**تولید زیست‌پلاستیک پلی‌هیدروکسی‌آلکانوآت از کاغذ بازیافتی: بهره‌گیری از گلوکز تجزیه‌شده آنزیمی توسط *Cupriavidus* *necator* ATCC 17699**

**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 100% تخریب‌پذیر و مشابه پلاستیک‌های رایج امروزی هستند. استفاده از سویه‌های با بازده بالای تولید، کاهش هزینه‌ی سوبسترای مورد استفاده، شرایط تولید بهینه‌شده و فرآیندهای پایین‌دستی راحت‌تر و ارزان‌تر برای کاهش هزینه‌های تولید این پلیمرها مورد نیاز است. در این پژوهش، باکتری   
*Cupriavidus* *necator*ATCC17699 و گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ به عنوان منبع کربن ارزان‌قیمت، مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌ها در محیط کشت بهینه‌ی افزایش توده رشد و پس از سانتریفیوژ وارد محیط کشت جدید برای تولید PHA شدند. بهینه‌سازی تک‌متغیره و چند‌متغیره به روش سطح پاسخ روی فاکتورهای نسبت نیتروژن به کربن (N:C)، منبع نیتروژن، pH اولیه، میزان تلقیح، میزان هوادهی، غلظت گلوکز و دمای انکوباسیون به منظور دستیابی به بالاترین میزان تولید PHA انجام گرفت. جرم PHA تولیدی بر جرم خشک سلولی (DCW) اندازه‌گیری شد. در بررسی تک‌متغیره 5pH=، 005/0N:C=، غلظت گلوکز g/l30 و g/l40، منبع نیتروژن آمونیوم نیترات، میزان تلقیح 50/0 گرم سلول تر، میزان هوادهی زیاد و دمای 25 درجه سانتی‌گراد بهترین شرایط تولید شامل gPHB/DCW89/0 را با استفاده از گلوکز خالص نشان دادند. روش سطح پاسخ با تأیید نسبی نتایج تک‌متغیره بیشترین میزان تولید PHA را در 4pH=، 0N:C=، غلظت گلوکز g/l40، منبع نیتروژن آمونیوم نیترات، میزان تلقیح 50/0 گرم سلول تر، میزان هوادهی زیاد و دمای 25 درجه سانتی‌گراد پیش‌بینی کرد. بالاترین میزان تولید PHA بعد از تمامی مراحل بهینه‌سازی gPHA/DCW93/0 با استفاده از گلوکز خالص و g/DCW92/0 با استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ بود که به ترتیب 99% و 98% مشابهت با مقدار پیش‌بینی‌شده نشان دادند.

**كلمات كليدي:** پلی‌هیدروکسی‌آلکانوآت‌ها، بهینه‌سازی، *Cupriavidus* *necator*، گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ، سطح پاسخ

# مقدمه

در دهه‌های اخیر، نگرانی‌های زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه پلاستیک‌های پتروشیمیایی، تولید ضایعات پایدار و آلودگی منابع طبیعی، دانشمندان و صنعتگران را به سمت توسعه‌ی مواد زیست‌تخریب‌پذیر و سازگار با محیط زیست سوق داده است. در این میان، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوئات‌ها (PHAs) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین زیست‌پلاستیک‌های طبیعی، توجه بسیاری از پژوهشگران و فعالان حوزه زیست‌فناوری را به خود جلب کرده‌اند. این پلیمرهای زیستی که به‌صورت درون‌سلولی و به‌عنوان دانه‌های ذخیره‌ای انرژی توسط طیف وسیعی از باکتری‌ها سنتز می‌شوند، نه‌تنها قابلیت تجزیه‌ی زیستی دارند، بلکه از نظر خواص مکانیکی نیز مشابه برخی از پلیمرهای متداول نظیر پلی‌پروپیلن و پلی‌اتیلن هستند. همچنین زیست‌سازگاری و عدم سمیت PHAs، کاربردهای گسترده‌ای را در حوزه‌هایی نظیر پزشکی، بسته‌بندی، داروسازی و مهندسی بافت برای آن‌ها فراهم ساخته است (Tanadchangsaeng & Yu, 2012; Verlinden et al., 2007).

از میان گونه‌های میکروبی تولیدکننده‌ی PHA، باکتری *Cupriavidus* *necator* که پیش‌تر با نام‌های *Ralstonia* *eutropha* و *Alcaligenes* *eutrophus* شناخته می‌شد به‌عنوان یکی از شناخته‌شده‌ترین و پرکاربردترین میکروارگانیسم‌ها در این حوزه مطرح است. این باکتری گرم‌منفی و هوازی، قابلیت بالایی در تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) به‌عنوان ساده‌ترین عضو خانواده‌ی PHA دارد و توانایی استفاده از منابع کربنی متنوع، از جمله گلوکز، روغن‌های گیاهی، گلیسرول و حتی دی‌اکسید کربن را دارا می‌باشد. این انعطاف‌پذیری متابولیک در کنار ظرفیت بالای انباشت پلیمر تا بیش از 90 درصد جرم خشک سلولی،*C. necator* را به یک گزینه‌ی ایده‌آل برای تولید صنعتی زیست‌پلاستیک‌ها تبدیل کرده است (Verlinden et al., 2007; Wang & Yu, 2001).

یکی از متغیرهای مهم در تولید PHA، نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در محیط کشت است. افزایش نسبت C/N اغلب به توقف رشد سلولی و ورود به فاز ذخیره‌ای منجر می‌شود که موجب تجمع بیشتر دانه‌های PHA درون سلول می‌گردد. همچنین نوع منبع نیتروژن نیز می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر متابولیسم سلولی و مسیرهای بیوسنتزی PHA داشته باشد. منابعی نظیر نیترات آمونیوم، سولفات آمونیوم، کلرید آمونیوم و فسفات آمونیوم، هر یک به‌صورت متفاوتی در تنظیم بیان ژن‌ها و مسیرهای متابولیک باکتری‌ها ایفای نقش می‌کنند. افزون بر این، پارامترهایی نظیر دمای کشت، میزان هوادهی، سرعت همزن و pH محیط نیز از طریق تأثیر بر رشد سلول و فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز PHA، بر بازده تولید تأثیرگذار هستند (Chen, 2010).

در دهه‌های گذشته، پژوهشگران در تلاش برای بهینه‌سازی تولید PHA، از روش‌های مختلف آزمایشی بهره برده‌اند. روش‌های سنتی نظیر بررسی تک‌متغیره (OVAT) به دلیل سادگی اجرا، مورد استفاده قرار گرفته‌اند، اما بزرگ‌ترین ضعف آن‌ها عدم امکان بررسی هم‌زمان و تعامل میان چندین متغیر مؤثر در فرآیند است. برای غلبه بر این محدودیت، روش‌های آماری طراحی آزمایش‌ها (DoE) و به‌ویژه روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology – RSM) توسعه یافته‌اند که امکان بررسی چندین عامل به‌صورت هم‌زمان و مدل‌سازی ریاضی فرآیند را فراهم می‌سازند. در بین طرح‌های طراحی‌شده در RSM، طرح Box-Behnken یکی از روش‌های کارآمد است که با حداقل تعداد آزمایش، امکان تحلیل اثرات متقابل عوامل و یافتن ترکیب بهینه را فراهم می‌کند (Ramadas et al., 2010).

با توجه به مطالب فوق، هدف اصلی پژوهش حاضر، بررسی تأثیر عوامل محیطی کلیدی شامل نوع و غلظت منبع نیتروژن، نسبت کربن به نیتروژن، میزان هوادهی، دما، pH و سایر شرایط فیزیکی محیط کشت بر بازده تولید PHA توسط باکتری *Cupriavidus* *necator* می‌باشد. در این مطالعه، از رویکرد آماری طراحی آزمایش‌ها با تأکید بر روش RSM و طرح Box-Behnken برای شناسایی ترکیب بهینه‌ی عوامل و پیش‌بینی شرایط مطلوب تولید استفاده شده است. انتظار می‌رود نتایج این پژوهش گامی مؤثر در بهینه‌سازی تولید زیست‌پلاستیک‌ها و کاهش هزینه‌های مربوط به آن باشد و افق‌های جدیدی را در استفاده صنعتی از باکتری‌های تولیدکننده‌ی PHA فراهم سازد.

# مواد و روش‌ها

## سلول باکتریایی

سویه مورد استفاده در این پژوهش *Alcaligenes eutrophus* PTCC1615، به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌‌ها و باکتری‌های ایران خریداری و مطابق با دستورالعمل این سازمان احیا شد. این سویه امروزه به نام‌های   
*Ralstonia eutropha* ATCC17699و *Cupriavidus necator* ATCC17699 نامیده و به عنوان سوش شاخصی در تولید PHA شناخته می‌شود.

## محیط کشت تولید PHA (محدودیت نیتروژن)

برای وادار کردن سلول‌های باکتریایی به تولید PHA از محیط کشت با مقادیر ناچیز نیتروژن استفاده شد. ترکیب این محیط کشت در جدول 1 آورده شده است. در طی مراحل ‌بهینه‌سازی مقادیر و نوع منبع کربن و نیتروژن برحسب شرایط مورد نظر متغیر بود.

جدول 1- ترکیب محیط کشت محدودیت نیتروژن

|  |  |
| --- | --- |
| گلوکوز | 10 گرم |
| عصاره مخمر | 2.5 گرم |
| TMM | 1 میلی‌لیتر |
| آب مقطر | 1000 میلی‌لیتر |
| pH | مطابق آزمایش |

## تایید اولیه تولید PHA در باکتری

ابتدا باکتری در محیط غنی از نیتروژن (نسبت کربن به نیتروژن 1:2) و دمای 30 درجه سانتی‌گراد رشد داده، بعد از گذشت 40 ساعت و ورود به فاز سکون سلول‌‌ها با سانتریفیوژ در rpm3000 به مدت 10 دقیقه از محیط کشت جدا و پس از یک مرتبه شستشو در سالین و سانتریفیوژ مجدد این بار در محیط کشت محدودیت نیتروژن وارد شدند (منبع نیتروژن عصاره مخمر، دمای 30 درجه ‌سانتی‌گراد و7pH=). به باکتری 60 ساعت در محیط کشت جدید زمان داده شد تا دانه‌های PHA را تولید کند.

این سلول‌‌ها برای رنگ‌آمیزی سودان سیاه و اکریدین اورنج، استخراج پلیمر و FTIR به منظور تایید تولید PHA مورد استفاده قرار گرفتند.

### رنگ‌آمیزی سودان سیاه

* گستره‌ی میکروبی بر روی یک لام تهیه و ثابت شد.
* رنگ سودان سیاه بر روی نمونه ریخته شد و بعد از 10 دقیقه لام شسته شد.
* لام به مدت 1 دقیقه در محلول زایلول قرار گرفت تا رنگ‌های اضافی خارج شود و مجددا شسته شد.
* رنگ سافرانین به مدت 1 دقیقه اضافه شد.

لام رنگ‌آمیزی شده برای بررسی تولید PHA با بزرگنمایی X1000 میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

### رنگ‌آمیزی فلورسانس

* 10 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به همراه 50 میکرولیتر از رنگ اکریدین اورنج در یک میکروتیوب با هم مخلوط شدند.
* مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در حمام آب 30 درجه ‌سانتی‌گراد انکوبه شد.
* بعد از 30 دقیقه سوسپانسیون در rpm5000 سانتریفیوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد.
* سلول‌های ته نشین شده با آب مقطر شسته شده و مجددا در همین دور سانتریفیوژ شدند.
* محلول رویی دور ریخته شد و سلول‌‌ها در آب مقطر حل شدند.

از این سوسپانسیون گستره بر روی لام تهیه و در طول موج nm490 توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. طول موج نشری این رنگ nm520 و به رنگ نارنجی است.

### استخراج پلیمر و اندازه‌گیری میزان PHA تولیدی

برای استخراج پلیمر از روش هضم هیپوکلریت سدیم-کلروفرم و رسوب با حلال متانول استفاده شد.

* سوسپانسیون سلولی به مدت 10 دقیقه در rpm10000 سانتریفیوژ و محیط کشت رویی دور ریخته شد.
* سلول‌‌ها با آب مقطر شسته شده و مجددا سانتریفیوژ انجام شد.
* 1 گرم جرم تر سلولی با 50 میلی‌لیتر کلروفرم و 50 میلی‌لیتر هیپوکلریت سدیم مخلوط شدند و به مدت 90 دقیقه در حمام آب 30 درجه تیمار شد.
* بعد از 90 دقیقه ظرف محتوی سلول‌‌ها خوب تکان داده شد تا پلیمر در فاز آلی حل و از فاز آبی جدا شود.
* مخلوط حاصل در rpm8000 به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز بالایی (هیپوکلریت سدیم) و فاز میانی (اجزای سلولی) دور ریخته شدند.
* فاز کلروفرم حاوی پلیمر با 4 برابر مقدار حجمی متانول 70% تیمار شد.
* رسوب حاصل با سانتریفیوژ در rpm10000 به مدت 10 دقیقه جداسازی، خشک و توزین شد.

برای گزارش میزان تولید PHA، جرم تر سلولی قبل از استخراج اندازه‌گیری شده و با استفاده از نمودار استاندارد جرم خشک سلولی-جرم تر سلولی به جرم خشک تبدیل و مقدار کمی تولید PHA برحسب جرم PHA تولیدی بر جرم خشک سلولی گزارش شد.

### FTIR

پلیمر استخراج شده به صورت پودر خشک با دستگاه FTIR bio-rad آنالیز شد.

## ‌بهینه‌سازی تولید PHA

7 فاکتور نسبت نیتروژن به کربن، منبع نیتروژن، درصد تلقیح، میزان هوادهی، غلظت گلوکوز و دمای انکوباسیون و pH اولیه در این مرحله مورد بررسی قرار گرفتند.

به دلیل عدم امکان تغییر دور شیکرها برای بررسی فاکتور میزان هوادهی، برای این متغیر مقادیر 25، 50 و 75 تعریف شد که نشان‌دهنده‌ی میزان محیط کشت در ارلن‌های 100 مورد استفاده برای ‌بهینه‌سازی است. در رابطه با میزان تلقیح نیز اعداد مورد استفاده در طراحی آزمایش نشان‌دهنده‌ی مقدار سوسپانسیون باکتریایی دارای جذب در 600 نانومتر برابر با 6 است که برای جداسازی سلول‌‌ها سانتریفیوژ شده و بعد از یکبار شستشو در سالین و سانتریفیوژ مجدد به محیط کشت محدودیت نیتروژن منتقل شدند.منبع نیتروژن 1 آمونیوم سولفات، منبع نیتروژن 2 اوره و منبع نیتروژن 3 آمونیوم نیترات است.

برای هر آزمایش طراحی شده، ابتدا سلول‌‌ها در محیط کشت ‌بهینه‌سازی شده در مرحله‌ی اول به مدت 40 ساعت تا زمان رسیدن به فاز سکون رشد داده شدند. سلول‌‌ها بعد از ورود به فاز سکون در rpm3000 سانتریفیوژ شده و محیط کشت قدیمی دور ریخته شد. برای هر آزمایش طراحی شده مطابق با شرایط، 3 تکرار انجام شد. سلول‌های سانتریفیوژ شده بعد از یک مرحله شستشو در سالین و سانتریفیوژ مجدد به محیط کشت محدودیت نیتروژن وارد شده و 60 ساعت در شیکر قرار داده شدند. بعد از 60 ساعت سلول‌‌ها با سانتریفیوژ rpm10000 به مدت 10 دقیقه جداسازی شده جرم تر سلولی اندازه‌گیری و پلیمر تولیدی استخراج شد. جرم پلیمر تولیدی اندازه‌گیری و با استفاده از جرم تر سلولی اندازه‌گیری شده و نمودار استاندارد جرم تر/جرم خشک به جرم PHA تولیدی/جرم خشک سلولی (w/w) تبدیل شد.

### ‌بهینه‌سازی تک متغیره

در این مرحله در هر سری آزمایش 6 فاکتور ثابت و یک فاکتور متغیر در نظر گرفته شد. مقادیر در نظر گرفته شده برای هر فاکتور در جدول 2 و آزمایشات طراحی شده در جدول 3 نشان داده شده است. آزمایشات طراحی شده انجام و نمودار اثر هر فاکتور روی میزان تولید توده رسم شد.

جدول 2- مقادیر در نظر گرفته شده هر پارامتر در طراحی آزمایشات تک متغیره ‌بهینه‌سازی تولید PHA

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| نسبت نیتروژن به کربن | 0 | 125/0 | 25/0 |  |  |  |
| منبع نیتروژن | اوره | آمونیوم نیترات | آمونیوم سولفات |  |  |  |
| pH | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| درصد تلقیح (میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری) | 25 | 50 | 75 |  |  |  |
| میزان هوادهی (میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن 100) | 25 | 50 | 75 |  |  |  |
| غلظت گلوکوز(گرم بر لیتر) | 10 | 20 | 30 | 40 |  |  |
| دمای انکوباسیون (درجه ‌سانتی‌گراد) | 25 | 30 | 35 |  |  |  |

جدول 3- آزمایشات طراحی شده در ‌بهینه‌سازی تک متغیره تولید PHA

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | منبع نیتروژن | نسبت نیتروژن به کربن | pH | درصد تلقیح (میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری) | میزان هوادهی (میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن 100) | غلظت گلوکوز (گرم بر لیتر) | دمای انکوباسیون (درجه ‌سانتی‌گراد) |
| سری 1 | اوره، آمونیوم سولفات، آمونیوم نیترات | 125/0 | 7 | 50 | 50 | 20 | 30 |
| سری 2 | آمونیوم نیترات | 0 و 125/0و 250/0 | 7 | 50 | 50 | 20 | 30 |
| سری 3 | آمونیوم نیترات | 0 | 4،5،6،7،8،9،10 | 50 | 50 | 20 | 30 |
| سری 4 | آمونیوم نیترات | 0 | 4 | 25،50،75 | 50 | 20 | 30 |
| سری 5 | آمونیوم نیترات | 0 | 4 | 75 | 25،50،75 | 20 | 30 |
| سری 6 | آمونیوم نیترات | 0 | 4 | 75 | 75 | 10،20،30،40 | 30 |
| سری 7 | آمونیوم نیترات | 0 | 4 | 75 | 75 | 40 | 25،30،35 |

### بهینه‌سازی چند متغیره

طراحی آزمایش چند متغیره به روش RSM و الگوریتم box-behnken برای هفت متغیر ذکر شده در بالا انجام شد. مقادیر در نظر گرفته شده در طراحی آزمایش‌های چندمتغیره در جدول 4 نشان داده شده است.

62 آزمایش پیشنهادی توسط نرم‌افزار، انجام شده و مقادیر پلیمر تولیدی از آن‌‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار تجزیه و تحلیل شد.

جدول 4- مقادیر در نظر گرفته شده در طراحی آزمایشات چندمتغیره تولید PHA

|  |  |
| --- | --- |
| نسبت کربن به نیتروژن | 025/0-0 |
| منبع نیتروژن | (3-1) به ترتیب آمونیوم نیترات - اوره- آمونیوم سولفات |
| pH | 10-4 |
| مقدار تلقیح | 75-25 |
| میزان هوادهی | 75-25 |
| غلظت گلوکوز | 40-10 |
| دمای انکوباسیون | 35-25 |

### آزمایش بهینه

بعد از آنالیز داده‌‌ها توسط نرم‌افزار و تعیین شرایط بهینه‌ی تولید PHA، آزمایش بهینه پیشنهادی توسط نرم‌افزار نیز انجام گرفته و مقادیر PHA به دست آمده با مقدار ‌پیش‌بینی شده مقایسه شد.

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

در این مرحله آزمایش بهینه‌ی طراحی شده توسط نرم‌افزار با استفاده از گلوکوز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ به عنوان منبع کربن انجام شد و جرم PHA تولید شده بر جرم خشک سلولی با نتایج به دست آمده از گلوکوز خالص مقایسه شد.

# نتایج

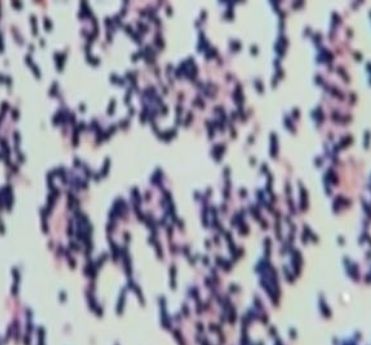
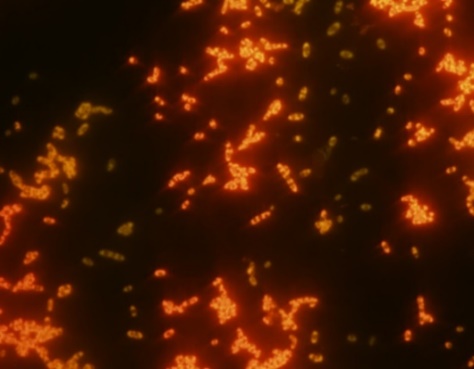
## تایید تولید دانه‌های PHA

### رنگ‌آمیزی سودان سیاه

در این رنگ‌آمیزی دانه‌های PHA تولیدی به رنگ سیاه (سودان سیاه) و سیتوپلاسم سلولی رنگ قرمز (سافرانین) دیده می‌شوند (شکل 1).

### رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج

در این رنگ‌آمیزی حضور رنگ نارنجی نشانگر تولید دانه‌های PHA درون سلول است (شکل 1).



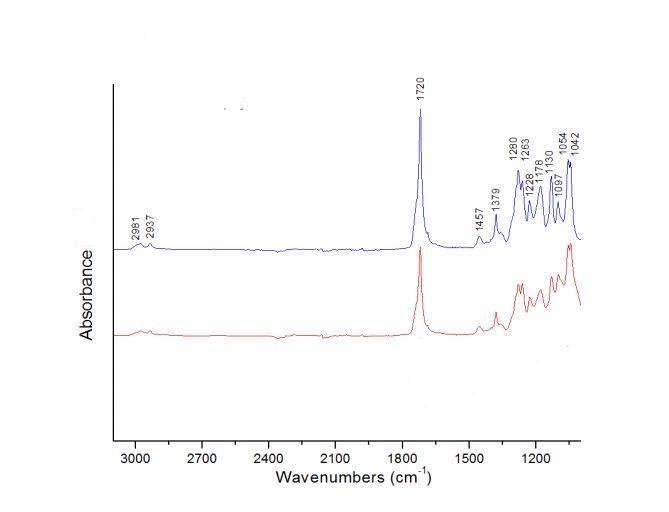
شکل 1- رنگ‌آمیزی سودان سیاه و اکریدین اورنج باکتری *Cupriavidus* *necator* PTCC1615

### استخراج و اندازه‌گیری PHA تولیدی

مقدار PHA تولیدی برحسب "جرم PHA بر جرم خشک سلولی"، در این مرحله 27/0 به دست آمد.

### FTIR

نتایج FTIR پلیمر استخراج شده در (شکل 2) در مقایسه با PHB تجاری نشان داده شده است. باند تشکیل شده در طول موج cm-11720 مربوط به گروه عاملی C=O در پلیمر مشاهده می‌شود.



شکل 2- نتایج FTIR پلیمر استخراج شده (پایین) در مقایسه با PHB تجاری (بالا)

## رسم نمودار استاندارد جرم خشک سلولی-جرم تر سلولی

شکل 3 نمودار استاندارد جرم خشک سلولی-جرم تر سلولی را نشان می‌دهد. مطابق این نمودار حدود 47% جرم باکتری حاوی پلیمر را آب تشکیل می‌دهد.

شکل 3- نمودار استاندارد جرم خشک سلولی-جرم تر سلولی

## ‌بهینه‌سازی تک متغیره

نتایج حاصل از آزمایشات طراحی شده به صورت تک متغیره در زیر آورده شده است. قابل ذکر است که بهترین نتیجه‌ی به دست آمده در هر سری آزمایش برای متغیر مورد نظر، در سایر مرحله‌‌ها لحاظ شده است.

### بررسی اثر pH روی تولید PHA

مطابق شکل 4 در 6pH= بیشرین میزان تولید PHA مشاهده می‌شود.

شکل 4- اثر pH روی میزان PHA تولیدی

### بررسی اثر منبع نیتروژن روی تولید PHA

مطابق شکل 5 میزان تولید PHA در منبع نیتروژن آمونیوم نیترات بیشتر از آمونیوم سولفات و در هر دو بیشتر از اوره است.

شکل 5- اثر منبع نیتروژن روی میزان PHA تولیدی

### بررسی اثر میزان تلقیح روی تولید PHA

مطابق شکل 6 افزایش میزان تلقیح از 50 به 75 سبب کاهش محسوس در تولید شده است.

شکل 6- اثر میزان تلقیح روی میزان PHA تولیدی

### بررسی اثر نسبت نیتروژن به کربن روی تولید PHA

مطابق شکل 7 با افزایش نسبت نیتروژن به کربن میزان تولید PHA کاهش می‌یابد.

شکل 7- اثر نسبت نیتروژن به کربن روی میزان PHA تولیدی

### بررسی اثر غلظت منبع کربن روی تولید PHA

مطابق شکل 8 میزان تولید PHA با افزایش غلظت گلوکز ابتدا کاهش، سپس افزایش و در نهایت ثابت می‌ماند.

شکل 8- اثر غلظت منبع کربن روی میزان PHA تولیدی

### بررسی اثر میزان هوادهی روی تولید PHA

مطابق شکل 9 با کاهش میزان هوادهی تولید PHA اندکی افزایش می‌یابد.

شکل 9- اثر میزان هوادهی روی میزان PHA تولیدی

### بررسی اثر دما روی میزان تولید PHA

مطابق شکل 10 میزان تولید PHA در دمای 25 درجه ‌سانتی‌گراد بیشتر از 35 درجه ‌سانتی‌گراد و در هر دو بیشتر از 30 درجه ‌سانتی‌گراد است.

شکل 10- اثر دما روی میزان PHA تولیدی

## ‌بهینه‌سازی چندمتغیره

62 آزمایش طراحی شده انجام و نتایج در نرم‌افزار وارد شدند و پس از تجزیه و تحلیل نتایج در زیر گزارش شده‌اند.

### طراحی مدل

آنالیز داده‌‌ها برای نتایج مقادیر PHA تولیدی، مدل زیر را ‌پیش‌بینی کرده است:

PHA (g/DCW)\_1 = 2.28 -0.61N/Cratio - 0.188nitrogen source + 0.3513pH   
- 0.0018inoculum - 0.0155air + 0.0013carbon concentration   
- 0.1636temperature - 0.80N/C ratio\*N/Cratio   
+ 0.0498nitrogen source\*nitrogen source - 0.02604pH\*pH  
+ 0.000005 inoculum\*inoculum + 0.000129 air\*air  
+ 0.000207carbon concentration\*carbon concentration  
+ 0.002717 temperature \* temperature  
+ 0.160N/C ratio\*nitrogen source + 0.0000N/C ratio\*pH   
+ 0.0028N/C ratio\*inoculum + 0.0024N/C ratio\*air  
- 0.0111N/C ratio\*carbon concentration   
-0.0083N/C ratio\*temperature + 0.0000nitrogen source\*pH   
- 0.00007nitrogen source\*inoculum + 0.00025nitrogen source\*air  
+ 0.00004nitrogen source\*carbon concentration  
- 0.00125nitrogen source\*temperature + 0.000000pH\*inoculum  
- 0.000000pH\*air - 0.000000pH\*carbon concentration   
- 0.00000pH\*temperature+ 0.000009inoculum\*air  
+ 0.000007 inoculum\*carbon concentration  
- 0.000001 inoculum \* temperature   
-0.000006air\*carbon concentration + 0.000155air\*temperature   
- 0.000279carbon concentration\*temperature

### آزمون سازگاری مدل

برای بررسی مدل طراحی شده توسط نرم‌افزار، مقادیر ‌پیش‌بینی شده براساس مدل با مقادیر واقعی به دست آمده مقایسه شد (شکل 11).

شکل 11- آزمون سازگاری مدل طراحی شده نرم‌افزار با داده‌های واقعی

## بررسی اثر فاکتورها در تولید

نمودارهای بررسی اثر همزمان دو متغیر روی میزان تولید PHA، براساس مدل ‌پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار رسم و در شکل 12 تا شکل 32 نشان داده شده است. در تمامی شکل‌‌ها مقادیر متغیرهای ثابت در کنار عکس‌‌ها ذکر شده است.

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

در شکل 12 بیشینه‌ی تولید در نسبت‌های 0 تا 05/0 نیتروژن به کربن و منابع نیتروژن 1 و 2 (به ترتیب آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات) مشاهده می‌شود.

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\source-ratio.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\souce-ratio.JPG |

شکل 12- اثر همزمان منبع نیتروژن و نسبت نیتروژن به کربن بر روی میزان تولید PHA

### اثر همزمان pH و نسبت نیتروژن به کربن

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ph-ratio-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ph-ratio.JPG |

شکل 13- اثر همزمان pH و نسبت نیتروژن به کربن بر روی میزان تولید PHA

مطابق با شکل 13، بیشینه‌ی تولید در نسبت‌های نیتروژن به کربن 0 تا 05/0 و pH‌های 9/5 تا 9/7 مشاهده می‌شود.

### اثر همزمان میزان تلقیح و نسبت نیتروژن به کربن

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ino-ratio-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ino-ratio.JPG |

شکل 14- اثر همزمان میزان تلقیح و نسبت نیتروژن به کربن بر روی میزان تولید PHA

در شکل 14 بیشترین میزان تولید در نسبت‌های 0 تا 05/0 نیتروژن به کربن و تمامی مقادیر تلقیح رخ می‌دهد.

### اثر همزمان میزان هوادهی و نسبت نیتروژن به کربن

مطابق با شکل 15، بررسی اثر همزمان نسبت نیتروژن به کربن و میزان هوادهی، نمایانگر بهینه‌ی شرایط تولید PHA در نسبت‌های نیتروژن به کربن 0 تا نزدیک 05/0 و مقادیر هوادهی 70 تا 75 است.

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-ratio.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-ratio-2.JPG |

شکل 15- اثر همزمان میزان هوادهی و نسبت نیتروژن به کربن بر روی میزان تولید PHA

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

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-ratio-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-ratio.JPG |

شکل 16- اثر همزمان غلظت منبع کربن و نسبت نیتروژن به کربن بر روی میزان تولید PHA

در شکل 16 بررسی اثر همزمان نسبت نیتروژن به کربن و غلظت گلوکوز، بهینه‌ی شرایط تولید را در غلظت‌های 35 تا 40 گرم بر لیتر گلوکوز و نسبت نیتروژنی 0 تا 05/0 نشان می‌دهد.

### اثر همزمان دما و نسبت نیتروژن به کربن

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

شکل 17- اثر همزمان دما و نسبت نیتروژن به کربن بر روی میزان تولید PHA

بررسی اثر همزمان میزان نسبت نیتروژن به کربن و دما بر روی میزان تولید PHA در شکل 17 بیانگر بالاترین میزان تولید در دمای 25 درجه ‌سانتی‌گراد و نسبت نیتروژن به کربن نزدیک به صفر است.

### اثر همزمان pH و منبع نیتروژن

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ph-source-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ph-source.JPG |

شکل 18- اثر همزمان غلظت pH و منبع نیتروژن بر روی میزان تولید PHA

در شکل 18 بررسی اثر همزمان منبع نیتروژن و pH، نشان‌دهنده‌ی بالاترین میزان تولید در رنج pH 9/5 تا 9/7 برای منابع نیتروژنی 1 و 3 (به ترتیب آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات) است.

### اثر همزمان میزان تلقیح و منبع نیتروژن

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ino-source-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ino-source.JPG |

شکل 19- اثر همزمان میزان تلقیح و منبع نیتروژن بر روی میزان تولید PHA

مطابق با شکل 19، شرایط تولید بهینه در منابع نیتروژنی 1 و 3 ( به ترتیب آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات) در مقادیر تلقیح 25 تا 50 برای آمونیوم نیترات و 25 تا 40 برای آمونیوم سولفات است.

### اثر همزمان میزان هوادهی و منبع نیتروژن

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-source-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-source.JPG |

شکل 20- اثر همزمان میزان هوادهی و منبع نیتروژن بر روی میزان تولید PHA

شکل 20 با بررسی اثر همزمان منبع نیتروژن و میزان هوادهی، نشان‌دهنده‌ی مقادیر بالای تولید در منابع نیتروژنی 1 و 3 (به ترتیب آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات) در مقادیر هوادهی نزدیک به 75 است.

### اثر همزمان غلظت کربن و منبع نیتروژن

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-source-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-source.JPG |

شکل 21- اثر همزمان غلظت کربن و منبع نیتروژن بر روی میزان تولید PHA

مطابق با شکل 21، در بررسی اثر همزمان منبع نیتروژن و غلظت گلوکوز بر میزان تولید PHA، غلظت 38 تا 40 گرم بر لیتر گلوکوز، در دو منبع نیتروژنی 1و 3 (آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات) بهترین نتیجه را نشان می‌دهد.

### اثر همزمان دما و منبع نیتروژن

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

شکل 22- اثر همزمان دما و منبع نیتروژن بر روی میزان تولید PHA

بررسی اثر همزمان دما ومنبع نیتروژن بر روی میزان تولید PHA، نشان‌دهنده‌ی تولید بالا در منبع نیتروژنی 1 (آمونیوم نیترات) در دمای 25 درجه ‌سانتی‌گراد می‌باشد (شکل 22).

### اثر همزمان میزان تلقیح و pH

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ino-ph.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\ino-ph-2.JPG |

شکل 23- اثر همزمان میزان تلقیح و pH بر روی میزان تولید PHA

مطابق شکل 23 بیشینه‌ی تولید PHA در pH‌های 8/5 تا 9/7 و تمامی مقادیر تلقیح رخ می‌دهد.

### اثر همزمان میزان هوادهی و pH

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-ph-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-ph.JPG |

شکل 24- اثر همزمان میزان هوادهی و pH بر روی میزان تولید PHA

شکل 24 با بررسی اثر همزمان pH و میزان هوادهی، بهترین شرایط تولید را در میزان هوادهی نزدیک به 75 و pH‌های 9/5 تا 9/7 نشان می‌دهد.

### اثر همزمان غلظت منبع کربن و pH

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-ph-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-ph.JPG |

شکل 25- اثر همزمان غلظت منبع کربن و pH بر روی میزان تولید PHA

در شکل 25 بررسی اثر همزمان pH و غلظت گلوکوز بر روی میزان تولید، نشان‌دهنده‌ی بهینه‌ی شرایط در pHهای 9/5 تا 9/7 و غلظت‌های 35 تا 40 گرم بر لیتر گلوکز است.

### اثر همزمان دما و pH

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-ph-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-ph.JPG |

شکل 26- اثر همزمان دما و pH بر روی میزان تولید PHA

در شکل 26، بیشترین میزان تولید در رنج pH 8/5 تا 9/7 و دمای 25 تا 27.5 درجه ‌سانتی‌گراد مشاهده می‌شود.

### اثر همزمان میزان هوادهی و میزان تلقیح

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-ino-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\air-ino.JPG |

شکل 27- اثر همزمان میزان هوادهی و میزان تلقیح بر روی میزان تولید PHA

مطابق با شکل 27 در بررسی اثر همزمان میزان تلقیح و میزان هوادهی، مقادیر هوادهی نزدیک به 75 و میزان تلقیح 25 تا 40 بیشترین میزان تولید را نشان می‌دهند.

### اثر همزمان غلظت منبع کربن و میزان تلقیح

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-ino-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-ino.JPG |

شکل 28- اثر همزمان غلظت منبع کربن و میزان تلقیح بر روی میزان تولید PHA

مطابق با شکل 28، در بررسی اثر همزمان میزان تلقیح و غلظت گلوکوز، در غلظت‌های نزدیک به 40 گرم بر لیتر گلوکوز که بهترین شرایط تولید را نشان می‌دهد، مقدار تلقیح اثر چندانی نداشته و در رنج 25 تا نزدیک به 70 مقدار تولید بالایی را دارد.

### اثر همزمان دما و میزان تلقیح

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-ino-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-ino.JPG |

شکل 29- اثر همزمان دما و میزان تلقیح بر روی میزان تولید PHA

در شکل 29 با بررسی اثر همزمان میزان تلقیح و دما، مقادیر تلقیح 25 تا نزدیک 50، در دمای 25 درجه به عنوان مقادیر بهینه معرفی شده است.

### اثر همزمان غلظت منبع کربن و میزان هوادهی

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-air.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\conc-air-2.JPG |

شکل 30- اثر همزمان غلظت منبع کربن و میزان هوادهی بر روی میزان تولید PHA

در شکل 30 بررسی اثر همزمان میزان هوادهی و غلظت گلوکوز، نشان می‌دهد میزان هوادهی 75 در غلظت‌های گلوکوز نزدیک به 40 گرم بر لیتر بیشترین میزان تولید PHA را به همراه دارد.

### اثر همزمان دما و میزان هوادهی

|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-air-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-air.JPG |

شکل 31- اثر همزمان دما و میزان هوادهی بر روی میزان تولید PHA

شکل 31 نشان‌دهنده‌ی اثر همزمان میزان هوادهی و دما بر روی میزان تولید PHA است و میزان هوادهی 70 تا 75 در دو گستره‌ی دمای 5/33 تا 35 و 25 تا 5/27درجه ‌سانتی‌گراد، به عنوان بهترین شرایط تولید نتیجه‌گیری می‌شود.

### اثر همزمان دما و غلظت منبع کربن

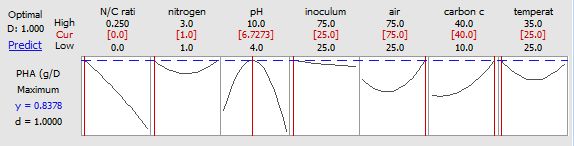
|  |  |
| --- | --- |
| C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-conc-2.JPG | C:\Users\E.coli\Desktop\New Folder (7)\temp-conc.JPG |

شکل 32- اثر همزمان دما و غلظت منبع کربن بر روی میزان تولید PHA

با بررسی اثر همزمان غلظت گلوکوز و دما بر روی میزان تولید PHA، غلظت گلوکوز 40 گرم بر لیتر در دمای 25 درجه ‌سانتی‌گراد به عنوان بهترین مقادیر تولید PHA تعیین شد (شکل 32).

## آزمایش بهینه

در نهایت بهترین شرایط برای بیشینه تولید PHA توسط نرم‌افزار ‌پیش‌بینی و ارائه شد که شامل نسبت نیتروژن به کربن صفر، منبع نیتروژن آمونیوم نیترات، pH=6/7، میزان تلقیح زیاد (25)، میزان هوادهی کم (75)، غلظت گلوکز 40 گرم بر لیتر و دمای 25 درجة سانتی‌گراد است (شکل 33). برای آزمایش بهینة طراحی شده میزان تولید PHA، g/CDW 83/0 توسط نرم‌افزار پیش‌بینی شد که پس از انجام آزمایش میزان تولید PHA، g/CDW 80/0 به دست آمد.



شکل 33- بهینه شرایط ‌پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار برای افزایش میزان تولید PHA

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

در این مرحله میزان تولید g/CDW 78/0 به دست آمد.

# 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 گسترده‌ای 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 پلاستیک،ها تجمع ضایعات پلاستیکی در محیط زیست نگرانی‌های گسترده ای را ایجاد کرده لذا جایگزینی این پلاستیک‌ها با انواع زیست تخریب‌پذیر و سازگار با محیط زیست اهمیت فراوانی پیدا کرده است.

PHAها، پلی استرهای میکروبی هستند که به دلیل تنوع مونومری تنوع بالای خواص و کاربردها را از خود نشان میدهند همچنین این پلاستیک‌ها به دلیل زیست تجزیه پذیری کامل برتری هایی 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 ارزان قیمت 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.

## انتخاب سویه‌ی *Cupriavidus* *necator* ATCC17699

PHAها، توسط سویه‌های باکتریایی مختلفی تولید می‌شوند. *Cupriavidus* *necator* سویه ای است که بیشترین کاربرد را در تولید PHAها داراست این سویه قادر به رشد در تراکم بالا و در محیط‌های ساده است مطالعات گسترده ای در رابطه با تولید PHA روی آن انجام شده و به طور طبیعی و بدون نیاز به دستکاری‌های ژنتیکی قادر به تجمع میزان بالایی از PHAها تا ۹۰ درصد جرم خشک سلولی است. این سویه نخستین سویه‌ی مورد استفاده در تولید صنعتی PHA توسط کمپانی ICI و قادر به تولید PHB و نیز کوپلیمیرهایی از HB و HV است. ویژگی مناسب دیگر این سویه توانایی استفاده از منابع کربن متنوع برای تولید PHA است (Kim et al., 1994).

## تایید تولید PHA توسط FTIR

باند تشکیل شده در طول موج cm-1 1720 مربوط به گروه عاملی CO در پلیمر مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده‌ی حضور PHB در ترکیب است (Hong et al., 1999; Kansiz et al., 2000) مقایسه‌ی طیف پلیمر تولید شده با طیف PHB خالص شرکت سیگما ماهیت PHB بودن پلیمر استخراج شده را تایید می‌کند (شکل 2).

## استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذهای باطله‌ی اداری

انتخاب منبع کربن مناسب فاکتوری ضروری است که هم کیفیت تخمیر و هم هزینه‌ی تمام شده‌ی تولید را تحت تاثیر قرار می‌دهد، هدف انتخاب ارزان‌ترین منبع کربن است که در عین حال بالاترین نرخ رشد سویه و تولید PHA را دارا باشد. گلوکز یکی از مناسب‌ترین منابع کربن برای رشد و تولید PHA و بالاخص هوموپلیمر PHB،   
در *Cupriavidus* *necator* ATCC17699 است. ۷۰ درصد گلوکز موجود در محیط کشت توسط این باکتری به PHA تبدیل می‌شود (Anderson & Dawes, 1990; Jung et al., 2010) از مشکلات قابل‌توجهی که بشر در سال‌های اخیر با آن مواجه بوده تولید و دفع بی رویه مواد زائد از جمله کاغذ و مقوا در محیط زیست است که علاوه بر هدررفت سرمایه‌های ملی باعث آسیب به محیط زیست هم می‌شود در کنار مقوله‌ی بازیافت کاغذ می‌توان استفاده‌های دیگری نیز از این زائدات داشت. استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ برای تولید پلاستیک‌های زیست تخریب پذیر، هم با جمع آوری کاغذ کمکی برای محیط زیست است و هم با تبدیل به پلاستیک زیست تخریب پذیر و جایگزین شدن آن با انواع تخریب ،ناپذیر آسیبهای ناشی از پراکندگی پلاستیک‌‌ها در طبیعت را نیز کم می‌کند هزینه‌ی پایین تولید این گلوکز نیز جایگزینی آن با گلوکز خالص برای تولید پلاستیک را مطلوب می‌کند.

## بررسی مدل ‌پیش‌بینی شده در ‌بهینه‌سازی تولید PHA

مدل ‌پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار برای میزان تولید PHA مقادیر p-value زیر 05/0 را در بررسی‌های آماری با سطح اطمینان ۹۵ دارد که نشان‌دهنده‌ی قابل اعتماد بودن این مدل است. مقایسه مقادیر ‌پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار با مقادیر واقعی به دست آمده که در (شکل 11) نشان داده شده است مطابقت بالایی را نشان می‌دهند

## ‌بهینه‌سازی تک متغیره و چند متغیره به روش box-behnken میزان تولید PHA

همانطور که در بخش 1-3-3 ذکر شده است pHهای ۶ و ۷ بیشترین مقادیر تولید PHA را از خود نشان دادند در بررسیهای چند متغیره ۶.۷۳ pH به عنوان pH بهینه تولید به دست آمد که با نتایج بررسیهای تک متغیره که 6 pH را به عنوان pH بهینه تعیین کرده بود متفاوت اما بسیار نزدیک است. نتایج مشابهی در بررسی‌های Tripathi و همکاران برای Alcaligenes sp با استفاده از اوره و ملاس به دست آمده است (Tripathi et al., 2013). کاهش تولید در pHهای بالای ۷.۵ به دلیل افزایش فعالیت PHA depolymerase و کاهش فعالیتPHA synthase (Tripathi et al., 2013) است.

نتایج به دست آمده در مورد بررسی اثر منبع ،نیتروژن نشان‌دهنده‌ی تولید بالا به ترتیب در منابع نیتروژن آمونیوم سولفات آمونیوم نیترات و اوره است که بیانگر ترجیح میکروارگانیسم در استفاده از نیتروژن غیر آلی برای تولید PHA است نتایج بررسیهای Khanna و همکاران در حضور فروکتوز نیز موید این مطلب است (Khanna & Srivastava, 2005). منبع نیتروژن ۱ (آمونیوم نیترات) در بررسی‌های چند متغیره بیشینه‌ی تولید را از خود نشان داد در حالی که در بررسیهای تک متغیره آمونیوم سولفات و آمونیوم نیترات نتایج مشابهی را از خود نشان داده بودند و به دلیل ارزانی آمونیوم سولفات این منبع کربن برای انجام آزمایشات تک متغیره و منبع نیتروژن بهینه انتخاب شده بود. دلیل این امر اثر متقابل سایر فاکتورها بالاخص نسبت نیتروژن به کربن روی منبع نیتروژن است (Shoaei-parchin, 2015). تولید توده سلولی بالا در حضور اوره و عدم تولید PHA در حضور همین منبع نیتروژن توسط Rmadas همکاران گزارش شده است (Ramadas et al., 2010). علت اختلاف نتایج بررسی‌های تک متغیره و چند متغیره را می‌توان در میانکنشها جستجو کرد. مقادیر مختلف نسبت نیتروژن به کربن روی الگوی تولید در منابع مختلف نیتروژن اثر می‌گذارد و با وجود اینکه در نسبت نزدیک به 125/0 میزان تولید در آمونیوم نیترات و آمونیوم سولفات مشابه است اما با کاهش این نسبت اختلاف تولید در این دو منبع نیتروژن نیز بیشتر می‌شود (Shoaei-parchin, 2015).

نتایج به دست آمده در بررسی اثر هوادهی روی میزان تولید PHA نمایانگر افزایش تولید PHA در صورت کاهش هوادهی است. در بررسیهای چند متغیره میزان هوادهی ۷۵ به عنوان میزان بهینه بدست آمد که با نتایج حاصل از بررسیهای تک متغیره تطابق دارد الگوی تاثیر هوادهی روی میزان تولید PHA با نتایج Du و همکاران با استفاده از گلوکز و آمونیوم سولفات و Ishizaki و همکاران با استفاده از کربن دی اکسید در مورد همین سویه و Tripathi و همکاران با استفاده از ملاس و اوره در Alcalignes sp مطاقبت دارد (Du et al., 2000; Ishizaki & Tanaka, 1991; Tripathi et al., 2013) محرومیت از اکسیژن مسیر متابولیسمی سلول‌ها را تغییر می‌دهد. در این شرایط NADPH درون سلول اکسید نشده و در نتیجه بازده چرخه‌ی کربس کاهش می‌یابد و همین امر سبب تجمع یافتن استیل کوآنزیم آ در درون سلول و کاهش کوآنزیم آ آزاد درون سلول می‌شود افزایش نسبت استیل کوآنزیم آ/کوآنزیم آ باعث فعالیت B ketothiolase شده که شرایط مناسبی برای تشکیل PHA ایجاد می‌شود (Anderson & Dawes, 1990; Du et al., 2000). دلیل اختلاف در نتایج بررسیهای تک متغیره و چندمتغیره را باید در میانکنشها جستجو کرد مقادیر مختلف تلقیح روی الگوی تولید در هوادهی‌های مختلف تاثیر می‌گذارد و در مقادیر تلقیح زیاد (۲۵) میزان تولید در وادهی‌های ۷۵ و ۵۰ با هم اختلاف بیشتری پیدا می‌کند (Shoaei-parchin, 2015).

نتایج ذکر شده در بخش 4-3-3 نشان‌دهنده افزایش تولید PHA در صورت کاهش نسبت نیتروژن به کربن است. در بررسیهای چند متغیره نسبت نیتروژن به کربن نزدیک به صفر به عنوان میزان بهینه به دست آمد که نتایج بررسی‌های تک متغیره را تایید می‌کند افزایش تولید PHA همزمان با کاهش نسبت نیتروژن به کربن مشابه نتایج به دست آمده توسط Yang و همکاران با استفاده از اسیدهای آلی و آمونیوم ،کلرید Ishizaki و همکاران با استفاده از کربن دی اکسید Loo و همکاران با استفاده از اوره و Reddy و همکاران است (Ishizaki & Tanaka, 1991; Loo & Sudesh, 2007; Reddy & Mohan, 2012; Yang et al., 2010). با افزایش میزان نیتروژن مسیر متابولیکی سلول در جهت رشد و تقسیم عمل می‌کند و تولید PHA متوقف می‌شود (Loo & Sudesh, 2007).

مطابق نتایج به دست آمده افزایش غلظت گلوکز تا ۳۰ گرم بر لیتر باعث افزایش تولید PHA می‌شود و افزایش بیشتر غلظت تاثیری در میزان تولید ندارد. در بررسیهای تک متغیره غلظت گلوکز ۳۰ گرم بر لیتر به عنوان میزان بهینه به دست آمد که با نتایج بررسیهای تک متغیره که در آن غلظت ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز به عنوان مقادیر بهینه به دست آمده‌اند اندکی تفاوت را نشان می‌دهد که دلیل می‌توان اثرات متقابل سایر فاکتورها روی غلظت گلوکز دانست. نتایج Khanna و همکاران نیز همین نتیجه را با استفاده از فروکتوز به عنوان منبع کربن و اوره گزارش کرده‌اند (Khanna & Srivastava, 2005). توقف افزایش تولید PHA در غلظتهای بیش از حد گلوکز به دلیل اثر مهاری سوبسترا روی بیوسنتز PHA رخ می‌دهد (Purushothaman et al., 2001). دلیل تفاوت نتایج در بررسی‌های تک متغیره و چند متغیره را باید در میانکنشها جستجو کرد. مقادیر مختلف نسبت نیتروژن به کربن روی الگوی تولید در مقادیر مختلف غلظت گلوکز اثر می گذارد و در نسبت‌های نیتروژن به کربن کم، مقادیر تولید در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز با هم اختلاف پیدا می‌کنند. همچنین مقادیر مختلف دما نیز روی الگوی تولید در غلظت‌های مختلف گلوکز اثر می‌گذارد و در دمای ۲۵ درجه ‌سانتی‌گراد میزان تولید در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز با هم اختلاف پیدا می‌کند ((Shoaei-parchin, 2015)).

نتایج ذکر شده در بخش 3-3-3 نشان‌دهنده‌ی افزایش در تولید با افزایش تراکم سلولی یا میزان تلقیح (میزان تلقیح۲۵) است در بررسی‌های چند متغیره نیز مانند بررسی‌های تک متغیره میزان تلقیح زیاد (۲۵) به عنوان میزان بهینه بدست آمد. افزایش میزان تولید PHA در اثر افزایش غلظت سلول‌های در معرض محدودیت نیتروژن در پژوهش Kim و همکاران برای این سویه در حضور گلوکز و آمونیوم سولفات گزارش شده است (Kim et al., 1994). کاهش میزان تلقیح باعث کاهش جمعیت سلولی در محیط شده و همین امر سبب می‌شود تعداد سلول‌ها بسیار کمتر از منابع محیط کشت باشد و تمامی منابع موجود مورد استفاده قرار نگیرند. این امر میزان PHA تولید شده را کاهش می‌دهد (Ramadas et al., 2010). علت تفاوت نتایج بررسی‌های تک‌متغیره و چندمتغیره را باید در میانکنش‌‌ها جستجو کرد. مقادیر مختلف نسبت نیتروژن به کربن روی الگوی تولید در مقادیر مختلف تلقیح تاثیر می‌گذارد و در نسبتهای کم نیتروژن به کربن مقادیر تولید در تلقیح‌های ۲۵ و ۵۰ اختلاف پیدا می‌کند ((Shoaei-parchin, 2015)).

مطابق نتایج بررسی‌های تک متغیره دمای ۲۵ درجه ‌سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه‌ی تولید PHA دست آمد که بررسی‌های چندمتغیره نیز این دما را تایید کرد. دما فاکتور مهمی است که متابولیسم سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. افزایش دما قادر به خنثی کردن اثرات استرس‌های تغذیه‌ای و محیطی است و آنرا تعدیل می کند. در نتیجه افزایش دما می‌تواند تولید PHA را کاهش دهد (Kim & Shin, 1996).

## مقایسه‌ی میزان تولید PHA قبل و بعد از ‌بهینه‌سازی

میزان محتوای PHA درون سلول بعد از تمامی مراحل ‌بهینه‌سازی از 27/0 به 80/0 گرم بر جرم خشک سلولی به دست آمد که ۱۹۶٪ افزایش تولید نسبت به قبل از ‌بهینه‌سازی نشان می‌دهد (جدول ). مطالعات زیادی روی میزان تولید PHA در باکتریهای مختلف و محیطهای کشت متنوع انجام شده است. این تفاوت در تولید احتمالا به دلیل تنوع در محیطهای کشت و منابع کربن استفاده از سویه‌های مختلف و حتی جهش یافته و تنوع در شرایط کشت و نوع کشت است (Hafuka et al., 2011).

جدول 6- مقایسه‌ی میزان تولید PHA در مراحل مختلف ‌بهینه‌سازی

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 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 چندمتغیره | 33/6 | 44/10 | 1.30E+10 |

## مقایسه‌ی میزان تولید PHA در گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ با گلوکز خالص

در ‌بهینه‌سازی میزان تولید PHA با استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه آنزیمی کاغذ اندکی کاهش نسبت به گلوکز خالص نشان می‌دهد (جدول ).

جدول 7- مقایسه‌ی میزان تولید PHA در گلوکز خالص و حاصل از تجزیه‌ی 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 | 1.26E+10 |

# نتیجه‌گیری

در این پژوهش ‌بهینه‌سازی تولید *PHA* در *Cupriavidus necator ATCC17699* با استفاده از گلوکز حاصل از تجزیه‌ی آنزیمی کاغذ به عنوان منبع کربن انجام شد.

افزایش بازده تولید PHA هم نیازمند توده‌ی سلولی زنده بالا و هم نیازمند شرایط مناسب برای افزایش تجمع PHA درون سلول است بنابراین در این پژوهش با انجام کشت دو مرحله ای و تولید توده بهینه (Shoaei-parchin, 2015) و ‌بهینه‌سازی تولید PHA با هم شرایط مناسب برای افزایش هرچه بیشتر تولید PHA ایجاد شده است. انتخاب سویه‌ی با بازده بالای تولید و منبع کربن مناسب برای این سویه از دیگر شرایط ایجاد شده برای افزایش هرچه بیشتر تولید نهایی است که با 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 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 میزان تولید PHA، 196%افزایش نشان داد و به ۸۰٪ جرم خشک سلولی رسید که میزان قابل‌توجهی است.

# مراجع

Anderson, A. J., & Dawes, E. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, *54*(4), 450–472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/mr.54.4.450-472.1990>

Chen, G.-Q. (2010). Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, 17–37. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_2>

Du, G.-C., Chen, J., Gao, H.-J., Chen, Y.-G., & Lun, S.-Y. (2000). Effects of environmental conditions on cell growth and poly-β-hydroxybutyrate accumulation in Alcaligenes eutrophus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *16*, 9–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1008922113483>

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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.018>

Hong, K., Sun, S., Tian, W., Chen, G., & Huang, W. (1999). A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *51*, 523–526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s002530051427>

Ishizaki, A., & Tanaka, K. (1991). Production of poly-β-hydroxybutyric acid from carbon dioxide by Alcaligenes eutrophus ATCC 17697T. *Journal of fermentation and bioengineering*, *71*(4), 254–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90277-N>

Jung, Y. K., Lee, S. Y., & Tam, T. T. (2010). Towards systems metabolic engineering of PHA producers. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, 63–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_4>

Kansiz, M., Billman-Jacobe, H., & McNaughton, D. (2000). Quantitative determination of the biodegradable polymer poly (β-hydroxybutyrate) in a recombinant Escherichia coli strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariative statistics. *Applied and environmental microbiology*, *66*(8), 3415–3420. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3415-3420.2000>

Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by Ralstonia eutropha. *Process Biochemistry*, *40*(6), 2173–2182. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.011>

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. <https://doi.org/> <https://doi.org/10.1002/bit.260430908>

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.

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

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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s004490100240>

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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12010-009-8807-5>

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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.127>

Shoaei-parchin, N. (2015). *Optimization of polyhydroxyalkanoat production from glucose resulting from enzymatic digestion of paper by Cupriavidus necator ATCC 17699* Ferdowsi University of Mashhad].

Tanadchangsaeng, N., & Yu, J. (2012). Microbial synthesis of polyhydroxybutyrate from glycerol: gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. *Biotechnology and bioengineering*, *109*(11), 2808–2818. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.24546>

Tripathi, A. D., Srivastava, S. K., & Singh, R. P. (2013). Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by Alcaligenes sp. *Biomass and bioenergy*, *55*, 243–250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.017>

Verlinden, R. A., Hill, D. J., Kenward, M., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of applied microbiology*, *102*(6), 1437–1449. <https://doi.org/ttps://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>

Wang, J., & Yu, J. (2001). Kinetic analysis on formation of poly (3-hydroxybutyrate) from acetic acid by Ralstonia eutropha under chemically defined conditions. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, *26*(3), 121–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000097>

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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-010-2699-8>