

الله أكبر

1. Ngee



دانشگاه مازندران

موضوع:

# تثبیت آنزیم سلولاز بر روی نانوذرات پلیمری

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته مهندسی شیمی

استاد راهنما:

دکتر کامیاز موقرنژاد

استاد مشاور:

دکتر محسن جهانشاهی

نگارش:

مراد رشیدی

تابستان ۸۷

۱۰۸۵۲۲

اطلاعات مرکز علمی پژوهشی  
مستند

۱۳۸۷ / ۱۱ / ۱۵

باسمه تعالی

دانشگاه صنعتی  
نوشیروانی بابل

تحصیلات تکمیلی

۸۷/۱/۱۰۹۰۵۲  
۸۷/۱/۵۳

ارزشیابی پایان نامه در جلسه دفاعیه

شماره دانشجویی : ۸۴۵۱۳۸۲۰۰۲

مقطع : کارشناسی ارشد

نام و نام خانوادگی دانشجو : مراد رشیدی

رشته تحصیلی : مهندسی شیمی

سال تحصیلی : نیمسال دوم ۸۷-۱۳۸۶

عنوان پایان نامه :

«تولید آنزیم های تثبیت شده سلولاز بر روی نانو ذرات پلیمری»

۱۳۸۷ / ۱۱ / ۱۵

نمره تعلق گرفته به دانشجو در صورتی معتبر است  
که تصدیقات مورد نظر هیات داوران تا موعد مقرر، توسط  
دانشجو انجام گیرد.

تاریخ دفاع : ۸۷/۱۶/۲۳

نمره پایان نامه (به عدد) : ۱۹,۵

نمره پایان نامه (به حروف) : نوزده و ۵

هیات داوران :

استاد راهنما : دکتر کامیار موقر نژاد

استاد مشاور : دکتر محسن جهانشاهی

استاد مدعو : دکتر مسلم منصور لکوری

استاد مدعو : دکتر حسین عیسی زاده

نماینده کمیته تحصیلات تکمیلی : دکتر مجید تقی زاده

امضا  
امضا  
امضا  
امضا

منت خدای را عزوجل که طاعتش موجب غربت است و به شکر

اندرش مزید نعمت، هر نفسی که فرومی رود مدحیاط است و چو برآید

مفرح ذات، پس بر هر نفسی دو نعمت موجود است و بر هر نعمتی

شکری واجب.

تهدیم به پدر فداکارم:

که در تمام مراحل زندگی یار و پشتیبان من بوده است.

تهدیم به مادر سپورم:

که شمع وجودش روشنی بخش راه من است.

## تشکر و سپاس

با تشکر و قدردانی از استاد عالیقدر جناب آقای دکتر کامیار موقرنژاد که همواره با خوشرویی در حل مشکلات راهنمایم بودند.

همچنین از استاد گران قدر جناب دکتر محسن جهانشاهی که پشتیبان اینجانب بودند.

با تشکر از مسئولین محترم کارخانه آنتی بیوتیک سازی ایران که مرا در اجرای این پروژه یاری رسانیدند.

## چکیده:

یکی از مناسب ترین سوخت های جایگزین برای محصولات نفتی، الکل معمولی یا اتانول است که می توان آن را با تخمیر مواد قندی بدست آورد و در آن صورت بدان بیو اتانول می گویند. این ماده که در بسیاری از کشورها بعنوان جایگزین بنزین یا مخلوط با آن بکار رود، دارای هیچگونه اثر آلوده کننده محیط زیستی نیست و تنها محصول احتراق آن آب و دی اکسید کربن می باشد که وارد چرخه طبیعی کره زمین می شود. مهمترین روش برای تولید اتانول، تجزیه سلولز به واحدهای کوچکتر گلوکز و تخمیر آنها به اتانول می باشد.

مهمترین روش برای شکستن پیوندها میان واحدهای سلولز و تجزیه آن به گلوکز، هیدرولیز آنزیمی آن توسط آنزیم های سلولاز می باشد. از آنجایی که سطح تماس در معرض ملکولهای آنزیم بر روی سلولز محدود بوده و همچنین عواملی همچون انواع کمپلکسهای فعال و غیر فعال، مواد تولیدی شامل گلوکز و سلوبیوز و کاهش فعالیت سلولاز و ناپایداری آن در مقابل برخی عوامل مانند دما و فشار و pH، باعث کاهش راندمان تجزیه سلولز می شود. البته این راهم باید در نظر گرفت که همواره مقداری آنزیم بصورت آزاد و بدن تغییر در محیط واکنش باقی می ماند. بنابراین باید به دنبال راهکارهایی برای بهینه کردن و اقتصادی کردن این فرآیند باشیم.

در این پایان نامه پس از بررسی اصول فرآیند هیدرولیز آنزیمی سلولز و به بررسی راهکارهای بهینه کردن استفاده از آنزیم می پردازیم. در ادامه انواع روش تثبیت آنزیم را مورد مطالعه قرار می دهیم و نحوه تثبیت آنزیم سلولاز را بر روی یک پلیمر طبیعی بنام کیتوسان، در دو مقیاس دانه ای و نانو مورد بررسی قرار می دهیم. تاثیرات عواملی همچون دما و pH را بر روی آنها مورد مطالعه قرار می دهیم.

بطور کلی، تثبیت بیوکاتالیست‌ها، پایداری و راحتی عملکرد و انتقال آنها را نسبت به همتای آزاد خود در پی خواهد داشت. یکی از این مزایای مهم استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده می‌توان عملکرد چندین باره آنها را در مدت زمان‌های طولانی چه در سیستم‌ها پیوسته و چه در سیستم‌های ناپیوسته دانست.



فهرست

صفحه

عنوان

فصل اول: کلیات

۲	..... (۱-۱) مقدمه
۵	..... (۲-۱) مختصری در مورد پیشرفتارها بر روی Biomass
۷	..... (۳-۱) انواع تجزیه سلولز
۸	..... (۴-۱) مقاومت‌های انتقال جرم
۹	..... (۵-۱) جذب و دفع آنزیم‌های سلولاز روی مواد سلولزی
۱۰	..... (۶-۱) اثر بازدارنده مواد تولیدی
۱۰	..... (۷-۱) غیر فعال شدن دائمی آنزیم در جریان هیدرولیز سلولز

فصل دوم: بررسی خصوصیات سوپسترا و نحوه واکنش آن

۱۳	..... (۱-۲) بررسی خصوصیات سلولز
۱۴	..... (۱-۱-۲) ابعاد سلولز
۱۴	..... (۲-۱-۲) تولید سلولز
۱۵	..... (۳-۱-۲) تجزیه سلولز
۱۵	..... (۴-۱-۲) فرمهای سلولز و شناسایی آنها
۱۶	..... (۵-۱-۲) سطح ملکولی از یک ماکروملکول تنها
۱۸	..... (۶-۱-۲) سطح سوپر ملکولی دسته‌های ماکروملکول
۲۰	..... (۷-۱-۲) سطح مورفولوژی

۲۲	..... (۲-۲) بررسی خصوصیات کربوکسی متیل سلولز
۲۲	..... (۱-۲-۲) ویژگی‌های کاربردی C.M.C
۲۳	..... (۲-۲-۲) خواص فیزیکی
۲۴	..... (۳-۲) واکنش‌های سلولز
۲۶	..... (۱-۲-۲) جذب آب
۲۶	..... (۲-۲-۲) خلل و فرج موجود در مواد سلولز طبیعی
۲۶	..... (۳-۲-۲) مواد سلولزی طبیعی مناسب برای تجزیه آنزیمی
۳۱	..... (۴-۲) بررسی خصوصیات کیتوسان
۳۱	..... (۱-۴-۲) مختصری در مورد ساختار کیتوسان
۳۱	..... (۱-۴-۲) منابع کیتوسان در طبیعت
۳۴	..... (۱-۴-۲) کاربردهای کیتوسان

### فصل سوم: بررسی خصوصیات آنزیم‌ها و سلولاز

۳۸	..... (۱-۳) آنزیم
۳۸	..... (۱-۱-۳) پیشگفتار
۳۹	..... (۲-۱-۳) تاریخچه
۴۰	..... (۳-۱-۳) سیر تحولی و رشد
۴۰	..... (۴-۱-۳) ساختار آنزیمها
۴۱	..... (۵-۱-۳) طبقه بندی آنزیمها
۴۲	..... (۶-۱-۳) نحوه عملکرد آنزیمها

- ۴۳ ..... عوامل بازدارنده ..... (۷-۱-۳)
- ۴۳ ..... پروآنزیم یا زیموژن ..... (۸-۱-۳)
- ۴۴ ..... عمل متقابل آنزیم و سوبسترا ..... (۹-۱-۳)
- ۴۴ ..... عملکرد اختصاصی آنزیمها ..... (۱۰-۱-۳)
- ۴۴ ..... نامگذاری آنزیمها ..... (۱۱-۱-۳)
- ۴۵ ..... چشم اندازی به اهمیت آنزیمها ..... (۱۲-۱-۳)

(۲-۳) سلولاز

- ۴۶ ..... خصوصیات سلولاز ..... (۱-۲-۳)
- ۴۶ ..... نامهای دیگر سلولاز ..... (۲-۲-۳)
- ۴۸ ..... انواع آنزیمهای موجود در سیستمهای سلولازی و نحوه عمل آنها ..... (۳-۲-۳)
- ۴۸ ..... Endo-Cellulase (۱-۳-۲-۳) ..... (۱-۳-۲-۳)
- ۴۹ ..... Exo-Cellulase (۲-۳-۲-۳) ..... (۲-۳-۲-۳)
- ۵۰ ..... Cellubias (۳-۳-۲-۳) ..... (۳-۳-۲-۳)
- ۵۰ ..... Oxidative Cellulase (۴-۳-۲-۳) ..... (۴-۳-۲-۳)
- ۵۱ ..... Cellulose phosphorylase (۵-۳-۲-۳) ..... (۵-۳-۲-۳)
- ۵۲ ..... موارد استفاده و کاربردها ..... (۳-۳)

فصل چهارم: راهکارهای تثبیت آنزیم و انتخاب روش مناسب

- ۵۴ ..... تثبیت ..... (۱-۴)
- ۵۵ ..... نمای کلی از تکنیکهای تثبیت ..... (۲-۴)

- ۵۶ ..... جذب (۱-۲-۴)
- ۵۷ ..... انسداد یا گیرانداختن (۲-۲-۴)
- ۵۸ ..... اتصالات عرضی (۳-۲-۴)
- ۵۹ ..... پیوندهای کووالانسی (۴-۲-۴)
- ۶۰ ..... انتخاب روش تثبیت (۳-۴)

### فصل پنجم: تعیین میزان قند، پروتئین و اندازه‌گیری میزان اکتیویته آنزیم

- ۶۳ ..... اندازه‌گیری میزان پروتئین در محلول (۱-۵)
- ۶۳ ..... دورنما و تئوری (۱-۱-۵)
- ۶۴ ..... ابتدا جذب با UV (۱-۱-۱-۵)
- ۶۴ ..... روش‌های Lowry & Copper / Bicinchoninic (۲-۱-۱-۵)
- ۶۵ ..... روش Bradford (۳-۱-۱-۵)
- ۶۵ ..... دستور العمل برادفورد برای تعیین میزان پروتئین (۲-۱-۵)
- ۶۶ ..... طرز عمل آزمایش برای میزان پروتئین ( $200-2000 \mu\text{g/ml protein}$ ) (۱-۲-۱-۵)
- ۶۷ ..... طرز عمل آزمایش برای میزان پروتئین ( $\text{Protein} < 50 \mu\text{g/ml}$ ) (۲-۲-۱-۵)
- ۶۸ ..... تعیین غلظت قند تولیدی با روش استاندارد DNS (۲-۵)
- ۶۸ ..... مواد و محلول‌های مورد نیاز (۱-۲-۵)
- ۷۰ ..... رقیق‌سازی (۲-۲-۵)
- ۷۰ ..... روش FPU برای تعیین میزان اکتیویته آنزیم (۳-۲-۵)

- ۷۳ ..... (۳-۵) کیت گلوکز.....
- ۷۳ ..... (۱-۳-۵) اساس آزمایش.....
- ۷۳ ..... (۲-۳-۵) معرفیها.....
- ۷۴ ..... (۳-۳-۵) شرایط نگهداری و پایداری محلولها.....
- ۷۴ ..... (۴-۳-۵) نحوه محاسبات.....

### فصل ششم: آزمایش‌های انجام گرفته برای تثبیت آنزیم

- ۷۷ ..... (۱-۶) آزمایش اول: تهیه دانه‌های کیتوسان بهینه‌سازی شده و تثبیت آنزیم سلولاز بر روی آنها.....
- ۷۷ ..... (۱-۱-۶) تهیه دانه‌های کیتوسان.....
- ۷۹ ..... (۲-۱-۶) تهیه دانه‌های کیتوسان با اتصالات عرضی.....
- ۸۰ ..... (۳-۱-۶) تهیه محلول پلی وینیل الکل اصلاح شده با مالئیک انهیدرید.....
- ۸۱ ..... (۴-۱-۶) تهیه دانه‌های کیتوسان با اتصالات عرضی و پوشش پلی وینیل الکل اصلاح شده.....
- ۸۲ ..... (۵-۱-۶) تثبیت آنزیم سلولاز بر روی دانه‌های کیتوسان.....
- ۸۳ ..... (۶-۱-۶) اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم بر روی دانه‌های کیتوسان اصلاح شده.....
- ۸۴ ..... (۲-۶) آزمایش دوم: تهیه نانوذرات کیتوسان و تثبیت آنزیم سلولاز بر روی آنها.....
- ۸۴ ..... (۱-۲-۶) تهیه نانوذرات کیتوسان.....
- ۸۵ ..... (۲-۲-۶) آماده سازی آنزیم سلولاز برای تثبیت.....
- ۸۵ ..... (۳-۲-۶) آماده سازی نانوذرات کیتوسان برای تثبیت آنزیم سلولاز بر روی آنها.....
- ۸۵ ..... (۴-۲-۶) اندازه گیری میزان اکتیویته آنزیم سلولاز آزاد و تثبیت شده بر روی نانوذرات کیتوسان..

فصل هفتم: نتایج و محاسبات

۸۸ ..... (۱-۷) شرایط تغییر آنزیم

۸۸ ..... (۲-۷) بررسی خصوصیات آنزیم تثبیت شده

۸۸ ..... (۱-۲-۷) اثر pH

۸۹ ..... (۲-۲-۷) اثر دما

۸۹ ..... (۳-۲-۷) اثر پایداری عملیاتی

۹۰ ..... (۴-۲-۷) پایداری و مقاومت در برابر نگهداری و ذخیره سازی

۹۱ ..... (۳-۷) نتایج آزمایش تثبیت آنزیم سلولاز بر روی دانه‌های کیتوسان

۹۲ ..... (۱-۳-۷) اثر دما و pH بر روی اکتیویته سلولاز آزاد و سلولاز تثبیت شده

۹۵ ..... (۲-۳-۷) قابلیت دوباره استفاده کردن و پایداری عملیاتی سلولاز تثبیت شده

۹۶ ..... (۳-۳-۷) توانایی ذخیره سازی

۹۸ ..... (۴-۷) نتایج آزمایش تثبیت آنزیم سلولاز بر روی نانوذرات کیتوسان

۹۹ ..... (۱-۴-۷) اثر دما و pH بر روی اکتیویته سلولاز آزاد و سلولاز تثبیت شده

۱۰۲ ..... (۲-۴-۷) قابلیت دوباره استفاده کردن و پایداری عملیاتی سلولاز تثبیت شده

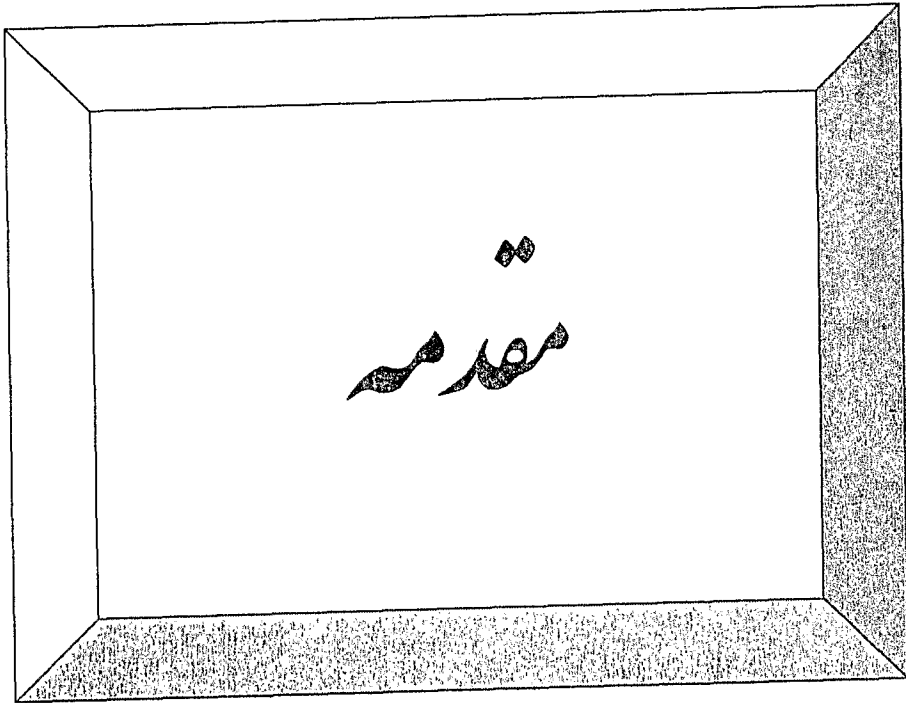
۱۰۲ ..... (۳-۴-۷) توانایی ذخیره سازی

۱۰۴ ..... (۵-۷) نتیجه‌گیری

فصل هشتم: فهرست منابع

۱۰۶ ..... منابع

فصل اول





(۱-۱) مقدمه

در حال حاضر نفت خام منبع اصلی تامین انرژی در سطح جهان است. پرواضح است که چرخه اقتصادی اکثر کشورهای جهان از جمله کشورمان ایران نیز به سوخته‌های فسیلی وابسته است، حتی تصور به پایان رسیدن این منبع تامین انرژی و بحران شدیدی که در سراسر جهان روی خواهد داد، بسیار مشکل و توصیف ناشدنی است. اکنون سوالاتی مطرح میشود که آیا باید این نگرانی از اتمام این منبع تامین انرژی را داشته باشیم یا نه و اگر جواب مثبت است آیا راه حلی برای آن وجود دارد، می‌توان برای آن منابع جایگزینی یافت؟ [۱]

برخی از پژوهشگران ادعا کرده‌اند که کاهش در استخراج جهانی نفت خام قبل از سال ۲۰۱۰ میلادی آغاز میشود با توجه به آمارهای اعلام شده از میزان استخراج نفت در سالیان اخیر می‌توان پیشبینی کرد که استخراج سالانه نفت در سال ۲۰۵۰ میلادی به یک پنجم مقدار کنونی کاهش خواهد یافت. می‌بینیم که تا چند دهه آینده منابع فسیلی (نفت خام و گاز) در حال اتمام می‌باشد و مهمترین و اصلی‌ترین علت این امر تجدید ناپذیر بودن منابع فسیلی می‌باشد که باعث اتمام آن خواهد شد، بنابراین از هم اکنون باید به دنبال منابع جایگزین برای تامین انرژی خود باشیم. [۲، ۳]

برای رسیدن به این هدف راهکارهای زیادی پیشنهاد شده است از قبیل استفاده از انرژی خورشیدی یا بادی، مثل توربین‌های بادی در کشور هلند و انرژی آبی که به عنوان مثال در برخی کشورها با کار گذاشتن توربین آبی از امواج اقیانوس‌ها برای تولید برق استفاده می‌کنند، تولید هیدروژن به عنوان سوخت جایگزین، تولید اتانول به عنوان سوخت جایگزین با استفاده از





منابع گیاهی و سلولزی، استفاده از انرژی هسته‌ای و غیره. که در میان این منابع شناخته شده-ترین آنها انرژی هسته‌ای می باشد که اکثر کشورهای دنیا سعی بر بدست آوردن این تکنولوژی برای استفاده از آن را دارند اما منبع عظیم انرژی دیگری وجود دارد که ما همه روزه به نحوی با آن سروکار داریم "منابع گیاهی و سلولزی" . [۳, ۴]

یکی از مناسب ترین سوخت های جایگزین برای محصولات نفتی، الکل معمولی یا اتانول است که می توان آن را با تخمیر مواد قندی بدست آورد و در آن صورت بدان بیو اتانول می گویند. این ماده که در بسیاری از کشورها بعنوان جایگزین بنزین یا مخلوط با آن بکار رود، دارای هیچگونه اثر آلوده کننده محیط زیستی نیست و تنها محصول احتراق آن آب و دی اکسید کربن می باشد که وارد چرخه طبیعی کره زمین می شود. که می توان اثر سوختن اتانول در چرخه کربنی را در شکل (۱-۱) مشاهده کرد. [۵] بعنوان مثال، هم اکنون مصرف بیواتانول در بخش حمل و نقل ایالات متحده معادل ۵/۵ درصد سوخت مصرفی این کشور می باشد. هرچند ثابت شده است که استفاده از سوخت مخلوط بیواتانول و بنزین برای وسایل نقلیه بطور عمده ای مصرف بنزین و تولید گازهای گلخانه ای را کاهش می دهد و همچنین بیو اتانول نیازی به MTBE (ماده افزودنی به بنزین برای احتراق بهتر که ماده ای بسیار سمی و از عوامل آلوده کننده آبهای سطحی است.) ندارد. [۶]

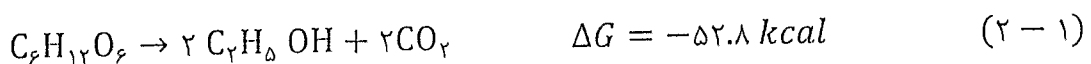
میزان انرژی جذب شده بوسیله عمل فتوسنتز بر روی کره زمین چیزی در حدود ۱۰ برابر مصرف سالیانه انرژی جهان می باشد، که از این میزان حدود ۶۵٪ آن بوسیله گیاهان و بقیه بوسیله فیتوپلانکتونهای آبی جذب می شود. [۷] سلولز فراوان ترین ماده طبیعی موجود در جهان می باشد و بر خلاف سوخت های تجدید ناپذیر فسیلی، هر ساله مقدار عظیمی سلولز در



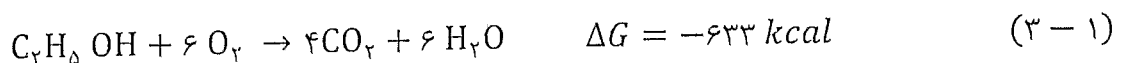
جهان تولید می‌شود، البته میزان سلولز در مواد مختلف متفاوت است، مثلاً مقدار سلولز در برخی از محصولات کشاورزی (نوعی علوفه) حدود ۲۰ درصد و برای الیاف پنبه حدود ۹۱ درصد می‌باشد. اگر بطور متوسط ۴۰ درصد از بافت خشک گیاهان را سلولز در نظر بگیریم، میزان سلولز تولیدی سالانه در جهان را می‌توان  $1 \times 10^{11}$  تن تخمین زد که قادر خواهیم بود  $10^{13} \times 7/13$  لیتر الکل یا به عبارت دیگر ۴۵۰ میلیارد بشکه الکل در هر سال از آن استخراج کرد. حتی اگر مقدار اندکی از این الکل قابل حصول باشد، انرژی عظیمی خواهد شد. سوال اینجاست که این منبع انرژی به چه صورت بوده و از کجا بدست آمده است، برای این منظور کافیست نگاهی به موازنه انرژی آن بیاندازیم [۸]. فرایند فتوسنتز که در آن گیاهان برای بقای خود مواد قندی (گلوکز) تولید می‌کنند به صورت زیر می‌باشد [۹]:



می‌بینیم که انرژی زیادی توسط گیاه از نور خورشید و زمین در بافت گیاهی آن ذخیره می‌شود، حاصل این فرایند تولید گلوکز می‌باشد که اگر گلوکز در اثر فرایند تخمیر به اتانول تبدیل شود، تنها بخش کوچکی از انرژی حاصل از فتوسنتز از دست می‌رود. بدین صورت که:



و در نتیجه اگر از اتانول بدست آمده بعنوان سوخت استفاده شود (فرایند احتراق)، انرژی آزاد شده از آن بصورت زیر خواهد بود:



اگر معادلات (۱-۱) و (۳-۱) را با هم مقایسه کنیم، خواهیم دید که ۹۲٪ انرژی حاصل از فتوسنتز در اتانول ذخیره شده و تنها ۸ درصد آن به هدر رفته است که البته از نظر بازده انرژی



بسیار عالی است و با توجه بدان که فرایند تبدیل گلوکز به بیو اتانول (تخمیر) تا درصدهای بالای تبدیل گلوکز به اتانول قابل حصول است و این فرایند انرژی بسیار اندکی مصرف می کند، بازده کلی فرایند نیز بسیار بالا خواهد بود.

همان طور که قبلا اشاره کردیم می توان با استفاده از منابع سلولزی ، اتانول تولید و از آن بجای سوخت استفاده کرد. کلیه مواد سلولزی قبل از تولید اتانول نیاز به یکسری پیشرفتارهای دارند که باید بر روی آنها صورت بگیرد از آن جمله می توان به [۱۰]:

- ۱- خرد کردن<sup>۱</sup>
- ۲- مایع سازی<sup>۲</sup>
- ۳- رنگبری<sup>۳</sup>
- ۴- تولید مواد قندی (تولید گلوکز)<sup>۴</sup>

البته این نوع فرایندها با مشکلات فراوانی روبرو هستند که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشد مانند، پیشرفتارها بر روی ماده اولیه<sup>۵</sup> و تولید سلولاز مصرفی که در قسمت های بعدی بطور مفصل راجع به آن بحث خواهیم کرد.

### (۲-۱) مختصری در مورد پیشرفتارها بر روی Biomass

برای این عملیات یکسری عملیات مکانیکی شامل خرد کردن صورت می گیرد سپس باید تکه های خرد شده چوب را بطور کامل در یکسری عملیات هضم به صورت محلول در آورد و بعد از این مرحله باید رنگ موجود در این سیستم ها حذف کرد و محصول را از مواد زائد جدا کرد.

<sup>۱</sup> Pummel

<sup>۲</sup> Liquefaction

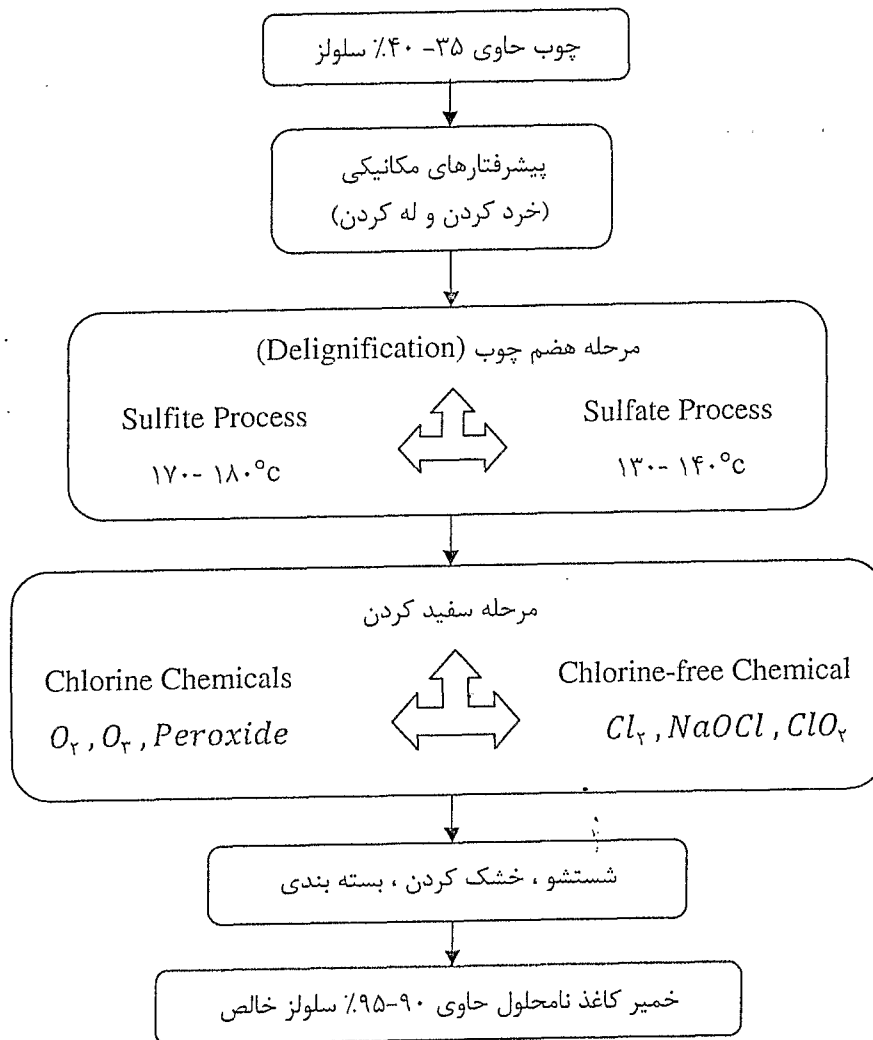
<sup>۳</sup> Deodorant

<sup>۴</sup> Saccharification

<sup>۵</sup> Biomass Pretreatment



یک نمونه از این عملیات برای بدست آوردن خمیرهای سلولزی با خلوص بالا بصورت زیر می-  
باشد [۱۱]:



شکل (۱-۱): شمای مختصری از پیشرفتارها بر روی چوب برای تبدیل آن به سلولاز با خلوص بالا

روش‌های متنوعی برای تجزیه سلولز وجود دارد که بطور خلاصه آنها را در ذیل مشاهده می-

کنید. [۱۲]