



پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری (بیوتکنولوژی) - گرایش میکروبی

عنوان:

**تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات توسط باکتری *Ralstonia eutropha H16*
از پساب کارخانجات صنعتی**

استادان راهنما

دکتر منصور مشرقی

دکتر محمدرضا حسین دخت

گردآورنده

مهديه سرگل زایی

اسفند ۱۳۹۲

چکیده

پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) یک پلیمر قابل تجزیه با کاربردهای فراوان در پزشکی و صنعت می باشد. بنابراین امروزه توجه زیادی به این نوع پلیمر شده است. قیمت این پلیمر ها در مقایسه با پلاستیک های سنتز شده پتروشیمیایی بسیار بالاست و تولید آنها را دچار مشکل کرده است. قسمت عمده ای از هزینه تولید PHB مربوط به فرایند تخمیر ، سوبسترا و استخراج محصول درون سلولی است. بطوریکه حدود ۳۵٪ قیمت تمام شده مربوط به منبع کربن و ۴۰٪ آن مربوط به فرایند های استخراج و جداسازی می باشد. با توجه به اهمیت تولید این دسته از بیوپلیمر ها ، ارائه راه کارهایی به منظور کاهش هزینه های تولید آنها امری ضروری بنظر می رسد.

هدف اصلی این پژوهش بهینه سازی فرایند تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از سوبسترای ارزان قیمت به منظور کاهش هرچه بیشتر هزینه های تولید است. بدین منظور در ابتدا سوبستراهایی انتخاب شد (پساب شیر ، آب پنیر ، پساب گلاب و پساب رب) که به میزان زیاد در دسترس می باشند. عمل تخمیر با بکارگیری ترکیبی از سوبستراهای ارزان قیمت و محیط کشت LB (۶۰٪ پساب + ۴۰٪ محیط کشت) در حضور ریز سازواره *Ralstonia eutropha H16* (سویه معرفی شده صنعتی) انجام گرفت. با توجه به اینکه در ترکیب سوبستراهای انتخاب شده (پساب شیر ، آب پنیر ، پساب گلاب و پساب رب) فاکتور های موثر برای رشد و تولید پلیمر PHB موجود می باشد. لذا در ترکیب محیط کشت تخمیری از منابع نمک های معدنی و سایر افزودنی ها که هزینه ی تولید را بالا می برد به میزان بسیار اندک استفاده شده است.

تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با چندین روش مانند رنگ آمیزی سودان و نارنجی آکریدین تایید گردید و پلیمر مربوطه تحت میکروسکوپ نوری و فلورسانس مشاهده گردید. دستگاه FTIR نیز برای تشخیص پیک حضور پلیمر مورد استفاده قرار گرفت. فاکتورهای متعددی برای بهینه سازی تولید PHB در پساب شیر در نظر گرفته شد مانند: pH (۷ ، ۸ ، ۹ ، ۱۰) دمای (۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس) هوادهی (۱۵۰ و ۲۰۰ rpm) و نسبت کربن به نیتروژن (۱/۱ ، ۱/۴ و ۱/۸). نهایتاً بعد از بدست آمدن شرایط بهینه برای تولید PHB ، تاثیر میدان مغناطیسی ۰/۳ تسلا بر افزایش میزان تولید PHB مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید پلیمر توسط پساب شیر در دمای ۳۷ درجه و pH ، ۹ و میزان هوادهی 200rpm و نسبت منبع نیتروژن به کربن (N/C): 1/4 به میزان 2.47g/L تولید گشت.

در شرایط محدودیت منبع نیتروژن این میزان با 5% افزایش به 2.91g/L رسید. تحت شرایط میدان مغناطیسی میزان تولید پلیمر به شدت افزایش یافته و به 4.42g/L رسید.

کاهش هزینه های استخراج این محصول درون سلولی یکی از راهبردهای مهم در کاهش قیمت تمام شده PHB می باشد. با افزایش درصد پلیمر در سلول هزینه ی بازیافت به نحو چشمگیری کاهش می یابد. با اعمال میدان مغناطیسی خارجی به محیط کشت درصد پلیمر در سلول به میزان 28% افزایش یافت. این افزایش تجمع، به نحو چشمگیری در کاهش هزینه فرایند جداسازی موثر خواهد بود.

کلمات کلیدی: پلی هیدروکسی بوتیرات، پساب کارخانجات، پلیمرهای زیست تخریب پذیر، بهینه سازی، میدان مغناطیسی

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات

۲	۱-۱ مقدمه.....
۳ (Bustami, Chan et al. 2000)
۴	۲-۱ هزینه های تولید پلی هیدروکسی آلکانوات ها(PHAs)
۵	۳-۱ تاریخچه تولید پلی هیدروکسی آلکانوات ها(PHAs).....
۹	۴-۱ ساختار و تقسیم بندی پلی هیدروکسی آلکانوات ها.....
۹	۱-۴-۱ ساختار PHA.....
۱۰	۲-۴-۱ تقسیم بندی پلیمر های PHAs.....
۱۱	۳-۴-۱ هموپلیمر های PHAs
۱۱	۴-۴-۱ پلی ۳-هیدروکسی بوتیرات P(3HB).....
۱۱	۵-۴-۱ پلی ۴-هیدروکسی بوتیرات P(4HB).....
۱۲	۶-۴-۱ پلی ۳-هیدروکسی والرات P(3HV).....
۱۲	۷-۴-۱ پلی ۳-هیدروکسی هگزانوات P(3HHX).....
۱۲	۸-۴-۱ کوپلیمر های PHAs
۱۲	۵-۱ بیوسنتز و مسیرهای متابولیکی PHAs.....
۱۲	۱-۵-۱ مراحل بیوسنتز PHB.....
۱۴	۲-۵-۱ مسیر های متابولیکی بیوسنتز PHA.....
۱۵	۳-۵-۱ متابولیسم تجمع PHA در سلول.....
۱۶	۴-۵-۱ تخریب درون سلولی PHB.....
۱۷	۵-۵-۱ سینتیک تولید PHAs.....
۱۷	۶-۵-۱ خواص فیزیکی و مکانیکی PHAs.....
۱۹	۷-۵-۱ زیست تخریب پذیری PHAs در طبیعت.....
۲۰	۸-۵-۱ کاربردهای PHAs
۲۲	۶-۱ سوبسترا ها و ریز سازواره ها در تولید تخمیری PHAs.....
۲۳	۷-۱ انواع سامانه های تخمیری در تولید PHAs.....

۲۳	۱-۷-۱ سامانه ناپیوسته
۲۳	۱-۱-۷-۱ سامانه های ناپیوسته خوراک دهی شده
۲۳	۲-۷-۱ سامانه های پیوسته
۲۴	۸-۱ مواد خام اولیه برای تولید صنعتی PHAs
۲۵	۹-۱ فرایندهای پایین دستی تولید PHAs
۲۵	۱-۹-۱ گسستن دیواره سلولی
۲۶	۲-۹-۱ روش های مکانیکی
۲۶	۳-۹-۱ شوک اسمزی
۲۶	۴-۹-۱ تیمار فیزیکی
۲۶	۵-۹-۱ استفاده از سیال فوق بحرانی
۲۷	۶-۹-۱ استخراج آنزیمی
۲۷	۷-۹-۱ روش الیزا در انحلال دیواره سلولی
۲۸	۸-۹-۱ کافت دیواره سلولی با استفاده از باکتریوفاژها
۲۸	۹-۹-۱ روش مهندسی ژنتیک در کافت دیواره سلولی (گسستن خودبخودی)
۲۸	۱۰-۹-۱ روش های استخراج با حلال
۲۹	۱-۱۰-۹-۱ استخراج با حلال های آلی
۲۹	۲-۱۰-۹-۱ استخراج با هیپوکلریت سدیم (آب ژاول)
۳۰	۳-۱۰-۹-۱ استخراج مشترک با هیپوکلریت سدیم و کلروفرم
۳۱	۴-۱۰-۹-۱ استخراج PHA در مقیاس صنعتی به روش حلال
۳۱	۵-۱۰-۹-۱ روش های جداسازی و خالص سازی PHAs
۳۲	۱۰-۱ تولید PHB از سوپستراهای ارزان قیمت
۳۳	۱۱-۱ تأثیر میدان مغناطیسی بر روی سیستم های زیستی
۳۴	۱۲-۱ روش طراحی آزمایش برای بهینه کردن مراحل مختلف فرایند زیستی
۳۶	۱۳-۱ اهداف پژوهش

فصل دوم: مواد و روش ها

۳۸	۱-۲ مواد و وسایل
----	------------------

۳۸	۱-۱-۲ ریز سازواره
۳۸	۲-۱-۲ وسایل و مواد مورد استفاده
۳۹	۲-۲ استریل کردن وسایل:
۳۹	۳-۲ فعال سازی ریز سازواره
۴۰	۴-۲ شناسایی ریز سازواره
۴۰	۱-۴-۲ مشخصات ماکروسکوپی
۴۰	۲-۴-۲ رنگ آمیزی گرم
۴۱	۳-۴-۲ رنگ آمیزی سودان سیاه
۴۱	۴-۴-۲ روش رنگ آمیزی فلورسنس (آکریدین اورنج) :
۴۱	۵-۲ محیط های کشت
۴۱	۱-۵-۲ محیط کشت نگهداری باکتری
۴۲	۲-۵-۲ محیط کشت محدودیت نیترژن
۴۲	۶-۲ تهیه بانک سلولی
۴۲	۷-۲ تاثیر پساب کارخانجات صنعتی (به عنوان منبع کربن) بر روی تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات :
۴۳	
۴۳	۱-۷-۲ طریقه جمع آوری پساب کارخانجات صنعتی :
۴۴	۲-۷-۲ تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از پساب کارخانه شیر به عنوان منبع کربن:
۴۵	۳-۷-۲ تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از آب پنیر به عنوان منبع کربن:
۴۵	۴-۷-۲ تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از پساب گلاب به عنوان منبع کربن:
۴۶	۵-۷-۲ تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از پساب رب به عنوان منبع کربن:
۴۶	۸-۲ تعیین شرایط بهینه توسط روش تک عاملی یا یک عامل در یک زمان :
۴۶	۱-۸-۲ تاثیر تنظیم pH محیط کشت بر رشد باکتری و تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر:
۴۶	۲-۸-۲ تاثیر تنظیم دمای محیط کشت بر رشد باکتری و تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر:
۴۷	
۴۷	۳-۸-۲ تاثیر تنظیم میزان هوادهی(شدت تکان دهی) بر محیط کشت بر رشد باکتری و تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر:

- ۴-۸-۲ تاثیر تنظیم نسبت نیتروژن به کربن محیط کشت بر رشد باکتری و تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر: ۴۸
- ۹-۲ تولید پلیمر PHB طی کشت دو مرحله ای (شرایط محدودیت نیتروژن): ۴۸
- ۱۰-۲ تاثیر میدان مغناطیسی (۳. تسلا) بر روی تولید PHB: ۴۸
- ۱۱-۲ طریقه رسم منحنی رشد باکتری R. eutropha H16 ۴۹
- ۱۲-۲ وزن خشک سلولی ۵۰
- ۱۳-۲ استخراج PHB از درون سلول باکتری ۵۰
- ۱۴-۲ تایید تولید PHB با استفاده از FTIR ۵۲
- ۱۵-۲ تعیین شرایط بهینه توسط روش آماری: ۵۳

فصل سوم: نتایج

- ۱-۳ شناسایی ریز سازواره ۵۶
- ۱-۱-۳ مشخصات ماکروسکوپی ۵۶
- ۲-۱-۳ رنگ آمیزی گرم ۵۷
- از این روش رنگ آمیزی به منظور شناسایی نوع باکتری و اطمینان از آلوده نبودن محیط کشت به سایر باکتری ها، استفاده شد براساس رنگ آمیزی گرم این سویه جزء باکتری های گرم منفی کوکسی یا میله ای می باشد ۵۷
- ۳-۱-۳ منحنی رشد باکتری (*Ralstonia eutropha* (PTTC1615) در محیط کشت استاندارد ۵۷
- ۴-۱-۳ رنگ آمیزی سودان سیاه ۵۷
- ۲-۳ تأیید تولید PHB با استفاده از FTIR ۵۸
- ۳-۳ تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از پساب کارخانجات صنعتی (پساب کارخانه شیر ، آب پنیر، پساب کارخانه گلاب ، پساب کارخانه رب) به عنوان منبع کربن: ۵۹
- ۴-۳ نتایج حاصل از بهینه کردن تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در باکتری R.eutropha توسط روش تک عاملی ۶۱
- ۱-۴-۳ تاثیر تنظیم pH محیط کشت بر روی تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر : ۶۱

- ۲-۴-۳ تاثیر تنظیم دمای محیط کشت بر روی تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر: ۶۳
- ۳-۴-۳ تاثیر تنظیم میزان هوادهی (شدت تکان دهی) بر محیط کشت بر رشد باکتری و تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر: ۶۵
- ۴-۴-۳ تاثیر تنظیم نسبت نیتروژن به کربن محیط کشت بر رشد باکتری و تولید پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات در محیط کشت حاوی پساب کارخانه شیر: ۶۶
- ۵-۳ مقایسه تولید پلیمر در محیط کشت استاندارد و محیط حاوی پساب شیر در کشت دو مرحله ای (محدودیت نیتروژن) :..... ۶۸
- ۶-۳ تاثیر میدان مغناطیسی (۳/ تسلا) بر روی تولید PHB :..... ۷۰
- ۷۱
- ۷-۳ بدست آمدن شرایط بهینه توسط روش آماری پاسخ سطح :..... ۷۲

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

- ۱-۴ مقدمه :..... ۷۸
- ۲-۴ تولید و بهینه سازی پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات :..... ۷۹
- ۳-۴ اثر میدان مغناطیس بر تولید پلیمر PHB :..... ۸۳
- ۴-۴ بهینه سازی با روش پاسخ سطح :..... ۸۴
- ۵-۴ نتیجه گیری کلی :..... ۸۶
- ۶-۴ سهم این پژوهش در ایجاد دانش :..... ۸۷
- ۷-۴ پیشنهادها :..... ۸۷
- منابع..... ۸۸

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱: خانواده پلی استرهای زیست تخریب پذیر..... ۳
- شکل ۱-۲: ساختمان عمومی پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها (Lee 1996)..... ۹
- شکل ۱-۳: تصاویر میکروسکوپ الکترونی (TEM) از تجمع ذرات PHA در سلول باکتری (مقیاس یک میکرون است) (Noda, Lindsey et al. 2010)..... ۱۰
- شکل ۱-۴: شمای کلی مسیر متابولیکی بیوسنتز PHB از منابع کربن وابسته (Lee and Choi 1999)..... ۱۴
- شکل ۱-۵: نمونه هایی از کاربرد PHA در صنایع بسته بندی، دارویی و پزشکی (Steinbüchel 1991)..... ۲۱
- شکل ۱-۶: الف) حمله باکتریوفاژ لامبدا به سلول باکتری (ب) نحوه متلاشی شدن باکتری و خروج مواد درون سلولی..... ۲۸
- شکل ۲-۱: محیط و ظرف نمونه برداری از پساب..... ۴۴
- شکل ۲-۲: تصویر دستگاه ایجاد کننده میدان مغناطیس..... ۴۹
- شکل ۲-۳: رسوب حاصل از توده سلولی باکتری *R. eutropha* H16..... ۵۰
- شکل ۲-۴: الف) محلول سلول و هیپوکلریت سدیم (ب) محلول سلول و کلروفرم (ج) پلیمر PHB..... ۵۲
- شکل ۲-۵: دستگاه بررسی طیف FTIR..... ۵۳
- شکل ۳-۱: تصویر پلیت حاوی کلنی باکتری..... ۵۶
- شکل ۳-۲: منحنی رشد باکتری در محیط کشت استاندارد..... ۵۷
- شکل ۳-۳: رنگ آمیزی سودان سیاه..... ۵۸
- شکل ۳-۴: تصویر گروه های عاملی پلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات..... ۵۸
- شکل ۳-۵: نمودار FTIR برای تأیید تولید پلیمر PHB..... ۵۹
- شکل ۳-۶: بررسی کیفی تولید پلیمر طی رنگ آمیزی فلورسنت (a) پساب رب (b) پساب گلاب (c) پساب آب پنیر (d) پساب شیر..... ۶۰
- شکل ۳-۷: بررسی کمی تولید پلیمر PHB توسط پساب ارزان قیمت..... ۶۱
- شکل ۳-۸: بررسی کیفی تولید پلیمر طی رنگ آمیزی فلورسنت (a) در pH=7 (b) pH=8 (c) pH=9 (d) pH=10..... ۶۲
- شکل ۳-۹: بررسی کمی تولید پلیمر در pH های متفاوت (pH=7,8,9,10)..... ۶۳
- شکل ۳-۱۰: بررسی کیفی تولید پلیمر طی رنگ آمیزی فلورسنت (a) دمای ۳۰ درجه (b) دمای ۳۷ درجه..... ۶۴
- شکل ۳-۱۱: بررسی کمی تولید پلیمر در دماهای متفاوت (دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد)..... ۶۴
- شکل ۳-۱۲: بررسی کیفی تولید PHB طی رنگ آمیزی فلورسنت (a) میزان هوادهی ۲۰۰ (b) میزان هوادهی ۱۵۰..... ۶۵
- شکل ۳-۱۳: بررسی کمی تولید PHB طی شرایط هوادهی مختلف..... ۶۶

- شکل ۳-۱۴: بررسی کیفی تولید PHB طی رنگ آمیزی فلورسنت تحت شرایط مختلف نسبت منبع نیتروژن به کربن (a) نسبت منبع نیتروژن به کربن $n/c=1/1$ (b) نسبت منبع نیتروژن به کربن $n/c=1/4$ (c) نسبت منبع نیتروژن به کربن $n/c=1/8$ ۶۷
- شکل ۳-۱۵: بررسی کمی تولید PHB در نسبت های متفاوت N/C (1/1 , 1/4 , 1/8) ۶۸
- شکل ۳-۱۶: (a) تولید PHB توسط باکتری در شرایط استاندارد (b) تولید PHB در حضور پساب شیر. طی رنگ آمیزی فلورسنت ۶۹
- شکل ۳-۱۷: مقایسه وزن توده سلولی و وزن پلیمر در شرایط معمولی کشت تک مرحله ای (۱: محیط کشت استاندارد , ۲: محیط کشت حاوی پساب) ۶۹
- شکل ۳-۱۸: مقایسه وزن توده سلولی و وزن پلیمر در کشت دو مرحله محدودیت نیتروژن (۱: محیط کشت استاندارد ۲: محیط کشت حاوی پساب) ۷۰
- شکل ۳-۱۹: مقایسه وزن توده سلولی و وزن پلیمر در شرایط معمولی کشت تک مرحله ای (۱: محیط کشت استاندارد , ۲: محیط کشت حاوی پساب) ۷۱
- شکل ۳-۲۰: مقایسه وزن توده سلولی و وزن پلیمر در شرایط میدان مغناطیسی (۱: محیط کشت استاندارد , ۲: محیط کشت حاوی پساب شیر) ۷۱
- شکل ۳-۲۱: بررسی کیفی تولید PHB طی رنگ آمیزی فلورسنت تحت شرایط میدان مغناطیسی $3T$ (a) محیط کشت ۷۲
- شکل ۳-۲۲: بررسی میزان تولید پلیمر PHB بر اساس طراحی Box behnken (تعیین مقدار بهینه پلیمر PHB در شرایط نسبت N/C و pH متغیر) ۷۴
- شکل ۳-۲۳: بررسی میزان تولید پلیمر PHB بر اساس طراحی Box behnken (تعیین مقدار بهینه پلیمر PHB در شرایط pH و میزان هوادهی متغیر) ۷۶

فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۱: تأثیر قیمت سوبسترا و بازده PHB بر هزینه تولید (Liebergesell, Hustede et al. 1991)..... ۵
- جدول ۱-۲: ترکیب محدود کننده موثر در تجمع PHA درون باکتری های مختلف..... ۱۶
- جدول ۱-۳: خواص فیزیکی و مکانیکی پلیمر های PHA در مقایسه با پلیمر های سنتزی..... ۱۸
- جدول ۱-۴: ریزسازواره ها, سوبستراها و سامانه های تخمیری در تولید PHA..... ۲۲
- جدول ۱-۵: مقایسه میزان PHAs تولید شده در دو سامانه ناپیوسته خوراک دهی شده و مداوم..... ۲۴
- جدول ۱-۶: انواع سوبسترا های ارزان قیمت در فرایند تخمیری PHA..... ۳۳
- جدول ۲-۱: وسایل و دستگاه های مورد استفاده در پژوهش..... ۳۸
- جدول ۲-۲: مواد مورد استفاده در پژوهش..... ۳۹
- جدول ۲-۳: ترکیبات محیط کشت LB..... ۴۲
- جدول ۲-۴: مشخصات کمی و کیفی پساب کارخانه تولید پودر شیر..... ۴۵
- جدول ۲-۵: طراحی آزمایش Box Behnken..... ۵۴
- جدول ۳-۱: میزان تولید PHB توسط طراحی آزمایش Box Behnken..... ۷۳
- جدول ۴-۱: میزان درصد تجمع PHB تحت شرایط محدودیت یک ماده غذایی و نیز شرایط کشت حاوی پساب..... ۸۲
- جدول ۴-۲: مقایسه مقادیر حقیقی و پیش بینی شده برای غلظت PHB..... ۸۴

فصل اول

کلیات

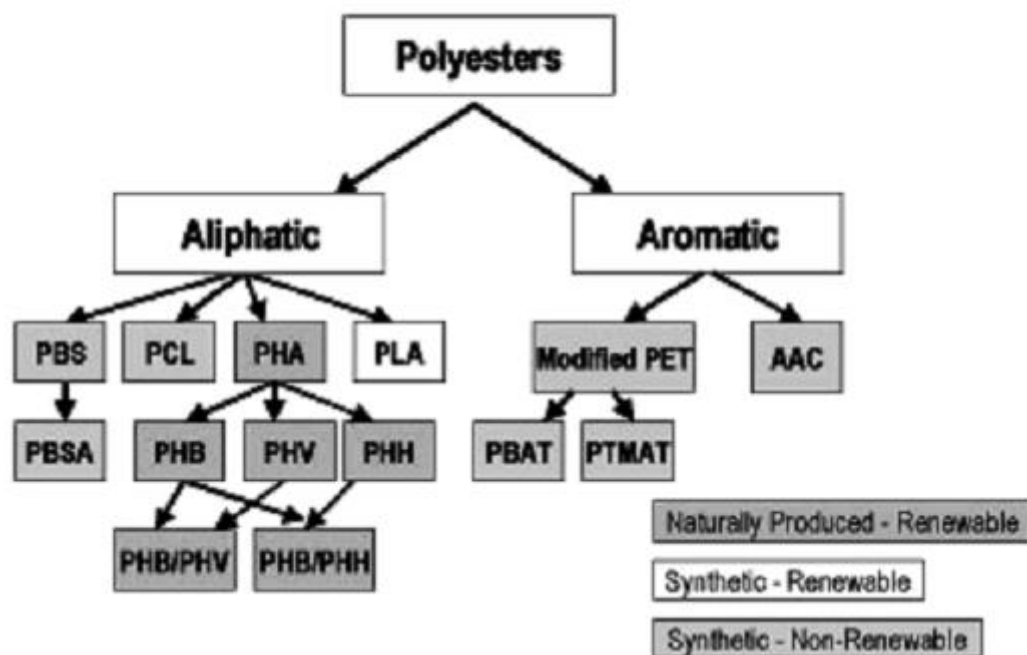
۱-۱ مقدمه

امروزه استفاده از مواد پلاستیکی در صنایع بسته بندی و غذایی به دلیل دارا بودن خواص مطلوب و سهولت استفاده، در حال گسترش است. تولید روز افزون اینگونه مواد که از پلیمرهای مقاوم به تخریب زیستی می باشند، جهان را با بحران دفع آنها مواجه ساخته و مشکلات اکولوژیکی و زیست محیطی فراوانی را ایجاد کرده است. سالانه چندین هزار تن پلاستیک پس از مصرف در محیط های آبی ریخته شده و در نواحی خاصی از دریاها و اقیانوس ها تجمع می یابند و مشکلات جبران ناپذیری در اکوسیستم دریایی ایجاد می کنند. از سوی دیگر سوزاندن ضایعات پلیمری سبب آلودگی هوا می شود و با توجه به نوع ماده اولیه در سنتز آنها، گازهایی همچون سیانید هیدروژن، کلرید هیدروژن و سایر گازهای خطرناک در محیط آزاد می شود. بنابراین مشکلات زیست محیطی ناشی از تجمع این مواد در طبیعت سبب شده است که توجه بیشتری به تولید نوعی از این پلاستیک ها معطوف شود که براحتی در محیط زیست تخریب می شوند و به طبیعت بازمی گردند (Bustami, Chan et al. 2000).

تاکنون تعداد زیادی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر^۱ شناسایی و سنتز شده اند و مطالعه برای تولید انواع جدید اینگونه پلیمرها در دست بررسی است و روز به روز بر تعداد آنها افزوده می شود. انواع این پلیمرها در دسته های زیر قرار می گیرند: پلی هیدرکسی آلکانوات ها (PHAS)^۲، پلی وینیل الکل (PVOH)، پلی اورتان (PU)، پلی کاپرولاکتن (PCL)، پلی لاکتیک اسید (PLA)، پلی بوتیلن سوکسینات آدیپات (PBSA)، پلی بوتیلن سوکسینات (PBS)، اتیلن ترفتالات (PET)، کوپلیمرهای آلیفاتیک آروماتیک (AAC) پلی متیلن آدیپات ترفتالات (PTMAT)، بوتیلن آدیپات ترفتالات (PBAT) و پلی لاکتیک اسید با ترکیب های آلیفاتیک (CPLA). با تغییر واحدهای پلیمری و درصد آنها در کوپلیمرها می توان درجه تخریب پذیری بیوپلیمر را تنظیم و کنترل کرد. انواع پلیمرهای زیست تخریب پذیر در شکل ۱-۱ بطور شماتیک نشان داده شده است (Bustami, Chan et al. 2000).

¹ - Biodegradable polymers

² - Polyhydroxyalkanoates



شکل ۱-۱: خانواده پلی استرهای زیست تخریب پذیر

(Bustami, Chan et al. 2000)

در میان پلاستیک های زیست تخریب پذیر، پلی هیدروکسی آلکانوات ها مورد توجه بیشتری قرار گرفته اند. این توجه بدلیل مشابهت این مواد با پلاستیک های رایج و خاصیت ترموپلاستیکی آنها می باشد (Lee 1996). پلی ۳-هیدروکسی آلکانوات ها علاوه بر زیست تخریب پذیری، زیست سازگار^۱ نیز هستند. محصول حاصل از تخریب آنها، ۳-هیدروکسی آلکانوئیک اسیدها هستند که در محیط طبیعی بدن یافت می شوند. سازگاری آنها با سامانه های زیستی بدن سبب شده است که با کاربردهای فراوان در صنایع داروسازی و پزشکی نظر دانشمندان را بسوی خود معطوف سازند (Suriyamongkol, Weselake et al. 2007). پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) به عنوان اولین پلیمر شناخته شده از پلی هیدروکسی آلکانوات مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. در حالی که تخریب کامل یک کیسه بسته بندی از جنس پلی پروپیلن حدود ۹۰ سال به طول می انجامد، پلیمرهای زیست تخریب پذیری نظیر پلی هیدروکسی بوتیرات در شرایط مناسب کمپوست^۲ طی مدت زمان ۶ هفته ای به طور کامل تخریب می شوند (Liebergesell, Hustede et al. 1991)(Nishida and Tokiwa 1992).

¹ - Biocompatible

² - Compost

علیرغم کاربردهای فراوان اینگونه پلیمرها در پزشکی و صنعت، قیمت زیاد آنها در مقایسه با پلیمرهای پتروشیمیایی، تولید آنها را در مقیاس صنعتی دچار مشکل کرده است. قسمت عمده ای از هزینه تولید PHA مربوط به فرایند تخمیر، سوپسترا و استخراج محصول درون سلولی است. بطوریکه حدود ۳۵٪ قیمت تمام شده مربوط به منبع کربن و ۴۰٪ آن مربوط به مراحل پائین دستی (جداسازی) می باشد (Steinbüchel and Fuchtenbusch 1998) (Mudliar, Vaidya et al. 2008). بنابراین استفاده از منابع کربن ارزان قیمت مانند ملاس چغندر^۱، ملاس نیشکر^۲، آب پنیر^۳ و ضایعات کشاورزی هم چون شیر خرم^۴، یکی از روش های کاهش هزینه های تولید است. از طرفی افزایش مقدار پلیمر درون سلول، روشی کار آمد در افزایش بهره وری فرایند تخمیر و پایین آوردن هزینه استخراج PHA از درون سلول های ریزسازواره^۵ خواهد بود و تا حدود زیادی در هزینه تولید اینگونه پلیمرها مؤثر است.

۱-۲ هزینه های تولید پلی هیدروکسی آلکانوات ها (PHAs)

مشکلات زیست محیطی پلیمرهای پتروشیمیایی باعث شده است که اکثر کشورها استفاده از پلیمرهای زیست تخریب پذیر را در دستور کار خود قرار دهند. در بین این پلیمرها، پلی هیدروکسی آلکانوات ها بدلیل خواص زیست سازگاری، ترموپلاستیکی و دیگر خواص مشابه با پلیمرهای پتروشیمیایی خصوصاً پلی پروپیلن بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند. بالا بودن هزینه تولید این بیوپلیمرها نسبت به پلیمرهای پتروشیمیایی (حدود ۱۲ برابر) یکی از موانع اصلی تولید آنها در صنعت می باشد قیمت این پلیمرها در سال ۲۰۰۷ در اروپا ۱۱/۸ \$/Kg بود، در حالی که لازم است این رقم به ۵ \$/Kg برسد تا در مقایسه با پلیمرهای سنتزی مانند پلی پروپیلن با قیمت (۱ \$/Kg) قابل رقابت باشد (Mudliar, Vaidya et al. 2008) نحوه انجام عملیات تخمیر، منبع کربن مورد استفاده، بازده سو بسترای کربنی و روش استخراج بر هزینه تمام شده محصول تأثیر می گذارند (Kodama, Igarashi et al. 1975). بطور کلی به منظور کاهش قیمت تمام شده PHAs تحقیقات و مطالعات گسترده ای انجام گرفته و در حال انجام است که می توان به موارد زیر اشاره کرد.

- ۱- جداسازی و پرورش باکتریها با قابلیت بهره دهی بالا و رشد مناسب بر منابع کربن ارزان قیمت؛
- ۲- استفاده از روش های کشت با تراکم سلولی بالا؛
- ۳- استفاده از روش های مهندسی ژنتیک بویژه انتقال ژن باکتریها به گیاهان؛

¹ Beet molasses

² Cane molasses

³ Whey

⁴ Date syrup

⁵ Microorganism

۴- استفاده از روش های ارزان و مؤثر در استخراج محصول درون سلولی؛ بخش عمده ای از هزینه تولید (تقریباً % ۳۵) مربوط به منبع کربن است (Steinbüchel and Fuchtenbusch 1998, Reddy, Ghai et al. 2003). استفاده از منابع کربنی با قیمت پایین تر، تا حدود زیادی از قیمت تمام شده محصول می کاهد. در جدول ۱-۱ قیمت چند منبع کربن و هزینه کلی تولید مقایسه شده است (Moo-Young 1985, Liebergesell, Hustede et al. 1991).

جدول ۱-۱: تأثیر قیمت سوبسترا و بازده PHB بر هزینه تولید (Liebergesell, Hustede et al. 1991)

The price index of finished product	PHB yield per substrate consumed	The price per kilogram of substrate (USD)	Substrate
۱/۳۰	./۳۸	./۴۹۳	Glucose
./۷۲	./۴۰	./۲۹۰	Sucrose
./۴۲	./۴۳	./۱۸۰	Methanol
۱/۵۶	./۳۸	./۵۹۵	Acetic acid
۱/..	./۵۰	./۵۰۲	Ethanol
./۲۲	./۳۳	./۷۱	Whey

بخش دیگر هزینه ها مربوط به فرایند تخمیر می باشد. افزایش میزان پلیمر به ازاء واحد وزن سلول^۱ بطور فزاینده ای از هزینه تولید و فرایند جداسازی می کاهد. بطوریکه با افزایش این میزان از ۵۰ % به ۸۸ % هزینه جداسازی ۸۰ % کمتر خواهد بود (Lee and Choi 1998).

۳-۱ تاریخچه تولید پلی هیدروکسی آلکانوات ها (PHAs)

پلی هیدروکسی آلکانوات ها (PHAs) دسته ای از پلی استرهای طبیعی هستند که در شرایط خاصی درون سیتوپلاسم گروهی از ریزسازواره ها تولید و ذخیره می شوند. اولین پلیمر شناخته شده در این خانواده، پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) است که در سال ۱۹۲۵ در انستیتو پاستور پاریس توسط باکتری شناس فرانسوی به نام موریس لمون^۲ کشف شد. وی اجسامی دانه ای شکل در سیتوپلاسم *Bacillus megaterium*^۳ مشاهده نمود که در اثر حل نمی شدند. او پی برد که این ترکیب ها دارای فرمول کلی (CH₄O₆X₂) می باشند و این پلیمر را به کمک کلروفوم

¹ PHA content (PHA%)

² Maurice Lemogine

³ *Bacillus megaterium*

جداسازی کرد (Griffin 1994). در سال ۱۹۵۲، کپس^۱ نقطه ذوب این پلیمر را برابر با ۱۸۰ °C گزارش کرد (Jüttner, Lafferty et al. 1975). در سال ۱۹۵۳ وبل^۲ ذرات^۳ درون سلول باسیلوس مگاتریوم را با انحلال دیواره سلولی توسط لیزوزیم جداسازی کرد (Weibull 1953). در سال ۱۹۵۷ برکلی^۴، استانر^۵ و دودوروف^۶ دریافتند که PHB محصول اکسیدی ترکیب های آلی، توسط باکتری های فتوتروفیک است. ایشان سعی کردند تا به جزئیات بیشتری از بیوسنتز و مکانیزم تولید PHB دست یابند (Stanier, Doudoroff et al. 1959). در همان سال استانر و ویلکینسون^۷ PHB را محصولی درون سلولی معرفی کردند و تجمع درون سلولی آن را در پاسخ به محدودیت یکی از مواد محیط کشت دانستند (Stanier, Doudoroff et al. 1959). یک سال بعد ویلیامسون^۸ و ویلکینسون وزن مولکولی و خواص فیزیکی آن را گزارش نمودند. در همان سال مک رای^۹ و ویلکینسون مشاهده نمودند که تجمع PHB درون سلول با محدودیت نیتروژن در محیط کشت افزایش می یابد (Griffin 1994). در سال ۱۹۵۹ با شناخت مسیر متابولیکی تولید PHB توسط استانر، وی دریافت که این محدودیت باعث فعال کردن مسیر متابولیکی می شود بطوری که واحد های استیل تولید شده در مسیر قرار متابولیکی را از مسیر اصلی (چرخه تری کربوکسیلیک) منحرف کرده و در مسیر تولید PHB قرار می دهد (Stanier, Doudoroff et al. 1959).

در اوایل دهه ۱۹۶۰ وربر^{۱۰} و باپتیست^{۱۱} تولید کمی PHB را در دو شرکت جداگانه و با اهداف تجاری آغاز نمودند و حق امتیاز تولید و جداسازی آن را به دست آوردند. پروژه تولیدی این شرکت ها به دلیل مشکلاتی چون بازدهی کم، درجه خلوص پائین و هزینه زیاد استخراج رهاشد و تولید صنعتی این پلیمر تا یک دهه به تعویق افتاد (Jüttner, Lafferty et al. 1975).

در سال ۱۹۶۸ اطلاعات فنی برای تخمیر در مقیاس بزرگ و نیز مهارت در زمینه فرایندهای افزایش چشمگیری پیدا کرد. در این زمان شرکت ICI باکتری *آلکا لیژ نزاوتروفوس*^{۱۲} (که چندی بعد یعنی در

¹ Kepes

² Weibull

³ Granules

⁴ Berkely

⁵ Stanier

⁶ Doudoroff

⁷ Wilkinson

⁸ Williamson

⁹ Mc Rae

¹⁰ Waarber

¹¹ Baptist

¹² *Alkaligenis eutrophous*

سال ۱۹۹۷ *رالستونیا/اوتروففا*^۱ نام گذاری شد و در حال حاضر به *واترسیا/اوتروففا*^۲ تغییر نام داده است) را که قادر به تولید و تجمع PHB تا بیش از ۷۰٪ وزن خشک سلولی است، معرفی کرد .

تا قبل از سال ۱۹۷۳ اطلاعاتی راجع به آنزیم های تولید کننده PHB در دست نبود تا اینکه در همین سال داوس^۳ و شلگل^۴ سه آنزیم مسوول در بیوسنتز PHB به نام های کتوتیولاز^۵، ردوکتاز^۶ و سنتاز^۷ را شناسائی کردند(Oeding and Schlegel 1973; Senior and Dawes 1973) در فاصله سالهای ۱۹۷۳ تا ۱۹۷۵ ذرات PHB به قطر ۲۴۰ الی ۷۲۰ نانومتر در باکتری های *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس سرئوس*^۸ بررسی و تخلیص شدند. در سال ۱۹۷۶، PHB از باکتری *ازتوباکتر بیجرینگی*^۹ در محیط کشت عاری از آمونیوم با منبع کربن گلوکز به دست آمد (JACKSON and DAWES 1976).

شناسایی PHB توسط کروماتوگرافی گازی در سال ۱۹۷۸ منتشر گردید (Shi, Shiraishi et al. 1997). در سال ۱۹۸۱ هلمز^{۱۰} و همکاران فرایند تولید زیستی کوپلیمرهای PHB از منابع کربن متفاوت را توسط *رالستونیا/اوتروففا* در ICI ارائه نمودند. ایشان کوپلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات /والرات P(HB/HV) حاصل از *رالستونیا/اوتروففا* را بیوپل^{۱۱} نامیدند و تغییر در نسبت پروپیونیک اسید و گلوکز در محیط تخمیر را عامل اصلی در تغییر نسبت اجزای کوپلیمر و تولید بیوپل با نقطه های ذوب، خواص مکانیکی و ترموپلاستیکی متفاوت دانستند(Griffin 1994).

کوپلیمرهای PHA به واسطه خواص نزدیکتر به پلی پروپیلن و عدم شکنندگی نسبت به PHB برای کاربردهای صنعتی مناسب تر شناخته شده اند (Tamer, Moo-Young et al. 1998). در سال ۱۹۸۳ وایت^{۱۲} نشان داد که واحدهای هیدروکسی آلکانوات استخراج شده از پلی استر درون باکتری با هیدروکسی بوتیرات و هیدروکسی والرات متفاوت می باشد. ایشان حدود ۱۱ نوع هیدروکسی آلکانوات خطی و شاخه ای را شناسائی کرد(Findlay and White 1983) در سال ۱۹۸۶، PHB در سامانه ناپیوسته خوراک دهی شده توسط باکتری های متان دوست تولید شد (Yamane 1993). در سال ۱۹۸۸ شناسایی ساختمان کوپلیمر P(HB)-۳HB-۴ با روش رزونانس مغناطیسی هسته^{۱۳} انجام

¹ *Ralstonia eutropha*

² *Wautersia eutropha*

³ Dawes

⁴ Schlegel

⁵ Ketothiolase

⁶ Redoctase

⁷ Synthase

⁸ *Bacillus cereus*

⁹ *Azotobacer beijerinckij*

¹⁰ Holmes

¹¹ Biopol

¹² White

¹³ Nuclear magnetic resonance (NMR)

گرفت (Doi, Kunioka et al. 1988). در فاصله سال های ۱۹۸۸ تا ۱۹۹۰ دنیس^۱ ژن های مسوول در بیوسنتز PHB را از *راستونیا استخراج و درون اشریشیا کلی*^۲ بارگذاری^۳ کرد. بدین ترتیب تولید PHB و کوپلیمر P(HB/HV) از *اشریشیا کلی* مهندسی ژنتیک شده با طیف وسیعی از ترکیب های آلی آغاز شد (Slater, Gallaher et al. 1992) (Schubert, Steinbüchel et al. 1988) در سال ۱۹۹۰ کمپانی ولا^۴ در آلمان به تولید اولین محصول تجارتي بیوپل به صورت یک بطری زیست تخریب پذیر برای بسته بندی شامپو اقدام نمود (Griffin 1994). در اواخر سال ۱۹۹۱ از باکتریوفاژها برای کافت^۵ (لیز کردن) دیواره سلولی استفاده شد. در سال ۱۹۹۲، ژن های مسوول تولید PHB با افزودن قطعات DNA توسط *آگروباکتریوم*^۶ درون *آرابیدوپسیس تالیانا*^۷ منتقل شدند.

و با قرار دادن این سه ژن اصلاح شده درون کلروپلاست گیاه نخود، ذراتی از PHB با قطر حدود ۷-۱۲ میکرون تجمع یافتند. مقدار PHB ذخیره شده در گیاه نخود به بیش از ۱۴٪ وزن خشک گیاه رسید (Page, Manchak et al. 1992) در سال ۱۹۹۶ ژن های سه گانه مسوول در تولید PHB توسط روش بمباران ذرات در گیاه پنبه قرار گرفت. مطالعات میکروسکوپ الکترونی، حضور ذرات PHB را در سیتوپلاسم گیاه تراریخته^۸ پنبه نشان داده است. بدین ترتیب تغییر قابل ملاحظه ای در خواص حرارتی و مکانیکی الیاف پنبه بوجود آمد بطوری که الیاف تولید شده نسبت به الیاف عادی پنبه، خواص بهتری که مطلوب صنایع نساجی است از خود نشان دادند (John and Keller 1996). در سال ۲۰۰۲، با بارگذاری حامل^۹ ژن کننده *باسیلوس آمیلولیکوفاشنر*^{۱۰} درون *باکتری باسیلوس مگاتریوم* عمل شکستن دیواره سلولی توسط خود باکتری^{۱۱} بارگذاری شده انجام گرفت و بدین ترتیب روش جدیدی برای استخراج محصول درون سلولی و بازیابی PHB ابداع شد (Hori, Kaneko et al. 2002). در حال حاضر استفاده از روش های مهندسی ژنتیک و میکروبیولوژی ملکولی برای تولید بیشتر و ارائه راه کار هایی به منظور اقتصادی کردن عملیات جداسازی مورد توجه ویژه قرار گرفته است. به طوری که با استفاده از این روش ها سعی بر گرفتن بیان بیشتری از ژن های تولید کننده این پلیمر ها در سلول میزبان هستند. بدین ترتیب علاوه برافزایش میزان پلیمر در سلول میزبان، با کاهش مدت زمان فرایند

^۱ Dennis

^۲ *Escherichia coli (E-coli)*

^۳ Clone

^۴ Wella

^۵ Lysis

^۶ *Agrobacterium*

^۷ *Arabidopsis thaliana*

^۸ Transgenic plant

^۹ Vector

^{۱۰} *B. amyloliquefaciens*

^{۱۱} Self-disruption