



بهینه سازی محیط کشت HS به منظور تولید نانوالیاف سلولز میکروبی با استفاده از باکتری استوباکتر زایلینیوم

فاطمه نوری روزبهانی^۱، فاطمه اشرفی^{۲*}، سهیلا مرادی بیدهندی^۳

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی، ^۲ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبی شناسی، ^۳ دانشیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: سلولز باکتریایی سنتز شده توسط برخی میکروارگانیسم ها از جمله *استوباکتر زایلینیوم* به دلیل ویژگی های خاص کاربرد زیادی در صنایع مختلف پیدا کرده است. هدف از این پژوهش بهینه سازی شرایط کشت برای تولید سلولز میکروبی در محیط کشت جدید می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه به صورت تجربی منابع جدید کربن و نیتروژن به محیط هسترین-شرام مایع حاوی *استوباکتر زایلینیوم* اضافه و به مدت ۷ روز گرماگذاری شدند. منابع کربن شامل: گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، ساکاروز، مالتوز، اتانول، متانول، اینوزیتول، گلیسرول، زایلوز، مانیتول و منابع نیتروژن شامل آمونیوم سولفات، آمونیوم نترات، سدیم نترات (۱-۳-۶-۹) و پیتون و عصاره مخمر (۵-۱۰-۱۵-۲۰) گرم در هر لیتر محیط کشت HS بودند. از آلزینات سدیم و استات سدیم نیز به منظور بررسی تاثیر ویسکوزیته و تنظیم pH استفاده شد. برای تایید تولید سلولز از میکروسکوپ الکترونی نگاره، پراش اشعه ایکس و تکنیک طیف سنجی FTIR استفاده گردید.

یافته ها: چهار منبع کربن گلیسرول (بدون افت محسوس در pH)، گلوکز، فروکتوز و اینوزیتول به ترتیب بیشترین مقدار تولید سلولز را داشتند. منابع نیتروژن آلی و به ویژه پیتون، بر خلاف منابع نیتروژن معدنی تاثیر زیادی بر تولید داشتند. میزان بهینه استفاده از آلزینات سدیم به عنوان عامل ویسکوز کننده و استات سدیم به عنوان بافر به ترتیب ۱/۲ و ۳ گرم در هر لیتر محیط کشت به دست آمد. نتایج تفرق اشعه ایکس بیشترین اندیس کریستالینیتی را به ترتیب در محیط های گلوکز، فروکتوز، اینوزیتول و گلیسرول نشان داد. مقدار و شدت جذب فروسرخ حاصل از FTIR محصولات به دست آمده از دو محیط گلوکز و گلیسرول و مقایسه آن ها با سایر نمودارهای سلولزی مشابه تولید سلولز را تایید نمود. همچنین بررسی های انجام شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره، ساختار نانوفیبریلی سلولزهای میکروبی در محیط کشت های با منابع برتر کربن را به وضوح نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که گلیسرول و پیتون بیشترین تاثیر را در تولید سلولز میکروبی دارند. همچنین مشخص شد که افزودن آلزینات سدیم به عنوان عامل ویسکوز کننده محیط کشت به میزان ۱/۲ گرم در لیتر و کنترل pH در حین فرایند با افزودن ۳ گرم در لیتر استات سدیم به محیط کشت می تواند نقش موثری در تولید سلولز داشته باشند.

واژگان کلیدی: سلولز میکروبی، *استوباکتر زایلینیوم*، بهینه سازی محیط کشت.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۷

(* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروبی شناسی.

پست الکترونیک: f_ashrafi@iau-tnb.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۲۲۰۸۰۹۱۳

مقدمه

فسفات بدون آب و اسیدسیتریک مونو هیدرات تشکیل شده است (۱۶). در مقابل برخی از یافته ها نشان می دهند که جنس هایی مانند *آگروباکتر*، *ازتوباکتر*، *آئروباکتر*، *ریزوبیوم*، *آکالینز*، *سارسینا*، *آکروموباکتر*، *سودوموناس*، *سالمونلا* و *اشریشیا* نیز در شرایط مناسب قادر به تولید سلولز می باشند (۱۷ و ۱۸). گونه هایی مانند *آکروموباکتر اسپانیوس (Achromobacter spanius)*، *سودوموناس لوتیلا (Pseudomonas luteola)* و *سودوموناس دوریفلاوا (Pseudomonas duriflava)* به عنوان گونه های تولید کننده سلولز میکروبی معرفی می شوند (۱۰ و ۱۹).

امروزه کاربردهای متعدد نانو الیاف سلولزی در زمینه های مختلف مانند صنایع غذایی، صنایع کاغذ، محیط زیست و همچنین در پزشکی به عنوان جایگزین رگ های خونی و تهیه پانسمان زخم، پوست مصنوعی، داروهای کاهنده درد، سرم های کاهنده کلسترول، اعضای مصنوعی و مواد آرایشی و بهداشتی (۱۵ و ۲۰) و نیز خسارات جبران ناپذیر و تخریب زیست محیطی با استفاده از منابع گیاهی سلولز به اثبات رسیده است. هدف از این مطالعه، بهینه سازی شرایط محیط کشت HS با استفاده از باکتری *استوباکتر زایلینوم* به منظور تولید بیشتر نانوالیاف سلولز باکتریایی می باشد.

مواد و روش ها

الف) نگهداری سویه ها: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی سویه میکروبی *استوباکتر زایلینوم* PTCC1734 به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران تهیه شد. برای نگهداری طولانی مدت سویه ها (بیش از یک ماه تا دو سال) از محیط کشت HS حاوی ۵۰٪ وزنی گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سلیسیوس استفاده شد.

ب) تهیه مایه تلقیح: برای این منظور، ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت HS تهیه شد. سپس یک ویال از بانک سلولی تهیه شده به آن اضافه گردید. تعلیق سلولی یاد شده در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس و به صورت ایستا به مدت ۲ روز گرما گذاری شد. در صورتی که تعداد سلول های موجود در مایه تلقیح به 3×10^6

سلولز فراوان ترین پلیمر زیستی زمین است که سالیانه حدود ۱۸۰ بیلیون تن از آن تولید می گردد (۱ و ۲). سلولز ترکیب اصلی پیکر گیاهان و بخش اصلی بیومس گیاهی را تشکیل می دهد (۳ و ۴). خالص سازی سلولز حاصل از گیاهان و به دست آوردن سلولزی تمیز و سفید نیازمند اعمال فرآیندهای فیزیکی و شیمیایی مختلف نظیر عملیات سفیدگری است که می تواند بر پیکره سلولز آسیب شدید و جبران ناپذیری وارد نموده و موجب افت ویژگی ذاتی سلولز مانند استحکام و دوام شود (۵).

افزایش جمعیت و افزایش تقاضا در مورد مصرف سلولز، پژوهشگران را بر آن داشته تا از منابع دیگر به دنبال تامین سلولز باشند (۶). در این میان سلولز میکروبی یا باکتریایی یکی از مهم ترین منابعی است که در چند دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۷). سلولز باکتریایی که اولین بار توسط براون (Brown) در سال ۱۸۸۶ کشف شد (۸)، به دلیل ویژگی های بی نظیری مانند تخلخل، جذب آب، شکل پذیری، زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری بالا توجه ها را به خود جلب کرده است (۹). به طور کلی سلولز باکتریایی توسط باکتری های مربوط به دو جنس *استوباکتر (Acetobacter)* و *گلوکونوباکتر (Gluconobacter)* به عنوان بیوفیلم ساخته می شود (۱۰).

موثرترین و مهم ترین باکتری تولید کننده سلولز میکروبی، *استوباکتر زایلینوم (Acetobacter xylinum)* است. این باکتری گرم منفی، هوازی و میله ای شکل است و می تواند ۱۰۸ مولکول گلوکز را به سلولز تبدیل نماید (۱۴-۱۱). برای تولید سلولز از این باکتری ها از محیط کشت معین Hestrin-Schramm استفاده می شود که در طول بیوستنز سلولز، باکتری ترکیبات مختلف محیط را مصرف کرده و زنجیره های خطی بتا را تولید می کند (۱۵). محیط کشت معین به محیطی اطلاق می شود که دارای مقادیر مشخص از عناصر و مواد تشکیل دهنده باشد.

محیط کشت HS از گلوکز، پیتون، عصاره مخمر، دی سدیم

حالت دوم به محیط کشت میزان ۳ گرم در لیتر نیترات آمونیوم، در حالت سوم مقدار ۶ گرم در لیتر نیترات آمونیوم و در حالت چهارم میزان ۹ گرم در لیتر آمونیوم نیترات به محیط کشت اضافه و مراحل قبل انجام گردید.

۴- نیترات سدیم: ابتدا محیط کشت استاندارد HS با میزان پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد تهیه شد. سپس مقدار ۱ گرم در لیتر نیترات سدیم به آن اضافه گردید. پس از استریل و سرد شدن محیط کشت، تلقیح باکتری به آن در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا و گرمادهی به مدت ۷ روز انجام شد. در حالت دوم به محیط کشت میزان ۳ گرم در لیتر نیترات سدیم، در حالت سوم مقدار ۶ گرم در لیتر نیترات سدیم و در حالت چهارم میزان ۹ گرم در لیتر از نیترات سدیم به محیط کشت اضافه و مراحل قبل انجام گردید.

۵- پپتون: ابتدا محیط کشت استاندارد HS با میزان پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد تهیه شد. سپس مقدار ۵ گرم در لیتر پپتون به آن اضافه گردید. پس از استریل و سرد شدن محیط کشت، تلقیح باکتری به آن در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا و گرمادهی به مدت ۷ روز انجام شد. در حالت دوم به محیط کشت میزان ۱۰ گرم در لیتر پپتون، در حالت سوم مقدار ۱۵ گرم در لیتر پپتون و در حالت چهارم میزان ۲۰ گرم در لیتر از پپتون به محیط کشت اضافه و مراحل قبل انجام گردید.

۶- عصاره مخمر: ابتدا محیط کشت استاندارد HS با میزان پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد تهیه شد. سپس مقدار ۵ گرم در لیتر عصاره مخمر به آن اضافه گردید. پس از استریل و سرد شدن محیط کشت، تلقیح باکتری به آن در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا و گرمادهی به مدت ۷ روز انجام شد. در حالت دوم به محیط کشت میزان ۱۰ گرم در لیتر عصاره

برسد می توان از آن به عنوان مایه تلقیح استفاده کرد. سپس از مایه تلقیح با نسبت ۱۰ درصد (حجمی به حجمی) برای تلقیح کشت اصلی استفاده گردید. برای داشتن مایه تلقیح با غلظت سلولی یکسان در تمامی آزمایش ها تعداد سلول های موجود در مایه تلقیح توسط لام نئوبار شمارش شد. لام نئوبار زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰X بررسی و تعداد سلول های موجود شمرده شدند (۲۱).

ج) بررسی منابع مختلف بر پایه محیط کشت HS: به منظور بررسی تاثیر منابع کربنی و نیتروژنی جدید، هر کدام جداگانه در محیط کشت HS افزوده شدند.

۱- منابع کربن: منابع کربن مورد استفاده در این پژوهش شامل گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، ساکاروز، مالتوز، اتانول، متانول، اینوزیتول، گلیسرول، زایلوز و مانیتول (مرک، آلمان) و منابع نیتروژن شامل آمونیوم سولفات، آمونیوم نیترات، سدیم نیترات، پپتون و عصاره مخمر (مرک آلمان) بود.

۲- آمونیوم سولفات: ابتدا محیط کشت استاندارد HS با میزان پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد تهیه شد. سپس مقدار ۱ گرم در لیتر آمونیوم سولفات به آن اضافه گردید. پس از استریل و سرد شدن محیط کشت، تلقیح باکتری به آن در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا و گرمادهی به مدت ۷ روز انجام شد. در حالت دوم به محیط کشت میزان ۳ گرم در لیتر آمونیوم سولفات، در حالت سوم مقدار ۶ گرم در لیتر آمونیوم سولفات و نهایتاً در حالت چهارم میزان ۹ گرم در لیتر از آمونیوم سولفات به محیط کشت اضافه و مراحل قبل انجام گردید.

۳- نیترات آمونیوم: ابتدا محیط کشت استاندارد HS با میزان پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد تهیه شد. سپس مقدار ۱ گرم در لیتر نیترات آمونیوم به آن اضافه گردید. پس از اتوکلاو و سرد شدن محیط کشت، تلقیح باکتری به آن در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا به مدت ۷ روز انجام گرفت. در

زایلینیوم در محیط کشت Hestrin-Schramm رشد داده شد. ترکیب محیط کشت HS شامل پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد بود (۲۲). پس از سترون سازی و سرد شدن محیط کشت، اتانول در شرایط سترون به آن اضافه شد. اتانول از جهش سویه ها جلوگیری می کند. سپس این محیط کشت با مایه تلقیح دو روزه با نسبت حجمی ۱۰ درصد تلقیح شد. محیط کشت ها پس از تلقیح در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا به مدت ۷ روز گرمادهی شدند. پس از گذشت مدت زمان یاد شده سلولز توسط باکتری استوباکتر زایلینیوم در مرز مشترک هوا و محیط کشت تشکیل می گردد. سلولز تشکیل شده خارج گردید و با آب دیونیزه شست و شو داده شد. سپس سلولز باکتریایی شسته شده در سود ۰/۱ مولار به مدت ۹۰ دقیقه به منظور حذف ناخالصی ها و باقیمانده های سلولی جوشیده و مجدداً با آب دیونیزه شست و شو داده شد. در این مرحله وزن تر سلولز با استفاده از ترازوی دیجیتالی محاسبه گردید. سپس صفحات سلولزی در آن ۴۰ درجه سلیسیوس و به مدت ۷۴ ساعت خشک شدند. در آخر وزن خشک سلولز با استفاده از ترازوی دیجیتالی اندازه گیری و ثبت گردید.

ز) بررسی تاثیر زمان کشت بر تولید سلولز: برای بررسی تاثیر زمان بر تولید گلوکز، ابتدا به تعداد روزهای مورد نظر محیط کشت HS استریل با شرایط استاندارد و مشابه تهیه و در انکوباتور با شرایط قبلی قرار داده شد. سپس در هر روز معین، ارلن مربوط به همان روز از انکوباتور خارج شده، کاغذ صافی را وزن کرده و محتویات آن روی کاغذ صافی ریخته شد. پس از خشک شدن، آن را مجدداً توزین نموده و تفاوت وزن ابتدایی و انتهایی به عنوان میزان تولید سلولز میکروبی اعلام گردید (۲۳ و ۲۴).

ح) آزمون های تایید نمونه: به منظور بررسی شاخص کریستالینیتی سلولزهای تشکیل شده از آزمایش پراش اشعه ایکس (XRD) با مشخصات RIGAKU PRINT سری ۲۲۰۰ ولت با ولتاژ ۴۰Kv و ۳۰mA و برای تایید نمونه سلولز تولید

مخمر، در حالت سوم مقدار ۱۵ گرم در لیتر عصاره مخمر و در حالت چهارم میزان ۲۰ گرم در لیتر از عصاره مخمر به محیط کشت اضافه و مراحل قبل انجام گرفت.

د) بررسی اثر ویسکوزیته محیط بر تولید سلولز: برای این منظور از آلژینات سدیم (مرک، آلمان) استفاده شد. این آزمایش در چهار حالت به صورت زیر بررسی گردید

ابتدا محیط کشت استاندارد HS با میزان پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد تهیه شد. سپس مقدار ۰/۴ گرم در لیتر آلژینات سدیم به آن اضافه گردید. در مرحله بعد تمام اجزای درون ارلن، در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سلیسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. پس از استریل و سرد شدن محیط کشت، تلقیح باکتری به آن در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا و گرمادهی به مدت ۷ روز انجام شد. در حالت دوم به محیط کشت میزان ۰/۸ گرم در لیتر آلژینات سدیم، در حالت سوم مقدار ۱/۲ گرم در لیتر آلژینات سدیم و در حالت چهارم میزان ۱/۶ گرم در لیتر از آلژینات سدیم به محیط کشت اضافه و مراحل قبل انجام گردید. ه) تنظیم pH: به منظور جلوگیری از کاهش pH از باز مزدوج اسید استیک یعنی استات سدیم (مرک، آلمان) در محیط کشت در چهار حالت زیر استفاده شد:

ابتدا محیط کشت استاندارد HS با میزان پپتون ۰/۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، اسید سیتریک مونوهیدرات ۰/۱۵ درصد، دی سدیم فسفات بدون آب ۰/۲۷ درصد و D-گلوکز ۲ درصد تهیه شد. سپس مقدار ۱ گرم در لیتر استات سدیم به آن افزوده شد. پس از استریل و سرد شدن محیط کشت، تلقیح باکتری به آن در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس به صورت ایستا و گرمادهی به مدت ۷ روز انجام شد. در حالت دوم به محیط کشت میزان ۳ گرم در لیتر استات سدیم، در حالت سوم مقدار ۶ گرم در لیتر استات سدیم و در حالت چهارم میزان ۹ گرم در لیتر از استات سدیم به محیط کشت اضافه و مراحل قبل انجام گرفت.

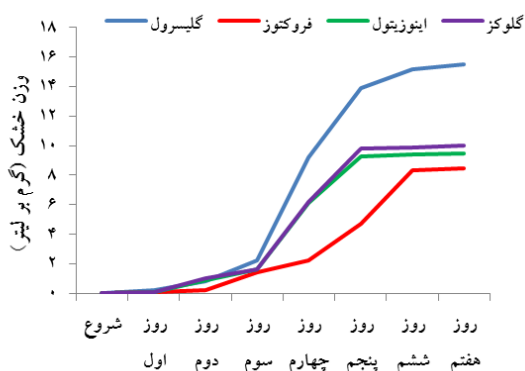
و) روش کشت باکتری استوباکتر زایلینیوم: باکتری استوباکتر

جدول ۱: ارزیابی تولید سلولز با استفاده از منابع کربن مختلف

| منبع کربن | تولید سلولز g/L | pH نهایی |
|-----------|-----------------|----------|
| شاهد | ۲/۲ | ۶/۳ |
| گلوکز | ۱۰ | ۳/۹ |
| گالاکتوز | ۲/۴ | ۵/۱ |
| فروکتوز | ۵/۹ | ۶/۵ |
| لاکتوز | ۲/۲ | ۳/۶ |
| ساکاروز | ۳/۲ | ۷/۵ |
| مالتوز | ۵/۲ | ۱/۶ |
| اتانول | ۵/۲ | ۱/۴ |
| متانول | ۲/۲ | ۳/۶ |
| اینوزیتول | ۵/۸ | ۳/۵ |
| گلیسرول | ۵/۱۵ | ۵/۵ |
| زابلوز | - | - |

مونوساکاریدها پایین تر از مقدار اولیه pH در محیط کشت است. کمترین pH مربوط به محیط دارای گلوکز می باشد. فروکتوز و دی ساکاریدها کاهش pH کمی را فقط در ابتدای گرماگذاری از خود نشان دادند و بازدهی تولید سلولز آنها با سلولز تولید شده از گلوکز نزدیک به دست آمد. در دسته منابع کربن الکلی، اینوزیتول تولید نزدیک به گلوکز و فروکتوز را نشان داد. بالاترین بازده تولید سلولز را گلیسرول بدون افت محسوس در pH در طول فرایند گزارش شد (نمودار ۳).

ه) بررسی منابع مختلف نیتروژن بر تولید سلولز: اثر منابع مختلف نیتروژن شامل آمونیوم سولفات، آمونیوم نترات، سدیم



نمودار ۱: تغییرات وزن خشک سلولز تولیدی در طول دوره کشت برای محیط کشت های گلوکز، فروکتوز، اینوزیتول، گلیسرول.

شده، از تکنیک طیف سنجی مادون قرمز (FTIR) با مشخصات FTIR TENSOR 27 BRUKER استفاده شد. این طیف سنجی امکان بررسی گروه های عاملی و پیش بینی رفتار شیمیایی را فراهم می کند. همچنین ساختار و مورفولوژی سلولز میکروبی تولید شده، با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) با مشخصات HHS-2R در مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که لایه سلولزی خالص و خشک شده توسط لایه ای از طلا به پوشانیده و عکس برداری گردید.

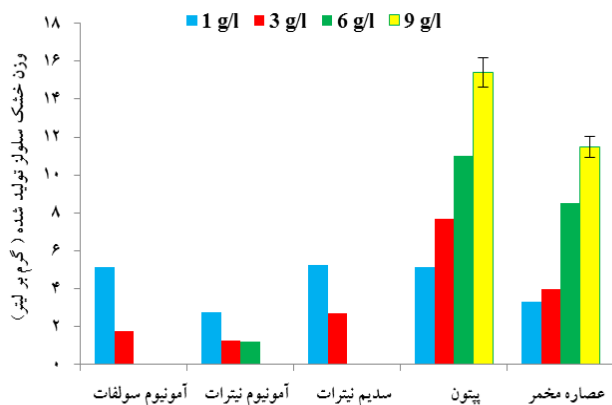
یافته ها

الف) بررسی منابع برتر کربن: از بین ۱۱ منبع مختلف کربن مورد آزمایش، چهار منبع گلیسرول، گلوکز، فروکتوز و اینوزیتول بیشترین تولید سلولز را داشتند. با توجه به این موضوع مراحل بعدی آزمایش ها با منبع کربن، با استفاده از این چهار منبع برتر بررسی شدند (جدول ۱).

ب) تاثیر زمان کشت بر تولید سلولز: بر اساس مشاهدات صورت گرفته، با افزایش روزهای کشت، میزان تولید سلولز باکتریایی ازدیاد پیدا کرده و بهینه ترین حالت آن در روز هفتم کشت گزارش گردید. در این بررسی محیط گلیسرول بالاترین میزان تولید سلولز را نشان می دهد. در این شرایط سه ماده دیگر (گلوکز، اینوزیتول و فروکتوز) تولید مشابهی داشتند که بسیار پایین تر از گلیسرول بود (نمودار ۱). این نتایج نشان می دهد که سلولز تولید شده نتیجه واکنش های بسیار پیچیده است. تغییرات pH در محیط کشت، پیچیدگی واکنش را نشان می دهد.

ج) میزان مصرف منبع کربن: برای این منظور از فرمول $100 \times (\text{غلظت اولیه/غلظت ثانویه})$ استفاده گردید. نتایج این آزمون نشان داد که گلوکز و اینوزیتول تقریباً به طور کامل مصرف شده و تنها حدود ۵ درصد باقی ماندند. اما فروکتوز و گلیسرول در حدود ۵۰ درصد مصرف شده اند (نمودار ۲).

د) بررسی تغییرات pH مقدار pH نهایی محیط های دارای



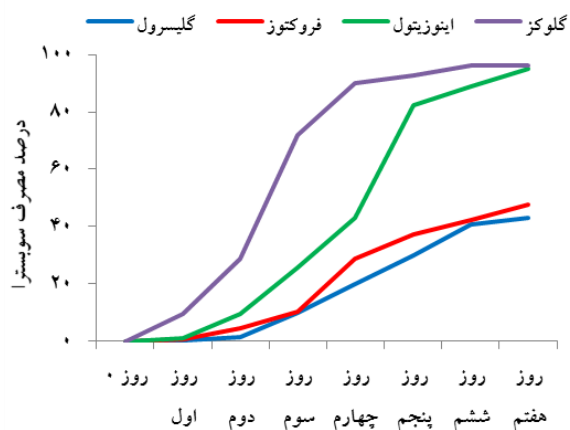
نمودار ۴: ارزیابی تولید سلولز با استفاده از منابع مختلف نیتروژن.

در ادامه با افزودن مقادیر بیشتر استات سدیم افزایش تولید کمتر بود. در نتیجه بهینه ترین حالت استفاده از استات سدیم ۳ گرم در هر لیتر محیط کشت گزارش شد (جدول ۳). افزایش تولید سلولز می تواند ناشی از ثابت ماندن pH در چند روز اول فرایند و تولید سلول های بیشتر باشد که پس از کاهش pH شروع به تولید سلولز می کنند و به دلیل زیاد بودن تعداد آن ها سلولز بیشتری تولید می شود. اما افزایش بیشتر غلظت سدیم استات موجب ثبات بیشتر pH و تولید سلول بیشتر می شود که منابع غذایی را مصرف می کنند و محیط دچار کاهش مواد مغذی جهت تولید سلولز می گردد.

ح) تفرق اشعه ایکس نانوالیاف سلولزی تولید شده: نتایج حاصله از تفرق اشعه X نانوالیاف سلولزی تولید شده با استفاده از چهار منبع برتر کربن نشان داد که بیشترین اندیس کریستالینیتی در محیط گلوکز به اندازه ۸۸ درصد و پس از آن به ترتیب مربوط به محیط فروکتوز ۸۶ درصد، محیط اینوزیتول ۷۸ درصد و محیط گلیسرول ۷۵ درصد می باشد که تفاوت

جدول ۲: بررسی اثر محیط ویسکوز بر تولید سلولز میکروبی

| حالت | g/l | OD= 600 nm | وزن تر (گرم) | وزن خشک (گرم) |
|--------|-----|------------|--------------|---------------|
| حالت ۱ | ۰/۴ | ۰/۲۵۳ | ۲/۴۰ | ۰/۰۸ |
| حالت ۲ | ۰/۸ | ۰/۳۴۳ | ۲/۴۶ | ۰/۰۹ |
| حالت ۳ | ۱/۲ | ۰/۴۷۷ | ۲/۰۹ | ۰/۱۰۱ |
| حالت ۴ | ۱/۶ | ۰/۵۴۶ | ۴/۲۷ | ۰/۱۰۴ |

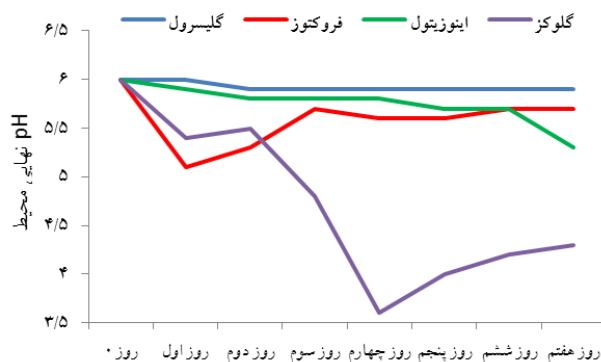


نمودار ۲: مصرف کربن در طول دوره کشت برای محیط کشت های گلوکز، فروکتوز، اینوزیتول، گلیسرول.

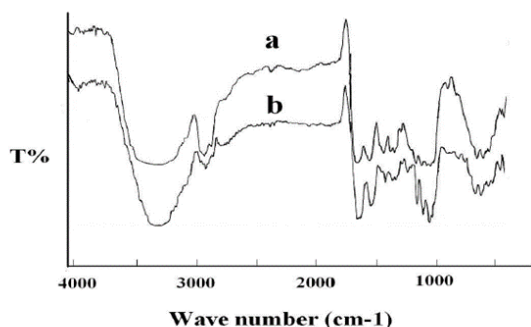
نیترات، پیتون و عصاره مخمر در محیط کشت HS طی ۷ روز مورد بررسی واقع گردید. منابع نیتروژن آلی بر خلاف منابع نیتروژن معدنی تاثیر زیادی در افزایش تولید داشتند. به طوری که بالاترین تولید سلولز در محیط حاوی پیتون مشاهده گردید (نمودار ۴).

و) اثر ویسکوزیته محیط بر تولید سلولز میکروبی: نتایج نشان داد که با افزایش غلظت آلزینات سدیم بالاتر از ۱/۲ گرم بر لیتر، تولید سلولز افزایش ناچیزی پیدا می کند. در نتیجه بهینه ترین حالت استفاده از آلزینات سدیم ۱/۲ گرم در هر لیتر محیط کشت گزارش شد (جدول ۲).

ز) اثر محیط بافری بر تولید سلولز میکروبی: در ابتدا با افزودن استات سدیم تولید سلولز افزایش چشمگیری مشاهده شد، اما



نمودار ۳: تغییرات pH در طول دوره کشت برای محیط کشت های گلوکز، فروکتوز، اینوزیتول، گلیسرول.



نمودار ۶: آزمون FTIR سلولز تولید شده توسط استوباکتری *Zygomycetes* در محیط گلیسرول (a) و گلوکز (b).

سنجی FTIR نمونه های سلولزی در محیط های گلوکز و گلیسرول به گروه های عاملی C-H، C-O و O-H تفسیر و بنابراین گروه های عاملی مختلف سلولز و انواع پیوندها مشخص شدند.

ی) بررسی ریخت شناسی نانوسلولزهای تولید شده: ریخت شناسی نانوسلولزها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد ارزیابی قرار گرفت. با بررسی توسط آن، ساختار نانوفیبریلی سلولزهای میکروبی در محیط کشت های با منابع برتر کربن به خوبی قابل ملاحظه است (شکل ۱). نانو مقیاس بودن ساختار سلولز میکروبی خواص یکتایی به آن در مقایسه با سلولز گیاهی می دهد. سلولز میکروبی به دلیل ساختار نانو مقیاس توانایی بالایی در جذب آب داشته و از استحکام مکانیکی بسیار بالایی نیز برخوردار بود.

بحث

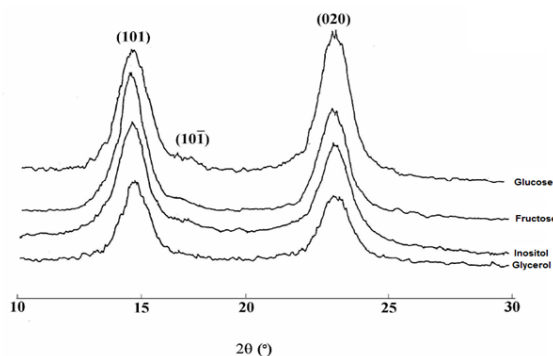
امروزه با توجه به سرعت رشد نیازهای جوامع بشری به سلولز و همچنین تخریب فراوان محیط زیست و خسارات جبران ناپذیر ناشی از آن، از فعالیت گیاهان در این زمینه کاسته شده است. بنابراین یافتن راه های جایگزین تامین سلولز مورد نیاز، قابل توجه قرار گرفته است. تولید سلولز از میکروارگانیسم ها یکی از راه های تامین این ماده حیاتی است که طی سال های اخیر به طور چشمگیری در حال بررسی می باشد. به طور کلی شکل گیری لایه سلولزی به وسیله باکتری/استوباکتری *Zygomycetes* بدین صورت می باشد که ابتدا مولکولهای مفرد گلوکز به

جدول ۳: بررسی اثر محیط بافری بر تولید سلولز میکروبی با استات سدیم

| حالت | g/l | OD= 600 nm | وزن تر(گرم) | وزن خشک (گرم) |
|--------|-----|------------|-------------|---------------|
| حالت ۱ | ۱ | ۰/۱۱۵ | ۳/۸۸ | ۰/۰۵۸ |
| حالت ۲ | ۳ | ۰/۱۵۱ | ۵/۰۵ | ۰/۰۹۸ |
| حالت ۳ | ۶ | ۰/۱۷۶ | ۵/۶۵ | ۰/۱۰۲ |
| حالت ۴ | ۹ | ۰/۱۷۹ | ۶/۴۹ | ۰/۱۲۶ |

ناچیزی است. با مقایسه پراش اشعه ایکس سلولز های تولید شده در هر چهار محیط کشت الگوهای یکسانی مشاهده گردید (نمودار ۵). همچنین تفاوت های زیادی در ساختار بلوری در میان هگوز ها وجود نداشت. محیط های هگوز دارای بهترین شاخص بلوری بودن در میان منابع دیگر کربن هستند.

ط) بررسی سلولزهای تولید شده با روش طیف سنجی FTIR: مقدار و شدت جذب طیف فروسرخ حاصل از FTIR پیوندهای یک ماده، منحصر به فرد است. در نتیجه طیف سنجی حاضر این امکان را فراهم می آورد تا اطمینان حاصل شود که بیوپلیمر حاصله، حتماً سلولز است. در نمودار ۶ جذب نمونه های لایه سلولز باکتریایی تهیه شده مربوط به منابع گلوکز و گلیسرول در عددهای موجی 4000 تا 500 cm^{-1} را نشان داده شده است. با مقایسه نمودار به دست آمده با سایر نمودارهای سلولزی مشابه در پژوهش های گذشته و همچنین تطابق دو طیف مخصوص به گلوکز و گلیسرول، مشخص شد که لایه های تولید شده در این پژوهش سلولز باکتریایی می باشد. با استفاده از نرم افزار IRPal2 نتایج عدد موجی حاصل از پیک های طیف



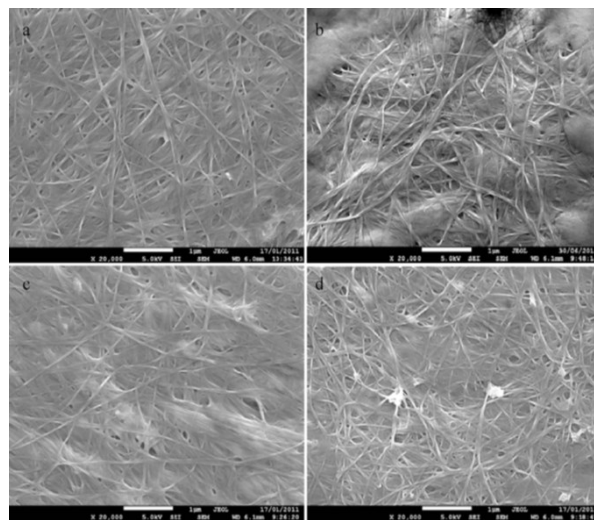
نمودار ۵: پراش اشعه ایکس سلولز تولید شده توسط استوباکتری *Zygomycetes* (از بالا به پایین: گلوکز، فروکتوز، اینوزیتول، گلیسرول).

سلولز باکتریایی گزارش شده که در آن کازئین هیدرولیز شده توانست تا ۵ گرم در لیتر و پیتون تا ۸/۴ گرم در لیتر تولید سلولز با استفاده از استویاکتر زایلینیوم را افزایش دهد (۲۶).

همچنین اثر غلظت های مختلف عصاره مخمر بر روی رشد سلول و تولید سلولز در محیط های کشت در محدوده ۵ تا ۶۰ گرم در لیتر بررسی و بیشینه ۶/۷ گرم در لیتر سلولز گزارش شده است (۲۷). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در محیط حاوی پیتون نسبت به عصاره مخمر تا حدود ۲۵ درصد افزایش تولید بیشتری را به دنبال دارد. تولید به دست آمده از پیتون حدود ۱۵ گرم بر لیتر بود که نسبت به مقادیری که تا کنون گزارش شده، بیشتر است. اما هزینه محیط کشت را بالا می برد، چرا که سایر منابع نیتروژن صنعتی نیز موجود هستند و از نظر اقتصادی عصاره مخمر انتخاب بهتری می باشد.

در راستای کاهش هزینه، منابع مختلف کربن نیز بررسی شد و مشاهده گردید با استفاده از گلیسرول به عنوان منبع کربن و مقادیر بسیار کمتر پیتون، همچنان تولید ۱۵ گرم بر لیتر مشاهده می شود. در این پژوهش مصرف منبع کربن در طول دوره کشت برای محیط کشت های برتر کربن که شامل گلوکز، فروکتوز، اینوزیتول و گلیسرول بودند، با غلظت اولیه برابر بررسی شد. مشاهده گردید که گلوکز و اینوزیتول تقریباً به طور کامل مصرف شده اما فروکتوز و گلیسرول در حدود ۴۵ درصد مصرف شده اند. بیشترین تولید سلولز به ترتیب در محیط های گلیسرول، گلوکز، فروکتوز و اینوزیتول به دست آمد. اثر غلظت اولیه گلوکز روی تولید سلولز مهم است. زیرا تشکیل گلوکونیک اسید به عنوان یک محصول جانبی سبب کاهش pH محیط کشت و در نهایت کاهش تولید سلولز می شود (۲۸).

کیشک (Keshk) و همکاران میزان تولید سلولز در غلظت های اولیه گلوکز با ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ گرم در لیتر مطالعه و مصرف گلوکز را به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۶۸ و ۲۸ درصد غلظت اولیه گزارش نمودند (۲۹). در تحقیق حاضر، میزان تولید در گلوکز و فروکتوز و اینوزیتول به هم نزدیک بود، اما تولید در محیط واجد گلیسرول به طور چشمگیری بالاتر بود. بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش بهینه ترین شرایط برای منبع کربن



شکل ۱: تصاویر SEM از لایه سلولز تولید شده در محیط کشت a: گلوکز، b: گلیسرول، c: فروکتوز، d: اینوزیتول.

زنجیره های خطی گلوکان پلیمریزه شده و سپس زنجیره های ایجاد شده به خارج سلول ترشح می شوند. زنجیره های گلوکان به هم پیوسته و کریستالی شده و با در کنار هم قرار گرفتن زنجیره ها به صورت نواری شکل در می آیند. در آخر ریبون های سلولزی در کنار هم تجمع کرده و یک شبکه سه بعدی در سطح محیط کشت ایجاد می نمایند (۲۵).

در این مطالعه به منظور به دست آوردن شرایط بهینه محیط کشت HS جهت تولید سلولز میکروبی، تاثیر چهار عامل منبع کربن، منبع نیتروژن، ویسکوزیته محیط و pH مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس این نتایج شرایط بهینه با استفاده از منبع کربن گلیسرول، منبع نیتروژن پیتون، آلزینات سدیم به عنوان افزایش دهنده ویسکوزیته با غلظت ۱/۲ گرم در هر لیتر محیط کشت HS و همچنین استات سدیم با غلظت ۳ گرم در هر لیتر محیط کشت HS به دست آمد.

در این پژوهش، منابع نیتروژن آلی و غیر آلی در غلظت های مختلف بررسی شد. منابع نیتروژن معدنی تاثیر زیادی در تولید سلولز نداشتند و در مواردی با غلظت های مشخص، رشد مشاهده نشد. اما منابع نیتروژن آلی تاثیر زیادی در افزایش تولید داشتند و بالاترین تولید در محیط حاوی پیتون مشاهده شد.

از آن جایی که نیتروژن ترکیب اصلی پروتئین های ضروری در متابولیسم سلولی است، اثر برخی منابع نیتروژنی بر روی تولید

منظور نفوذ یا پخش گلوکز در مرحله رشد لایه سلولزی طراحی کردند. این مدل تایید نمود که افزایش در مقاومت نفوذ یا پخش، قابل ملاحظه و برجسته است. اما عوامل دیگر نیز باید در نظر گرفته شود. بدین ترتیب مشاهده نمودند که رشد سلولز در ارتباط با دیواره ظرف می باشد و به سمت بخش های پایین در داخل محیط کشت با گذشت زمان در ارتباط است. از این رو محققین یاد شده تماس دیواره ای را در حالت های مختلف انجام دادند و نشان دادند که تماس دیواره با تولید سلولز متناسب است و موجب افزایش تولید سلولز می شود (۳۲).

نتایج حاصل از این پژوهش در مورد تأثیر ویسکوزیته محیط، به دلیل وجود حالتی مشابه حضور دیواره در محیط کشت بوده که در تولید سلولز اثر مثبت داشت. در مطالعه دیگر بایه (Bae) و همکاران گزارش کردند که تولید سلولز باکتریایی در محیط کشتی که آگار به آن افزوده شده باشد، بیشتر می شود و نشان دادند که میزان سلولز باکتریایی در محیط کشت حاوی ۰/۴٪ آگار از ۸ به ۱۲/۸ گرم بر لیتر افزایش پیدا نمود (۳۱).

از آنجایی که آلزینات سدیم یک پلی ساکارید خطی و کopolیمر ارزان، در دسترس و محلول در آب می باشد که بر اثر حل شدن در آب، مایعی با ویسکوزیته بالا حاصل می شود، در این پژوهش از آلزینات سدیم به عنوان افزایش دهنده ویسکوزیته استفاده گردید.

پس از انجام آزمون مشاهده شد که افزودن آلزینات سدیم به محیط کشت تا غلظت ۱/۲ g/l می تواند تولید سلولز را تا حدود ۳۰ درصد نسبت به محیط بدون آلزینات سدیم افزایش دهد. این یافته با نتایج پژوهش های مشابه یادشده، هم خوانی داشت. این مساله ارتباط مستقیم تولید با ویسکوزیته را نشان می دهد. بنابراین افزایش تولید سلولز می تواند ناشی از ویسکوز شدن محیط کشت باشد که به عنوان پایه برای تشکیل سلولز توسط باکتری استفاده می شود. بهینه ترین حالت استفاده از غلظت ۱/۲ گرم در هر لیتر آلزینات سدیم بود. همچنین دلیل کاهش تولید سلولز با افزودن بیشتر آلزینات سدیم و افزایش ویسکوزیته را می توان به کاهش انتقال جرم در اثر افزایش

گلیسرول معرفی می شود، زیرا نسبت به بقیه منابع کربن مورد آزمایش حدود ۳۵ درصد تولید بیشتری را نشان داد.

pH محیط کشت برای تولید سلولز باکتریایی در محدوده بین ۶-۴ می باشد و میزان محصول سلولز در pH پایین تر از ۴ کاهش می یابد. در فرایند تولید تخمیری سلولز به دلیل تجمع اسیدهای گلوکونیک، استیک یا لاکتیک در محیط کشت، pH مایع کاهش می یابد. بنابراین کنترل pH در محدوده بهینه مهم است. یکی از روش های کنترل pH در محدوده مناسب، ایجاد ویژگی بافری در آن محدوده است (۳۰).

بایه (Bae) و همکاران از شربت ذرت خیسانده (CSL) به عنوان ماده دارای ظرفیت بافری استفاده کردند که شامل انواع مواد یا ترکیبات بافری می باشد. آنها محیط فروکتوز - CSL را به کار بردند و نیز pH را در محدوده بهینه حفظ کردند و توانستند سلولز بیشتری نسبت به قبل تولید کنند (۳۱). اما این افزایش رشد نمی تواند دقیقاً بر اثر عامل pH باشد. چرا که CSL در عمل دارای منابع غنی نیتروژن است و احتمال اثر مثبت منبع نیتروژن هم بر این افزایش رشد وجود دارد.

بنابراین در پژوهش حاضر، از آن جایی که در حین فرایند، یکی از اسیدهای تولید شده اسید استیک است که توسط باکتری تولید می شود، به منظور جلوگیری از کاهش pH از باز مزدوج اسید استیک یعنی استات سدیم به عنوان بافر در محیط کشت استفاده شد. با انجام این کار و ایجاد خاصیت بافری در محیط کشت با استفاده از استات سدیم، تولید نسبت به حالت بدون بافر استات سدیم به میزان ۵۰ درصد افزایش یافت.

همچنین بیشترین کاهش pH در محیط کشت حاوی گلوکز اتفاق افتاد. دلیل این امر می تواند تولید گلوکونیک اسید علاوه بر استیک اسید در محیط کشت باشد. اما در محیط های گلیسرول و فروکتوز کاهش بسیار ناچیزی در pH به دست آمد. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، بهینه ترین حالت استفاده از بافر ۳ گرم در لیتر استات سدیم در محیط کشت بود. هورنیونگ (Hornung) و همکاران اثر سرعت انتقال جرم سوپسترا بر روی رشد باکتری ها، تشکیل سلولز و مصرف سوپسترا را بررسی کردند. محققین یاد شده یک مدل پایه به

ترتیب دارای بیشترین تولید سلولز هستند. منابع نیتروژنی آلی پیتون و عصاره مخمر همچنین آلزینات سدیم به عنوان افزایش دهنده ویسکوزیته با غلظت ۱/۲ گرم در هر لیتر محیط کشت و استات سدیم به عنوان بافر با غلظت ۳ گرم در هر لیتر محیط کشت معرفی می شوند. بنابراین با در دست داشتن این چند عامل اساسی شرایط محیط کشت HS، می توان تولید سلولز میکروبی را افزایش داد. همچنین پیشنهاد می شود که تولید سلولز میکروبی با استفاده از منابع کربن و نیتروژن دیگر و جایگزینی منابع کربن و نیتروژن با گریدهای صنعتی به منظور کاهش هزینه تولید، محیط های کشت ارزان تر و همچنین سوبه های موتانت و نوترکیب به منظور افزایش راندمان تولید سلولز میکروبی از حیث مولکولی بررسی شوند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد با عنوان بهینه سازی محیط کشت HS به منظور تولید نانوالیاف سلولز میکروبی با استفاده از باکتری *استوباکتر زایلینیوم* مصوب ۲/۱۲/۹۵ دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می باشد. بدین وسیله از مساعدت تمامی دوستان که در تهیه این مقاله شرکت داشته اند تقدیر و تشکر به عمل می آید.

ویسکوزیته نسبت داد. چرا که در این شرایط مواد مغذی با سرعت کمتری در اختیار باکتری قرار می گیرند و در نتیجه سرعت تولید سلولز کاهش می یابد. با اینکه پژوهش حاضر با استفاده از باکتری *استوباکتر زایلینیوم* به عنوان مهمترین و پر بازده ترین باکتری تولید کننده سلولز میکروبی انجام گردید. اما میکروارگانیزم های دیگری نیز پتانسیل تولید سلولز باکتریایی را دارند و جداسازی و کشت آن ها در حال حاضر انجام پذیر است (۱۵ و ۱۶). تمامی نتایج به دست آمده از این پژوهش در کنار ویژگی های منحصر به فرد سلولز میکروبی می تواند آینده بسیار روشنی را برای تولید این ماده حیاتی ارزان قیمت در مقیاس صنعتی با کاربردهای ویژه و متنوع پیش بینی نماید.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که انجام روش های طراحی آزمون به منظور دستیابی به شرایط بهینه محیط کشت HS و کاهش هزینه های تولید سلولز میکروبی، در مقیاس صنعتی انجام پذیر می باشد. بر این اساس، با نتایج حاصله، شرایط بهینه محیط کشت HS، چهار منبع کربن گلیسرول، گلوکز، فروکتوز و اینوزیتول که به

References:

1. Huang Y, Zhu C, Yang J, Nie Y, Chen C, Sun D. Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose*. 2014; 21(1): 1-30.
2. Kurosumi A, Sasaki C, Yamashita Y, Nakamura Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydr Polym*. 2009; 76(2): 333-335.
3. Jarvis MC. Structure of native cellulose microfibrils, the starting point for nanocellulose manufacture. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2018; 376(2112). pii: 20170045.
4. Mondragon G, Fernandes S, Retegi A, Peña C, Algar I, Eceiza A, Arbelaiz A. A common strategy to extracting cellulose nanoentities from different plants. *Ind Crops Prod*. 2014; 55: 140-148.
5. Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005; 44(22): 3358-3393.
6. Eichhorn SJ, Dufresne A, Aranguren M, Marcovich NE, Capadona JR, Rowan SJ, Weder C,

- Thielemans W, Roman M, Renneckar S, Gindl W. Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *J Mater Sci*. 2010; 45(1): 1.
7. Esa F, Tasirin SM, Rahman NA. Overview of bacterial cellulose production and application. *Agric Agric Sci Proc*. 2014; 2: 113-119.
 8. Brown AJ. XLIII. on an acetic ferment which forms cellulose. *J Chem Soc Trans*. 1886; 49: 432-439.
 9. Mohite BV, Patil SV. Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. *Carbohydr polym*. 2014; 106: 132-141.
 10. Li S, Huang D, Zhang B, Xu X, Wang M, Yang G, Shen Y. Flexible supercapacitors based on bacterial cellulose paper electrodes. *Adv Energy Mater*. 2014; 4:1.
 11. Meftahi A, Khajavi R, Rashidi A, Sattari M, Yazdanshenas ME, Torabi M. The effects of cotton gauze coating with microbial cellulose. *Cellulose*. 2010; 17(1): 199-204. [In Persian]
 12. Cai Z, Kim J. Bacterial cellulose/poly (ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility. *Cellulose*. 2010; 17(1): 83-91.
 13. Lestari P, Elfrida N, Suryani A, Suryadi Y. Study on the production of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* using agro-waste. *Jordan J Biol Sci*. 2014; 7(1): 75-80.
 14. Mohammad SM, Rahman NA, Khalil MS, Abdullah SR. An overview of biocellulose production using *Acetobacter xylinum* culture. *Adv Biol Res*. 2014; 8(6): 307-313.
 15. Keshk SM. Bacterial cellulose production and its industrial applications. *J Bioprocess Biotech*. 2014; 4(2): 1.
 16. Kiziltas EE, Kiziltas A, Gardner DJ. Bacterial cellulose production and its industrial applications extracted wood sugars. *Carbohydr Polym*. 2015; 124: 131-138.
 17. Bellamy WD. Single cell proteins from cellulosic wastes. *Biotechnol Bioeng*. 1974; 16(7): 869-880.
 18. Moosavi-Nasab M, Yousefi A. Biotechnological production of cellulose by *Gluconacetobacter xylinus* from agricultural waste. *Iran J Biotechnol*. 2011; 9(2): 94-101. [In Persian]
 19. Purali P, Yahyaei B, Ajoudanifar H, Taheri R, Alavi H, Hoseini A. Impregnation of the bacterial cellulose membrane with biologically produced silver nanoparticles. *Curr Microbiol*. 2014; 69(6): 785-793.
 20. Shi Z, Zhang Y, Phillips GO, Yang G. Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*. 2014; 35: 539-545.
 21. Gunduz G, Erbas Kiziltas E, Kiziltas A, Gencer A, Aydemir D, Asik N. Production of bacterial cellulose fibers in the presence of effective microorganism. *J Nat Fibers*. 2018; 21: 1-9.
 22. Emtiazi G, Jalili Tabaii M. Comparison of bacterial cellulose production among different strains and fermented media. *Appl Food Biotechnol*. 2016; 3(1): 35-41. [In Persian]
 23. Czaja W, Romanovicz D, Malcolm Brown R. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture. *Cellulose*. 2004; 11(3-4): 403-411.

24. Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jeziarska A, Gonçalves-Miśkiewicz M, Turkiewicz M, Bielecki S. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J Ind Microbial Biotechnol.* 2002; 29(4): 189-195.
25. Lee KY, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A. More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromol Biosc.* 2014; 14(1): 10-32.
26. Son HJ, Kim HG, Kim KK, Kim HS, Kim YG, Lee SJ. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresour. Technol.* 2003; 86(3): 215-219.
27. Moon SH, Park JM, Chun HY, Kim SJ. Comparisons of physical properties of bacterial celluloses produced in different culture conditions using saccharified food wastes. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2006; 11(1): 26.
28. Li Z, Wang L, Hua J, Jia S, Zhang J, Liu H. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. *Carbohydr Polym.* 2015; 120: 115-119.
29. Keshk S, Sameshima K. The utilization of sugar cane molasses with/without the presence of lignosulfonate for the production of bacterial cellulose. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 72(2): 291.
30. Gindl W, Keckes J. Tensile properties of cellulose acetate butyrate composites reinforced with bacterial cellulose. *Compos Sci Technol.* 2004; 64(15): 2407-2413.
31. Bae S, Shoda M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. *Biotechnol Prog.* 2004; 20(5): 1366-1371.
32. Hornung M, Ludwig M, Schmauder HP. Optimizing the production of bacterial cellulose in surface culture: A novel aerosol bioreactor working on a fed batch principle (Part 3). *Eng Life Sci.* 2007; 7(1): 35-41.



Optimizing the HS medium for the production of microbial cellulose nanofibers using *Acetobacter xylinum*

Fatemeh Nouri Rouzbahani¹, Fatemeh Ashrafi², Soheila Moradi Bidhendi³

¹M.Sc., Department of cellular and molecular Biology, Faculty of sciences, Islamic Azad University, Tehran North branch, Tehran, Iran, ² Assistant Professor, Department Microbiology, Faculty of sciences, Islamic Azad University, Tehran North branch, Tehran, Iran, ³ Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Bacterial cellulose synthesized by some microorganisms, including *Acetobacter xylinum*, has been widely used in various industries due to its specific properties. The purpose of this study was to optimize the cultivation condition for the production of microbial cellulose in a new culture medium.

Materials & Methods: In this experimental study, new sources of carbon and nitrogen were added to the Hestrin-Schramm medium, containing *A. xylinum*, and incubated for 7 days under static conditions. Carbon sources included glucose, galactose, fructose, lactose, sucrose, maltose, ethanol, methanol, inositol, glycerol, xylose, and mannitol and nitrogen sources included ammonium sulfate, ammonium nitrate, sodium nitrate (1, 3, 6, 9 g/l HS medium), peptone and yeast extract (5, 10, 15, 20 g/l HS medium). Sodium alginate and sodium acetate were used to investigate the viscosity effect and to adjust the medium pH. Scanning electron microscopy, X-ray diffraction, and FTIR spectroscopy technique were used in order to confirm the cellulose production. Sodium alginate and sodium acetate were used to investigate the viscosity effect and determine the pH adjustment. Scanning electron microscope, X-ray diffraction and FTIR spectroscopy technique were used in order to confirm the cellulose production.

Results: Four carbon sources including glycerol (without a significant drop in pH), glucose, fructose, and inositol produced the highest amount of cellulose, respectively. Organic nitrogen sources, particularly peptone, had a great impact on cellulose production, unlike mineral nitrogen sources. The optimum amount of sodium alginate as the viscosity agent and sodium acetate as the buffer was 1.2 and 3 gram per liter of culture medium, respectively. X-ray diffraction showed the highest crystallinity index in medium containing glucose, fructose, inositol, and glycerol, respectively. The amount and intensity of infrared absorption in FTIR scanning of the products of culture media containing glucose and glycerol and comparing them with other similar cellulose graphs confirmed the cellulose production. Furthermore, Scanning Electron Microscopy studies clearly showed a nanofiber structure of microbial cellulose in media with better carbon sources.

Conclusion: According to our findings, glycerol and peptone have the most impact on microbial cellulose production. It was also indicated that addition of 2.1 g/ L sodium alginate to the culture medium as the viscosity agent along with pH control during the process by adding 3 g/ L sodium acetate can have a significant effect on cellulose production.

Keywords: Microbial cellulose, *Acetobacter xylinum*, Optimization of culture medium.

Correspondence to: Fatemeh Ashrafi

Tel: +98 9122080913

E-mail: f_ashrafi@iau-tnb.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 11(4): 340-352.