



تولید پلیمر زیست تخریب پذیر هیدروکسی بوتیرات-والرات در محیط کشت خالص: ارزیابی مقایسه‌ای فرآیندهای ناپیوسته و خوراک‌دهی شده به شکل ناپیوسته

عاطفه فرجامنش^{۱*}، سید احمد عطایی^۲

^۱کارشناسی ارشد، مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

^۲استادیار، مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله مروری

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۲۵

ویرایش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۳

پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۱

کلیدواژه‌ها:

پلی هیدروکسی آلکانوات،

زیست تخریب پذیری،

آلکالیجنس اوتروفس،

فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده،

اسیده‌های چرب.

پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها (PHA) ها به عنوان پلیمرهای زیست تخریب پذیر، گزینه‌ای امیدوارکننده برای کاهش اثرات زیست محیطی پسماندها محسوب می‌شوند. این ترکیبات در شرایط تنش ناشی از محدودیت مواد مغذی و حضور منابع کربنی فراوان، به صورت درون سلولی توسط میکروارگانیسم‌ها ذخیره می‌شوند. در میان آن‌ها، کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات شناخته شده ترین عضو این خانواده است. تولید این پلیمرها معمولاً مبتنی بر مصرف ترکیبات آلی محلول مانند اسیده‌های چرب فرار است که علاوه بر هیدروکسی بوتیرات، به تولید هیدروکسی والرات نیز منجر می‌شوند. در این پژوهش، هدف بررسی تأثیر افزودن تدریجی اسیده‌های چرب بر افزایش بازده تولید و کاهش مصرف منابع کربنی بود. سویه آلکالیجنس اوتروفس از کلکسیون میکروبی تهیه شد و منابع کربنی شامل گلوکز و اسیده‌های چرب (استیک، پروپیونیک و مخلوط آن‌ها) مورد استفاده قرار گرفت. برای ارزیابی اثر منبع کربن، دو فرآیند ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی شده مقایسه شدند. طراحی آزمایش‌ها با نرم افزار Minitab و با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه انجام شد. کشت‌ها در ارلن‌های لرزان حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط انجام گرفت و ۵ میلی لیتر محیط بذر به آن‌ها افزوده شد. در روش خوراک‌دهی شده، اسیده‌های چرب در سه زمان مشخص (۲۴، ۴۵ و ۵۰ ساعت) به صورت مرحله‌ای اضافه شدند تا اثرات بازدارندگی جلوگیری شود. شرایط کشت شامل دمای ۳۲ درجه، سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و زمان ۷۲ ساعت بود. نتایج نشان داد بیشترین تولید هیدروکسی بوتیرات (۳/۴۸۶ گرم بر لیتر) و هیدروکسی والرات (۰/۷۹۴ گرم بر لیتر) در حضور اسید استیک و روش خوراک‌دهی شده حاصل شد. همچنین این روش موجب افزایش حدود ۱۷ درصدی هیدروکسی والرات شد و کارایی مصرف منابع را بهبود داد.

*Corresponding author E-mail: farjadmanesh@gmail.com

DOI: 10.22104/mbbe.2026.8261.1017

https://mbbe.irost.ir/article_1710.html



۱. مقدمه

پلاستیک اگرچه به عنوان یکی از شاهکارهای صنعت بشر و در عین حال از آلاینده‌های اصلی محیط‌زیست محسوب می‌شود، اما امروزه انباشت زباله‌های پلاستیکی به یکی از چالش‌های جدی و نگران‌کننده برای اکوسیستم جهانی تبدیل شده است. در میان پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر که تاکنون توسعه یافته‌اند، گروهی به نام پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs) [1] و کopolymerهای متناظرشان به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند. این گروه که شامل حدود ۴۰ نوع ترکیب مختلف است، به دلیل تجزیه‌پذیری کامل در طبیعت، انعطاف‌پذیری بالا، مقاومت کامل در برابر نفوذ آب، هزینه تولید نسبتاً مقرون به صرفه و فرآیند تولید ساده‌تر نسبت به سایر بیوپلیمرها، جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند [۲]. از نظر شیمیایی، PHAها در واقع پلی‌استرهای مشتق‌شده از هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (HA) محسوب می‌شوند و وزن مولکولی آنها بسته به گونه میکروارگانیسم مورد استفاده و شرایط محیطی کشت، در بازه‌ای بین ۱۰۵ تا ۱۰۶ دالتون متغیر است [۳].

این پلیمرها طیف گسترده‌ای از کاربردها را در بر می‌گیرند که می‌توان به تولید انواع الیاف مصنوعی، افزودنی‌ها در صنعت آرایشی و بهداشتی (مانند شامپوها)، ساخت ایمپلنت‌های استخوانی و پروتزها، نخ‌های جراحی و دستکش‌های پزشکی، پوشش‌های زخم، مهندسی بافت عروق خونی، و همچنین تولید فیلم‌های بسته‌بندی، کیسه‌ها و ظروف یک‌بار مصرف اشاره کرد [۴].

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) [1] به عنوان یکی از اعضای برجسته خانواده PHAs، توسط میکروارگانیسم‌ها به عنوان منبع ذخیره انرژی درون سلولی تولید می‌شود. این فرآیند ذخیره‌سازی زمانی رخ می‌دهد که میکروب‌ها در محیطی با غلظت بالای منابع کربن قرار داشته باشند، اما از کمبود عناصر مغذی حیاتی نظیر نیتروژن، فسفر، پتاسیم یا اکسیژن رنج ببرند [۵]. در مقابل، کopolymer هیدروکسی‌والرات که زیرمجموعه‌ای از PHAs محسوب می‌شود، عمدتاً در حضور اسیدهای چرب فرار تولید شده و سهم آن در کل بیوپلیمر تولیدی، در مقایسه با PHB بسیار ناچیز است [۶].

منبع کربن نقش تعیین‌کننده‌ای در نوع و ساختار PHA تولیدی ایفا می‌کند. میکروارگانیسم‌های تولیدکننده PHA طیف وسیعی از مواد اولیه را قادر به مصرف دارند؛ از منابع ارزان‌قیمت مانند ملاس (نشت‌کرده از صنایع چغندر و نیشکر)، روغن‌های گیاهی و اسیدهای چرب مشتق‌شده از آنها، تا

آلکان‌ها و کربوهیدرات‌های ساده [۷]. استراتژی بهینه‌سازی عملیات تولید، تحت تأثیر متغیرهای متعددی از جمله نوع منبع کربن (گلوکز خالص یا پساب‌های ترکیبی)، ماهیت محیط کشت (کشت‌های خالص یا میکروبیوم‌های مخلوط)، رژیم عملیاتی (ناپیوسته، ناپیوسته خوراک‌دهی شده یا پیوسته)، و نوع راکتور مورد استفاده (راکتور ایرلیفت) [۲] یا راکتور پیوسته‌ی هم‌زده (CSTR) قرار دارد [۳]. فرآیند تخمیر می‌تواند به صورت تک‌مرحله‌ای یا چندمرحله‌ای در سیستم‌های ناپیوسته متوالی اجرا شود.

اگرچه فرآیند تخمیر ناپیوسته به دلیل هزینه‌های عملیاتی پایین، گزینه‌ای محبوب برای تولید PHA است، اما فرآیندهای ترکیبی (مانند ناپیوسته خوراک‌دهی شده) به عنوان رایج‌ترین استراتژی برای بهینه‌سازی بازده و کنترل کیفیت محصول، مورد استفاده قرار می‌گیرند [۸].

باکتری رالستونیا اوتروفا [۱]، که در ادبیات علمی با نام‌های واترسیا اوتروفا [۲] و آکالیجنس اوتروفس [۳] نیز شناخته می‌شود، یکی از پرکاربردترین و مطالعه شده‌ترین سویه‌های میکروبی برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHA) محسوب می‌گردد [۷]. این ارگانیسم، یک کوکسی گرم‌منفی است [۹] و سویه H16 آن به عنوان یک مدل بیوتکنولوژیکی مهم شناخته می‌شود. این باکتری توانایی منحصر به فردی در سنتز طیف وسیعی از متابولیت‌ها و بیوپلیمرها دارد و می‌تواند از طریق متابولیسم هتروتروفیک (استفاده از مواد آلی) و لیتواتروفیک (استفاده از منابع معدنی) رشد کند [۱۰].

تنوع منابع کربن مورد استفاده توسط رالستونیا اوتروفا بسیار گسترده است [۷]. به‌ویژه در حضور اسیدهای چرب با زنجیره کربنی فرد (مانند اسید پروپیونیک)، این باکتری قادر به تولید کopolymer پلی (۳- هیدروکسی بوتیرات - کو - ۳- هیدروکسی والرات) یا PHBV است [۶]. خواص فیزیکی، حرارتی و مکانیکی این کopolymer، مستقیماً تحت تأثیر درصد محتوای ۳-هیدروکسی‌والرات در ساختار آن قرار دارد.

هدف اصلی از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر فرآیند ناپیوسته‌ی خوراک‌دهی شده بر بازده تولید کopolymerهای هیدروکسی‌بوتیرات و هیدروکسی‌والرات است. در این راستا، انتخاب بهینه منابع کربن (شامل اسیدهای چرب متنوع و سایر منابع) برای حداکثرسازی تولید پلیمر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توجه به اینکه هزینه‌های بالای تولید بیوپلیمرها یکی از موانع اصلی تجاری‌سازی آنهاست، انجام تحقیقاتی که منجر به بهینه‌سازی اقتصادی فرآیند شود، ضروری به نظر می‌رسد.

مرحله‌ی اول میکروارگانیسم مولد بیوپلیمر PHA با نام *آلکالیجنس اوتروفوس* از کلکسیون میکروبی ایران (سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) سفارش داده شد. محیط کشت تعریف شده برای باکتری *آلکالیجنس اوتروفوس*، در جدول ۱ آورده شده است. پس از آماده سازی، pH محیط کشت به ۷/۲ تنظیم شد و قبل از استریلیزاسیون، ۱/۵٪ LB agar (Merck, Germany) به آن افزوده گردید.

شایان ذکر است که با وجود مطالعات گسترده در حوزه تولید PHA، تاکنون پژوهش جامعی بر روی افزودن تدریجی اسیدهای چرب در محیط کشت خالص با سویه رالستونیا اوتروفا انجام نشده است. بنابراین، نتایج این تحقیق می‌تواند سهم مؤثری در ارتقای دانش فنی و بهبود فرآیندهای تولید این پلیمرهای ارزشمند ایفا کند.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مشخصات باکتری *آلکالیجنس اوتروفوس*: در

جدول ۱: محیط کشت باکتری *آلکالیجنس اوتروفوس*.
Table 1. Growth Medium for *Alcaligenes eutrophus*.

Component	Amount
Peptone (Merck, Germany)	0.10 g
Yeast extract (Merck, Germany)	0.5 g
NaCl (Merck, Germany)	0.5 g
Distilled water (Beta Shimi Pars)	100 ml

گلوکز، ساکاروز، لاکتوز و مخلوط سه قند (گلوکز + ساکاروز + لاکتوز). برای تهیه محیط کشت، مقدار ۳۰ گرم از هر منبع قندی (گلوکز، ساکاروز، لاکتوز یا مخلوط سه قند با نسبت‌های معادل) وزن گردید، در آب مقطر حل گردید و محلول حاصل به ارلن‌های استریل منتقل شد. علاوه بر منابع قندی، اسیدهای چرب نیز به‌عنوان منابع کربن مکمل مورد استفاده قرار گرفتند. اسیدهای چرب مورد استفاده شامل اسید استیک خالص، اسید پروپیونیک خالص و مخلوط هم‌وزن اسید استیک و اسید پروپیونیک بود. بر اساس پیش‌زمینه پژوهش و مقادیر پیشنهادی، حجم ۵ میلی‌لیتر از این اسیدهای چرب به محیط کشت در آزمایش‌های ناپیوسته افزوده شد و در آزمایش‌های ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده، این مقدار به‌صورت تدریجی در سه مرحله (هر مرحله ۱/۲۵ میلی‌لیتر) اضافه گردید.

۲. محیط‌های کشت میکروبی و نحوه‌ی تهیه‌ی آن‌ها:

به‌منظور اطمینان از رشد بهینه و کارایی میکروارگانیسم در مراحل مختلف، از سه نوع محیط کشت مجزا شامل «محیط کشت ذخیره»، «محیط کشت بذری» و «محیط کشت تخمیر» استفاده شد. ترکیبات شیمیایی مورد نیاز برای محیط کشت ذخیره و همچنین محیط کشت بذری، بر اساس فرمولاسیون‌های استاندارد و با استفاده از ترکیبی از نمک‌های معدنی (جدول ۲) طراحی و تهیه گردیدند.

محیط کشت تخمیر، در واقع همان محیط کشت بذری است با یک تفاوت اساسی در غلظت منبع کربن؛ در این مرحله، غلظت منبع کربن افزایش می‌یابد تا شرایط لازم برای تجمع بیوپلیمر فراهم شود. در این پژوهش، چهار نوع منبع کربن قندی به‌عنوان منبع کربن اصلی مورد استفاده قرار گرفت:

جدول ۲: ترکیبات محیط کشت بذری

Table 2. Composition of Seed Culture Medium

Component	Concentration (g/L)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (Biochem, France)	3.5
KH ₂ PO ₄ (Merck, Germany)	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck, Germany)	1.35
MnSO ₄ ·5H ₂ O (Merck, Germany)	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Merck, Germany)	0.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Merck, Germany)	0.08
K ₂ SO ₄ (Merck, Germany)	2.2
H ₃ BO ₃ (Merck, Germany)	0.02
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Merck, Germany)	0.08

۳-۲-فعال کردن باکتری آلکاليجنس اوتروفس:

کپسول حاوی سویه میکروبی که از کلکسیون میکروبی ایران تهیه شده بود، تحت شرایط استریل و در مجاورت شعله قرار گرفت. فرآیند فعال‌سازی اولیه باکتری، دقیقاً مطابق با پروتکل‌های ذکر شده در دفترچه راهنمای کلکسیون میکروبی انجام پذیرفت تا از زنده‌مانی و کارایی سویه اطمینان حاصل شود.

۴-۲-تعیین سطوح و طراحی آزمایش:

به منظور بهینه‌سازی شرایط تولید و شناسایی پارامترهای مؤثر، از متغیرهای مختلف در طراحی آزمایش استفاده شد. برای مقایسه بازده تولید پلیمر در دو حالت کشت

ناپیوسته (B) و کشت ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده (F-B)، سه نوع منبع کربنی شامل اسید استیک (AA)، اسید پروپیونیک (PA) و ترکیب هم‌وزن این دو اسید (AA-PA) به عنوان عوامل اصلی مورد آزمایش قرار گرفتند. این آزمایش‌ها در ارلن‌های لرزان (Shake Flasks) اجرا شدند.

طراحی تجربیات با بهره‌گیری از نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۶ و با استفاده از روش تحلیل واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) صورت گرفت. کلیه متغیرهای مورد بررسی، از جمله نوع منبع کربن و روش تخمیر، در بازه زمانی ماند ۷۲ ساعت ارزیابی شدند. ساختار کامل آزمایش‌ها و ترکیب متغیرها در جدول ۳ خلاصه شده‌اند.

جدول ۳: طراحی آزمایش انجام شده با استفاده از متغیرها و نوع آن‌ها
Table 3. Experimental Design with Variables and Their Types

Experiment No.	Fatty Acid	Process Type
1	AA	B
2	AA	F-B
3	AA	B
4	AA	F-B
5	AA	B
6	AA	F-B
7	AP	B
8	AP	F-B
9	AP	B
10	AP	F-B
11	AP	B
12	AP	F-B
13	AA-AP	B
14	AA-AP	F-B
15	AA-AP	B
16	AA-AP	F-B
17	AA-AP	B
18	AA-AP	F-B

حروف و اختصارات استفاده شده در جدول ۳ به شرح زیر هستند: AA: اسید استیک (Acetic Acid)، AP: اسید پروپیونیک (Propionic Acid)، AA-AP: مخلوط هم‌وزن اسید استیک و اسید پروپیونیک، B: فرآیند ناپیوسته (Batch)، F-B: فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده (Fed-Batch).

۵-۲-آزمایشات فرایند ناپیوسته:

برای انجام آزمایش‌های ناپیوسته، ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تخمیر با ۵ میلی‌لیتر محیط کشت بذر حاوی باکتری مخلوط گردید. سپس، ۵ میلی‌لیتر از اسیدهای چرب استریل‌شده به مخلوط اضافه شد. در این سیستم، حجم کل محیط کشت ۶۰ میلی‌لیتر بود که شامل ۸۴٪ محیط کشت تخمیر، ۸٪ محیط کشت بذر و ۸٪ اسیدهای چرب می‌باشد. پس از آماده‌سازی، درب ارلن‌ها با پنبه استریل و ورق آلومینیوم پوشانده شد و نمونه‌ها به انکوباتور منتقل گردیدند. شرایط انکوباسیون شامل دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد، سرعت همزن ۱۲۰ دور در دقیقه و مدت زمان ۷۲ ساعت بود.

۶-۲-آزمایشات فرایند ناپیوسته‌ی خوراک‌دهی

شده:

در فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی‌شده، مرحله اولیه مشابه حالت ناپیوسته بود؛ به این صورت که ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تخمیر با ۵ میلی‌لیتر محیط بذر ترکیب شد. سپس، ۱/۲۵ میلی‌لیتر از اسیدهای چرب مورد نظر (استیک، پروپیونیک یا مخلوط آن‌ها) به ارلن‌ها اضافه گردید. شایان ذکر است که استریل‌سازی اسیدهای چرب پیش از اضافه شدن به محیط کشت انجام پذیرفته بود. درب ارلن‌ها پس از اضافه کردن اسیدها، با پنبه و آلومینیوم پوشانده شد و نمونه‌ها به انکوباتور (دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه) منتقل شدند.

اجرا شد [۱۱].

۸-۲- اندازه‌گیری مقدار پلیمر به روش کروماتوگرافی گازی:

برای تعیین غلظت پلیمر تولیدی، از روش کروماتوگرافی گازی استفاده شد. فرآیند استخراج و متیلاسیون بر اساس روش‌های توصیف‌شده توسط عطایی انجام پذیرفت [۱۱]. در این روش، از مخلوط کلروفرم و متانول اسیدی برای حل کردن دیواره سلولی و تبدیل اسیدهای هیدروکسی‌آلکانوات به متیل‌استرهای آن‌ها استفاده گردید. کلروفرم علاوه بر حلالیت دیواره سلولی، توانایی حل کردن PHB را نیز دارد.

پس از انجام عملیات، سه فاز مجزا تشکیل شد:

- فاز رویی: حاوی اسید سولفوریک
- فاز میانی: حاوی بقایای باکتریایی
- فاز زیرین (آلی): حاوی متیل‌استرهای هیدروکسی‌آلکانوات (HAS)

فازهای رویی و میانی با استفاده از پیپت اتوماتیک جدا و حذف شدند. فاز آلی زیرین جهت نمونه‌گیری و تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی آماده‌سازی گردید. برای این منظور از دستگاه کروماتوگرافی گازی دانشگاه شهید باهنر کرمان استفاده شد. مشخصات فنی و شرایط عملیاتی دستگاه مورد استفاده در جدول ۴ آورده شده است.

برنامه خوراک‌دهی به صورت زیر طراحی شد:

۱. مرحله اول: پس از گذشت ۲۴ ساعت از شروع فرآیند، مقدار ۱/۲۵ میلی‌لیتر از اسیدهای چرب به همان ترتیب قبلی به محیط کشت افزوده شد.
۲. مرحله دوم: پس از گذشت ۴۵ ساعت (۲۱ ساعت پس از خوراک‌دهی دوم)، مقدار دیگری معادل ۱/۲۵ میلی‌لیتر از اسیدهای چرب اضافه گردید.
۳. مرحله سوم: در ساعت ۵۰ (۵ ساعت پس از خوراک‌دهی دوم)، آخرین نوبت خوراک‌دهی با حجم ۱/۲۵ میلی‌لیتر انجام شد.

بعد از هر نوبت اضافه کردن اسید، نمونه‌ها مجدداً به انکوباتور منتقل می‌شدند تا فرآیند رشد تا پایان زمان ۷۲ ساعته ادامه یابد. زمان‌بندی خوراک‌دهی به گونه‌ای انتخاب شد که در ساعاتی صورت پذیرد که رشد باکتری به اوج خود می‌رسد و نیاز سلول‌ها به منبع کربن در روز دوم و سوم افزایش می‌یابد. ذکر این نکته ضروری است که حجم و زمان‌بندی خوراک‌دهی در این پژوهش بر اساس پیشینه مطالعاتی انتخاب شده و در تحقیقات دیگر محققان، این مقادیر و الگوها می‌توانند متفاوت باشند.

۷-۲- تعیین وزن خشک سلولی:

پس از اتمام دوره ۷۲ ساعته انکوباسیون، نمونه‌ها از انکوباتور خارج شدند. به منظور تعیین وزن خشک سلولی، ۵ میلی‌لیتر از هر نمونه به لوله‌های آزمایش منتقل گردید. این روش بر اساس پروتکل‌های ارائه‌شده توسط عطایی و همکاران

جدول ۴: مشخصات فنی و شرایط عملیاتی دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد استفاده

Table 4. Technical Specifications and Operational Conditions of the Gas Chromatography Instrument Used

پارامتر	شرایط عملیاتی
مدل دستگاه	Varian CP 3800
نوع ستون	Capillary cp-sil 8 cp
طول ستون	30 m
قطر داخلی ستون	1 μ m
دتکتور	FID
گاز حامل	H ₂
نرخ جریان گاز حامل	30 mL/min
دمای دتکتور	180 °C
دمای انژکتور	150 °C
دمای اولیه ستون	80 °C
زمان اولیه	1 min
Ramp 1	25 °C/min
دمای نهایی	150 °C
زمان در دمای نهایی	1 min

۹-۲- تعیین درصد PHA

برای تعیین درصد تولید پلی هیدروکسی آلکانوات (PHA) نسبت به زیست توده خشک، از روش های توصیف شده توسط عطایی و همکاران استفاده شد [۱۱]. در این راستا، با جایگذاری مقادیر اندازه گیری شده برای غلظت های هیدروکسی بوتیرات (HB)، هیدروکسی والرات (HV) و وزن خشک سلولی [1] (CDW) در معادله ۴-۱، درصد تولید پلیمر در هر نمونه محاسبه گردید [۱].

$$PHA = \frac{HB + HV}{CDW} \times 100$$

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقادیر تولیدی کopolymerهای هیدروکسی بوتیرات - والرات
تعیین هویت و کمی سازی پلیمرها بر اساس زمان نگهداری (Retention Time) و مساحت زیر پیک های خروجی

جدول ۵: مقادیر تولیدی کopolymerهای هیدروکسی بوتیرات، هیدروکسی والرات، درصد والرات و درصد PHA با توجه به متغیرها و نوع آن ها

Table 5. Production Values of Hydroxybutyrate-Hydroxyvalerate Copolymers with Respect to Variables and Their Types

Process Type	Fatty Acid	Experiment No.	PHA (%)	CDW (g/L)	HV (%)	HV (g/L)	HB (g/L)
B	AA	1	76	10.4	17	0.5166	2.6040
F-B	AA	2	84	10.5	19	0.7940	3.4860
B	AA	3	76	8.4	17	0.5145	2.5838
F-B	AA	4	84	11.5	19	0.7922	3.4790
B	AA	5	75	16.4	17	0.5150	2.5910
F-B	AA	6	84	7.5	19	0.7891	3.4683
B	AP	7	69	3.30	9	0.2234	2.0532
F-B	AP	8	78	3.92	11	0.3234	2.7180
B	AP	9	67	3.36	9	0.2135	2.0428
F-B	AP	10	79	3.82	11	0.3198	2.7115
B	AP	11	69	3.30	9	0.2121	2.0487
F-B	AP	12	77	3.92	11	0.3201	2.7142
B	AA-AP	13	77	3.50	15	0.3995	2.3040
F-B	AA-AP	14	81	4.50	14	0.4961	3.1584
B	AA-AP	15	76	3.53	15	0.3924	2.2995
F-B	AA-AP	16	81	4.48	13	0.4890	3.1516
B	AA-AP	17	77	3.47	14	0.3859	2.3006
F-B	AA-AP	18	80	4.53	13	0.4846	3.1498

در این آزمون نیز شرط $P \geq 0.05$ مبنی بر برابری واریانس ها بین گروه های مختلف آزمایش است. پس از اطمینان از برقراری این فرضیات، تحلیل واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) برای ارزیابی اثر فاکتورها و تعیین میزان تأثیرگذاری آن ها بر متغیر پاسخ انجام شد. مقادیر P-Value حاصل از این تحلیل در جدول ۶ ارائه شده اند. با مقایسه این مقادیر با سطح اطمینان ۹۵٪ (سطح خطای ۰.۰۵٪)، اهمیت آماری فاکتورهای مورد مطالعه و انواع مختلف آن ها تعیین گردید.

پیش از انجام تحلیل های اصلی، صحت فرضیات نرمال بودن توزیع داده ها و همگنی واریانس ها با استفاده از نرم افزار Minitab مورد بررسی قرار گرفت. برای تأیید نرمال بودن توزیع، از آزمون اندرسون-دارلینگ (Anderson-Darling) استفاده شد [۱]. بر اساس این آزمون، مقادیر P-Value بزرگ تر یا مساوی ۰.۰۵ ($P \geq 0.05$) نشان دهنده پذیرش فرضیه صفر و نرمال بودن توزیع داده ها است. همچنین، برای بررسی همگنی واریانس ها از آزمون لون (Levene's Test) بهره گرفته شد [۲].

جدول ۶: مقادیر P_v محاسبه شده برای داده‌های حاصل از نتایج آزمایشات هیدروکسی بوتیرات-والرات، با استفاده از طراحی کامل فاکتوریل

Table 6. Calculated P_v Values for Hydroxybutyrate-Hydroxyvalerate Experimental Data Using Full Factorial Design

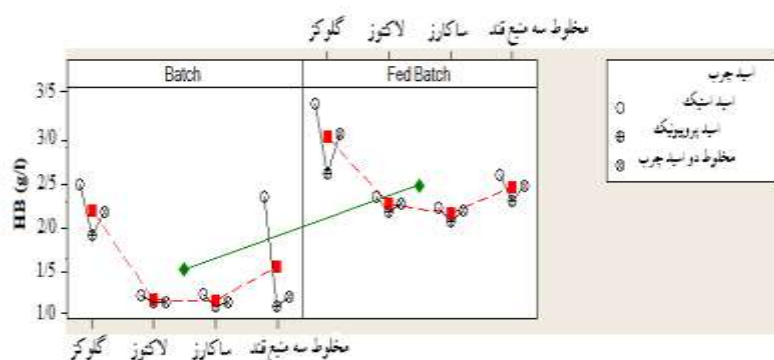
Variable	P _v Hydroxyvalerate	P _v Hydroxybutyrate
Carbon source	0.000	0.001
Fatty acid	0.000	0.018
Process type	0.000	0.000

تولید HB در این پژوهش بود. در مقابل، ساکاروز ضعیف‌ترین عملکرد را در میان منابع قندی نشان داد. کمترین میزان تولید (۲/۱۹۹ گرم بر لیتر HB) مربوط به زمانی بود که از ساکاروز و اسید پروپیونیک در فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده استفاده شد. همچنین، استفاده از گلوکز همراه با مخلوط دو اسید چرب (استیک و پروپیونیک) در همان فرآیند، غلظتی معادل ۳/۱۵۸ گرم بر لیتر را به دست داد که نتیجه‌ای قابل قبول اما کمتر از حالت بهینه بود. نکته حائز اهمیت دیگر، تأثیر ترکیب گلوکز و اسید پروپیونیک بود. این ترکیب در فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده، باعث تولید ۲/۷۱۸ گرم بر لیتر HB شد که نشان‌دهنده برتری آن نسبت به سایر ترکیبات (حتی ترکیب گلوکز و اسید استیک در برخی شرایط دیگر) است. همچنین، مخلوط سه منبع قندی (گلوکز، ساکاروز و لاکتوز) همراه با اسید استیک در فرآیند Fed-Batch، تولیدی معادل ۲/۷۰۶ گرم بر لیتر را رقم زد. با این حال، این مخلوط قندی در کنار سایر اسیدهای چرب عملکرد چشمگیری نداشت. منبع قندی لاکتوز نیز عملکردی مشابه با ساکاروز داشت، هرچند در حضور اسید استیک نتایج بهتری ارائه داد. به‌طور کلی، استفاده از مخلوط دو اسید چرب نسبت به اسید پروپیونیک خالص، منجر به افزایش درصد تولید پلیمر شد. علاوه بر نوع منبع کربن، نوع فرآیند نیز نقش مهمی ایفا کرد. ساکاروز و لاکتوز در هر دو حالت ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی شده، تولیدات مشابهی داشتند. اما مهم‌ترین یافته این بود که به‌کارگیری فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده نسبت به فرآیند ناپیوسته کلاسیک، باعث افزایش حدود ۲۰ درصدی در تولید پلیمر HB گردید.

بررسی بررسی نتایج ارائه شده در جدول ۵ نشان می‌دهد که برای کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات (HB)، متغیرهای «منبع کربن» و «نوع فرآیند» دارای مقدار P-Value کمتر از ۰/۰۱ ($P < 0.01$) هستند که حاکی از تأثیرگذاری بسیار معنی‌دار آن‌ها بر تولید این پلیمر است. همچنین متغیر «نوع اسید چرب» نیز دارای تأثیر معنی‌داری است. در مورد کوپلیمر هیدروکسی والرات (HV)، هر سه متغیر «منبع کربن»، «نوع اسید چرب» و «نوع فرآیند» دارای مقادیر P-Value کمتر از ۰/۰۱ می‌باشند. این موضوع نشان می‌دهد که تمامی فاکتورهای مورد مطالعه به‌شدت بر تولید HV تأثیرگذار بوده و نتایج حاصل از تغییرات آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار است. با توجه به اینکه غلظت تولیدی هیدروکسی والرات در مقایسه با هیدروکسی بوتیرات کمتر است، حساسیت این پلیمر به تغییرات پارامترهای فرآیندی بیشتر می‌باشد. به همین دلیل، حتی تغییرات جزئی در متغیرها می‌تواند منجر به تغییرات چشمگیر در بازده تولید HV شود. از این رو، افزایش حتی مقدار ناچیزی در تولید کوپلیمر HV، می‌تواند تأثیر مثبت و قابل توجهی بر بهبود کلی بازده تولید بیوپلیمرها داشته باشد.

۲-۳- تأثیر فاکتورهای بررسی شده بر تولید

کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات: بررسی نمودار چندمتغیره (شکل ۱) نشان می‌دهد که حداکثر غلظت تولیدی هیدروکسی بوتیرات به مقدار ۳/۴۸۶ گرم بر لیتر (g/L) در شرایطی حاصل شد که از ترکیب گلوکز و اسید استیک به‌عنوان منبع کربن و از فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده (Fed-Batch) استفاده گردید. این شرایط بهینه‌ترین حالت برای بیشینه‌سازی



شکل ۱: تأثیر کلی فاکتورهای منابع کربن، اسید چرب و نوع فرآیند بر تولید هیدروکسی بوتیرات

Figure 1. Overall Effect of Carbon Source, Fatty Acid, and Process Type on Hydroxybutyrate Production

۳-۳- تأثیر فاکتورهای بررسی شده بر تولید

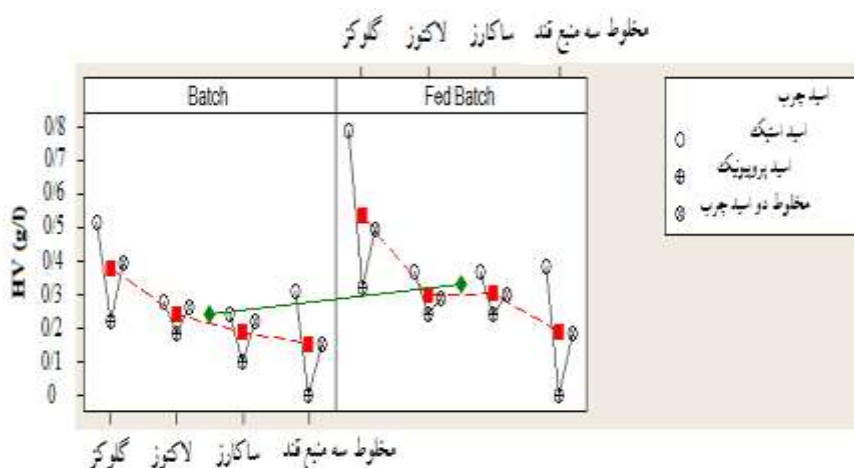
کوپلیمر هیدروکسی والرات

بررسی نمودار چندمتغیره (شکل ۲) نشان می‌دهد که حداکثر غلظت تولیدی هیدروکسی والرات به مقدار ۰/۷۹۴ گرم بر لیتر (g/L) و بالاترین درصد محتوای والرات (۱۹٪) در شرایطی حاصل شد که از ترکیب گلوکز و اسید استیک به عنوان منابع کربن و از فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده (Fed-Batch) استفاده گردید. در شرایط دیگر، حضور گلوکز همراه با مخلوط دو اسید چرب در فرآیند Fed-Batch، منجر به تولید ۰/۴۹۶ گرم بر لیتر HV شد که افزایش قابل توجهی نسبت به سایر ترکیبات محسوب می‌شود. همچنین، استفاده از گلوکز و اسید استیک در فرآیند ناپیوسته کلاسیک، غلظتی معادل ۰/۵۱۶ گرم بر لیتر را رقم زد. ترکیب گلوکز و مخلوط اسیدهای چرب در فرآیند ناپیوسته نیز با تولید ۰/۳۹۹ گرم بر لیتر، نشان‌دهنده اهمیت گلوکز به عنوان یک منبع کربن باکیفیت در کنار اسیدهای چرب است. برخی ترکیبات خاص از جمله ساکاروز با اسید پروپیونیک (ناپیوسته)، لاکتوز با اسید استیک (ناپیوسته)، گلوکز با اسید استیک (ناپیوسته) و لاکتوز با مخلوط اسیدهای چرب (ناپیوسته)، همگی منجر به تولید ۱۷ درصدی والرات شدند. شایان ذکر است که درصد والرات بر اساس نسبت غلظت‌های بوتیرات و والرات محاسبه شده و این نسبت‌ها در دو فرآیند مورد مطالعه متفاوت است. با توجه به مطالعات پیشین، غلظت والرات معمولاً کمتر از بوتیرات است؛ بنابراین، حتی تغییرات جزئی در درصد والرات اهمیت آماری و کاربردی دارد. در این پژوهش، افزایش ۲ درصدی درصد والرات در فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده نسبت به فرآیند ناپیوسته، به عنوان یک نتیجه مطلوب و حائز اهمیت ارزیابی می‌شود. به طور کلی، داده‌های به دست آمده تأیید می‌کنند که فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده منجر به افزایش کل تولید پلیمر شده است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که افزودن اسیدهای چرب در زمان‌های مشخص و مرحله به مرحله، نه تنها بازده تولید را افزایش می‌دهد، بلکه امکان بهینه‌سازی مصرف مواد اولیه و افزایش درصد والرات را نیز فراهم می‌کند. تحلیل نهایی داده‌ها، ترکیب گلوکز و اسید استیک را به عنوان مناسب‌ترین منبع کربنی برای تولید این بیوپلیمر معرفی می‌کند. همچنین، عملکرد قابل توجه اسید استیک در تمامی آزمایش‌ها حاکی از آن است که استفاده از این اسید چرب به صورت خوراک‌دهی شده، می‌تواند بازده تولید را بهبود بخشیده و از نظر اقتصادی از نظر کاهش هزینه‌های مواد اولیه حائز اهمیت باشد. نتایج این پژوهش با مطالعات پیشین بر روی تولید

PHBV توسط رالستونیا اوتروفا در شرایط ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی شده هم‌سو است. به طور مثال، کولکاری و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از سویه هالوموناس کمپیسالیس در محیط‌های حاوی اسیدهای چرب فرار، افزایش معنی‌داری در تولید پلی (۳-هیدروکسی بوتیرات-کو-۳-هیدروکسی والرات) گزارش کردند و نشان دادند که حضور اسید پروپیونیک می‌تواند درصد هیدروکسی والرات را افزایش دهد [۵]. یو و سی (۲۰۰۴) نیز با بررسی مسیرهای متابولیک کربن در رالستونیا اوتروفا بر روی اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر، تأثیر مستقیم نوع اسید چرب بر ساختار و ترکیب PHA را نشان دادند و گزارش کردند که اسید پروپیونیک منبع اصلی برای تولید هیدروکسی والرات است. در مطالعه سودش و همکاران (۲۰۰۰)، ویژگی‌های فیزیکی و حرارتی PHAs و نقش درصد هیدروکسی والرات در تعیین خواص کوپلیمر PHBV به طور گسترده مرور شد و تأکید گردید که حتی تغییرات جزئی در درصد HV می‌تواند خواص مکانیکی پلیمر را به شدت تغییر دهد [۶]. این یافته با نتایج مطالعه حاضر هم‌سو است که نشان داد افزایش ۲ درصدی درصد والرات در فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده نسبت به ناپیوسته، یک نتیجه حائز اهمیت و کاربردی است. همچنین، سان فوهر و همکاران (۲۰۱۸) در مرور استراتژی‌های عملیاتی بیوراکتور برای افزایش بهره‌وری PHA اشاره کردند که فرآیندهای ناپیوسته خوراک‌دهی شده به عنوان استراتژی رایج برای بهینه‌سازی بازده و کنترل کیفیت محصول مورد استفاده قرار می‌گیرند و اغلب منجر به افزایش تولید نسبت به فرآیندهای ناپیوسته کلاسیک می‌شوند [۱۲]. این مشاهده با یافته اخیر که فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی شده حدود ۲۰ درصد افزایش تولید HB و افزایش ۲ درصدی درصد HV را نسبت به فرآیند ناپیوسته کلاسیک ایجاد کرد، همخوانی دارد. علاوه بر مطالعات پیشین، تحقیقات جدیدتر نیز بر اهمیت اسیدهای چرب فرار و استراتژی‌های تخمیر ناپیوسته خوراک‌دهی شده در تولید PHBV تأکید کرده‌اند. به طور مثال، چن و وو (۲۰۱۵) با مهندسی رالستونیا اوتروفا نشان دادند که افزودن پروپیونات در فرآیند تخمیر، امکان کنترل درصد HV۳ در کوپلیمر PHBV را فراهم می‌کند و می‌تواند مقدار HV۳ را تا حدود ۲۶٪ مول افزایش دهد؛ این یافته با نتایج اخیر که نشان داد حضور اسید پروپیونیک و مخلوط اسید استیک و پروپیونیک منجر به افزایش درصد HV می‌شود، هم‌سو است [۱۳]. همچنین، در مطالعه رفیعی و حسینی (۲۰۱۷)، مقایسه فرآیندهای ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی شده برای تولید هیدروکسی بوتیرات نشان داد که فرآیند ناپیوسته خوراک‌دهی

خوراک دهی شده) می تواند نقش کلیدی در کاهش هزینه های تولید و افزایش بازده اقتصادی داشته باشد؛ این دیدگاه با هدف پژوهش ما برای بهبود بازده تولید و بهینه سازی مصرف منابع کربنی با استفاده از افزودن تدریجی اسیدهای چرب هماهنگ است [۱۵].

شده منجر به افزایش غلظت بیومس و درصد پلیمر در مقایسه با فرآیند ناپیوسته کلاسیک می شود؛ این نتیجه با مشاهده اخیر که فرآیند ناپیوسته خوراک دهی شده حدود ۲۰ درصد افزایش تولید HB ایجاد کرد، همخوانی دارد [۱۴]. در مروری جدیدتر، رودریگز پرز و همکاران (۲۰۲۳) استفاده از ضایعات و اسیدهای چرب فرار به عنوان خوراک کم هزینه برای تولید مقرون به صرفه PHA را بررسی کردند و تأکید نمودند که بهینه سازی فرآیند تخمیر (از جمله استفاده از فرآیند ناپیوسته



شکل ۲: تأثیر کلی فاکتورهای منابع کربن، اسید چرب و نوع فرایند بر تولید هیدروکسی والرات
Figure 2. Overall Effect of Carbon Source, Fatty Acid, and Process Type on Hydroxyvalerate Production

موفقیت روش خوراک دهی اسیدهای چرب، پیشنهاد می شود که این استراتژی برای منابع کربن اصلی (مانند گلوکز) نیز به کار گرفته شود. به این صورت که به جای افزودن تمام منبع کربن در ابتدای فرآیند، مقدار مشخصی از آن در زمان های مختلف و به ویژه در ساعات اوج رشد باکتری به سیستم اضافه گردد. این رویکرد می تواند از اثرات مهارکنندگی غلظت های بالای قند جلوگیری کرده و تولید پلیمر را بهبود بخشد. یکی از مزایای استفاده از محیط کشت خالص در این پژوهش، امکان تعمیم نتایج به ضایعات صنعتی است. با توجه به اینکه ضایعات کارخانجات معمولاً حاوی ترکیباتی از گلوکز، ساکارز، لاکتوز یا اسیدهای چرب هستند، می توان با بومی سازی شرایط بهینه به دست آمده و استفاده از روش خوراک دهی تدریجی، به بالاترین سطح تولید این پلیمر دوست دار محیط زیست دست یافت. علاوه بر بهینه سازی فرآیند تخمیر، کاهش هزینه های استخراج محصول از داخل سلول از راهبردهای مهم در کاهش قیمت تمام شده PHB است. انتخاب روش استخراج مناسب با توجه به شرایط اقتصادی و فنی، بخش مهمی از بهینه سازی فرآیند است. همچنین، غلظت منبع کربن پارامتری مؤثر بر

7- نتیجه گیری

بررسی نتایج به دست آمده نشان می دهد که حداکثر غلظت تولیدی هیدروکسی بوتیرات (HB) به مقدار ۳/۴۸۶ گرم بر لیتر (g/L) در شرایطی حاصل شد که از گلوکز به عنوان منبع کربن، اسید استیک به عنوان منبع اسید چرب و فرآیند ناپیوسته خوراک دهی شده (Fed-Batch) استفاده گردید. در فرآیند ناپیوسته کلاسیک نیز، بیشترین تولید (۲/۶۰۴ گرم بر لیتر HB) در ترکیب گلوکز و اسید استیک مشاهده شد. در مورد کوپلیمر هیدروکسی والرات (HV)، بیشترین غلظت تولیدی در فرآیند ناپیوسته به مقدار ۰/۵۱۶ گرم بر لیتر (شامل ۱۷٪ والرات) و در فرآیند ناپیوسته خوراک دهی شده به مقدار ۰/۷۹۴ گرم بر لیتر (شامل ۱۹٪ والرات) و با استفاده از همان منابع کربنی (گلوکز و اسید استیک) ثبت گردید. این یافته ها حاکی از آن است که افزودن تدریجی اسیدهای چرب، نقش کلیدی در افزایش بازده تولید HB و HV ایفا می کند. این روش نه تنها منجر به افزایش تولید پلیمر می شود، بلکه با مدیریت بهینه مصرف مواد اولیه، می تواند تأثیر قابل توجهی در بهبود شرایط اقتصادی تولید این بیوپلیمرها داشته باشد. با توجه به

[7] Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci.* 2000;25:1503–1555. doi: 10.1016/S0079-6703(00)00027-9

[8] Amache R, Sukan A, Safari M, Roy I, Keshavarz T. Advances in PHAs production. *Chem Eng Trans.* 2013;32:931–936. doi: 10.3303/CET1332156

[9] Ahmadi M, Mansourian V. Investigation of processed recycled date-based culture medium for polyhydroxyalkanoate production using *Alcaligenes eutrophus*. In: 2nd National Conference on Sustainable Agriculture and Natural Resources; 2014. Mehr Arvand Higher Education Institute: Environmental Supporters Association, Iran. [In Persian].

[10] Poladyan A, Blbulyan B, Sahakyan M, Lenz O, Trchounian A. Growth of the facultative chemolithoautotroph *Ralstonia eutropha* on organic waste materials: growth characteristics, redox regulation and hydrogenase activity. *Microb Cell Fact.* 2019;18:1–13. doi: 10.1186/s12934-019-1111-6

[11] Ataei A. Determination of optimum conditions for polyhydroxyalkanoates production using inexpensive substrates. PhD thesis. Tehran: Tarbiat Modares University; 2008. [In Persian].

[12] Sanführ A, Beccari A, Ward OP. Bioreactor operating strategies for improved polyhydroxyalkanoate (PHA) productivity. *Polymers.* 2018;10(10):1197. DOI: 10.3390/polym10101197

[13] Chen GQ, Wu Q. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) with controlled 3HV fractions. *Metab Eng.* 2015;18:45–53. DOI: 10.1016/j.meteng.2015.02.003

[14] Rafiei M, Hosseini S. Comparison of hydroxybutyrate production in batch and fed-batch processes. In: Proceedings of the National Conference on Chemical Engineering and Biotechnology; 2017. Tehran: Iranian Society of Chemical Engineering. [In Persian]

[15] Rodriguez-Perez S, Martinez-Blanco J, Alonso-Farinas B. From waste to self-healing concrete: proving the concept of a new application for polyhydroxyalkanoate. *J Cleaner Prod.* 2023;380:134987. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.134987

تولید است. اگرچه در این پژوهش از غلظت بهینه ۳۰ گرم بر لیتر (g/L) بر اساس مطالعات پیشین استفاده شد، اما بررسی تغییرات غلظت و یافتن نقطه‌ای که از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه باشد، می‌تواند سهم بسزایی در کاهش نهایی هزینه‌های تولید داشته باشد.

۸- تعارض منافع

نویسندگان متعهد می‌گردند که نتایج حاصل از پژوهش مذکور را در مجله‌ی دیگری ارسال نکرده و در این راستا منافع تجاری وجود نداشته و در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده است.

مراجع

[1] Najafi-Shalmai M, Mojtahedzadeh A, Sarhadi S, Amir-Aslani F. Types of biodegradable polymers and the necessity of their application. In: 5th National Conference and Specialized Exhibition on Environmental Engineering; 2011. Iran University of Science and Technology: SELCO. [In Persian]

[2] Mokhtarani N. Determination of effective factors on the production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge. PhD thesis. Tehran: Tarbiat Modares University; 2005.

[3] Pelissero A. Update on biodegradable plastics materials *Imballaggio.* 1987;38:38–54..

[4] Pfeffer JT. Solid waste management engineering. Englewood Cliffs (NJ): Prentice Hall; 1992.

[5] Kulkarni SO, Kanekar PP, Nilegaonkar SS, Sarnaik SS, Job JP. Production and characterization of a biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresour Technol.* 2010;101:9765–9771. doi: 10.1016/j.biortech.2010.07.089

[6] Yu J, Si Y. Metabolic carbon fluxes and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates in *Ralstonia eutropha* on short chain fatty acids. *Biotechnol Prog.* 2004;20:1015–1024. doi: 10.1002/bit.20034

MICROBIAL BIOTECHNOLOGY AND
BIOPROCESS ENGINEERING02157416262
02157416806 <https://mbbe.irostd.ir> <https://mbbe.irostd.ir>

Production of Biodegradable Hydroxybutyrate-Valerate Polymer in Pure Culture: A Comparative Evaluation of Batch and Fed-Batch Processes

Atefeh Farjadmanesh ^{*1}, Seyed Ahmad Ataei ²¹ M.Sc., Chemical Engineering – Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran² Assistant Professor, Chemical Engineering – Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran**Article Info****Document Type:**
Review Paper**Paper History:**

Received: 2026-05-15

Revised: 2026-06-13

Accepted: 2026-07-12

Keywords:**Polyhydroxyalkanoates,
Biodegradability,
Alcaligenes eutrophus,
Fed-batch process,
Fatty acids.****ABSTRACT**

Polyhydroxyalkanoates (PHAs), as biodegradable polymers, are considered promising alternatives for reducing the environmental impacts of waste. These compounds are accumulated intracellularly by microorganisms under stress conditions caused by nutrient limitation in the presence of excess carbon sources. Among them, hydroxybutyrate copolymer is the most well-known member of this family. Their production is generally based on the consumption of soluble organic substrates such as volatile fatty acids, which lead not only to hydroxybutyrate formation but also to hydroxyvalerate production. This study aimed to evaluate the effect of gradual fatty acid addition on improving production yield and reducing carbon source consumption. The strain *Alcaligenes eutrophus* was obtained from a microbial culture collection, and carbon sources included glucose and fatty acids (acetic acid, propionic acid, and their equal-weight mixture). To assess the impact of carbon sources, batch and fed-batch processes were compared. Experimental design was conducted using Minitab software with a two-way ANOVA approach. Cultures were grown in shake flasks containing 50 mL of medium, with 5 mL of inoculum added. In the fed-batch process, fatty acids were added stepwise at 24, 45, and 50 hours to prevent substrate inhibition. Incubation conditions were 32°C, 120 rpm, and 72 hours. Results showed maximum hydroxybutyrate (3.486 g/L) and hydroxyvalerate (0.794 g/L) production under acetic acid and fed-batch conditions. This approach increased hydroxyvalerate production by approximately 17% and improved resource efficiency.

<https://doi.org/10.22104/mbbe.2026.8261.1017>[URL: https://mbbe.irostd.ir/article_1710.html](https://mbbe.irostd.ir/article_1710.html)**How to cite this paper:**

Farjadmanesh, A., Ataei, S. A. (2026). Production of Biodegradable Hydroxybutyrate-Valerate Polymer in Pure Culture: A Comparative Evaluation of Batch and Fed-Batch Processes. *Microbial Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 1(1), 16-26. DOI: 10.22104/mbbe.2026.8261.1017

*Corresponding author E-mail: ath.farjadmanesh@gmail.com