**بهینه‌سازی تولید زیست توده زنده باکتری Cupriavidus necator ATCC17699 با استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ با طراحی شرایط کشت: بررسی روش‌های تک‌متغیره و چندمتغیره**

**ندا شعاعی پرچین****1**

**معصومه بحرینی2**

**سید محمود موسوی3**

1. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد (مسئول)

2. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

3. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه فردوسی مشهد

**چکیده**

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوآت‌ها پلی‌استر‌های زیستی هستند که 100% تخریب‌پذیر بوده و ویژگی‌هایی مشابه پلاستیک‌های رایج از خود نشان می‌دهند. تولید این پلی‌‌استرها در باکتری در فاز سکون انجام می‌شود. افزایش هرچه بیشتر توده‌ی باکتری در فاز لگاریتمی زمینه‌ساز تولید هرچه بیشتر پلیمر در فاز سکون خواهد بود. در این پژوهش، باکتری *Cupriavidus necator ATCC17699* و گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ به عنوان منبع کربن ارزان‌قیمت، مورد استفاده قرار گرفت. بهینه‌سازی تک‌متغیره و چند‌متغیره به روش سطح‌پاسخ روی فاکتورهای غلظت گلوکز، نسبت نیتروژن به کربن (N:C)، نوع منبع نیتروژن (اوره، عصاره‌ی مخمر، آمونیوم سولفات و آمونیوم نیترات) و pH اولیه‌ی محیط کشت به منظور دست‌یابی به بالاترین توده‌ی زنده انجام گرفت. جذب سوسپانسیون باکتری در nm600، جرم خشک توده‌ی سلولی و شمارش سلولی زنده (تعداد سلول در میلی‌لیتر) به منظور بررسی میزان تولید توده انجام شد. در بررسی تک‌متغیره 6pH=، 5/0=N:C، غلظت گلوکز 30 گرم بر لیتر و منبع نیتروژن عصاره‌ی مخمر بهترین نتیجه‌ی کلی را شامل جذب 76/5، جرم خشک g/l 46/9 و CFU=1E10 با استفاده از گلوکز خالص نشان دادند. بهینه‌سازی چند‌متغیره نیز با تأیید نسبی نتایج تک‌متغیره بیشترین میزان تولید توده را در 5/0N:C=، 6=pH، غلظت گلوکز g/l 33/33 و منبع نیتروژن عصاره‌ی مخمر پیش‌بینی کرد. بالاترین میزان توده‌ی تولیدی بعد از تمامی مراحل بهینه‌سازی، جرم خشک g/l 49/10، جذب 34/6 و CFU=1.33E10 با استفاده از گلوکز خالص و جذب 03/6، جرم خشک سلولی g/l 34/10 و CFU=1.2E10 با استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ بود که به ترتیب 99% و 95% مشابهت با مقادیر پیش‌بینی‌شده نشان دادند.

**كلمات كليدي:** *Cupriavidus* *necator*، تولید زیست‌توده، تجزیه آنزیمی کاغذ، طراحی چندمتغیره، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات (PHA)

# مقدمه

در سال‌های اخیر، به دلیل نگرانی‌های روزافزون زیست‌محیطی و محدودیت منابع فسیلی، تلاش‌های گسترده‌ای در راستای تولید زیستی پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر به‌عنوان جایگزینی پایدار برای پلاستیک‌های سنتزی انجام شده است (Chen & Patel, 2012; Sudesh et al., 2000). در این میان، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs) به‌عنوان دسته‌ای از پلیمرهای زیستی با قابلیت تجزیه در محیط، زیست‌سازگاری بالا و خواص فیزیکی مطلوب، جایگاه ویژه‌ای در صنایع مختلف از جمله بسته‌بندی، پزشکی و داروسازی یافته‌اند (Philip et al., 2007). این پلیمرها به‌صورت دانه‌های ذخیره‌ای درون‌سلولی توسط انواع مختلفی از باکتری‌ها تولید می‌شوند و می‌توانند به‌عنوان منابع ذخیره‌ای انرژی و کربن در شرایط نامساعد رشد عمل کنند (Koller et al., 2010; Steinbüchel & Füchtenbusch, 1998).

یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های مدل برای تولید PHAs، باکتری *Cupriavidus necator (*که پیش‌تر با نام‌های *Ralstonia eutropha* و *Alcaligenes eutrophus* شناخته می‌شد) است. این باکتری گرم‌منفی، هوازی و دارای رشد سریع، توانایی تولید مقادیر زیادی از PHA، به‌ویژه پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB)، را دارد و به همین دلیل به‌طور گسترده‌ای در پژوهش‌های زیست‌فناوری و صنایع زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Choi & Lee, 1999; Koller et al., 2010).

*C. necator* قادر است از طیف وسیعی از منابع کربنی مانند گلوکز، اسیدهای چرب، الکل‌ها و حتی گاز دی‌اکسید کربن به‌عنوان سوبسترا برای رشد و تولید PHA بهره‌برداری کند (Choi & Lee, 1999). این انعطاف‌پذیری در مصرف سوبسترا باعث شده است که این باکتری یکی از مهم‌ترین گزینه‌ها برای تولید صنعتی پلیمرهای زیستی محسوب شود (Choi & Lee, 1999).

با این حال، یکی از مهم‌ترین چالش‌ها در مسیر تجاری‌سازی تولید PHAs، هزینه‌ی بالای تولید زیست‌توده و پلیمر است (Khanna & Srivastava, 2005). از آنجا که تولید PHA به‌صورت درون‌سلولی انجام می‌شود، ابتدا نیاز به انباشت توده سلولی بالا در شرایط مطلوب رشد وجود دارد. هرچه توده‌ی سلولی بیشتری تولید شود، پتانسیل تولید بیشتر پلیمر نیز افزایش می‌یابد. بنابراین، بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری برای تولید حداکثری زیست‌توده، نخستین گام کلیدی در فرآیند تولید صنعتی PHA است. این امر نه تنها بهره‌وری نهایی را افزایش می‌دهد، بلکه با کاهش هزینه‌های فرآیند تخمیر، نقش مهمی در اقتصادی‌سازی این فناوری ایفا می‌کند (Chanprateep, 2010).

طراحی یک محیط کشت بهینه برای رشد*C. necator* نیازمند درک دقیق از نیازهای تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی این باکتری است. عواملی مانند نوع و غلظت منبع کربن، نسبت عناصر کربن به نیتروژن (C/N ratio)، pH، دما، میزان تلقیح اولیه، تهویه و سرعت هم‌زن از جمله مهم‌ترین پارامترهایی هستند که بر رشد این میکروارگانیسم اثرگذارند (Chanprateep, 2010).

در سال‌های گذشته، روش‌های مختلفی برای بهینه‌سازی محیط‌های کشت مورد استفاده قرار گرفته‌اند. روش سنتی تک‌متغیره (One-Variable-at-a-Time, OVAT) یکی از ابتدایی‌ترین و درعین‌حال رایج‌ترین روش‌هاست که در آن تنها یک عامل در هر مرحله تغییر داده می‌شود، در حالی که سایر عوامل ثابت نگه داشته می‌شوند. با وجود سادگی این روش، بزرگ‌ترین نقطه‌ضعف آن ناتوانی در شناسایی اثرات متقابل بین عوامل مختلف است، به‌طوری‌که ممکن است ترکیباتی از عوامل که منجر به بهترین نتیجه می‌شوند، در این روش شناسایی نشوند (Montgomery, 2017).

برای رفع این محدودیت، در سال‌های اخیر روش‌های آماری پیشرفته‌تری توسعه یافته‌اند که به‌عنوان روش‌های بهینه‌سازی چندمتغیره شناخته می‌شوند. از جمله این روش‌ها می‌توان به طراحی‌های سطح پاسخ (Response Surface Methodology, RSM) اشاره کرد که توانایی تحلیل تأثیرات متقابل عوامل مختلف و یافتن نقطه بهینه را با دقت بالایی دارند (Myers et al., 2016). در میان طراحی‌های آماری RSM، طرح Box-Behnken یکی از کاراترین و متداول‌ترین روش‌هاست که با تعداد آزمایش‌های کمتر نسبت به طرح‌های دیگر، امکان تحلیل دقیق و مدل‌سازی ریاضی شرایط فرآیند را فراهم می‌آورد (Ferreira et al., 2007). استفاده از این روش در طراحی محیط کشت، با بررسی هم‌زمان اثر چندین عامل کلیدی، موجب افزایش چشمگیر در کارایی رشد و تولید می‌شود (Ferreira et al., 2007).

در مطالعات گذشته نیز به دفعات اثربخشی این روش‌ها در بهینه‌سازی تولید زیستی پلیمرها توسط*C. necator* نشان داده شده است. به‌عنوان مثال، در تحقیقات مختلف استفاده از منابع کربنی متنوع، از جمله گلوکز، روغن‌های گیاهی و گلیسرول، در ترکیب با تنظیم مناسب شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت، موجب افزایش معنادار توده سلولی و در نتیجه تولید PHA گردیده است (Khosravi-Darani et al., 2013; Obruca et al., 2010). همچنین گزارش‌هایی مبنی بر کاربرد موفق RSM در بهینه‌سازی پارامترهایی مانند pH، دما، هوادهی و غلظت مواد مغذی برای سویه‌های مختلف*C. necator* موجود است که همگی بر اهمیت طراحی دقیق و علمی محیط کشت در این زمینه تأکید دارند (Khosravi-Darani et al., 2013).

با توجه به اهمیت مرحله‌ی رشد در فرایند تولید پلیمرهای زیستی و نقش حیاتی طراحی محیط کشت در افزایش بازده زیست‌توده، هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر عوامل کلیدی محیطی و تغذیه‌ای بر رشد باکتری *Cupriavidus necator* و بهینه‌سازی آن با بهره‌گیری از دو رویکرد تک‌متغیره و چندمتغیره است. در این پژوهش، ابتدا با استفاده از روش تک‌متغیره، اثر جداگانه‌ی هر یک از عوامل بررسی شده و سپس در مرحله‌ی دوم، با طراحی Box-Behnken به‌عنوان یکی از طراحی‌های سطح پاسخ، شرایط بهینه برای بیشینه‌سازی توده سلولی تعیین گردیده است. انتظار می‌رود یافته‌های این پژوهش به درک بهتر از عوامل مؤثر در رشد*C. necator* منجر شده و گامی مؤثر در جهت تولید اقتصادی و پایدار پلیمرهای زیستی باشد.

# مواد و روش‌ها

## گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ

گلوکوز مورد استفاده با اثر آنزیم سلولاز قارچ Trichoderma reesei بر روی کاغذهای باطله اداری در بافر استات تولید شد. مجموعه‌ی قندهای احیایی حاصل از غشای تخت اولترافیلتراسیون از جنس پلی اتر سولفون عبور داده شد و گلوکوز خالص تولید شد. گلوکوز تولید شده با روش بندیکت تعیین غلظت و خشک شد و بعدا با انحلال مجدد در غلظت‌‌های مورد نظر برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

## آماده‌سازی و احیای سویه

سویه‌ی باکتری *Cupriavidus necator* ATCC17699 مورد استفاده در این پژوهش از نوع صنعتی بوده و از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌‌های صنعتی ایران (PTCC) تهیه گردید. این سویه لیوفیلیزه پس از دریافت، طبق دستورالعمل رسمی سازمان، احیا شد. سپس باکتری بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و ویژگی‌‌های ماکروسکوپی کلنی و میکروسکوپی باکتری مورد بررسی و تایید قرار گرفت. برای نگهداری بلندمدت کلنی‌‌های خالص به محیط TSB حاوی 25٪ گلیسرول منتقل و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. پیش از شروع آزمایش‌ها، باکتری از محیط ذخیره خارج شده و جهت احیا، در محیط کشت پیشنهادی PTCC کشت داده شد. در ضمن نمودار رشد باکتری نیز با روش استاندارد ترسیم شد.

## ترکیب محیط‌های کشت افزایش توده و تلقیح

جهت بررسی تأثیر فاکتورهای مدنظر بر افزایش توده‌ی سلولی، محیط کشت پایه شامل منبع کربن (گلوکز در غلظت‌‌های متغیر)، منبع نیتروژن (انواع منبع نیتروژن در نسبت‌‌های مختلف)، TMM، و آب مقطر تهیه شد. محیط‌های کشت به‌صورت استریل شده و در حجم 50 میلی‌لیتر به ارلن‌های 100 میلی‌لیتری منتقل شدند. همه آزمایشات در ارلن 100 میلی‌لیتری با 50 میلی‌لیتر محیط کشت انجام شدند تا هوادهی ثابت باقی بماند. تلقیح اولیه در تمام آزمایش‌ها با رقت 1:50 از سوسپانسیون دارای جذب نوری معادل 5/0 مک‌فارلند انجام شد. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار با دمای 30 درجه سانتی‌گراد و دور 150 rpm تا رسیدن به انتهای فاز لگاریتمی (حدود 40 ساعت) انکوبه شدند.

## روش‌های ارزیابی و اندازه‌گیری رشد باکتری

برای ارزیابی افزایش توده‌ی باکتری در شرایط مختلف، از سه روش مکمل استفاده شد:

### سنجش جذب نوری

در پایان هر آزمایش، جذب نوری سوسپانسیون باکتریایی در طول موج 600 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. این روش به‌عنوان یک نشانگر غیرمستقیم برای بررسی افزایش توده سلولی در نظر گرفته شد.

### اندازه‌گیری جرم خشک سلولی

به‌منظور تعیین دقیق‌تر میزان رشد، 45 میلی‌لیتر از کشت هر نمونه سانتریفیوژ شده (rpm10000، مدت 10 دقیقه)، سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و مجدداً سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل در آون خلا با دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 12 ساعت خشک شد. پس از خشک شدن، وزن نمونه‌ها اندازه‌گیری و به‌عنوان جرم خشک سلولی (CDW) ثبت شد.

### شمارش سلول زنده (CFU)

برای تعیین تعداد سلول زنده، از روش رقت‌سازی سریالی و کشت بر روی محیط نوترینت آگار استفاده شد. از هر رقت، 10 میکرولیتر روی پلیت کشت داده شد (3 تکرار) و پس از 48 ساعت انکوباسیون در دمای 30 درجه سانتی‌گراد، کلنی‌ها شمارش شدند. فقط رقت‌هایی که کلنی‌های مجزا داشتند برای محاسبه CFU/ml لحاظ شدند. میانگین سه تکرار برای هر نمونه به‌عنوان تعداد سلول‌های زنده در نظر گرفته شد.

## طراحی آزمایش‌ها

منبع کربن مورد استفاده در آزمایشات بهینه‌سازی گلوکز خالص بود و فقط بعد از هر مرحله بهینه‌سازی آزمایش نهایی با گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ انجام و نتایج آن با گلوکز خالص مقایسه شد. جهت دستیابی به ترکیب محیط کشت بهینه برای رشد باکتری، از دو روش طراحی آزمایش استفاده شد:

### طراحی تک‌متغیره

در این رویکرد، در هر سری آزمایش فقط یک متغیر تغییر داده شد و سایر متغیرها ثابت نگه‌ داشته شدند. این رویکرد امکان بررسی اثر مستقیم هر متغیر را فراهم کرد. مقادیر انتخاب‌شده برای هر پارامتر در جدول 1آمده‌اند و ترکیب سری‌های آزمایشی در جدول 2 تنظیم شده است.

جدول 1- مقادیر در نظر گرفته شده هر پارامتر در طراحی آزمایشات تک متغیره افزایش توده

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| pH | 5 | 6 | 7 | 8 |
| نسبت نیتروژن به کربن | 1/0 | 25/0 | 5/0 | - |
| منبع نیتروژن | عصاره مخمر | آمونیوم سولفات | آمونیوم نیترات | اوره |
| غلظت گلوکوز (گرم بر لیتر) | 10 | 20 | 30 | 40 |

جدول 2- آزمایشات طراحی شده بهینه‌سازی تک متغیره افزایش توده

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | pH | نسبت نیتروژن به کربن | منبع نیتروژن | غلظت گلوکوز (گرم بر لیتر) |
| سری 1 | 5 و 6 و 7 و 8 | 5/0 | عصاره مخمر | 20 |
| سری 2 | 6 | 1/0 و 25/0 و 5/0 | عصاره مخمر | 20 |
| سری 3 | 6 | 5/0 | عصاره مخمر و آمونیوم سولفات و آمونیوم نیترات و اوره | 20 |
| سری 4 | 6 | 5/0 | عصاره مخمر | 10 و 20 و 30 و 40 |

در پایان هر سری، بهترین مقدار هر فاکتور به‌عنوان مبنای طراحی سری بعدی در نظر گرفته شد.

### طراحی چندمتغیره به روش RSM و الگوریتم Box-Behnken

برای بررسی اثرات متقابل متغیرها و تعیین دقیق شرایط بهینه، طراحی آزمایش‌ها به روش RSM و مدل   
Box-Behnken انجام شد. متغیرهای لحاظ‌شده عبارت بودند از:

* pH (5، 6، 7، 8)
* نسبت نیتروژن به کربن (1/0، 25/0، 5/0)
* نوع منبع نیتروژن (کدگذاری‌شده: 1 = اوره، 2 = عصاره مخمر، 3 = آمونیوم سولفات) (به دلیل عملکرد مشابه آمونیوم سولفات و آمونیوم نیترات در آزمایشات تک متغیره و ارزان‌تر بودن آمونیوم سولفات، در طراحی چند متغیره فقط از آمونیوم سولفات استفاده شد)
* غلظت گلوکز (10، 20، 30، 40 گرم بر لیتر)

در مجموع 27 آزمایش توسط نرم‌افزار Design Expert (نسخه 13) طراحی شد.

## آنالیز آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌ها شامل جذب نوری، CFU و جرم خشک سلولی وارد نرم‌افزار شد. تحلیل واریانس (ANOVA) (تعیین R2) و مدل رگرسیون چندجمله‌ای برای تعیین معناداری متغیرها و اثرات متقابل به‌کار گرفته شد. شرایط بهینه پیشنهادشده توسط نرم‌افزار در یک آزمایش جداگانه مورد بررسی و صحت‌سنجی قرار گرفت.

# نتایج

## گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ

غلظت اولیه محلول گلوکز بعد از خالص‌سازی 35 گرم بر لیتر تعیین شد. نتایج ICP برای عناصر بررسی شده در جدول 3 ارائه شده است.

جدول 3- نتایج تعیین غلظت عناصر مدنظر به روش ICP

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| عناصر | P | Mo | Zn | Cu | B | Fe | Mg |
| غلظت (میلی‌گرم بر لیتر) | 569/1 | 081/0 | 065/1 | 479/0 | 524/0 | 136/0- | 105/5 |

## بررسی رشد باکتری در محیط پایه و ارزیابی اولیه

کلنی‌‌های این باکتری بعد از 24 ساعت انکوباسیون در محیط کشت جامد نوترینت آگار گرد با قطر حدود 5/0 تا 1 میلی‌متر و بیرنگ، موکوئیدی و برآمده هستند و پس از ادامه رشد به مدت 48 ساعت درشت‌تر شده و به رنگ سفید درمی‌آیند. این باکتری در زیر میکروسکوپ به شکل کوکوباسیل‌‌های گرم منفی و عمدتا دوتایی دیده می‌شود.

منحنی رشد باکتری دارای فاز تاخیر طولانی (15 ساعت) و فاز لگاریتمی 25 ساعته است و باکتری بعد از 40 ساعت وارد فاز رکود می‌شود (شکل 1).

|  |
| --- |
|  |

شکل 1- منحنی رشد باکتری *Cupriavdus necator*

## مرحله اول بهینه‌سازی: روش تک‌متغیره

در این مرحله 4 سری آزمایش انجام شد که در هر سری فقط یکی از فاکتورها متغیر و بقیه ثابت بودند.

### بررسی اثر pH اولیه در میزان توده‌ی تولید شده (سری 1)

مطابق (شکل 2) با افزایش pH، از 6 به هفت جذب در 600 نانومتر، جرم توده خشک سلولی و CFU کاهش یافته و با افزایش بیشتر pH تا هشت جذب در 600 نانومتر و جرم توده خشک سلولی تقریبا ثابت مانده اما CFU همچنان کاهش نشان می‌دهد. رشدی در 5pH= مشاهده نشد.

### بررسی اثر نسبت نیتروژن به کربن در میزان توده‌ی تولید شده (سری 2)

مطابق (شکل 3) مقادیر جذب در 600 نانومتر، جرم توده خشک سلولی و CFU با افزایش نسبت نیتروژن به کربن تا 4/0، افزایش یافته و سپس ثابت می‌ماند.

### بررسی اثر منبع نیتروژن در میزان توده‌ی تولید شده (سری 3)

مطابق (شکل 4) مقادیر جذب در 600 نانومتر، جرم خشک سلولی و CFU در منبع نیتروژن عصاره‌ی مخمر بیشتر از اوره، در هردو این‌ها بیشتر از آمونیوم سولفات و در هر سه بیشتر از آمونیوم نیترات است.

### بررسی اثر غلظت منبع کربن بر میزان توده‌ی تولید شده (سری 4)

مطابق (شکل 5) میزان جذب در 600 نانومتر، جرم خشک سلولی و CFU با افزایش غلظت گلوکز تا 30 گرم بر لیتر، افزایش یافته و سپس با افزایش بیشتر غلظت گلوکز این مقادیر اندکی کاهش نشان می‌دهند.

|  |
| --- |
|  |

شکل 2- اثر pH روی میزان توده تولید شده

|  |
| --- |
|  |

شکل 3- اثر نسبت نیتروژن به کربن روی میزان توده تولید شده

|  |
| --- |
|  |

شکل 4- اثر منبع نیتروژن روی میزان توده تولید شده

|  |
| --- |
|  |

شکل 5- اثر غلظت منبع کربن روی میزان توده تولید شده

## مرحله دوم بهینه‌سازی: طراحی آزمایش به روش Box–Behnken

**طراحی مدل**

آنالیز داده‌ها برای نتایج حاصل از CFU، CDW، و OD مدل‌‌های رگرسیون زیر را ‌‌پیش‌بینی کرده است. مقادیر   
p-value برای مدل طراحی شده و پارامترهای بررسی شده در جدول 4 ذکر شده‌اند.

رگرسیون پیشنهادی نرم‌افزار برای فاکتورهای موثر در میزان تولید زیست توده به شرح زیر می‌باشند:

Weight (g/l) = -26.2 + 1.5pH + 17.30source + 79.8ratio + 0.158concentration   
- 0.217pH\*pH - 5.962source\*source - 19.4ratio\*ratio   
- 0.00349concentration\*concentration + 0.98pH\*source - 6.71pH\*ratio   
+ 0.0228pH\*concentration - 3.92source\*ratio   
- 0.0043source\*concentration - 0.247ratio\*concentration

A (600nm) = -15.6 + 0.88pH + 10.34source + 48.0ratio + 0.098concentration   
- 0.130pH\*pH - 3.594source\*source - 11.6ratio\*ratio   
- 0.00209concentration\*concentration + 0.610pH\*source   
- 4.02pH\*ratio + 0.0136pH\*concentration - 2.46source\*ratio   
- 0.0039source\*concentration - 0.149ratio\*concentration

CFU = 143072498310 - 42726645000pH - 3887038333source + 106444212500ratio + 578420741concentration + 3078161667pH\*pH - 1589438333source\*source   
+ 2086729167ratio\*ratio + 3060307concentration\*concentration   
+ 1406905000pH\*source - 14430500000pH\*ratio - 98396667pH\*concentration   
- 414750000source\*ratio + 333333source\*concentration   
- 35916667ratio\*concentration

جدول 4- مقادیر p-value برای داده های حاصل از جرم، جذب و CFU

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **مدل (Model)** | **p-value داده‌های CFU** | **p-value داده‌های جذب در ۶۰۰ نانومتر** | **p-value داده‌های جرم خشک سلولی** |
| **Model** | 18/0 | 09/0 | 09/0 |
| **pH** | 04/0 | 26/0 | 34/0 |
| **source** | 02/0 | 06/0 | 21/0 |
| **ratio** | 006/0 | 07/0 | 07/0 |
| **concentration** | 02/0 | 43/0 | 46/0 |
| **pH\*pH** | 07/0 | 50/0 | 72/0 |
| **source\*source** | 01/0 | 07/0 | 44/0 |
| **ratio\*ratio** | 03/0 | 32/0 | 23/0 |
| **concentration\*concentration** | 02/0 | 43/0 | 43/0 |
| **pH\*source** | 15/0 | 19/0 | 19/0 |
| **pH\*ratio** | 03/0 | 14/0 | 16/0 |
| **pH\*concentration** | 17/0 | 06/0 | 07/0 |
| **source\*ratio** | 04/0 | 32/0 | 23/0 |
| **source\*concentration** | 999/0 | 996/0 | 955/0 |
| **ratio\*concentration** | 066/0 | 04/0 | 04/0 |

## آزمون سازگاری مدل

برای بررسی مدل‌های طراحی شده توسط نرم‌افزار، مقادیر پیش‌بینی شده براساس مدل با مقادیر واقعی به دست آمده مقایسه شد. مدل پیش‌بینی شده براساس داده‌های جذب در 600 نانومتر تطابق نسبتا مناسبی با داده‌‌های واقعی نشان می‌دهد (شکل 6).

|  |
| --- |
|  |

شکل 6- آزمون سازگاری مدل حاصل از نتایج ‌‌اندازه‌گیری جذب در 600 نانومتر با نتایج واقعی

مدل ‌‌پیش‌بینی شده بر اساس داده‌‌های جرم خشک سلولی تطابق نسبتا مناسبی با داده‌‌های واقعی نشان می‌دهد (شکل 7).

|  |
| --- |
|  |

شکل 7- آزمون سازگاری مدل حاصل از نتایج ‌‌اندازه‌گیری جرم خشک سلولی با نتایج واقعی

مدل ‌‌پیش‌بینی شده بر اساس داده‌‌های CFU تطابق نسبتا مناسبی با داده‌‌های واقعی نشان می‌دهد (شکل 8).

|  |
| --- |
|  |

شکل 8- آزمون سازگاری مدل حاصل از نتایج CFU با نتایج واقعی

## بررسی اثر فاکتورها در تولید

نمودارهای بررسی اثر همزمان دو متغیر روی میزان تولید توده سلولی، برای هر 3 پارامتر CFU، جرم و OD به صورت مجزا براساس نتایج حاصل از آزمایشات چندمتغیره توسط نرم‌افزار رسم و در (شکل 9) تا (شکل 26) نشان داده شده است. در تمامی شکل‌ها مقادیر متغیرهای ثابت در شرایط بهینه‌ی خود در کنار عکس‌ها ذکر شده است. در ضمن بررسی برهمکنش‌‌های بین فاکتورها نیز انجام شده است (در این مقاله مورد بررسی قرار نخواهد گرفت).

### اثر همزمان نسبت نیتروژن به کربن و غلظت منبع کربن

در بررسی اثر همزمان نسبت نیتروژن به کربن و غلظت گلوکوز، مدل‌‌های حاصل از نتایج ‌‌اندازه‌گیری جذب در 600 نانومتر (شکل 9) و جرم توده (شکل 10) الگوی مشابهی را نشان دادند. در این الگو بیشترین میزان تولید در رنج نسبت نیتروژن به کربن 4/0 تا 5/0 و غلظت گلوکز 10 تا 35 مشاهده می‌شود.

مدل حاصل از نتایج اندازه‌گیری CFU (شکل 11)، الگوی متفاوتی از شرایط بهینه را نشان می‌دهد. در این الگو بیشترین تولید همچنان در رنج نسبت نیتروژن به کربن 4/0 تا 5/0 اما در رنج غلظت گلوکز 30 تا 40 مشاهده می‌شود.

|  |
| --- |
|  |

شکل 9- اثر همزمان نسبت نیتروژن به کربن و غلظت منبع کربن روی جذب در 600 نانومتر

|  |
| --- |
|  |

شکل 10- اثر همزمان نسبت نیتروژن به کربن و غلظت منبع کربن روی جرم خشک توده

|  |
| --- |
|  |

شکل 11- اثر همزمان نسبت نیتروژن به کربن و غلظت منبع کربن روی CFU

### اثر همزمان منبع نیتروژن و غلظت منبع کربن

در بررسی اثر همزمان منبع نیتروژن و غلظت گلوکوز، مدل‌‌های حاصل از اندازه‌گیری جذب در 600 نانومتر (شکل 12) و جرم توده (شکل 13)، الگوی یکسانی را نشان دادند. بیشترین میزان تولید در این الگو در منبع کربن شماره 2 (عصاره مخمر) و رنج غلظتی 10 تا 40 گرم بر لیتر گلوکز مشاهده می‌شود. اما مدل حاصل از نتایج CFU (شکل 14)، الگوی کاملا متفاوتی را نشان می‌دهد. در این مدل مقادیر بیشینه‌ی تولید در منابع نیتروژنی 1 و 2 (عصاره مخمر و آمونیوم سولفات) و رنج غلظت گلوکز 35 تا 40 گرم بر لیتر مشاهده می‌شود.

|  |
| --- |
|  |

شکل 12- اثر همزمان منبع نیتروژن و غلظت منبع کربن روی جذب در 600 نانومتر

|  |
| --- |
|  |

شکل 13- اثر همزمان منبع نیتروژن و غلظت منبع کربن روی جرم خشک توده

|  |
| --- |
|  |

شکل 14- اثر همزمان منبع نیتروژن و غلظت منبع کربن روی CFU

### اثر همزمان pH و غلظت منبع کربن

در بررسی اثر همزمان pH و غلظت منبع کربن، مدل‌‌های پیش‌بینی شده براساس نتایج اندازه‌گیری جذب در 600 نانومتر (شکل 15) و جرم توده (شکل 16) الگوی یکسانی را نشان دادند. در این الگو بیشترین میزان تولید در pH‌‌های بین 6 تا 3/6 و رنج غلظت گلوکز 10 تا 35 گرم بر لیتر مشاهده می‌شود.

اما مدل حاصل از نتایج CFU (شکل 17) الگوی کاملا متفاوتی را نشان می‌دهد. در این مدل بیشترین میزان تولید در نزدیکی 6pH= باقی مانده اما به غلظت‌‌های 35 تا 40 گرم بر لیتر گلوکوز محدود شده است.

|  |
| --- |
|  |

شکل 15- اثر همزمان pH و غلظت منبع کربن روی جذب در 600 نانومتر

|  |
| --- |
|  |

شکل 16- اثر همزمان pH و غلظت منبع کربن روی جرم خشک توده

|  |
| --- |
|  |

شکل 17- اثر همزمان pH و غلظت منبع کربن روی CFU

### اثر همزمان منبع نیتروژن و نسبت نیتروژن به کربن

در بررسی اثر همزمان منبع نیتروژن و نسبت نیتروژن به کربن، مدل‌های پیش‌بینی شده براساس نتایج جذب در 600 نانومتر (شکل 18) و ‌‌اندازه‌گیری جرم توده (شکل 19) الگوی یکسانی را نشان دادند. مقادیر بهینه‌ی تولید توده در منبع نیتروژن 2 و نسبت‌های نیتروژن به کربن 4/0 تا 5/0 مشاهده شد.

اما مدل حاصل از نتایج CFU (شکل 20) الگوی کاملا متفاوتی را نشان می‌دهد. در این مدل منبع نیتروژن 1 (آلومینیوم سولفات) در نسبت‌‌های نیتروژن به کربن حدود 45/0 تا 5/0 و منبع نیتروژن 2 (عصاره مخمر) در نسبت‌‌های نزدیک به 5/0 نیتروژن به کربن مقادیر بهینه را نشان می‌دهند.

|  |
| --- |
|  |

شکل 18- اثر همزمان منبع نیتروژن و نسبت نیتروژن به کربن روی جذب در 600 نانومتر

|  |
| --- |
|  |

شکل 19- اثر همزمان منبع نیتروژن و نسبت نیتروژن به کربن روی جرم خشک توده

|  |
| --- |
|  |

شکل 20- اثر همزمان منبع نیتروژن و نسبت نیتروژن به کربن روی CFU

### اثر همزمان pH و نسبت نیتروژن به کربن

در بررسی اثر همزمان pH و نسبت نیتروژن به کربن، مدل‌‌های ‌‌پیش‌بینی شده براساس نتایج جذب در 600 نانومتر (شکل 21) و اندازه‌گیری جرم توده (شکل 22) الگوی یکسانی را نشان دادند. مقادیر بهینه‌ی تولید در pH‌‌های نزدیک 6 و نسبت نیتروژن به کربن نزدیک به 5/0 مشاهده شد.

اما مدل حاصل از نتایج CFU (شکل 23) اندکی تفاوت را با دو مدل بالا نشان می‌دهد. مقادیر بیشینه تولید به 6pH= و نسبت نیتروژن به کربن 5/0 محدودتر شده و سایر مرزبندی‌ها نیز جابجا شده‌اند.

|  |
| --- |
|  |

شکل 21- اثر همزمان pH و نسبت نیتروژن به کربن روی جذب در 600 نانومتر

|  |
| --- |
|  |

شکل 22- اثر همزمان pH و نسبت نیتروژن به کربن روی جرم خشک توده

|  |
| --- |
|  |

شکل 23- اثر همزمان pH و نسبت نیتروژن به کربن روی CFU

### اثر همزمان pH و منبع نیتروژن

در بررسی اثر همزمان pH و منبع نیتروژن، مدل‌‌های پیش‌بینی شده براساس نتایج ‌‌اندازه‌گیری جذب در 600 نانومتر (شکل 24) و جرم توده (شکل 25) الگوی یکسانی را نشان دادند. منبع نیتروژن 2 (عصاره مخمر) در pH‌‌های 6 تا نزدیکی 3/6 مقادیر بهینه‌ی تولید توده را دارند.

|  |
| --- |
| **C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder\Contour Plot of A(600nm) vs source; pH.jpg** |

شکل 24- اثر همزمان pH و منبع نیتروژن روی جذب در 600 نانومتر

|  |
| --- |
|  |

شکل 25- اثر همزمان pH و منبع نیتروژن روی جرم توده خشک

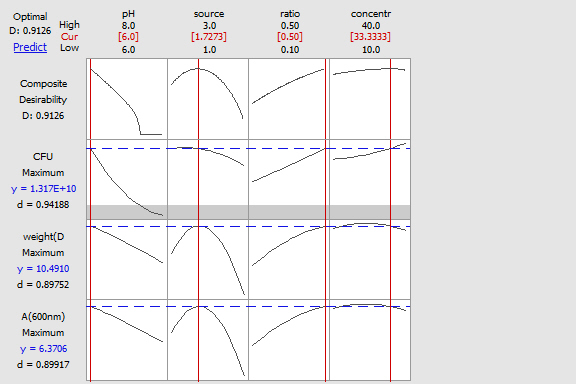
مدل حاصل از نتایج CFU (شکل 26) اندکی تفاوت را با دو مدل بالا نشان می‌دهد. در این مدل در حضور منبع نیتروژن 2 (عصاره مخمر) رنج pH بهینه محدود به 6 شده و همچنین در منبع نیتروژن 1 (آمونیوم سولفات) و 6pH= نیز مقادیر بالای تولید مشاهده می‌شود.

|  |
| --- |
|  |

شکل 26- اثر همزمان pH و منبع نیتروژن روی CFU

## آزمایش بهینه

با بررسی نتایج حاصل برای هر 3 پارامتر با هم، بهترین شرایط افزایش توده توسط نرم‌افزار با تاکید بیشتر بر CFU پیش‌بینی و ارائه شد که در (شکل 27) مشاهده می‌شود. برای آزمایش بهینه‌ی طراحی شده جذب 37/6 در 600 نانومتر، جرم توده‌ی خشک 49/10 گرم بر لیتر و CFU=1.32×1010 توسط نرم‌افزار ‌‌پیش‌بینی شد. پس از انجام آزمایش جذب 33/6 در 600 نانومتر، جرم خشک سلولی 44/10 و CFU=1.30×1010 به دست آمد.

****

شکل 27- بهینه‌ی شرایط با در نظر گرفتن داده‌‌های حاصل از هر سه پارامتر OD، CFU و جرم

### آزمایش بهینه در حضور گلوکوز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ

در این مرحله جذب 03/6 در 600 نانومتر، جرم خشک سلولی 34/10 و CFU=1.2×1010 به دست آمد.

# نتیجه‌گیری و بحث

در دنیای امروز پلاستیک‌ها تقریبا در هر صنعتی از صنایع خودروسازی تا پزشکی وارد شده اند. این ترکیبات با تنوع ساختاری بالای خود تنوع عملکردی گسترده ای را نشان می‌دهند و می‌توان آنها را به راحتی به هر شکل دلخواهی از فیبرها تا فیلم‌های بسیار نازک تبدیل کرد با افزایش روزافزون استفاده از پلاستیک‌ها تجمع ضایعات پلاستیکی در محیط زیست نگرانی‌های گسترده ای را ایجاد کرده لذا جایگزینی این پلاستیک‌ها با انواع زیست‌تخریب‌پذیر و سازگار با محیط زیست اهمیت فراوانی پیدا کرده است.

PHAها، پلی‌استرهای میکروبی هستند که به دلیل تنوع مونومری تنوع بالای خواص و کاربردها را از خود نشان می‌دهند همچنین این پلاستیک‌ها به دلیل زیست تجزیه‌پذیری کامل برتری‌هایی نسبت به پلاستیک‌های پتروشیمیایی دارند اما قیمت بالای تمام شده‌ی تولید این پلاستیک‌ها آن‌ها را در رقابت با پلاستیک‌های بیوشیمایی با مشکل روبرو می‌کند موفقیت در جایگزینی پلاستیک‌های پتروشیمیایی با PHAها نیازمند افزایش عرضه با قیمت مناسب است. استفاده از منابع کربن ارزان‌قیمت و در عین حال کارآمد به همراه فراهم کردن بهترین شرایط برای دستیابی به بالاترین بازده تولید می‌تواند هزینه‌های تولید PHAها را به میزان بسیار زیادی کاهش دهد. در نتیجه در این پژوهش استفاده از یک منبع کربن ارزان قیمت به همراه بهینه‌سازی دو مرحله‌ای شرایط رشد سویه و تولید PHA مورد بررسی قرار گرفته است.

## بررسی مدل پیش‌بینی شده در بهینه‌سازی تولید توده سلولی

مدل پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار برای CFU جذب در ۶۰۰ نانومتر و جرم خشک توده سلولی مقادیر p-value زیر 05/0 را در بررسی‌های آماری با سطح اطمینان ۹۵ دارا هستند که نشان‌دهنده‌ی قابل اعتماد بودن این مدل‌هاست (جدول 4) مقایسه مقادیر پیش بینی شده توسط نرم‌افزار با مقادیر واقعی به دست آمده که در شکل 6 و شکل 7 و شکل 8 نشان داده شده است مطابقت بالایی را نشان می‌دهند.

## بهینه‌سازی تک متغیره و چندمتغیره به روش box-behnken میزان تولید توده

همانطور که در بخش 1-3-3 ذکر شد افزایش pH اولیه محیط از ۶ تا ۸ میزان تولید توده‌ی زنده را کاهش می‌دهد. در بررسی‌های چندمتغیره میزان بهینه‌ی 6= pH به دست آمد که با نتایج بررسی‌های و تک‌متغیره هم‌خوانی دارد اثر بازدارندگی pH روی میزان رشد این سویه با نتایج پژوهش Yang و همکاران با استفاده از اسیدهای آلی به عنوان منبع کربن و آمونیوم کلرید مطابقت نشان می‌دهد (Yang et al., 2010) با توجه به افزایش pH مشاهده شده در طول رشد این باکتری که در بخش ۴-۲ ذکر شد، علت کاهش تولید PHA در صورت افزایش PH را می‌توان افزایش بیش از حد pH در محیط‌های کشت با pH اولیه‌ی بالا دانست که شرایط رشد را نامساعد کرده و باعث کاهش رشد می شوند. افزایش pH در حین رشد این سویه در محیط‌های کشت دیگر در پژوهش‌های Yang و همکاران با استفاده از اسیدهای آلی و آمونیوم کلرید و Kim و همکاران با استفاده از گلوکز و آمونیوم سولفات نیز به دست آمده اما دلیلی برای این افزایش ذکر نشده است (Kim et al., 1994; Yang et al., 2010) عدم رشد مشاهده شده در 5=pH به دلیل اسیدیته‌ی بالای محیط است.

مطابق نتایج ذکر شده در بخش 2-3-3 افزایش نسبت نیتروژن به کربن تا 4/0 باعث افزایش میزان تولید توده میشود و افزایش بیشتر این نسبت تغییری در میزان رشد ایجاد نمی.کند در بررسی های تک متغیره نسبت نیتروژن به کربن 4/0 و 5/0 هر دو به عنوان مقادیر بهینه تعیین شدند حال آنکه در بررسی‌های چند متغیره و به دلیل اثر سایر فاکتورها روی نسبت نیتروژن به ،کربن میزان نسبت 5/0 نیتروژن به کربن به عنوان میزان بهینه به دست آمد نتایج به دست آمده در پژوهش Yang و همکاران با استفاده از اسیدهای آلی و آمونیوم ،کلرید Loo و همکاران با استفاده از اوره و Reddy و همکاران نیز این الگوی تاثیر نسبت نیتروژن به کربن روی رشد سویه را تایید می‌کند (Loo & Sudesh, 2007; Reddy & Mohan, 2012; Yang et al., 2010).

در نتایج به دست آمده در بخش 3-3-3 منبع نیتروژن عصاره مخمر بهترین منبع نیتروژن برای افزایش توده است که نشان‌دهنده‌ی ترجیح میکروارگانیسم در استفاده از نیتروژن آلی است و پس از آن به ترتیب اوره آمونیوم سولفات و آمونیوم نیترات بیشترین بازده تولید توده را دارند. منبع نیتروژن شماره ۲ عصاره مخمر در بررسیهای چند متغیره نیز به عنوان بهترین منبع نیتروژن به دست آمد که مشابه با نتایج بررسی‌های تک متغیره است و با نتایج Khanna و همکاران با استفاده از فروکتوز به عنوان منبع کربن و نیتروژن آلی مطابقت دارد (Khanna & Srivastava, 2005).

مطابق نتایج ذکر شده در بخش 4-3-3 افزایش در غلظت گلوکز تا ۳۰ گرم بر لیتر سبب افزایش میزان رشد می‌شود و پس از آن اثر بازدارندگی رشد را دارد که مشابه نتایج به دست آمده توسط Yang و همکاران با استفاده از اسیدهای آلی به عنوان منبع کربن و اوره و Kim و همکاران با استفاده از گلوکز و آمونیوم سولفات است (Kim et al., 1994; Yang et al., 2010).

بررسی‌های چند متغیره غلظت گلوکز اولیه 33/33 گرم بر لیتر را به عنوان غلظت بهینه تعیین کرد که با غلظت ۳۰ گرم بر لیتر به دست آمده در بررسی‌های تک متغیره متفاوت است اما اختلاف چندانی ندارد این کاهش تولید توده در غلظت‌های بیش از حد گلوکز می‌تواند به دلیل اثر بازدارندگی سوبسترا بر روی رشد باشد (Purushothaman et al., 2001)

## مقایسه‌ی میزان توده تولید شده قبل و بعد از بهینه‌سازی

میزان توده‌ی خشک تولید شده بعد از تمامی مراحل بهینه‌سازی از ۸.۱۳ گرم بر لیتر به 44/10 گرم بر لیتر رسید که 28% افزایش نسبت به قبل از بهینه‌سازی نشان می‌دهد (جدول 5). پژوهش‌هایی بسیاری روی میزان تولید توده‌ی خشک سلولی باکتری‌های تولیدکننده‌ی PHA با استفاده از محیط‌های کشت و شرایط رشد متنوع انجام شده است توده‌ی خشک

10 گرم بر لیتر در *Cupriavidus necator* (Hafuka et al., 2011)، 5 گرم بر لیتر در *Cupriavidus* *necator* (Ramadas et al., 2010)، 10 گرم بر لیتر در *Bacillus* *sphaericus* (Budde, Riedel, Hübner, et al., 2011)، 4/1 گرم بر لیتر در *Cupriavidus* *necator*، (Yang et al., 2010)، 5 گرم بر لیتر در *Cupravidus* *necator* (Kim & Shin, 1996)، 1/15 گرم بر لیتر در *Cupriavidus* *necator* (García et al., 2013)، 3/5گرم بر لیتر در *Cupriavidus* *necator* (Budde, Riedel, Willis, et al., 2011)، 11/3، 48/2، 41/2، 79/2 و ۲۰۱۳ گرم بر لیتر در منابع کربن مختلف در گونه‌ای ناشناخته از جنس *Alcaligenes* (Akiyama et al., 1992) ، 3 گرم بر لیتر در *Cupriavidus* *necator* (Riedel et al., 2012).

گزارش شده است همچنین در این پژوهش میزان جذب در nm 600 نانومتر نیز سنجیده شد که با افزایش از 93/4 به 33/6، %۲۸ افزایش نشان می‌دهد. میزان CFU به دلیل تفاوت قائل شدن بین سلول‌های زنده و مرده معیار مناسب‌تری نسبت به جذب و جرم خشک سلولی است. میزان CFU بعد از بهینه‌سازی از 08E+8/7 به 10E+3/1 رسیده است که 67/15 درصد افزایش را نشان می‌دهد.

جدول 5- مقایسه‌ی میزان تولید زیست توده در مراحل مختلف بهینه‌سازی میانگین جذب در میانگین جرم خشک

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | میانگین جذب در 600 نانومتر | میانگین جرم خشک توده (گرم بر لیتر) | میانگین CFU |
| قبل از بهینه‌سازی | 93/4 | 13/8 | 7.8E+08 |
| بعد از بهینه‌سازی تک متغیره | 62/5 | 46/9 | 1.00E+10 |
| بعد از بهینه‌سازی چند متغیره | 33/6 | 44/10 | 1.30E+10 |

جدول 6- مقایسه‌ی میزان تولید زیست توده در گلوکز خالص و گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | میانگین جذب در 600 نانومتر | میانگین جرم توده خشک سلولی | میانگین CFU |
| گلوکز خالص | 33/6 | 44/10 | 1.3E+10 |
| گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ | 03/6 | 35/10 | 126E+10 |

در هر دو مرحله‌ی بهینه سازی میزان تولید با استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ اندکی کاهش نسبت به گلوکز خالص نشان می‌دهد (جدول 5 و جدول 6).

نتایج ICP نشان‌دهنده‌ی حضور بعضی از عناصر ضروری در گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ حتى بعد از خالص‌سازی و صاف کردن است افزایش میزان عناصر کمیاب در محیط کشت سبب کاهش توده‌ی زنده و میزان تولید PHA می‌شود (Ramadas et al., 2010) و همین امر کاهش تولید در گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ را به نسبت گلوکز خالص سبب می‌شود.

# نتیجه‌گیری

در این پژوهش بهینه‌سازی تولید زیست توده زنده *Cupriavidus necator ATCC17699* با استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ به عنوان منبع کربن انجام شد. افزایش بازده تولید PHA توسط این باکتری هم نیازمند توده‌ی سلولی زنده بالا و هم نیازمند شرایط مناسب برای افزایش تجمع PHA درون سلول است. بنابراین در این پژوهش با تولید توده شرایط مناسب برای افزایش هرچه بیشتر تولید PHA در گام‌های بعدی ایجاد شده است. استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ به عنوان سوبسترا برای رشد و تولید هم هزینه‌ها کاهش می‌یابد و هم کمکی موثر برای پاکسازی محیط زیست خواهد بود. در بهینه‌سازی تولید توده علاوه بر جرم خشک سلولی که تفاوتی بین سلول‌های زنده و مرده قائل نمی‌شود میزان CFU نیز تعیین شده است تا تولید توده‌ی سلولی زنده بهینه شود. در بررسی‌های بهینه‌سازی تطابق بالایی بین مقادیر پیش‌بینی شده‌ی تولید و مقادیر تجربی به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی صحت و دقت مدل‌های محاسبه شده است. در نهایت توده زنده تولیدی با توجه به نتایج CFU افزایش 67/15 درصدی را نشان می‌دهد.

# مراجع

Akiyama, M., Taima, Y., & Doi, Y. (1992). Production of poly (3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus Alcaligenes utilizing long-chain fatty acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *37*, 698–701.

Budde, C. F., Riedel, S. L., Hübner, F., Risch, S., Popović, M. K., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2011). Growth and polyhydroxybutyrate production by Ralstonia eutropha in emulsified plant oil medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*, 1611–1619.

Budde, C. F., Riedel, S. L., Willis, L. B., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2011). Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered Ralstonia eutropha strains. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(9), 2847–2854.

Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of bioscience and bioengineering*, *110*(6), 621–632.

Chen, G.-Q., & Patel, M. K. (2012). Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review. *Chemical reviews*, *112*(4), 2082–2099.

Choi, J., & Lee, S. Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*, 13–21.

Ferreira, S. C., Bruns, R., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J., Brandão, G., da Silva, E. P., Portugal, L., Dos Reis, P., & Souza, A. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica chimica acta*, *597*(2), 179–186.

García, I., López, J., Dorado, M., Kopsahelis, N., Alexandri, M., Papanikolaou, S., Villar, M., & Koutinas, A. (2013). Evaluation of by-products from the biodiesel industry as fermentation feedstock for poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by Cupriavidus necator. *Bioresource Technology*, *130*, 16–22.

Hafuka, A., Sakaida, K., Satoh, H., Takahashi, M., Watanabe, Y., & Okabe, S. (2011). Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by Cupriavidus necator. *Bioresource Technology*, *102*(3), 3551–3553.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by Ralstonia eutropha. *Process Biochemistry*, *40*(6), 2173–2182.

Khosravi-Darani, K., Mokhtari, Z.-B., Amai, T., & Tanaka, K. (2013). Microbial production of poly (hydroxybutyrate) from C 1 carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 1407–1424.

Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., & Woo, S. I. (1994). Production of poly (3‐hydroxybutyric acid) by fed‐batch culture of Alcaligenes eutrophus with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, *43*(9), 892–898.

Kim, K. K., & Shin, S. K. (1996). Environmentally Safe Polyhydroxybutyrate Synthesis by Alcaligenes eutrophus in Pressurized Fermentor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *2*(1), 18–25.

Koller, M., Salerno, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). Modern biotechnological polymer synthesis: a review.

Loo, C. Y., & Sudesh, K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, *2*(2), 31–57.

Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John wiley & sons.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.

Obruca, S., Marova, I., & Snajdar, O. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolyzed waste starch from expired food. *Polish Journal of Microbiology*, *59*(2), 111–118.

Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of chemical technology & biotechnology: International research in process, Environmental & clean technology*, *82*(3), 233–247.

Purushothaman, M., Anderson, R., Narayana, S., & Jayaraman, V. (2001). Industrial byproducts as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA)–biodegradable plastics. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *24*, 131–136.

Ramadas, N. V., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2010). A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by Bacillus sphaericus NCIM 5149 under submerged fermentation using central composite design. *Applied biochemistry and biotechnology*, *162*, 996–1007.

Reddy, M. V., & Mohan, S. V. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresource Technology*, *114*, 573–582.

Riedel, S. L., Bader, J., Brigham, C. J., Budde, C. F., Yusof, Z. A. M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2012). Production of poly (3‐hydroxybutyrate‐co‐3‐hydroxyhexanoate) by Ralstonia eutropha in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, *109*(1), 74–83.

Steinbüchel, A., & Füchtenbusch, B. (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in biotechnology*, *16*(10), 419–427.

Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science*, *25*(10), 1503–1555.

Yang, Y.-H., Brigham, C. J., Budde, C. F., Boccazzi, P., Willis, L. B., Hassan, M. A., Yusof, Z. A. M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2010). Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by Ralstonia eutropha. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*, 2037–2045.