۱۹۸۸۷

به نام ایزد یکتا

۹۱۹۶۴

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده فنی و مهندسی
بخش مهندسی شیمی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد
مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی

بهینه سازی محیط کشت برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول

توسط:
علی حیدرزاده وظیفه خوران

استاد راهنما:
دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی

استاد مشاور:
دکتر سید عباس شجاع الساداتی

۱۳۸۷ /۷/ ۱۷

۱۳۸۷ /۷/ ۱۷

اسفند ماه ۸۶

۹۸۹۶۳

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان

آقای علی حیدرزاده وظیفه خوران پایان نامه ۸ واحدی خود را **با عنوان بهینه سازی محیط کشت برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات ازمتانول** در تاریخ ۱۳۸٦/۱۲/۲۵ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی پیشنهاد می کنند.

عضو هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضا
استاد راهنما	دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی	استاد	
استاد مشاور	دکتر سید عباس شجاع الساداتی	استاد	
استاد ناظر	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر فاطمه تابنده	استادیار	
مدیر گروه (یا نماینده گروه تخصصی)	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	

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 که 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 باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشد.

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 بر اساس آئین نامه های 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 بایدٌ 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 می شود.

۱۳۸۷ /۷/ ۱۷

نام و نام خانوادگی

امضاء

علی حیدرزاده وظیفه خوران

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم که تا این زمان زحمات فراوان و بی دریغی را در قبال من متحمل شده اند و نیز خانواده محترم و تمام کسانی که دوستشان دارم.

تقدیر و تشکّر

در ابتدا از راهنمایی ها و کمک های شایان جناب آقای دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی بی نهایت سپاسگزارم و نیز کمال قدردانی را از مساعدت های جناب آقای دکتر سید عباس شجاع الساداتی دارم. همچنین از همیاری و همفکری سرکار خانم مهندس زهرا بیگم مختاری نهایت تشکّر را دارم. در ضمن از زحمات بی دریغ سرکار خانم مهندس فاطمه تیموری، کارشناس محترم آزمایشگاه متشکّرم.

چکیده

قیمت بالای پلیمر های زیست تخریب پذیر مانعی بر سر راه تولید صنعتی آنها مـی باشـد. عوامـل عمده مؤثر بر هزینه تولید مربوط به سوبسترا و عملیات استخراج مـی باشـد. اسـتفاده از سوبـسترای ارزان و به دنبال آن بهینه سازی باعث پایین آمدن هزینه ها به میزان زیادی می شـود. یکـی از ایـن پلیمرهای زیستی، پلی هیدروکسی بوتیرات می باشد که بسیار مورد توجه قرار گرفته اسـت. در ایـن پژوهش از منبع کربن متانول به عنوان سوبسترای ارزان قیمت استفاده شد و روشهای آماری مختلف نیز برای شناسایی، غربالگری و بهینه سازی اجزای مؤثر برای افزایش تولید پلی هیدروکسی بـوتیرات به کار رفت. باکتری مورد بررسی از مجموعـه میکروارگانیـسمهای آزمایـشگاه بیوتکنولـوژی دانـشگاه تربیت مدرس انتخاب شد که توسط متانول جداسازی شده بود. اجـزای مـورد مطالعـه $(NH_4)_2SO_4$، KH_2PO_4، $Na_2HPO_4.12H_2O$، $MgSO_4.7H_2O$ و عناصر کم مقدار بودند. ابتدا از روش آماری پلاکت - برمن برای شناسایی عوامل مؤثر و تأثیر گذار بر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات استفاده شد. از بین پنج عامل یاد شده عناصر کم مقدار تأثیر قابل ملاحظه ای بر تولید نداشت و بنابراین در مراحل بعدی پژوهش در مقدار ۲/۵٪ حجمی ثابت در نظر گرفته شد. سپس بـا اسـتفاده از روش تـاگوچی و روش پاسخ سطح، بهینه سازی برای چهار عامل انجام شد و مشخص شد که توانایی، قابلیـت و دقـت روش پاسخ سطح نسبت به روش تاگوچی بسیار بالاتر و قابل اطمینان تر می باشد.

غلظت پلی هیدروکسی بـوتیرات در محـیط مبنـا برابـر ۰/۸ گـرم بـر لیتـر، بـرای شـرایط بهینـه پیشنهادی روش تاگوچی، برابر ۱/۰۵ گرم بر لیتر و در شرایط بهینـه روش پاسـخ سـطح بـا طراحـی ترکیب مرکزی برابر ۱/۴ گرم بر لیتر است. با توجه به مقادیر غلظت یاد شده ۳۰٪ افزایش در غلظـت پلی هیدروکسی بوتیرات با بهینه سازی توسط روش تاگوچی نسبت به محیط مبنـا، ۷۵٪ افـزایش در غلظت پلی هیدروکسی بوتیرات با بهینه سازی توسط روش پاسخ سطح نسبت به محیط مبنـا و ۳۳٪ افزایش در غلظت پلی هیدروکسی بوتیرات در نقطه بهینه روش پاسخ سطح نـسبت بـه نقطـه بهینـه روش تاگوچی مشاهده شد.

به طـور کلـی در ایـن مطالعـه مـشخص شـد کـه دو ترکیـب $Na_2HPO_4.12H_2O$ و $(NH_4)_2SO_4$ بیشترین تأثیر را بر روی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات داشتند. در مورد ماده $Na_2HPO_4.12H_2O$ با P و T به ترتیب ۰/۰۰۰ و ۶/۳۳ سطح بـالای آن بـسیار مـؤثر بـوده و کمبـود آن منجـر بـه کـاهش چشمگیر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات می شود. دلیل این کاهش کنترل pH توسط این ترکیب می باشد که به محیط خاصیت بافری می دهد. به احتمال زیاد اهمیت ایـن ترکیـب در مقیـاس بـالاتر از فلاسک یعنی در کشت ناپیوسته، ناپیوسته خوراک دهی شده و پیوسته بسیار پایین می آیـد زیـرا در

این مقیاس ها تنظیم pH به طور خودکار انجام می شود. در مورد ماده $(NH_4)_2SO_4$ با P و T به ترتیب ۰/۰۱۱ و ۲/۹۰- سطح منفی آن بیشترین تأثیر را بر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات داشت.
کلمات کلیدی: پلی هیدروکسی بوتیرات، متانول، بهینه سازی، پلاکت - برمن، روش تاگوچی، روش بهینه سازی پاسخ سطح، طراحی ترکیب مرکزی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۱
۱-۱- پلیمرهای زیست تخریب پذیر	۲
۱-۲- پلی هیدروکسی آلکانوات ها	۲
۱-۳- پلی هیدروکسی بوتیرات	۳
۱-۴- تولید زیستی پلی هیدروکسی بوتیرات	۳
۱-۵- اهداف پژوهش	۴
۱-۶- تنظیم نگارش پایان نامه	۴
فصل دوم: مرور ادبیات	۵
۲-۱- تاریخچه	۶
۲-۲- میکروارگانیسم	۷
۲-۲-۱- *رالستونیا اتروفا*	۷
۲-۲-۲- *آلکالیژنز لاتوس*	۸
۲-۲-۳- *ازتوباکتر وینلاندی*	۸
۲-۲-۴- متیلوتروف ها	۸
۲-۲-۵- *اشرشیا کلی* نوترکیب	۹
۲-۳- فرآیند تولید	۹
۲-۳-۱- کشت ناپیوسته	۹
۲-۳-۲- کشت ناپیوسته خوراک دهی شده	۹
۲-۳-۳- کشت پیوسته	۱۱
۲-۴- استخراج پلی هیدروکسی بوتیرات	۱۱
۲-۵- روشهای آنالیز و شناسایی پلی هیدروکسی بوتیرات	۱۲
۲-۵-۱- روشهای کروماتوگرافی	۱۲
۲-۵-۲- فلوسایتومتری	۱۳
۲-۵-۳- کدورت سنجی	۱۳
۲-۵-۴- NMR اسپکتروسکوپی	۱۳
۲-۵-۴- IR اسپکتروسکوپی	۱۳
۲-۵-۵- تعیین وزن مولکولی پلی هیدروکسی بوتیرات	۱۳
۲-۶- هزینه تولید پلی هیدروکسی بوتیرات	۱۳
۲-۷- متیلوتروف ها	۱۴
۲-۷-۱- تاریخچه	۱۵
۲-۷-۲- طبقه بندی متیلوتروف ها	۱۶

۲-۷-۳- متابولیسم متیلوتروف ها (متانول به عنوان منبع کربن) ۱۷
۲-۷-۴- شرایط رشد متیلوتروف ها ۲۱
۲-۷-۴-۱- ترکیب محیط کشت ۲۱
۲-۷-۴-۲- دما ۲۲
۲-۷-۴-۳- pH ۲۲
۲-۸- تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متیلوتروف ها ۲۲
۲-۸-۱- میکروارگانیسم ۲۶
۲-۸-۲- منبع کربن (متانول) ۲۶
۲-۸-۳- مسیر متابولیکی ۲۷
۲-۹- عوامل مؤثر بر رشد سلولی و تجمع پلی هیدروکسی بوتیرات ۲۸
۲-۹-۱- محدودیت مواد مغذی ۲۸
۲-۹-۲- سن تلقیح ۳۳
۲-۹-۳- حلالیت اکسیژن ۳۳
۲-۹-۴- عوامل دیگر ۳۳
۲-۱۰- وزن مولکولی پلی هیدروکسی بوتیرات ۳۴
۲-۱۰-۱- میکروارگانیزم ۳۴
۲-۱۰-۲- اثر منبع کربن و غلظت آن بر جرم مولکولی ۳۴
۲-۱۰-۳- اثر نوع محدودیت بر روی وزن مولکولی پلی هیدروکسی بوتیرات ۳۵
۲-۱۱- استفاده از روشهای آماری در طراحی آزمایش ۳۶
۲-۱۱-۱- روش پلاکت - برمن ۳۷
۲-۱۱-۲- روش تاگوچی ۳۸
۲-۱۱-۳- روش پاسخ سطح ۳۸
۲-۱۱-۳-۱- طراحی آزمایش برای برازش مدل درجه اول ۳۹
۲-۱۱-۳-۲- طراحی برای برازش مدل درجه دوم ۴۰
فصل سوم: مواد و روش ها **۴۲**
۳-۱- میکروارگانیسم ۴۳
۳-۲- محیط های کشت ۴۳
۳-۲-۱- محیط نگهداری ۴۳
۳-۲-۲- محیط‌کشت بذر ۴۳
۳-۲-۳- آماده‌سازی کشت بذر ۴۵
۳-۳- شرایط تخمیر ۴۶
۳-۳-۱- مطالعه سینتیک رشد ۴۶
۳-۳-۲- بررسی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات ۴۶
۳-۴- روشهای آنالیز ۴۷

۳-۴-۱- اندازه‌گیری میزان رشد باکتری ۴۷
۳-۴-۱-۱- روش جذب نوری ۴۷
۳-۴-۱-۲- تعیین وزن خشک سلولی ۴۷
۳-۴-۲- اندازه‌گیری مقدار پلی هیدروکسی بوتیرات به روش کروماتوگرافی گاز ۴۸
۳-۵- طراحی آزمایش ۴۹
۳-۵-۱- غربالگری اولیه اجزاء محیط کشت ۴۹
۳-۵-۲- تعیین محدودهٔ بهینه متغیرها ۵۱
۳-۵-۳- بهینه سازی ۵۳
فصل چهارم: نتایج و بحث **۵۶**
۴-۱- بررسی سینتیک رشد ۵۷
۴-۲- غربالگری اولیه با استفاده از روش پلاکت - برمن ۵۸
۴-۲-۱- تعیین عوامل مؤثر بر غلظت پلی هیدروکسی بوتیرات ۵۸
۴-۲-۲- تعیین اجزای مؤثر بر محتوای پلی هیدروکسی بوتیرات ۶۱
۴-۳- تعیین محدودهٔ بهینه متغیرها توسط روش تاگوچی ۶۳
۴-۳-۱- تعیین نقطه بهینه متغیرها برای غلظت پلی هیدروکسی بوتیرات ۶۳
۴-۳-۲- تعیین نقطه بهینه متغیرها برای محتوای پلی هیدروکسی بوتیرات ۶۶
۴-۴- بهینه سازی متغیرها توسط روش پاسخ سطح ۶۸
۴-۴-۱- بهینه سازی متغیرها برای غلظت پلی هیدروکسی بوتیرات ۶۸
۴-۴-۲- بهینه سازی متغیرها برای محتوای پلی هیدروکسی بوتیرات ۷۹
۴-۵- مقایسه میزان پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده در نقاط بهینه مربوط به تاگوچی و پاسخ سطح ۸۹
فصل پنجم: نتیجه گیری و پیشنهادها **۹۱**
۵-۱- نتیجه گیری ۹۲
۵-۲- پیشنهادها ۹۳
مراجع **۹۴**

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- تصویر شماتیک فرآیند ناپیوسته خوراک دهی شده به همراه تجهیزات جانبی ۱۰

شکل ۲-۲- درخت فیلوژنتیکی: روابط بین باکتریهای متانوتروف، متیلوتروف وغیر متیلوتروف ها ۱۸

شکل ۲-۳- متابولیسم ترکیبات تک کربنه توسط باکتریهای متیلوتروف ۱۹

شکل ۲-۴- مسیر ریبولوز مونوفسفات ۲۰

شکل ۲-۵- مسیر سرین ۲۰

شکل ۲-۶- بیوسنتز پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول توسط چرخه سرین ۲۷

شکل ۲-۷- منحنی رشد *سودوموناس* ۱۳۵ در محیط هایی با ترکیب درصد های مختلف ۳۱

شکل ۲-۸- منحنی رشد و تجمع پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط هایی با محدودیت های مختلف ۳۲

شکل ۴-۱- منحنی رشد میکرو ارگانیسم مورد مطالعه ۵۸

شکل ۴-۲- نمودار کانتور بین دو عامل A و B برای غلظت PHB در حالی که دو عامل C و D در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۷۲

شکل ۴-۳- نمودار کانتور بین دو عامل A و C برای غلظت PHB در حالی که دو عامل B و D در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۷۳

شکل ۴-۴- نمودار کانتور بین دو عامل A و D برای غلظت PHB در حالی که دو عامل B و C در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۷۴

شکل ۴-۵- نمودار کانتور بین دو عامل B و C برای غلظت PHB در حالی که دو عامل A و D در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۷۵

شکل ۴-۶- نمودار کانتور بین دو عامل B و D برای غلظت PHB در حالی که دو عامل A و C در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۷۶

شکل ۴-۷- نمودار کانتور بین دو عامل C و D برای غلظت PHB در حالی که دو عامل A و B در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۷۷

شکل ۴-۸- نمودار کانتور بین دو عامل A و B برای محتوای PHB در حالی که دو عامل C و D در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۸۳

شکل ۴-۹- نمودار کانتور بین دو عامل A و C برای محتوای PHB در حالی که دو عامل B و D در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۸۴

شکل ۴-۱۰- نمودار کانتور بین دو عامل A و D برای محتوای PHB در حالی که دو عامل B و C در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۸۵

شکل ۴-۱۱- نمودار کانتور بین دو عامل B و C برای محتوای PHB در حالی که دو عامل A و D در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۸۶

شکل ۴-۱۲- نمودار کانتور بین دو عامل B و D برای محتوای PHB در حالی که دو عامل A و C در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۸۷

شکل ۴-۱۳- نمودار کانتور بین دو عامل C و D برای محتوای PHB در حالی که دو عامل A و B در مقدار کد صفر ثابت نگه داشته شده اند ۸۸

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- درصد وزنی عناصر در باکتری های متیلوتروف ۲۱
جدول ۲-۲- نام و ترکیب درصد محیط های گوناگون برای رشد متیلوتروف ها ۲۳
جدول ۲-۳- تأثیر قیمت سوبسترا و بازده پلی هیدروکسی بوتیرات بر هزینه تولید ۲۴
جدول ۲-۴- اثر کمبود ترکیبات محیط کشت بر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات ۲۹
جدول ۳-۱- ترکیب درصد محیط کوی و همکاران ۴۴
جدول ۳-۲- متغیرهای مورد مطالعه در طراحی پلاکت - برمن برای غربالگری اولیه ۵۰
جدول ۳-۳- ماتریکس ۸ تایی پلاکت - برمن برای بررسی اثر ۵ متغیر ۵۰
جدول ۳-۴- مقادیر متغیرهای مورد مطالعه در طراحی آزمایش به روش تاگوچی ۵۲
جدول ۳-۵- آرایه L_9 تاگوچی برای بررسی اثر ۴ متغیر ۵۲
جدول ۳-۶- طراحی ترکیب مرکزی برای ۴ متغیر ۵۴
جدول ۳-۷- مقادیر متغیرها و سطوح مورد مطالعه در طراحی ترکیب مرکزی ۵۵
جدول ۴-۱- تغییرات جذب نوری با زمان ۵۷
جدول ۴-۲- غلظت PHB برای طراحی پلاکت - برمن با دو بار تکرار ۵۹
جدول ۴-۳- تحلیل نتایج غلظت PHB بر اساس طراحی پلاکت - برمن با دو بار تکرار ۶۰
جدول ۴-۴- میزان محتوای PHB برای طراحی پلاکت - برمن با دو بار تکرار ۶۱
جدول ۴-۵- تحلیل نتایج محتوای PHB بر اساس طراحی پلاکت - برمن با دو بار تکرار ۶۲
جدول ۴-۶- غلظت PHB بر اساس طراحی تاگوچی با دو بار تکرار ۶۳
جدول ۴-۷- تحلیل نتایج غلظت PHB بر اساس طراحی تاگوچی با دو بار تکرار ۶۴
جدول ۴-۸- نقطه بهینه به دست آمده توسط روش تاگوچی برای غلظت PHB ۶۵
جدول ۴-۹- میزان محتوای PHB برای طراحی تاگوچی با دو بار تکرار ۶۶
جدول ۴-۱۰- تحلیل نتایج محتوای PHB بر اساس طراحی تاگوچی با دو بار تکرار ۶۷
جدول ۴-۱۱- نقطه بهینه به دست آمده توسط روش تاگوچی برای محتوای PHB ۶۸
جدول ۴-۱۲- میزان غلظت PHB بر اساس طراحی ترکیب مرکزی با دو بار تکرار ۶۹
جدول ۴-۱۳- تحلیل نتایج غلظت PHB بر اساس طراحی ترکیب مرکزی با دو بار تکرار ۷۰
جدول ۴-۱۴- میزان واقعی غلظت پلی هیدروکسی بوتیرات در مقابل میزان به دست آمده از رابطه (۴-۲) ۷۱
جدول ۴-۱۵- مقدار واقعی و تئوری غلظت PHB برای نقاط پیش بینی شده توسط نرم افزار ۷۸
جدول ۴-۱۶- نقطه بهینه به دست آمده توسط روش پاسخ سطح برای غلظت PHB ۷۹
جدول ۴-۱۷- میزان محتوای PHB برای طراحی ترکیب مرکزی با دو بار تکرار ۸۰
جدول ۴-۱۸- تحلیل نتایج برای محتوای PHB مربوط به طراحی ترکیب مرکزی با دو بار تکرار ۸۱
جدول ۴-۱۹- میزان واقعی محتوای پلی هیدروکسی بوتیرات در مقابل میزان به دست آمده از معادله (۴-۳) ۸۲

فصل اول

مقدمه

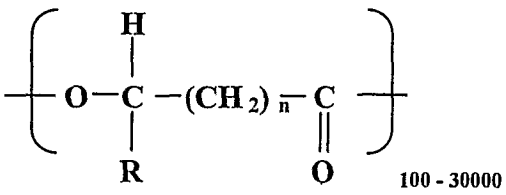
۱-۱- پلیمرهای زیست تخریب پذیر

استفاده از پلیمرها و پلاستیک ها در اغلب وسایل انسان از ریزترین آنها گرفته تا بزرگترین آنها انکار ناپذیر است. دلیل این استفاده وافر پلیمرها و پلاستیک ها در زندگی انسان خواص بسیار زیاد آنها می باشد. مصرف سرانه پلاستیک در اروپا ۶۰ کیلوگرم و در آمریکا ۸۰ کیلوگرم در سال است [۱]. علیرغم فواید فراوان پلیمرها و پلاستیک ها، استفاده از آنها باعث معضلات زیست محیطی فراوان شده است و همین امر باعث شده است که بشر به فکر تولید پلیمرهای زیست تخریب پذیر و تخریب زیستی پلیمرها و پلاستیک ها بیافتد.

پلیمرهای زیست تخریب پذیر زیادی شناسایی شده اند و یکی از مهمترین آنها پلی هیدروکسی آلکانوات ها می باشد. استفاده از این گروه پلیمرهای زیست تخریب پذیر در کشاورزی و صنایع دارویی و غیره بسیار مورد توجه قرار گرفته است که دلیل آن سازگاری با محیط زیست و سامانه های حیاتی می باشد [۲، ۳].

۱-۲- پلی هیدروکسی آلکانوات ها

این ترکیبات پلیمرهای زیست تخریب پذیر هستند و به صورت ذرات درون سلولی در میکروارگانیسم های مختلف تشکیل می شوند [۴]. وزن مولکولی این پلیمرها در محدوده ۲×۱۰^{۵} تا ۳×۱۰^{۶} دالتون می باشد. وزن مولکولی بر حسب نوع میکروارگانیسم و شرایط رشد تغییر می کند [۵]. ساختمان پلی هیدروکسی آلکانوات در زیر دیده می شود [۳، ۶].



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)
n = 3	R = hydrogen	→	Poly(5- hydroxyvalerate)

۱-۳- پلی هیدروکسی بوتیرات

یکی ازمهمترین پلی هیدروکسی آلکانوات ها، پلی هیدروکسی بوتیرات است. پلی هیدروکسی بوتیرات یک پلیمر خطی از ۳-هیدروکسی بوتیرات است و در اندازه های مختلفی از ذرات در داخل سلول موجود است. پلی هیدروکسی بوتیرات به عنوان یک منبع ذخیره انرژی و کربن برای میکروارگانیزم می باشد و تحت شرایطی مثل محدودیت نیتروژن، فسفر، اکسیژن، یون ها و غیره در داخل سلول تجمع می یابد و با رفع این محدودیت ها پلی هیدروکسی بوتیرات تجزیه می شود. پلی هیدروکسی بوتیرات جامد به عنوان یک پلی استر ترموپلاستیک زیست تخریب پذیر مورد توجه قرار گرفته است زیرا خواص شبیه به خواص تعداد زیادی از پلاستیک های سنتزی معمولی دارد [۷، ۸].

پلی هیدروکسی بوتیرات دارای خواص فیزیکی و شیمیایی شبیه به پلی اتیلن و پلی پروپیلن است و مانند پلاستیکهای معمولی در زمینه های متعددی قابل استفاده است. به عنوان مثال می توان آن را قالب ریزی کرد، توسط پرکن های غیر آلی تقویت کرد، به صورت رشته هایی به هم تابید یا به شکل ورق درآورد و دارای خواص آب بندی عالی است [۹].

۱-۴- تولید زیستی پلی هیدروکسی بوتیرات

باکتری های زیادی در سیتوپلاسمشان، پلیمرهای زیست تخریب پذیر با خواص ترموپلاستیکی مشابه با پلاستیک های معمولی تولید می کنند. این پلیمرها زیست تخریب پذیر می باشند و بنابراین می توان از آنها برای ساخت برخی پلاستیک ها استفاده کرد [۷، ۸].

در بیشتر باکتریها پلی هیدروکسی آلکانوات ها به صورت ذرات درون سلولی، تحت شرایط نامناسب رشد سنتز و انباشته می‌شود. بالغ بر ۳۰۰ نوع باکتری شناخته شده‌اند که قادر به سنتز پلی هیدروکسی آلکانوات ها می‌باشند [۴].

باکتری های زیادی توانایی سنتز پلی هیدروکسی بوتیرات را از منابع کربن مختلف دارند. سوبستراهای مورد استفاده برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات معمولا گلوکز ، ساکارز و اسیدهای چرب می باشند. هرچند برای تولید کاربردی و عملی نیاز به منبع کربن ارزانتر داریم تا هزینه تولید را کاهش دهیم. پلی هیدروکسی بوتیرات را می توان از سوبستراهای نسبتا ارزان مانند متانول، دی اکسید کربن و ملاس چغندر یا اتانول تولید کرد [۱۰].

هزینه تولید پلی هیدروکسی بوتیرات و پلی استرهای مشابه چندین برابر پلاستیک های معمولی است و همین مانع جدی در استفاده از این مواد در مقیاس وسیع و صنعتی می باشد. هزینه های سوبسترا و استخراج، دو عامل مهم در هزینه بالای این نوع پلیمرها است. یکی از راه های پایین آوردن هزینه استفاده از سوبستراهای ارزان است. متانول یکی از سوبستراهای مناسب برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات است و هزینه ها را تا مقدار مطلوبی کاهش می دهد[۱۱، ۱۲].

برای پایین آوردن بیشتر هزینه تولید پلی هیدروکسی بوتیرات بهینه سازی محیط کشت برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات بسیار مورد توجه قرار گرفته است و با استفاده از تجزیه و تحلیل نتایج آزمایشگاهی توسط روش های آماری می توان به محیط کشت بهینه دست یافت [۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵].

۱-۵- اهداف پژوهش

همانطور که در بخش ۱-۴ بیان شد، متانول یکی از سوبستراهای ارزان برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات می باشد و بهینه سازی محیط کشت منجر به افزایش تولید و کاهش هزینه ها می شود. لذا هدف از انجام این پژوهش بهینه سازی محیط کشت با استفاده از روش های آماری طراحی آزمایش ها برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول توسط باکتری های جدا شده از خاک مناطق نفت خیز جنوب (مسجد سلیمان و دره خرسان) است.

۱-۶- تنظیم نگارش پایان نامه

پس از معرفی مقدماتی پلی هیدروکسی آلکانوات ها و تعیین اهداف این پژوهش در فصل اول، مرور ادبیات مربوط به تولید میکروبی پلیمرهای زیست تخریب پذیر پلی هیدروکسی آلکانوات ها با تأکید بر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول توسط باکتری های متیلوتروف در فصل دوم انجام گرفته است. در فصل سوم روش های آزمایشگاهی و دستگاه های مورد استفاده برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از متانول توسط باکتری های جدا شده از خاک مناطق نفت خیز جنوب (مسجد سلیمان و دره خرسان) تشریح شده است. نتایج حاصل از آزمایش ها و تجزیه و تحلیل این نتایج در فصل چهارم بیان شده است. سر انجام در فصل پنجم نتیجه گیری کلی از این پژوهش و پیشنهادها برای ادامه کار ارائه شده است.

فصل دوم

مرور ادبیات

۲-۱- تاریخچه

پلی هیدروکسی بوتیرات درسال ۱۹۲۵ توسط لمون[1] در انستیتو پاستور پاریس در سیتوپلاسم *باسیلوس مگاتریم*[2] کشف شد [۱۶-۳]. درسال۱۹۵۸ ویلیامسون و ویلکینسون[3] وزن مولکولی و خواص فیزیکی آن را تعیین نمودند و درهمان سال مک رایی[4] و ویلکینسون مشاهده نمودند که انباشت پلی هیدروکسی بوتیرات درون سلول با کمبود نیتروژن درمحیط کشت فزونی می یابد [۱۶].

دراوایل دهه ۱۹۶۰ وربر[5] و باپتیست[5] تولید کمی پلی هیدروکسی بوتیرات با اهداف تجاری را شروع نمودند. البته به دلیل مشکلاتی رها شد و تولید این پلیمر در مقیاس صنعتی تا یک دهه به تأخیر افتاد [۱۶].

درسال ۱۹۶۸ باکتری *رالستونیا اوتروفا*[6] که قادر به تولید و تجمع پلی هیدروکسی بوتیرات تا بیش از ۷۰٪ وزن خشک سلولی است معرفی شد [۱۷]. در سال ۱۹۷۶ پلی هیدروکسی بوتیرات ازباکتری *ازتوباکتر بیجرینکی*[7] در محیط کشت عاری از آمونیوم و با منبع کربن گلوکز بدست آمد [۱۸]. روش شناسایی پلی هیدروکسی بوتیرات توسط کروماتوگرافی گازی درسال ۱۹۷۸ منتشر گردید [۱۹]. درسال ۱۹۸۱ هلمز[8] و همکارانش فرآیند تولید زیستی کوپلیمرهای پلی هیدروکسی بوتیرات ازمنابع کربن متفاوت را توسط *رالستونیا اتروفا* ارائه نمودند [۱، ۱۶]. درسال ۱۹۸۶ پلی هیدروکسی بوتیرات در فرآیند ناپیوسته خوراک دهی شده و توسط باکتریهای متانوتروف تولید شد [۲۰]. بالاخره درسال ۱۹۹۰ کمپانی ولا[9] در آلمان اولین بطری زیست تخریب پذیر را برای بسته بندی شامپو تولید کرد [۱۶].

---

1 - Lemogine
2 - *Basillus megateriom*
3 - Williamson and Wilkinson
4 - Mc Rae
5 - Waarber and Babtist
6 - *Ralstonia eutropha*
7 - *Azetobacter beijrinki*
8 - Holmes
9 - Wella