بسم الله الرحمن الرحیم

تولید میکروبی دانه‌های درون سلولی (پلی‌هیدروکسی بوتیرات)

تألیف:

دکتر کیانوش خسروی دارانی

(عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)

مهندس فاطمه یزدیان

مهندس علیرضا امیرصادقی

انتشارات جهاد دانشگاهی واحد تهران

۱۳۸۷

www.ketab.ir

سرشناسه : خسروی دارانی، کیانوش
عنوان و نام پدیدآور : تولید میکروبی دانه‌های درون سلولی (پلی هیدروکسی بوتیرات) کیانوش خسروی دارانی، فاطمه یزدیان، علیرضا امیرصادقی
مشخصات نشر : تهران: سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی، واحد تهران، ۱۳۸۷.
مشخصات ظاهری : ۱۸۶ ص.: مصور، جدول، نمودار.
شابک : 978-964-2729-44-9
وضعیت فهرست‌نویسی : فیپا
یادداشت : کتابنامه
موضوع : پلاستیک‌های قابل تجزیه زیستی.
موضوع : تکنولوژی زیستی میکروبی.
شناسه افزوده : یزدیان، فاطمه
شناسه افزوده : امیر صادقی، علیرضا
شناسه افزوده : سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی. واحد تهران.
رده‌بندی کنگره : ۱۳۸۶ ۵ خ ۳ ت / TP ۱۱۸۰
رده‌بندی دیویی : ۶۶۸/۴۱۹
شماره کتابشناسی ملی : ۱۱۵۰۶۲۲

نام کتاب : تولید میکروبی دانه‌های درون سلولی (پلی هیدروکسی بوتیرات)
تألیف : کیانوش خسروی دارانی، فاطمه یزدیان، علیرضا امیرصادقی
ناشر : سازمان انتشارات جهاد دانشگاهی شعبه واحد تهران
جهاد دانشگاهی دانشکده فنی دانشگاه تهران (گروه پژوهشی فرآیند)
ناظر چاپ : احمد آرش
لیتوگرافی : زاویه نور
چاپ و صحافی : نقش نیزار
شمارگان : ۱۰۰۰ نسخه
قیمت : ۲۸۰۰۰ ریال
نوبت چاپ : اول ـ ۱۳۸۷
شابک : ۹۷۸-۹۶۴-۲۷۲۹-۴۴-۹
ISBN : 978-964-2729-44-9

نشانی : تهران ـ صندوق پستی ۱۸۶ - ۱۳۱۴۵
تلفن : ۶۶۴۱۸۴۹۹ - ۶۶۹۵۴۳۶۸ تلفکس : ۶۶۴۹۰۳۳۰
تلفن مرکز پخش : ۲-۶۶۴۹۰۷۴۰-۶۶۴۸۴۸۷۰-۶۱۱۱۲۸۶۲
WWW.jahat.ir
Nashr@jahat.ir

www.ketab.ir

پیشگفتار

به منظور رفع مشکل ناشی از تجمع ضایعات پلاستیکی در زباله‌های شهری (سالانه هفت میلیون تن در دنیا) و ورود تاخیری و ناکامل پلاستیک‌های معمول (حاصل از مشتقات نفتی) به چرخه مواد، محققان علوم زیست فناوری در پی تولید پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر از منابع تجدیدشونده مثل ریزسازواره‌ها و گیاهان هستند. واژه زیست‌تخریب‌پذیر[1] اصطلاح پذیرفته شده‌ای است که برای توصیف موادی به کار برده می‌شود که توسط موجودات زنده در مدت ۶- ۲ ماه به میزان ٪۹۰-۶۰ به واحدهای سازنده خود تجزیه می‌شوند. دلیل اصلی زیست‌تخریب‌ناپذیری پلاستیک‌های نفتی، طویل بودن مولکول پلیمر و پیوند قوی بین مونومرهای آن است که تجزیه آن را توسط موجود زنده با مشکل مواجه می‌سازد. به منظور غلبه بر معضل زیست‌محیطی یاد شده و با هدف داشتن صنعتی در خدمت توسعه پایدار و حفظ زیست بوم‌های طبیعی، تولید مواد اولیه مورد نیاز صنعت بر اساس فرآیندهای طبیعی در دستور کار دولت بسیاری از کشورهای پیشرفته قرار گرفته است. در این بین تولید پلیمرهای زیستی به علت اساس طبیعی ساختار آنها و سهولت مصرف توسط موجود زنده جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند.

دو روش برای تولید پلیمرهای تخریب‌پذیر وجود دارد: استخراج پلیمر از توده زیستی گیاه (سلولز، نشاسته، انواع پروتئین ها، فیبرها و چربی‌های گیاهی) و تولید توسط سازواره‌ها و ریزسازواره‌های زنده به صورت گرانول‌های درون سلولی. باکتری‌ها به سهولت در محیط کشت رشد داده شده و محصول آن‌ها برداشت می‌شود. اما هزینه تولید میکربی این پلیمرها در مقایسه با رقبای پتروشیمیایی زیاد است. به منظور کاهش قیمت، تولید پلیمر زیست تخریب‌پذیر در گیاهان با ژنوم اصلاح شده صورت گرفت. اما مهم‌ترین مشکل فنی باقی‌مانده، نحوه استخراج آن از بافت گیاهی با روشی کم‌هزینه و کارآمد است.

در حال حاضر مبارزه تحقیقاتی برای پیدا کردن راه حلی برای کاهش قیمت تولید و استخراج این پلیمرهای ارزشمند در حال انجام است. به منظور آشنایی قشر زیست‌فناوران

---

[1] Biodegradable

www.ketab.ir

جامعه علمی کشور بر آن شدیم تا با تالیف کتاب حاضر تجربیات عملی و نتایج مطالعات مروری خود را در دسترس دانش‌جویان و دانش‌پژوهان علاقه‌مند فارسی‌زبان قرار دهیم. در این راستا در فصل اول به مبانی زیست‌فناوری و تولید و رشد میکربی اشاره شده و در ادامه بحث در فصل دوم، تولید پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر خانواده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات (PHA) با نگاهی ویژه بر معروف‌ترین عضو گروه یعنی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) به طور اختصاصی مورد بررسی قرار می‌گیرد. در فصل سوم تمرکز اصلی به انواع روش‌های تولید و استخراج پلیمر PHB معطوف شده است. فصل چهارم به معرفی ریزسازواره‌های متیلوتروف به عنوان تولید کنندگان PHB از منابع ارزان قیمت تک‌کربنه می‌پردازد و با مروری بر سوخت و ساز، زیستگاه و شرایط رشد آن‌ها ادامه می‌یابد. تولید PHB از دو سوبسترای تک‌کربنی گازی و ارزان قیمت دی‌اکسید کربن و متان موضوع فصل پنج را به خود اختصاص داده و شرایط تولید، مشکلات عملیاتی و روش کار با سوبسترای گازی در ادامه این بخش به خوبی تفصیل شده است. در پایان انواع بیوراکتورهای تولید کننده PHB از گاز در فصل ششم مرور شده است.

در پایان لازم می‌دانیم از همه دوستانی که به نحوی در رفع موانع علمی و عملی تحقیقات و جمع‌آوری مطالب موثر بوده‌اند، به ویژه استاد فرزانه جناب آقای دکتر ابراهیم واشقانی فراهانی که از چهره‌های شناخته شده کشور در زمینه تولید پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر هستند و راهنمایی‌های ایشان در طی طریق علم‌آموزی راه‌گشای اینجانبان بوده است قدردانی نماییم. همچنین از همکاری بیدریغ و با انگیزه مدیر محترم جهاد دانشکده فنی دانشگاه تهران جناب آقای مهندس مسعود کمبرانی برای تهیه و چاپ کتاب قدردانی نموده و توفیق همه خیراندیشان جامعه اسلامی ایران را از خداوند منان خواستاریم. همچنین از شرکت ملی گاز ایران نیز قدردانی می شود. امید است صاحب‌نظران و علاقه‌مندان از ارسال پیشنهادها و نظرات اصلاحی دریغ نفرموده، در اعتلای این اثر یاری‌رسان ما باشند.

خسروی و همکاران

تابستان ۱۳۸۷

www.ketab.ir

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

فصل اول: مبانی رشد و تولید میکروبی ۱

۱-۱- مقدمه‌ای بر زیست‌فناوری ۱

۱-۲- بخش‌های اصلی زیست فرایندی ۱

۱-۳- نیازهای غذایی ریزسازواره‌ها ۳

۱-۳-۱- منبع کربن ٤

۱-۳-۱-۱- ملاس ٤

۱-۳-۱-۲- عصاره مالت ٥

۱-۳-۱-۳- نشاسته و دکسترین ٥

۱-۳-۱-٤- لیکور سولفیت ٦

۱-۳-۱-٥- سلولز ٦

۱-۳-۱-٦- آب پنیر ٦

۱-۳-۱-۷- آلکان‌ها و الکل ها ۷

۱-۳-۱-۸- چربی‌ها و روغن‌ها ۷

۱-۳-۲- منبع کربن و عوامل موثر بر انتخاب آن ۷

۱-۳-۳- منبع نیتروژن ۹

۱-۳-۳-۱- خیساب ذرت ۱۰

۱-۳-۳-۲- عصاره مخمر ۱۰

۱-۳-۳-۳- پپتون‌ها ۱۱

۱-۳-۳-٤- کنجاله سویا ۱۱

۱-٤- مراحل رشد ۱۲

۱-٤-۱- فاز تاخیر ۱۲

۱-٤-۲- فاز لگاریتمی یا نمایی رشد ۱۳

۱-٤-۳- فاز کاهنده رشد ۱۳

۱-٤-٤- فاز ساکن ۱۳

www.ketab.ir

۱-٤-٥- ناز مرگ ١٤
۱-٥- انواع سامانه‌های تخمیری ١٤
منابع فصل اول ١٧

فصل دوم: پلی‌هیدروکسی بوتیرات ۱۹
۲-۱- مقدمه‌ای بر گرانول‌های درون سلولی ١٩
۲-۱-۱- گرانول‌های متاکروماتیک ١٩
۲-۱-۲- گرانول‌های پلی‌ساکاریدی ٢٠
۲-۱-۳- گرانول‌های لیپیدی ٢٠
۲-۱-٤- گرانول‌های گوگردی ٢٠
۲-۲- تخریب زیستی ٢١
۲-۳- پلی‌هیدروکسیآلکانوآت‌ها ٢٣
۲-٤- پلی‌هیدروکسی بوتیرات (PHB) ٢٧
۲-٥- چرخه‌های بیوسنتز PHA ٢٩
۲-٥-۱- مسیربیوسنتزی *رالستونیا اوتروفا* ٢٩
۲-٥-۲- مسیر بیوسنتزی *رودوسپیریلیوم روبروم* ٣٢
۲-٥-۳- مسیربیوسنتزی *سودوموناس اولئورانس* ٣٢
۲-٥-٤- مسیر بیوسنتزی *سودوموناس آئروجینوزا* ٣٣
۲-٦- عوامل مؤثر بر تولید و ترکیب PHB ٣٣
۲-٦-۱- سوبسترا و شرایط رشد ٣٣
۲-٦-۲- گونه باکتریایی ٣٨
۲-۷- برآورد اقتصادی تولید PHB ٤١
۲-۷-۱- استفاده از راهبردهای مختلف با هدف کاهش قیمت تمام شده PHB ٤٥
۲-۸ - کاربرد پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر تولید شده از PHB ٤٦
منابع فصل دوم ٤٩

فصل سوم: تولید و جداسازی PHB ۵۳
۳-۱- تاریخچه تولید PHB ٥٣
۳-۲- فرایندهای تخمیری ٥٦
۳-۲-۱- سامانه ناپیوسته ٥٦
۳-۲-۲- سامانه ناپیوسته خوراک دهی شده ٥٦

www.ketab.ir

۳-۲-۳- سامانه پیوسته ۵۶
۳-۳- سینتیک تولید ۶۳
۳-۴- روش‌های گسستن سلولی ۶۳
۳-۵- فرآیندهای بازیابی PHB ۶۴
۳-۵-۱- استخراج با حلال ۶۵
۳-۵-۲- هضم با هیپوکلریت سدیم ۶۵
۳-۵-۳- استخراج مشترک با هیپوکلریت سدیم وکلروفرم ۶۸
۳-۵-۴- استخراج با همگن‌کننده‌های با فشار بالا ۶۸
۳-۵-۵- هضم آنزیمی ۶۹
۳-۶- روش‌های اندازه‌گیری PHB ۷۰
۳-۶-۱- روش کدورت سنجی ۷۱
۳-۶-۲- روش هیپوکلریت ۷۱
۳-۶-۳- روش هیپوکلریت سدیم و کلروفرم ۷۱
۳-۶-۴- کروماتوگرافی گازی ۷۲
۳-۶-۵- NMR اسپکتروسکوپی ۷۲
۳-۶-۶- IR اسپکتروسکوپی ۷۲
۳-۶-۷- روش فلوسایتومتری ۷۲
۳-۷- عوامل موثر بر جرم مولکولی PHB ۷۳
۳-۷-۱- مشخصات فیزیولوژی ریزسازواره ۷۳
۳-۷-۲- سطح بیان آنزیم PHA سنتاز فعال ۷۴
۳-۷-۳- منبع کربن ۷۵
۳-۷-۴- شرایط کشت ۷۵
۳-۷-۴-۱- محدودیت مواد مغذی ۷۵
۳-۷-۴-۲- pH محیط‌کشت ۷۶
۳-۷-۴-۳- سن کشت ۷۶
۳-۷-۴-۴- دما ۷۶
۳-۷-۵- روش استخراج و خالص‌سازی PHB ۷۷
۳-۸- راهبرد استفاده از روش‌های جدید ارزان و مؤثر در استخراج پلیمر ۷۷
۳-۸-۱- کاربردهای سیال فوق بحرانی (SCF) در زیست‌فناوری ۷۷
۳-۸-۲- کاربرد سیال فوق بحرانی در گسستن سلول ۷۸
۳-۸-۳- حلالیت پلیمر در دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی ($SC-CO_2$) ۷۸

www.ketab.ir

منابع فصل سوم ۸۰

فصل چهارم: ریزسازواره‌های تولیدکننده PHB ۸۵

۴-۱- متیلوتروف‌ها ۸۵

۴-۲- تاریخچه متیلوتروف‌ها ۸۶

۴-۳- طبقه‌بندی متیلوتروف‌ها ۸۷

۴-۳-۱- ریزسازواره‌های واجد چرخه کلوین (متیلوتروف‌های انوتروف) ۸۷

۴-۳-۲- ریزسازواره‌های واجد چرخهٔ ریبولوز مونوفسفات (RuMP) ۸۷

۴-۳-۲-۱- متانوتروف اجباری نوع I ۸۷

۴-۳-۲-۲- متیلوتروف اجباری قادر به مصرف سوبستراهای یک کربنه ۸۸

۴-۳-۲-۳- متیلوتروف اختیاری قادر به مصرف ترکیبات چند کربنه ۸۸

۴-۳-۲-۴- گونه *سودوموناس اولئووارانس* ۸۸

۴-۳-۳- ریزسازواره‌های واجد مسیر سرین ۸۸

۴-۳-۳-۱- متانوتروف اجباری نوع II ۸۸

۴-۳-۳-۲- متانوتروف اختیاری نوع II ۸۸

۴-۳-۳-۳- متیلوتروف اختیاری مولد رنگ دانه صورتی (PPFM) ۸۸

۴-۳-۳-۴- *میفومیکروبیوم‌ها* ۸۸

۴-۳-۳-۵- *سودوموناس*‌های بدون رنگدانه (ایزوسیترات لیاز مثبت +ICL) ۸۹

۴-۴- متانوتروفها ۹۱

۴-۴-۱- *متیلوموناس* ۹۱

۴-۴-۲- *متیلوباکتر* ۹۱

۴-۴-۳- *متیلوکوکوس* ۹۱

۴-۴-۴- *متیلوسینوس* ۹۱

۴-۴-۵- *متیلوکیستیس* ۹۱

۴-۵- سوخت‌وساز متانوتروف‌ها ۹۶

۴-۶- زیستگاه متیلوتروف‌ها ۱۰۲

۴-۷- شرایط رشد متیلوتروف‌ها ۱۰۲

۴-۷-۱- ترکیب محیط کشت ۱۰۲

۴-۷-۲- دما ۱۰۳

۴-۷-۳- pH ۱۰۳

۴-۸ – جداسازی متیلوتروف‌ها ۱۰۴

www.ketab.ir

٤-٩- اهمیت متیلوتروف‌ها در صنعت ١٠٥
٤-٩-١- تولید پروتئین تک یاخته ١٠٥
٤-٩-٢- تولید متابولیت‌های برون سلولی ١٠٥
٤-٩-٢-١- اسیدهای آمینه ١٠٥
٤-٩-٢-٢- ویتامین‌ها و کوآنزیم‌ها ١٠٦
٤-٩-٢-٣- پلی‌ساکاریدها ١٠٦
٤-٩-٢-٤- رنگدانه‌ها ١٠٦
٤-٩-٢-٥- اسیدهای آلی ١٠٦
٤-٩-٣- تولید پلیمرهای درون سلولی و برون سلولی ١٠٧
٤-٩-٤- استفاده کاتالیستی از متیلوتروف‌ها ١٠٧
منابع فصل چهارم ١٠٨

فصل پنجم: تولید PHB از سوبسترای گازی ١١١

٥-١- مقدمه ١١١
٥-١-١- تولید PHB از متان ١١٢
٥-٢- تاریخچه تولید PHB از متان ١١٢
٥-٢-١- تولید PHB از سوبسترای متان ١١٣
٥-٢-٢- ریزسازواره‌های متانوتروف ١١٤
٥-٢-٣- تولید PHB در باکتری‌های متانوتروف ١١٥
٥-٢-٤- اکسیداسیون میکروبی متان ١١٧
٥-٢-٤-١- تولید توده زیستی ١١٧
٥-٢-٤-٢- تولید PHB ١١٩
٥-٢- ٥- شرایط کشت ١٢٢
٥-٢-٥-١- ریزسازواره ١٢٢
٥-٢-٥-٢- محیط‌کشت ١٢٢
٥-٢-٥-٣- مایه تلقیح ١٢٢
٥-٢-٥- ٤- عملیات تخمیر تولید PHB ١٢٤
٥-٣- تولید میکربی پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات از دی‌اکسیدکربن ١٢٤
٥-٣-١- مشکلات کشت اتوتروفیک باکتری‌های اکسید کننده هیدروژن ١٢٦
٥-٣-٢- روش کشت با تراکم سلولی بالا (HCDC) ١٢٧
٥-٣-٢-١- تعریف و سابقه ١٢٧

www.ketab.ir

۵-۳-۲-۲- مزایا و معایب روش HCDC ۱۲۸
۵-۳-۲-۳- توسعه و بهبود محیط کشت در روش HCDC ۱۲۸
۵-۳-۲-٤- مشکلات HCDC ۱۲۸
۵-۳-۲-۵- به کارگیری فرایند تخمیر ناپیوسته خوراک‌دهی شده جهت دستیابی به HCDC در تولید PHB ۱۳۰
۵-۳-۲-٦- کشت HOB با دانسیته سلولی بالا با هدف تولید PHB ۱۳۱
۵-۳-۳- مواد و روش‌های کشت با سوبسترای گازی دی‌اکسیدکربن ۱۳۲
۵-۳-۳-۱- سامانه کشت ۱۳۲
۵-۳-۳-۱-۱- اطمینان از عدم وجود نشت گاز در سامانه ۱۳۵
۵-۳-۳-۲- روش جداسازی و خالص‌سازی از آب رودخانه یا خاک ۱۳۵
۵-۳-۳-۲-۱-رنگ آمیزی دانه‌های متاکروماتیک ۱۳٦
منابع فصل پنجم ۱۳۷

فصل ششم: بیوراکتورهای تولیدکننده PHB از گاز طبیعی ۱۴۱

٦-۱- مقدمه ۱٤۱
٦-۲- راکتورهای مورد استفاده در تولید PHB از متان ۱٤۱
٦-۲-۱- بیوراکتورهای همزن‌دار ۱٤۲
٦-۲-۲- بیوراکتور مخزن‌دار همراه با جریان برگردشی ۱٤٤
٦-۲-۳- بیوراکتور حلقه‌ای در ارتفاع ۱۵۰
٦-۲-٤- راکتور حلقه‌ای در طول ۱۵۵
منابع فصل ششم ۱۵۹
واژه‌نامه ۱٦۱
نمایه ۱٦۷

www.ketab.ir