Available in: http://jips.ippi.ac.ir

Iranian Journal of Polymer Science and Technology
Vol. 23, No. 5, 397-404
December 2010-January 2011
ISSN: 1016-3255

Enhancement of Poly(β-hydroxybutyrate) Production from Methanol by *Methylobacterium Extorquens* Using Mixed Substrates

Z. Beagom Mokhtari-Hosseini, E. Vasheghani-Farahani*, and S.A. Shojaosadati

Biotechnology Group, Department of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University,
P.O. Box: 14115-143, Tehran, Iran

Received 14 July 2010, accepted 5 January 2011

ABSTRACT

Poly-β-hydroxybutyrate (PHB), produced by several species of bacteria, has attracted great attention as a biodegradable and biocompatible compound with almost similar properties of polypropylene. Unfortunately, its use is currently limited due to high production costs. One of the most common methods for overcoming this constraint is the use of inexpensive substrates, like methanol. Another strategy which involves the increase in carbon yield which can directly affect the production costs. One method to increase carbon yield is the use of mixed substrates. Therefore, for PHB production the effects of three sources of carbon, ethanol, sodium acetate, and glucose were studied as substrates in different concentrations mixed with methanol. It was found that PHB concentration and PHB content increased by addition of ethanol and acetate, but glucose addition did not have any significant effect on PHB production. Calculation of carbon yield under the best condition indicated that it increased about 3 times by addition of acetate.

Key Words:

methanol,
methylobacterium extorquens,
Poly-β-hydroxybutyrate (PHB),
mixed substrate,
carbon yeild

(*)To whom correspondence should be addressed.
E-mail: evf@modares.ac.ir

قابل دسترس در نشانی: http://jips.ippi.ac.ir

مجله علوم و تکنولوژی پلیمر،
سال بیست و سوم، شماره ۵،
صفحه ۴۰۴-۳۹۷، ۱۳۸۹
ISSN : 1016-3255

افزایش تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول به وسیله متیلوباکتریوم اکستروکوئنس و سوبسترای مخلوط

زهرا بیگم مختاری حسینی، ابراهیم واشقانی فراهانی*، سید عباس شجاع السادات

تهران، دانشگاه تربیت مدرس ، دانشکده مهندسی شیمی ، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۴۳-۱۴۱۱۵

دریافت: ۸۹/۴/۲۳، پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک گرمانرم زیست‌سازگار و زیست تخریب پذیر است که به وسیله چند گونه از باکتری‌ها تولید می‌شود. این گرمانرم به دلیل خواص مشابه با پلی‌پروپیلن بسیار مورد توجه واقع شده است. این پلیمر کاربردهای گسترده‌ای در صنعت، پزشکی و کشاورزی دارد. با وجود مزایای زیاد نسبت به پلیمرهای پتروشیمیایی، استفاده از آن به علت هزینه‌بری تولید محدود شده است. یکی از روش‌های معمول رفع این مشکل، استفاده از سوبسترای ارزان قیمت مانند متانول است. راه‌کار دیگر، افزایش مقدار بازده کربنی است که به طور مستقیم بر هزینه تولید مؤثر است. استفاده از سوبسترای مخلوط یکی از روش‌های افزایش بازده کربنی است. در این مطالعه، اثر سه منبع کربنی اتانول، سدیم‌استات و گلوکوز با سه غلظت متفاوت به عنوان سوبسترای مخلوط بر تولید PHB بررسی شده است. نتایج نشان می‌دهد، افزودن اتانول و سدیم استات غلظت و مقدار PHB را افزایش می‌دهد و اضافه کردن گلوکوز اثر قابل ملاحظه‌ای بر مقدار تولید PHB ندارد. محاسبه بازده کربنی در بهترین حالت نشان می‌دهد، افزودن سدیم‌استات به عنوان سوبسترای مخلوط بازده کربنی را تا سه برابر افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

متانول،
متیلوباکتریوم اکستروکوئنس،
پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB)،
سوبسترای مخلوط،
بازده کربنی

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
evf@modares.ac.ir

مقدمه

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) ترکیبی درون سلولی است که به عنوان منبع ذخیره کربن و انرژی در چند نوع باکتری تولید می‌شود [۵-۱]. این پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار است که خواصی مشابه پلی‌پروپیلن دارد [۸-۶]. به دلیل این ویژگی‌ها، PHB در پزشکی، دامپزشکی، داروسازی، مهندسی بافت، کشاورزی و صنعت کاربردهای فراوانی دارد [۱۰،۹]. با وجود مزایای زیاد، هزینه زیاد تولید PHB نسبت به پلاستیک‌های مشتق شده از نفت، استفاده از آن را، به ویژه در صنایع بسته‌بندی، محدود کرده است. عوامل متعددی بر هزینه تولید PHB مؤثرند. یکی از مهم‌ترین عوامل، منبع کربن است. هزینه منبع کربن حدود ۴۰ درصد قیمت تمام شده PHB را به خود اختصاص می‌دهد. یکی از منابع کربن ارزان قیمت که در کشور ما به دلیل ذخایر بزرگ گاز به وفور و به آسانی تولید می‌شود، متانول است.

از دیگر عوامل مهم و مؤثر بر هزینه تولید، مقدار بهره‌دهی کلی تولید است. هر چه مقدار بهره‌دهی (مقدار تولید در واحد زمان در واحد حجم) بیشتر باشد، هزینه تولید کمتر می‌شود. بازده کربنی تولید از جمله عواملی است که اثر مستقیم بر مقدار بهره‌دهی دارد. بازده کربنی بستگی به نوع سوبسترا، ریزسازواره، (میکروارگانیسم) نوع کشت، سرعت رشد و شرایط محیطی کشت دارد [۱۱]. طبق نظریه ارایه شده توسط Babel و همکاران، یکی از راه‌کارهای افزایش بازده کربنی تولید، استفاده از سوبسترای مخلوط است [۱۲،۱۳].

متیلوباکتریوم اکستروکوئنس یک متیلوتروف اختیاری مولد رنگ دانه صورتی است که می‌تواند از متانول که یک سوبسترای ارزان قیمت است، به عنوان تنها منبع کربن استفاده کند. این باکتری برای تولید انواع محصولات از جمله PHB استفاده شده است [۱۸-۱۴].

بررسی مطالعات و گزارش‌های موجود نشان می‌دهد، تاکنون در زمینه اثر استفاده از سوبسترای مخلوط بر مقدار بازده کربنی هیچ مطالعه تجربی انجام نشده است. بنابراین در پژوهش حاضر، اثر استفاده از سوبسترای مخلوط بر مقدار رشد باکتری متیلوباکتریوم اکستروکوئنس، PHB تولید شده به وسیله آن و بازده کربنی حاصل بررسی شد. بدین منظور اثر سه سوبسترا با غلظت‌های متفاوت به عنوان سوبسترای مخلوط با متانول بر تولید PHB مورد بررسی قرار گرفت.

تجربی

مواد و روش‌ها

ریزسازواره، نگه‌داری و تهیه بذر (مایه تلقیح)

سویه میکروبی متیلوباکتریوم اکستروکوئنس DSMZ 1340 از مجموعه میکروبی DSMZ آلمان خریداری شد. بانک میکروبی این باکتری (کشت ۳۶ ساعتی در محیط معدنی به علاوه ۱۰ v/v٪ گلیسیرین) به شکل ویال‌های ۱/۵ mL در دمای $-80^{\circ}C$ نگه‌داری شد. محیط بذر با ترکیب جدول ۱ که در مطالعه پیشین برای رشد این باکتری بهینه شده بود [۱۷]، در یک ارلن ۲۵۰ mL به مقدار ۱۰۰ mL تهیه شد. محیط حاصل با یکی از ویال‌های بانک میکروبی تلقیح و به مدت ۳۶ h در دمای $30^{\circ}C$ و شدت تکان‌دهی ۲۰۰ rpm گرمادهی شد.

شرایط کشت

برای بررسی کارایی سوبسترای مخلوط، از سامانه ارلن لرزان در فرایند ناپیوسته استفاده شد. فرایند در دو مرحله رشد و تولید با حجم کاری یکسان انجام شد.

مرحله رشد باکتری

محیط کشت با ترکیب بهینه [۱۷] (جدول ۱) تهیه، با ۱٪ (v/v) از کشت بذر تلقیح و سپس در دمای $30^{\circ}C$ و شدت تکان‌دهی ۲۰۰ rpm به مدت ۴۸ h گرمادهی شد. سلول‌های رشد یافته، در شرایط سترون در دستگاه مرکزگریز قرار داده شده و با سرم فیزیولوژی سترون شست و شو داده شدند. تعلیق حاصل مجدداً در دستگاه مرکزگریز قرار گرفته و با سرم سترون به حجم مورد نیاز رسانده شد (برای هر ارلن مرحله بعد ۱ mL تعلیق میکروبی مورد نیاز است).

جدول ۱ - ترکیب بهینه محیط کشت باکتری متیلوباکتریوم اکستروکوئنس DSMZ 1340 [۱۷].

اجزای محیط کشت	مقدار
CH_3OH (% v/v)	۰/۶۰
$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	۱/۷۵
KH_2PO_4 (g/L)	۰/۶۸
$Na_2HPO_4.\ 12H_2O$ (g/L)	۶/۱۴
$MgSO_4.7H_2O$ (g/L)	۰/۱۰
$FeSO_4 7H_2O$(mg/L)	۲۰/۰۰
$CaCl_2.2H_2O$ (mg/L)	۲۰/۰۰
$MnSO_4.H_2O$ (mg/L)	۵/۰۰
$ZnSO_4.7H_2O$ (mg/L)	۱/۵۰
$Na_2MoO_4.2H_2O$ (mg/L)	۰/۰۴
$CuSO_4.5H_2O$ (mg/L)	۰/۰۴
$CoCl_2.6H_2O$ (mg/L)	۰/۶۰
H_3BO_3 (mg/L)	۰/۲۰

مرحله تولید محصول

بررسی انواع سوبسترای مخلوط در این مرحله انجام شد. محیط کشت بدون منبع کربن مطابق ترکیب جدول ۱ تهیه شد. به منظور بررسی اثر سوبسترای مختلف و ترکیب آنها با متانول با غلظت‌های متفاوت (غلظت‌ها براساس مفاهیم نظری ارایه شده توسط Babel و همکاران [۱۳] انتخاب شد). منبع کربن در ۱۴ حالت مختلف موجود درجدول ۲، به محیط اضافه شد و ۱ mL از تعلیق میکروبی تهیه شده در مرحله رشد به هر ارلن اضافه شد. کربن دهی ارلن‌ها طبق جدول ۲ هر ۴۸ h یک مرتبه انجام شد. پس از ۱۲۰ h مقدار PHB تولید شده در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.

روش‌های شناسایی

وزن خشک سلولی (CDW) با استفاده از روش وزن‌سنجی اندازه‌گیری شد. در این روش، حجم دقیقی از محیط کشت در دستگاه مرکزگریز قرار گرفته و رسوب حاصل پس از شست و شو تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۹۰°C قرار داده شد. مقدار PHB نیز با دستگاه رنگ‌نگار گازی با استفاده از روش Braunegg و همکاران [۱۹] معین شد. در این روش ۵ mL از محیط کشت در دستگاه مرکزگریز قرار گرفت و محلول رویی دور ریخته شد. ۲ mL کلروفرم و ۱ mL محلول ۴ درصد سولفوریک اسید در متانول به ماده زیستی ته‌نشین شده اضافه شد. ترکیب حاصل به مدت ۴ h در دمای ۱۰۰°C قرار داده شد تا واکنش استری‌شدن مونومر هیدروکسی بوتیرات انجام شود. پس از اتمام فرایند و خنک شدن لوله‌ها ۱ mL آب دو بار تقطیر به محصول واکنش اضافه و به شدت به مدت ۱۰ min تکان داده شد. پس از دو فازشدن محلول، محلول رویی که شامل متانول و آب است و فصل مشترک دو فاز دور ریخته شد. ۱ mL از محلول زیری که کلروفرم حاوی متیل استر در آن تشکیل شده است، به دستگاه GC تزریق شد. دستگاه GC مورد استفاده PU 4410 Philips با آشکار ساز FID بود که در آن جداسازی به وسیله ستون مویینه‌ای از جنس سیلوکسان، با سرعت جریان گاز حامل ۳۵mL/min انجام شد. برنامه داده شده به دستگاه عبارت از دمای آشکارساز ۲۸۰°C، دمای محل تزریق ۲۵۰°C، دمای ستون ۷۵°C به مدت ۲ min، سرعت افزایش دمای اولیه ۱۰°C/min، دمای اولیه بالای ستون ۱۰۰°C، زمان ماندن در دمای اولیه ۰/۵ min، سرعت افزایش دمای ثانویه ۳۵°C/min، دمای ثانویه بالای ستون ۲۰۰°C و زمان ماندن در دمای ثانویه ۰/۵ min بود.

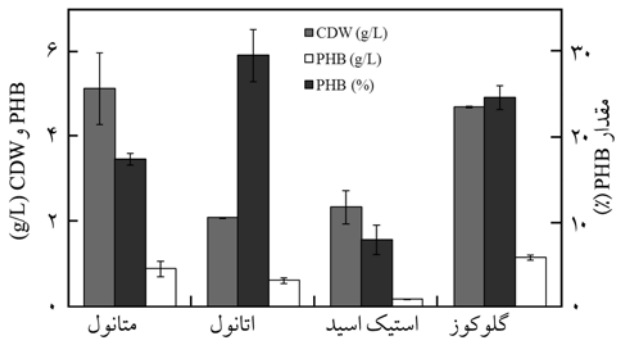
جدول ۲ ـ منابع کربن بررسی شده به عنوان سوبسترای مخلوط.

ردیف	کد	متانول (v/v ٪)	اتانول (v/v ٪)	سدیم استات (g/L)	گلوکز (g/L)
۱	M	۷/۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۲	E	۰/۰	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۳	A	۰/۰	۰/۰۰	۷/۴۰	۰/۰۰
۴	G	۰/۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۲۲/۲۰
۵	M+E1	۰/۵	۰/۲۵	۰/۰۰	۰/۰۰
۶	M+E2	۰/۵	۰/۵۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۷	M+E3	۰/۵	۰/۱۰	۰/۰۰	۰/۰۰
۸	M+A1	۰/۵	۰/۰۰	۱/۸۵	۰/۰۰
۹	M+A2	۰/۵	۰/۰۰	۳/۷۰	۰/۰۰
۱۰	M+A3	۰/۵	۰/۰۰	۷/۴۰	۰/۰۰
۱۱	M+G1	۰/۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۵/۵۵
۱۲	M+G2	۰/۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۱۱/۱۰
۱۳	M+G3	۰/۵	۰/۰۰	۰/۰۰	۲۲/۲۰
۱۴	M+E+A	۰/۵	۰/۵۰	۳/۷۰	۰/۰۰

نتایج و بحث

بررسی نوع منبع کربن

متیلوباکتریوم اکستروکوئنس یک متیلوتروف اختیاری است، بنابراین قابلیت استفاده از سوبستراهای چندکربنی را نیز دارد. برای بررسی قابلیت رشد باکتری و تولید PHB از سایر منابع کربنی و مقایسه آنها با متانول، چهار منبع کربن، متانول، اتانول، سدیم‌استات و گلوکوز ارزیابی شدند. بدین‌منظور مطابق روش کار بیان شده، باکتری رشد داده شد و مقدار وزن خشک سلول، محتوای PHB موجود در سلول و غلظت PHB معین شد. نتایج حاصل در شکل ۱ مقایسه شده است. همان‌طور



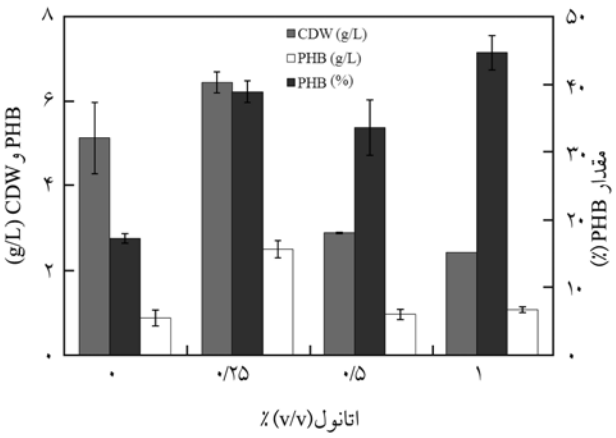
شکل ۱ ـ مقایسه رشد متیلوباکتریوم اکستروکوئنس DSMZ 1340 و تولید PHB به وسیله آن در منابع کربن مختلف.

که در این شکل مشاهده می‌شود، باکتری به دلیل این که یک متیلوتروف اختیاری است، قابلیت استفاده از همه این منابع را دارد. بیشترین رشد در متانول، بیشترین درصد تجمع در اتانول و بیشترین غلظت PHB در گلوکوز مشاهده می‌شود. ویژگی قابلیت استفاده از منابع کربن متفاوت یک مزیت با ارزش برای فرایندهایی است که از این باکتری استفاده می‌کنند. زیرا، اگر شرایطی پیش آید که نتوان سوبسترای فرایند را تأمین کرد، با اندک تغییرات می‌توان از سوبسترای جای‌گزین استفاده کرد. باتوجه به امکان رشد باکتری در سایر منابع کربنی، در این مطالعه برای افزایش تولید PHB، از راه‌کار به کارگیری سوبسترای مخلوط با متانول استفاده شده است.

بررسی اثر استفاده از سوبسترای مخلوط

اتانول به عنوان سوبسترای مخلوط

شکل ۲ اثر غلظت اتانول را بر درصد تجمع، غلظت PHB و رشد باکتری نشان می‌دهد. در این شکل نتایج حاصل از سه نسبت حجمی ۱ به ۲، ۱ به ۱ و ۲ به۱ اتانول به متانول (با درصد حجمی ۰/۵ متانول و درصدهای حجمی ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱/۰ اتانول در محیط کشت) با حالت بدون سوبسترای مخلوط مقایسه شده است. طبق نتایج حاصل افزودن اتانول درصد تجمع PHB و غلظت آن را در همه نسبت‌ها افزایش می‌دهد. اما، مقدار رشد باکتری تنها در حالتی که غلظت اتانول نصف غلظت متانول است، بیشتر شده و در بقیه نسبت‌ها کاهش یافته است. این نتیجه احتمالاً به دلیل سمیت اتانول است، یعنی اگر غلظت آن در محیط از حدی بیشتر شود، رشد باکتری را مهار می‌کند. بیشترین مقدار غلظت PHB در نسبت ۱به ۲ اتانول به متانول به دست آمده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، بیشترین تجمع PHB در نسبت ۲ به ۱ اتانول به متانول



شکل ۲ ـ اثر افزودن اتانول به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و محتوای PHB.

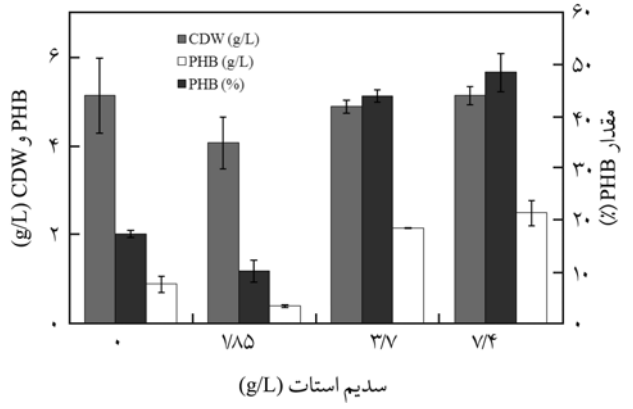
است. در این شرایط اتانول به دلیل سمیت از رشد باکتری جلوگیری می‌کند. با توجه به این که PHB در شرایط نامساعد رشد و در شرایط وجود کربن اضافی تجمع می‌یابد، بیشترین تجمع PHB در این حالت قابل توجیه است.

سدیم استات به عنوان سوبسترای مخلوط

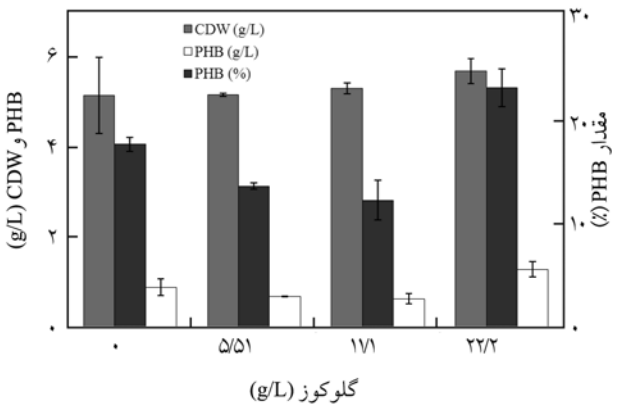
اثر افزودن سدیم‌استات با سه نسبت مولی ۱ به ۴، ۱ به ۲ و ۱ به ۱ استات به متانول در مقایسه با متانول خالص در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد، رشد باکتری، تجمع و غلظت PHB در سدیم‌استات با غلظت کم (نسبت مولی ۱ به ۴ سدیم‌استات به متانول) نسبت به متانول خالص کاهش می‌یابد. اما، با افزایش غلظت سدیم‌استات در سوبسترای مخلوط مقدار رشد، تجمع و غلظت PHB افزایش نشان می‌دهد. بیشترین تجمع و غلظت PHB در نسبت مولی ۱ به ۱ مشاهده می‌شود که سه برابر حالت متانول خالص است. این نتیجه اثر مثبت سوبسترای مخلوط سدیم‌استات و متانول بر تولید PHB در غلظت زیاد سدیم‌استات را نشان می‌دهد. علت افزایش تولید PHB در سدیم‌استات به دلیل مهارشدن چرخه TCA به وسیله سدیم‌استات است. با توجه به مسیر تولید PHB در باکتری‌ها، در استفاده از استیل کو آ (Ac-CoA) بین چرخه کربس و چرخه PHB رقابت وجود دارد [۲۰،۲۱]، هنگام وجود سدیم‌استات اضافی در محیط، چرخه کربس مهار شده و چرخه PHB فعال می‌شود. بنابراین، مقدار تجمع و تولید PHB افزایش می‌یابد.

گلوکوز به عنوان سوبسترای مخلوط

اثر افزودن گلوکوز در سه نسبت مولی ۱ به ۴، ۱ به ۲ و ۱ به ۱ گلوکوز به متانول در مقایسه با متانول خالص بر رشد سلول، تجمع و غلظت PHB

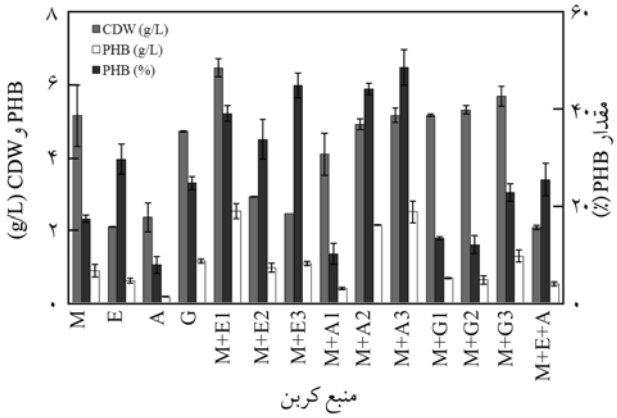


شکل ۳ ـ اثر افزودن سدیم استات به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و مقدار PHB.



شکل ۴ ـ اثر افزودن گلوکوز به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و مقدار PHB.

در شکل ۴ نشان داده شده است. فقط در نسبت مولی ۱ به ۱، مقدار رشد باکتری، تجمع و غلظت PHB نسبت به حالت متانول خالص کمی افزایش یافته است. در سه حالت مورد بررسی، مقدار رشد تغییر محسوسی نسبت به حالت متانول خالص ندارد. اما، مقدار تجمع PHB در غلظت‌های کمتر گلوکوز نسبت به حالت شاهد کاهش یافته و در غلظت زیاد گلوکوز افزایش می‌یابد. این افزایش احتمالاً به دلیل وجود



شکل ۵ ـ مقایسه اثر سوبستراهای مخلوط بر CDW، غلظت و مقدار PHB.

کربن اضافی در محیط است که منجر به تولید PHB می‌شود. با توجه به نتایج حاصل استفاده از گلوکوز به عنوان سوبسترای مخلوط از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. زیرا، در اثر افزودن مقدار زیادی گلوکوز تولید PHB اندکی افزایش یافته است.

مقایسه کل سوبستراهای مخلوط

نتایج به دست آمده از بررسی اثر سوبسترای مخلوط در جدول ۳ و شکل

جدول ۳ ـ مقایسه اثر سوبستراهای مخلوط بر وزن خشک سلول (CDW)، غلظت و مقدار پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB).

کد	منبع کربن موجود در محیط کشت	CDW (g/L)	مقدار PHB (٪)	غلظت PHB (g/L)
M	متانول	۵/۱۴±۰/۸۴	۱۷/۳۹±۰/۶۷	۰/۹۰±۰/۱۸
E	اتانول	۲/۱۰±۰/۰۱	۲۹/۶۰±۳/۰۸	۰/۶۲±۰/۰۷
A	سدیم استات	۲/۳۵±۰/۳۹	۷/۹۲±۱/۷۶	۰/۱۸±۰/۰۱
G	گلوکوز	۴/۷۱±۰/۰۲	۲۴/۶۶±۱/۴۱	۱/۱۶±۰/۰۶
M+E1	اتانول: متانول ۲:۱ v/v	۶/۴۶±۰/۲۴	۳۹/۰۱±۱/۶۲	۲/۵۲±۰/۲۰
M+E2	اتانول:متانول ۱:۱ v/v	۲/۹۲±۰/۰۱	۳۳/۶۷±۴/۱۲	۰/۹۸±۰/۱۲
M+E3	اتانول:متانول ۱:۲ v/v	۲/۴۴±۰/۰۱	۴۴/۷۹±۲/۵۴	۱/۰۹±۰/۰۶
M+A1	سدیم استات:متانول ۴:۱ mol/mol	۴/۰۸±۰/۵۸	۱۰/۱۹±۲/۱۳	۰/۴۱±۰/۰۳
M+A2	سدیم استات:متانول ۲:۱ mol/mol	۴/۹۰±۰/۱۵	۴۴/۰۳±۱/۲۱	۲/۱۶±۰/۰۱
M+A3	سدیم استات:متانول ۱:۱ mol/mol	۵/۱۵±۰/۲۰	۴۸/۵۶±۳/۶۵	۲/۵۰±۰/۲۸
M+G1	گلوکوز:متانول ۴:۱ mol/mol	۵/۱۶±۰/۰۴	۱۳/۴۴±۰/۲۹	۰/۶۹±۰/۰۱
M+G2	گلوکوز:متانول ۲:۱ mol/mol	۵/۳۹±۰/۱۲	۱۲/۱۰±۱/۸۸	۰/۶۴±۰/۱۱
M+G3	گلوکوز:متانول ۱:۱ mol/mol	۵/۶۸±۰/۲۷	۲۲/۷۶±۱/۸۱	۱/۳۰±۰/۱۶
M+E+A	متانول + سدیم استات* +اتانول#	۲/۰۹±۰/۰۵	۲۵/۳۸±۳/۳۳	۰/۵۳±۰/۰۶

* نسبت ۱ به ۴ سدیم استات به متانول؛ #، نسبت حجمی ۱ به ۱ اتانول به متانول.

جدول ۴ ـ مقایسه سوبسترای مخلوط سدیم‌استات و متانول با متانول خالص.

منبع کربن	متانول + استات	متانول
سدیم‌استات اضافه شده به محیط در سه مرحله (g/L)	۲۱/۸۵	-
سدیم استات مصرف شده (g/L)	۱۰/۵۰	-
سدیم استات مصرف شده (mol)	۰/۱۲۸	-
متانول اضافه شده به محیط در سه مرحله (g/L)	۱۱/۸۵	۲۳/۷۰
متانول مصرف شده (g/L)	۹/۴۵	۱۷/۸۴
متانول مصرف شده (mol)	۰/۲۹۵	۰/۵۵۸
توده زیستی تولید شده (g/L)	۵/۱۵	۵/۱۴
PHB تولید شده (g/L)	۲/۵۱	۰/۹۰
HB ($C_4H_6O_2$) تولید شده (mol)	۰/۰۲۹	۰/۰۱۰
مقدار توده زیستی باقی‌مانده (g/L)	۲/۶۴	۴/۲۴
مقدار توده زیستی ($C_4H_8O_2N$) باقی‌مانده (mol)	۰/۰۲۶	۰/۰۴۲
$Y_{X/Methanol}$ (g/g)	۰/۵۴	۰/۲۹
$Y_{PHB/Methanol}$ (g/g)	۰/۲۶	۰/۰۵
$Y_{X/Acetate}$ (g/g)	۰/۴۹	-
$Y_{PHB/Acetate}$ (g/g)	۰/۲۴	-
مقدار کربن در سوبسترای مصرف شده (mol)	۰/۵۵۱	۰/۵۵۸
مقدار کربن مصرف شده برای تولید PHB (mol)	۰/۱۱۶	۰/۰۴۲
بازده کربنی تولید PHB (mol/mol)	۰/۲۱۱	۰/۰۷۵
مقدار کربن مصرف شده برای توده زیستی باقی‌مانده[1] (mol)	۰/۱۰۴	۰/۱۶۳
بازده کربنی تولید توده زیستی باقی‌مانده (mol/mol)	۰/۱۸۸	۰/۲۹۲

۱- وزن توده زیستی باقی‌مانده = تفاضل وزن کلی توده زیستی از PHB درون آن.

۵ نشان داده شده است. با توجه به شکل ۵ بهترین نتایج سوبسترای مخلوط مربوط به نسبت مولی ۱ به ۱ سدیم‌استات به متانول و نسبت حجمی ۱ به ۲ اتانول به متانول است.

محاسبه بازده کربنی

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، یکی از بهترین ترکیب‌های سوبسترای مخلوط، ترکیب نسبت مولی ۱ به ۱ سدیم‌استات به متانول (M+A3) است. طی فرایندی که در مدت ۱۲۰ h انجام شد، به دلیل سمیت متانول، منابع کربن در فواصل زمانی ۴۸ h یک مرتبه به محیط کشت اضافه شدند. بازده تولید توده زیستی و PHB در دو حالت نسبت مولی ۱ به ۱ سدیم‌استات به متانول و متانول خالص در جدول ۴ مقایسه شده است. مطابق نتایج، بازده کربنی تولید PHB، یعنی تعداد مول‌های کربن که صرف تولید PHB شده به مول‌های کربن موجود در سوبسترای مصرف شده، در حالت مخلوط سدیم‌استات و متانول سه برابر حالت متانول خالص است. Babel [۱۳] استفاده از مخلوط سوبستراها را این طور توجیه می‌کند: با توجه به منبع کربن و انرژی و مسیرهای سوخت و ساز، تولید PHB با مصرف انرژی، (یا) توان کاهشی یا با تولید آنها همراه است. در مورد اول (به منظور تولید انرژی مصرفی یا توان کاهشی مورد نیاز تولید PHB)، باید سوبسترای اضافی اکسید شود. بنابراین، رسیدن به بازده نظری سوخت و ساز کربن ممکن نیست. مثلاً برای تولید PHB از متانول معادله (۱) برقرار است [۱۳]:

$$2CH_3OH + 2CO_2 + 5NAD(P)H \xrightarrow{SER} C_4H_6O_2 \qquad (۱)$$

در حالتی که از مخلوط استیک اسید (استات) و متانول استفاده می‌شود، یکی از آنها اسکلت کربنی را می‌سازد و دیگری انرژی یا توان کاهشی مورد نیاز اولی را فراهم می‌کند:

$$\begin{cases} 2CH_3COOH + NAD(P)H + 4ATP \rightarrow (C_4H_6O_2) \\ 2CH_3OH \rightarrow CO_2 + 2NADH + ATP \end{cases} \qquad (۲)$$

اگر NADH و NAD(P)H معادل در نظر گرفته شود (از نظر انرژی و به عنوان سوبسترایی برای واکنش‌های احیایی، مثل AcAc-CoA ردوکتاز)، حدود ۸۰٪ منبع کربن جفت سوبسترای استیک اسید - متانول، می‌تواند به PHB تبدیل شود [۱۳]. البته همان‌طور که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد، به طور عملی این وضعیت رخ نمی‌دهد، ولی با بهبود سویه‌های ریزسازواره، بهینه‌سازی محیط کشت و شرایط محیطی می‌توان به این وضعیت دست یافت.

نتیجه‌گیری

با توجه به ویژگی متیلوتروف اختیاری بودن باکتری متیلوباکتریوم اکستروکوئنس DSMZ 1340، این باکتری قابلیت رشد و تولید PHB در منابع کربن اتانول، سدیم‌استات و گلوکوز را دارد. استفاده از منابع کربن مختلف با غلظت‌های متفاوت به عنوان سوبسترای مخلوط با متانول نشان می‌دهد، استفاده از سوبسترای مخلوط با غلظت مناسب مقدار تولید PHB را افزایش می‌دهد. به دلیل مهار شدن چرخه کربس به وسیله سدیم‌استات و به همراه آن فعال شدن چرخه تولید PHB، یکی از بهترین سوبستراها سدیم‌استات است که در نسبت مولی ۱ به ۱ با متانول، بازده کربنی تولید PHB را بیش از سه برابر افزایش می‌دهد.

مراجع

1. Suriyamongkol P., Weselake R., Narine S., Moloney M., and Shah S., Biotechnological Approaches for the Production of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms and Plants - A Review, *Biotechnol. Adv.*, **25**, 148-175, 2007.
2. Mokhtarani N., Ganjidust H., Vasheghani Farahani E., and Khaleghi Sarnamy M., Effect of Volatile Fatty Acids in Production of Polyhydroxyalkanoates by Activated Sludge, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **21**, 83-90, 2008.
3. Ganjidust H., Vasheghani Farahani E., Borghai M., and Mokhtarani N., Effects of Natural Polymers and Chemical Coagulants on the Dewatering of Sewage Sludge, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **17**, 353-357, 2004.
4. Mohamadbigi Kh. and Vasheghani Farahani E., Comparison of Different Biopolymers Performance in Water Treatment, *Iran. J. Polym. Sci. Technol. (In Persian)*, **18**, 285-290, 2005.
5. Ataei S.A., Vasheghani-Farahani E., Shojaosadati S.A., and Abdol Tehrani H., Isolation of PHA Producing Bacteria from Date Syrup Waste, *Macromol. Symp.*, **269**, 11-16, 2008.
6. Sudesh K., Abe H., and Doi Y., Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters, *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1503-1555, 2000.
7. Lenz R.W. and Marchessault R.H., Bacterial Polyesters: Biosynthesis, Biodegradable Plastics and Biotechnology, *Biomacromolecules*, **6**, 1-8, 2005.
8. Ayorinde F.O., Saeed K.A., Price E., Morrow A., Collins W.E., Mclnnis F., Pollack S.K., and Eribo B.E., Production of Poly(β-hydroxybutyrate) from Saponified Vernonia Galamensis Oil by Alcaligenes Eutrophus, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 46-50, 1998.
9. Shishatskaya E.I., Biomedical Investigations of Biodegradable PHAs, *Macromol. Symp.*, **269**, 65-81, 2008.
10. Chiellini D.F., Piras A.M. and Chiellini E., Polymeric Materials for Bone and Cartilage Repair, *Prog. Polym. Sci.*, **35**, 403-440, 2010.
11. Choi J. and Lee S.Y., Factors Affecting the Economics of Polyhydroxyalkanoate Production by Bacterial Fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 13-21, 1999.
12. Babel W., The Mixed Substrate Concept, Applied for Microbial Syntheses of Metabolites, *Biotech. Adv.*, **8**, 261-275, 1990.
13. Babel W., Pecularities of Methylotrophs Concerning Overflow Metabolism, Especially the Synthesis of Polyhydroxyalkanoates, *FEMS Microbiol. Rev.*, **103**, 141-148, 1992.
14. Bourque D., Pomerleau Y., and Groleau D., High-cell-density Production of Poly-β-hydroxybutyrat (PHB) from Methanol by Methylobacterium Extorquens: Production of High-molecular-Mass PHB, *Appl. Microbiol. Biot.*, **44**, 367-376, 1995.
15. Kim P., Kim J.H., and Oh D.K., Improvement in Cell Yield of Methylobacterium sp. Reducing the Inhibition of Medium Components for Poly-β-hydroxybutyrate Production, World *J. Microb. Biot.*, **19**, 357-361, 2003.
16. Suzuki T., Yamane T., and Shimizu S., Mass Production of Poly-β-hydroxybutyric Acid by Fully Automatic Fed-batch Culture of Methylotroph, *Appl. Microbiol. Biot.*, **23**, 322-329, 1998.
17. Mokhtari-Hosseini Z.B., Vasheghani-Farahani E., Heidarzadeh-Vazifekhoran A., Shojaosadati S.A., Karimzadeh R., and Khosravi Daran K., Statistical Media Optimization for Growth and PHB Production from Methanol3 by a Methylotrophic Bacterium, *Bioresour. Technol.*, **100**, 2436-2443, 2009.
18. Mokhtari-Hosseini Z.B., Vasheghani-Farahani E., Shojaosadati S.A., Karimzadeh R., and Heidarzadeh-Vazifekhoran A., Effect of Feed Composition on PHB Production from Methanol by HCDC of Methylobacterium Extorquens (DSMZ 1340), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **84**, 1136-1139, 2009.
19. Braunegg G., Sonnleitner B., and Lafferty R.M., A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly-β-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 29-37, 1978.
20. Mothes G., Rivera H.S., and Babel B., Competition between β-Ketothiolase and Citrate Synthase during Poly(β-hydroxybutyrate) Synthesis in Methylobacterium Rhodesianum, *Arch. Microbiol.*, **166**, 405-410, 1997.
21. Mothes G., Ackermann J.U., and Babel W., Regulation of Poly(β-hydroxybutyrate) Synthesis in Methylobacterium Rhodesianum MB 126 Growing on Methanol or Fructose, *Arch. Microbiol.*, **169**, 360-363, 1998.