عنوان طرح:

تولید سلولز باکتریایی از ضایعات خرما و نیشکر به منظور استفاده در صنایع تولید کاغذ و پوشش‌های بسته‌بندی

مجری طرح:

دکتر مهدی زارعی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۱- معرفی سلولز باکتریایی

سلولز، فراوان ترین بیوپلیمر موجود در طبیعت بوده که از مونومر های گلوکز با باندهای ß_ یک و چهار گلیکوزید تشکیل شده است. سلولز گیاهی ماتریس ساختاری پایه دیواره های سلولی در اکثر گیاهان، قارچ ها و جلبک ها می باشد. سالیانه حدود ۸۰ بیلیون تن از این پلیمر زیستی تولید می شود. در بین گیاهان و درختان پنبه با ۹٤٪ سلولز و چوب با ۵۰٪ سلولز، نقش بیشتری را در تولید آن به عهده داشته و تولید انواع فراورده ها از سلولز طبیعی و بازیافتی به وسیله ی این منابع انجام می شود. با توجه به اینکه تولید انواع فراورده های سلولزی به ویژه الیاف سلولزی بازیافتی و طبیعی از مرتع ها و و جنگل های گوناگون صورت می گیرد و برای به دست آوردن فراورده هایی با کیفیت مناسب، باید از روش های گوناگون خالص سازی شیمیایی سلولز بهره برد، در سال های اخیر آسیب زیادی به طبیعت وارد شده است. از سوی دیگر رشد جمعیت و تمایل بشر به استفاده از الیاف طبیعی و یا بازیافتی به دست آمده از طبیعت، پژوهشگران را بر آن داشت تا به دنبال تأمین سلولز از منابعی دیگر باشند. در این میان سلولز باکتریایی bacterial cellulose(BC) یکی از مهمترین منابعی است که در چند دهه ی اخیر مورد توجه قرار گرفته است.

سلولز باکتریایی اولین بار توسط Brown در سال ۱۸۸٦ میلادی در طی فرآیند تولید سرکه، در سطح ظرف تخمیر سرکه به صورت یک ماده ی ژلاتینی به دست آمد. سلولز باکتریایی خواص منحصر به فردی نظیر بلورینگی بالا، درجه ی بالای پلیمریزاسیون؛ مقاومت کششی بالا، خلوص بالا و سازگاری بیولوژیکی قوی نشان داده، بنابراین جایگزین مناسبی برای سلولز مشتق شده از گیاهان می باشد. از نظر ساختار شیمیایی سلولز باکتریایی مشابه سلولز گیاهی می باشد. این سلولز نیاز به رنگبری نداشته و با یک تیمار قلیایی ساده می توان سلول های باکتری و عناصر محیط کشت را از آن زدود. ساختار لیفچه ای بسیار ریز

شبکه ای دارد که بسیار متخلخل بوده و با داشتن نسبت سطح به حجم بالا به دلیل داشتن ابعاد نانو باعث افزایش قابلیت جذب آب و قدرت نگهداری آب بالایی شده است همچنین درجه بلورینگی (CI) آن بالای ٪۶۰ می باشد که نزدیک به درصد بلورینگی سلولز پنبه و گاهی از آن بالا تر نیز می رود.

سلولز باکتریایی در مقیاس وسیع، به طور عمده توسط باکتری های مربوط به جنس *گلوکونواستوباکتر زایلینوم* بیشترین میزان سلولز را تولید می کند. سلولز تولید شده توسط این باکتری فاقد لیگنین، همی سلولز، پکتین و موم است. این باکتری گرم منفی، هوازی و میله ای شکل است و می تواند ۱۰۸ ملکول گلوکز را به سلولز تبدیل نمایند. برای تولید سلولز از این باکتری از محیط کشت Hestrin-schramm (HS) استفاده می شود که در طول بیوسنتز سلولز، باکتری ترکیبات مختلف محیط را مصرف کرده و زنجیره های خطی بتا تولید می کند. محیط HS از گلوکز، پپتون، عصاره مخمر، دی سدیم فسفات بدون آب و اسید سیتریک مونو هیدرات تشکیل شده است. یکی از جنبه های کلیدی در فرآیند تولید سلولز باکتری، توسعه یک محیط کشت مقرون به صرفه جهت به دست آوردن حداکثر راندمان تولید می باشد، از منابع مورد استفاده می‌تواند ملاس و شیره خرما باشد. در مقابل برخی از یافته ها نشان می دهند که جنس هایی مانند *آکروباکتر، ازتوباکتر، آئروباکتر، ریزوبیوم، آلکالیژنز، سارسینا، آکروموباکتر، سودوموناس، سالمونلا و اشرشیا* نیز در شرایط مناسب قادر به تولید سلولز می باشد. گونه هایی مانند *آکروموباکتر اسپانیوس، سودوموناس لوتیلا، سودوموناس دوریفلاوا* به عنوان گونه های تولیدکننده سلولز میکروبی معرفی می شوند.

۲- محیط های لازم جهت تولید سلولز باکتریایی

محیط کشت Stock: به محیطی گفته می شود که میکروب مورد نظر که به صورت لیوفیلیزه در آمده است در این محیط کشت میکروب به فرم فعال در آمده و توانایی رشد می یابد. این محیط می تواند به صورت محیط مغذی مایع Nutrient broth یا محیط جامد PCA باشد.

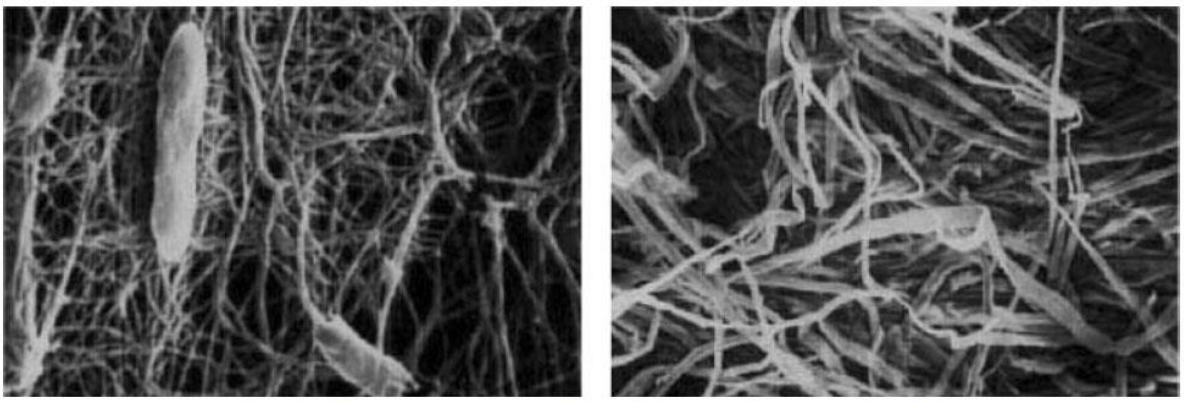
محیط دانه بندی: محیط seed همانطور که از اسم آن بر می آید شامل محیطی است که دانه بندی و شکل گیری توده میکروب مورد نظر در آن صورت می گیرد. در این محیط، میکروب مورد نظر از قند موجود به عنوان منبع کربنی جهت رشد استفاده کرده و با توجه به این که محیط seed از لحاظ ترکیبات بسیار شبیه محیط تخمیر است، امکان آداپته شدن میکروب در محیط تخمیر افزایش می یابد و تولید محصول در محیط تخمیر در زمان کمتری صورت می گیرد. سلول های میکروبی لازم برای تلقیح در محیط تخمیر با عمل سانتریفیوژ محیط seed و جداسازی سلول های میکروبی آن تأمین می گردد.

محیط تخمیر: محیط تخمیر(Fermentation) محیطی است که در آن فرایند تخمیر صورت گرفته و محصول نهایی در بستر آن به دو روش سطحی یا غوطه وری تولید می شود. منبع کربنی مورد نیاز در جهت تولید محصول در این محیط با استفاده از ضایعات کشاورزی یا صنایع غذایی تامین می گردد.

۳- تفاوت و شباهت سلولز گیاهی و باکتریایی

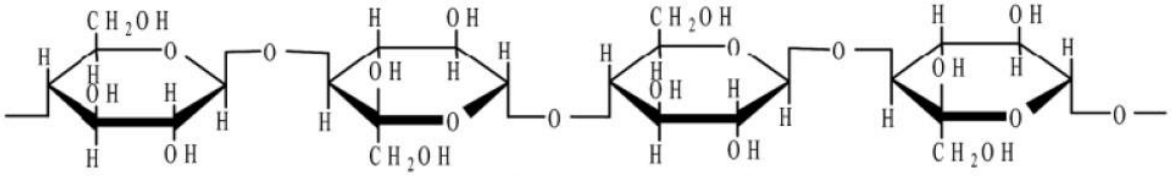
معمولاً سلولز باکتریایی تولید شده مشخصات فیزیکی بسیار بالاتر نسبت به سلولز گیاهی را دارا می باشد. سلولز باکتریایی دارای ساختار کریستالی، میزان کشش، فرم پذیری و ظرفیت جذب آب بیشتری (۷۰۰برابر

وزن آن) می باشد. قطر فیبر سلولز باکتریایی ۱/۱۰۰ سلولز گیاهی است که این ظرفیت بالا در شکل زیر مشخص است.



شکل ۱- تصویر راست: سلولز گیاهی، تصویر چپ: سلولز باکتریایی

دارا بودن خاصیت کشسانی بیشتر همراه با سفتی خوب سبب شده است در مواردی که از سلولز گیاهی نمی توان استفاده کرد، بتوان از این سلولز باکتریایی به خوبی استفاده کرد. سلولز یک پلیمر غیر منشعب است که از اتصال باقیمانده های گلوکز با پیوند ۱-ß تشکیل شده است.



شکل۲- ساختار شیمیایی سلولز

ساختار شیمیایی سلولز باکتریایی و گیاهی مشابه است به غیر از درجه پلیمری شدن که در مورد سلولز گیاهی ۱۳۰۰۰ تا ۱٤۰۰۰ می باشد در حالی که در مورد سلولز باکتریایی ۲۰۰۰ تا ٦۰۰۰ است.

ساختار ماکروملکولی و ویژگی های سلولز باکتریایی متفاوت است. زنجیره های کوتاه این نوع سلولز به هم متصل شده و زیر فیبریل ها را می سازند. این زیر فیبریل ها دارای پهنایی به اندازه حدود ۱.۵ نانومتر می باشند که از جمله نازکترین فیبر های موجود به شمار می روند. این فیبر ها کریستاله شده و به میکروفیبر ها و آن ها نیز به دسته ها و در نهایت به ریبون ها (نوارها) تبدیل می شوند.

۴- کاربردهای سلولز باکتریایی

۱-٤- زیست پزشکی

برخی از مهم ترین کاربردهای زیست پزشکی در ذیل آمده است:

قلب و عروق: بیماری های قلبی عروقی یکی از علل مرگ و میرزنان و مردان در سراسر جهان است. به گفته سازمان بهداشت جهانی و بنیاد قلب بریتانیا، بیماریهای قلبی عروقی به ترتیب ۳۰ درصد مرگ و میر در سراسر جهان و ٤۲ درصد در اروپا است. هرساله هزاران بیمار جراحی بایپس قلبی انجام میدهند. به دلیل کمبود کاشتنیهای بایپس مصنوعی تاکنون، عروق از پاها یا قفسه سینه بیماران گرفته شده است. کاشتنیهای بایپس مصنوعی ساخته شده از پلی تترافلورو اتیلن، پلی اتیلن و پلی اورتان برای جراحی قلب و عروق ناموفق بوده اند. گروههای تحقیقاتی متعددی کاشتنیهای مبتنی بر سلولز باکتریایی را تولید کرده اند، که سازگاری با خون

و بافت،رشد سلولی، جراحی، و روش های معمول ضد عفونی کردن مطایقت دارد. مطالعات اولیه نشان داد که لوله های BNC برای جراحی بسیار مناسب هستند و میتوانند به روش های استاندارد ضدعفونی شوند.

جایگزینی عروق خونی: یکی از رایج ترین درمانها برای بیماریهای قلبی عروقی جراحی پیوند عروق کرونر است، که برای تامین خون به بافت قلب با جایگزینی مناسب انجام میشود. سلولز باکتریایی با داشتن مقاومت مکانیکی خوب فشار خروجی تا ۸۸۰ میلیمتر جیوه و زیست سازگاری با خون، میتوان آن را به عنوان ماده ای برای لوله های مصنوعی برای پیوند عروق با اندازههای کوچک (کمتر از ٤ میلی متر) یا (بزرگتر از ٦ میلی متر) استفاده کرد، که در این صورت از پدیده لختگی و تنگی مجرا جلوگیری کند. با توجه به شرایط بالینی لختگی خون و انسداد، موادی که اغلب برای جایگزینی پیوند عروق استفاده میشوند، به دلیل کوچکی عروق خونی مناسب نیستند. هیدروژل نانو سلولز باکتریایی به عنوان مواد بیولوژیکی امیدوار کننده برای عروق خونی مصنوعی پیشنهاد شده است. با این حال، برخی از خواصBNC به تمام الزامات رگ خونی طبیعی پاسخ نمیدهد. به همین منظور برای بهبود خواص لوله های BNC ،از پلی وینیل الکل PVA در لوله های BNC برای ساخت کامپوزیتها استفاده کردند و نتایج نشان داد که PVA

آغشته به لوله های BNC به طور قابل توجهای خواص BNC ،به خصوص خواص مکانیکی و نفوذ پذیری آب را بهبود می بخشد .

ترمیم بافت پوست و پانسمان زخم: پانسمان زخم برای تسریع التیام زخم وجلوگیری از عفونی شدن زخم انجام میشود. استفاده از پانسمانهای مرسوم زمان ترمیم طولانی، تعویض دردناک زخم و... را شامل میشود. بنابراین محققان درصدد پانسمانی بودند، که ویژگیهای مطلوبی داشته باشد، آنها از سلولز باکتریایی استفاده کردند، که شبیه به سلولز گیاهی است. پوشش های سلولزی به صورت روکش موقتی برای درمان زخمهایی مانند: فشارهای دردناک، ایستایی وریدی، زخمهای اسکیمی و دیابتی وسوختگی های درجه دوم، محل های جراحی پوست، خراشهای عمیق و پارگی ها استفاده میشود. هدف اصلی استفاده ازآنها هزینه کم، چسبندگی خوب بر روی زخم، نفوذپذیری بخارآب، کشسانی، مقاومت و ممانعت فیزیکی و دسترسی آسان با حداقل سرمایه گذاری است. مکانیسم عمل پوششهای زخم کاملا مشخص نشده است، اما بعضی از محققیان مکانیسم درد را شامل: دستگیری آنیونها ازطریق پیوندهای هیدروژنی سلولز یا نانوباکتری سلولز با شبکه سه بعدی در سطح پوست میدانند که شرایط بهینه ای برای التیام و احیای زخم ایجاد میکنند. از سلولز نانو باکتری به همراه آنتی بیوتیک اسید فوسیدیک که با آن اشباع شده بود، یک ژلی شفاف و بی رنگ برای پانسمان زخم به

دست آوردند. به علت ساختار شبکه ای سه بعدی منحصربه فرد نانو ذرات، سلولز باکتریایی دارای رطوبت زیاد، مقاومت مکانیکی بالا و قابلیت زیست سازگاری عالی است که همه آن را قادر میسازد تا به عنوان داربستی طبیعی برای بازسازی انواع بافتهای مختلف به کار رود. و مشخصه مهم آن توانایی جذب ترشح التهاب در طی فرآیند پوشش و همچنین حذف آنها از سطح زخم پس از بهبودی است.

درمان سوختگی: سوختگی، صدمات بسیار خطرناکی است که باعث آسیب جدی به بافت های پوست میشود. فرایند بهبود شامل بازسازی اپیدرم و ترمیم غشای میانی پوست است که هر دو باعث تشکیل بافت اسکار یا همان بافتی که در اطراف زخم ایجاده شده، میشود. هدف اصلی در طول درمان بیماران سوختگی این است که سریعا زخم را برای افزایش میزان بهبودی ببندیم و درد را کاهش دهیم. علاوه بر این، برای مدیریت زخم مناسب باید زخم را از ابتلا به آلرژی و خشکی دور کرد. علیرغم این واقعیت که بسیاری از پانسمان زخم های زیستی و مصنوعی مختلف در حال حاضر توسعه یافته است، اما نانو پوست سلولز باکتریایی تقریبا تنها محصولی است که تمام شرایط مورد نظر را مورد ارزیابی قرار میدهد. به علت ویژگیهای منحصر به فرد آن، نانو زیست سلولز به عنوان مواد بسیار مؤثر برای پوشیدن زخم شناخته شده است.

خـــواص ســـازگاری و خـــواص انعطـــاف پذیـــری سلولز باکتریایی ســـطح بالایی از پیونـــد را بـــا محـــل زخـــم ایجـــاد میکنـــد. حتـــی بـــه قســـمت های متحـــرک ماننـــد تنـــه و صـــورت، نیـــز قـــدرت پیونـــد دارد. اســـتفاده از پانســـمان BC در درمـــان ســـوختگیهای ضخیـــم، محیطـــی مناســـب بـــرای ترمیـــم زخـــم ایجـــاد میکنـــد.

چشم پزشکی: اسـتفاده از کامپوزیتهای سلولز باکتریایی شـامل توانایی آن برای پیوسـتن و افزایـــش تکثیـــر اپیتلیـــوم رنگـــی شـــبکیه اســـت. پیوندهـــای سلولز باکتریایی میتوانـــد بـــه طورگســـترده میـــزان رد شـدن قرنیه هـای پیونـد را کاهـش دهـد و درمـان بیماری های چشـــم را بـــا تقویـــت موضعـــی نئوواسکوالریزاســـیون و کاهـــش عـــوارض جانبـــی و فواصـــل جراحـی را بهبـود ببخشـد. بسـیاری از کامپوزیتهـای مرتبط بـا سلولز باکتریایی قـادر بـه حمایـت از رشـد سـلول هـای اسـترومای قرنیه بـــا حفـــظ دیـــد کامـــل بـــرای بیمـــار هسـتند. ایـن مـواد قابلیـت زیـادی بـرای داربسـت چشـم دارند و جایگزیـن موادی هستند کـــه در حـــال حاضـــر در درمانگاه هـــا کاربـــرد دارد. همچنیـــن یـــک قابلیـــت زیســـت مهندســـی مناسـبی بـرای بیماریهـای مرتبـط بـا چشـم ارائـه میدهـند؛ روش هـای مختلفـی از فشـار دادن بـه سلولز باکتریایی بـرای ایجاد اشـکال محـدب ایجـاد شـده اسـت کـه میتوانـد در تولیـد لنزهـای ثابـت پایـدار بـرای اصـلاح پیـر چشـمی، آستیگماتیسـم، دور بینـی و نزدیـک بینـی اسـتفاده شـود.

۲-۴- صنایع غذایی

به دلیل ویژگی های خاص و ساختار سلولز باکتریایی از آن در فرمولاسیون های گوناگون غذایی استفاده می شود. در مواردی که بخواهند از مقادیر کم سلولز استفاده کنند، تداخل طعم ایجاد نگردد، کف ها را پایدار کرده و پایداری بالایی در دامنه ی وسیعی از pH و دما ایجاد کنند، سلولز باکتریایی کاربرد زیادی دارد. سلولز در سس ها نیز برای ایجاد توانایی بهتر ریزش کاربرد دارد. در صنایع لبنی یخ زده و محصولات زده شده مانند خامه زده شده نیز از سلولز باکتریایی استفاده می شود. از کاربرد های دیگر سلولز باکتریایی در صنایع غذایی می توان به کاربرد آن به عنوان یک ترکیب اضافه شده به غذا جهت کم کردن کالری، تغلیظ کننده، پایدار کننده و اصلاح کننده بافت اشاره کرد. سلولز باکتریایی در لیست GRAS جای گرفته و به عنوان یک اضافه شونده به غذا و دارو در سال ۱۹۹۲ مورد تأیید قرار گرفت. ژل سلولز باکتریایی که Nata نامیده می شود به عنوان یک دسر خوشمزه در فیلیپین مصرف می شود. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که حضور نانو الیاف سلولز باکتریایی خواص کششی، مقاومت به رطوبت و حمله میکروارگانیسم ها را بهبود می بخشد.

چربی ها نقش مهمی در خواص انواع غذاها و ویژگی های فیزیکی، رئولوژیکی و بافتی دارند به عنوان مثال، چربی ها مسئول نگه داشتن سلول های هوا در امولسیون روغن در آب هستند و به حجم، نرمی و طعم کمک می کنند. از طرفی مصرف زیاد چربی ایجاد چندین مشکل سلامتی از جمله چاقی، دیابت، سطح کلسترول خون بالا و بیماری های قلبی می کند. بنابراین، تلاش های زیادی برای کاهش محتوای چربی در غذا صورت گرفته است. مصرف کنندگان نیز بوده به طور چشمگیری از اثرات مضر رژیم های غذایی پرچرب آگاه هستند و بنابراین خواهان مصرف

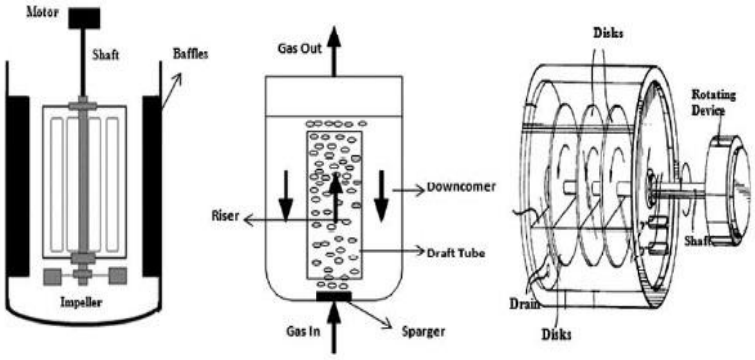
محصولاتی با چربی کم هستند. اما غذاهای کم چرب کمتر مطلوب هستند، زیرا آنها اغلب در مقایسه با غذاهای چرب ویژگی‌های حسی پایین‌تری دارند. از سلولز باکتریایی به عنوان جایگزین چربی در تعدادی از مواد غذایی استفاده شده است. هدف از جایگزینی چربی تقلید عملکرد چربی است در محصولات غذایی مختلف و در عین حال کاهش ارزش کالری محصول و اجتناب از مشکلات سلامتی مرتبط با چربی .در تحقیقات انجام شده جایگزینی چربی توسط سلولز باکتریایی در یک محصول سوریمی منجر به افزایش استحکام ژل و ظرفیت نگهداری آب به دلیل ساختار شبکه پیشرفته آن شد.

بستنی محصولی است که در سطح جهانی مصرف می شود و مورد استقبال قرار می گیرد. از نظر ساختاری بستنی از یک ماتریس پیچیده تشکیل شده است که شامل:گلبول های چربی، کریستال های یخ، حباب های هوا، پروتئین–هیدروکلوئید ساختارها و یک فاز پیوسته (سرم) از آب یخ زده با قندهای محلول، پروتئین و نمک است. چربی ها نقش حیاتی بر ساختار و بافت یخ دارند. قطرات چربی، شبکه ای سه بعدی را تشکیل می دهند که هوا را احاطه میکنند و این مسئله به حفظ شکل محصول کمک میکند. علاوه بر این، چربی ها به حس روان بودن و غنای طعم کمک می کنند. پروتئین ها نیز ساختاری هستند که با عملکردهای مرتبط با امولسیون سازی و جذب به گلبول های چربی و کمک کننده برای تشکیل حباب های هوا و اتصال به آب و افزایش ویسکوزیته، افزایش زمان ذوب و کاهش یخ زدگی در بستنی نقش به سزایی را ایفا می کنند. قندها نیز رشد کریستال یخ را تنظیم می کند و به یک بافت یکنواخت کمک می کند. در صورت افزایش یا نوسانات دما، کریستال های یخ ذوب می شوند و شبکه ای از چربی به هم پیوسته بر روی گلبول ها فرو می ریزند.

عملکردهای بالقوه مختلف سلولز باکتریایی به عنوان یک ماده بستنی ممکن است به عنوان اصلاح کننده ساختار و بافت ذکر شود. (افزایش ویسکوزیته و زمان ذوب، پشتیبانی ساختار فیزیکی، کمک به حفظ شکل)، تثبیت کننده امولسیون و کف و کمک به حفظ شبکه قطرات چربی در اطراف سلول های هوا و جایگزین چربی از نظر ساختار و بافت. از طرفی سلولز باکتریایی توانایی بالاتری در تثبیت امولسیون نسبت به سلولزهای گیاهی را دارد.

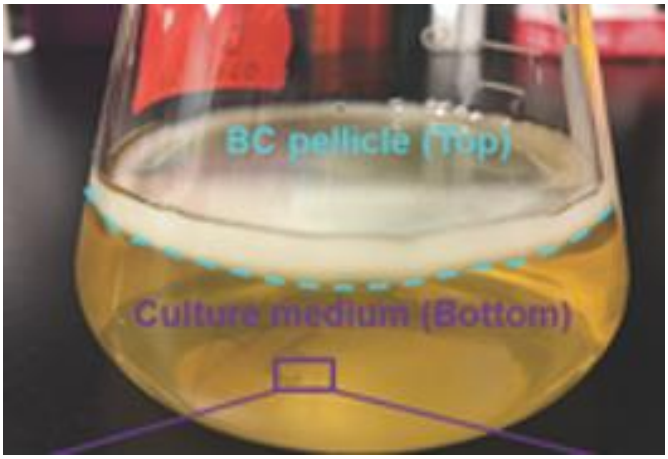
۵- بررسی اثر نوع شرایط بر تولید سلولز باکتریایی

به طور عمده فرایند تولید سلولز باکتریایی تحت دو شرایط استاتیک و دینامیک انجام می شود. اشکال مختلفی از سلولز تحت این شرایط قابل تولید است. فرآیند شکل گیری سلولز تحت شرایط استاتیک به وسیله تأمین هوا از سطح محیط کشت انجام می شود و بازده آن وابسته به غلظت منبع کربن است. به طور کلی یافته ها نشان داده اند که میزان تولید سلولز در شرایط استاتیک بیشتر از شرایط دینامیک می باشد، اما شرایط ساکن نیازمند فضا و نیروی کار بیشتری است، در نتیجه در مقیاس صنعتی مقرون به صرفه نیست. از این رو، برای تولید تجاری سلولز باکتریایی، شرایط دینامیک به طور گسترده مورد استفاده قرار می¬گیرد. نشان داده شده است که الیاف سلولز باکتریایی تحت شرایط ساکن بسیار طولانی تر هستند، در صورتی که سلولز باکتریایی تحت شرایط دینامیک، منحنی شکل بوده و با یکدیگر نیز گره خوردگی¬هایی دارند، سلولز باکتریایی به دست آمده تحت شرایط دینامیک بسیار ساده تر از سلولز باکتریایی به دست آمده تحت شرایط ساکن به قطعات با ابعاد کوچکتر تبدیل و شکسته می شود در شرایط یکسان.

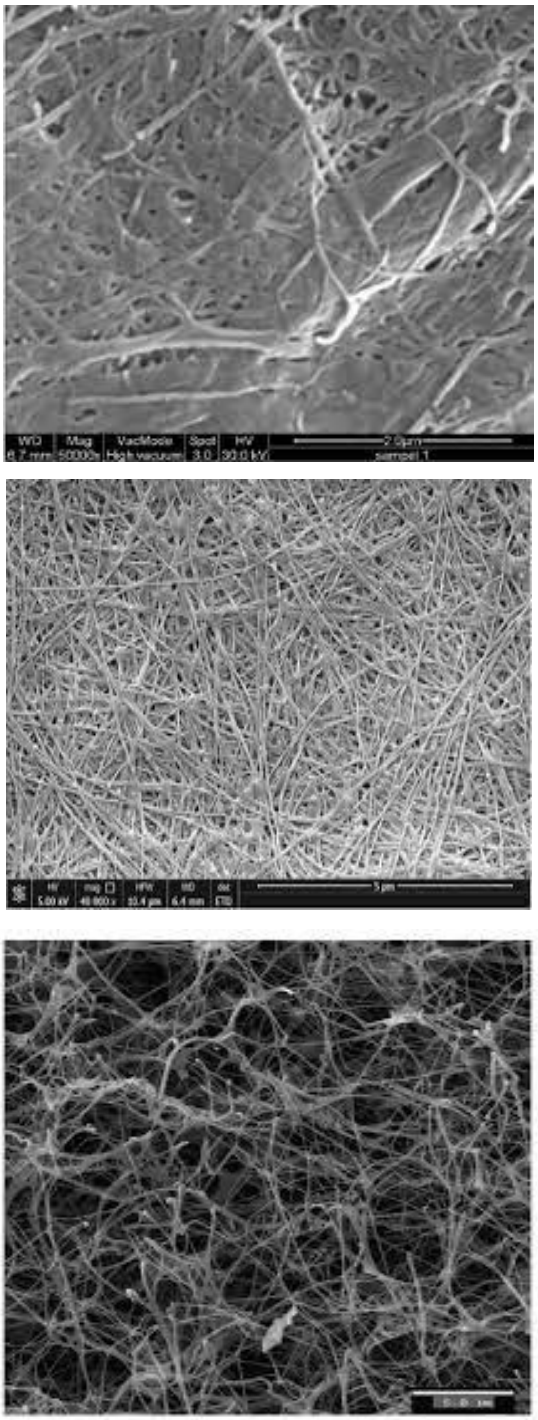


(a) Stirred Tank Bioreactor (b) Airlift Bioreactor (c) Rotary Disk Bioreactor

شکل ۳- انواع مختلف بیوراکتور های استفاده شونده در تولید سلولز باکتریایی



شکل ٤- تولید سلولز باکتریایی در محیط کشت HS در شرایط ساکن



شکل ۵- تصاویر میکروسکپ الکترونی از سلولز باکتریایی