تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از مخلوط سبوس و جوانه ذرت به روش تخمیر حالت جامد

محمدصادق جعفری، پریسا حجازی*+

تهران، دانشگاه علم و صنعت ایران، دانشکده مهندسی شیمی، آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۳۱۱۴ ـ ۱۶۸۴۶

چکیده: پلیمر زیست تخریب‌پذیر پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) فراورده‌ی درون سلولی برخی از میکروارگانیسم‌ها است که در شرایط سخت به عنوان منبع کربن و انرژی تولید می‌شود. تخمیر حالت جامد (SSF) روشی مناسب برای تولید فراورده‌های ثانویه می‌باشد و قابلیت استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان سوبسترا را دارد. در این پژوهش با به‌کارگیری فرایند SSF، تولید PHB با استفاده از میکروارگانیسم واترسیا یوتروفا و مخلوط سبوس و جوانه ذرت به عنوان سوبسترای ارزان قیمت مورد بررسی قرار گرفت. عامل‌های مؤثر بر تولید PHB مانند درصد ترکیب سوبسترا، دما و همچنین غنی‌سازی سوبسترا توسط ملاس به روش طراحی آزمایش "یک عامل در هر زمان" به منظور افزایش بهره‌وری تولید PHB در مقیاس ارلن مورد بررسی قرار گرفت. بیشینه تولید PHB و بهره‌وری آن در دمای $28\ ^{\circ}C$، رطوبت اولیه ۷۰٪، سوبسترای دارای ۵۰٪ جوانه ذرت و بدون حضور ملاس به ترتیب برابر ۳٫۲۶g/kg و ۰٫۰۶g/kg/h به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌هیدروکسی بوتیرات، تخمیر حالت جامد، سبوس ذرت، جوانه ذرت، غنی سازی محیط کشت.

KEY WORDS: *Polyhydroxybutyrate, Solid state fermentation, Corn bran and germ, Supplemented medium.*

مقدمه

با افزایش جمعیت جهان، مشکل‌های مربوط به محیط زیست نیز با سرعت بسیار زیادی در حال افزایش می‌باشد. یکی از عامل‌های اصلی این مشکل‌ها به مواد پلاستیکی مربوط است که به‌دلیل داشتن ویژگی‌های کاربردی بسیار زیاد، مورد توجه بشر بوده است [۱]. از این رو تلاش‌های بسیاری برای تولید پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر صورت پذیرفته است. یکی از مهمترین نوع‌های این پلیمرهای زیستی، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها[۱] (PHAs) با قابلیت ۱۰۰٪ تجزیه پذیری می‌باشند [۲]. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات[۲] (PHB) به عنوان مهمترین عضو این خانواده توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها در شرایط کمبود منبع نیتروژنی یا فسفری محیط کشت در حضور منبع کربنی اضافی به عنوان منبع ذخیره انرژی و کربن تولید می‌شود [۳، ۴]. این پلیمر زیستی به دلیل ویژگی‌های بسیار مناسب و نزدیکی به ویژگی‌های فیزیکی ـ شیمیایی پلیمرهای تولید شده توسط فرایندهای پتروشیمیایی به ویژه پروپیلن، مورد توجه بسیاری از صنایع قرار گرفته است. با وجود تمام برتری‌های این پلیمر زیستی، به دلیل قیمت بالای تمام شده این فراورده، کاربرد آن در بین صنایع گوناگون بسیار محدود می‌باشد.

*عهده دار مکاتبات

+E-mail: phejazia@iust.ac.ir

(۱) Polyhydroxyalkanoates

(۲) Polyhydroxybutyrate

Archive of SID

www.SID.ir

تلاش‌های زیادی با استفاده از فرایندهای تخمیر حالت غوطه‌ور[۱] برای تولید بهینه انجام شده است [۷-۵]، اما با این حال قیمت تمام شده این فراورده که ۵-۲ دلار برای هر کیلوگرم PHB در چند سال اخیر می‌باشد در مقایسه با پلیمرهای تجاری بر پایه نفت با قیمت حدود ۱ دلار برای هر کیلوگرم پلی پروپیلن، بیشتر است [۸].

بزرگترین مشکل در تجاری‌سازی این ماده، هزینه تمام شده بالای این فراورده می‌باشد. یکی از مهمترین عامل‌های تأثیرگذار در تولید اقتصادی فراورده‌ها قیمت مواد خام اولیه می‌باشد. استفاده از فرایندی با بهره‌وری بالا و همچنین استفاده از مواد خام ارزان قیمت از مهمترین راه‌ها در کاهش هزینه این پلیمرزیستی با ارزش است [۱۰، ۹]. با افزایش جمعیت، میزان استفاده از فراورده‌های کشاورزی نیز به میزان قابل توجهی افزایش یافته است که این مسئله سبب افزایش ضایعات کشاورزی و آلودگی محیط زیست می‌شود. تخمیر حالت جامد[۲] (SSF) یکی از قدیمی‌ترین روش‌های تخمیر بر اساس رشد میکروارگانیسم‌ها بر سوبسترای جامد در نبود آب آزاد می‌باشد. از آنجایی که فرایندهای تخمیر حالت جامد قابلیت استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان سوبسترا و منبع کربنی را دارا می‌باشند، با این روش به مقدار چشمگیری هزینه تولید این فراورده گران قیمت کاهش می‌یابد [۱۱]. از سوی دیگر PHB در بیشتر میکروارگانیسم‌ها در فاز ایستایی تولید می‌شود و فرایندهای تخمیر حالت جامد به دلیل ماهیتشان برای تولید فراورده‌های ثانویه بسیار مناسب می‌باشند. استفاده از فرایند SSF که هزینه‌های پایین دستی را به مقدار چشمگیری کاهش می‌دهد تا حد بسیار زیادی می‌تواند در کاهش هزینه نهایی مؤثر باشد [۱۲]. سبوس ذرت و جوانه ذرت[۳] باقی‌مانده از فرایند تولید گلوکز از نشاسته ذرت، از جمله ضایعات ارزان قیمت صنایع غذایی است که به طور معمول برای خوراک دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد. در ۱۰ سال اخیر بیشتر پژوهش‌ها برای تولید این پلیمر زیستی زیست‌تخریب‌پذیر با استفاده از میکرورگانیسم *واترسیا یوتروفا*[۴] بوده است [۱۳]. در تنها پژوهش انجام شده برای تولید PHB به روش SSF از این میکروارگانیسم و کیک سویا، دارای حدود ۴۵٪ منبع کربنی، به عنوان سوبسترا استفاده شد و ۱٫۲ g/kg PHB تولید شد [۱۴].

ملاس به عنوان منبع غنی کربنی که دارای سایر مواد غذایی مانند ویتامین‌ها و عناصر کمیاب مورد نیاز رشد میکروارگانیسم می‌باشد، می‌تواند در رشد و تولید PHB بسیار مفید واقع شود. پژوهش‌هایی با استفاده از این سوبسترای ارزان قیمت در حالت غوطه‌ور انجام شده است که تأثیر مثبتی نیز در افزایش تولید PHB داشته است [۱۶، ۱۵]. *الیویرا* و *همکاران* در سال ۲۰۰۴ میلادی با افزودن ملاس به محیط کشت کیک سویا، مقدار بازدهی PHB تولید شده توسط میکروارگانیسم *واترسیا یوتروفا* در آزمایش‌های خود را در حدود ۲٫۵ برابر نسبت به حالتی‌که هیچ افزودنی به محیط کشت جامد افزوده نشده بود، گزارش نمودند [۱۴].

در این پژوهش با استفاده از مخلوط سبوس ذرت و جوانه ذرت روغن‌گیری شده با ترکیب درصدهای متفاوت، اثر این منبع ارزان قیمت در تولید PHB با استفاده از میکروارگانیسم *واترسیا یوتروفا* در سه دمای ۲۶، ۲۸ و ۳۰ °C مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه به منظور افزایش میزان تولید PHB، اثر غلظت ملاس به عنوان بخشی از رطوبت افزوده شده به محیط کشت جامد به روش طراحی آزمایش "یک عامل در یک زمان[۵]" مورد ارزیابی قرار گرفت.

بخش تجربی

میکروارگانیسم و مایه تلقیح

در انجام آزمایش‌ها از میکروارگانیسم *واترسیا یوتروفا* با کد PTCC ۱۶۱۵ تهیه شده از مرکز میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده شد. برای آماده‌سازی مایه تلقیح برای افزودن آن به محیط کشت جامد اصلی، ابتدا میکروارگانیسم دلخواه در شرایط سترون بر روی بشقابک‌های دارای نوترینت آگار کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ °C درون انکوباتور قرار داده شد. در ادامه از میکروب رشد کرده به ارلن ۲۵۰ mL دارای ۵۰ mL محیط کشت مایع شامل پپتون ۱۰ g/L، عصاره مخمر ۵ g/L و NaCl ۵ g/L، افزوده شد. ارلن تلقیح شده در حدود ۱۵ ساعت در دمای ۳۰ °C درون شیکر انکوباتور قرار داده شد تا میزان جذب نوری برابر ۱ در طول موج ۶۰۰ nm به منظور ایجاد شرایط همانند آزمایشگاهی در تمام آزمایش‌ها به دست آید. سرانجام از محیط کشت مایع به عنوان مایه تلقیح برای افزودن به محیط کشت جامد اصلی استفاده شد.

(۱) Submerged Fermentation Process
(۲) Solid State Fermentation (SSF)
(۳) Corn Germ
(۴) *Wautersia eutropha*
(۵) One Factor at a Time

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱ـ بررسی عامل‌های مؤثر بر تولید PHB به روش یک عامل در هر زمان.

مرحله	عامل مورد بررسی	سایر شرایط سامانه		
		مقدار جوانه ذرت (% w/w)	دما (°C)	غلظت ملاس (% w/w)
۱	درصد ترکیب سوبسترا	۰ –۱۰۰	۲۸	۰
۲	دما	۵۰	۲۶–۳۰	۰
۳	افزودن ملاس	۵۰	۲۸	۰/۵ – ۳

محیط کشت جامد

برای تولید پلیمر زیست تخریب‌پذیر PHB از محیط کشت مخلوط سبوس ذرت و جوانه ذرت روغن گیری شده تهیه شده از کارخانه گلوکزان قزوین با ترکیب درصدهای متفاوت استفاده شد. اندازه ذره‌های سوبسترای مخلوط کمتر از ۴ میلی‌متر بود. در آزمایش‌ها مقدار ۴ گرم از سوبسترای جامد شامل سبوس و جوانه ذرت وزن شد و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شد. بر اساس آزمایش‌های مقدماتی انجام شده، حدود (v/w) ۴۰٪ رطوبت باید قبل از اتوکلاو به محیط کشت جامد افزوده شود، مقدار این رطوبت باید در حدی باشد که به هیدرولیز اسیدی سوبسترا کمک نماید تا میکروارگانیسم در ساعت‌های اولیه کشت در محیط جامد از مقدار قند کافی برخوردار باشد. باقیمانده رطوبت و مایه تلقیح که مقدار آن در حدود (v/w) ۳۰٪ بر مبنای وزن خشک سوبسترای اولیه بود، پس از اتوکلاو در شرایط کاملا استریل به سوبسترای جامد افزوده شد تا رطوبت و pH اولیه سوبسترا بر روی ۷۰٪ و ۷±۰/۲ تنظیم شود.

طراحی آزمایش‌ها

برای بررسی اثر عامل‌های مؤثر بر تولید PHB، سه عامل دما و درصد ترکیب سوبسترا و غلظت ملاس از روش طراحی آزمایش "یک عامل در یک زمان" استفاده شد. در این نوع طراحی آزمایش در هر مرحله اثر یک عامل در چند سطح مورد بررسی قرار می‌گیرد، به‌طوری‌که سطوح سایر عامل‌های ثابت در نظر گرفته می‌شود. سطح بهینه عامل بررسی شده در هر مرحله در مرحله‌های بعد به‌صورت ثابت لحاظ می‌شود و تأثیر عامل دیگری مورد بررسی قرار می‌گیرد (جدول ۱). این روش به طور معمول در آزمایش‌های مقدماتی و در شرایطی که آزمایش‌کننده تمایل به تغییر سریع در شرایط آزمایش پس از دیدن نتیجه در هر مرحله دارد یا در مواردی که اثر اصلی متغیر[۱] از خطای استاندارد آزمایش‌ها بسیار بیشتر است، مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۷]. سطوح عامل‌ها با توجه به نتیجه‌های موجود در مراجع برای تولید PHB به روش تخمیر حالت غوطه‌ور آزمایش‌های مقدماتی و همچنین با توجه به ماهیت SSF انتخاب شد. همان‌گونه که در جدول ۱ دیده می‌شود، اثر افزایش درصد جوانه ذرت در مخلوط سبوس ذرت و جوانه ذرت در چهار سطح ۰، ۵۰، ۷۰ و (w/w) ۱۰۰٪ مورد سنجش قرار گرفت.

به تقریب در تمامی پژوهش‌های انجام شده در تولید PHB با استفاده از باکتری *واترسیا یوتروفا* در تخمیر حالت غوطه‌ور، دمای $30\ ^{\circ}C$ دمای بهینه رشد اعلام شده است. اما با توجه به پدیده تجمع گرما و افزایش دما در مرکز سوبسترای جامد، در آزمایش‌های این مرحله با استفاده از انکوباتور با دقت $0/5\ ^{\circ}C$، دماهای ۲۶، ۲۸ و $30\ ^{\circ}C$ مورد آزمایش قرار گرفتند، درحالی که سایر شرایط عملیاتی ثابت بودند.

به منظور افزایش بهره‌وری PHB، ملاس تهیه شده از شرکت توسعه نیشکر و صنایع جانبی با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵ و (w/w) ۱٪ به عنوان بخشی از رطوبت پس از عملیات اتوکلاو به محیط کشت جامد افزوده شد و تأثیر آن در شرایط بهینه تولید PHB به دست آمده در مرحله قبل مورد ارزیابی قرار گرفت.

شایان یادآوری است، رطوبت اولیه سوبسترا با توجه به نتیجه‌های به دست آمده از آزمایش‌های مقدماتی در تمامی آزمایش‌ها برابر ۷۰٪ بر مبنای وزن خشک سوبسترا در نظر گرفته شد. همچنین به منظور بررسی تغییرهای سامانه با زمان، آزمایش‌ها در طول ۲ تا ۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور، برای هر روز یک ارلن در شرایط مورد نظر آماده شد و در پایان موعد مقرر مورد سنجش قرار گرفت. در ضمن به منظور بررسی مشخصه‌های سوبسترا در لحظه صفر، ارلن‌هایی با شرایط آزمایش آماده و پس از تلقیح مورد سنجش قرار گرفتند.

تجزیه واریانس[۲] (ANOVA) داده‌ها با احتمال خطای کمتر از

(۱) Factor Effect

(۲) Analysis of Variance

Archive of SID
www.SID.ir

۵٪ (P-value <۰/۰۵)، در شرایط گوناگون به منظور اطمینان از تفاوت معنادار بین نتیجه‌های به دست آمده در سطوح گوناگون متغیرها اعمال شد [۱۸].

فروشویی محیط کشت جامد تخمیر شده

برای بررسی مقدار قند احیا و قند کل در هر نمونه، عملیات فروشویی بر روی نمونه تخمیر شده در هر ارلن انجام شد. در این روش توده زیستی رشد کرده بر سوبسترای جامد نیز بازیافت و مقدار PHB تولید شده بررسی شد. در راستای انجام این عملیات مقدار مشخصی از نمونه تخمیر شده وزن و با افزودن۱۰ برابر وزنی آب مقطر به جامد تخمیر شده، مخلوط به دست آمده به مدت یک ساعت داخل شیکر انکوباتور قرار داده شد تا توده سلولی و سایر مواد شامل از قندهای احیا و کل به خوبی از فاز جامد به فاز آبی منتقل شود. سپس با عبور دادن مخلوط به دست آمده از یک صافی پارچه‌ای، مایع از سوبسترای جامد جدا شد. به منظور اطمینان از انتقال تمامی توده‌های سلولی از فاز جامد به فاز مایع، سوبسترای باقیمانده بر روی صافی پارچه‌ای با ۱۰ mL آب مقطر شستشو داده شد. در پایان تمام مایع عبور کرده از صافی در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع رویی برای انجام تجزیه قندهای کل و احیا و جامد ته‌نشین شده پس از عملیات سانتریفوژ نیز برای تجزیه مقدار PHB تولیدی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار باقیمانده از سوبسترای تخمیرشده برای اندازه‌گیری pH سوبسترا با مخلوط کردن آن با ۱۰ برابر آب مقطر استفاده شد.

اندازه‌گیری مقدار قند احیا و قند کل

در شرایط تخمیر حالت جامد به طور معمول با محیط کشت پیچیده روبه‌رو هستیم و میکروارگانیسم به طور پیوسته با ترشح آنزیم‌های مطلوب، قند مورد نیاز خود را از محیط کشت پیچیده تأمین می‌کند. درنتیجه مقدار قند احیا آزاد شده را می‌توان بر اساس یکی از قندهای متعارف مانند گلوکز، فروکتوز، رامنوز یا ... محاسبه نمود. برای محاسبه قند احیا از روش دی نیترو سالیسیلیک اسید[۱] (DNS) میلر، بر پایه قند گلوکز استفاده شد [۱۹]. میزان جذب در طول موج ۵۷۵ nm توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (UV/Vis SP8001 MeterTech) خوانده شد.

برای بررسی مقدار قند کل محلول موجود در محیط کشت از روش فنول سولفوریک اسید استفاده شد و سرانجام مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ nm خوانده شد [۲۰].

استخراج و اندازه‌گیری مقدار PHB

با توجه به اینکه PHB یک فراورده درون سلولی می‌باشد، برای محاسبه مقدار تولید این فراورده توسط میکروارگانیسم، ابتدا باید آن را از توده سلولی استخراج نمود. همان‌گونه که در قسمت قبل توضیح داده شد جامد ته‌نشین شده در پایان عملیات فروشویی برای استخراج و اندازه‌گیری مقدار PHB مورد استفاده قرار گرفت.

به‌منظور استخراج PHB، جامد ته‌نشین شده در معرض ۱ mL هیپوکلریت اسید (۳۰٪) با pH برابر با ۱۲ در حمام آب ۳۷ °C به مدت یک ساعت قرار داده شد تا دیواره سلولی گسسته شود و گرانول‌های PHB استخراج شود. در ادامه محلول به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ °C با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. پس از جداسازی مایع رویی، مقدار ۱ mL آب مقطر به جامد ته‌نشین شده افزوده شد و بار دیگر سانتریفوژ شد. همین عملیات با ۱ mL الکل و استن به منظور حل کردن چربی‌های سلول تکرار شد. در پایان جامد نهایی چند بار با ۲ ml کلروفرم سانتریفوژ شد تا PHB به خوبی درون کلروفرم حل شود و از سایر جامدها جدا شود. در این مرحله دو فاز آلی (سنگین) و جامد (سبک) قابل تشخیص خواهند بود. مقدار مشخصی از محلول کلروفرم دارای PHB جدا شد و پس از تبخیر کامل کلروفرم، گرد سفید رنگ باقیمانده برای تجزیه PHB مورد استفاده قرار گرفت [۲۱].

برای تجزیه PHB از شیوه *لو*[۲] و *اسلیپکی*[۳] به روش طیف سنجی استفاده شد [۲۲]. بر طبق این روش مقدار ۱۰ mL سولفوریک اسید غلیظ ۹۶٪ به PHB ته‌نشین شده افزوده شد و محلول به دست آمده در لوله‌های درب بسته به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ °C قرار گرفت تا PHB با سولفوریک اسید واکنش داده و کروتونیک اسید تشکیل شود. سرانجام پس از سرد شدن محلول‌ها، مقدار جذب آن‌ها در طول موج ۲۳۵ nm خوانده شد.

نتیجه‌ها و بحث

اثر درصد ترکیب سوبسترا

یکی از مهمترین عامل‌ها در تولید PHB مقدار و نوع منبع کربنی محیط کشت می‌باشد که به شدت به درصد ترکیب سوبسترای مورد استفاده وابسته است. همان‌گونه که از شکل ۱ مشخص است با افزایش درصد جوانه ذرت از ۰ تا ۱۰۰٪ مقدار قند اولیه کل و احیای اولیه سوبسترا افزایش یافت.

(۱) Dinitrosalicylic Acid

(۲) Law

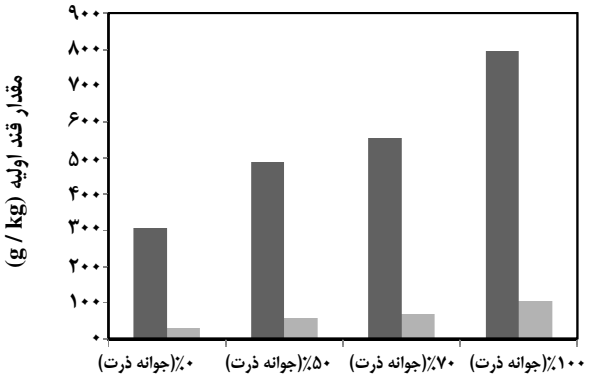
(۳) Slepecky

Archive of SID
www.SID.ir

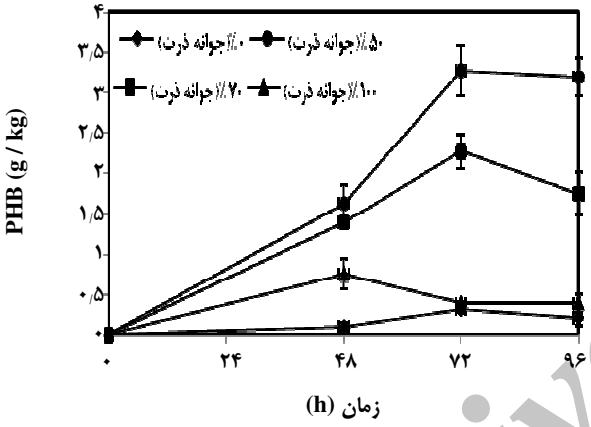
همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، با افزایش درصد جوانه ذرت و در نتیجه افزایش مقدار قند اولیه محیط کشت، مقدار PHB تولیدی روند افزایشی منظمی نداشته است و مقدار PHB تولیدی با استفاده از سوبسترای دارای ۵۰٪ جوانه ذرت بهترین نتیجه را داشته است. با افزایش درصد جوانه ذرت از ۵۰ تا ۱۰۰٪ مقدار تولید PHB کاهش یافته است، که دلیل این پدیده را می‌توان افزایش اسیدهای چرب آلی در محیط کشت با افزایش درصد جوانه ذرت دانست. همچنین بعضی از اسیدهای چرب آلی در محیط کشت به عنوان پیش‌سازها در تولید کوپلیمر نقش دارند و در رشد میکروارگانیسم نقشی ندارند. از سوی دیگر، افزایش بیش از حد غلظت این نوع اسیدهای چرب در محیط کشت به دلیل سمیت، باعث کاهش رشد میکروارگانیسم شده و سرانجام سبب کاهش تولید PHB می‌شود [۲۳]. همچنین امکان دارد که مقدار زیاد حضور قند اولیه باعث ایجاد محدودیت[۱] در تولید PHB شود. همان‌گونه که از شکل ۲ دیده می‌شود، استفاده از سبوس ذرت به تنهایی (بدون حضور جوانه ذرت) نیز در تولید PHB مفید نبوده است، که می‌توان کمبود قند در دسترس میکروارگانیسم و یا کمبود سایر مواد مغذی مانند ویتامین‌ها که معمولا در جوانه ذرت موجود می‌باشند را دلیل آن بیان نمود.

همان‌گونه که از شکل ۲ مشخص است، تولید PHB با باکتری *واترسیا یوتروفا* وابسته به رشد[۲] است و با افزایش تعداد سلول‌ها مقدار پلیمر زیستی افزایش می‌یابد و در فاز سکون با شروع محدودیت در مواد مغذی (همچون نیتروژن و فسفر) یا اکسیژن و در حضور کربن اضافه، مقدار تولید PHB تا حدودی افزایش می‌یابد و سرانجام به دلیل کمبود مواد، باکتری از پلیمر زیستی به عنوان منبع کربن استفاده می‌کند [۲۴].

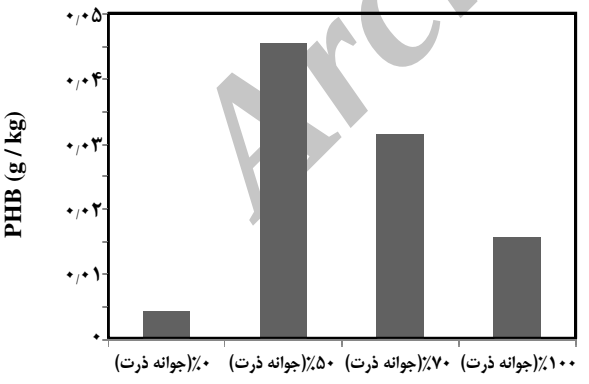
در شکل ۲ مشخص است، مقدار تولید PHB در روز سوم به بیشترین مقدار خود یعنی ۳/۳ گرم به ازای هر کیلوگرم سوبسترای خشک اولیه رسیده است و سپس در روز چهارم مقدار بسیار کمی کاهش یافته است که دلایل آن را می‌توان به دلیل محدودیت مواد مغذی و مصرف آن‌ها توسط توده سلولی به عنوان منبع کربن یا انرژی دانست [۸]. بین مقدارهای PHB در روز سوم تفاوت معناداری (P-value <۰/۰۱) وجود دارد. برطبق شکل ۳ مقدار بهره‌وری PHB در سوبسترای دارای ۵۰٪ جوانه بیشترین مقدار را نشان می‌دهد.



شکل ۱ـ مقدارهای قندهای کل (■) و احیای (■) اولیه در محیط کشت بر اساس درصد ترکیب‌های گوناگون سوبسترا.



شکل ۲ـ تغییر PHB تولید شده با زمان با درصد ترکیب‌های گوناگون سوبسترا.

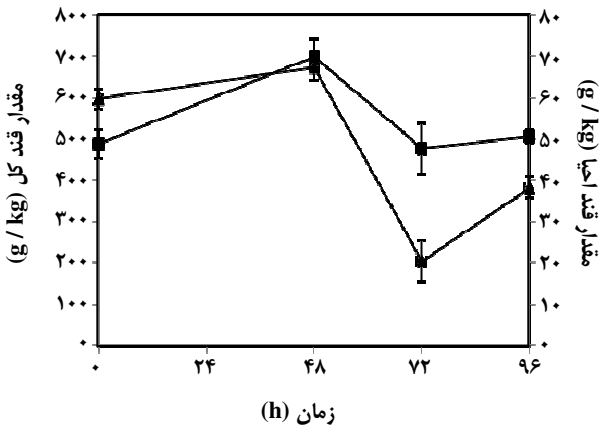


شکل ۳ـ مقدار بیشینه بهره‌وری PHB با استفاده از درصد ترکیب‌های گوناگون سوبسترا

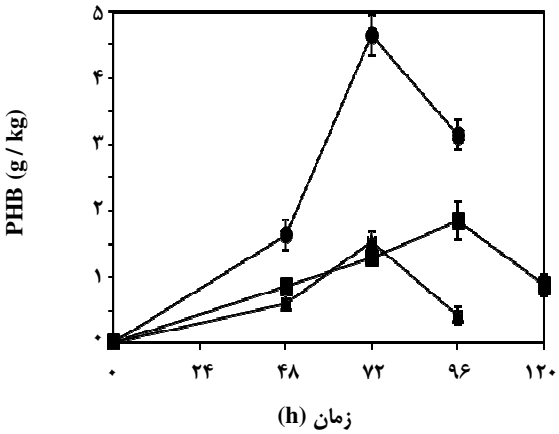
(۱) Inhibition

(۲) Growth-associated

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴ـ تغییر قند احیا (▲) و قند کل (■) با زمان با استفاده از سوبسترای حاوی ۵۰٪ جوانه ذرت.



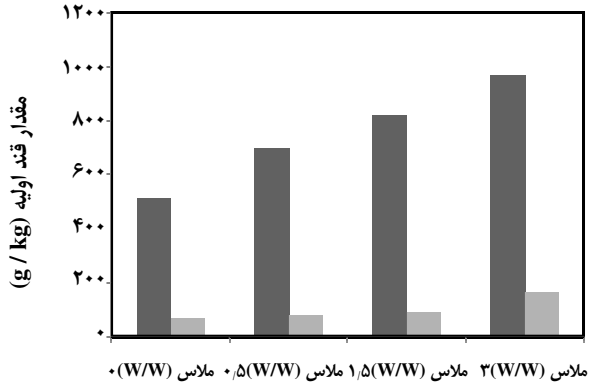
شکل ۵ ـ تغییر مقدار تولیدPHB در طول فرایند در دماهای ۲۶ (■)، ۲۸ (●) و ۳۰ (▲) درجه سانتیگراد.

در شکل ۴ تغییر قند کل و قند احیا با استفاده از محیط کشت بهینه با ۵۰٪ جوانه در برابر زمان نشان داده شده است. مقدار قند کل که شامل قند احیا نیز می‌باشد، تمامی کربوهیدرات‌های محلول در آب را شامل می‌شود که در ابتدای فرایند با هیدرولیز اسیدی سوبسترا در نتیجه عملیات سترون‌سازی و در طول فرایند تخمیر با ترشح آنزیم‌های هیدرولیز کننده یا فراورده‌های جانبی تولید شده به دست آورده می‌شوند. به طور معمول میکروارگانیسم‌ها از قند احیا در طول فرایند تخمیر استفاده می‌کنند، بنابراین مقدار قند احیا در هر زمان به طور غیرمستقیم نشان‌دهنده میزان رشد میکروارگانیسم و تولید فراورده می‌باشد [۲۵]. همان‌گونه که در شکل مشخص است، مقدار قند کل تا روز دوم افزایش محسوس یافته، درحالی که مقدار قند احیا تغییر محسوسی نداشته است. این امر بدان معناست که با رشد میکروارگانیسم‌ها و ترشح آنزیم‌های هیدرولیزکننده، قند کل افزایش می‌یابد ولی چون به طور معمول باکتری‌ها قادر به مصرف قندهای احیا هستند، به طور عمده از آن استفاده و رشد می‌کنند و مقدار قند احیا در ۴۸ ساعت اول به تقریب ثابت مانده است. مقدار باقیمانده قند احیا پس از ۴۸ ساعت به مقدار اولیه آن در شروع فرایند، نزدیک می‌باشد و در این حالت با توجه به افزایش تعداد سلول‌ها و در نتیجه افزایش محدودیت مواد مغذی، تولید PHB به عنوان منبع ذخیره کربن و انرژی در فاز سکون آغاز می‌شود و در روز سوم به بیشترین مقدار می‌رسد. مقدار قند کل و احیا در روز سوم کاهش محسوسی را نشان می‌دهد که نشان از مصرف منبع کربنی برای تولید PHB می‌باشد که شکل ۲ این امر را تأیید می‌نماید. در روز چهارم با کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها و شاید مصرف PHB توسط میکروارگانیسم‌ها، میزان تولید PHB کاهش یابد (شکل ۲) و مقدار قند کل و احیای محیط کشت به ترتیب به تقریب ثابت ماند و اندکی افزایش نشان می‌دهند.

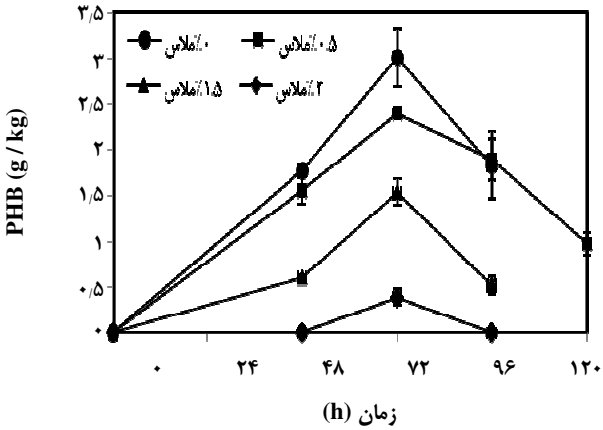
اثر دما

مقدار قندهای کل و احیا اولیه سوبسترای دارای ۵۰٪ جوانه ذرت در ابتدای فرایند در هر سه دمای مورد آزمایش به تقریب یکسان بود و درنتیجه تنها عامل مؤثر در این سری آزمایش‌ها دما می‌باشد. شکل ۵ مقدار تولید PHB را درطول فرایند در سه دمای ۲۶، ۲۸ و ۳۰ °C نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل دیده می‌شود، در دمای ۲۶ °C بیشترین مقدار تولید PHB در روز چهارم به دست آمد و مقدار آن نیز برابر با ۱٫۹ گرم به ازای هر کیلوگرم سوبسترای خشک اولیه می‌باشد. گذشت زمان و تجمع مواد جانبی متابولیکی و همچنین وجود گرادیان دما و غلظت مواد مغذی را از دلایل کاهش مقدار تولید PHB توسط باکتری در روز پنجم می‌توان عنوان نمود. در دماهای ۲۸ و ۳۰ °C نیز روندی همانند در تغییر میزان PHB دیده می‌شود، با این تفاوت که در دماهای ۲۸ و ۳۰ °C مقدار بیشینه تولید PHB در روز سوم است، که دلیل آن افزایش سرعت فعالیت متابولیکی و افزایش میزان رشد با دما و به دنبال آن تولید PHB با سرعت بیشتری می‌باشد با توجه به شکل یاد شده مشخص است که دمای مناسب برای تولید PHB در دمای ۲۸ °C می‌باشد. با استفاده از تجزیه واریانس مشخص شد که مقدار PHB تولید شده در روز سوم در دماهای گوناگون با اطمینان بالا (P-value <۰٫۰۱) تفاوت معناداری دارد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۶ ـ مقدار قندهای کل (■) و احیای (■) اولیه محیط کشت غنی شده با درصدهای گوناگون ملاس افزوده شده.



شکل ۷ ـ تغییر مقدار تولید PHB با زمان با استفاده از محیط کشت غنی شده با درصدهای گوناگون ملاس.

مقدار بیشینه بهره‌وری PHB تولید شده در دماهای ۲۶، ۲۸ و ۳۰ °C به ترتیب برابر با ۰/۰۲، ۰/۰۶ و ۰/۰۲ (g PHB/Kg/h) می‌باشد.

غنی‌سازی محیط کشت

در این قسمت از پژوهش، اثر افزودن ملاس به عنوان بخشی از رطوبت اضافه شده به محیط کشت بهینه به دست آمده از آزمایش‌های مرحله قبل بررسی شد. تغییر مقدار قند کل و احیا اولیه محیط کشت با افزایش غلظت ملاس در شکل ۶ نشان داده شده است.

همان‌گونه که در شکل ۷ دیده می‌شود، مقدار تولید PHB در سوبسترای غنی شده با ۰/۵٪ (w/w) ملاس بهتر از سایر حالت‌ها می‌باشد؛ اما با این حال مقدار آن کمی کمتر از مقدار PHB تولید شده از محیط کشت غنی نشده است (تفاوت داده‌ها معنادار نیست (P-value > ۰/۰۵)). مقدار بیشینه بهره‌وری تولید PHB در نبود و با ۰/۵٪ (w/w) ملاس به ترتیب برابر ۰/۰۵ و ۰/۰۴ (g PHB/kg/h) به‌دست آمد، که نشان می‌دهد با افزایش مقدار غلظت ملاس تا ۰/۵٪، تفاوت چشمگیری در بازده و بهره‌وری تولید دیده نمی‌شود. با افزایش غلظت ملاس، مقدار تولید PHB به مقدار چشمگیری کاهش یافت و حتی در غلظت ۳٪ (w/w) مقدار تولید PHB به تقریب صفر به دست آمد. به نظر می‌رسد افزودن ملاس باعث افزایش محدودیت تولید PHB توسط میکروارگانیسم می‌شود. به دلیل نبود وجود گزارش قند موجود در سوبسترای جامد و مقدار مناسب برای تولید PHB در سایر پژوهش‌ها، اظهار نظر قطعی امکان پذیر نیست.

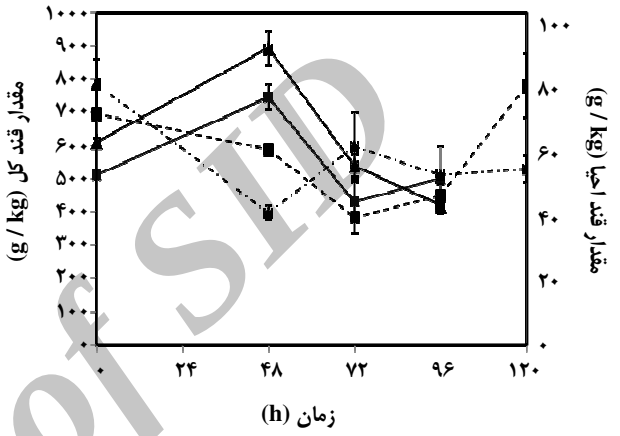
از نتیجه‌های آزمایش‌ها مشخص شد که در غلظت‌های بالای ملاس (۱/۵ و ۳٪)، با پیشرفت فرایند شاید به دلیل نوع منبع کربنی و یا مقدار زیاد آن و همچنین به سبب تولید متابولیت‌های برون سلولی، pH محیط کشت پس از ۴۸ ساعت از شروع فرایند در بازه‌ی اسیدی قرار گرفت که نشان دهنده دلخواه نبودن این محیط کشت برای این میکروارگانیسم می‌باشد. با توجه به نتیجه‌های به دست آمده در این آزمایش‌ها، ملاس، افزودنی مناسبی برای سوبسترای جامد استفاده شده در شرایط عملیاتی به‌کار رفته نمی‌تواند باشد. این نتیجه‌ها به طور روشن برخلاف نتیجه‌های گزارش شده توسط *الیویرا* و *همکاران* می‌باشد [۱۴]، که یکی از مهمترین دلایل آن می‌تواند تفاوت بین نوع سوبسترا، ملاس و کد میکروارگانیسم به‌کار رفته باشد.

همان‌گونه که از نتیجه‌های این قسمت مشخص است افزودن ملاس تا غلظت ۰/۵٪ (w/w) تأثیر مثبتی بر تولید PHB نداشته است، درنتیجه در شکل ۸ تغییرهای قند کل و قند احیا در دو حالت حضور ۰/۵٪ (w/w) و نبود ملاس با یکدیگر مقایسه شده است. با توجه به این شکل مقدار قند کل در حالت غنی نشده از لحظه صفر تا ساعت ۴۸ افزایش یافته است. در حالت غنی شده مقدار قند کل و احیا از لحظه صفر فرایند تا ساعت ۹۶ روند کاهشی داشته است و گویا میکروارگانیسم تنها از مقدار قند آزاد موجود در محیط کشت به دلیل هیدرولیز اسیدی توانسته استفاده نماید. مقدار قند کل و احیا تنها در پایان فرایند با کاهش مقدار PHB تولیدی شاید به دلیل کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌ها، افزایش یافته است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ـ مقایسه PHB تولید شده با استفاده از واترسیا یوتروفا به روش SSF در مقیاس ارلن با سایر پژوهش‌ها.

محیط کشت	هوادهی	زمان (h)	PHA (g/kg)	PHA (g/kg/h)	مرجع
سبوس و جوانه ذرت	---	۷۲	۳/۲۲۵	۰/۰۴۸	این پژوهش
سبوس و جوانه ذرت غنی شده با ملاس (w/w) ۰/۵٪		۷۲	۲/۳۵	۰/۰۳۳	
کیک سویا	×	۳۶	۱/۲	۰/۰۳۳	[۱۳]
کیک سویا غنی شده با ملاس ۲/۵٪		۶۰	۴/۹	۰/۰۸۲	



شکل ۸ ـ تغییر قند احیا (▲) و قند کل (■) با زمان با استفاده از سوبسترای غنی شده با ملاس ۰/۵٪ (خط چین) و بدون حضور ملاس (خط توپر).

جدول ۲ مقایسه بین نتیجه‌های به‌دست آمده در این پژوهش با پژوهش‌های *الیویرا* و *همکاران* [۱۴] را نشان می‌دهد. با توجه به نتیجه‌ها، مقدار PHB تولیدی با استفاده از محیط کشت غنی نشده بیشتر از نتیجه‌های *الیویرا* و *همکاران* می‌باشد. در نتیجه‌های این پژوهشگران، غنی‌سازی محیط کشت توسط ملاس، مقدار PHB تولیدی را تا مقدار ۲/۵ برابر افزایش داده است، این درحالی است که در این پژوهش منبع کربنی ملاس تأثیر مثبتی نداشته است. شاید دلیل آن متفاوت بودن درصد ترکیب‌های عناصر در ملاس مورد استفاده در دو پژوهش می‌باشد. شایان یادآوری است، در پژوهش‌های *الیویرا* و *همکاران* میکروارگانیسم در شرایط هوادهی بوده است، درحالی که در آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش، میکروارگانیسم در شرایط هوادهی قرار نداشت.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش به منظور تولید پلیمر زیست تخریب‌پذیر پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از فرایند تخمیر حالت جامد و سوبسترای ارزان قیمت مخلوط سبوس ذرت و جوانه ذرت استفاده شد. به منظور افزایش تولید PHB اثر عامل‌های درصد ترکیب سوبسترا، دما و غلظت ملاس افزوده شده به روش طراحی آزمایش "یک عامل در هر زمان" مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق نتیجه‌ها در دمای ۲۸ °C و درصد ترکیب سوبسترای دارای ۵۰٪ جوانه ذرت، بیشترین تولید PHB به میزان ۳/۲۶ گرم به ازای یک کیلوگرم از سوبسترای خشک اولیه به دست آمد. در ادامه در شرایط بهینه به دست آمده، اثر افزودن ملاس بر تولید PHB، به عنوان رطوبت اضافه شده به محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. اما استفاده از این منبع کربنی تاثیر مثبتی در تولید PHB نداشت و حتی افزودن ملاس در غلظت (w/w) ۳٪ نقش جلوگیری کننده در رشد میکروارگانیسم داشت و مقدار PHB تولید شده به تقریب برابر با صفر گزارش شد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۴

مراجع

[1] Castilho L.R., Mitchell D.A., Denise M.G., Freire C., Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Waste Materials and by-Products by Submerged and Solid-State Fermentation, *Bioresource Technol.*, **100**, p. 5996 (2009).

Archive of SID
www.SID.ir

[2] Ray S.S., Bousmina M., Biodegradable Polymers and Their Layered Silicate Nanocomposites: In Greening the 21st Century Materials World, *Prog. Mater. Sci.*, **50**, p. 962 (2005).

[3] Khanna S., Srivastava A.K., Recent Advances in Microbial Polyhydroxyalkanoates, *Process Biochem.*, **40**, p. 607 (2004).

[4] Steinbuchel A., Fuchtenbusch B., Bacterial and other Biological Systems for Polyester Production, *Trends Biotechnol.*, **16**, p. 419 (1998).

[۵] کیانوش خسروی دارانی، ابراهیم واشقانی فراهانی، انواع ریزه سازواره و سامانه تولید پلیمر زیست تخریب پذیر پلی هیدروکسی بوتیرات، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، (۱)**۳۹**، ص. ۱ (۱۳۸۴).

[۶] زهرا بیگم مختاری حسینی، ابراهیم واشقانی فراهانی، سید عباس شجاع الساداتی، افزایش تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول به وسیله *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* و سوبسترای مخلوط، *علوم و تکنولوژی پلیمر*، **۲۳**، ص. ۳۹۷ (۱۳۸۹).

[7] Mokhtari-Hosseini Z.B., Vasheghani-Farahani E., Heidarzadeh-Vazifekhoran A., Shojaosadati S. A., Karimzadeh R., Khosravi Darani K., Statistical Media Optimization for Growth and PHB Production from Methanol, *Bioresource Technol.*, **100**, p. 2436 (2009).

[8] Altman A., Hasegawa P.M., "Plant Biotechnology and Agriculture: Prospects for the 21st Century", 1st ed., Elsevier, (2012).

[9] Ramadas N.V., Singh S.K., Soccol C.R., Pandey A., Polyhydroxybutyrate Production Using Agro-industrial Residue as Substrate by Bacillus sphaericus NCIM 5149, *Braz. Arch. Biol. Techn.*, **52**, p. 17 (2009).

[10] Beom Soo K., Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Inexpensive Substrates, *Enzyme Microb. Tech.*, **27**, p. 774 (2000).

[11] Mitchell D.A., Berovic A.M., Kreiger N., Overview of Solid State Bioprocessing, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **8**, p. 183 (2002).

[12] González J.B., Solid-State Fermentation: Physiology of Solid Medium, its Molecular Basis and Applications, *Process Biochem.*, **47**, p. 175 (2012).

[13] Vandamme P., Coenye T., Taxonomy of the Genus Cupriavidus: a Tale of Lost and Found, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, p. 2285 (2004).

[14] Oliveira F.C., Freire D.M.G., Castilho L.R., Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Solid-State fermentation with Ralstonia Eutropha, *Biotechnol. Lett.*, **26**, p. 1851 (2004).

[15] Jiang Y., Song X., Li P., Dai C. and Shao W., High Poly(bhydroxybutyrate) Production by Pseudomonas Fluorescens A2a5 from Inexpensive Substrates, *Enzyme Microb. Technol.*, **42**, p. 167 (2008).

[16] Yilmaz M. and Beyatli Y., Poly-b-Hydroxybutyrate (PHB) Production by a Bacillus Cereus M5 Strain in Sugarbeet Molasses, *Zuckerindustrie*, **130**, p. 109 (2005).

[17] Frey D. D. and Wang H., Adaptive One-Factor-at-a-Time Experimentation and Expected Value of Improvement, *Technometrics*, **48**, p. 418 (2006).

Archive of SID

www.SID.ir

[18] Shahrim Z., Sabaratnam V., Rahman N. A. A., Abd-Aziz S., Hassan M. A., Karim M. I. A., Production of Reducing Sugars by *Trichoderma sp.* KUPM0001 During Solid Substrate Fermentation of Sago Starch Processing Waste Hampas, *Research J. Microb.*, **3**, p. 569 (2008).

[19] Miller G. L., Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.*, **31**, p. 426 (1959).

[20] Michel D., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. and Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Anal. Chem.*, **28**, p. 350 (1958).

[21] Braunegg G. and Lefebre G., Polyhydroxyalkanoates, Biopolymers from Renewable Resources: Physiological and Engineering Aspects, *J. Biotechnol.*, **65**, p. 127 (1978).

[22] Law J. H., Slepecky R. A., Assay of Poly-13-Hydroxybutyric Acid, *J. Bacteriol.*, **82**, p. 33 (1960).

[23] Sheua D.S., Chenb W.M.,"Thermophilic Bacterium Caldimonas Taiwanensis Produces poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) from Starch and Valerate as Carbon Sources, *Enzyme Microb. Technol.*, **44**, p. 289 (2009).

[24] Sangkharak K., Nutrient Optimization for Production of Polyhydroxybutyrate from Halotolerant Photosynthetic Bacteria Cultivated Under Aerobic-Dark Condition, *Electronic J. Biotech.*, **11**, p. 1 (2008).

[25] Zhang L., Zhao H., Gan M., Jin Y., Gao X., Chen Q., Guan J., Wang Z., Application of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) from Viscosity Reducing of Raw Sweet Potato for Bioethanol Production at Laboratory, Pilot and Industrial Scales, *Bioresource Technol.*, **102**, p. 4573 (2011).

Archive of SID

www.SID.ir