



دانشگاه گورگان

نشریه پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل

جلد بیست و ششم، شماره سوم، ۱۳۹۸

۲۹-۴۲

<http://jwfst.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jwfst.2018.14741.1735

تولید و ارزیابی نانوسلولز باکتریایی با استفاده از باکتری استوباکتر زایلینیوم

سه‌ها زیدانلو^۱، *محمد‌هادی آریائی‌منفرد^۲، محمدرضا دهقانی فیروزآبادی^۳ و الیاس افرا^۳

^۱دانشجوی کارشناسی‌ارشد صنایع خمیر و کاغذ، گروه علوم و مهندسی کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

^۲استادیار گروه علوم و مهندسی کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران،

^۳دانشیار گروه علوم و مهندسی کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۷

چکیده

سابقه و هدف: سلولز یک پلیمر طبیعی با استحکام بالا به‌ازای واحد وزن خود بوده و ماده ساختمانی اصلی الیاف گیاهی است. بسیاری از ویژگی‌های سلولز بستگی به طول زنجیر یا درجه پلیمریزاسیون، نسبت بخش‌های آمورف به کریستالی و همچنین ساختار کریستال آن دارد. در حالی‌که در بسیاری از روش‌های استخراج نانوسلولز از مواد شیمیایی یا تیمارهای مکانیکی سخت و شدید استفاده می‌گردد تنها روش‌های بسیار محدودی سلولز با ویژگی‌های بکر اولیه ولی با ابعاد نانومتری حاصل می‌آورند که نانوسلولز باکتریایی مهم‌ترین آن‌ها است. نانوسلولز باکتریایی به‌علت ساختارهای میکروسکوپی مناسب، قابلیت‌های بسیاری در مصارف خاص (مانند مصارف پزشکی و بهداشتی) دارد. این ماده در برخی از خواص مانند خلوص زیاد، بلورینگی و درجه سپارش با سلولز گیاهی تفاوت دارد. در مطالعه حاضر، تولید نانوسلولز باکتریایی با استفاده از باکتری استوباکتر زایلینیوم و ارزیابی مشخصات آن انجام شده است.

مواد و روش‌ها: برای تهیه نانوسلولز باکتریایی در این پژوهش، باکتری در محیط کشت مایع و در شرایط بستر استاتیک و دینامیک کشت داده شد و سلولز به‌دست آمده، شستشو و خالص‌سازی شد. ریزساختارها با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM)، ساختار بلورینگی با آنالیز پراش اشعه ایکس (XRD)، درصد وزنی، اندازه و نحوه پراکنش نانوسلولز با آنالیز عنصری اشعه ایکس پراکنش‌گرای انرژی (EDX)، تعیین گرانش و وزن مولکولی با روش انحلال سلولز در محلول کوپر دی اتیلن آمین (CED) و بازده نانوسلولز با روش توزین نمونه مرطوب و خشک آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بازده نانوسلولز در محیط کشت استاتیک نسبت به محیط کشت دینامیک آن بیش‌تر است. مقایسه تصاویر FE-SEM نشان داد که نحوه کشت تأثیر محسوسی بر ساختار ریخت‌شناسی الیاف نانوسلولزهای تولیدی دارد. به‌طوری‌که مقایسه تصاویر FE-SEM دو روش کشت نشان داد ریخت‌شناسی نانوسلولز باکتریایی در کشت استاتیک، متخلخل و مشبک و در نانوسلولز باکتریایی در کشت دینامیک دارای ساختار به هم چسبیده است. اندازه نانوذرات عموماً برای نانوسلولزهای تولیدی در محیط کشت دینامیک و استاتیک زیر ۶۰ نانومتر می‌باشد. نتایج آزمون XRD نشان داد میزان بلورینگی نانوسلولز باکتریایی در محیط کشت استاتیک حدود ۷۲/۴۹ درصد محاسبه شد، در حالی‌که این مقادیر برای محیط کشت دینامیک، ۱۴/۲۹ درصد

* مسئول مکاتبه: hadiaryaie@gmail.com

اندازه‌گیری گردید. همچنین میزان گرانشی سلولز باکتریایی تولید شده در محیط کشت استاتیک ۱۱۰/۷ سانتی‌پوآز و میزان گرانشی سلولز باکتریایی تولید شده در محیط کشت دینامیک ۹۷ سانتی‌پوآز محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی با در نظر گرفتن خصوصیات نانوسلولز باکتریایی تولید شده و مقایسه آن با سایر پژوهش‌های انجام‌شده، می‌توان نتیجه گرفت نانوسلولز باکتریایی مناسب تولید شده است که این مسأله به لحاظ نیاز تحقیقاتی موجود در این زمینه در کشور و کاربردهای پزشکی و مهندسی آن دارای اهمیت است.

واژه‌های کلیدی: باکتری استوباکتر زایلینیوم، کشت استاتیک، کشت دینامیک، نانوسلولز باکتریایی

مقدمه

امروزه تأمین ماده اولیه سلولزی مناسب مهم‌ترین چالش پیش روی صنایع خمیر و کاغذ کشور ما و دنیا می‌باشد (۸). از آن‌جا که بخش عمده این ماده اولیه از چوب و یا به‌عبارت بهتر از جنگل تأمین می‌شود، این امر موجب فشار بسیار زیاد بر جنگل‌های موجود و به‌ویژه جنگل‌های شمال کشور می‌گردد (۱۴). سلولز، فراوان‌ترین بسپار طبیعی است که برای هزاران سال به‌عنوان ماده مهندسی استفاده شده است (۱۵). این بسپار تجدیدپذیر، زیست‌تخریب‌پذیر و همچنین غیرسمی است (۴). منبع اصلی سلولز در بیوسفر، گیاهان و میکروب‌های مرتبط که می‌توانند سلولز تولید نمایند، می‌باشد. دومین سلولز قابل‌دسترس، سلولز باکتریایی نامیده می‌شود که توسط باکتری‌های زنده ساخته می‌شود (۲). نانو سلولز باکتریایی همچنین سلولز باکتریایی، سلولز میکروبی یا بیوسلولز نیز نامیده می‌شود (۱۰). سلولز باکتریایی نوعی سلولز سنتز شده توسط برخی باکتری‌ها مثل *Acetobacter*، *Acanthamoeba* و *Achromobacter spp.* می‌باشد (۷). سلولز باکتریایی به‌عنوان یک ساختار اساسی فیبریل است که متشکل از زنجیره‌های β -1 \rightarrow 4 گلوکان با فرمول مولکولی $(C_6H_{10}O_5)_n$ می‌باشد. زنجیره گلوکان توسط پیوند هیدروژنی درون و برون به یکدیگر متصل شده‌اند. میکروفیبریل‌های سلولز باکتریایی برای اولین بار توسط موهلتالر (۱۹۴۹) شرح

داده شد و حدود ۱۰۰ برابر کوچک‌تر از سلولز گیاهی است (۵). نتایج پژوهش‌های دانشمندان نشان داده که باکتری *Gluconacetobacter xylinus* قابلیت تولید سلولز را از منابع مختلف کربن مانند گلوکز، فروکتوز و ساکارز دارد. همچنین محیط کشت‌های مختلفی بدین‌منظور فرموله شده و به‌منظور بهینه‌سازی تولید سلولز باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت. برای تولید سلولز باکتریایی به‌صورت کارآمد، منبع گلوکز باید از منابع کربن سنتز شده و سپس به شکل سلولز پلیمریزه شود (۲). این ماده مشابه سلولز حاصل از گیاهان است، ولی در بعضی خواص مانند خلوص زیاد، بلورینگی، درجه بسپارش^۱ و مقاومت کششی با سلولزهای گیاهی تفاوت دارد (۲۲). به‌طور عمده تخمیر تولید سلولز باکتریایی تحت دو شرایط استاتیک و محرک انجام می‌شود. اشکال مختلفی از سلولز تحت این شرایط قابل تولید است (۵). فرآیند شکل‌گیری سلولز تحت شرایط استاتیک به‌وسیله تأمین هوا از سطح محیط کشت انجام می‌شود و بازده آن وابسته به غلظت منبع کربن است (۲۲). از جمله مهم‌ترین کاربردهای سلولز باکتریایی می‌توان در پزشکی به‌عنوان پوشاننده زخم و بافت‌های مصنوعی (۱۸)، در لوازم آرایشی و بهداشتی به‌عنوان ماسک صورت (به‌صورت پودر و ورقه‌ای)، اسکراب صورت (لایه‌بردار)، لنزهای تماسی و مرطوب‌کننده‌ها (۲۳)،

نشان داد که دمای تخمیر یک عامل مهم در تولید سلولز باکتریایی بوده و محیط کشت آب نارگیل می‌تواند به‌عنوان یک منبع غنی از کربن برای تولید سلولز مورد استفاده قرار بگیرد (۶).

با توجه به اهمیت روزافزون تولید و مصرف سلولز باکتریایی این پژوهش با هدف بررسی راندمان و ویژگی‌های کیفی سلولز باکتریایی در دو بستر ثابت و متحرک انجام شد. بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ساختاری سلولز باکتریایی تولیدشده در هر دو بستر تولید توسط ابزارهای دقیق آنالیز شیمیایی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری و محیط کشت: باکتری مورد استفاده در این مطالعه از نوع استوباکتر زایلینوم (*Gluconacetobacter xylinus*) از مرکز تحقیقاتی کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران^۲ (PTCC) تهیه شد. باکتری ذکر شده به‌صورت سرما-خشک، درون یک آمپول شیشه‌ای دوجداره قرار داشت. برای تأمین هدف احیا و تکثیر نمودن باکتری موردنظر، باید از محیط کشت^۳ GYC استفاده نمود. ترکیب این محیط کشت شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۱ گرم عصاره مخمر، ۲ گرم کربنات کلسیم و ۱/۵ گرم آگار می‌باشد. تنظیم pH برای این محیط کشت با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ نرمال برابر ۶ تنظیم شد. برای تهیه محیط کشت GYC ابتدا مواد خشک ذکرشده با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن گردید. سپس مواد به ارلنی با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر منتقل و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. درب ظرف با پنبه و فویل آلومینیوم مسدود شد. سپس ظرف مقداری تکان داده شد تا مخلوطی یکنواخت ایجاد شود. ارلن به‌منظور استریل

در صنعت کاغذسازی به‌عنوان کاغذهای ویژه، ترمیم کاغذهای بایگانی؛ ساخت اسکناس با دوام بیشتر؛ دستمال سفره و پوشک‌ها (۱۸) اشاره نمود. در ایران و خارج از کشور پژوهش‌های متعددی در ارتباط با تولید سلولز باکتریایی منتشر شده است. در ادامه به مهم‌ترین سوابق تحقیقاتی تولید و بررسی ویژگی‌های سلولز باکتریایی پرداخته می‌شود که می‌توان آن‌ها را مرتبط با موضوع مطالعه حاضر دانست.

موسوی‌نسب و یوسفی (۲۰۱۰) از شیر خرمای نامرغوب به‌عنوان یک منبع مغذی و در دسترس در ایران، برای تولید سلولز باکتریایی توسط گلوکن استوباکتر زایلینوس استفاده نمودند و به این نتیجه رسیدند که بیش‌ترین میزان سلولز باکتریایی پس از ۳۳۶ ساعت از شروع تخمیر و به‌ترتیب به‌میزان ۴/۳۵ و ۱/۶۹ گرم به‌ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تخمیر شامل شیر خرما و ساکارز تولید شد. میزان کریستاله بودن تعیین‌شده توسط پراش اشعه X ثابت کرد که این میزان برای سلولز استاندارد (۸۳/۶۱ درصد) بیش‌تر از سلولز باکتریایی (۶۰/۷۳ درصد) بود (۱۶).

کورتوگلو و تورکر ساکان (۲۰۱۷) تولید سلولز باکتری را توسط باکتری کوماتاگیتایا باکتر هانسینی^۱ با استفاده از گلوکز بر پایه جلبک مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنان نشان داد که هیدرولیز اسیدی نشاسته جلبک می‌تواند جایگزینی برای گلوکز در محیط تخمیر کوماتاگیتایا باکتر هانسینی برای تولید سلولز باشد. بازده تولید سلولز برای محیط کشت گلوکز برپایه جلبک و گلوکز (شاهد) و بر اساس وزن خشک به‌ترتیب ۱/۱۰۴±۰/۰۰۲ گرم در لیتر و ۱/۲۰۲±۰/۰۰۵ گرم در لیتر است (۱۳).

اسا و همکاران (۲۰۱۷) اثر نوع محیط کشت را در تولید سلولز باکتریایی توسط استوباکتر زایلینوم در محیط کشت آب نارگیل بررسی نمودند. نتایج آنان

2- Persian type culture collection

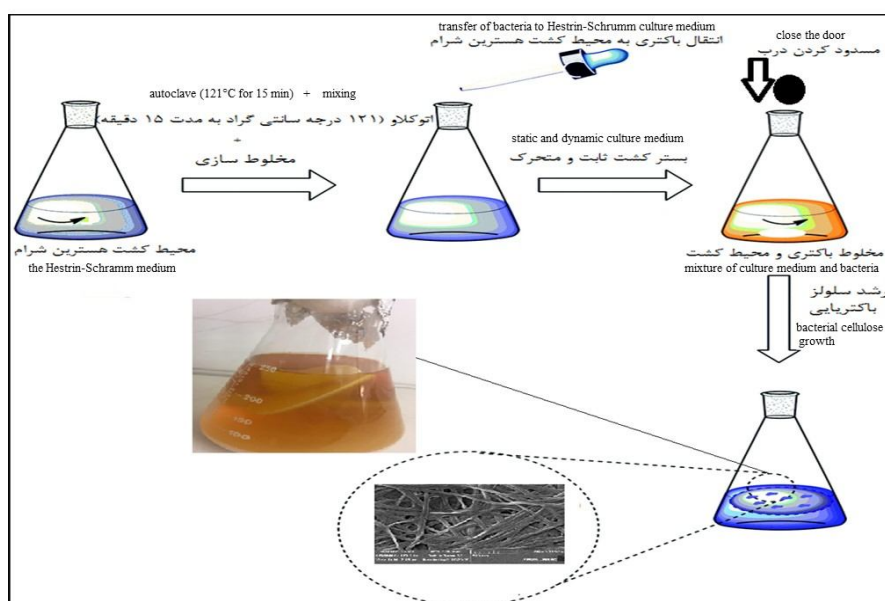
3- Glucose, yeast extract, calcium carbonate medium

1- *Komagataeibacter hansenii*

باکتری نیز از یخچال به زیر هود انتقال یافت. آنس روی شعله چراغ استریل شده، سپس هر بار مقداری باکتری برداشته و به تک‌تک ظروف منتقل شد. مجدداً درب ظروف به‌وسیله پنبه و فویل آلومینیومی مسدود شد. میکروارگانیسم به مدت ۱۴-۹ روز در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد تا باکتری‌ها در طول این مدت سلولز را به‌صورت لایه‌های در مرز هوا و مایع تشکیل دهند. پس از گذشت ۷ روز لایه سلولز تشکیل شده در مرز هوا و مایع با مقداری از محیط کشت خارج شده همراه آن‌ها جمع‌آوری شد و درون فالكون‌هایی ریخته شد (۲۰). با توجه به این‌که سلولز تولیدشده حاوی رنگدانه‌های محیط کشت و نیز باکتری می‌باشد؛ برای از بین بردن رنگ، کشتن باکتری‌ها و همچنین به‌منظور اطمینان از خروج ناخالصی‌ها تا حصول رنگ سفید سلولز، عملیات شستشوی سلولز تولیدی به‌صورت مکرر با آب مقطر ادامه یافت (۱۶). مراحل تولید سلولز باکتریایی در شکل ۱ ارائه شده است.

کردن با حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه جهت استریل شدن اتوکلاو شد. بعد از اطمینان از بسته شدن محیط‌ها، آنس (تلقیح‌کننده) با زاویه ۴۵ درجه بر روی شعله قرار گرفته استریل شد و توسط آنس مقداری باکتری از ظرف پتری حاوی کلونی‌های باکتری برداشته شد و به شکل و ترهایی روی محیط کشت جامد هر یک از پتری‌ها کشت داده شد. از محیط کشت هسترین-شرام برای تولید سلولز استفاده شد. ترکیب این محیط کشت شامل ۵ گرم پپتون، ۵ گرم عصاره مخمر، ۱/۱۵ گرم اسید سیتریک، ۲/۷ گرم دی‌سدیم فسفات و ۲۰ گرم گلوکز است. تنظیم pH برای این محیط کشت باید با استفاده از هیدروکسیدسدیم ۱ نرمال برابر ۶ تنظیم شود. محیط کشت به‌منظور استریل کردن با حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه جهت استریل شدن اتوکلاو شد.

تولید سلولز: در مطالعه حاضر و با توجه به نوین بودن موضوع هر دو روش شرایط استاتیک و دینامیک مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. در این مرحله ظروف به زیر هود منتقل شده و پلیت‌های حاوی



شکل ۱- شماتیک مراحل تولید نانوسلولز باکتریایی.

Figure 1. Schematic illustration of bacterial nano-cellulose (BNC).

که در آن، θ زاویه برخورد اشعه، CS اندازه بلور، λ طول اشعه X و H مقدار رادیان خطی می باشد. تعیین گرانروی و وزن مولکولی: برای اندازه گیری خصوصیت گرانروی از محلول کوپر دی اتیلن آمین (CED)^۴ به عنوان حلال و ویسکومتر مطابق با استاندارد شماره ۸۹ om-۲۳۰- آئین نامه تاپی استفاده شد.

نتایج و بحث

بازده تولید سلولز در محیط کشت استاتیک و دینامیک: با توجه به جدول ۱ نتایج بیانگر آن است که میزان بازدهی محیط کشت رابطه مستقیم با میزان باکتری مورد استفاده و مدت زمان انتظار دارد. در مقایسه دیگر می توان دریافت ابعاد نانوسلولز تولید شده در محیط کشت استاتیک با افزایش حجم ارلن به صورت قطری افزایش و از لحاظ ضخامت کاهش پیدا می کند، اما در محیط کشت دینامیک این اندازه تغییرات چشم گیری ندارد و میزان آن نسبتاً ثابت است. در این مقایسه حجم ارلن به ۵۰۰ افزایش یافت و غلظت مواد ثابت باقی ماند. نکته قابل توجه در آزمایش های انجام گرفته در این مطالعه که به صورت آزمون و خطا به آن پی برده شد و در سایر پژوهش های انجام شده اشاره ای به این قضیه نشده است، این بود که مقدار سلولز تولید شده ارتباط مستقیمی با اندازه سطح محیط کشت در تماس با هوا داشت. هرچه سطح تماس کوچک تر بود (مانند سطح تماس دایره ای شکل اسلنت) سلولز تولید شده مقدار کمتری داشت و با افزایش حجم محیط کشت، تولید سلولز بیشتر بود. در این حالت به دلیل قرارگیری محیط کشت در تماس با هوا، سلولز بیشتری هم تولید گردید (شکل ۲).

میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی^۱: به منظور بررسی از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی استفاده شد. برای تهیه تصاویر میکروسکوپی از دستگاه FE-SEM مدل Mira 3-XMU در مرکز خدمات آزمایشگاهی پژوهشگاه متالوژی رازی (تهران، ایران) استفاده شد. نمونه ها قبل از عکس برداری، خشک و با طلا پوشش داده شدند. به منظور ارزیابی درصد وزنی، اندازه و نحوه پراکنش نانوسلولز، آنالیز عنصری اشعه ایکس پراکنش گرای انرژی از نمونه ها تهیه گردید. آنالیز EDX^۲ آزمون است که می تواند درصد عناصر مختلف موجود در یک ساختار را در لایه سطحی نشان دهد. این آزمون توسط دستگاه FE-SEM و از لایه سطحی مواد مختلف تهیه می گردد.

آزمون پراش اشعه ایکس^۳: به منظور تعیین درصد بلورینگی و نیز اندازه بلور سلولز باکتریایی، از آزمون پراش اشعه ایکس استفاده شده است. در این آزمون از دستگاه XRD مدل Perform, X استفاده شد. آزمون مذکور در مرکز خدمات آزمایشگاهی پژوهشگاه متالوژی رازی (تهران، ایران) به انجام رسید. درصد بلورینگی از رابطه های ۱ و ۲ محاسبه شد.

$$100 \times CrI = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \quad (1)$$

که در آن، CrI درجه کریستالیت، i_{200} ارتفاع پیک در زاویه پراش 2θ درجه و I_{am} ارتفاع پیک در زاویه پراش ۱۸ درجه که مربوط به سلولز غیرکریستالی است (واحد دلخواه).

اندازه بلور از معادله شرر محاسبه می شود:

$$CS = \frac{0.9 \lambda}{H \cos \theta} \quad (2)$$

- 1- Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM)
- 2- Energy-dispersive X-ray spectroscopy
- 3- X-ray diffraction (XRD)

4- Copper ethylene diamine

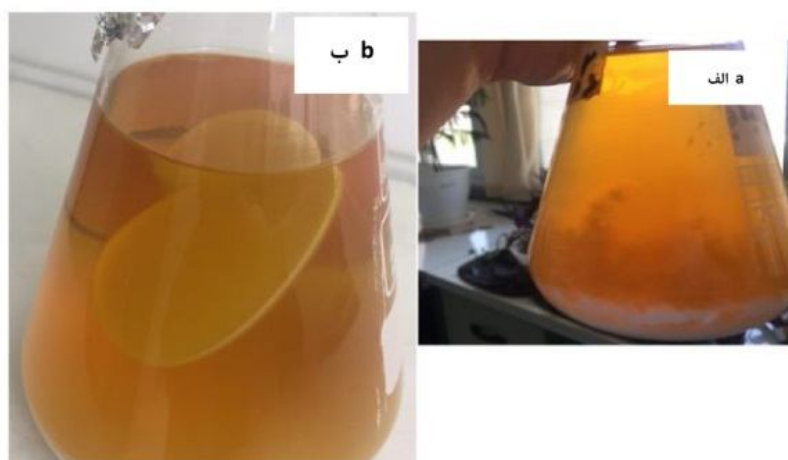
جدول ۱- بازده تولید سلولز در محیط کشت استاتیک و دینامیک.

Table 1. Cellulose production yield in static and dynamic medium.

وزن سلولز خشک (g) Dry cellulose weight (g)	وزن سلولز مرطوب (g) Wet cellulose weight (g)	حجم محیط کشت (ml) Volume of medium, ml	نوع نانوسلولز Nano-cellulose type
0.00346	0.1103	250	محیط کشت استاتیک
0.0506	1	500	Static medium
0.0003	0.006	250	محیط کشت دینامیک
0.0008	0.010	500	Dynamic medium

استفاده از ترکیبات ارزان قیمت تر می‌باشد، مطالعات گسترده‌ای جهت توسعه منابع جایگزین صورت گرفته است (۲). در پژوهشی کاسترو و همکاران (۲۰۱۲) تأثیرات pH و زمان را بر بازده تولید سلولز باکتریایی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و با منبع گلوکز بررسی نمودند. نتایج آنان نشان داد در pH حدود ۳/۵ و زمان ۸ تا ۱۴ روز حداکثر بازده سلولز حاصل شده است (۱). کریستینوویز و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه خود ذکر کرده‌اند که در درجه حرارت زیاد، ترکیبات سلولی مانند اسید نوکلئیک و پروتئین به صورت غیرطبیعی می‌شوند؛ بنابراین، درجه حرارت عامل بسیار مهمی است که تأثیر زیادی بر رشد میکروبی دارد. از این رو بهینه‌سازی درجه حرارت بر روی بازده نهایی سلولز تأثیر خواهند داشت (۱۲).

به‌طورکلی عواملی هم‌چون سرعت هوادهی، سرعت هم‌زدن، درجه حرارت و pH از مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار بر بازده نهایی بسیار زیستی تولیدی است. سرعت هم‌زدن روی مقدار حرکت در محیط تخمیر پلی‌ساکارید، به‌دلیل پیچیدگی رئولوژیکی آن و هم بر سرعت انتقال اکسیژن اثر می‌گذارد (۳) و (۹). مطابق گزارش‌ها، شرایط pH بهینه برای تولید سلولز باکتریایی وابسته به نوع باکتری است. شرایط pH بهینه، خستگی تا کمی اسیدی گزارش شده است (۱). بررسی مطالعات مشابه نیز نشان می‌دهد که به‌طورکلی در مراحل اولیه بسیاری از آزمون‌های بهینه‌سازی قند گلوکز و عصاره مخمر به‌ترتیب به‌عنوان منابع تأمین کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند. ولی از آنجایی که هدف تولید انبوه بر اساس



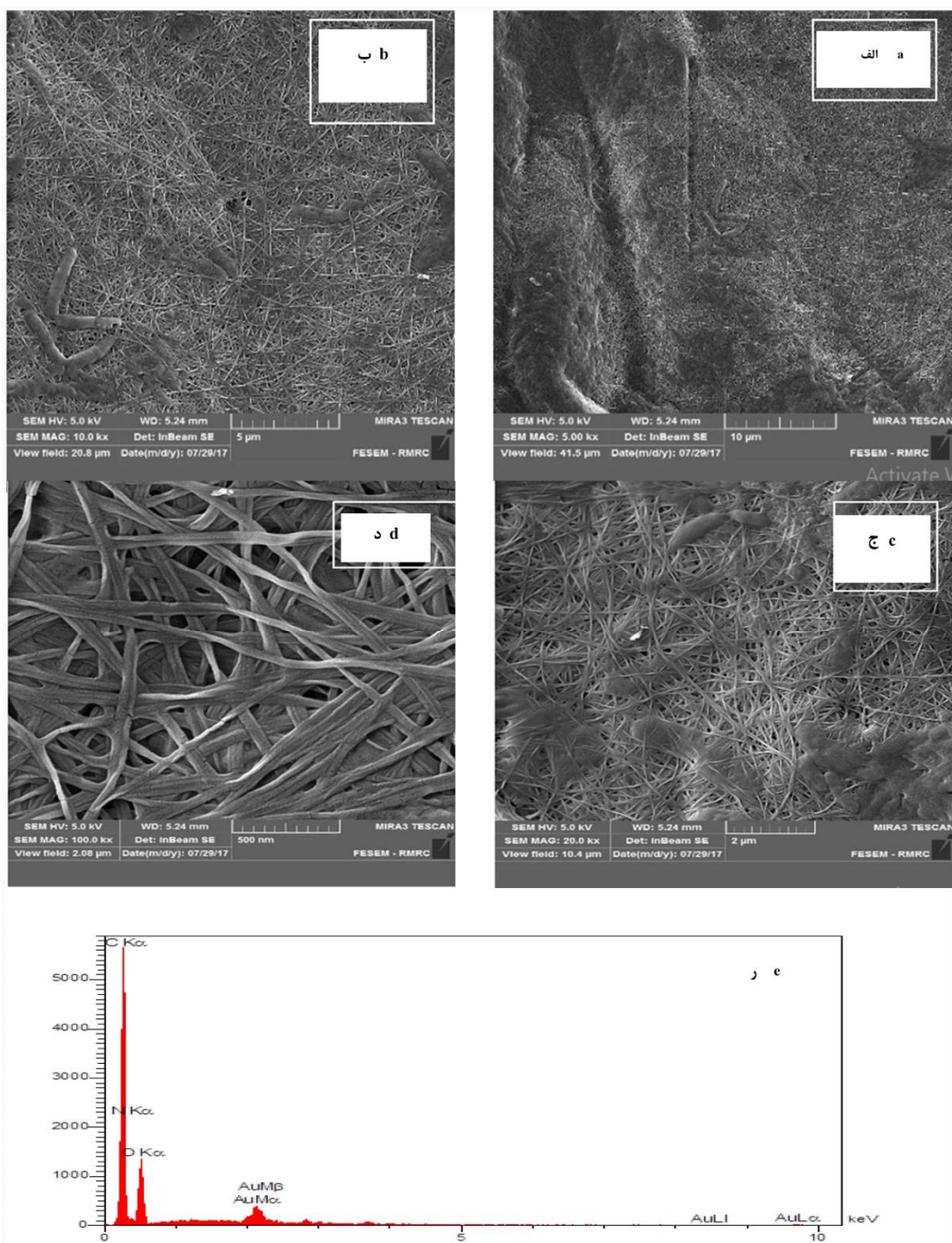
شکل ۲- نانوسلولز باکتریایی؛ (الف) محیط کشت دینامیک، (ب) محیط کشت استاتیک.

Figure 2. Bacterial nano-cellulose (BNC). (a) Static. (b) Dynamic medium.

کشت استاتیک، تعداد عناصر موجود در سلولز تولید شده با محیط کشت دینامیک بیش تر است.

ابعاد الیاف: همان طور که در شکل ۵ نشان داده شده است الیاف نواری تشکیل شده در این سلولز کاملاً مشخص است. قطر متوسط این الیاف متفاوت بوده است. مشاهده می شود که ذرات سلولز باکتریایی روی هم تجمع یافته اند، اما این تجمع ذرات بی معنی ایجاد توذگی نمی باشد. مشاهده می شود که این حالت تجمع با حفظ اندازه نانومتری در ذرات می باشد. به طوری که سلولز تولید شده در محیط کشت استاتیک دارای اندازه نانوذرات عموماً زیر ۶۰ نانومتر و همان طور که در تصویر مشاهده می شود قطر الیاف از ۱۹ تا ۳۹ نانومتر است. این امر صحت تولید سلولز باکتریایی را در مقیاس نانو مورد تأیید قرار می دهد. تفاوت اندازه در قطر نانوالیاف سلولز تولید شده در دو نوع محیط کشت در تصاویر FE-SEM به خوبی دیده می شود. این تفاوت قطر منجر به ایجاد سطح ویژه ای وسیع برای سلولز باکتریایی می شود و زمینه نگهداری بیش تر مایعات، مقاومت مکانیکی و سایر خصوصیات منحصربه فرد این پلیمر زیستی می شود (۱). نتایج پژوهش های چنگ و همکاران (۲۰۱۷) در خصوص قطر نانوالیاف سلولز باکتریایی تولید شده با محیط کشت تفاله نیشکر نشان دهنده این است که قطر نانوالیاف این نوع سلولز بین ۳۰ تا ۸۰ نانومتر است. نتایج این بخش از پژوهش با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۲). مورالس نارویز و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهش خود، قطر الیاف نانوسلولز باکتریایی تولید شده توسط باکتری استوباکتر زایلینوم را در محدوده 10 ± 45 نانومتر و طول آن را بیش تر از ۱۰ میکرومتر برآورد کردند (۱۷).

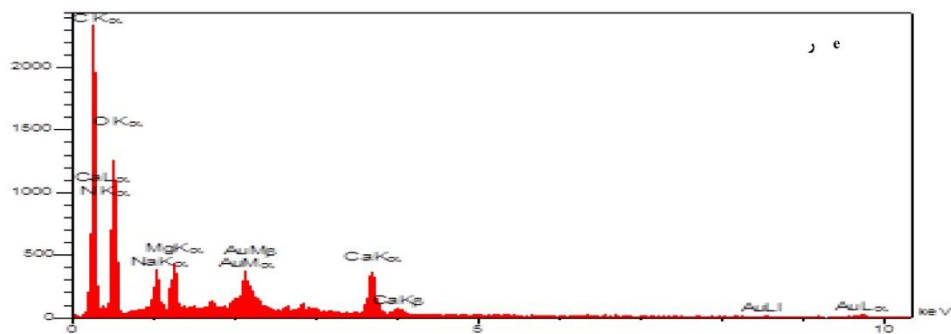
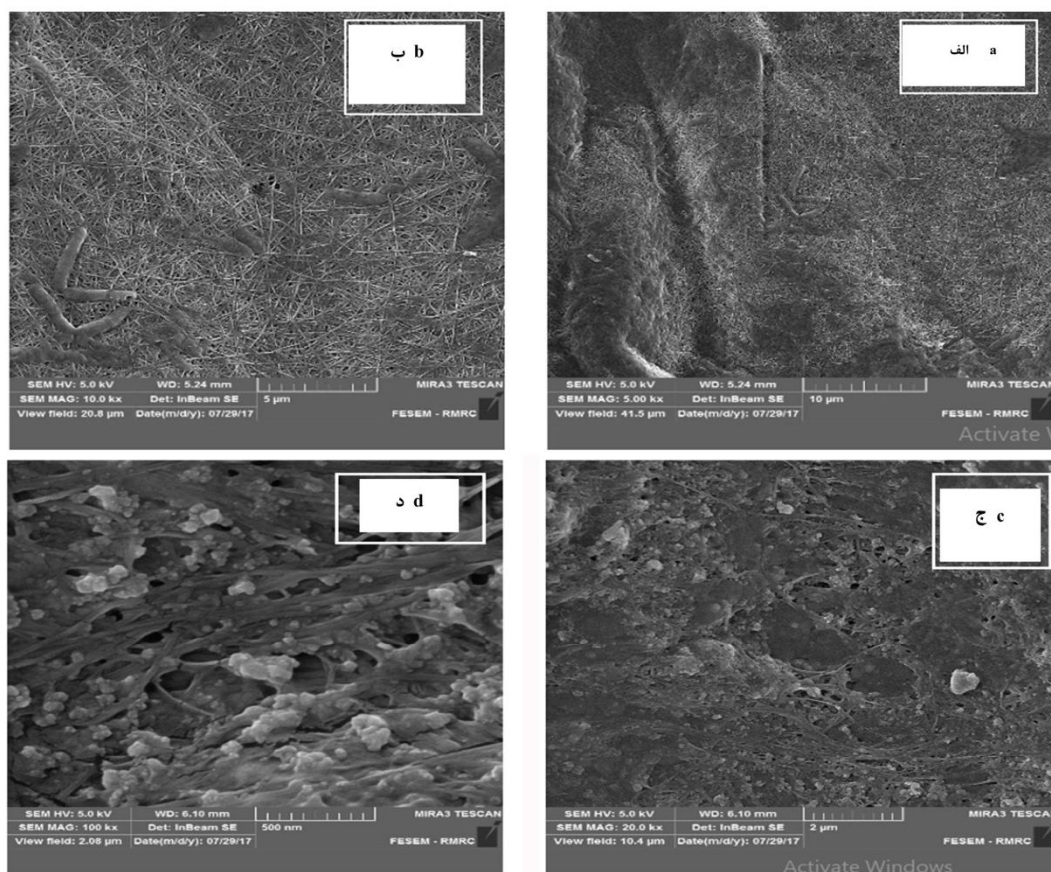
بررسی ریخت شناسی^۱ سلولز باکتریایی: مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) نشان داد که نحوه کشت تأثیر محسوسی در تصاویر FE-SEM دارد. به طوری که مقایسه تصاویر FE-SEM دو روش کشت استاتیک و دینامیک نشان داد ریخت شناسی سلولز باکتریایی در کشت استاتیک، متخلخل و مشبک است. به طوری که الیاف در این روش کشت، تشکیل یک ساختار متخلخل و مشبک را می دهند (شکل ۳). در مقایسه ساختار سلولز باکتریایی با سلولز گیاهی می توان بیان کرد که نانوالیاف سلولز گیاهی دارای رشته های ضخیم تری می باشند که تمایل به چسبیدن به یکدیگر دارند (۲۱)، ولی نانوسلولز باکتریایی دارای یک ساختار متخلخل و مشبک است. به طوری کلی نانوسلولز باکتریایی حاصل از محیط کشت استاتیک دارای الیاف مشبک، متخلخل و نواری هستند، اما نانوسلولز باکتریایی حاصل از محیط کشت دینامیک هیچ تفاوت مشابهی در ظاهر سطوح خارجی و داخلی آن با نانوسلولز استاتیک ندارد. به طوری که ساختار الیاف آن تمایل به چسبیدن به یکدیگر دارند و تشکیل یک ساختار بسته داده اند (شکل ۴). نتایج آنالیز عنصری اشعه ایکس پراکنش گرای انرژی (EDX) نشان دادند که میزان کربن موجود در این سلولز، ۵۵/۹ درصد وزنی نسبت به سایر ترکیبات می باشد. نتایج آنالیز عنصری همچنین نشان داد که ۵/۶۱ درصد از وزن کل سلولز را طلا تشکیل می دهد؛ که معیاری از ماده پوشش دهی به منظور تصویربرداری می باشد. نتایج بررسی EDX سلولز حاصل از محیط کشت دینامیک نشان داد که میزان کربن موجود در این سلولز، ۴۳/۵ درصد وزنی نسبت به سایر ترکیبات می باشد. در مقایسه با سلولز تولید شده با محیط



شکل ۳- تصاویر FE-SEM از سلولز باکتریایی تولیدشده در محیط کشت استاتیک در بزرگنمایی‌های مختلف؛ (الف) ۵۰۰۰ برابر،

(ب) ۱۰۰۰۰ برابر، (ج) ۲۰۰۰۰ برابر، (د) ۱۰۰۰۰۰ برابر (ر) آنالیز EDX.

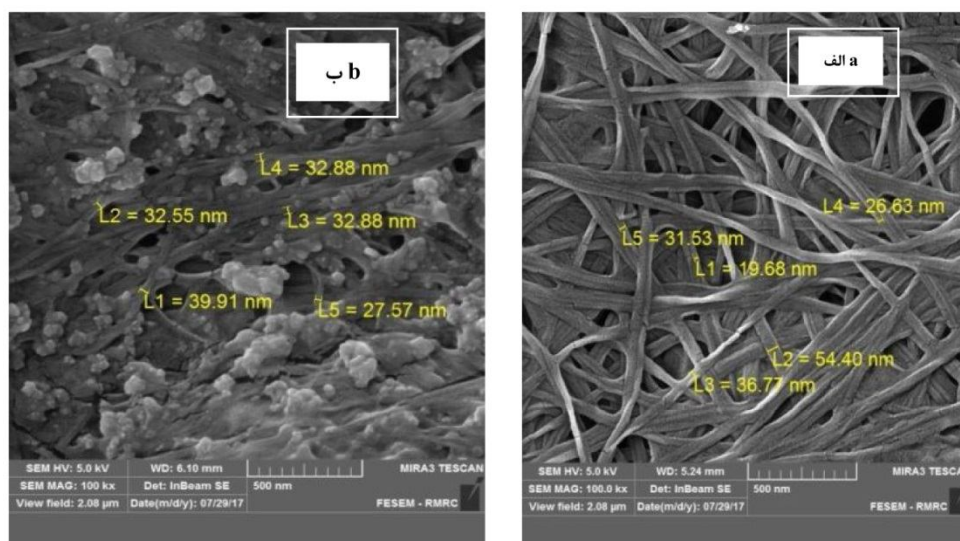
Figure 3. FE-SEM image of bacterial nano-cellulose (BNC) produced in static medium. (a) 5000×, (b) 10000×, (c) 20000×, (d) 100000×, (e) EDX analysis.



شکل ۴- تصاویر FE-SEM از سلولز باکتریایی تولیدشده در محیط کشت دینامیک در بزرگنمایی‌های مختلف: (الف) ۵۰۰۰ برابر،

(ب) ۱۰۰۰۰ برابر، (ج) ۲۰۰۰۰ برابر، (د) ۱۰۰۰۰۰ برابر و (ه) آنالیز EDX.

Figure 4. FE-SEM image of bacterial nano-cellulose (BNC) produced in dynamic medium. (a) 5000×, (b) 10000×, (c) 20000×, (d) 100000×, (e) EDX analysis.



شکل ۵- تصویر FE-SEM از سلولز باکتریایی در محیط کشت استاتیک (الف) و دینامیک (ب) (بزرگنمایی ۱۰۰۰۰۰ برابر).
Figure 5. FE-SEM image of bacterial nano-cellulose (BNC). (a) Static medium. (b) Dynamic medium. 100000×.

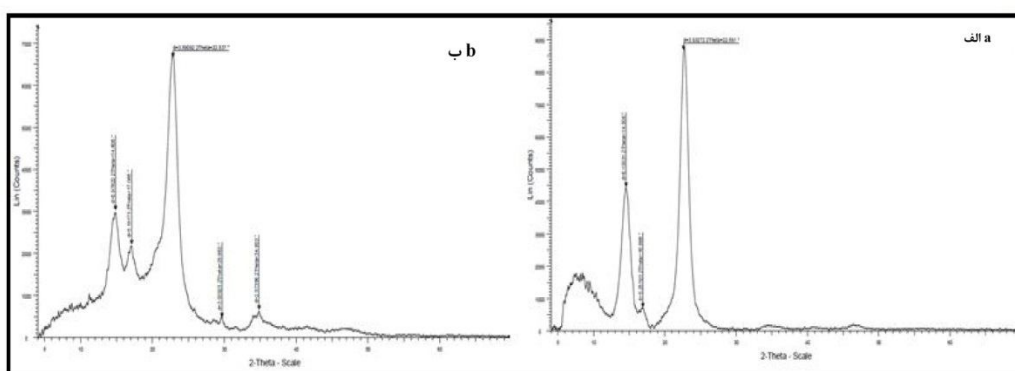
شده است. میزان بلورینگی سلولز یکی از مهم‌ترین پارامترهای ساختار سلولز می‌باشد. با افزایش میزان بلورینگی استحکام الیاف سلولز افزایش یافته و با افزایش نسبت مناطق بلورین به مناطق آمورف، انعطاف‌پذیری الیاف کاهش می‌یابد (۱۹). به علاوه، بلورینگی سلولز باکتریایی از اصلی‌ترین عوامل تعیین‌کننده ویژگی‌های مکانیکی، واکنش‌پذیری و سایر ویژگی‌های آن است؛ بنابراین این ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی می‌تواند متناسب نوع کاربرد با تغییر سلولز باکتریایی از طریق تیمارهای شیمیایی تغییر یا بهبود داده شوند (۲). سلولز باکتریایی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی است. به طوری که این سلولز در مقایسه با سلولز گیاهی دارای دو فرم کریستالی ($I\alpha$ و $I\beta$) می‌باشد، این در حالی است که سلولز گیاهی تنها دارای یک فرم کریستالی ($I\beta$) می‌باشد (۲۲). فاز $I\alpha$ عمدتاً در سلولز تولید شده توسط جلبک‌ها و باکتری یافت می‌شود، این در حالی است که فاز $I\beta$ در درصد‌های بالاتری در سلولز گیاه حضور دارد (۱۸).

آزمون پراش اشعه ایکس: در شکل ۶، الگوی پراش اشعه ایکس را در محدوده زاویه پراش ۶۰-۵ درجه نشان می‌دهد. بر پایه این نتایج، سلولز باکتریایی تا حدی بلورینگی بودن را از خود نشان داده است. هر چند که با توجه به این شکل، خالص‌سازی بیش‌تر نیز ممکن به نظر می‌رسد. برازش منحنی‌ها نشان داد که پیک‌های الگوی پراش پرتو ایکس سلولز نانو سلولز باکتریایی در محیط کشت دینامیک پهن‌تر شدند. پهن‌تر شدن پیک‌ها از دو عامل کاهش درجه تبلور و کاهش ضخامت کریستال نشأت می‌گیرد (۲۴). محاسبه‌های کمی انجام‌شده این ادعا را ثابت کرد. همان‌طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، میزان بلورینگی نانوسلولز باکتریایی در محیط کشت استاتیک حدود ۷۲/۴۹ درصد محاسبه شد، در حالی که این مقادیر برای محیط کشت دینامیک، ۱۴/۲۹ درصد اندازه‌گیری گردید؛ بنابراین، در اثر فرآیند تولید میزان بلورینگی سلولز کاهش یافت. به نظر می‌رسد عواملی مهمی همچون محیط کشت و مقدار اکسیژن سبب شکست کریستال‌ها، کاهش درجه کریستالی و ضخامت آن‌ها

جدول ۲- میزان بلورینگی نانوسلولز باکتریایی.

Table 2. Bacterial nano-cellulose (BNC) crystallinity.

میزان بلورینگی (درصد) Crystallinity (%)	نوع نانوسلولز Nano-cellulose type
74.49	نانوسلولز باکتریایی (محیط کشت استاتیک) BNC (Static medium)
14.29	نانوسلولز باکتریایی (محیط کشت دینامیک) BNC (Dynamic medium)



شکل ۶- نمودار پراش اشعه ایکس سلولز باکتریایی: (الف) محیط کشت استاتیک؛ (ب) محیط کشت دینامیک.

Figure 6. X-ray spectra of BNC. (a) Static medium. (b) Dynamic medium.

بین ساختارهای مجزا از فیبرهای سلولز باکتری تولید شده در کشت‌های دینامیک و استاتیک وجود ندارد. با این وجود، سلولز باکتری تولیدشده در کشت دینامیک، تغییرات میکروساختار را نشان می‌دهد، این مربوط به درجه کم بسپارش و میزان بلورینگی سلولز باکتری تولیدشده در کشت دینامیک است. این دلایل صحت نتایج به‌دست آمده در این پژوهش را با نتایج سایر پژوهشگران اثبات می‌کند (۱۱).

ویسکوزیته: میزان ویسکوزیته سلولز باکتریایی تولید شده در محیط کشت استاتیک ۱۱۰/۷ سانتی‌پواز و میزان ویسکوزیته سلولز باکتریایی تولیدشده در محیط کشت دینامیک ۹۷ سانتی‌پواز محاسبه شد (جدول ۳). نتایج نشان داد مقدار ویسکوزیته بلور سلولز باکتریایی حاصل از محیط کشت استاتیک از اندازه بلور سلولز باکتریایی حاصل از محیط کشت دینامیک بزرگ‌تر است. نتایج پژوهش‌های قبلی انجام‌شده توسط پژوهشگران نشان می‌دهد که تقریباً هیچ تفاوتی

جدول ۳- ویسکوزیته نانوسلولز باکتریایی.

Table 3. BNC viscosity.

ویسکوزیته (cP) Viscosity (cP)	نوع نانوسلولز Nano-cellulose type
110.7	نانوسلولز باکتریایی (محیط کشت استاتیک) BNC (Static medium)
97	نانوسلولز باکتریایی (محیط کشت دینامیک) BNC (Dynamic medium)

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت قابل‌توجه سلولز باکتریایی، مطالعات بسیاری در سطح دنیا برای تولید این محصول انجام شده است. با این حال با توجه به کمبود مطالعات در این زمینه در کشور، تولید بومی این محصول، ضروری به نظر می‌رسد. سلولز باکتریایی به‌علت ساختارهای میکروسکوپی مطلوب، قابلیت‌های بسیار زیادی نسبت به سلولز گیاهی دارد که باعث شده علی‌رغم قیمت بالاتر در مصارف خاص (مانند مصارف پزشکی و بهداشتی) مورد توجه قرار گیرد. با مروری بر سوابق تحقیقاتی گذشته، دیده می‌شود که تاکنون پژوهش‌های جامعی بر روی تولید سلولز باکتریایی به‌دست آمده از نوع استوباکتر در ایران انجام نشده است و افزون بر این موضوع، تأثیر نوع محیط کشت (استاتیک و دینامیک) بر روی کیفیت سلولز باکتریایی به‌دست آمده بررسی نشده است. به همین دلیل در این مطالعه، در مرحله اول به تولید سلولز باکتریایی با استفاده از سویه استوباکتر پرداخته شد و دانش تولید این پلیمر زیستی منحصربه‌فرد بومی‌سازی شد. سپس

در مرحله دوم به بررسی خصوصیات سلولز باکتریایی با استفاده از محیط کشت (استاتیک و دینامیک) پرداخته شد. نتایج مقایسه تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان (FE-SEM) نشان داد که نحوه کشت تأثیر محسوسی در تصاویر FE-SEM دارد. به طوری که مقایسه تصاویر FE-SEM دو روش کشت استاتیک و دینامیک نشان داد ریخت‌شناسی سلولز باکتریایی در کشت استاتیک، متخلخل و مشبک است. سلولز تولید در محیط کشت استاتیک دارای اندازه نانوذرات عموماً زیر ۶۰ نانومتر و به‌طور میانگین در محدوده ۳۵ نانومتر می‌باشد. این مقادیر برای سلولز تولید در محیط کشت دینامیک عموماً زیر ۴۰ نانومتر و به‌طور میانگین در محدوده ۳۵ نانومتر می‌باشد. نتایج آزمون XRD بلورینگی بودن سلولز باکتریایی را از خود نشان داده است. میزان بلورینگی سلولز باکتریایی تولید شده در محیط کشت استاتیک ۷۲/۴۹ درصد و میزان بلورینگی سلولز باکتریایی تولید شده در محیط کشت دینامیک ۱۴/۲۹ درصد محاسبه شد.

منابع

1. Castro, C., Zuluaga, R., Álvarez, C., Putaux, J.L., Caro, G., Rojas, O.J., Mondragon, I., and Gañán, P. 2012. Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. *Carbohydrate Polymers*. 8: 4. 1033-1037.
2. Cheng, Z., Yang, R., and Liu, X. 2016. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* through utilizing acetic acid hydrolysate of bagasse as low-cost carbon source. *Bioresources*. 12: 1. 1190-1200.
3. Cho, E.J., Oh, J.Y., Chang, H.Y., and Yun, J.W. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *J. of Biotechnology*. 127: 129-140.
4. Dufresne, A. 2013. Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial. *Materials Today*. 16: 6. 220-227.
5. Esa, F., Masrinda Tasirin, S., and Abd Rahman, N. 2014. Overview of bacterial cellulose production and application. *J. of Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2: 113-119.
6. Esa, F., Rahman, N.A., Kalil, M.S., and Tasirin, S.M. 2017. Effects of agitation conditions on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* 0416 in fermentation of matured coconut water medium. *Malaysian J. of Analytical Sciences*. 21: 1. 261-266.
7. Heinze, T., and Liebert, T. 2012. Celluloses and polyoses/hemicelluloses. *Polymer Science: A Comprehensive Reference*. 10: 83-152.
8. Jahan Latibari, A., Khosravani, A. and Rahmaninia, M. 2007. Paper recycling technology. Tehran: Arvij press, 544p. (In Persian)

9. Kang, X., Wang, Y., Harvey, L.M., and Mcneil, B. 2000. Effect of air flow rate on flow scleroglucan synthesis by *Sclerotiumglucanicum* in an airlift bioreactor with an internal loop. *J. of Bioprocess and Biosystems Engineering*. 23: 69-74.
10. Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindstrom, T., Ankerfors, M., Gray, D., and Dorris, A. 2011. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50: 24. 5438-5466.
11. Krystynowicz, A., Czaja, W., Jezierska, A.W., Mis'kiewicz, M.G., Turkiewicz, M., and Bielecki, S. 2002. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 29: 4. 189-195.
12. Krystynowicz, A., Maria, K., Aginiezka, W.K., Stanislaw, B., Emilia, K., Aleksander, M., and Andrzej, P. 2005. Molecular basis of biosynthesis disappearance in submerged culture of *Acetobacter xylinum*. *J. of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 52: 3. 691-698.
13. Kurtoglu Uzyol, H., and Turker Sacan, M. 2017. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. *Environmental Science and Pollution Research*. 24: 12. 11154-11162.
14. Mirshokraei, S.A. 2003. Pulp and paper technology. Aiij Press, 501p. (Translated in Persian)
15. Mirshokraei, S.A. 2002. Wood chemistry: fundamentals and applications. Aiij Press. 198p. (Translated in Persian)
16. Moosavi-Nasab, M., and Yousefi, A. 2012. Investigation of physicochemical properties of the bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter xylinus* from date syrup. *International J. of Nutrition and Food Engineering*. 4: 8. 613-618.
17. Morales-Narváez, E., Golmohammadi, H., Naghdi, T., Yousefi, H., Kostiv, U., Horak, D., Pourreza, N., and Merkoci, A. 2015. Nanopaper as an optical sensing platform. *ACS Nano*. 9: 7. 7296-7305.
18. Pecoraro, E., Manzani, D., Messaddeq, Y., and Ribeiro, S.J.L. 2008. Bacterial cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Chapter. 17: 369-383.
19. Poletto, M.P., Zattera, A.J., and Santana, R.M.C. 2012. Structural differences between wood species: Evidence from chemical composition, FTIR spectroscopy and thermogravimetric analysis. *J. of Applied Polymer Science*. 126: 1. 336-343.
20. Rangaswamy, B.E., Vanitha, K.P., and Hungund, B.S. 2015. Microbial cellulose production from bacteria isolated from rotten fruit. *International J. of Polymer Science*. 2015: 1-8.
21. Rezayati Charani, P., and Dehghani-Firouzabadi, M. 2016. Comparison of produced film of cellulose nano-fibers by dried and vacuum filtrated method from unbleached kraft pulp of kenaf bast fiber. *Iranian J. of Forest and Wood Products*. 68: 2. 317-328. (In Persian)
22. Torres, F.G., Commeaux, S., and Troncoso, O.M. 2012. Biocompatibility of bacterial cellulose based biomaterials. *Functional Biomaterials*. 3: 4. 864-878.
23. Ullah, H., Santos, H.A., and Khan, T. 2016. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *J. of Cellulose*. 23: 4. 2291-2314.
24. Yousefi, H., Faezipour, M., Nishino, T., Ebrahimi, G., and Shakeri, A. 2011. All-cellulose composite and nanocomposite made from partially dissolved micro and nanofibers of canola straw. *Polymer J*. 43: 559-564.



Producing and evaluating of bacterial nano-cellulose (BNC) using *Acetobacter xylinum* bacteria

S. Zeydanlou¹, *M.H. Aryaie Monfared², M.R. Dehghani Firuzabadi³ and E. Afra³

¹M.Sc. Student of Pulp and Paper Industry, Dept. of Paper Science and Engineering, Faculty of Wood and Paper Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran,

²Assistant Prof., Dept. of Paper Science and Engineering, Faculty of Wood and Paper Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran,

³Associate Prof., Dept. of Paper Science and Engineering, Faculty of Wood and Paper Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 02.24.2018; Accepted: 10.29.2018

Abstract

Background and Objectives: Cellulose is a high-strength natural polymer per unit weight and is the main building material of plant fibers. Many properties of the cellulose depend on the chain length or degree of polymerization, the ratio of the amorphous to the crystalline segments, as well as the crystal structure. While harsh chemicals or mechanical treatments are used in many nanocellulose extraction methods; cellulose is obtained with pristine properties but nanometer-sized by only very limited methods that bacterial nanocellulose is the most important of them. Bacterial nano-cellulose (BNC) due to special microscopic structures has a high potential in special uses (such as medical and sanitary applications). BNC differs from plant cellulose in its higher purity, crystallinity, and degree of polymerization. The goal of this study was to investigate the production of BNC using *Acetobacter xylinum* bacteria and its characteristics evaluation.

Materials and Methods: In order to obtain BNC in this research, the bacterium was cultured in a liquid culture medium under static and dynamic conditions and the resulting cellulose was washed and purified. Microstructures with field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), crystallinity structure by X-ray diffraction (XRD), weight percentage, size and distribution of BNC with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), determination of viscosity and molecular weight by dissolving of cellulose in copper(II)-ethylenediamine complex (CED) solution, and BNC yield by weighing wet and dry samples were studied.

Results: The results showed that yield of BNC static culture medium is more than BNC dynamic culture medium. Comparison of FE-SEM images showed that the culture method has a significant effect on the morphology structure of the BNCs fibers produced. Comparison of FE-SEM images of two culture methods showed that the morphology of BNC in static cultivation is porous and in dynamic is clustered together. The size of nanoparticles is generally below 60 nm for both BNCs. The results of XRD test showed that the crystallinity of BNCs in the static and dynamic medium was 72.49% and 14.29%, respectively. Also, viscosity of BNCs in the static and dynamic medium was 110.7 centipoise (cP) and 97 cP, respectively.

Conclusion: In general, with respect to characteristics of BNC produced and comparison with other studies, we concluded that suitable BNC has been produced in this study that with respect to research needed in this field in the country and medical applications and engineering are important.

Keywords: *Acetobacter xylinum* bacteria, Static culture, Dynamic culture, Bacterial nano-cellulose (BNC)

*Corresponding author: hadiaryaie@gmail.com