بسم الله الرحمن الرحيم

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخه نهائی پایان نامه آقای حسن یوسفی معصوم آباد دانشجوی رشته محیط زیست ،تحت عنوان: اثر مالتوز موجود در پساب کارخانه تولید ماءالشعیر به عنوان منبع کربنی بر روی تولید بیو پلیمر پلی هیدروکسی آلکانوات توسط باکتری *Cupriavidus necator* ،را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی‌ارشد پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
۱- استاد راهنما	دکترحبیب ا...یونسی	دانشیار	
۲- استاد مشاور	دکترنادر بهرامی فر	استادیار	
۳- استاد ناظر	دکتر عباس اسماعیلی ساری	استاد	
٤- استاد ناظر	دکتر علی اصغر قریشی	دانشیار	
٥-نماینده‌شورای‌تحصیلات‌تکمیلی	دکتر علیرضا ریاحی بختیاری	استادیار	

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه:

با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان‌ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهش‌گران، لازم است اعضای هیئت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهش‌های علمی که تحت عناوین پایان-نامه، رساله و طرح‌های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی معنوی پایان‌نامه ها/ رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هر گونه بهره-برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستوالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شوند نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی پیگیری خواهد شد.

بسمه تعالی

آیین‌نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه(رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: درصورت اقدام به چاپ پایان‌نامه(رساله)ی خود، مراتب را قبلا" به طور کتبی به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اطلاع دهید.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کنید:

« کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **محیط زیست** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر **حبیب ا... یونسی** و مشاوره جناب آقای **دکتر نادر بهرامی‌فر** از آن دفاع شده است. »

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به « دفتر نشر آثار علمی » دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

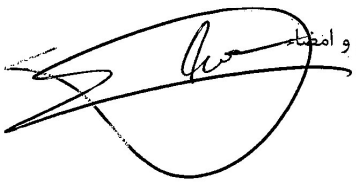
ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب **حسن یوسفی معصوم اباد** دانشجوی رشته **محیط زیست** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی: حسن یوسفی معصوم اباد

تاریخ و امضاء



دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده منابع طبیعی

گروه محیط زیست

اثر مالتوز موجود در پساب کارخانه تولید ماءالشعیر به عنوان منبع کربنی بر روی تولید بیوپلیمر پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات توسط باکتری *Cupriavidus necator*

نگارنده:

حسن یوسفی معصوم آباد

استادراهنما:

دکتر حبیب ا... یونسی

استادمشاور:

دکتر نادر بهرامی فر

دی ماه ۱۳۹۱

با کمال عشق، ادب و احترام

تقدیم به

ساحت پدر و مادر عزیز و بزرگوارم که لحظه لحظه آب شدن وجودشان را برای سرافرازی این حقیر نظاره گر بودم. آن هایی که عاشقانه سوختند تا گرما بخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند

و به روح برادر عزیزم که بخشی از قلب من را با خود به دیار باقی سپرد

و او.....

تقدیر و تشکر

با تقدیر و درود فراوان خدمت پدر و مادر بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آنها بوده ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی ها و مشکلات بوده است.

با تشکر و سپاس از استاد راهنمای گرامی و ارجمند، جناب آقای دکتر **حبیب الله یونسی** که از راهنمایی های ایشان در طول اجرای پایان نامه بهره مند گشتم

و همچنین از استاد مشاور عزیز و گرانقدرم جناب آقای دکتر **نادر بهرامی فر** که دوستانه و با سعه صدر مرا در تمامی مراحل پایان نامه همراهی کردند.

از استاد محترم ناظر آقای **سید علی قریشی** که زحمت نظارت پایان نامه را پذیرفته و با صبر و تامل فراوان نکات ارزنده را جهت ارتقای هرچه بیشتر کیفیت پایان نامه گوشزد فرمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم

-با امتنان بیکران از پدر بزرگوار گروه محیط زیست جناب آقای دکتر **عباس اسماعیلی ساری** مدیر محترم گروه محیط زیست که زحمت نظارت بر پایان نامه را تقبل نموده و علاوه بر مساعدت های لازم همچون پدری دلسوز مرا راهنمایی کرده و درس زندگی آموختند.

کمال تقدیر و تشکر از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر **علیرضا ریاحی بختیاری** که زحمت مدیریت جلسه دفاع از پایان نامه را تقبل نمودند.

از کارشناس محترم آزمایشگاه سرکار خانم حقدوست، دکتر یلیحه امینی و نیز همکلاسی های گرامی ام به ویژه خانم ها سمیرا سبحانی مهرنوش محمدی و معصومه جاوید به خاطر تمامی زحمات و سختی هایی که از اینجانب متحمل شدند تشکر و پوزش فراوان دارم

با سپاس بی دریغ خدمت دوستان گرانمایه ام آقایان عبدالرضا مشروفه، مهدی آلبوقنیله، محسن بهرامی، ایمان شیردل، محمد زمانی جمشیدی، عبدالخالد خالقی، حامد کویلی که مراصمیمانه و مشفقانه یاری داده اند و تمامی دوستانی که ذکر نامشان در این مجال نمی گنجد.

تقدیر و تشکر ویژه از دوست و برادر عزیزم **محمدرضا انتصاریان** که طی این ۵ / ۲ سال همراهم بود و آموخت مرا آنچه نمی دانستم.

و با تشکر خالصانه خدمت همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند

چکیده

در سال‌های اخیر به منظور تولید انبوه وتجاری پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها از یک طرف و کاهش آلودگی‌های ناشی از فاضلاب توسعه فناوری به سمت استفاده از منابع کربنی ارزان قیمت، از قبیل پسماندهای کشاورزی و پساب‌های مختلف معطوف گشته است و مورد توجه تحقیقات فراوانی در این زمینه گردیده است. در تحقیق حاضر تولید پلی-۳-هیدروکسی‌بوتیرات از پساب کارخانجات ماءالشعیر با استفاده از باکتری *Cupriavidus necator* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور آزمایشات در ۳ مرحله‌ی بررسی اثر غلظت‌های مختلف منبع کربنی، C/N و C/P بر روی تولید بیوپلیمر با استفاده از مالتوز صنعتی انجام گردید. فرآیند تخمیر در واکنشگاه غیرپیوسته صورت پذیرفت. جهت کنترل رشد سلول در طول دوره رشد و همچنین بررسی تغییرات میزان قند، NH_4^+-N و PO_4^{3-}-P موجود در محیط کشت، نمونه‌برداری بصورت ۲۴ ساعته تا پایان دوره رشد انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل شیمیایی به وسیله کروماتوگرافی گازی نشان داد که پلیمر تولیدی پلی-۳-هیدروکسی‌بوتیرات، می‌باشد. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که بیشترین پلیمر تولید شده برابر ۱/۹۸ گرم بر لیتر و بازده بیومس برابر ۰/۴۵ گرم بیومس بر گرم قند مصرفی در ۱۵: C/N/P=۱۰۰:۲ و غلظت ۴۰ گرم بر لیتر بوده است. هم‌چنین محاسبات نشان داد که بیشترین بازده بیوپلیمر و بهره‌دهی حجمی نیز مربوط به ۱۵: C/N/P=۱۰۰:۲ و غلظت ۴۰ گرم بر لیتر به ترتیب ۰/۲۸ گرم بر گرم قند مصرفی و ۰/۰۲۲ گرم بیوپلیمر بر لیتر بر ساعت بوده است. بنابراین نسبت C/N/P = ۱۰۰:۲:۱۵ با غلظت ۴۰ گرم بر لیتر به عنوان بهینه انتخاب و بر روی پساب خام تعمیم داده شد. مقادیر بیومس و بیوپلیمر آزمایش پساب به ترتیب ۷/۹ و ۳ گرم بر لیتر بدست آمد. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات می توان اذعان داشت که پساب تانک تخمیر کارخانجات تولید ماءالشعیر قابلیت تولید بیوپلیمر را به وسیله باکتری مذکور دارا می‌باشد هرچند نیازمند مطالعات و تحقیقات آزمایشگاهی بیشتر بر روی تولید بیوپلیمر از این پساب می‌باشد.

کلمات کلیدی: پلی-۳-هیدروکسی‌بوتیرات، مالتوز، نسبت C/N/P، پساب ماءالشعیر، *Cupriavidus necator*

فهرست مطالب

۱-۱ مقدمه ۱

۱-۲ پلیمرهای زیستی ۲

۱-۳ پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها ۳

۱-۳-۱ تعریف پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها ۳

۱-۳-۲ خواص پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها ۴

۱-۴ میکروارگانیسم‌های تولیدکننده **PHAS** ۵

۱-۵ منابع کربنی ۶

۱-۵-۱ منبع کربن (مالتوز) ۷

۱- ۴بیان مسئله ۸

۱-۵ اهداف ۹

۱- ۶ سؤالات تحقیق ۱۰

۱- ۷فرضیه‌ها/ پیش فرضها ۱۰

۲-۱ تاریخچه ۱۱

۲-۲ انواع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات ۱۲

۲-۶ مطالعات مربوط به تولید پلی‌هیدرروکسی‌آلکانوات ۱۳

۲-۶-۱ انواع منابع کربنی ۱۴

۲-۶-۲محیط کشت مخلوط (انواع فاضلاب‌ها و محصولات جانبی) ۱۵

۲-۶-۳ محصولات جانبی ۱۵

۲-۶-۴پسماند و پساب: ۱۷

۳-۱ میکروارگانیسم ۲۰

۳-۲محیط نگهداری ۲۱
۳-۳محیط کشت تلقیح ۲۲
۳-۴محیط کشت تخمیر ۲۳
۳-۵ تعیین شاخص‌های منبع کربنی ۲۳
۳-۶ شرایط تخمیر و نمونه‌برداری ۲۴
۳-۷ تهیه منحنی کالیبراسیون وزن خشک سلولی-جذب ۲۵
۳-۸ تعیین مقدار قندهای کاهش‌پذیر ۲۶
۳-۸- ۱ طرز تهیه محلول معرف **DNS** ۲۶
۳-۸-۲ رسم منحنی کالیبراسیون قندهای قابل تبدیل ۲۷
۳-۹ اندازه‌گیری نیتروژن ۲۸
۳-۱۰ اندازه‌گیری فسفر ۲۹
۳-۱۱ اندازه‌گیری **PHB** نمونه‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (**GC**) ۳۰
۳-۱۱-۱ آماده‌سازی نمونه برای تزریق به **GC** ۳۰
۳-۱۱- ۲ شرایط دستگاه کروماتوگرافی گازی ۳۰
۳-۱۱-۳ تهیه استاندارد داخلی متیل بنزوات ۳۱
۳-۱۱-۴ رسم منحنی کالیبراسیون ۳۱
۳-۱۳ محاسبات بازدهی ۳۳
۳-۱۳-۱ بازده بیومس ۳۳
۳-۱۳-۲بازدهی تولید ۳۴
۳-۱۳-۳ بهره‌دهی حجمی ۳۴
۳-۱۴ ماتریس آزمایشات ۳۴

۳-۱۵ تعمیم **C/N/P** بهینه برروی پساب تانک تخمیر ۳۵
۴-۱ نتایج بررسی زمانی مولفه‌های مورد آزمایش ۳۷
۴-۱-۱ اثر غلظت‌های متفاوت منبع کربنی مالتوز صنعتی ۳۷
۴-۱-۲ بررسی تاثیر نسبت‌های مختلف **C/N** بر اساس تغییر در مقدار منبع نیتروژن ۴۱
۴-۱-۳ بررسی تاثیر نسبت‌های مختلف **C/P** بر اساس تغییر در مقدار منبع نیتروژن ۴۵
۴-۲ تاثیر پارامترهای مورد آزمایش بر روی تجمع درون سلولی بیوپلیمر، بازده بیومس، بازده تولید و بهره-دهی حجمی ۴۵
۴-۴ تاثیر پارامترهای مورد آزمایش بر روی درصد مصرف منبع کربن و نیتروژن ۵۴
۴-۵ بررسی آماری آزمایشات ۵۶
۴-۶ بررسی کنش متقابل بین عناصر مغذی و محصولات با استفاده از آزمون همبستگی ۵۸
۴-۶-۱ تاثیر غلظت‌های مختلف منبع کربنی روی کنش متقابل هر یک از عوامل موثر بر روی رشد و تولید بیوپلیمر ۵۸
۴-۶-۲ تاثیر نسبت **C/N** بر روی کنش متقابل هر یک از عوامل موثر بر روی رشد و تولید بیوپلیمر ۵۹
۴-۶-۳ تاثیر نسبت **C/P** بر روی کنش متقابل هر یک از عوامل موثر بر روی رشد و تولید بیوپلیمر ۶۱
۴-۶-۴ کنش متقابل هر یک از عوامل موثر بر روی رشد و تولید بیوپلیمر در حالت کلی ۶۲
۴-۷ تعمیم **C/N/P** بهینه بر روی پساب تانک تخمیر ۶۲
۵-۲ آزمون فرضیات ۶۸
۵-۳ پیشنهادات ۶۹
۵-۳-۱ پژوهشی ۶۹
۵-۳-۲ کاربردی ۶۹
منابع ۷۰

فهرست جداول

جدول ۲-۱ : مطالعات صورت گرفته بر روی تولید پلیهیدروکسیآلکانوات از محصولات جانبی در چند سال اخیر ۱۶

جدول ۳- ۱: مواد شیمیایی مورد استفاده در محیط کشت اولیه (PYEB) ۲۱

جدول ۳- ۲. عناصر مورد نیا برای محیط کشت تلقیح اصلی ۲۲

جدول ۳- ۳: پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مربوط به منابع کربنی ۲۴

جدول ۳-۴ : ماتریس طرح آزمایشات ۳۶

جدول ۴- ۱: نتایج حاصل از محاسبات بازده بیومس، بازدهی تولید، وبهرهدهی حجمی برای هریک از آزمایشات ۵۰

جدول ۴- ۲: مقایسه همبستگی بین متغیرهای موثر برروی رشد و تولید بیوپلیمر به روش اسپیرمن در مرحله اول ۵۹

جدول ۴-۳: مقایسه همبستگی تاثیر نسبت C/N بر روی کنش متقابل هر یک از عوامل موثر بر روی رشد و تولید بیوپلیمر ۶۰

جدول ۴- ۴: مقایسه همبستگی تاثیر نسبت C/P بر روی کنش متقابل هر یک از عوامل موثر بر روی رشد و تولید بیوپلیمر ۶۱

جدول ۴- ۵ :مقایسه همبستگی بین متغیرهای موثر برروی رشد و تولید بیوپلیمر به روش اسپیرمن در حالت کلی ۶۲

فهرست اشکال

شکل ۱-۱ : ساختار کلی پلی_هیدروکسی_آلکانوات_ها ۴

شکل ۱- ۳ : ساختار ملکولی مالتوز ۷

شکل ۳-۱: منحنی کالیبراسیون وزن خشک سلولی باکتری *CUPRIAVIDUS NECATOR* ۲۶

شکل ۳-۲: منحنی کالیبراسیون قند های کاهش‌پذیر ۲۸

شکل ۳-۳: نمودار تیتراسیون اسید بر حسب غلظت ۲۹

شکل ۳-۴: نمودار منحنی استاندارد جذب - غلظت فسفر در ۴۵۰ نانومتر ۲۹

شکل ۳-۵: منحنی کالیبراسیون بهدست آمده برای سه بیوپلیمر PHB, PHV, PHH .....

شکل ۳-۶: کروماتوگرام مربوط به استاندارد ۱۰۰۰ MG/L سه استاندارد PHB, PHV, PHH ۳۳

شکل۴-۱: روند رشد باکتری(الف)، تولید بیوپلیمر (ب) مصرف مالتوز(ج) و مصرف نیتروژن در نسبتهای ثابت C/N = ۱۰۰:۲. و C/P = ۱۰۰:۱ ..... ۳۸

شکل۴-۲: روند رشد باکتری(الف)، تولید بیوپلیمر(ب) مصرف مالتوز(ج) و مصرف نیتروژن(د) در غلظت ثابت ۴۰ G/L، نسبت ثابت C/P = ۱۰۰:۱ و نسبتهای C/N متفاوت ۴۲

شکل۴-۳: روند رشد باکتری(الف)، تولید بیوپلیمر(ب) مصرف مالتوز(ج) و مصرف نیتروژن(د) باتوجه به نسبت های C/P متفاوت. ۴۶

شکل ۴-۵ :نمودار درصد مصرف منابع غذایی در محیط کشت..... ۵۵

شکل ۴-۶ : نتایج حاصل از وزن خشک سلولی و تولید بیوپلیمر و آنالیز واریانس یکطرفه در مراحل مختلف آزمایش با استفاده از آزمون دانکن ۵۷

شکل ۴-۹: روند رشد و تولید بیوپلیمر در ازای مصرف منبع کربن (الف) ۶۴

نمودارتحلیلی مصرف نیتروژن، فسفر و COD در طول دوره رشد (ب). ۶۴

شکل ۴-۱۰: مقایسه محصولات بین پساب خام وتیمار شده (الف) و مقایسه مصرف عناصر مغذی بین پساب خام و تیمار شده(ب)..... ۶۶

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه

افزایش جمعیت در عصر حاضر و رشد کیفیت و پیشرفت زندگی انسان منجر به روی آوردن انسان به صنایع و مواد مختلف شده است. ازاین‌رو تولید و انباشت ضایعات در محیط زیست از پیامد های اجتناب ناپذیر آن می‌باشد. از مهم‌ترین و پرکاربردترین این صنایع، صنایع پلاستیک می‌باشد. از طرفی صنعت پلاستیک یکی از صنایع رو به رشد در بخش اقتصاد جهانی بوده است که علت آن استفاده گسترده آن در هر صنعت دیگر می‌باشد. در سراسر دنیا سالانه حدود ۲۰۰ میلیون تن پلاستیک از مشتقات نفت تولید می‌گردد (Du و همکاران، ۲۰۱۲) و میلیون‌ها تن از آن در طبیعت تخلیه می‌گردد (Reddy و همکاران، ۲۰۰۳; Sridewi و همکاران، ۲۰۰۶). این در حالی است که میزان تولید پسماندهای پلاستیکی در ایران سالانه ۱۷۷ هزار تن می‌باشد. از طرفی تجزیه طولانی مدت و پایداری زیاد این مواد در محیط زیست (به طور متوسط حدود ۱۰۰ سال) منجر به آلودگی‌های جدی خواهد گردید (Castilho و همکاران، ۲۰۰۹).

افزایش چشم‌گیر در تولید پلیمرهای تجاری، به خصوص پلاستیک در صنعت بسته بندی مواد غذایی و عدم قابلیت تجزیه بیولوژیک این ترکیبات، منجر به جلب توجه عموم به تجمع بیش از حد پسماند آن در محیط زیست و اثرات و آلودگی‌های آن‌ها به علت پایداری زیاد در محیط زیست گردیده است. راهکارهای متفاوتی برای حل مسایل مربوط به ضایعات پلاستیک ارائه گردیده است که از آن جمله می‌توان به دفن، بازیافت و سوزاندن این ضایعات اشاره نمود. با این وجود هر یک از راهکارهای ذکر شده دارای معایب خاصی می‌باشد. به عنوان مثال دفن ضایعات در محیط نه‌تنها مدت زمان زیادی برای تجزیه در محیط را صرف می‌کند بلکه باعث اثراتی بر روی حیات وحش و نیز اثرات منفی زیبا شناختی می‌گردد. فرآیند سوزاندن باعث تولید

آلاینده‌های بسیار خطرناک از قبیل آلاینده‌های آلی پایدار[1] می‌گردد. فرآیند بازیافت نیز نیازمند هزینه و انرژی بسیار زیادی می‌باشد (Shah و همکاران، ۲۰۰۸).

همین امر موجب افزایش نگرانی‌ها در مورد اثرات این مواد پس از مصرف بر روی محیط زیست گردیده است. از این رو انتخاب یک جایگزین مناسب برای پلاستیک‌های نفتی یکی از مهم‌ترین اهداف تحقیقات علمی و کاربردی در این زمینه می‌باشد (Sharma و همکاران، ۲۰۰۵). توسعه فناوری تولید پلاستیک‌های قابل تجزیه یکی از مباحث اساسی در تحقیقات بیوتکنولوژی می‌باشد زیرا این مواد قابلیت تولید از طریق فرآیندهای دوست‌دار محیط زیست را داشته و طی فرآیند تجزیه توسط میکروارگانیسم‌ها نهایتا به آب و کربن‌دی‌اکسید تبدیل می‌گردند (Hsieh و همکاران، ۲۰۱۱).

۱-۲ پلیمرهای زیستی

پلیمرهای زیستی بر اساس چگونگی فرآیند تولید به ۳ گروه عمده تقسیم بندی می‌گردند (Lau و همکاران، ۲۰۱۱).

۱- پلیمرهای تولید شده به روش بیوشیمیایی مانند پلی لاکتیک اسید.

۲- پلیمرهای تولید شده به روش زیستی مانند پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها.

۳- پلیمرهای طبیعی تغییر ماهیت داده شده مانند نشاسته.

با این حال در کل پلیمرهای زیستی در ۷ طبقه تقسیم بندی می‌گردند که عبارتند از پلی‌نوکلئوتیدها، پلی-آمیدها، پلی‌ایزوپرین‌ها، لیگنین، پلی‌فسفات‌ها، پلی‌ساکاریدها و پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (Santhanam و همکاران، ۲۰۱۰).

[1] Persistent organic pollutant

در این میان پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها[1] به علت خواص الاستومری و ضد آب بودن و شباهت ساختاری به پلی‌اتیلن و پلی‌پروپیلن از بقیه جذاب‌ترند.

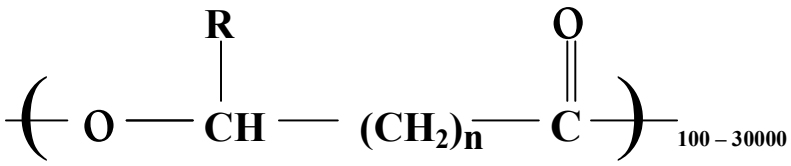
۱-۳ پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها

۱-۳-۱ تعریف پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها خانواده‌ای از پلی‌استرهای خطی۳، ۴، ۵ و ۶-هیدروکسی‌آلکانوئیک‌اسید هستند که توسط طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به صورت ذخیره‌های کربن و انرژی تحت تخمیر انواع منبع کربن قند، لیپید، آلکان، آلکن، و آلکانوئیک‌اسید، در شرایط غیر متعادل رشد از قبیل کربن بیش از حد و محدودیت حداقل یکی از عناصر ضروری رشد از قبیل نیتروژن، فسفر، منیزیم، پتاسیم، گوگرد، اکسیژن وغیره تولید می‌گردند (Philip و همکاران، ۲۰۰۷; Rai و همکاران، ۲۰۱۱; Valappil, Misra و همکاران، ۲۰۰۷). پلی-هیدروکسی‌آلکانوات‌ها از ۱۰۳ تا ۱۰۴ واحد مونومری و به صورت گرانول‌هایی با قطر ۰/۲ تا ۰/۵ میکرمتر در درون فضای سیتوپلاسمی سلول تشکیل و وزن ملکولی آن‌ها بین ۵۰۰۰۰ تا[2] Da ۱۰۰۰۰۰۰ می‌باشد (Reddy و همکاران، ۲۰۰۳; Suriyamongkol و همکاران، ۲۰۰۷). ساختار کلی این ترکیبات در شکل (۱-۱) نمایش داده شده است.

[1] Polyhydroxyalkanoates

[2] Dalton



n= 1	R=hydrogen	Poly(3-hydroxypropionate)
	R=methyl	Poly(3-hydroxybutyrate)
	R=ethyl	Poly(3-hydroxyvalerate)
	R=propyl	Poly(3-hydroxyhexanoate)
	R=pentyl	Poly(3-hydroxyoctanoate)
	R=nonyl	Poly(3-hydroxydodecanoate)
N=2	R=hydrogen	Poly(4-hydroxybutyrate)
	R=methyl	Poly(4-hydroxyvalerate)
N=3	R=hydrogen	Poly(5-hydroxyvalerat)
	R=methyl	Poly(5-hydroxyhexanoate)
N=4	R=hexyl	Poly(6-hydroxydodecanoate)

شکل ۱-۱ : ساختار کلی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (Castilho و همکاران، ۲۰۰۹)

این ترکیبات قادر به تجمع درون سلولی به میزان بیش از ۹۰٪ وزن خشک سلولی در شرایط نامتعادل و در فاز ساکن رشد می‌باشند (Madison و همکاران، ۱۹۹۹; Rai و همکاران، ۲۰۱۱; Thomson و همکاران، ۲۰۱۰). پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به عنوان یکی از انواع پلاستیک‌های زیستی دارای مزایای بسیاری نسبت به پلیمرهای غیر قابل تجزیه مشتق شده از نفت خام می‌باشند که به برخی از آن‌ها در زیر اشاره شده‌اند.

۱-۳-۲ خواص پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها دارای خواص بسیار منحصر به فرد می‌باشند که این خواص آن‌ها را از سایر پلیمرها مجزا کرده است. به عنوان مثال این ترکیبات، پلیمرهای طبیعی و زیست‌سازگار[1] هستند. فرآیند تولید این ترکیبات توسط منابع کربنی قابل تجدید صورت می‌گیرد که علاوه بر عدم استفاده از منابع غیر قابل تجدید نفتی از ایجاد آلودگی‌های ناشی از نفت جلوگیری کرده و منابع ایمن‌تری می‌باشند. ویژگی‌های الاستومری و انعطاف‌پذیری متفاوت داشته و نقطه ذوب آن‌ها بین ۴۰ تا ۱۸۰ درجه است. برای استفاده در کاربردهای

[1] Biocompatible

کوتاه مدت از قبیل بسته بندی مواد غذایی در مقیاس وسیع مناسب بوده و مشکلات مدیریت پسماندهای پلاستیکی را به دنبال نخواهد داشت. از طرف دیگر فرآیند تجزیه این مواد در محیط میکروبی حدود ۵ الی ۶ هفته به طول می‌انجامد و در صورت تجزیه کامل این ترکیبات، مواد حاصل، آب و کربن‌دی‌اکسید می‌باشند که کاملا دوست‌دار محیط زیست می‌باشند و قابلیت جذب مجدد در فرآیند فوتوسنتز را دارا می‌باشند و این فرآیند کاملا مطابق با چرخه کربن می‌باشد. همان‌گونه که اشاره گردید این مواد از جمله ترکیبات زیست-سازگار می‌باشند و از این رو کاربردهای مفید و حیاتی در زمینه‌های پزشکی و داروسازی و مهندسی بافت دارند. هم‌چنین خاصیت ضد آب و عدم نفوذ پذیری هوا دارند و از این رو مواد بسیار مناسبی برای صنایع تولید فیلم های روکش و مواد پوششی دارند (Ceyhan و همکاران، ۲۰۱۱).

همان‌طور که اشاره شد این ترکیبات دارای خواص بسیار متنوع می‌باشند که ناشی از تفاوت در ساختار شیمیایی بوده و به طور قابل ملاحظه‌ای به ساختار مونومرهای تشکیل دهنده آن بستگی دارد و تفاوت آن‌ها مربوط به طول گروه‌های متصل به ساختار اصلی یا فاصله بین گروه‌های استر موجود در ساختار پلیمر می-باشند ازاین‌رو می‌توان با ایجاد ترکیبات مختلف پلیمرهای کنترل شده با خواص مطلوب ایجاد نمود (Rai و همکاران، ۲۰۱۱).

۱-۴ میکروارگانیسم‌های تولیدکننده PHAs

باکتری‌های بسیاری اعم از گرم‌مثبت و گرم‌منفی از قبیل *Ralstonia, Bacillus, Pseudomonas, Aeromonas* و *Rhodobacter* و نیز برخی از اعضای خانواده هالوباکتری مانند *Haloferaxsulfurifontis* قادر به تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها می‌باشند. حتی پروکاریوت‌های دریایی چه باکتری و چه آرکی‌باکتری‌ها نیز پتانسیل بسیار بالای تولید تجاری PHAs (بیش از ۸۰٪ وزن خشک سلولی) را دارا می‌باشند. که این امر نشان از پراکنش گسترده میکروارگانیسم‌های تولید کننده PHAs در محیط زیست می‌باشد. بهترین تولید کنندگان PHA گونه‌هایی هستند که بتوانند هم‌زمان چندین تقاضا، از قبیل رشد جمعیت سریع، توانایی

استفاده از منابع کربنی ارزان و داشتن نرخ تولید بالا را برآورده نمایند (Tian و همکاران، ۲۰۰۸). در این میان باکتری *Cupriavidus necator* به منظور تولید پلی-۳-هیدروکسی‌بوتیرات[۱] به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و توانایی تولید این بیوپلیمر در مقیاس گسترده و صنعتی را دارا می‌باشد (Verlinden و همکاران، ۲۰۱۱).

باکتری *Cupriavidus necator* که با نام‌های *Wautersia eutropha* یا *Ralstonia eutropha* نیز شناخته می‌شود یک باکتری گرم‌منفی غیربیماری‌زا[۲] می‌باشد که هم در خاک و هم در آب یافت می‌گردد و توانایی استفاده از CO_2 و H_2 را به عنوان منبع کربن و انرژی در غیاب مواد آلی و نیز قابلیت تبدیل از تغذیه اوتوتروفی به هتروتروفی و بر عکس را دارا می‌باشد. این باکتری هم‌چنین یک باکتری مهم از نظر زیست محیطی است که بسیاری از ترکیبات آلی معطره از قبیل بنزوات‌ها، فنول‌ها و بی‌فنیل‌ها را تجزیه می‌کند. از دیگر ویژگی‌های *Cupriavidus necator* این است که می‌تواند در شرایط غیرمتعادل رشد بیش از ۹۰ درصد از وزن خشک سلولی، PHAs را در بدن خود تجمع دهد (Bowien و همکاران، ۲۰۰۲).

۱-۵ منابع کربنی

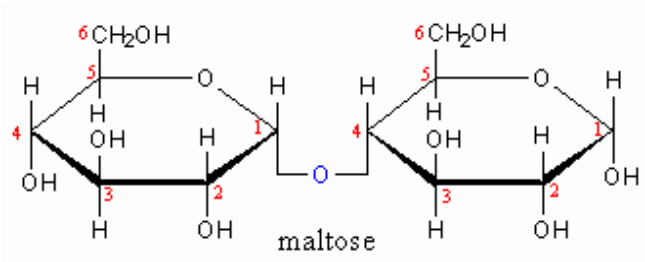
منابع کربنی متفاوتی جهت تولید این بیوپلیمرها مورد استفاده قرار می‌گیرند که بسته به نوع منبع کربنی به کار رفته و البته نوع میکروارگانیسم پلیمر متفاوتی تولید خواهد گردید. پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها از منابع کربنی متنوعی از قبیل منابع قابل تجدید، منابع نفتی، محصولات جانبی کارخانجات، مواد شیمیایی و دی-اکسیدکربن وسایر منابع کربنی ارزان قیمت از قبیل پساب و پسماندها تولید می‌گردند (Reddy و همکاران، ۲۰۰۳).

[۱] Poly3hydroxybutirate (P3HB)

[۲] Nonpatogen

۱-۵-۱ منبع کربن (مالتوز)

مالتوز (قند جوانه جو) دی‌ساکاریدی است که از تجزیه آنزیمی نشاسته (آمیلاز) با راندمان ۸۰٪ حاصل می‌شود. مالتوز، دی‌مر گلوکز است که در آن، اکسیژن همی‌استالی یک مولکول گلوکز (در فرم α- آنومری) با کربن شماره ۴ مولکول دیگر پیوند دارد. در این آرایش، واحد گلوکزی با خواص شیمیایی خاص خود، به صورت محافظت نشده باقی می‌ماند. مالتوز با محلول اسید یا آنزیم مالتاز، هیدرولیز شده، به دو مولکول گلوکز تبدیل می‌شود. شیرینی آن به اندازه یک سوم ساکارز است (Weast و همکاران، ۱۹۸۱). ساختار شیمیایی آن به صورت زیر می‌باشد.



شکل ۱- ۱ : ساختار ملکولی مالتوز

در فرآیند تخمیر مالتوز صنعتی در اثر افت pH محیط کشت هیدرولیز می‌گردد و نهایتا به گلوکز تبدیل می‌گردد که می‌تواند مورد استفاده باکتری قرار گیرد. طی فرآیند تولید ماءالشعیر پودر مالت یا مالتوز صنعتی مهم‌ترین ترکیب مورد استفاده می‌باشد که پس از فرآیند بوجاری کردن جو و جوانه زدن آن در شرایط خاص تولید می‌گردد. و پس از آن به تانک تخمیر منتقل می‌گردد تا در آنجا عصاره مالت موجود در ماءالشعیر تولید گردد. از این رو این منبع به عنوان یک منبع کربنی مناسب می‌توانست مورد مطالعه قرار گیرد.