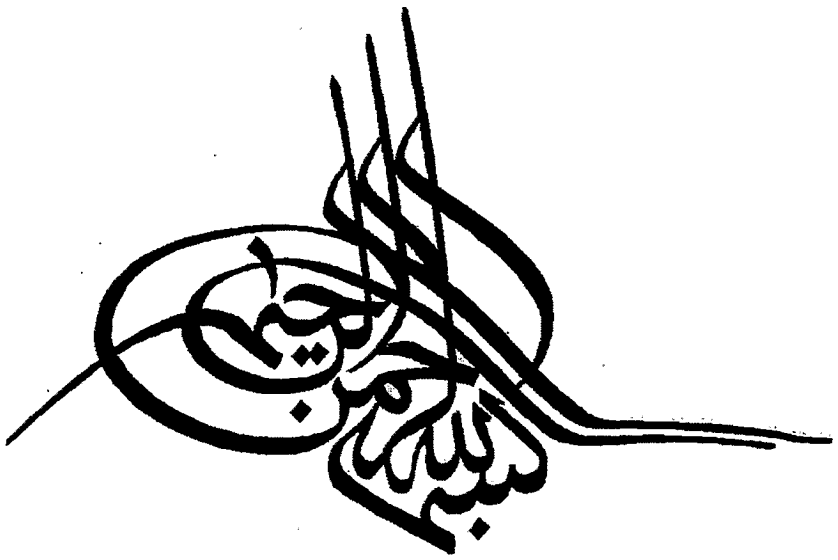
٩٩٢٨



١١٤٥٧٤

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده فنی و مهندسی

رساله دوره دکتری مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی

تأثیر ترکیب خوراک و راهبرد خوراک‌دهی بر میزان تولید PHB از متانل

زهرابیگم مختاری حسینی

استاد راهنما

دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی

استادان مشاور

دکتر سید عباس شجاع‌الساداتی و دکتر رامین کریم‌زاده

۱۳۸۸/۴/۱

اسفند ۱۳۸۷

تهیه مدارک

۱۱۴۵۷۲

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

خانم زهرابیگم مختاری رساله ۲٤ واحدی خود را **با عنوان تاثیر راهبرد خوراك دهی وترکیب خوراك بر میزان تولید PHB از متانول** در تاریخ ۱۳۸۷/۱۲/۲٤ ارائه کردند.

اعضای هیات داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه دکتری 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 مشاور	دکتر رامین کریم زاده	دانشیار	
استاد ناظر	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	
استاد ناظر	دکتر محمدرضا امیدخواه نسرین	دانشیار	
استاد ناظر	دکتر بابك بنکدارپور	دانشیار	
استاد ناظر	دکتر رسول خلیل زاده	استادیار	
نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر سمیره هاشمی نجف آبادی	استادیار	

این نسخه به عنوان نسخه نهایی پایان نامه/رساله مورد تأیید است.

امضای استاد راهنما:

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

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری 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 هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

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

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها 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 معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱٥ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

نام و نام خانوادگی: زهرا بیگم مختاری حسینی

امضاء

تقدیم به:

پدر و مادر بزرگوارم

مادر همسر مهربانم

همسر و پسر عزیزم

من لم یشکرالمخلوق لم یشکرالخالق

با حمد و سپاس فراوان خداوند یکتا را که توفیق کسب علم و دانش را بر ما ارزانی داشت، بر خود واجب می‌دانم که از زحمات بی‌دریغ استادان گرامی **جناب آقای دکتر واشقانی فراهانی** که با بینشی دقیق و عمیق این رساله را راهنمایی نمودند، **جناب آقای دکتر شجاع‌الساداتی** که در طی دوران تحصیل مشوق و حامی بنده بودند و مشاوره رساله را نیز بر عهده داشتند و **جناب آقای دکتر کریم‌زاده** و **سرکار خانم دکتر خسروی** به خاطر امر مشاوره این رساله، تشکر و سپاسگزاری نمایم.

از آقایان دکتر بنکدارپور، دکتر خلیل‌زاده، دکتر امیدخواه و خانم دکتر هاشمی نجف‌آبادی که زحمت داوری این رساله را قبول نمودند نیز متشکرم.

از سرکار خانم تیموری کارشناس آزمایشگاه که در طی انجام پژوهش از هیچ کمکی دریغ نکردند تشکر و قدردانی دارم.

از همفکری و همکاری کلیه دوستانی که در آزمایشگاه مشغول به کار بودند، مخصوصا آقای مهندس مقصودی و آقای مهندس حیدرزاده متشکرم.

از تمامی کارکنان محترم و زحمتکش دانشگاه تربیت مدرس به ویژه دانشکده فنی و مهندسی که برای فراهم کردن محیطی مناسب برای تحصیل و تحقیق می‌کوشند کمال تشکر را دارم.

چکیده

هزینه زیاد تولید پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) علی رغم کاربردهای فراوان آن باعث شده است که نسبت به تولید پلیمرهای پتروشیمیایی توجیه اقتصادی نداشته باشد. هزینه‌های جداسازی، بهره‌دهی فرآیند تخمیر، منبع کربن مورد استفاده و بازده سوبسترای کربنی از جمله عوامل مؤثر بر هزینه تولید PHB هستند. ارائه راهکارهایی به منظور افزایش بهره‌دهی و کاهش هزینه تولید هدف اصلی این پژوهش بوده است. به منظور کاهش هزینه مربوط به منبع کربن، از متانول به عنوان منبع کربن استفاده شد.

غلظت کلیه اجزای موجود در محیط کشت باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 به منظور رسیدن به بالاترین سرعت رشد با روش های آماری پلاکت برمن، تاگوچی و سطح پاسخ بهینه شد. در شرایط بهینه بدست آمده، رشد باکتری از OD = ۱/۳۵ برای محیط Choi به ۲/۱۵ = OD افزایش یافت. پس از تعیین ترکیب محیط کشت مناسب برای رشد، محیط کشت مناسب برای تولید PHB توسط این باکتری با روش‌های آماری فوق تعیین شد. در شرایط بهینه، میزان تولید PHB در ارلن به مقدار ۲/۹۵ g/L رسید. بهینه‌سازی محیط کشت تولید همچنین نشان داد که کمبود نیتروژن یا منیزیم در محیط کشت برای تولید PHB ضروری است. با انجام آزمایش در بیوراکتور با شرایط بهینه شده در ارلن، وزن خشک سلولی و غلظت PHB و درصد تجمع PHB در سلول به ترتیب عبارت بودند از ۱۵/٤ g/L، ۹/۵ g/L و ٦۲/۳ درصد. یکی دیگر از راهکارهای کاهش هزینه تولید PHB، افزایش بازده سوبسترای کربنی می باشد. با استفاده از سوبسترای مخلوط استات و متانل بازده کربنی PHB بیش از دو برابر نسبت به سوبسترای متانل تنها افزایش یافت.

در این پژوهش ترکیب خوراک ورودی به بیوراکتور برای رسیدن به دانسیته سلولی بالا در کشت ناپیوسته توأم با خوراک‌دهی از نظر نیتروژن، فسفر و منیزیم بررسی شد. در ترکیب خوراک مناسب بدست آمده، تراکم سلولی در مدت زمان ۳۷/۵ h به ٦۱/۹g/L رسید و مقدار بهره‌دهی سلولی بالای ۱/٦۵ g/Lh را نتیجه داد که بیشترین مقدار گزارش شده برای *متیلوباکتریوم‌ها* است.

زمان القا و روش القا از دیگر عوامل مؤثر بر تولید PHB هستند که در این پژوهش بررسی شدند. بیشترین تولید PHB در حالتی که تراکم سلولی در زمان القا برابر با ٤۵ g/L بود حاصل شد و

خوراک‌دهی متانول خالص و تنظیم pH با سود ۳ نرمال بهترین روش القا بود. روش خوراک‌دهی یکی از عوامل مؤثر بر بهره‌دهی تولید PHB است لذا روش‌های مختلف خوراک‌دهی مرحله رشد باکتری مطالعه شدند. خوراک‌دهی نمایی مرحله رشد با سه سرعت رشد ویژه متفاوت، h^{-1} ۰/۱۵، ۰/۱۰ و ۰/۰۷ انجام شد. با افزایش سرعت رشد ویژه، بهره‌دهی تولید افزایش یافت و بهترین نتیجه در سرعت رشد ویژه h^{-1} ۰/۱۵ حاصل شد. خوراک‌دهی نمایی با سرعت رشد ویژه h^{-1} ۰/۱۵، خوراک‌دهی با غلظت ثابت متانل و خوراک‌دهی بر اساس اکسیژن محلول (DO) با هم مقایسه شدند. از بین این سه روش، خوراک‌دهی بر اساس DO بیشترین بهره‌دهی تولید PHB برابر با g/Lh ۰/۵۹ را داشت. این بهره‌دهی بیشتر از مقادیری است که تا کنون برای تولید PHB از متانول با کشت در دانسیته سلولی بالا گزارش شده است.

واژه‌های کلیدی: پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB)، *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس*، متانل، بهینه‌سازی محیط کشت، کشت ناپیوسته توأم با خوراک‌دهی، راهبردهای خوراک‌دهی، کشت با تراکم سلولی بالا.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۱
۱-۱- بیان مساله	۲
۱-۲- اهداف پژوهش	۵
۱-۳- چگونگی تنظیم نگارش رساله	۵
فصل دوم : کلیات و مروری بر مطالعات گذشته	٦
۲-۱- پلی هیدروکسی بوتیرات	۷
۲-۱-۱- ساختار	۷
۲-۱-۲- خواص	۸
۲-۱-۳- کاربرد	۹
۲-۱-٤- تاریخچه	۱۰
۲-۱-۵- تولید	۱۲
۲-۱-۵-۱- عوامل مؤثر بر هزینه تولید	۱۲
۲-۲- متیلوتروف‌ها	۱٤
۲-۲-۱- تاریخچه	۱٤
۲-۲-۲- *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس*	۱۵
۲-۲-۲-۱- سوخت و ساز	۱۷
۲-۲-۲-۲- پتانسیل صنعتی	۱۸
۲-۳- بهینه‌سازی محیط کشت	۱۹
۲-۳-۱- طراحی آماری آزمایش ها	۲۰
۲-۳-۱-۱- طراحی پلاکت برمن	۲۲
۲-۳-۱-۲- طراحی تاگوچی	۲۲
۲-۳-۱-۳- طراحی سطح پاسخ	۲۳
۲-۳-۲- استفاده از طراحی آماری برای بهینه‌سازی محیط کشت	۲٦
۲-٤- فرآیند تخمیر	۲۷
۲-٤-۱- کشت با تراکم سلولی بالا	۲۷
۲-٤-۲- فرایند ناپیوسته توأم با خوراک‌دهی	۳۰

۲-٤-۲-۱- ملاحظات محیط کشت ۳۰
۲-٤-۲-۲- راهبرد خوراک‌دهی ۳۱
۲-۵- تولید PHB از متانل توسط متیلوتروف‌ها ۳۷
فصل سوم: مواد و روش‌ها ٤۰
۳-۱- ریزسازواره ٤۱
۳-۲- محیط‌های کشت ٤۱
۳-۲-۱- محیط نگهداری ٤۱
۳-۲-۲- محیط کشت بذر ٤۲
۳-۲-۲-۱- آماده‌سازی کشت بذر ٤۲
۳-۲-۳- محیط کشت تخمیر ٤۳
۳-۳- طراحی آزمایش ٤۳
۳-۳-۱- بهینه‌سازی محیط رشد باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 ٤۳
۳-۳-۱-۱- غربالگری اجزای محیط‌کشت ٤۳
۳-۳-۱-۲- بررسی متغیرهای مهمتر با روش تاگوچی ٤۵
۳-۳-۱-۳- بهینه‌سازی اجزای مهم ٤٦
۳-۳-۳- بهینه‌سازی محیط تولید ٤۸
۳-۳-۳-۱- غربالگری اجزای محیط تولید ٤۸
۳-۳-۳-۲- بررسی متغیرهای مهمتر با روش تاگوچی ٤۹
۳-۳-۳-۳- بهینه‌سازی اجزای مهم ۵۰
۳-٤- ساخت حسگر برای اندازه‌گیری متانل ۵۱
۳-٤-۱- اجزای تشکیل دهنده حسگر متانل ۵٤
۳-٤-۲- ویژگی‌های حسگر متانل ۵۵
۳-٤-۳- معایب حسگر متانل ۵۵
۳-٤-٤- ارزیابی کارکرد حسگر متانل ۵٦
۳-٤-۵- کالیبراسیون ۵٦
۳-٤-٦- ارزیابی کارکرد حسگر متانل در هنگام رشد ریزسازواره ۵۷
۳-۵- شرایط تخمیر ۵۸
۳-۵-۱- شرایط کشت در ارلن ۵۸

۳-۵-۲- کشت ناپیوسته ۶۰
۳-۵-۳- کشت ناپیوسته توأم با خوراک‌دهی ۶۰
۳-۶- روش‌های آنالیز ۶۵
۳-۶-۱- اندازه گیری توده سلولی ۶۵
۳-۶-۱-۱- روش جذب نوری ۶۵
۳-۶-۱-۲- تعیین وزن خشک سلولی ۶۵
۳-۶-۲- اندازه‌گیری مقدار PHB به روش GC ۶۶
۳-۶-۳- سنجش آمونیوم ۶۷
۳-۶-۴- سنجش استات ۶۷
۳-۶-۵- سنجش منیزیم ۶۸
۳-۶-۶- استخراج PHB ۶۹
۳-۶-۷- تعیین وزن مولکولی پلیمر ۶۹
فصل چهارم: نتایج و بحث ۷۰
۴-۱- منحنی رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* وتولید PHB ۷۱
۴-۱-۱- منحنی رشد ۷۱
۴-۱-۲- منحنی تولید PHB ۷۲
۴-۲- بهینه‌سازی محیط رشد باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 ۷۳
۴-۲-۱- غربالگری اجزای محیط‌کشت ۷۳
۴-۲-۲- بررسی متغیرهای مهمتر با روش تاگوچی ۷۵
۴-۲-۳- بهینه‌سازی اجزای مهم ۷۷
۴-۲-۴- مقایسه محیط بهینه بدست آمده با محیط کنترل ۸۲
۴-۳- بهینه‌سازی محیط تولید ۸۴
۴-۳-۱- غربالگری اجزای محیط تولید ۸۴
۴-۳-۲- بررسی متغیرهای مهمتر با روش تاگوچی ۸۶
۴-۳-۳- بهینه‌سازی اجزای مهم ۸۸
۴-۴- بررسی اثر سن مایه تلقیح بر رشد و تولید ۹۶
۴-۵- استفاده از سوبستراهای دیگر ۹۷
۴-۵-۱- بررسی اثر نوع منبع کربن ۹۷

٤-٥-٢- استفاده از مخلوط سوبستراها ٩٨
٤-٥-٢-١- بررسی اثر اتانل به عنوان سوبسترای مخلوط ٩٨
٤-٥-٢-٢- بررسی اثر استات به عنوان سوبسترای مخلوط ٩٩
٤-٥-٢-٣- بررسی اثر گلوکز به عنوان سوبسترای مخلوط ١٠٠
٤-٥-٣- مقایسه کل سوبستراهای مخلوط ١٠٠
٤-٥-٤- محاسبه بازده کربنی ١٠٢
٤-٦- کشت ناپیوسته در بیوراکتور ٥ لیتری ١٠٤
٤-٧- آزمایش تأیید محیط رشد و تولید بهینه بدست آمده ١٠٥
٤-٨- تعیین ترکیب بهینه خوراک برای رسیدن به تراکم سلولی بالا ١٠٦
٤-٨-١- اثر نیتروژن ١٠٧
٤-٨-٢- اثر فسفر ١٠٨
٤-٨-٣- اثر منیزیم ١٠٨
٤-٩- اثر زمان القا بر تولید PHB ١٠٩
٤-١٠- بررسی اثر نحوه القا بر تولید PHB ١١٠
٤-١٠-١- نسبت مولی C/N ثابت ١١١
٤-١٠-٢- افزایش تدریجی نسبت C/N ١١٢
٤-١٠-٣- افزایش تدریجی نسبت C/Mg ١١٣
٤-١٠-٤- قطع خوراک دهی N و Mg ١١٤
٤-١٠-٥- مقایسه روش های مختلف القا ١١٥
٤-١١- بررسی اثر روش خوراک‌دهی مرحله رشد بر تولید PHB ١١٦
٤-١١-١- خوراک‌دهی بر اساس تعیینپایان یافتن متانل با DO ١١٦
٤-١١-٢- خوراک‌دهی نمایی با سرعت رشد ویژه ثابت ١١٧
٤-١١-٣- خوراک‌دهی با غلظت ثابت متانل ١١٨
٤-١١-٤- مقایسه انواع روش‌های خوراک‌دهی مرحله رشد ١١٩
٤-١٢- مقایسه نتایج این پژوهش با دیگر مطالعات انجام شده در زمینه تولید PHB از متانل در تراکم سلولی بالا ١٢١
فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها ١٢٤
٥-١- نتیجه گیری کلی ١٢٥

۵-۲- سهم پژوهش در تولید علم ۱۲۷
۵-۳- پیشنهادها ۱۲۸
مراجع ۱۲۹

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۲-۱- ساختار کلی پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها	۷
شکل ۲-۲- سوخت و ساز متانل در *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس*	۱۸
شکل ۳-۱- شماتیک سامانه حسگر متانل	۵۳
شکل ۳-۲- چگونگی نفوذ متانل به شلنگ سیلیکونی	۵۳
شکل ۳-۳- نمایی از تخمیرگاه و سامانه کنترل غلظت متانل	۵۵
شکل ۳-۴- کارکرد حسگر متانل ساخته شده در غلظت های مختلف متانل	۵۶
شکل ۳-۵- کالیبراسیون حسگر متانل	۵۷
شکل ۳-۶- کارکرد حسگر متانل ساخته شده در زمان رشد ریزسازواره	۵۷
شکل ۳-۷- نرخ خوراک ورودی به تخمیرگاه با روش خوراک‌دهی نمایی با سرعت رشد ویژه ثابت h^{-1} ۰/۱۰	۶۴
شکل ۳-۸- نمایی از تخمیرگاه در حال کار	۶۴
شکل ۴-۱- منحنی رشد باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷۲
شکل ۴-۲- منحنی تولید و تجمع PHB در باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷۳
شکل ۴-۳- کانتورهای میزان رشد باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 بر حسب دانسیته نوری (OD) در برابر تغییر دو متغیر با ثابت نگه داشتن دو متغیر دیگر در کد صفر	۸۱
شکل۴-۴- نمودار سه بعدی میزان رشد باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس*DSMZ 1340 بر حسب دانسته نوری (OD) در برابر دو متغیر با ثابت نگه داشتن دو متغیر دیگر در کد صفر	۸۲
شکل ۴-۵- مقایسه منحنی رشد باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 در دو محیط بهینه و چوی	۸۳
شکل ۴-۶- کانتورهای پاسخ تجمع PHB در برابر تغییر دو متغیر با ثابت نگه داشتن سه متغیر دیگر در کد بهینه	۹۲
شکل ۴-۷- کانتورهای پاسخ غلظت PHB در برابر تغییر دو متغیر با ثابت نگه داشتن سه متغیر دیگر در کد بهینه	۹۵
شکل ۴-۸- اثر سن مایه تلقیح بر رشد و تولید PHB در باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس*	۹۶
شکل۴-۹- مقایسه رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 و تولید PHB توسط آن در منابع کربن مختلف	۹۷
شکل۴-۱۰- تأثیر افزودن اتانل به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و محتوای PHB	۹۸
شکل۴-۱۱- تأثیر افزودن استات به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و محتوای PHB	۹۹
شکل ۴-۱۲- تأثیر افزودن گلوکز به محیط به عنوان سوبسترای مخلوط بر CDW، غلظت و محتوای PHB	۱۰۰
شکل ۴-۱۳- مقایسه تأثیر سوبستراهای مخلوط بر CDW، غلظت و محتوای PHB	۱۰۱

شکل ٤-١٤- منحنی رشد باکتری *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* در کشت نا پیوسته در تخمیرگاه ١٠٤
شکل ٤-١٥- منحنی رشد، تجمع و تولید PHB، غلظت نیتروژن، منیزیم ومتانل در فرآیند شبیه سازی شده با شرایط بهینه بدست آمده در ارلن ١٠٦
شکل٤-١٦- تغییرات CDW، متانل، نیتروژن و منیزیم با زمان در هنگام استفاده از بهترین ترکیب خوراک ١٠٩
شکل ٤-١٧- تغییرات CDW، غلظت و محتوای PHB و غلظت نیتروژن با زمان در روش القای PHB با نسبت ثابت C/N =٢٥ ١١١
شکل ٤-١٨- تغییرات CDW، غلظت و محتوای PHB، نیتروژن و نسبت C/N با زمان در روش القای PHB با افزایش تدریجی C/N ١١٢
شکل ٤-١٩ - تغییرات CDW، غلظت و محتوای PHB، نیتروژن و نسبت C/Mg با زمان در روش القای PHB با افزایش تدریجی C/Mg ١١٣
شکل ٤-٢٠- تغییرات CDW، غلظت و محتوای PHB، نیتروژن، منیزیم و متانل با زمان در روش القای PHB با قطع کامل نیتروژن و منیزیم ١١٤
شکل ٤-٢١- مقایسه تراکم سلولی و تولید PHB در سرعت های رشد ویژه متفاوت خوراک‌دهی نمایی مرحله رشد ١١٨
شکل ٤-٢٢- منحنی رشد سلول وتولید PHB با روش خوراک‌دهی غلظت ثابت متانل در مرحله رشد ١١٩
شکل ٤-٢٣- توزیع وزن مولکولی تولید شده توسط *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 ١٢٠

فهرست جدول ها

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱- تأثیر قیمت سوبسترا و بازده PHB بر هزینه تولید	٤
جدول ۲-۱- خواص فیزیکی و شیمیایی پلی‌پروپیلن و پلی هیدروکسی بوتیرات	۹
جدول ۲-۲- انواع روش های خوراک‌دهی استفاده شده برای ریزسازواره های مختلف	۳٤
جدول۲-۳- روش های خوراک‌دهی برای انجام فرآیند ناپیوسته توأم با خوراک‌دهی	۳۷
جدول ۳-۱- متغیرهای مورد مطالعه در طراحی PBD برای غربالگری محیط رشد	٤٤
جدول۳-۲- ماتریس ۲۰ تایی PBD	٤٤
جدول ۳-۳- متغیرهای مورد مطالعه در طراحی به روش تاگوچی برای بررسی محیط رشد	٤٥
جدول ۳-٤- آرایه L_{27} تاگوچی برای بررسی اثر ۱۰ متغیر در سه سطح وبرهمکنش بین دو متغیر	٤٦
جدول ۳-٥- متغیرها و سطوح مورد مطالعه در طراحی ترکیب مرکزی برای بهینه‌سازی محیط رشد	٤۷
جدول ۳-٦- طراحی ترکیب مرکزی برای ٤ متغیر	٤۷
جدول ۳-۷- متغیرهای مورد مطالعه در طراحی PBD برای غربالگری محیط تولید	٤۸
جدول۳-۸- ماتریس ۱۲ تایی PBD برای بررسی اثر ۱۱ متغیر	٤۹
جدول ۳-۹- متغیرهای مورد مطالعه در طراحی به روش تاگوچی برای بررسی محیط تولید	٤۹
جدول ۳-۱۰- آرایه L_{18} استفاده شده برای بررسی ٦ متغیر در سه سطح	٥۰
جدول ۳-۱۱- متغیرها و سطوح مورد مطالعه در طراحی ترکیب مرکزی برای بهینه‌سازی محیط تولید	٥۰
جدول ۳-۱۲- طراحی ترکیب مرکزی استفاده شده برای بهینه‌سازی محیط تولید	٥۱
جدول ۳-۱۳- منابع کربن بررسی شده به عنوان سوبسترای مخلوط	٦۰
جدول ٤-۱- PBD و نتایج حاصل برای محیط رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷٤
جدول ٤-۲- تجزیه وتحلیل نتایج PBD برای محیط رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷٥
جدول ٤-۳- طراحی تاگوچی و نتایج حاصل برای محیط رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷٦
جدول ٤-٤- تحلیل واریانس نتایج تاگوچی برای محیط رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷۷
جدول ٤-٥- CCD و نتایج حاصل برای محیط رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷۸
جدول ٤-٦- آنالیز نتایج CCD برای محیط رشد *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۷۹
جدول ٤-۷- مقایسه محیط بهینه رشد و محیط کنترل	۸۳
جدول ٤-۸- PBD و نتایج حاصل برای محیط تولید PHB توسط *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* 1340 DSMZ	۸٤
جدول ٤-۹- تجزیه و تحلیل نتایج PBD برای محیط تولید PHB توسط *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۸٥
جدول ٤-۱۰- طراحی تاگوچی ونتایج حاصل برای محیط تولید PHB توسط *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340	۸۷
جدول ٤-۱۱- تحلیل واریانس نتایج محتوای PHB و سطوح بهینه پیشنهادی طراحی تاگوچی برای محیط	۸۷

تولید
جدول ٤-١٢- تحلیل واریانس نتایج غلظت PHB و سطوح بهینه پیشنهادی طراحی تاگوچی برای محیط تولید ٨٨
جدول ٤-١٣- CCD و نتایج حاصل برای محیط تولید PHB توسط *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* 1340 DSMZ ٨٩
جدول ٤-١٤- آنالیز نتایج CCD برای محیط تولید PHB توسط *متیلوباکتریوم اکستروکوئنس* DSMZ 1340 ٩٠
جدول ٤-١٥- مقایسه تأثیر سوبستراهای مخلوط بر CDW، غلظت و محتوای PHB ١٠١
جدول ٤-١٦- مقایسه سوبسترای مخلوط استات و متانل با متانل خالص ١٠٣
جدول ٤-١٧- خوراک اضافه شده به تخمیرگاه در آزمایش های بررسی اثر ترکیب خوراک بررشد سلول ١٠٧
جدول ٤-١٨- نتایج آزمایش های بررسی اثر ترکیب خوراک بر رشد سلول ١٠٧
جدول ٤-١٩- اثر زمان القا بر CDW و تولید PHB ١١٠
جدول ٤-٢٠- مقایسه CDW و تولید PHB در روش‌های القای متفاوت ١١٥
جدول ٤-٢١- مقایسه CDW و تولید PHB در روش های مختلف خوراک‌دهی مرحله رشد ١٢٠
جدول ٤-٢٢- مقایسه نتایج حاصل در این پژوهش با مطالعات دیگر در زمینه تولید PHB از متانل ١٢٢
جدول ٤-٢٣- ارزیابی اقتصادی تولید ١٠٠٠٠٠ تن PHB در سال، توسط باکتری‌های مختلف با روش استخراج با حلال ١٢٣

فصل اول

مقدمه

۱-۱- بیان مسأله

امروزه استفاده از مواد پلاستیکی در صنایع بسته‌بندی و غذایی به دلیل دارا بودن خواص مطلوب و سهولت استفاده، در حال گسترش است. تولید روزافزون اینگونه مواد که از پلیمرهای مقاوم به تخریب زیستی می‌باشند، 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 زیست ریخته شده و مشکلات جبران ناپذیری در اکوسیستم ایجاد می‌کند. از سوی دیگر سوزاندن ضایعات پلیمری سبب آلودگی هوا می‌شود و با توجه به نوع ماده اولیه‌ای که در تهیه آنها بکار رفته است، گازهایی همچون سیانید هیدروژن، کلرید هیدروژن و سایر گازهای خطرناک در محیط آزاد می‌شود. به منظور حل معضل تجمع پلاستیک‌ها در طبیعت، تحقیقات بسیاری در زمینه تخریب زیستی پلیمرها و تولید پلیمرهای زیست تخریب پذیر[1] انجام گرفته و ادامه خواهد یافت.

تاکنون تعداد زیادی از پلیمرهای زیست تخریب پذیر شناسایی و تهیه شده‌اند و مطالعه برای تولید انواع جدید اینگونه پلیمرها در دست بررسی است و روز به روز بر تعداد آنها افزوده می‌شود. در میان پلاستیک های زیست تخریب پذیر، پلی هیدروکسی آلکانواتها مورد توجه بیشتری قرار گرفته اند. این توجه بدلیل مشابهت این مواد با پلاستیکهای رایج و خاصیت ترموپلاستیکی آنها می‌باشد [۲۷]. این مواد علاوه بر زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگار[2] نیز هستند. محصول حاصل از تخریب آنها ۳-هیدروکسی آلکانوئیک اسیدها هستند که در محیط بدن یافت می‌شوند. سازگاری آنها با سامانه‌های زیستی بدن سبب شده است که کاربردهای فراوانی در صنایع داروسازی و پزشکی داشته باشند. پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) به عنوان اولین پلیمر شناخته شده از پلی هیدروکسی آلکانواتها مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. در حالی که تخریب کامل یک کیسه بسته‌بندی از

[1]- Biodegradable Polymers
[2] - Biocompatible

جنس پلی‌پروپیلن حدود ۹۰ سال به طول می انجامد، پلیمرهای زیست تخریب پذیر نظیر پلی هیدروکسی بوتیرات در شرایط مناسب کمپوست[1] طی مدت زمان شش هفته به طور کامل تخریب می‌شود [۱]. علیرغم کاربردهای فراوان اینگونه پلیمرها در پزشکی، صنعت و کشاورزی، قیمت زیاد آنها در مقایسه با پلیمرهای پتروشیمیایی، تولید آنها را در مقیاس صنعتی دچار مشکل کرده است. قیمت این پلیمرها در سال ۲۰۰۷ در اروپا ۱۱/۸ $/Kg بوده است، در حالی که لازم است این رقم به ۵ $/Kg برسد تا در مقایسه با پلیمرهای مصنوعی مانند پلی‌پروپیلن (با قیمت ۱ $/Kg) قابل رقابت باشد. فرآیند تخمیر، منبع کربن مورد استفاده، بازده سوبسترای کربنی و روش استخراج بر هزینه تمام شده محصول تأثیر می گذارند [۱۵۲]. برای کاهش هزینه فرایند تخمیر بایستی بهره‌دهی فرآیند را بالا برد. راهکارهای متعددی برای افزایش بهره‌دهی فرایند وجود دارد. یکی از این روش‌ها بهینه‌سازی محیط کشت رشد و تولید به کمک طراحی آماری آزمایش‌ها می‌باشد [۱۴۳]. پلی هیدروکسی بوتیرات یک محصول درون سلولی است و بنابراین تراکم سلولی[2] از عوامل مؤثر بر بهره‌دهی تولید آن می‌باشد. بهترین روش برای رسیدن به تراکم سلولی بالا، تخمیر ناپیوسته توأم با خوراک‌دهی[3] با ترکیب خوراک و روش خوراک‌دهی مناسب می‌باشد [۱۵۶]. راهکار دیگر افزایش بهره‌دهی استفاده از مهندسی ژنتیک و تولید PHB از باکتری‌های نوترکیب و گیاهان تراریخته[4] است [۱۷۷]. برای افزایش بازده کربنی می‌توان از سوبسترای مخلوط کمک گرفت [۱۶]. استفاده از روش‌های ارزان و مؤثر در استخراج محصول نیز از راهکارهای دیگر کاهش هزینه تولید است [۷۳]. بخش عمده ای از هزینه تولید، تقریبا ۴۰ ٪، مربوط به هزینه منبع کربن است [۱۵۲]. استفاده از منابع کربن با قیمت پایین تر، تا حدود زیادی از قیمت تمام شده محصول می کاهد. در جدول ۱-۱ قیمت چند منبع کربن و هزینه تولید آنها با هم مقایسه شده است.

---

[1] - Compost
[2] -Cell Density
[3] - Fed-Batch
[4]- TransgenicPlants