vazifekhoran A., Effect of Feed Composition on PHB Production from Methanol by HCDC of *Methylobacterium Exorquens* (DSMZ 1340), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **84**, 1136-1139, 2009.
19. Braunegg G., Sonnleitner B., and Lafferty R.M., A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly- β -Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29-37, 1978.
20. Mothes G., Rivera H.S., and Babel B., Competition between β -Ketothiolase and Citrate Synthase during Poly(β -hydroxybutyrate) Synthesis in *Methylobacterium Rhodesianum*, *Arch. Microbiol.*, **166**, 405-410, 1997.
21. Mothes G., Ackermann J.U., and Babel W., Regulation of Poly(β -hydroxybutyrate) Synthesis in *Methylobacterium Rhodesianum* MB 126 Growing on Methanol or Fructose, *Arch. Microbiol.*, **169**, 360-363, 1998.