

# تولید نانوسلولز باکتریایی و بررسی انرژی سطح به روش کروماتوگرافی گازی معکوس

فرانک محمد کاظمی\*

گروه مهندسی سامانه های زیستی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوریهای نوین، دانشگاه شهید بهشتی، پردیس علمی-تحقیقاتی زیراب، سوادکوه، مازندران

► f\_mkazemi@sbu.ac.ir

**چکیده:** در این مطالعه نانوسلولز باکتریایی توسط سویه *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 در محیطهای کشت (HS و Z) و با منابع کربن مختلف (گلوکز، شیر، خرما، ساکارز، مانیتول و ساکارز خوراکی) تولید و خصوصیات سطحی آنها با روش کروماتوگرافی گازی معکوس (IGC) ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بطور میانگین وزن خشک سلولز در محیط کشت Z به مقدار ۱۴/۲ درصد بیشتر از HS بود. در حالیکه بازده تولید در محیط HS حدود ۷۶/۸۶ درصد بیشتر از Z بود. تصاویر FE-SEM ساختار شبکه‌های سه بعدی الیاف سلولز باکتریایی با میانگین قطر ۶۰-۲۰ نانومتر را تأیید کرد. طبق نتایج آنالیز IGC، در محیطهای کشت HS و Z بیشترین انرژی آزاد سطح با پروب اتانول به ترتیب با شیر (۷/۴۶ kJ/mol) و مانیتول (۱۱/۱۴ kJ/mol) بدست آمد که نشان‌دهنده بیشتر بودن خاصیت بازی سطح می‌باشد. ثابت‌های اسیدی و بازی بدست آمده نیز این یافته‌ها را تأیید کردند.

**واژگان کلیدی:** نانوسلولز باکتریایی، محیط کشت، منبع کربن، سطح، IGC.

## ۱ مقدمه

سلولز (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>) پلی ساکاریدی خطی و مجموعه‌ای از زنجیرهای گلوکان است و بصورت خاصی آرایش یافته که ساختار بلوری را افزایش می‌دهد. سلولز معمولاً از دیواره سلولی گیاهان استخراج می‌شود. مواد چوبی، پوست درخت و حتی گیاهان دریایی و زغال سنگ نارس منابع مهم سلولز هستند. جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز از دیگر منابع تولید سلولز هستند [۱].

از بین باکتری‌های مختلف سویه‌های زیادی توانایی تولید سلولز را دارند. در هر حال، *Acetobacter xylinum* تنها گونه شناخته شده است که قادر به تولید سلولز در مقیاس تجاری است. خنثی بودن نسبی سلولز باکتریایی باعث استفاده آن به عنوان عامل تقویت‌کننده در کامپوزیت‌ها می‌شود. از اینرو روش‌های تولید سلولز باکتریایی با هدف بهبود بازده، ساختار و خواص فیزیکی توسعه یافته‌اند. سلولز باکتریایی کاملاً خالص است چون ۹۹/۸ درصد آن آب و ۰/۲ درصد آن یک پلی ساکارید

خنثی است. در حالیکه فاقد لیگنین، همی سلولز، پکتین و موم‌ها است. این سلولز درجه کریستالینیته بالا (بالای ۶۰ درصد) با قطر مقطع عرضی ۲-۴ نانومتر، طول چند صد میکرومتر، درجه پلیمریزاسیون ۶۰۰۰-۲۰۰۰، ظرفیت جذب آب بالا، پایداری شیمیایی خوب، مقاومت مکانیکی بالا (مدول یانگ ۲۰۰-۳۰۰ مگاپاسکال)، حفظ مقاومت و شکل عالی دارد [۲ و ۳]. ساختار شیمیایی- فیزیکی سلولز باکتریایی، امکان اصلاح آن را به روش‌های مختلف جهت بهبود خواص مختلف می‌دهد. مطالعات بسیاری در ارتباط با پتانسیل سلولز باکتریایی بعنوان تقویت‌کننده در نانوکامپوزیت‌های مورد استفاده در ساخت وسایل پزشکی، پوشش زخم و ترمیم بافت، داروسازی، صنایع غذایی، مهندسی نساجی، تصفیه، صنعت کاغذ، خوردسازی و فیلم‌های شفاف انجام شده اند [۴-۶].

بطور کلی یکی از جنبه‌های مهم در ساخت مواد و کامپوزیت‌های جدید، انتخاب روشی مناسب جهت شناسایی خواص سطحی آنها است. کروماتوگرافی گازی معکوس روشی مفید و پرکاربرد برای شناسایی خصوصیات سطحی مواد بویژه انرژی

جدول ۱: محیط‌های کشت HS و Z

اجزای محیط کشت	محیط کشت (%، w/v)	
	HS	Z
Carbon source	۲	۴
Corn steep liquor (CSL)	-	۲
Yeast extract	۰/۵	-
Peptone	۰/۵	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	۰/۲۷	-
Citric acid. H <sub>2</sub> O	۰/۱۱۵	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	۰/۴
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	۰/۲
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	۱/۰۴

## روش آزمایش

در این بررسی از باکتری *Gluconacetobacter xylinus* استفاده شد. ابتدا باکتری در محیط Yeast extract agar به مدت سه روز کشت داده شد تا برای تلقیح محیط پیش کشت آماده شود. محیط پیش کشت در دمای °C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو قرار داده شد. سپس باکتری رشد یافته روی محیط کشت پایه تلقیح شد.

محیط‌های کشت اصلی شامل Hestrin-Schramm(HS) و Zhou (Z) بعنوان محیط کشت باکتری و منابع کربن مختلف از جمله گلوکز، ساکارز، ساکارز خوراکی، مانیتول و شیر خرمای انتخاب شدند. در همه محیط‌ها از اتانول ۱٪ استفاده شد. باکتری‌ها در محیط‌های کشت با محیط پیش کشت تلقیح شدند و به مدت هفت روز در انکوباتور کشت داده شد. این دو محیط کشت غنی از ترکیبات کربن و نیتروژن برای رشد و فعالیت باکتری‌ها هستند. دمای شرایط کشت باکتری‌ها °C ۲۸ بود [۱۸]. پایان دوره کشت سلولز استخراج و با محلول سود ۱٪ در °C ۸۰ و سپس با آب مقطر شستشو داده شد تا به pH خنثی برسد. وزن خشک نسبت به حجم محیط کشت و بصورت g/L اندازه‌گیری شد. بازده (%) نیز از رابطه زیر محاسبه شد:

$$(۱) \quad ۱۰۰ \times (\text{کربن منبع وزن}) / (\text{سلولز خشک وزن}) = \text{بازده } (\%)$$

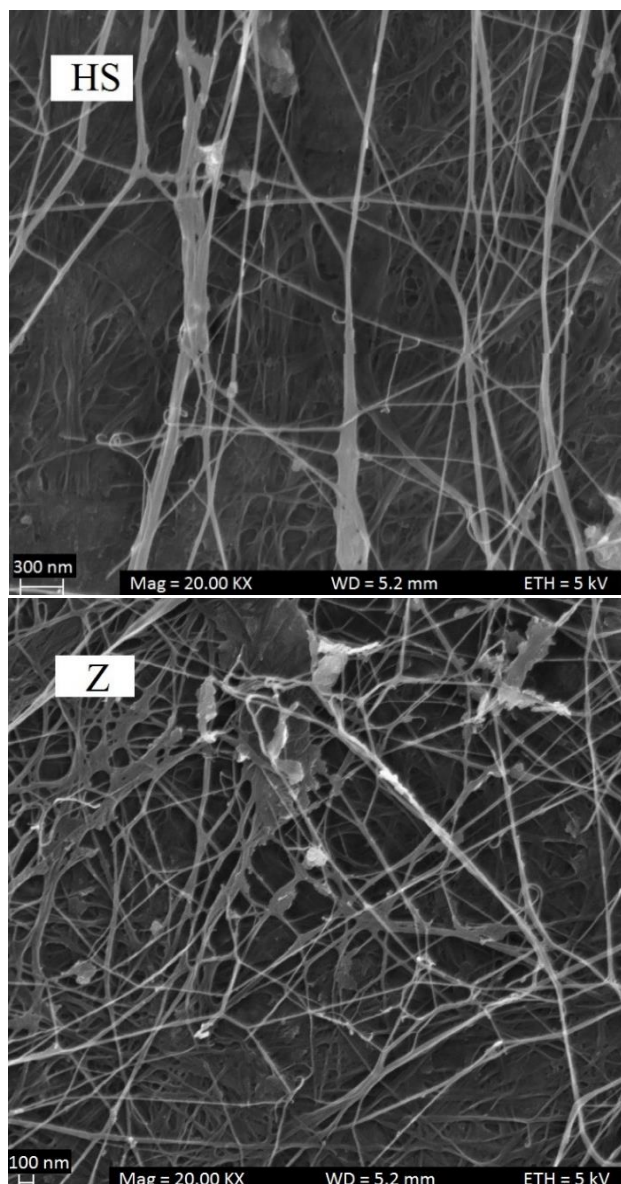
سطح است. زیرا اطلاعات مفیدی در مورد خواص فیزیکی-شیمیایی در طیف وسیعی از دما و رطوبت بدست می‌دهد. از این روش برای بررسی خصوصیات مواد زیستی و سنتزی، جاذبها [۷]، الیاف [۸]، مواد غذایی [۹]، نانوکامپوزیت‌ها [۱۰] و [۱۱] و کامپوزیت سیمانی [۱۲] استفاده شده است.

در کنار روش‌های مختلف تولید، pH و منبع نیتروژن و فسفات، مواد غذایی اصلی برای این سوبه متغیر است. یکی از روش‌های افزایش تولید این پلیمر طبیعی، استفاده از افزودنی‌ها و ترکیبات مختلف در محیط کشت باکتری می‌باشد که بر خواص کاربردی آن نیز اثرگذار است. بکارگیری روش‌هایی جهت افزایش تولید و اصلاح ساختار سلولز باکتریایی جهت کاربردهای مختلف مورد توجه بسیاری از محققین بوده است [۱۳-۱۶]. محققین به بررسی خواص سلولز باکتریایی تولید شده در محیط کشت حاوی ساکارز و شیر خرمای پرداختند. نتایج نشان داد که سلولز باکتریایی تولید شده در محیط کشت حاوی منبع کربن شیر خرمای میزان تولید بازده بیشتری داشت [۱۷]. از این رو تعیین شرایط رشد مناسب باکتری برای تولید مقدار زیاد سلولز با کمترین هزینه ضروری است. از طرفی بررسی اثرات محیط‌های کشت مختلف بر ساختار و ویژگی‌های سطحی سلولز بسیار حائز اهمیت می‌باشد. لذا، هدف از پژوهش حاضر در مرحله اول بررسی مقایسه‌ای اثر محیط‌های کشت با منابع کربن مختلف از جمله شیر خرمای بر میزان تولید نیز تعیین محیط کشت بهینه و پربازده است. سپس اثر محیط‌های کشت مختلف بر انرژی سطح سلولز باکتریایی به روش IGC بعنوان روشی کارآمد بررسی شده است.

## ۲ بخش تجربی

### مواد و تجهیزات

محیط‌های کشت اصلی شامل Hestrin-Schramm(HS) و Zhou (Z) بعنوان محیط کشت باکتری انتخاب شدند (جدول ۱) که همگی از شرکت Merck آلمان تهیه شدند. پروبهای قطبی و n-alkanes برای اندازه‌گیری‌های IGC همگی با خلوص بیش از ۹۹٪ از سیگما-آلدریج تهیه شدند. گاز متان و هلیوم نیز از شرکت Air liquide خریداری شد. ساکارز خوراکی از کارخانه قند کرج و شیر خرمای از ضایعات تهیه شدند.



شکل ۱: تصویر FE-SEM نانوسولوز باکتریایی تولید شده در محیط کشت HS و Z

شکل ۲ طیف‌های XRD مربوط به نانوسولوز تولید شده در محیط کشت HS و Z را نشان می‌دهد. سلولز باکتریایی در شدت‌های  $2\theta = 17^\circ, 22/8^\circ, 14/7^\circ$  دارای پیک‌های اصلی می‌باشد که به ترتیب مربوط به صفحات ۱۰۱، ۱۱۰ و ۰۰۲ می‌باشند. پیک‌های ناحیه  $29^\circ, 36^\circ, 39^\circ$  و  $43^\circ$  نیز مربوط به وجود ناخالصی و ترکیبات محیط کشت باقیمانده در نمونه‌ها می‌باشد. محاسبه بلورینگی نشان داد که نانوسولوز تولید شده در محیط کشت HS بلورینگی بیشتری (حدود ۷۶٪) نسبت به نانوسولوز حاصل از محیط کشت Z (حدود ۶۲٪) داشته است.

اندازه‌گیری‌های IGC با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی معکوس تجاری مجهز به آشکارسازهای یونش شعله‌ای و هدایت حرارتی انجام شد. داده‌های بدست آمده با استفاده از استاندارد V1.3 و نرم افزار تحلیل پیشرفته V1.21 تجزیه و تحلیل شدند.

خصوصیات سطح نانوسولوزهای تولید شده توسط دستگاه IGC بررسی شد. برای اندازه‌گیری برهمکنش مؤلفه‌های پراکنش انرژی آزاد سطح از هپتان، اوکتان، نونان و دکان و برای اندازه‌گیری مؤلفه‌های ویژه انرژی آزاد سطح و شاخصهای سطح اسید-باز از پروبهای استونیتریل، اتیل استات، اتانول و تتراهیدروفوران در  $298^\circ\text{K}$  استفاده شدند. همه آزمایشات در رطوبت نسبی ۰٪ با جریان گاز هلیوم با سرعت  $10\text{ ml/min}$  انجام گرفت.

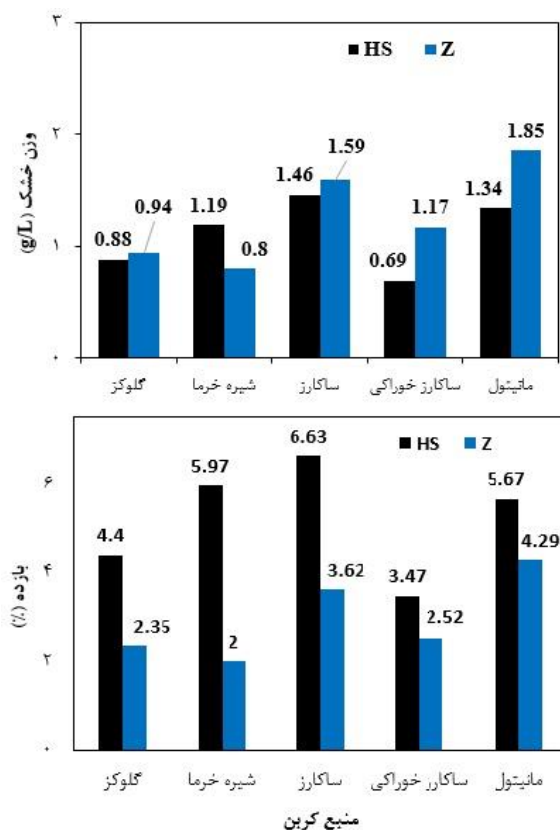
بررسی خصوصیات مورفولوژیکی سطح و اندازه‌گیری قطر نانوالیاف با آنالیز FE-SEM و با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM, Hitachi SU 8090) انجام شد. لازم به ذکر است نمونه‌ها قبل از انجام آنالیز کاملاً خشک و با طلا پوشش‌دهی شدند.

بلورینگی با دستگاه XRD (X-ray diffraction) مدل PW3040/60 محاسبه شد. شرایط آزمایش شامل ولتاژ  $40\text{KV}$ ، دمای  $25^\circ\text{C}$ ، وضوح  $0.01^\circ$ ، جریان  $40\text{mA}$  و محدوده مورد بررسی  $2\theta = 5-50^\circ$  بود.

برای انجام آنالیز آماری از نرم افزار SPSS و آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش تجزیه واریانس استفاده شد و گروه‌بندی میانگین‌ها براساس آزمون چند دامنه دانکن (DMRT) صورت گرفت.

### ۳ نتایج و بحث

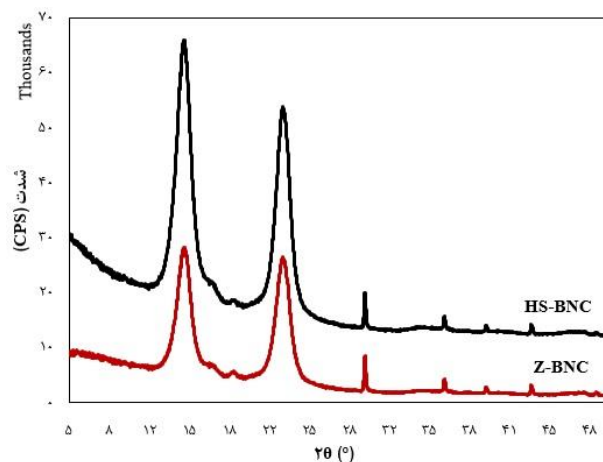
شکل ۱ ساختار میکروسکوپی نانوسولوز باکتریایی تولید شده را نشان می‌دهد. همه نمونه‌ها از ساختار شبکه‌های سه بعدی نانوالیاف با قطر  $20-60$  نانومتر تشکیل شده‌اند که بطور تصادفی آرایش یافته‌اند. نوارهای متراکم نانوسولوز با ساختار فشرده و درهم بافته نشان‌دهنده چسبندگی قوی سطح مشترک بین الیاف سلولز است.



شکل ۳: وزن خشک و بازده تولید نانوسولوز باکتریایی

جداول ۲ و ۳ به ترتیب انرژی ویژه آزاد سطح و نیز مؤلفه‌های پراکنش انرژی سطح و ثابت‌های اسید و باز حاصل از آنالیز IGC را نشان می‌دهند. نتایج نشان داد که همه نمونه‌های نانوسولوز برهمکنش خوبی با استونیتریل دارند که نشان‌دهنده وجود گروه‌های اسیدی و بازی در سطح است. در حقیقت افزایش انرژی آزاد ویژه سطح تعامل بهتر گروه‌های قطبی سطح با پروب‌های قطبی را نشان می‌دهد. در مورد محیط کشت HS بیشترین انرژی با پروب اتانول با منبع کربن شیره خرما بدست آمد (۷/۴۶ kJ/mol) که می‌تواند نشان‌دهنده بیشتر بودن خاصیت بازی سطح است. از نظر شیمیایی، شیره خرما علاوه بر مواد معدنی، غنی از گلوکز و فروکتوز است که می‌توانند بعنوان مونومرها و کوفاکتورها در مسیر متابولیک عمل کنند [۲۱]. در محیط کشت Z، بیشترین انرژی مربوط به سلولز تولید شده در محیط کشت حاوی مانیتول بود (۱۱/۱۴ kJ/mol). بیشترین انرژی آزاد سطح در محیط‌های HS و Z در تعامل با تتراهیدروفوران به ترتیب مربوط به شیره خرما و مانیتول بوده است.

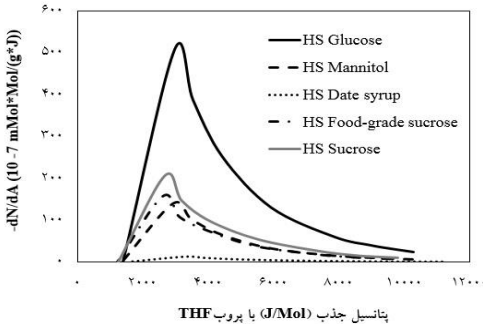
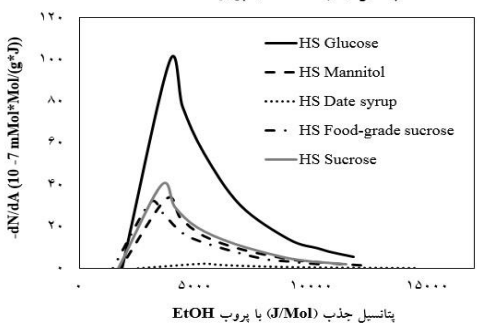
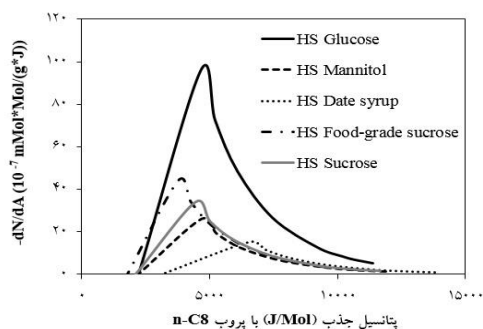
بطور کلی در مقایسه با سلولز گیاهی خالص بوده و بلورینگی بالاتری دارد که برای کاربردهای مختلف قابل استفاده خواهد بود.



شکل ۴: طیف XRD نانوسولوز باکتریایی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن خشک و بازده تولید نانوسولوز باکتریایی با منابع کربن مختلف در شکل ۳ آمده است. نتایج نشان داد که بازده نانوسولوز باکتریایی تولید شده در محیط HS و در حضور ساکارز، مانیتول و شیره خرما بیشترین مقدار را داشت درحالی‌که در محیط Z با شیره خرما کمترین بازده مشاهده شد که دلیل آن را می‌تواند بر هم خوردن تعادل بین ترکیبات قندی و نیتروژن در این محیط و تغییرات pH دانست. بطور میانگین مقدار وزن خشک سلولز در محیط کشت Z بیشتر از HS بود. در حالی‌که بازده تولید در محیط HS نزدیک به دو برابر Z بود. براساس جدول ۱ مقدار منبع کربن در محیط کشت HS نصف Z می‌باشد و این درحالی است که بازده آن بیشتر است. تولید نانوسولوز تحت تاثیر مقدار و نوع محیط کشت و اجزای آن است. بطور کلی، سویه باکتری، منبع کربوهیدرات، اسیدپته، دما و روش‌های کشت از پارامترهای مهم در تولید نانوسولوز باکتریایی هستند [۱۹]. کمترین مقدار تولید سلولز در محیط کشت HS-G بوده است (۰/۸۸ g/L). کاهش pH باعث تشکیل گلوکونیک اسید که یک محصول فرعی در محیط‌های حاوی گلوکز است، می‌گردد که تولید سلولز باکتریایی کاهش می‌دهد [۲۰].

در محیط‌های HS و Z با منابع کربن مختلف نشان می‌دهند. پیک‌ها و پروفیل انرژی پراکنده سطح در این شکل آمده است. براساس پیک حداکثر جذب (Amax) با پروب n-C8، EtOH و THF در محیط HS، نانوسلولز تولید شده با منبع کربن شیره خرما تعداد مکان‌های فعال کمتر ( $-dN/dA$ ) و انرژی جذب بیشتری داشت. در محیط کشت Z، نانوسلولز تولید شده در محیط کشت حاوی مانیتول انرژی جذب بیشتر و تعداد مکان‌های فعال کمتری داشت. در محیط کشت HS کمترین انرژی جذب مربوط به نانوسلولز تولید شده در محیط حاوی ساکارز خوراکی بود که در پروب‌های n-C8، EtOH و THF به ترتیب به مقدار  $3/78$ ،  $3/04$  و  $2/59$  kJ/Mol می‌باشد. در محیط کشت Z نیز انرژی جذب در نانوسلولز بدست‌آمده از محیط حاوی ساکارز و ساکارز خوراکی تقریباً برابر بود.



شکل ۴: پتانسیل جذب با پروب‌های n-C8، EtOH و THF در محیط HS با منابع کربن مختلف

جدول ۲: انرژی آزاد ویژه سطح

محیط کشت	تتراهیدروفوران	اتانول	اتیل استات	استونیتریل	$(\text{kJ/mol}) \Delta G_S^{SP}$
HS-DS	۸/۷۸	۷/۴۶	۷/۹۳	۱۰/۷۱	
HS-FGS	۶/۷۰	۴/۵۲	۵/۹۹	۷/۶۰	
HS-G	۸/۲۵	۵/۸۲	۷/۳۲	۹/۳۲	
HS-M	۸/۷۳	۶/۸۹	۸/۱۰	۱۰/۱۶	
HS-S	۸/۱۷	۶	۷/۲۶	۹/۷۷	
Z-DS	۸/۷۹	۸/۳۴	۸/۰۶	۱۰/۷۳	
Z-FGS	۸/۵۲	۷/۳۶	۷/۸۱	۱۰/۳۶	
Z-G	۷/۸۷	۶/۸۱	۷/۰۴	۹/۳۷	
Z-M	۹/۹۶	۱۱/۱۴	۹/۴۹	۱۳/۱۴	
Z-S	۸/۲۳	۷/۲۰	۷/۴۹	۱۰/۱۶	

در محیط‌های HS و Z، سلولز باکتریایی تولید شده در حضور منبع کربن شیره خرما (HS-DS) و مانیتول (Z-M) پراکنش انرژی سطح بیشتری مشاهده شد (جدول ۳). ثابت‌های اسیدی و بازی بدست‌آمده نیز نشان داد که سطح سلولزهای تولید شده با منابع کربن HS-DS ( $K_a/K_b=0/9$ ) و Z-M ( $K_a/K_b=0/57$ ) خاصیت بازی بیشتری دارند [۲۲].

جدول ۳: مؤلفه‌های پراکنش انرژی آزاد سطح و ثابت‌های اسید-باز

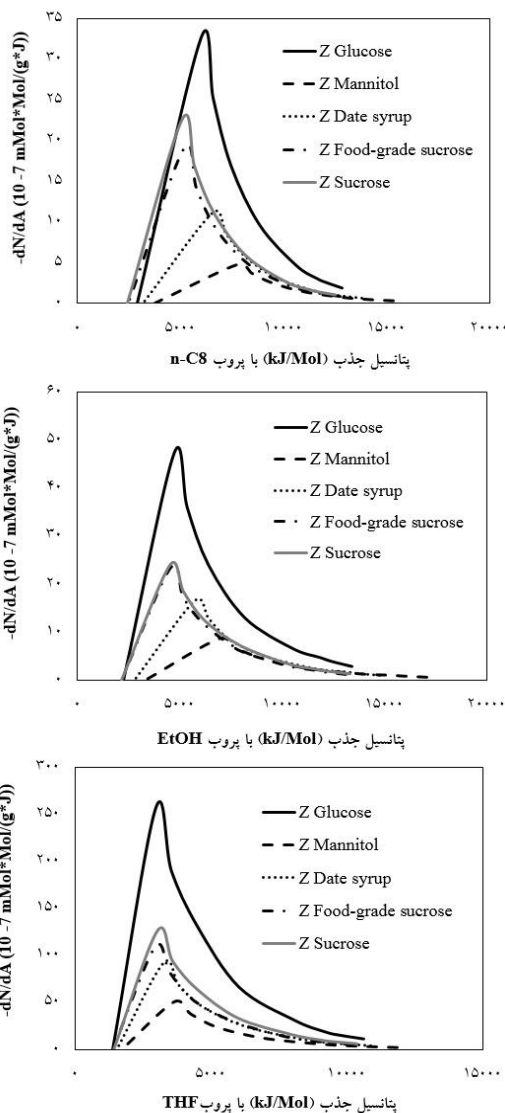
محیط کشت	$\gamma_s^d$ (mJ.m <sup>-2</sup> )	$K_a$	$K_b$	$K_a/K_b$
HS-DS	۴۶/۹۲	۰/۱	۰/۱۱	۰/۹
HS-FGS	۳۵/۱۳	۰/۰۹	۰/۰۷	۱/۲۸
HS-G	۴۰/۶۶	۰/۱	۰/۰۷	۱/۴۲
HS-M	۴۵/۳۱	۰/۱	۰/۱	۱
HS-S	۳۹/۲۹	۰/۱	۰/۰۸	۱/۲۵
Z-DS	۵۰/۸۱	۰/۱	۰/۱۲	۰/۸۳
Z-FGS	۴۶/۹۵	۰/۱	۰/۱۱	۰/۹
Z-G	۴۱/۵۵	۰/۰۹	۰/۰۹	۱
Z-M	۶۲/۷۲	۰/۱۱	۰/۱۹	۰/۵۷
Z-S	۴۳/۹۵	۰/۱	۰/۱۱	۰/۹

ناهمگنی نمایه انرژی پراکنده سطح بوسیله مدل BET با تزریق پروب‌های مختلف تعیین شد. نتایج نشان داد که هر چه انرژی پراکنده سطح بیشتر باشد، ناهمگنی سطح بیشتر خواهد بود که افزایش مساحت سطح را بدنبال خواهد داشت. ایزوترم خطی جذب توسط قانون هنری بیان شده است [۲۳]. شکل‌های ۴ و ۵ پتانسیل جذب با پروب‌های n-C8، EtOH و THF را به ترتیب

در محیط کشت Z بیشتر از HS بود. در حالیکه بازده تولید در محیط HS نزدیک به دو برابر Z بود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی FE-SEM ساختار شبکه‌های سه بعدی الیاف سلولز باکتریایی و نانوساختار بودن آن را تأیید کرد. پهنای الیاف سلولز باکتریایی ۶۰-۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در مورد سلولز تولید شده در محیط کشت HS بیشترین انرژی با پروب اتانول با منبع کربن شیره خرما بدست آمد که نشان‌دهنده بیشتر بودن خاصیت بازی سطح است. در محیط کشت Z، بیشترین انرژی مربوط به سلولز حاصل از محیط کشت حاوی مانیتول بود. ثابت‌های اسیدی و بازی بدست‌آمده نیز نشان داد که سطح سلولزهای تولید شده در محیط کشت HS-DS و Z-M خاصیت بازی بیشتری دارند. بررسی پروفیل انرژی سطح با پروب‌های مختلف نشان داد میزان انرژی جذب سلولز باکتریایی تولیدشده در محیط کشت HS با منبع کربن شیره خرما بیشتر و تعداد مکان‌های فعال کمتر بود. در محیط کشت Z بیشترین انرژی جذب با منبع کربن مانیتول حاصل شد. بطور کلی پژوهش حاضر امکان تولید نانوسلولز باکتریایی با پهنای الیاف زیر ۶۰ نانومتر را می‌دهد. نتایج حاصل نشان داد با تغییر منبع کربن و محیط کشت می‌توان بازده تولید و ساختار نانوسلولز و خصوصیات سطحی آن را تغییر داد. براساس پژوهش حاصل، خصوصیات سطحی نانوسلولز از فاکتورهای اساسی در بکارگیری آن در کاربردهای مختلف از جمله پزشکی، داروسازی، خالص‌سازی و تصفیه پساب، صنایع غذایی و ... می‌باشد که با توجه به نانوساختار بودن آن خواص فراورده را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد. همچنین با توجه به اینکه ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان خرما در دنیا محسوب می‌شود، امکان استفاده از شیره حاصل از خرما با کیفیت پایین که قابلیت مصرف ندارند، بعنوان منبع کربن جایگزین با سایر منابع کربن گران‌قیمت در تولید سلولز باکتریایی با خواص مطلوب وجود دارد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۶۰۰/د/۲۱۰۷ و با حمایت معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی می‌باشد که بدینوسیله از آن حوزه قدردانی می‌گردد.



شکل ۵: پتانسیل جذب با پروبهای n-C8، EtOH و THF در محیط Z با منابع کربن مختلف

### ۴ نتیجه گیری

در این پژوهش تولید نانوسلولز باکتریایی توسط سویه بومی *Gluconacetobacter xylinus* PTCC 1734 در محیط‌های کشت و منابع کربن مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بازده نانوسلولز باکتریایی تولیدشده در محیط HS و در حضور ساکارز، مانیتول و شیره خرما بیشترین مقدار را داشت در حالیکه در محیط Z با شیره خرما کمترین بازده مشاهده شد که دلیل آن را می‌تواند بر هم خوردن تعادل بین ترکیبات قندی و نیتروژن در این محیط و تغییرات pH دانست. بطور میانگین مقدار وزن خشک سلولز

## مراجع

- [1] G. Franz, W. Blaschek, *Cellulose in Methods in Plant Biochemistry: Carbohydrates*. 1990.
- [2] D. Klemm, D. Schumann, F. Kramer, N. Hessler, M. Hornung, H. Schmauder, S. Marsch, "Nanocelluloses as innovative polymers in research and application," *Advances in polymer science*, 205, 49-96, 2006.
- [3] P. Chen, S. Cho, H. Jin, "Modification and applications of bacterial celluloses in polymer science," *Macromolecular research*, 18, 309-320, 2010.
- [4] S. Kirdponpattara, A. Khamkeaw, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, M. Phisalaphong, "Structural modification and characterization of bacterial cellulose-alginate composite scaffolds for tissue engineering," *Carbohydrate polymer*, 132, 146-155, 2015.
- [5] W. Shao, S. Wang, H. Liu, J. Wu, R. Zhang, H. Min, M. Huang, "Preparation of bacterial cellulose/graphene nanosheets composite films with enhanced mechanical performances," *Carbohydrate polymer*, 138, 166-171, 2016.
- [6] S. Bielecki, A. Krystinowicz, M. Turkiewicz, H. Kalinowska, *Polysaccharides and polyamide in the food industry: Properties, production and patents*. 2005.
- [7] M. Elizalde-González, R. Ruíz-Palma, "Gas chromatographic characterization of the adsorption properties of the natural adsorbent CACMM2," *Chromatography A*, 845, 373-379, 1999.
- [8] N. Cordeiro, A. Ashori, Y. Hamzeh, M. Faria, "Effects of hot water pre-extraction on surface properties of bagasse soda pulp," *Materials science and engineering:c*, 33, 613-617, 2013.
- [9] A. Boutboul, F. Lenfant, P. Giampaoli, A. Feigenbaum, V. Ducret, "Use of inverse gas chromatography to determine thermodynamic parameters of aroma-starch interactions," *Chromatography A*, 969, 9-16, 2002.
- [10] K. Boukerma, J. Piquemal, M. Chehimi, M. Mravcakova, M. Omastova, P. Beaunier, "Synthesis and interfacial properties of montmorillonite/polypyrrole nanocomposites," *Polymer science*, 47, 569-576, 2005.
- [11] F. Mohammadkazemi, M. Faria, N. Cordeiro, "In situ biosynthesis of bacterial nanocellulose-CaCO<sub>3</sub> hybrid composite: one-step process," *Material science and engineering c*, 65, 393-399, 2016.
- [12] I. Neves, M. Chabut, C. Perruchot, M. Chehimi, K. Benzarti, "Interfacial interactions of structural adhesive components with cement pastes studies by inverse gas chromatography (IGC)," *Applied surface science*, 238, 523-529, 2004.
- [13] S. Lin, C. Liu, K. Hsu, Y. Hung, T. Shih, K. Cheng, "Production of bacterial cellulose with various additives in a PCS rotating disk bioreactor and its material property analysis," 23, 367-377, 2016.
- [14] R. Yudianti, A. Syampurwadi, H. Onggo, M. Karina, H. Uyama, J. Azuma, "Properties of bacterial cellulose transparent film regenerated from dimethylacetamide-LiCl solution," *Polymers advanced technologies*, 27, 1102-1107, 2016.
- [15] F. Mohammadkazemi, K. Doosthoseini, E. Ganjian, M. Azin, "Manufacturing of bacterial nano-cellulose reinforced fiber-cement composites," *Construction and building materials*, 101, 958-964, 2015.
- [16] H. Chen, L. Chen, H. Huang, S. Lin, "In situ modification of bacterial cellulose nanostructure by adding CMC during the growth of *Gluconacetobacter xylinus*," *Cellulose*, 18(6), 1573-1583, 2011.
- [17] M. Moosavi-Nasab, A. Yousefi, "Investigation of physicochemical properties of the bacterial cellulose produced by *gluconacetobacter xylinus* from date syrup," *World academy of science, engineering and technology. biological, biomolecular, agricultural, food and biotechnological and engineering*, 4, 613-618, 2010.
- [18] D. Ruka, G. Simon, K. Dean, "Altering the growth conditions of *gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose," *Carbohydrate polymers*, 89, 613-622, 2012.
- [19] S. Gea, "Innovative bio-nano composites based on bacterial cellulose," Ph.D. dissertation,

engineering materials sciense department Queen Mary university of London. 2010.

[20] R. Chawla, B. Bajaj Ishwar, A. Survase Shrikant, S. RekhaSinghal, "Microbial cellulose: fermentative production and applications," Food technology and biotechnology, 47, 107-124, 2009.

[21] B. Mohite, S. Patil, "A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications," Biotechnology and applied biochemistry, 61, 101-110, 2014.

[22] C. Castro, N. Cordeiro, M. Faria, R. Zuluaga, J. Putaux, E. Filpponen, L. Velez, O. Rojas, P. Ganán, "In-situ glyoxalization during biosynthesis of bacterial cellulose," Carbohydrate polymers, 126, 32-39, 2015.

[23] N. Cordeiro, C. Gouveia, A. Moraes, S. Amico, "Natural fibers characterization by inverse gas chromatography," Carbohydrate polymers, 84, 110-117, 2011.