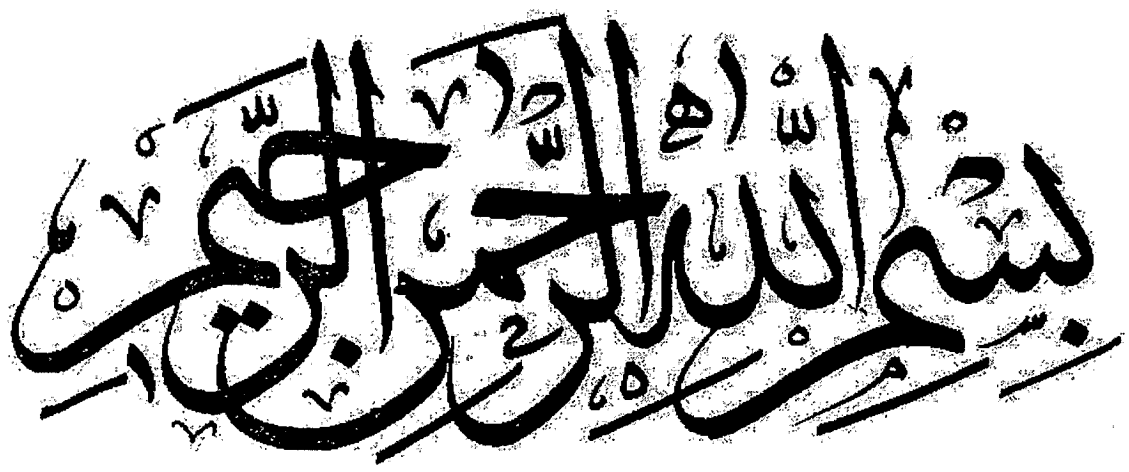
خ ٢٥٩٥



١١٠٥٧

۸۷/۱/۱۰۸۹۴۲
۸۷/۲/۲

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی
گروه محیط زیست

پایان نامه کارشناسی ارشد

تاثیر استفاده از منابع کربنی در تولید کوپلیمر هیدروکسی بوتیرات و والرات با استفاده از باکتری *Cupriavidus necator*

استاد راهنما

دکتر حبیب الله بونسی

نگارش

محمد فریدونی

پائیز ۱۳۸۷

۱۳۸۸/۱/۱۷

۱۱۰۰۵۷

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

اعضای هیئت داوران نسخه نهائی پایان نامه آقای محمد فریدونی رشته محیط زیست
تحت عنوان: تاثیر استفاده از منابع کربنی در تولید کوپلیمر پلی هیدروکسی بوتیریت و والریت توسط باکتری *Cupriavidus necator*
را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی‌ارشد پیشنهاد می‌کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
۱- استاد راهنما	دکتر حبیب ا... یونسی	استادیار	
۲- استاد مشاور	----------		
۳-نماینده‌شورای‌تحصیلات‌تکمیلی	دکتر سید حمیدرضا صادقی	دانشیار	
۴- استاد ناظر	دکترقاسم نجف پور	استاد	
۵- استاد ناظر	دکتر نادر بهرامی فر	استادیار	

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

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

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده در رشتهٔ شیمی معدنی است که در سال در دانشکده دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم /جناب آقای دکتر ، مشاوره سرکار خانم /جناب آقای دکتر و مشاوره سرکار خانم /جناب آقای دکتر 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 آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند 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 رابه عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند 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 می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب محمد خدروی دانشجوی رشته شیمی معدنی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: محمد خدروی

تاریخ و امضا:

M. Khadivi

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

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های 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 هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ 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 دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳ انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود

ماده ۴ ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ 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 لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

تقدیم به:

همسر عزیزم

فهرست مطالب

عنوان		صفحه
	تقدیم	i
	فهرست مطالب	ii
	فهرست جدول‌ها	ii
	فهرست شکل‌ها	iiii
	چکیده فارسی	viii
فصل اول: مقدمه و کلیات		
۱-۱	مقدمه	۱
۱-۲	انواع پلیمرهای قابل تجزیه	۲
۱-۳	ویژگیهای پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها	۲
۱-۴	بیان مسئله	۴
۱-۵	اهداف تحقیق	۴
۱-۶	فرضیات	۴
فصل دوم: سابقه تحقیق		
۲-۱	میکروارگانیسم‌های تولیدکننده پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها	۵
۲-۲	کوپلیمرهای هیدروکسی‌آلکانوات	۷
۲-۳	نحوه سنتز بیوپلیمرهای هیدروکسی‌آلکانوات	۹
۲-۴	منابع ارزان‌قیمت کربنی در تولید پلیمرهای PHA	۱۰
۲-۵	سنتز پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها در گیاهان	۱۱
۲-۶	اندازه‌گیری کمی بیوپلیمرها	۱۳
۲-۷	خواص فیزیکی و موارد استفاده پلیمرهای زیستی	۱۴
۲-۸	قابلیت تجزیه‌پذیری پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها	۱۵
۲-۹	استفاده پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها در صنایع	۱۶
فصل سوم: مواد و روش تحقیق		
۳-۱	میکروارگانیسم	۱۸
۳-۲	انتقال میکروارگانیسم از حالت یخ‌خشک به محیط‌کشت اولیه	۱۹

۳-۳	محیط نگهداری	۲۰
۴-۳	محیط‌کشت تلقیح	۲۰
۵-۳	محیط کشت تخمیر	۲۱
۶-۳	آماده‌سازی کشت تلقیح	۲۱
۷-۳	شرایط تخمیر و نمونه‌برداری	۲۲
۸-۳	تهیه منحنی کالیبراسیون وزن خشک سلولی – جذب	۲۳
۹-۳	تهیه منحنی‌های کالیبراسیون جهت تعیین مفادیر منابع کربن	۲۴
۱-۹-۳	طرز تهیه محلول معرف DNS	۲۴
۲-۹-۳	رسم منحنی کالیبراسیون قندهای قابل‌تبدیل	۲۵
۳-۹-۳	شرایط کروماتوگراف گازی برای اندازه‌گیری اسید استیک و ۴،۱- بوتان‌دی‌ال	۲۶
۴-۹-۳	تهیه منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری اسید استیک و ۴،۱- بوتان‌دی‌ال	۲۶
۱۰-۳	شرایط کروماتوگراف گازی برای اندازه‌گیری پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها	۲۸
۱-۱۰-۳	تهیه استاندارد داخلی	۲۹
۲-۱۰-۳	تهیه منحنی‌های کالیبراسیون متیل‌هیدروکسی‌بوتیرات، متیل‌هیدروکسی‌والرات و متیل-هیدروکسی‌هگزانات	۲۹
۳-۱۰-۳	آماده‌سازی نمونه برای تزریق به GC	۳۰
۱۱-۳	اندازه‌گیری میزان یونهای PO_4 و NH_4	۳۱
۱۲-۳	طرح آزمایشات	۳۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۱-۴	استفاده از منابع کربن بصورت جداگانه	۳۴
۱-۱-۴	فروکتوز بعنوان تنها منبع کربن	۳۵
۲-۱-۴	گلوکز بعنوان تنها منبع کربن	۳۶
۳-۱-۴	۴،۱- بوتان‌دی‌ال بعنوان تنها منبع کربن	۳۷
۴-۱-۴	استات بعنوان تنها منبع کربن	۳۸
۲-۴	تاثیر ۴،۱- بوتان‌دی‌ال با فروکتوز و استات بر رشد میکروارگانیسم و تولید بیوپلیمر	۳۸
۱-۲-۴	ترکیب ۴،۱- بوتان‌دی‌ال و گلوکز	۳۸

۴-۲-۲	ترکیب ۴،۱- بوتان‌دی‌ال و فروکتوز	۴۱
۴-۲-۳	ترکیب ۴،۱- بوتان‌دی‌ال و استات	۴۵
۴-۲-۴	نتایج کلی استفاده از ۴،۱- بوتان‌دی‌ال در ترکیب با گلوکز، فروکتوز و استات	۴۸
۴-۳	تاثیر استات بر رشد میکروارگانیسم و تولید بیوپلیمر	۴۹
۴-۳-۱	ترکیب گلوکز و استات بعنوان منابع کربن	۴۹
۴-۳-۲	ترکیب فروکتوز و استات	۵۲
۴-۳-۳	نتایج کلی استفاده از استات در ترکیب با گلوکز و فروکتوز	۵۵
۴-۴	بازده بیوماس	۵۵
۴-۵	بهره‌دهی حجمی	۵۶
۴-۶	بازدهی تولید	۵۸
۴-۷	تاثیر میزان نیتروژن و فسفر بر رشد میکروارگانیسم و تولید بیوپلیمر	۵۹
۴-۸	تاثیر منابع کربن بر تولید بیوپلیمر	۶۲
۴-۹	نتیجه‌گیری	۶۴
	منابع	۶۶
	پیوست	
	پیوست الف	۷۲
	پیوست ب	۷۳
	چکیده انگلیسی	۷۴

فهرست جدول‌ها

صفحه

جدول ۲-۱	برخی از باکتریهای مورد استفاده در تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها	۶
جدول ۲-۲	میکروارگانیسم‌ها و منابع مورد استفاده در تولید کوپلیمر هیدروکسی‌بوتیرات – والرات	۹
جدول ۲-۳	مقایسه برخی از خواص فیزیکی پلیمرهای تولیدی	۱۴
جدول ۲-۴	برخی از میکروارگانیسم‌های جداسازی‌شده جهت تجزیه PHAs	۱۵
جدول ۲-۵	شرکتهای تولیدکننده پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر	۱۷
جدول ۳-۱	اجزای محیط کشت تولید	۳۲
جدول ۳-۲	تعداد رانهای آزمایش و غلظت هر یک از منابع کربن برحسب گرم بر لیتر	۳۵
جدول ۳-۳	نسبت بین منابع کربن، نیتروژن و فسفر	۳۳
جدول ۴-۱	حداکثر بهره‌دهی حجمی با استفاده از ترکیبات مختلف	۵۷
جدول ۴-۲	حداکثر بازدهی تولید با استفاده از ترکیبات مختلف	۵۸

فهرست شکل‌ها

صفحه

شکل ۲-۱	ساختار شیمیایی پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها	۶
شکل ۲-۲	مسیر بیوسنتز پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات- والرات	۸
شکل ۳-۱	رابطه بین میزان رشد و مقدار مصرف گلوکز توسط باکتری *C. necator*	۲۲
شکل ۳-۲	منحنی کالیبراسیون وزن خشک سلولی باکتری *C.necator* در محیط‌کشت توصیه شده توسط DSMZ	۲۴
شکل ۳-۳	منحنی کالیبراسیون گلوکز	۲۵
شکل ۳-۴	منحنی کالیبراسیون فروکتوز	۲۶
شکل ۳-۵	منحنی کالیبراسیون ۴،۱- بوتان‌دی‌ال	۲۷
شکل ۳-۶	منحنی کالیبراسیون استات‌سدیم	۲۸
شکل ۳-۷	منحنی کالیبراسیون استات‌سدیم و ۴،۱- بوتان‌دی‌ال در حالت مخلوط	۲۸
شکل ۳-۸	منحنی کالیبراسیون ۳- متیل‌هیدروکسی‌بوتیرات، ۳-متیل‌هیدروکسی‌والرات و ۳-متیل هیدروکسی‌هگزانوات	۳۰
شکل ۴-۱	استفاده از فروکتوز بعنوان تنها منبع کربن در تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB)	۳۵
شکل ۴-۲	استفاده از گلوکز بعنوان تنها منبع کربن	۳۶
شکل ۴-۳	استفاده از ۴،۱ بوتان‌دی‌ال بعنوان تنها منبع کربن	۳۷
شکل ۴-۴	استفاده از استات بعنوان تنها منبع کربن	۳۸
شکل ۴-۵	ترکیب g/l ۴۰ گلوکز و g/l ۱۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال	۳۹
شکل ۴-۶	ترکیب g/l ۳۰ گلوکز و g/l ۲۰ از ۴،۱ بوتان‌دی‌ال	۴۰
شکل ۴-۷	ترکیب g/l ۲۰ گلوکز و g/l ۳۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال	۴۰
شکل ۴-۸	ترکیب g/l ۱۰ گلوکز و g/l ۴۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال	۴۱
شکل ۴-۹	ترکیب g/l ۴۰ فروکتوز و g/l ۱۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال	۴۲
شکل ۴-۱۰	ترکیب g/l ۳۰ فروکتوز و g/l ۲۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال	۴۳
شکل ۴-۱۱	ترکیب g/l ۲۰ فروکتوز و g/l ۳۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال	۴۳

شکل ۴-۱۲ ترکیب g/l ۱۰ فروکتوز و g/l ۳۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال ۴۴
شکل ۴-۱۳ ترکیب g/l ۲ استات و g/l ۴۰ از ۴،۱ بوتان‌دی‌ال ۴۵
شکل ۴-۱۴ ترکیب g/l ۵ استات و g/l ۳۰ از ۴،۱ بوتان‌دی‌ال ۴۶
شکل ۴-۱۵ ترکیب g/l ۱۰ استات و g/l ۲۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال ۴۷
شکل ۴-۱۶ ترکیب g/l ۱۵ استات و g/l ۱۰، ۴،۱ بوتان‌دی‌ال ۴۷
شکل ۴-۱۷ ترکیب g/l ۴۰ گلوکز و g/l ۲ استات ۴۹
شکل ۴-۱۸ ترکیب g/l ۳۰ گلوکز و g/l ۵ استات ۵۰
شکل ۴-۱۹ ترکیب g/l ۲۰ گلوکز و g/l ۱۰ استات ۵۱
شکل ۴-۲۰ ترکیب g/l ۱۰ گلوکز و g/l ۱۵ استات ۵۲
شکل ۴-۲۱ ترکیب g/l ۴۰ فروکتوز و g/l ۲ استات ۵۳
شکل ۴-۲۲ ترکیب g/l ۳۰ فروکتوز و g/l ۵ استات ۵۴
شکل ۴-۲۳ ترکیب g/l ۲۰ فروکتوز و g/l ۱۰ استات ۵۴
شکل ۴-۲۴ اعمال محدودیت منابع نیتروژن ۵۹
شکل ۴-۲۵ استفاده از منابع نیتروژن بیش از حد نرمال برای تولید بیوپلیمر ۶۰
شکل ۴-۲۶ اعمال محدودیت در میزان منابع فسفر ۶۱
شکل ۴-۲۷ اعمال محدودیت در منابع کربن ۶۲
شکل ۴-۲۸ استفاده از کربن به میزان معمول ۶۳
شکل ۴-۲۹ استفاده از کربن اضافی در محیط ۶۳

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، دستیابی به کوپلیمر هیدروکسی‌بوتیرات – والرات با استفاده از کشت میکروارگانیسم *Cupriavidus necator* DSM 545 بود. برای کشت از چهار منبع متفاوت کربن (گلوکز، فروکتوز، استات و ۴،۱- بوتان‌دی‌ال) استفاده گردید. نتایج آزمایشات نشان داد که استفاده از منابع کربنی بصورت جداگانه، تنها سبب تولید هیدروکسی‌بوتیرات شده است. بالاترین میزان هیدروکسی‌بوتیرات تولیدشده با استفاده از کشت میکروارگانیسم بر روی فروکتوز و بمیزان g/l ۱۰/۹۵ و کمترین میزان هیدروکسی‌بوتیرات توسط ۴،۱- بوتان‌دی‌ال و بمیزان g/l ۰/۱۸ حاصل شدند. استفاده از منابع کربن بصورت مخلوط سبب تولید کوپلیمر هیدروکسی‌بوتیرات- والرات، در ترکیب ۴،۱- بوتان‌دی‌ال با فروکتوز و گلوکز، و ترکیب استات با فروکتوز و گلوکز گردید. در ترکیب گلوکز و فروکتوز با ۴،۱- بوتان‌دی‌ال و گلوکز با استات، هیدروکسی‌بوتیرات تولید غالب بود و والرات بمیزان کمی تولید می‌شد. بالاترین میزان هیدروکسی‌والرات زمانی تولید شد که از ترکیب فروکتوز و استات استفاده شد. تغییر نسبت کربن: نیتروژن: فسفر نشان داد که فسفر نقش حیاتی در رشد این میکروارگانیسم داشته و کمبود آن سبب کاهش رشد و تولید بیوپلیمر شده در حالیکه کمبود نیتروژن سبب ذخیره‌سازی و تولید پلی‌هیدروکسی-آلکاناتها توسط میکروارگانیسم خواهد شد. افزایش میزان کربن موجود در محیط با رعایت نسبت بین نیتروژن: فسفر، سبب تولید بیوپلیمر بمیزان بالایی شد.

کلمات کلیدی: پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات- والرات، گلوکز، فروکتوز، ۴،۱- بوتان‌دی‌ال، استات، *Cupriavidus necator*

فصل ۱
مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

امروزه پلاستیک جزیی تفکیک‌ناپذیر از زندگی روزمره انسانها و جوامع بشری محسوب می‌گردد. براساسی تخمینی، نرخ تجمع پلاستیک بر روی کره زمین ۲۵×۱۰^{۶} تن در سال می‌باشد (Sharma و همکاران، ۲۰۰۷). بیش از ۴۰ درصد از این مقدار پلاستیک تولیدی راهی مکانهای دفن زباله[1] شده و چند صد هزار تن هر ساله به محیطهای دریایی ریخته می‌شوند (Tokiwa و Ugwu، ۲۰۰۷).

برای از بین بردن مشکلات ناشی از پلاستیکهای مشتق‌شده از نفت خام دو راه حل عمده که یکی، جمع-آوری و سوزندان آنها در کوره‌های زباله سوز[2] و دیگری بازیافت مجدد، پیشنهاد شده است. اما هر یک از این دو گزینه بنوبه خود مشکلات عمده‌ای را ایجاد می‌کنند. در اثر سوزاندان پلاستیک، موادی شیمیایی مانند کلرید هیدروژن و سیانید هیدروژن در محیط آزاد می‌گردند که تاثیرات سوء بر سلامتی انسان دارند (Reddy و همکاران، ۲۰۰۳). بازیافت، نیز عملیاتی پرهزینه و مستلزم صرف وقت فراوان است. بعلاوه حضور ترکیباتی نظیر مواد رنگی[3] که در پلاستیکها حضور دارند، استفاده از پلاستیک بازیافت شده را دچار مشکل می‌سازد (Braunegg و همکاران، ۱۹۹۸). علاوه بر موارد فوق، تحقیقات نشان می‌دهد که سالیانه ۲۷۰ میلیون تن نفت خام صرف تولید مواد پلاستیکی می‌گردد. با توجه به افزایش قیمت نفت و غیرقابل تجدید بودن این منبع، نیاز روزافزونی به ساخت پلاستیکهایی احساس می‌شود که قابل تجزیه بوده و زیانی برای محیط‌زیست به همراه نداشته باشند (Sharma و همکاران، ۲۰۰۷).

---

[1] landfill
[2] Incineration
[3] Pigment

۱-۲- انواع پلیمرهای قابل تجزیه[1]

انواع مختلفی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر تاکنون شناسایی شده اند و بر تعداد آنها روز به روز افـزوده می شود (Sharma و همکاران، ۲۰۰۷). بطور کلی پلیمرهای قابل تجزیه را به سه دسته عمـده مـی‌تـوان تقسیم‌بندی نمود: دسته اول پلیمرهایی هستند که بـصورت شـیمیایی سـنتز مـی‌شـوند[2]. ایـن دسـته از پلیمرها نظیر پلی‌وینیل الکل از نظر تجاری ارزش چندانی نداشـته و کلیـه خـواص پلاسـتیک را نیـز دارا نیستند. دسته دوم، پلاستیکهای قابل تجزیـه‌ای کـه توسـط نـشاسته سـاخته مـی‌شـوند[3]. ایـن دسـته از پلاستیکها، توسط باکتریهای موجود در خاک به راحتی تجزیه می‌شـوند امـا بقایـای ناشـی از تجزیـه در محیط باقی می‌ماند. دسته سوم پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها[4] می‌باشند. این دسته تنها پلیمرهایی هستند کـه بطور کامل و صد در صد در محیط تجزیه می‌گردند. آنهـا همینطـور درجـات بـالایی از پلیمـری شـدن و کریستالی شدن را دارا می باشند و از لحاظ نوری فعالند و در آب نامحلولند (Reddy و همکاران، ۲۰۰۳).

۱-۳- ویژگیهای پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها

طی دو دهه اخیر پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها بطور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. آنها قابل تجزیه و سازگار با محیط‌زیست بوده و از منابع تجدیدپذیر قابل استحصال می‌باشند. این خواص، آنها را بعنوان جایگزینی مناسب برای پلیمرهای مشتق‌شده از مواد نفتی معرفی می‌کند. بسیاری از گونه‌های میکروارگانیسم که جزو اعضای خانواده *Halobactericeae* می‌باشند قادر به تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها می‌باشند. تاکنون بیش ۳۰۰ گونه از این میکروارگانیسم‌ها شناسایی گردیده و تعداد آن مرتبا در حال افزایش می‌باشد (Ciesielski و همکاران، ۲۰۰۶). باکتریها قادر به سنتز طیف وسیعی از ترکیبات پلی-هیدروکسی‌آلکانات هستند و تقریبا ۱۵۰ ترکیب متفاوت از پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها تاکنون شناسایی شده است. پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها که از سلولهای باکتریها گرفته می‌شوند دارای ویژگیهای مشابه با

---

[1] Biodegradable
[2] Chemical synthesized polymer
[3] Starch-based plastics
[4] Polyhydroxyalkanoate's(PHA's)

پلاستیکهای متداول نظیر پلی‌پروپیلن می‌باشند (Steinbuchel و Valentine، ۱۹۹۵).

پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها را برحسب نوع منومر به دو دسته می‌توان تقسیم نمود. دسته اول پلیمرهایی با زنجیره کوتاه هستند که دارای ۳ تا ۵ اتم کربن بوده و ترد و شکننده می‌باشند. دسته دوم، پلیمرهایی با زنجیره متوسط که دارای ۶ تا ۱۴ اتم کربن بوده و دارای خاصیت الاستیکی می‌باشند (Bassas و همکاران، ۲۰۰۶).

پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها در فرایند تخمیر هوازی و در محدوده دمایی ۶۰ C° و رطوبت ۵۵٪ به کمپوست تبدیل می‌گردند. مطالعات نشان داده است که در فرایند دفن بهداشتی[1]، ۸۵ درصد پلی‌هیدروکسی-آلکانات‌ها تجزیه می‌گردد. پلی‌هیدروکسی‌آلکانات‌ها از گستره وسیعی از مواد اولیه همچون منابع تجدید پذیر (ساکاروز، نشاسته، سلولز) و منابع فسیلی (متان، نفت خام، لیگنیت)، محصولات فرعی (ملاس، آب پنیر، گلیسرول)، اسیدهای آلی مثل (اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک) و دی اکسید کربن قابل استحصال می‌باشند.

۱-۴- بیان مسئله

تنوع گسترده مونومرها در پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها طیف وسیعی از پلیمرها با خواص فیزیکی متفاوت ایجاد کرده است. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات حالت ترد و شکننده داشته و دارای کاربرد بسیار کمی می‌باشد. پلی‌هیدروکسی‌آلکانات‌هایی که دارای زنجیره متوسط هستند خاصیت الاستیکی داشته و موادی سخت محسوب می‌گردند که برای تولید لاستیک بسیار مناسب می‌باشند. کوپلیمرهای پلی‌هیدروکسی‌آلکانات شامل هیدروکسی‌بوتیرات بهمراه زنجیره‌های بلندتر نظیر هیدروکسی‌والرات، هیدروکسی‌هگزانات یا هیدروکسی‌اوکتانات بوده و دارای انعطاف‌پذیری بیشتری بوده و دوام بالاتری دارند. این ترکیبات قابلیت مصرف در طیف وسیعی از تولیدات نظیر بطری، خودتراش، پوششهای ضد آب و بسته‌بندی مواد غذایی را دارا هستند (Hocking و Marchessault، ۱۹۹۴).

[1] Sanitary landfill

در این تحقیق توانایی باکتری *Cupriavidus necator* DSM 545 در تولید کوپلیمر هیدروکسی‌بوتیرات و والرات[1] با استفاده از منابع کربنی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. از جمله سوالاتی که سبب شروع این تحقیق گردید:

۱- آیا باکتری *Cupriavidus necator* توانایی تولید کوپلیمر را داراست؟

۲- تاثیر منابع مختلف کربن بر نوع و میزان کوپلیمر تولیدی چه میزان است؟

۳- نقش منابع نیتروژن و فسفر در تولید چگونه است؟

تحقیقات موجود نشان می‌دهد که استفاده از منابع ساده در تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها سبب تولید تنها یکی از منومرها شده و پلیمر ترکیبی یا کوپلیمر ایجاد نخواهد کرد، بنابراین ضروری است که منبع کربن بصورت مخلوط و ترکیبی استفاده گردد.

۱-۵- اهداف تحقیق

تحقیق حاضر در زمینه بررسی امکان تولید مواد سازگار با محیط‌زیست جهت کاهش اثرات منفی پلاستیکهای مشتق‌شده از نفت خام صورت گرفته است. این تحقیق همینطور می‌تواند راهگشای بسیاری از صنایع کشور، از جمله صنایع داروسازی و بسته‌بندی مواد غذایی باشد. در حال حاضر اینگونه مواد از کشورهای دیگر تهیه می‌گردد.

۱-۶- فرضیات

۱- میکروارگانیسم *Cupriavidus necator* توانایی تولید کوپلیمر از ترکیب منابع کربنی را داراست.

۲- افزایش غلظت منابع کربن و کاهش غلظت منابع نیتروژن و فسفر سبب افزایش تولید بیوپلیمر خواهد شد.

[1] Poly3hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate, (P3HB-co-P3HV)

فصل ۲

سابقه تحقیق

در این فصل به مروری بر منابع می‌پردازیم که دربرگیرنده میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها، منابع کربنی مورد استفاده، استفاده از گیاهان، منابع کربنی ارزان قیمت و همینطور تغییر نسبت بین منابع کربن، نیتروژن و فسفر می‌باشد. در ادامه به ویژگیهای فیزیکی، تخریب-پذیری و همینطور استفاده‌های صنعتی آنها پرداخته شده است.

۲-۱- میکروارگانیسم‌های تولیدکننده پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها

پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها[1] استرهای هیدروکسی‌آلکاناتها هستند که توسط تعدادی از باکتری‌ها بصورت ذخایر انرژی و کربن درون سلولی سنتز شده و بصورت گرانول در سیتوپلاسم سلولها تجمع می‌یابند (Lee و همکاران، ۱۹۹۹). پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات[2] اولین عضو خانواده پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها بوده که برای اولین بار در انستیتو پاستور توسط لمون[3] در سیتوپلاسم *Bacillus megaterium* کشف و فرمول کلی آن به صورت $(C_4H_6O_2)_n$ توصیف شد (Daws و Senior، ۱۹۷۳). مشاهده شده بود که *B. megaterium* در هنگام رشد در محیط کشت با محدودیت نیتروژن مقدار زیادتری از PHB را ذخیره می‌کند که نشان می-داد تولید PHB در پاسخ به شرایط نامتعادل جهت رشد حاصل می‌شود (Lenz و Marchessault، ۲۰۰۵). باکتریهایی که برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها مورد استفاده قرار می‌گیرند را به دو دسته می‌توان تقسیم‌بندی نمود: دسته اول شامل باکتریهایی هستند که برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانات، به کمبود یکی از عناصر ضروری نظیر نیتروژن، فسفر، منگنز و یا گوگرد به همراه کربن اضافی در محیط نیاز

[1] Polyhydroxyalkanoates (PHAs)
[2] Polyhydroxybutyrate (PHB)
[3] Lemoigne

دارند. از این گروه از باکتریها می‌توان به *Ralstonia eutrophus* ، *Protomonas extorquens* ، *Protomonas oleovorans* و *C. necator* اشاره نمود (Mallick، ۲۰۰۷). دسته دوم شامل باکتریهایی می‌باشند که به هیچ‌گونه کمبودی جهت تولید بیوپلیمر نیاز نداشته و همزمان با رشد قادر به تولید پلی-هیدروکسی‌آلکاناتها می‌باشند. از این گروه می‌توان به *Alcaligenes latus* و *Escherichia coli* اشاره نمود (Khanna و Srivastava، ۲۰۰۵). پلی‌هیدروکسی‌آلکانات بطور معمول پلیمری تولید می‌کند که $۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۴}$ منومر دارد که این منومرها بدون اینکه اثر سوء بر ارگانیسم‌ها داشته باشند در داخل سلولهای باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی تجمع می‌یابند (Khanna و Srivastava، ۲۰۰۵). جدول ۲-۱ برخی از میکروارگانیسم‌ها و منابع کربن مورد استفاده در تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها را نشان می‌دهد. محتوای پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها برحسب منبع کربن و نوع میکروارگانیسم مورد استفاده، متفاوت بوده و بین ۴۰ تا بیش از ۸۰ درصد متغیر است. یکی از متداولترین منابع برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها گلوکز است.

جدول ۲-۱- برخی از باکتریهای مورد استفاده در تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها (Khanna و Srivastava، 2005)

باکتری	نوع پلیمر	منبع کربن	درصد PHAs
Azotobacter vinelandii	P(3HB)	گلوکز و پپتون ماهی	۸۵
Alcaligenes latus	P(3HB)	ساکاروز	۸۸
Pseudomonas strain K	P(3HB)	متانول	٦٤
Recombinant *Escherichia coli* LB 1	P(3HB)	گلوکز	٧٦
Ralstonia eutropha	P(3HB)	گلوکز	٧٤
Chromobacterium violaceum	P(3HV)	اسید والریک	٦٥-٧٠
Pseudomonas putida	P(3HHx-co-3HO-co-3HD-co-3HDD-co-3HTD)	اسید اولئیک	٤٥
Recombinant *Pseudomonas putida*	P(3HB-co-3HV-co-4HVco-3HHx-co-3HO)	Octanoic acid + Levulinic	٤٣
Pseudomonas oleovorans	P(3HHx-co-3HO)	اکتان	٣٥-٤٠
Pseudomonas oleovorans	P(3HHx-co-3HO-co-3HD)	Glucanoic acid + Octanoic acid	٦٦

اما بجز این منبع، منابع متعدد دیگری نظیر اسید لاکتیک (Linko و Vaheri، ۱۹۹۳)، ترکیبی از اسید لاکتیک و اسید استیک (Tohyama و Shimizu، ۱۹۹۹) نیز برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تحقیقات نشان داده است که مقدار منبع کربن به تنهایی برای بیان نحوه تولید بیوپلیمر کافی نیست و لازم است تا عوامل متعدد دیگری نیز در این زمینه مورد بررسی قرار گیرند. در این ارتباط نسبت بین منابع کربن به نیتروژن (C/N) توانسته تا حدود بیشتری رشد میکروارگانیسم و شکل‌گیری بیوپلیمر را بیان کند (Khanna و Srivastava، ۲۰۰۵). بدین منظور تاکنون تحقیقات متعددی صورت گرفته است که در آن نسبت بین منابع کربن/نیتروژن/ فسفر و یا کربن/نیتروژن مورد بررسی واقع شده است. از جمله این تحقیقات می‌توان به مطالعه، Wang و همکاران (۲۰۰۷) اشاره نمود. آنها نسبت بین کربن و نیتروژن را بصورت ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۴۰ در نظر گرفتند. نتایج کار، نشان می‌داد که افزایش نسبت کربن به نیتروژن از ۲۰ الی ۸۰، سبب افزایش تولید بیوپلیمر در میکروارگانیسم *Alcaligenes latus* DSM 1124 شده است. مطالعه Lee و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از *C. necator* و روغن نخل و اسید پروپیونیک، اقدام به تولید بیوپلیمرهای هیدروکسی‌آلکانات نمودند. مهمترین عامل در تولید بیوپلیمر توسط این میکروارگانیسم، نسبت بین کربن به نیتروژن بود. در این مطالعه نسبت بین کربن به نیتروژن بین ۴۲ الی ۴۸ تنظیم گردیده بود. آنها نشان دادند که افزایش میزان نیتروژن در محیط، سبب کاهش تولید بیوپلیمر شده است. مطالعه Tian و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که نسبت کربن/ نیتروژن مناسب برای رشد و تولید بیوپلیمر بین ۲۰ الی ۴۰ است. نتایج آنها توسط مطالعه‌ای که اخیرا توسط Amirul و همکاران (۲۰۰۸) صورت گرفته نیز تایید شده است.

۲-۲- کوپلیمرهای هیدروکسی‌آلکانات

در شکل ۲-۱ ساختار شیمیایی پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها نشان داده شده است. تعداد اتمهای کربن در گروه آلکیلی از ۱ تا بیش از ۱۴ اتم کربن متغییر است و بر این اساس پلی‌هیدروکسی‌آلکاناتها به سه دسته زیر قابل تقسیم‌بندی هستند: