فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۴، پیاپی ۷۰، زمستان ۱۴۰۰، ص ۶۸-۹۳
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.4, Sering.70, winter 2021, p. 68-93
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۸

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir

10.22051/JAB.2021.34309.1398

بررسی عوامل موثر بر بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات (PHBV) به روش پلاکت-برمن و بهینه‌سازی بهره‌وری تولید با تکنیک کشت سلولی با تراکم بالا

ندا سینائی[۱]، داود زارع *[۲]، مهرداد آذین[۳]

چکیده

PHAs پلیمرهایی زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار هستند که توسط طیف گسترده‌ای از باکتریها تولید می‌شوند. در پژوهش حاضر، از سویه طبیعی Bacillus cereus تولیدکننده کوپلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو والرات (PHBV) با بهره‌وری تولید بالا جداسازی شده از پساب نشاسته استفاده گردید. به منظور تولید، پساب نشاسته بعنوان یک محیط کشت ارزان‌قیمت بررسی و در ادامه، ترکیب بهینه محیط کشت و بمنظور دستیابی به بهره‌وری بالاتر، روش کشت با تراکم بالای سلولی ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که میانگین حداکثر تولید PHBV با استفاده از طراحی آزمایش پلاکت-برمن، حدود ۵۹/۵٪ وزن خشک سلول است. در ادامه با بهینه سازی کشت با تراکم بالای سلولی، تولید به بیش از ۷۲٪ وزن خشک سلول افزایش یافت. بنابراین روش کشت سلولی با تراکم بالا تاثیر معناداری بر بالا بردن بهره‌وری تولید PHBV دارد. با توجه به بکارگیری محیط کشت ارزان‌قیمت پساب، اهمیت این نتایج دوچندان بوده و پتانسیل تولید در مقیاس صنعتی را نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: پساب نشاسته، پلی‌هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات، روش پلاکت-برمن، Bacillus cereus، PHBV

---

۱ . دکتری پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
۲ . استادیار، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران * نویسنده مسئول: zare@irost.ir
۳ . استاد، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران

مقدمه

پلاستیک‌های زیستی، پلیمرهای زیستی صنعتی مهمی هستند که تحت هر شرایط محیطی توسط فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌ها تجزیه می‌شوند. در حال حاضر بیوپلیمرهایی مانند پلی‌هیدروکسی‌آلکان‌ها، پلی‌ساکاریدها، پلی‌لاکتیک‌ها و پلی‌استرهای‌آلیفاتیک گزینه‌هایی مناسب جهت جایگزیی پلاستیک‌های پتروشیمیایی هستند. در میان این بیوپلیمرها، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs) به دلیل دارا بودن ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی بسیار مشابه با پلاستیک‌های سنتزی و قابلیت تجزیه‌پذیری کامل در محیط، توجه بسیاری از محققان جهان را به‌خود جلب کرده‌اند (Guillet, 2004). پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها، پلی استرهای هیدروکسی‌آلکانوات‌ها هستند و وزن مولکولی آن‌ها بر حسب نوع میکروارگانیسم و شرایط رشد در محدوده ۲×۱۰^{۵} تا ۳×۱۰^{۶} دالتون قرار دارد (Lenz & Marchessault, 2005).

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها توسط دامنه وسیعی از باکتری‌ها در شرایط خاص تولید می‌شوند. تقریبا ۳۰۰ نوع ریزسازواره، شامل انواع گرم مثبت و منفی شناسایی شده است که قادر به ذخیره سازی انواعی از پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها از جمله PHB و PHBV به عنوان منبع ذخیره کربن در داخل سلول خود هستند (Akaraonye *et al*., 2010). از ویژگی‌های پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها می‌توان به خاصیت زیست تخریب پذیری، سازگاری با سیستم‌های حیاتی ، طبیعت پلی استری و خاصیت ترمو پلاستیکی اشاره کرد. این ویژگی‌ها سبب کاربردهای فراوان پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به عنوان پوشش به منظور رهایش کنترل شده داروها و حشره‌کش‌ها، استفاده به عنوان جایگزین‌های استخوانی (پروتزها)، نخ و دستکش‌های جراحی، بکارگیری به عنوان جایگزین عروق خون و درنهایت بسته‌بندی شده است (Mohan *et al*., 2016).

با وجود فواید و ویژگی‌های منحصر به فرد بیوپلاستیک‌ها، تولید این مواد به صورت صنعتی با چالش‌های جدی روبروست. یکی از بزرگترین مشکلاتی که مانع از تجاری شدن این بیوپلیمرها می‌گردد هزینه‌ی بالای تولید آن‌ها می‌باشد(Aragão *et al*., 2009). قیمت منبع کربن یک فاکتور اساسی در قیمت تمام شده پلاستیک‌زیستی است و بیشترین نقش را در کل هزینه‌ی تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکان‌ها داراست. به‌این‌ترتیب کاهش قیمت سوبسترا و استفاده از منابع کربنی ارزان‌قیمت و دستیابی به سویه‌هایی که توانایی مصرف این نوع منابع کربن را داشته باشند استراتژی‌هایی هستند که در حال بررسی هستند. استفاده از منابع کربنی ارزان‌قیمت به منظور تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکان‌ها می‌تواند منجر به افزایش ارزش تجاری این پلیمرها گردد (Dalcanton *et al*., 2010., Batcha *et al*., 2014).

نشاسته، پلیمری از مولکول‌های گلوکز است که بر اساس منبع تولید آن (ذرت، گندم، سیب زمینی، برنج و تاپیوکا) از پر مصرف‌ترین افزودنی‌ها در محصولات غذایی مختلف است. طی فرایند تولید نشاسته از گندم و انجام مراحل تهیه خمیر و هموژن

کردن آن، جدا سازی گلوتن و همچنین شستشو و آبگیری و خشک کردن نشاسته، پسابی تولید می‌شود که از طرفی دارای اکسیژن خواهی شیمیایی (COD) و اکسیژن خواهی زیستی (BOD) بالایی بوده و رهاسازی آن در طبیعت مشکلات زیست‌محیطی فراوانی به‌دنبال دارد و از طرف دیگر دارای مقادیر قابل توجهی قند و نشاسته قابل مصرف توسط باکتری است. بنابراین این پساب می‌تواند به عنوان یکی از بهترین منابع کربنی ارزان قیمت جهت تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

در راستای بررسی موارد مذکور، تحقیق حاضر پیرو مطالعه پیشین که به غربالگری جدایه‌ها با قابلیت رشد و بهره‌وری تولید بالا با استفاده از منبع کربن ارزان‌قیمت پساب نشاسته‌ای پرداخته بود، با بررسی عامل‌های مؤثر، ترکیب بهینه محیط کشت برای سویه برتر مورد بررسی را ارزیابی و به منظور دستیابی به بهره‌وری بالاتر تولید، روش کشت با تراکم بالای سلولی را مورد سنجش قرار می‌دهد.

مواد و روش ها

سویه باکتری مورد مطالعه: در این پژوهش باکتری وحشی *Bacillus cereus* غربال شده از پساب نشاسته طی تحقیقات قبلی به‌عنوان سویه تولید کننده کوپلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات مورد بررسی قرار گرفت (Sinaei *et al*., 2021).

تهیه محیط پیش کشت

محیط پیش کشت Nutrient broth در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر تهیه و پس از تنظیم pH بر روی ۷، به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو و پس از تلقیح با باکتری جداسازی شده در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه گرماگذاری شد. جذب نوری نمونه‌ها (OD) هر ۳ ساعت یکبار با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی فرابنفش (Biochrom WPA Biowave II, Cambridge, UK) در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. هنگامی که غلظت سلولی در محیط Nutrient broth برابر ۱ مک فارلند (۳×۱۰^{۸} سلول در هر میلی‌لیتر) گردید، ۲/۵ میلی‌لیتر از محیط پیش کشت به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید انتقال یافت که غلظتی معادل ۵٪ (حجمی/حجمی) ایجاد گردد.

تهیه محیط کشت صنعتی تولید

پساب نشاسته‌ای شرکت آردینه (واقع در اصفهان) جمع‌آوری و تا زمان استفاده در دمای ۲ تا ۴ درجه سلسیوس ذخیره شد. بر اساس نتایج آنالیزهای انجام گرفته، پساب موردنظر حاوی ۲۱/۳ گرم در لیتر قند احیاشده و ۱۹/۱ گرم در لیتر نیتروژن کل بود.

برای از بین بردن مواد جامد معلق، نمونه‌های اتوکلاو شده در سانتریفیوژ با ۵۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند. سپس مایع رویی با ۱۸/۱ گرم در لیتر قند احیاشده و ۲/۹ گرم در لیتر نیتروژن کل، جدا و به عنوان محیط کشت تولید جهت بررسی میزان تولید پلیمر زیستی توسط جدایه‌های باکتریایی انتخاب شده استفاده شد. به منظور دستیابی به محیطی مشابه DM9 که محیط کشت ساختگی مناسبی برای تولید پلیمر زیستی است، پساب رسوب‌گذاری شده به میزان ۴ بار رقیق گردید تا حاوی ۴/۴۹ گرم در لیتر قند احیاشده و ۰/۷۱ گرم در لیتر نیتروژن کل گردد.

بررسی عامل‌های موثر بر بهینه سازی تولید پلیمر زیستی با روش پلاکت-برمن

طراحی آزمایش به روش پلاکت- برمن به منظور تعیین مهم‌ترین متغیرهای موثر که در مقالات به آنها اشاره شده بود، توسط نرم افزار Minitab 16 انجام شد. طراحی آزمایشات پلاکت-برمن با ۷ متغیر در دو سطح و با سه تکرار انجام گردید. شرایط کشت در جدول زیر آورده شده است. جهت انجام آزمایشات مطابق روش تک عاملی ابتدا باکتری در محیط Nutrient broth کشت و در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. زمانی که میزان جذب آن برابر یک مک‌فارلند گردید مطابق جدول به محیط‌های کشت طراحی شده تولید، تلقیح و مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی آزمایش به روش پلاکت-برمن

جدول ۱: طراحی آزمایش به روش پلاکت-برمن

→	C3	C4	C5	C6	C7	C8-T	C9	C10	C11
	CenterPt	Blocks	Agitation	Volume of media	Inoculum size	Persipitation	Dilution(%)	Sodium acetate(g/l)	Ethanol
2	1	1	120	100	1	no	25	0.1	1.0
3	1	1	200	50	5	yes	50	2.0	0.1
4	1	1	120	100	1	yes	25	0.1	0.1
5	1	1	200	100	5	no	25	0.1	0.1
6	1	1	120	50	5	yes	25	2.0	0.1
7	1	1	200	100	1	no	25	2.0	0.1
8	1	1	200	50	1	no	50	0.1	1.0
9	1	1	120	50	1	no	50	2.0	0.1
10	1	1	200	100	5	yes	25	0.1	1.0
11	1	1	120	50	1	yes	50	2.0	1.0
12	1	1	200	100	1	yes	50	0.1	0.1
13	1	1	200	50	1	yes	25	2.0	1.0
14	1	1	120	50	5	no	50	0.1	0.1
15	1	1	120	100	5	no	25	2.0	1.0
16	1	1	200	50	5	no	50	2.0	1.0
17									

نتایج حاصل از آزمایشات طراحی شده به روش پلاکت-برمن (جدول ۱) نشان داد که فقط عامل رسوب‌گذاری دارای تاثیر معنی‌داری بر مقدار PHBV تولید شده است. به همین دلیل و به منظور یافتن عامل موثری که بتوان تولید پلیمرزیستی را افزایش داد و به دلیل اینکه محیط کشت صنعتی مورد استفاده محیط پیچیده پساب نشاسته‌ای است، عامل‌ها بصورت تک عاملی بررسی و نتایج قبلی نیز صحت سنجی گردید.

بررسی تاثیر نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت صنعتی

نسبت کربن به نیتروژن عامل مهمی در تولید پلیمرهای ذخیره‌ای محسوب می‌شود. آنالیز اولیه پساب نشاسته نشان داد که حاوی ۲۱/۳ گرم بر لیتر قند و ۱۹/۱ گرم بر لیتر نیتروژن کل است. از آنجاییکه محیط کشت صنعتی مورد استفاده (پساب نشاسته) حاوی مقدار بالایی نیتروژن است، به‌منظور کاهش میزان نیتروژن و دستیابی به نسبت بهینه کربن به نیتروژن، نمونه‌های محیط کشت پساب نشاسته‌ای در سه حالت بدون رسوب‌گذاری، رسوب‌گذاری جزئی و رسوب‌گذاری کامل بررسی و میزان کربن و نیتروژن آن‌ها اندازه‌گیری شد. جهت دستیابی به محیط کشت صنعتی با رسوب‌گذاری جزئی، پساب نشاسته‌ای به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ گردید و محیط کشت پساب نشاسته با رسوب‌گذاری کامل، از سانتریفوژ محیط کشت صنعتی مذکور با سرعت۵۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه حاصل گردید. پس از رسوب گذاری مقدار کربن و نیتروژن محلول رویی بررسی شد و سپس ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مذکور به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردیده و پس از تنظیم pH بر روی ۷، اتوکلاو و از محیط پیش کشت تلقیح گردید و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و چرخش ۱۵۰ دور بر دقیقه قرار گرفت. در نهایت میزان ماده خشک سلولی و پلیمر زیستی تولید شده در فازهای مختلف رشد در مدت زمان ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و مقایسه گردید.

بررسی تاثیر غلظت قند محیط کشت صنعتی

از آنجاییکه پساب نشاسته دارای گرانروی بالایی بوده و درصد قند بالایی دارا است و به‌منظور بررسی محدوده وسیعی از میزان کربن، دو رقت ۲۵٪ و ۵۰٪ و نمونه رقیق نشده این محیط کشت مورد مقایسه قرار گرفت. در این مرحله، شرایط بهینه مرحله قبل اعمال گردید و بقیه عامل‌ها ثابت باقی ماند. سپس با توجه به میزان پلیمر زیستی تولید شده و بهره‌وری مربوطه، بهترین میزان غلظت محیط کشت پساب نشاسته‌ای برای مراحل بعدی بدست آمد.

بررسی تاثیر تغییر نسبت حجم محیط کشت به حجم کل ظرف

نسبت حجم محیط کشت به حجم کل می‌تواند بر میزان هوادهی محیط کشت و سرعت تکثیر سلولی تاثیر گذار باشد. در این پژوهش به منظور ارزیابی اثر این عامل بر بهره‌وری تولید پلیمر زیستی، سه حجم ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری مقایسه گردید.

بررسی تاثیر درصد تلقیح محیط پیش کشت به محیط کشت صنعتی

در این قسمت از پژوهش، میزان درصدهای مختلف تلقیح از محیط پیش کشت تهیه شده به محیط کشت تولید (پساب نشاسته‌ای)، مورد بررسی قرار گرفت. هنگامی که غلظت سلولی در محیط پیش کشت برابر یک مک‌فارلند (۳×۱۰^{۸} سلول در هر میلی‌لیتر) گردید، بر اساس مقالات، مقادیر ۰/۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌لیتر محیط پیش کشت به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید انتقال یافت که به ترتیب غلظتی معادل ۱٪، ۵٪ و ۱۰٪ (حجمی/حجمی) ایجاد نمود. سپس میزان پلیمر زیستی تولید شده و بهره‌وری تولید اندازه‌گیری و ارزیابی گردید.

بررسی تاثیر افزودن ترکیبات محرک تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات به محیط کشت تولید

بررسی منابع نشان می‌دهد که افزودن ترکیباتی چون استات سدیم و اتانول به ترکیب محیط کشت، باعث افزایش تولید پلیمر زیستی می‌شود. علت تئوری مطرح شده این است که وجود اتانول در محیط کشت می‌تواند رشد باکتری را متوقف ساخته و مسیر بیوشیمیایی تولید پلیمرزیستی با سرعت بیشتری پیش رود. سدیم استات نیز مهار کننده چرخه TCA در سلول است. با توجه به مسیر سنتز PHA در باکتری‌ها، در استفاده از استیل کوآ بین چرخه کربس و مسیر تولید پلیمر رقابت وجود دارد. بنابراین هنگام وجود سدیم استات اضافی در محیط کشت، چرخه کربس مهار می‌شود و تولید PHA افزایش می یابد. لذا تاثیر این دو ماده بصورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. استات سدیم در غلظتهای ۰/۱ و ۲ گرم بر لیتر و اتانول در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌لیتر بر لیتر به محیط‌های کشت افزوده و میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات حاصل با نمونه بلانک که فاقد ماده مورد بررسی بود مقایسه آماری گردید.

بررسی اثر میزان هوادهی بر بهره‌وری تولید پلیمر در محیط کشت صنعتی

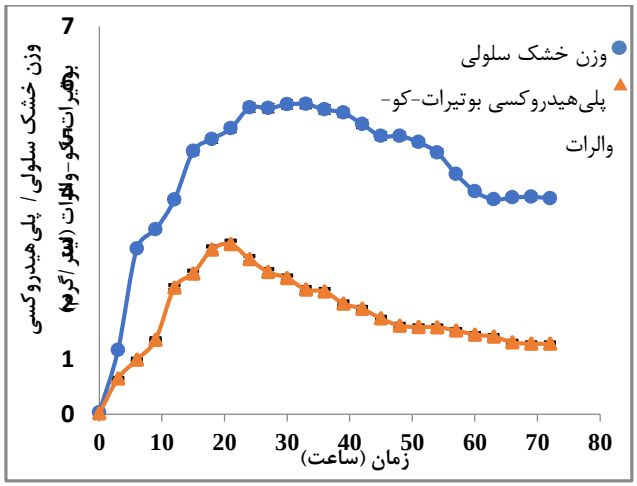
ارلن‌های حاوی محیط کشت صنعتی در انکوباتور شیکردار با دورهای متفاوت ۱۲۰ و ۲۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شدند و میزان پلیمر زیستی تولید شده مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه سازی تولید پلیمر زیستی با روش کشت با تراکم سلولی بالا

در این مرحله از تحقیق، تاثیر کشت با تراکم سلولی بالا بر بهره‌وری تولید مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل انجام آزمایشات در ارلن، امکان ایجاد شرایط خوراک‌دهی مداوم جهت ارزیابی تکنیک کشت با تراکم سلولی بالا میسر نبود. بنابراین در کلیه مراحل، از محیط کشت بهینه‌سازی شده طی مراحل قبل استفاده گردید و سپس با انتقال توده سلولی به شرایط کشت جدید، میزان تاثیر این روش بر بهره وری تولید PHBV سنجیده شد.

بررسی تاثیر زمان انتقال توده سلولی به محیط کشت صنعتی تازه

با توجه به منحنی رشد باکتری و تولید پلیمر زیستی در فازهای مختلف رشد در محیط کشت ساختگی DM9 (شکل ۱)، بهترین زمان انتقال توده سلولی حاصل به محیط کشت صنعتی تازه بررسی شد. به این منظور، کل توده سلولی رشدیافته در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت پساب نشاسته‌ای در سه زمان ابتدای فاز لگاریتمی (ساعت ۶)، انتهای فاز لگاریتمی (ساعت ۱۲) و اواسط فاز سکون (ساعت ۲۷)، با سانتریفیوژ رسوب‌گذاری شد و در شرایط استریل به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت صنعتی مشابه ولی تازه افزوده شد و تاثیر آن بر میزان بهره‌وری تولید پلاستیک‌زیستی مقایسه گردید.



شکل ۱: نمودار رشد و تولید پلیمرزیستی توسط سویه *B. cereus* مورد بررسی در محیط کشت ساختگی DM9

بررسی تاثیر نوع محیط پیش کشت بر میزان بهره‌وری تولید

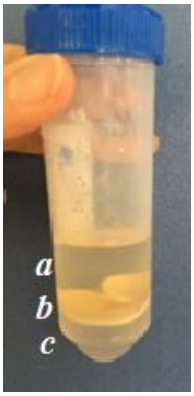
به منظور بررسی میزان تاثیر نوع محیط پیش کشت، دو نوع محیط پیش کشت جهت فعال نمودن سلول‌ها قبل از مرحله تولید در محیط کشت صنعتی مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از آن‌ها محیط Nutrient broth ، و دیگری محیط پساب نشاسته‌ای مشابه با محیط کشت تولید است. سپس درصد تجمع پلیمر و بهره‌وری تولید محاسبه و نتایج مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

بررسی تاثیر غلظت توده سلولی منتقل شده بر میزان بهره‌وری تولید

در این مرحله، توده سلولی با ۳ نسبت متفاوت ۱:۱/۲، ۱:۱ و ۱:۲ به محیط کشت صنعتی تولید اضافه و با اندازه‌گیری میزان تولید پلیمر زیستی در فواصل زمانی ۳ ساعت یکبار، بهترین غلظت سلولی محاسبه گردید. برای نسبت ۱:۱ کل توده سلولی رشد یافته در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت اولیه، رسوب‌گذاری و به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت پساب نشاسته‌ای تازه اضافه شد و برای نسبت‌های ۱/۲ و ۲ به ترتیب نصف و دو برابر حجم محیط کشت، رسوب‌گذاری و توده سلولی آن‌ها در شرایط آسپتیک به محیط کشت صنعتی مشابه ولی تازه افزوده و اثر آن بر افزایش بهره‌وری تولید پلاستیک‌زیستی محاسبه گردید.

روش استخراج پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات

ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی نمونه در سانتریفیوژ با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه رسوب‌گذاری شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم (۵٪ کلر فعال با pH برابر با ۱۰) به رسوب باکتری اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. سپس محلول حاصل با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب باکتری به ترتیب با ۳۰ میلی‌لیتر آب جوش، ۲۰ میلی‌لیتر استون و ۲۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق شسته و در پایان هر مرحله سانتریفیوژ شدند (Law & Slepecky, 1961). در ادامه رسوبات حاصل در محلولی با نسبت ۷: ۳: ۱ از کلروفرم: متانول: آب حل شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت گرماگذاری شد (Hahn *et al*., 1993). پس از سانتریفیوژ، یک محلول سه لایه (تری فازیک) با لایه بالایی آب، لایه مرکزی بقایای سلولی و لایه زیرین محلول کلروفرم به دست آمد (شکل ۲). قسمت کلروفرم جدا و در آون با دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از تبخیر کامل کلروفرم، یک فیلم سفید رنگ از پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به دست آمد که برای تعیین غلظت پلیمر زیستی تولید شده با روش سنجش اسید کروتونونیک مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲: تشکیل محلول سه لایه (تری فازیک) طی فرآیند استخراج پلیمر. a: لایه بالایی آب، b: لایه مرکزی بقایای سلولی و c: لایه زیرین محلول کلروفرم است

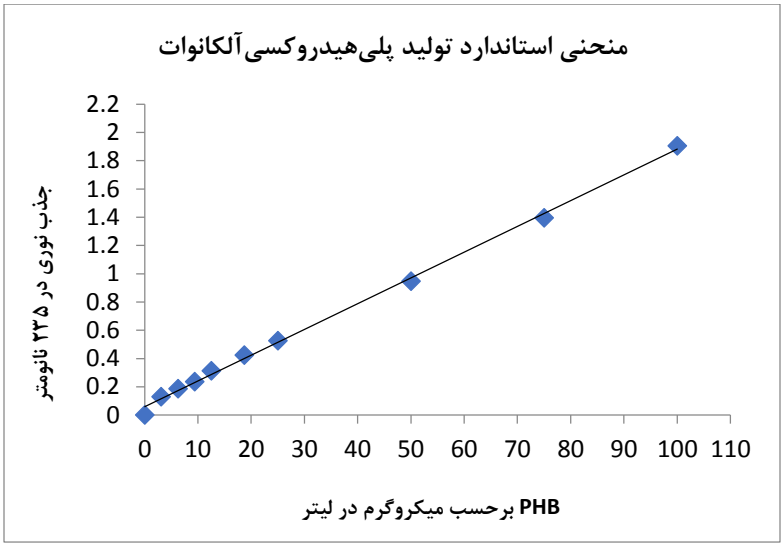
اندازه‌گیری وزن خشک سلولی

برای تخمین وزن خشک سلولی، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید با سانتریفیوژ ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه رسوب‌گذاری شد. پس از سه بار شستشو با آب مقطر، رسوب باکتریایی در دمای ۵۵ درجه سلسیوس در آون خشک شد تا وزن ثابت حاصل شود (Pal *et al*., 2002).

اندازه‌گیری پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات با استفاده از روش اسید کروتونونیک

غلظت پایین پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در نمونه‌ها را می‌توان با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری نمود. اساس این روش بر پایه تبدیل پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به اسید کروتونونیک با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ و حرارت است. جذب نوری اسید کروتونیک حاصل به وسیله اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌های استخراج شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس در یک حمام آب گرم قرار داده شد تا تبدیل پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به اسید کروتونیک انجام گیرد. سپس جذب محلول در ۲۳۵ نانومتر در برابر محلول بلانک که اسید سولفوریک جوشیده بود اندازه‌گیری شد (Law & Slepecky, 1961).

هم‌چنین منحنی استاندارد سنجش با استفاده از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات خالص شرکت سیگما ترسیم شد. به این منظور مقادیر مختلف (۰ تا ۱۰۰ میکروگرم) پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استاندارد در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و داغ حل، جذب نمونه‌ها در ۲۳۵ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد رسم گردید (شکل ۳).



شکل ۳: منحنی استاندارد و جذب نوری کروتونیک اسید حاصل از مقادیر مشخص پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات که توسط اسید سولفوریک غلیظ هیدرولیز شده‌اند

اندازه‌گیری درصد تجمع پلیمر و بهره‌وری تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات

برای سنجش کمی‌توانایی تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، پلیمرهای استخراج شده از تک تک جدایه‌های جداسازی شده توسط روش کروتونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت و و درصد تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات بر اساس نسبت پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولیدی در وزن خشک سلولی طبق رابطه (۱) محاسبه شد. میزان بهره‌وری نیز با محاسبه نسبت تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در هر ساعت مطابق رابطه (۲) به دست آمد.

$$\text{درصد تجمع پلیمر} = \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج شده (گرم)}}{\text{وزن خشک سلولی (گرم)}} \times 100$$ رابطه (۱)

$$\text{بهره‌وری} = \frac{\text{وزن خشک پلیمر استخراج شده (گرم)}}{\text{زمان (ساعت)}}$$ رابطه (۲)

تجزیه و تحلیل نتایج آنالیزها

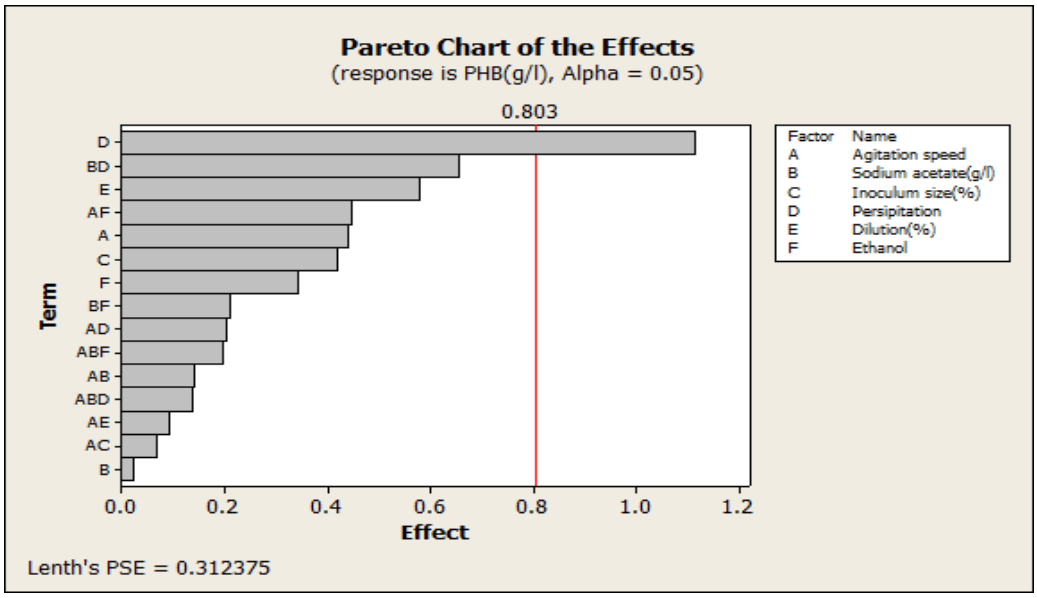
به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید. کلیه آزمایشات مورد بررسی با سه تکرار، با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین، برای انجام مقایسه زوج میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری $p <$ ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

در تمامی آزمایشات، سویه *باسیلوس سرئوس* جداسازی شده از پساب نشاسته‌ای که در تحقیقات قبلی غربالگری شده بود، به عنوان سویه مورد بررسی انتخاب شد. پلی هیدروکسی آلکانوات تولید شده نیز به عنوان کوپلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات شناسایی شده بود (Sinaei *et al*., 2021). از آنجاییکه به دلیل هزینه بالای فرایند تولید پلیمر زیستی، جایگزینی وسیع این دسته از پلیمرها با پلاستیک‌های تولید شده بر پایه ترکیبات نفتی تاکنون امکان‌پذیر نشده است و تلاش برای یافتن منبع کربن ارزان‌قیمت که مهم‌ترین عامل بالا بودن هزینه تمام شده پلاستیک‌های زیستی است همچنان ادامه دارد، در این پژوهش از پساب نشاسته بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده شده است. این پساب‌ها از یک طرف بسیار ارزان بوده و از طرف دیگر به دلیل دارا بودن مواد آلی فراوان، مشکلات زیست محیطی فراوانی ایجاد می‌کنند ولی باکتری‌ها به‌راحتی می‌توانند این مواد آلی را به ترکیبات مفیدی چون پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات ها تبدیل نمایند. تحقیقات Ahn و همکارانش در سال ۲۰۱۵ ثابت نمود که نسبت بالای کربن به نیتروژن در پسماندها و فاضلاب‌ها شرایط مناسبی برای تولید و ذخیره‌سازی پلیمر زیستی توسط باکتری مهیا می‌کند (Ahn *et al*., 2015). پیش از آن، Goff و همکاران در سال ۲۰۰۷ با رشد باکتری *Pseudomonas putida* بر روی پساب صنایع پلاستیک‌های نفتی و بهینه سازی خوراک‌دهی توانستند به میزان ۴۲٪ ماده خشک سلولی، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید کنند (Goff *et al*., 2007). نتایج Bosco و Chiampo در سال ۲۰۱۰ نشان داد که غلظت پلیمر زیستی تولیدی در پساب صنایع لبنی و با کمک باکتری‌های لجن فعال کمتر از ۰/۵ گرم بر لیتر است (Bosco & Chiampo, 2010). Yuan در سال ۲۰۲۰ با رشد باکتری‌های لجن فعال در پساب شهری به تولید پلیمر زیستی با میزان ۱۵٪ وزن خشک سلول‌ها دست یافت (Yuan *et al*., 2020). این در حالی است که غلظت کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات تولید شده توسط سویه *B.cereus* مورد بررسی در محیط کشت پساب نشاسته‌ای بدون اعمال شرایط بهینه‌سازی، برابر با ۳/۰۷ گرم در لیتر (۵۹٪ وزن خشک سلولی) است (Sinaei *et al*., 2021). بنابراین سویه غربال شده دارای توانایی بالایی جهت تولید پلیمرزیستی در محیط ارزان‌قیمت پساب دارا است.

عوامل موثر بر بهینه سازی تولید پلیمر زیستی با روش پلاکت-برمن

به منظور دستیابی به محیط کشت بهینه، عوامل موثر با روش پلاکت برمن مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانگونه که در شکل ۴ قابل مشاهده است فقط عامل رسوب‌گذاری محیط کشت عامل موثر است. این نتایج نشان می‌دهد که با روش RSM نمی‌توان به میزان تولید بالاتری نسبت به شرایط محاسبه شده محیط کشت صنعتی مورد استفاده دست یافت. به همین منظور و به دلیل اینکه محیط کشت مورد استفاده محیطی کمپلکس بوده و احتمال برهم کنش بین عامل‌ها وجود دارد، تمامی عوامل مورد بررسی به روش تک عاملی نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند.



شکل ۴: نمودار پرتو و عوامل تاثیرگذار بر بهینه سازی تولید پلیمر زیستی

بررسی تاثیر نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت صنعتی

از آنجایی که تولید و ذخیره‌سازی پلیمر زیستی در شرایط محدودیت نیتروژن و وجود مقدار کافی کربن القا می‌گردد، نسبت بالای کربن به نیتروژن می‌تواند بر بهینه‌سازی تولید پلیمر زیستی موثر باشد. نتایج آنالیز پساب نشاسته‌ای در مراحل مختلف رسوب‌گذاری نشان می‌دهد که جداسازی رسوب تاثیر بسزایی بر کاهش میزان نیتروژن موجود در محیط کشت دارد. این نتایج در جدول ۲ نمایش داده شده است. در مرحله بعد میزان رشد و تولید سویه *B. cereus* در محیط‌های کشت مذکور مقایسه گردید. نتایج نشان داد بهترین شرایط تولید در محیط کشت با نسبت ۶ به ۱ کربن به نیتروژن حاصل می‌شود که حاصل رسوب‌گذاری کامل پساب نشاسته‌ای است. نتایج حاصل در جدول ۲ قابل مشاهده است.

جدول ۲: ارزیابی میزان کربن و نیتروژن محیط کشت صنعتی در شرایط مختلف رسوب‌گذاری

پساب نشاسته‌ای	نیتروژن کل (گرم در لیتر)	قند کل (گرم در لیتر)
بدون رسوب‌گذاری	۲۱/۳±۰/۶	۱۹/۱±۰/۳
رسوب‌گذاری جزئی	۱۱/۷±۰/۳	۱۸/۴±۰/۴
رسوب‌گذاری کامل	۲/۹±۰/۴	۱۸/۱±۰/۳

جدول ۳: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در محیط کشت صنعتی

پساب نشاسته‌ای	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان(ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
بدون رسوب‌گذاری	۰/۹۰۲±۰/۰۶۰^{a}	۰/۲۶۸±۰/۰۲۲^{a}	۳۹	۲۹/۷۱	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰۱^{a}
رسوب‌گذاری جزئی	۵/۲۲۶±۰/۰۷۱^{b}	۱/۱۸۹±۰/۰۴۱^{b}	۳۰	۲۰/۸۴	۰/۰۳۹۶±۰/۰۰۰۰۷^{b}
رسوب‌گذاری کامل	۵/۱۵۲±۰/۰۶۳^{b}	۳/۰۶۵±۰/۰۳۲^{c}	۲۱	۵۹/۴۹	۰/۱۴۵۹±۰/۰۰۰۱^{c}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

بر اساس نتایج جدول ۳، رسوب‌گذاری تاثیر معنی داری بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات دارا است. نکته جالب توجه اینجاست که در شرایط رسوب‌گذاری جزئی نیز میزان رشد سلولی با شرایط رسوب‌گذاری کامل مشابه است درحالیکه بین میزان تولید پلیمرزیستی در این دو شرایط اختلاف معنی‌داری وجود دارد. این نتایج می‌تواند موید این مساله باشد که شرایط مناسب برای تکثیر سلول و تولید پلیمر زیستی توسط سویه مورد بررسی یکسان ناست. از آنجاییکه عامل مورد مقایسه در صنایع میزان بهره‌وری

تولید یعنی مقدار پلیمر زیستی تولید شده در واحد زمان است، بنابراین شرایط رسوب‌گذاری کامل به عنوان بهترین محیط برای مراحل بعدی انتخاب می‌گردد. قابل توضیح است که در تمام موارد ذکر شده، آزمون دانکن اختلاف معنی داری را در سطح معنی داری ۵ درصد ($P\ value < 0.05$) بین میانگین بهره‌وری‌ها نشان داد.

با توجه به نتایج می‌توان چنین استنباط نمود که یکی از علت‌های مناسب بودن محیط کشت پساب نشاسته جهت رشد باکتری *Bacillus cereus*، نسبت C/N این محیط کشت است. عامل C/N، یکی از عوامل مهم موثر بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات است. در این تحقیق، بر اساس نتایج جدول ۲ پساب نشاسته‌ای تیمار شده دارای C/N با نسبت در حدود ۶ به ۱ بود که نزدیک به بهترین نسبت برای تولید PHB در جنس باکتریایی باسیلوس بود که توسط محققان پیشنهاد شده است (Mohapatra *et al.*, 2015). علاوه بر این پساب نشاسته حاوی مقادیر بالایی مواد آلی است که توسط باکتری‌ها تجزیه زیستی شده و به PHA تبدیل می‌شوند. همانطور که قبلا توضیح داده شد، پساب نشاسته حاوی مقادیر زیادی قندهای کاهش یافته است که این ماده را به محیطی با ارزش برای فرایندهای تخمیر تبدیل می‌کند. همچنین، پساب رسوب‌گذاری شده دارای نسبت COD / BOD مناسب (۴/۵۷) برای رشد میکروبی بود. نتایج تحقیقات Bhuwal و همکارانش نشان داد که Bacillus sp. NG220 در فاضلاب صنعت مقوا با نسبت COD / BOD بین ۳/۹ تا ۵ در ۷۲ ساعت، می‌تواند ۳/۹۵۱ گرم در لیتر PHB تولید کند (Bhuwal *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر، حداکثر میزان PHA تولیدی، (حدود ۶۰٪ وزن خشک سلولی و غلظت ۳/۰۷ گرم در لیتر) در ۲۱ ساعت با استفاده از پساب نشاسته‌ای رسوب‌گذاری شده بدست آمد (جدول ۳). بنابراین، بهره‌وری سویه *B. cereus* غربال شده در محیط کشت صنعتی مورد بررسی، تقریبا ۳ برابر بیشتر از گزارشات Bhuwal و همکاران است.

بررسی تاثیر رقت محیط کشت صنعتی

از آنجایی که میزان دسترسی باکتری به ترکیبات محیط کشت تاثیر مستقیمی بر رشد سلولی و تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات دارد، به منظور دستیابی به غلظت بهینه محیط کشت جهت تولید پلاستیک‌زیستی مربوطه، سه غلظت مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج در جدول ۴ نمایش داده می‌شود.

جدول ۴: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در غلظت‌های مختلف محیط کشت صنعتی

پساب نشاسته‌ای	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
بدون‌رقیق سازی	۰۹±۰/۰۳۱[a] ۴/۸	۲/۱۲۳±۰/۰۳۲[a]	۲۴	۵۱/۸۰	۰/۰۸۸۵±۰/۰۰۰۱[a]
رقت ۵۰٪	۱۷±۰/۰۷۱[b] ۵/۶	۳/۰۰۵±۰/۰۵۱[b]	۲۱	۵۸/۰۵	۰/۱۴۳±۰/۰۰۰۱[b]
رقت ۲۵٪	۱۶±۰/۰۶۳[b] ۵/۲	۳/۰۷۲±۰/۰۴۴[b]	۲۱	۵۹/۵۱	/۱۴۶۲±۰/۰۰۰۰۹[b] ۰

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

همان‌گونه که مقایسه نتایج نمونه‌های رقیق شده پساب نشاسته‌ای(۵۰٪ و ۲۵٪) با نمونه اولیه رقیق نشده نشان می‌دهد، رقیق‌سازی تاثیر معنی‌داری بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات دارا است. احتمالا وجود ترکیبات خاص در پساب نشاسته و حتی غلظت بالای قند در محیط کشت پساب نشاسته بدون رقیق سازی مانعی برای رشد سلولی و تولید حداکثری پلی‌هیدروکسی آلکانوات است که با رقیق سازی به میزان ۵۰٪ این ممانعت برطرف می‌گردد. نکته مورد توجه این است که اختلاف معنی‌داری بین رقت‌های ۵۰٪ و ۲۵٪ مشاهده نمی‌شود و از آنجاییکه جهت تولید در مقیاس صنعتی، غلظت پایین‌تر محیط کشت ویژگی به حساب می آید، بنابراین رقت ۲۵٪ به عنوان بهترین رقت برای مراحل بعدی انتخاب گردید.

بررسی تاثیر نسبت حجم محیط کشت صنعتی به حجم کل ظرف

در این مرحله سه حجم مختلف ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر جهت دستیابی به بهترین نسبت حجم محیط کشت به حجم ارلن مورد بررسی قرار گرفت. این عامل تاثیر مستقیمی بر میزان هوادهی نمونه‌ها دارا است. نتایج این بررسی در جدول ۵ توضیح داده شده است.

جدول ۵: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در نسبتهای مختلف محیط کشت صنعتی

نسبت حجم پساب نشاسته‌ای به حجم ارلن	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان(ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
۱ به ۲/۵	۳/۱۵۱±۰/۰۴۲[a]	۱/۷۵۴±۰/۰۳۲[a]	۲۴	۵۵/۶۶	۰/۰۷۳۱±۰/۰۰۰۲[a]
۱ به ۵	۵/۱۶۲±۰/۰۳۱[b]	۳/۰۹±۰/۰۵۱[b]	۲۱	۵۹/۸۶	۰/۱۴۷۱±۰/۰۰۰۱[b]
۱ به ۱۰	۵/۲۳۵±۰/۰۵۰[b]	۳/۰۷۹±۰/۰۴۵[b]	۲۱	۵۹/۴۹	۰/۱۴۶۷±۰/۰۰۰۲[b]

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

همانگونه که جدول ۵ نشان می‌دهد بهره‌وری در نسبت‌های ۱ به ۵ و ۱ به ۱۰ حجم محیط کشت پساب نشاسته‌ای به حجم ارلن اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد. دلیل این امر می‌تواند هوادهی کافی جهت تولید پلی‌هیدروکسی آلکانوات در نسبت ۱ به ۵ باشد. هوادهی بالاتر سرعت رشد سلولی را افزایش داده است ولی روی میزان تولید پلیمر تاثیری نداشته است. از طرف دیگر، مقایسه نتایج میزان بهره‌وری این نسبت‌ها با نسبت ۱ به ۲/۵ اختلاف معنی داری نشان می‌دهد. بررسی داده‌های جدول ۴ نشان می‌دهد که نسبت ۱ به ۲/۵ برای حجم محیط کشت پساب نشاسته‌ای به حجم ارلن، نسبت پایینی بوده که منجر به هوادهی ناکافی و در نتیجه پایین آمدن نرخ رشد سلولی و هم‌چنین کاهش میزان تولید پلیمرزیستی شده است. بنابراین با توجه به اینکه نسبت ۱ به ۱۰، منجر به کاهش حجم محیط کشت موثر و بالارفتن هزینه‌های جانبی تولید می‌گردد و بصرفه اقتصادی ناست، در این پژوهش نسبت ۵ برابری ظرف به محیط کشت به عنوان نسبت بهینه تعیین گردید.

بررسی تاثیر درصد تلقیح محیط پیش کشت به محیط کشت صنعتی

در این قسمت از پژوهش تاثیر میزان مایه تلقیح بر بهره‌وری تولید سنجیده شد. به همین منظور در مرحله انتقال سلول‌های در حال تقسیم از محیط پیش کشت به محیط کشت تولید، درصدهای مختلف حجمی ۱، ۵ و ۱۰ درصد از این محیط به محیط کشت صنعتی تلقیح گردید. نتایج این بررسی در جدول ۵ نمایش داده شده است.

جدول ۶: درصد تجمع پلیمر زیستی و بهره‌وری تولید توسط سویه مورد بررسی در درصدهای مختلف تلقیح از محیط پیش کشت به محیط کشت صنعتی

درصد تلقیح از محیط پیش کشت به محیط کشت تولید	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
۱	/۱۶۷±۰/۰۴۲[a] ۵	۳/۰۸۵±۰/۰۶۲[a]	۲۱	۵۹/۷۰	/۱۴۶۹±۰/۰۰۰۲[a] ۰
۵	/۱۷۶±۰/۰۳۵[a] ۵	۳/۰۶۷±۰/۰۵۳[a]	۲۱	۵۹/۲۵	۰/۱۴۶±۰/۰۰۰۱[a]
۱۰	/۱۶۱±۰/۰۵۴[a] ۵	۳/۰۷۸±۰/۰۴۳[a]	۲۱	۵۹/۶۳	/۱۴۶۶±۰/۰۰۰۲[a] ۰

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۶ نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین درصدهای مختلف تلقیح محیط پیش کشت وجود نداشته و این عامل نمی‌تواند بعنوان عامل موثر مورد توجه قرار گیرد. دلیل این مساله سرعت بالای رشد و پایین بودن زمان تکثیر سلولی باکتری *Bacillus cereus* است. تعداد این باکتری در مدت زمان حدود ۱۸ دقیقه دو برابر می‌شود. بنابراین این اختلاف غلظت در مدت کوتاهی جبران شده و در روند تولید پلی‌هیدروکسی بوتیرات آن تاثیر قابل توجهی ایجاد نمی‌کند.

بررسی تاثیر تولید پلیمر زیستی با افزودن ترکیبات محرک تولید به محیط کشت

در این مرحله تاثیر افزودن ترکیباتی که در سایر مقالات بعنوان ترکیبات موثر بر افزایش تولید اشاره شده است، مورد بررسی قرار گرفت. اتانول و استات سدیم با نسبت‌های مختلف به محیط کشت تولید اضافه شده و اثر آن بر میزان تولید و بهره‌وری مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۷: بررسی اثر افزودن ترکیبات اضافی به محیط کشت صنعتی بر میزان تولید پلیمر زیستی

ماده افزودنی	مقدار	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
استات سدیم (گرم بر لیتر)	۱/ ۰	/۸۶۸±۰/۰۴۲^{a} ۵	۳/۰۸±۰/۰۳۳^{a}	۲۱	۵۲/۴۹	۱۴۶±۰/۰۰۰۲^{a} ۰/۶
استات سدیم (گرم بر لیتر)	۲	/۲۰۴±۰/۰۳۳^{b} ۶	۳/۰۷۷±۰/۰۴۳^{a}	۲۱	۴۹/۶	۱۴۶±۰/۰۰۰۱^{a} ۰/۵
اتانول(میلی‌ل یتر بر لیتر)	۱	/۱۷۱±۰/۰۳۵^{c} ۵	۳/۰۶۵±۰/۰۳۴^{a}	۲۱	۵۹/۲۷	۱۴۵±۰/۰۰۰۲^{a} ۰/۹
اتانول(میلی‌ل یتر بر لیتر)	۱۰	/۱۶۳±۰/۰۵۴^{c} ۵	۳/۰۷۲±۰/۰۴۵^{a}	۲۱	۵۹/۵۰	۱۴۶±۰/۰۰۰۲^{a} ۰/۲

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۷ نشان می‌دهد افزودن ترکیبات افزودنی تاثیر معنی‌داری بر میزان تولید یا بهره‌وری تولید پلیمر زیستی مورد بررسی نداشته است. البته افزودن استات سدیم تا حدی بر میزان تکثیر سلول باکتری موثر بوده و میزان وزن خشک سلولی را افزایش داده است ولی تاثیر مثبتی بر میزان تولید پلی‌هیدروکسی والرات مورد بررسی نداشته است. این مشاهدات با نتایج تحقیقات Mothes و همکاران همخوانی ندارد که دلیل آن می‌تواند به این دلیل باشد که محیط کشت مورد بررسی کمپلکس بوده و دارای ترکیبات زیادی است (Mothes *et al*., 1997). بنابراین این نتایج موید این موضوع است که این محیط کشت صنعتی ارزان‌قیمت نیاز به این مواد افزودنی نداشته و احتمالا ترکیبات مشابهی در محیط مورد بررسی وجود دارد که از مزایای این محیط کشت صنعتی به‌شمار می آید. از طرف دیگر نتایج Anderson و همکاران و Mothes و همکاران نشان داد که ترکیباتی چون اتانول که با اعمال اثر مهاری خود بر تکثیر سلولی، مسیر سنتز پلی‌هیدروکسی آلکانوات را تقویت می کنند فقط زمانی می‌توانند موثر باشند که تولید پلیمر همراه رشد سلولی اتفاق نیافتد. با توجه به منحنی‌های رشد و تولید سویه مذکور، سنتز پلی‌هیدروکسی آلکانوات وابسته به رشد بوده و با توجه به غنی بودن محیط کشت نتایج حاصل قابل انتظار است (Anderson & Dawes, 1990., Mothes *et al*., 1998)

.

بررسی تاثیر میزان هوادهی بر بهره‌وری تولید پلیمر در محیط کشت صنعتی

به منظور افزایش میزان بهره‌وری تولید پلیمر زیستی، هوادهی بالاتر بعنوان عامل موثر احتمالی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در جدول ۸ نمایش داده شده است.

جدول ۸: بررسی اثر هوادهی بر میزان تولید پلیمر زیستی

دور بر دقیقه	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان(ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
۱۲۰	۵/۱۷۱±۰/۰۴۲[a]	۳/۰۷۲±۰/۰۴۳[a]	۲۱	۵۹/۴۱	۰/۱۴۶۳±۰/۰۰۰۳[a]
۲۰۰	/۵۶۸±۰/۰۵۳[b] ۵	۳/۰۸۳±۰/۰۵۱[a]	۲۱	۵۵/۳۷	۰/۱۴۶۸±۰/۰۰۰۴[a]

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۸ نشان می‌دهد که افزایش هوادهی تاثیر معنی‌داری بر افزایش سرعت تکثیر سلولی دارا است ولی بر افزایش درصد تولید و بهره‌وری آن اثر معنی‌داری ندارد. بنابراین با توجه به سویه منتخب و محیط کشت صنعتی مورد استفاده، عامل هوادهی نمی‌تواند بعنوان عامل موثر انتخاب گردد.

بهینه سازی تولید پلیمر زیستی در سویه برتر با روش کشت با تراکم سلولی بالا

بررسی تاثیر زمان انتقال توده سلولی به محیط کشت صنعتی تازه

در این بخش از تحقیق حاضر، به کمک منحنی رشد باکتری *B. cereus* و تولید پلیمر زیستی در فازهای مختلف رشد، بهترین زمان انتقال توده سلولی حاصل به محیط کشت صنعتی تازه بررسی شد. به این منظور، انتقال توده سلولی در سه زمان ابتدای فاز لگاریتمی، اواسط فاز لگاریتمی و فاز سکون رسوب‌گذاری و در شرایط آسپتیک به محیط کشت تازه منتقل و اثر آن بر افزایش

بهره‌وری تولید پلاستیک‌زیستی، مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به نمودار رشد باکتری، ساعت‌های ۶، ۱۲ و ۲۷ جهت بررسی انتخاب گردید و نتایج حاصل از انتقال سلول‌ها به محیط کشت صنعتی تازه در جدول ۹ نمایش داده شده است.

جدول ۹: تاثیر زمان اعمال روش کشت با تراکم سلولی بالا بر درصد تجمع و بهره‌وری تولید پلیمر زیستی در سویه *B. cereus*

زمان	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان (ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
ابتدای فاز لگاریتمی (ساعت ۶)	۵/۳۷۱±۰/۰۳۳^{a}	۳/۱۷۷±۰/۰۴۲^{a}	۲۱	۵۹/۱۵	۰/۱۵۱۳±۰/۰۰۰۲^{a}
اواسط فاز لگاریتمی (ساعت ۱۲)	۶/۱۶۸±۰/۰۴۵^{b}	۴/۴۴۳±۰/۰۴۴^{b}	۲۴	۷۲/۰۳	۰/۱۸۵۱±۰/۰۰۰۳^{b}
فاز سکون (ساعت ۲۷)	۵/۵۳۸±۰/۰۳۷^{c}	۲/۷۷۸±۰/۰۴۰^{c}	۲۷	۵۰/۱۶	۰/۱۰۲۸±۰/۰۰۰۲^{c}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۹ نشان می‌دهد که اولا روش انتقال سلول‌های جوان (قبل از ورود به فاز سکون) به محیط کشت تازه بسیار موثر است و باعث افزایش وزن خشک سلولی و میزان پلی‌هیدروکسی آلکانوات تولید شده می‌شود. این نتایج با مشاهدات Bourque و همکارانش کاملا منطبق است (Bourque *et al*., 1995). مقایسه سایر نتایج نشان می‌دهد که این تاثیر بر سلول‌های فاز لگاریتمی بسیار بیشتر بوده و انتقال سلول‌ها در این فاز که دقیقا زمان تولید و ذخیره سازی پلیمرزیستی در سویه موردنظر نیز است، اثر افزایشی

موثری بر میزان تولید پلاستیک‌زیستی و بهره‌وری آن داشته است. تا جایی که بیش از ۷۰٪ وزن خشک سلولی را پلیمرزیستی تولید شده تشکیل داده است. بنابراین بهترین زمان انتقال سلول‌های باسیلوس مورد بررسی به محیط کشت صنعتی تازه، فاز لگاریتمی رشد است.

بررسی تاثیر غلظت توده سلولی منتقل شده بر میزان بهره‌وری تولید

در این مرحله، محدوده وسیعی از توده سلولی با ۳ نسبت متفاوت ۱:۱/۲، ۱:۱ و ۱:۲ به محیط کشت صنعتی تولید اضافه و با اندازه‌گیری میزان تولید پلیمر زیستی در فواصل زمانی و محاسبه بهره‌وری، بهترین غلظت سلولی محاسبه گردید.

جدول ۱۰: تاثیر نسبت توده سلولی منتقل شده بر درصد تجمع و بهره‌وری تولید پلیمرزیستی در سویه *B. cereus*

نسبت توده سلولی	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان(ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
۱:۱/۲	۵/۶۱۱±۰/۰۴۲^{a}	۳/۸۴۲±۰/۰۳۱^{a}	۳۲	۶۸/۴۷	۰/۱۲۰۰±۰/۰۰۰۳^{a}
۱:۱	۶/۱۵۴±۰/۰۵۳^{b}	۴/۴۵۸±۰/۰۴۳^{b}	۲۴	۷۲/۴۴	۰/۱۸۵۷±۰/۰۰۰۲^{b}
۱:۲	۶/۷۳۳±۰/۰۴۰^{c}	۳/۳۸۴±۰/۰۴۱^{c}	۲۱	۵۰/۲۵	۰/۱۶۱۱±۰/۰۰۰۳^{c}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج جدول ۱۰ نشان می‌دهد که نسبت توده سلولی انتقال یافته از محیط کشت تولید اولیه به محیط کشت تازه، تاثیر معنی‌داری بر روی میزان بهره‌وری تولید دارد. در شرایط انتقال نیمی از سلول‌های محیط کشت اولیه، به دلیل پایین بودن غلظت سلولی، سلول‌ها در محیط کشت تازه شروع به تکثیر نموده و این مساله باعث تاخیر در زمان تولید حداکثری پلیمر می‌گردد (ساعت ۳۲). این در حالی است که هنگامی که نسبت ۱:۱ اعمال می‌گردد، سلول‌های باکتری در مدت ۲۴ ساعت به حداکثر تولید و بهره‌وری که اختلاف معنی داری با نسبت‌های دیگر دارا است، می‌رسد. نکته جالب توجه این است که در نسبت تلقیح بالاتر (۱:۲)، زمان تولید حداکثری پایین آمده که دلیل آن می‌تواند غلظت بالای سلولی باشد. از طرف دیگر، نتایج نشان می‌دهد که با وجود وزن خشک بالاتر، درصد تجمع پلیمر پایین‌تری حاصل شده است. این نتایج نشان می‌دهد باکتری‌ها پس از نامساعد شدن شرایط رشد محیط کشت، از پلیمر ذخیره شده بعنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. بنابراین در نسبت ۱:۲، غلظت بالای سلولی باعث شده است که سلول‌ها

سریع‌تر وارد فاز سکون تولید شده و همزمانی تولید و مصرف پلیمر باعث کاهش میانگین تولید و درصد تجمع پلیمر گردد. بنابراین بهترین غلظت انتقال سلول‌های باسیلوس مورد بررسی به محیط کشت صنعتی تازه، نسبت ۱:۱است.

بررسی تاثیر نوع محیط پیش کشت بر میزان بهره‌وری تولید

به منظور ارزیابی تاثیر نوع محیط پیش کشت، یک مرحله عقب‌تر رفته و دو نوع محیط پیش کشت جهت فعال نمودن سلول‌ها قبل از ورود به مرحله تولید مورد مطالعه قرار گرفت. یکی از آن‌ها محیط Nutrient broth، و دیگری محیط پساب نشاسته‌ای مشابه با محیط کشت تولید است. نتایج درصد تجمع پلیمر و بهره‌وری تولید در جدول ۱۰ نمایش داده شده است.

جدول ۱۱: تاثیر نوع محیط پیش کشت بر درصد تجمع و بهره‌وری تولید پلیمر زیستی در سویه *B. cereus*

نوع محیط پیش کشت	وزن خشک سلول (گرم در لیتر)	پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تولید شده (گرم در لیتر)	زمان(ساعت)	درصد تجمع پلیمر زیستی	بهره‌وری (گرم بر لیتر در ساعت)
Nutrient broth	۶/۱۸۴±۰/۰۴۳[a]	۴/۴۷۲±۰/۰۵۴[a]	۲۴	۷۲/۳۱	۰/۱۸۶۳±۰/۰۰۰۲[a]
پساب نشاسته‌ای	۵/۷۴۶±۰/۰۵۲[b]	۳/۶۶۲±۰/۰۴۱[b]	۲۴	۶۳/۷۳	۰/۱۵۲۶±۰/۰۰۰۳[b]

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های رشد یافته در محیط پیش کشت Nutrient broth دارای توانایی تولید بالاتری نسبت به باکتری‌های تکثیر یافته در محیط مشابه تولید یعنی پساب نشاسته‌ای هستند. این نتایج موید این نکته است که شرایط رشد سلول‌ها قبل از ورود به محیط کشت تولید بر میزان تولید آن‌ها موثر است.

نتایج فوق نشان می‌دهد اولا روش انتقال سلول‌ها به محیط کشت تازه بسیار موثر است و دیگر اینکه بهترین زمان انتقال سلول‌های باسیلوس مورد بررسی، فاز لگاریتمی بوده و محیط پیش کشت انتخابی، محیط Nutrient broth است. مقایسه نتایج

موید این مطلب است که حتی با وجود افزایش زمان تخمیر به مدت ۳ ساعت در شرایط کشت با تراکم سلولی بالا نسبت به شرایط بهینه قبلی، چون میزان تولید پلی‌هیدروکسی والرات به میزان قابل ملاحظه‌ای (حدود ۴۵ درصد) افزایش یافته‌است، اینگونه نتیجه‌گیری می‌شود که روش کشت با تراکم سلولی بالا در تولید پلی‌هیدروکسی والرات بوسیله سویه *B. cereus* بسیار اثربخش بوده و بهره‌وری تولید را به میزان چشمگیری افزایش می‌دهد که با نتایج تحقیقات Yamane و همکارانش کاملا هم خوانی دارد (Yamane & Shimizu, 1984). ایشان نشان دادند که این روش برای سویه‌هایی که تولید پلیمر زیستی با رشد و تکثیر سلولی همراه است، موثر بوده و تاثیر بسزایی بر بالابردن میزان بهره‌وری تولید داراست. در سال ۲۰۱۳ نیز Kanjanachumpol و همکارانش نشان دادند که با استفاده از این روش، درصد تجمع پلی‌هیدروکسی بوتیرات در باکتری *B. megaterium* حدود ۲ برابر افزایش یافته‌است (Kanjanachumpol *et al.*, 2013). نتایج مشابهی توسط Nygaard و همکارانش در سال ۲۰۲۱ به چاپ رسید که نشان می‌دهد استفاده از این روش، باعث افزایش بیش از دوبرابری میزان تجمع پلی‌هیدروکسی بوتیرات در سلول‌های *Cupriavidus necator* شده است (Nygaard *et al.*, 2021). با در نظر گرفتن مجموع نتایج، تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تکنیک کشت سلولی با تراکم بالا جهت بهینه‌سازی تولید و بهره‌وری کوپلیمر ارزشمند پلی هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات توسط سویه *B. cereus* مورد بررسی، بسیار کارآمد بوده و میزان تولید را از حدود ۳/۰۷ g/l (معادل ۵۹/۵٪ وزن خشک سلول) به مقدار ۴/۴۵ g/l (بیش از ۷۲٪ وزن خشک سلول) افزایش داده است. این نتایج به همراه اهمیت بالای این نوع پلیمرزیستی از یک سو و بکارگیری پساب به‌عنوان محیط کشت مورد استفاده از سوی دیگر بر این مهم اشاره دارد که سویه غربال‌شده پتانسیل تولید صنعتی پلیمرزیستی پلی هیدروکسی بوتیرات-کو-والرات را دارا است.

منابع

Ahn, J., Jho, E.H. and Nam, K. (2015). Effect of C/N ratio on polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulation by *Cupriavidus necator* and its implication on the use of rice straw hydrolysates. Env Eng Res, 20(3): 246-253.

Akaraonye, E., Keshavarz, T. and Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. J Chem Technol Biotechnol, 85: 732-743.

Anderson, A.J. and Dawes, E.A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiology Review, 54: 450-472.

Aragão, G. M.F., Schmidell, W., Ienczak J. L. and Fischer S.A. (2009). Preparation of polyhydroxyalkanoates from a citric residue. PCT - WO2009/149529 A1.

Batcha, A.F.M., Prasad, D.M.R., Khan, M.R. and Abdullah, H. (2014). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by Cupriavidus necator H16 from jatropha oil as carbon source. Bioprocess Biosyst Eng, 37: 943–951.

Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K., Goyal, V. and Yadav, A. (2014). Poly-β-hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new Bacillus sp. NA10. Bioresour. Bioprocess, 1, 9.

Bosco, F. and Chiampo, F. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge Production of bioplastics using dairy residues. J. Biosci. Bioeng, 109: 418–421.

Bourque, D., Pomerleau, Y. and Groleau, D. (1995). High-cell-density production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by Methylobacterium extorquens: production of high-molecular-mass PHB. Appl Microbiol Biotechnol, 44: 367–376.

Dalcanton, F., Ienczak, J.L., Fiorese, M.L., Aragão, G.M.F. (2010). Production of poly (3-hydroxybutyrate) by Cupriavidus necator in hydrolyzed rice starch medium with soybean oil supplementation at different temperatures. Química Nova, 3, n. 33, 552-556.

Goff, M., Ward, P.G., and O'Connor, K.E. (2007). Improvement of the conversion of polystyrene to polyhydroxyalkanoate through the manipulation of the microbial aspect of the process: a nitrogen feeding strategy for bacterial cells in a stirred tank reactor. J Biotechnol, 132: 283–286.

Guillet, J. (2004). Plastics and environment. In: Scott G (ed) Degradable polymers: principles and applications. 2nd edn. Kluwer, New York, pp 1254–1263.

Hahn, SK, Chang, YK, Kim, BS, Lee, KM, Chang, H.N. (1993) The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. Biotechnology Techniques, 7(3): 209-212.

Kanjanachumpol, P., Kulpreecha, S., Tolieng, V. and Thongchul, N. (2013). Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. Bioprocess and biosystems engineering, 36 (10): 1463-1474.

Law, J, Slepecky, R.A. (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. Journal of Bacteriology, 82(1):33–36.

Lenz, R.W. and Marchessault, R.H. (2005). Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology. Biomacromolecules, 61:1–8.

Mohan, S., Oluwafemi, O.S., Kalarikkal, N., Thomas, S. and Songca, S.P. (2016). Biopolymers–application in nanoscience and nanotechnology. Recent Adv. Biopolymers, 47.

Mohapatra, S., Mohanta, P.R., Sarkar, B., Daware, A., Kumar, C. and Samantaray, D.P. (2015). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by Bacillus Strain isolated from waste water

and its biochemical characterization. Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B Biol. Sci, 87(2): 459–466.

Mothes, G., Rivera, H.S., and Babel, B. (1997). Competition between β Ketothiolase and Citrate Synthase during Poly(β-hydroxybutyrate) Synthesis in *Methylobacterium rhodesianum*, Arch. Microbiol., 166: 405-410.

Mothes, G., Ackermann, J.U., and Babel, W. (1998). Regulation of Poly(β-hydroxybutyrate) Synthesis in Methylobacterium rhodesianum MB 126 Growing on Methanol or Fructose, Arch. Microbiol., 169: 360-363.

Nygaard, D., Yashchuk, O., Noseda, D.G., Araoz, B. and Hermida, E.B. (2021). Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type Cupriavidus necator from fructose. J.heliyon 7, e05979.

Pal, A., Parbhu, A., Kumar, A.A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Pannamma, V. and Shivakumar, S. (2002). Optimization of Process Parameters for Maximum Poly (β) hydroxybutyrate (PHB) production by Bacillus thuringiensis IAM 12077. Polish Journal of Microbiology, 2: 149-154.

Sinaei, N., Zare, D. and Azin, M. (2021). Production and characterization of poly 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate in wheat starch wastewater and its potential for nanoparticle synthesis. Brazilian Journal of Microbiology: 52(2): 561-573. DOI: 10.1007/s42770-021-00430-5.

Yuan, Q., Sparling, R. and Oleszkiewicz, J. (2020). Polyhydroxybutyrate Production from Municipal Wastewater Activated Sludge with Different Carbon Sources. J. Air, Soil and Water Research, 8(1).

Yamane, T. and Shimizu, S. (1984). Fed-batch techniques in microbial processes. Adv Biochem Eng Biot, 30: 147–194.

Investigation of effective factors on optimization of biopolymer production of polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) by Plackett–Burman method and optimization of productivity by high cell density technique

N. Sinaei[1], D. Zare[2]*, M. Azin[3]

Received: 2020.5.27

Accepted: 2021.7.19

Abstract

PHAs are biodegradable and biocompatible polymers produced by a wide range of bacteria. In the present study, the wild strain of *Bacillus cereus* producing polyhydroxybutyrate-co-valrate (PHBV) copolymer with high productivity, isolated from starch effluent was used. To produce, starch effluent was studied as a cheap medium. Then, the optimal composition of the culture medium was evaluated and in order to achieve higher productivity, the high cell density method was evaluated. The results showed the maximum production of PHBV using Plackett–Burman test design was about 59.5% of CDW. Subsequently, by optimizing culture with high cell density, the production rate increased to more than 72% of CDW. Therefore, the high cell density has a significant effect on increasing the productivity of PHBV production by *B. cereus*. Due to the use of cheap culture medium, the importance of these results is twofold and shows the potential for production on an industrial scale.

Keywords: **Bacillus cereus, polyhydroxybutyrate-co-valerate, Plackett–Burman method, PHBV, starch wastewater,**

---

1 PhD Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
2 Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran
(* Corresponding author: zare@irost.ir**)**
3 Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran