انواع ریزسازواره و سامانه تولید پلیمر زیست تخریب‌پذیر پلی‌هیدروکسی بوتیرات

کیانوش خسروی دارانی، ابراهیم واشقانی فراهانی *+

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی ومهندسی، بخش مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۴۳-۱۴۱۱۵

چکیده: *با هدف غلبه بر مشکلات زیست محیطی ناشی از تجمع پلاستیک‌های مصنوعی در طبیعت، فعالیت‌های پژوهشی گسترده‌ای در زمینه پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر در حال انجام است. بخش عمده‌ای از این پژوهش‌ها برروی تولید پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر با استفاده از منابع کربن ارزان قیمت، جداسازی ریزسازواره‌های جدید با سرعت رشد و تولید بالا و نیز ابداع روش‌های جدید استخراج با هدف کاهش قیمت تمام شده پلیمر، متمرکز است. در این مقاله علاوه بر معرفی اجمالی انواع پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر، تولید پلیمر پلی‌هیدروکسی بوتیرات به عنوان مشهورترین عضو گروه پلی‌هیدروکسی آلکانوآت‌ها به طور خاص مورد بررسی قرار گرفته‌است. پس از اشاره به تاریخچه تولید آن، مروری بر انواع ریزسازواره‌های مولد با استفاده از منابع کربن مختلف در سامانه‌های پیوسته، ناپیوسته و ناپیوسته خوراک‌دهی شده صورت گرفته، و سامانه‌های یاد شده از لحاظ بهره‌دهی تولید و نقاط ضعف مقایسه شده‌اند. همچنین انواع روش‌های موجود برای جداسازی پلیمر معرفی و محدودیت‌های هر یک به طور جداگانه بیان شده‌است.*

واژه‌های کلیدی: *بیو پلیمر، پلی هیدروکسی آلکانوآت، پلی هیدروکسی بوتیرات، منبع کربن، سامانه کشت، ریزسازواره، کشت با تراکم سلولی بالا.*

KEY WORDS: *Biopolymer, Poly(hydroxyalkanoate), Poly(hydroxybutyrate), Carbon source, Culture system, Microorganism, High cell density culture.*

مقدمه

تاکنون انواع مختلفی از پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر شناسایی شده و بر تعداد آنها روز به روز افزوده می‌شود [۱]. کشف مکانیسم تخریب این پلیمرها نیز به‌طور فزاینده‌ای رو به پیشرفت است [۲]. عمده پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر پلی‌استرها هستند که تولید آنها با روش‌های زیستی یا شیمیایی صورت می‌پذیرد. انواع این پلیمرها در گروه‌های پلی‌هیدروکسی آلکانوآت‌ها (PHAs) ، پلی ـ ال ـ کاپرولاکتن، پلی‌لاکتید اسید، پلی‌یورتان و پلی‌وینیل الکل قرار دارند. عوامل زیادی مانند ساختار شیمیایی و شرایط محیطی بر تخریب زیستی بیوپلیمرها اثر دارند [۳ و ۴]. اگرچه تخریب در شرایط هوازی کمتر شناخته شده و بسیار پیچیده است، تخریب غیرهوازی PHAs حاصل از کشت *ازتوباکتر ونیلاندی* UWD در لجن فعال بررسی شده و میزان تبدیل کربن سوبسترا به متان و کربن دی‌اکسید بین ۸۳ تا ۹۶ درصد گزارش شده است [۵]. به هرحال تخریب زیستی در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با شرایط محیطی بسیار متفاوت است [۶] و پیچیدگی‌های بسیاری در این ارتباط وجود دارد. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری تخریب زیستی ارایه شده که شامل کنترل افزایش تعداد یا توده سلولی، اندازه‌گیری تغییرهای حاصل در PHA ، تجزیه تولید فراورده ،

*عهده دار مکاتبات

+E-mail:evf@ modares.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری مصرف اکسیژن و تولید CO_2 و همچنین کاهش وزن پلیمر می‌باشد [۷].

تحقیقات انجام شده روی PHAs حاکی از خاصیت زیست تخریب‌پذیری، سازگاری با سامانه‌های حیاتی، طبیعت پلی‌استری و خاصیت ترموپلاستیکی این پلیمرها است. علاوه بر آن PHAs از منابع تجدیدپذیر تولید می‌شوند. به واسطه این ویژگی‌ها پلی‌هیدروکسی آلکانوآت‌ها در زمینه‌های مختلف علوم پزشکی و دامپزشکی، صنایع دارویی و بسته بندی، کشاورزی، محیطزیست، بهداشت و سلامتی بشر کاربرد دارند. با توجه به آثار بی‌شمار استفاده از آنها در حیطه علوم، سرمایه‌گذاری‌های کلان به ویژه از سوی کشورهای پیشرفته برای توسعه و تولید علم در این زمینه صورت گرفته و به شکل تصاعدی در حال افزایش است [۸]. پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) و کوپلیمر پلی هیدروکسی بوتیرات – والرات P(HB-CO-HV) از اعضای مشهور گروه PHAs هستند. ساده‌ترین کاربرد آنها بسته‌بندی ظروف غذا و بطری‌های نوشابه، فیلم‌های پلاستیکی وکیسه‌ها است [۸ و ۹]. همچنین خاصیت زیست تخریب‌پذیری PHAs و سازگاری آنها با سامانه‌های حیاتی سبب شده که از آنها در رهایش کنترل شده داروها، مهندسی بافت و دامپزشکی استفاده شود [۱۰–۱۲]. علیرغم کاربردهای بسیار متعدد پلیمر PHB در صنعت، آنچه استفاده جهان شمول آن را محدود کرده است، قیمت زیاد آن در مقایسه با پلیمرهای پتروشیمیایی است. محاسبات نشان می‌دهند که بیش از ۸۰ درصد قیمت تمام شده پلیمر به منبع کربن و مراحل جداسازی آن مربوط می‌شود [۱۳ و ۱۴]. در حال حاضر راهکارهای مختلفی برای کاهش قیمت PHAs در حال انجام است که در بخش بعد مورد بررسی قرار می‌گیرند [۱۵ ـ ۲۰].

تعداد بسیاری از باکتری‌ها قادرند PHAs را به عنوان ذخایر کربن و انرژی تحت شرایط محدودیت مواد مغذی و درحضور مقدار اضافی از منبع کربن تولید و ذخیره کنند. وزن مولکولی پلیمرها در گسترهٔ $۱۰^۵ \times ۲$ تا $۱۰^۶ \times ۳$ دالتون، برحسب نوع ریزسازواره و شرایط رشد متغیر است. PHAs به صورت گرانول‌هایی در داخل سلول انباشته می‌شوند. به‌طور تقریب ۳۰۰ نوع باکتری مختلف، شامل انواع گرم مثبت و گرم منفی، قادر به ذخیره‌سازی انواع PHAs هستند که در بیشتر آنها تجمع پلیمر تحت شرایط نامطلوب رشد، مانند محدودیت منبع نیتروژن، فسفات، منیزیم یا اکسیژن و در حضور مقدارهای اضافه کربن صورت می‌گیرد. تولید PHAs در سامانه‌های ناپیوسته، ناپیوسته خوراک‌دهی شده[۱] و پیوسته[۲] امکان‌پذیر است. از جمله باکتری‌های مولد این پلیمرها *رالستونیا اوتروفا*، *آلکالی ژنزلاتوس*، *ازتوباکتر وینلاندی*، جنس *سودوموناس* و *اشریشیا کلی* نوترکیب هستند. ریزسازواره‌هایی که قادر به انباشتن PHA می‌باشند به آسانی به‌وسیله رنگ آمیزی با سودان سیاه[۳] یا نیل آبی[۴] (لاجورد) قابل تشخیص هستند.

همان‌طور که یادآوری شد PHB یکی از پلیمرهای مشهور گروه PHAs است و ساختمان عمومی آن مطابق شکل ۱ می‌باشد. باکتری *رالستونیا اوتروفا* از جمله مشهورترین ریزسازواره‌های مولد این پلیمر می‌باشد، زیرا قادر است که تا بیش از ۷۵ درصد وزن خشک سلولی پلیمر تولید کند. به این ترتیب تعداد گرانول‌های پلیمر در باکتری *رالستونیا اوتروفا* به ۸ تا ۱۳ عدد، با قطری حدود ۰/۲ تا ۰/۵ میکرومتر می‌رسد (شکل ۲). این باکتری در گذشته با نام *آلکالی ژنز اوتروفوس* شناخته می‌شد و امروزه با استفاده از روش‌های جدید شناسایی در جنس *رالستونیا* قرار گرفته است. اما این باکتری (علیرغم کارایی زیاد) تولید و ذخیره‌سازی PHB را به‌طور معمول از منابع ساده کربنی (مونوساکاریدها) همچون فروکتوز انجام می‌دهد که سوبستراهای ارزان قیمتی برای فرایند محسوب نمی‌شوند. از این رو توجه محققین به یافتن سوبسترای ارزان قیمت برای تولید PHB و نیز بررسی قابلیت تولید سایر ریزسازواره‌ها معطوف شده است، زیرا همان‌طور که اشاره شد برای تولید تجاری این ماده هزینه‌های تولید و استخراج باید به حداقل رسد تا قابل رقابت با پلیمرهای مشتقات نفتی شود [۸]. جدول ۱ انواع باکتری‌های مولد PHB را با استفاده از منابع کربن مختلف نشان می‌دهد [۲۱ ـ ۲۴].

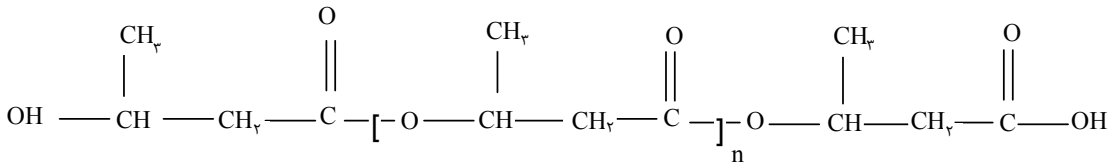
تاریخچه تحقیقات در زمینه پلی‌هیدروکسی بوتیرات

PHB اولین بار در سال ۱۹۲۵ در انستیتو پاستور پاریس توسط لمون[۵] در سیتوپلاسم *باسیلوس مگاتریوم* کشف و فرمول کلی آن به صورت $(C_۴H_۶O_۲)n$ توصیف شد [۲۵].

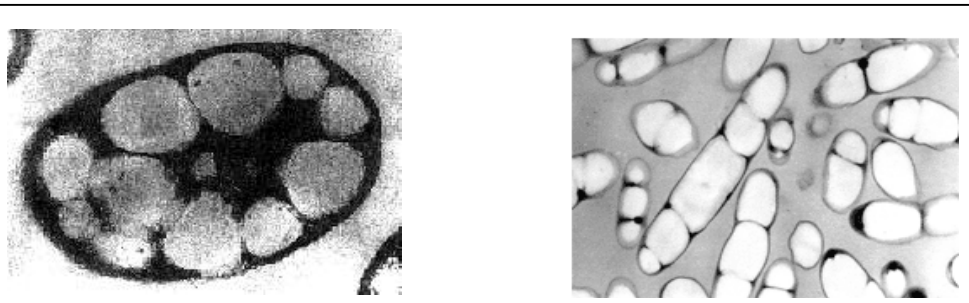
در سال ۱۹۵۲ نقطهٔ ذوب این پلیمر برابر ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد [۲۶]. در سال ۱۹۵۸ *ویلیامسون و ویلکینسون*[۶] وزن

(۱) Fed batch
(۲) Continuous
(۳) Sudan black
(٤) Nile blue
(۵) Lemogine
(٦) Williamson & Wilkinson

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱ ـ ساختمان عمومی PHB .



شکل ۲ ـ تصویر میکروسکوپ الکترونی از تجمع گرانول های PHB در *رالستونیا اوتروفا*.

مولکولی و خواص فیزیکی آن را گزارش نمودند. در همان سال *مک‌رایی*[۱] و *ویلکینسون* مشاهده نمودند که تجمع PHB درون سلول با محدودیت نیتروژن در محیط‌کشت افزایش می‌یابد [۲۶]. در اوایل دهه ۱۹۶۰ *وربر* و *باپتیست*[۲] شروع به تولید کمی PHB در دو شرکت جداگانه و با اهداف تجاری نمودند و حق امتیاز تولید و جداسازی آن را به دست آوردند. البته روش تخمیری آنها دارای بهره‌دهی کم بود و استخراج PHB با حلال، گران تمام می‌شد. به علاوه PHB به‌دست آمده به‌طور کامل خالص نبود، از این رو پروژه تولیدی این شرکت‌ها به دلیل مشکلات یاد شده رها شد و تولید صنعتی این پلیمر تا یک دهه به تعویق افتاد [۲۶].

در سال ۱۹۶۸ اطلاعات فنی در مورد تخمیر در مقیاس وسیع و نیز مهارت در زمینه فرایندهای پلیمری افزایش چشمگیری پیدا کرد. در این زمان ICI[۳] باکتری *آلکانی ژنز اوتروفوس* را (که در سال ۱۹۹۷ *رالستونیا اوتروفا* نام گرفت) قادر به تولید و تجمع PHB تا بیش از ۷۰ درصد وزن خشک سلولی معرفی کرد. البته کوپلیمرهای PHB به واسطه خواص نزدیک‌تر به پلی‌پروپیلن و عدم شکنندگی برای کاربردهای صنعتی مناسب‌تر شناخته شدند [۲۵].

در سال‌های ۱۹۷۳ و ۱۹۷۵ گرانول‌های PHB به قطر ۲۴۰ الی ۷۲۰ نانومتر در باکتری‌های *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس سرئوس* بررسی و تخلیص شدند. در این تحقیق روش اسپکتروسکوپی برای شناسایی و تعیین کمی PHB تا رقت $50\mu g.L^{-1}$ استفاده شد [۲۶]. در سال ۱۹۷۶ PHB از باکتری *ازتوباکتر بیجرینکی* در محیط‌کشت عاری از آمونیم با منبع کربن گلوکز به‌دست آمد [۲۷]. نتیجه‌های مربوط به شناسایی PHB به‌وسیله کروماتوگرافی گازی در سال ۱۹۷۸ منتشر شد [۲۸]. این روش سریع‌تر و دقیق‌تر از روش‌های قبلی بود و تا رقت $1\ \mu g.\ mL^{-1}$ حساسیت داشت. در سال ۱۹۸۱ *هلمز*[۴] و *همکاران* فرایند تولید زیستی کوپلیمرهای PHB از منابع کربن متفاوت را توسط *رالستونیا اوتروفا* در ICI ارایه کردند. ایشان کوپلیمر حاصل از *رالستونیا اوتروفا* را بیوپل[۵] نامیدند و تغییر در نسبت اسید پروپیونیک و گلوکز را عامل اصلی در تغییر نسبت اجزای کوپلیمر و تولید بیوپل با نقطه ذوب، خواص مکانیکی و ترموپلاستیکی متفاوت دانستند [۵].

در سال ۱۹۸۶ PHB درسامانه ناپیوسته خوراک دهی شده و توسط باکتری‌های متان دوست تولید شد [۲۹] و دو سال بعد مطالعات برای شناسایی ساختمان کوپلیمر۳HB–۴HB با فرمول $[OCH(CH_3)CH_2C(O)]_x\ [OCH_2CH_2C(O)]_y$ با روش رزونانس

(۱) Macrae
(۲) Waarber & Baptist
(۳) Imperial Chemical Industries
(۴) Holmes
(۵) Biopol

Archive of SID
www.SID.ir

مغناطیسی هسته انجام شد [۳۰]. بالاخره در سال ۱۹۹۰ کمپانی ولا[۱] در آلمان به‌تولید اولین محصول تجارتی بیوپل به‌صورت یک بطری زیست تخریب‌پذیر برای بسته‌بندی شامپو اقدام کرد [۲۵].

امروزه راهکارهای تحقیقاتی مختلفی برای کاهش قیمت PHB در حال انجام است که در گروه‌های زیر طبقه‌بندی می‌شوند: جداسازی و پرورش باکتری‌هایی با قابلیت بهره‌دهی بالا و رشد مناسب با استفاده از منبع کربن ارزان قیمت، تحقیق در زمینه بهینه‌سازی شرایط تخمیر و محیط کشت [۱۵ ـ ۱۷]، روش‌های استخراج ارزان ولی موثر [۱۸ و ۱۹]، مدل‌سازی و شبیه‌سازی فرایند تولید [۲۰]، استفاده از روش‌های کشت با تراکم سلولی بالا برای کاهش قیمت تمام شده محصول و انتقال ژن باکتری‌ها به گیاهان [۹].

یکی از مراحل بهینه‌سازی محیط‌کشت، دسترسی به روش‌های اقتصادی طراحی آزمایش است. در این ارتباط و به منظور بهینه‌سازی فرایند پیوسته تولید پلیمر، *خسروی* و *همکاران* از دو روش پلاکت برمن و تاگوچی استفاده کرده و بازده تولید پلیمر از منبع کربن فروکتوز توسط باکتری *رالستونیا اوتروفا* را اندازه‌گیری و مقایسه کرده‌اند [۱۵ و ۱۶]. نتیجه‌های این مطالعات نشان داد که شرایط بهینه متغیرهای مورد مطالعه در دو روش، تطابق کامل داشته و عبارتند از: غلظت اولیه فروکتوز $5\ g.L^{-1}$، نسبت C/N ۷/۴، شدت تکان دهی ۲۰۰ rpm، زمان کشت ۴۰h، درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سن بذر ۱۵ h. در شرایط بهینه غلظت نهایی سلول در محیط کشت به $18\ g.L^{-1}$ رسید در حالی که ۸۵ درصد وزن خشک سلول را PHB تشکیل می‌داد.

فرایندهای تخمیری

سامانه‌های متعددی در تولید PHB به‌کار برده می‌شوند که هر کدام با محدودیت‌ها و مشکلات ویژه‌ای به شرح زیر مواجه هستند.

سامانه ناپیوسته

در این سامانه عوامل غذایی محدودکننده رشد و محرک تولید PHB (نیتروژن اکسیژن، نیتروژن، پتاسیم و ...) باید به گونه‌ای به محیط‌کشت افزوده شوند که در فاز تجمع PHB (فاز سکون)، به کمترین مقدار خود برسند. از این سامانه برای تولید هموپلیمر و انواع کوپلیمرها از منابع کربن توسط گونه‌های متفاوت استفاده شده است. اما به دلیل این که در سامانه ناپیوسته به طور مداوم نسبت منابع کربن و نیتروژن و سایر مواد غذایی موجود در محیط‌کشت در حال تغییر است، کنترل غلظت مواد ممکن نیست. درحالی که نسبت غلظت منابع کربن به نیتروژن عامل بسیار مهمی در تولید پلیمر محسوب می‌شود و برای هر سوش مقداری مشخص و از پیش تعیین شده است. در این نوع سامانه امکان رسیدن به بهره‌دهی و غلظت زیاد محصول و نیز تراکم سلولی بالا[۲] (HCDC) ممکن نیست [۸]. *شاه‌حسینی* و همکاران آزمایش‌هایی در شرایط ناپیوسته و ناپیوسته خوراک دهی شده انجام داده‌اند و به مقایسه عینی بین پروفیل‌های مدل استوکیومتری *مالچندانی*[۳] و داده‌های آزمایشی خود پرداخته‌اند که این نتیجه‌ها دلالت بر کارایی قابل قبول مدل می‌کند. پارامترهای سینتیکی به‌دست آمده در این تحقیق دقت مدل را افزایش داده و با بررسی تئوری، محدودیت‌های آن معین شده است [۲۰].

سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی شده

معمول‌ترین سامانه‌ای که اغلب برای دستیابی به بهره‌دهی بالا به‌کار برده می‌شود، کشت ناپیوسته خوراک‌دهی شده است. در این سامانه که امکان کنترل دقیق درصد مواد در محیط‌کشت فراهم است، غلظت منابع کربن و نیتروژن در حدی که سبب مهار رشد ریزسازواره نشود، ثابت نگه داشته می‌شوند تا بالاترین دانسیته سلولی ممکن حاصل شود. از نظر کارایی تولید وتجمع PHB این سامانه نسبت به سایرین ارجحیت دارد. البته بیشترین موفقیت این نوع سامانه‌ها در استفاده از ریزسازواره‌هایی است که قادرند پلیمر را به صورت وابسته به رشد تولید کنند و در مورد به کارگیری باکتری‌هایی که به صورت غیر وابسته[۴] یا جزیی وابسته به رشد[۵] پلیمر را تولید می‌کنند، محدودیت وجود دارد زیرا رسیدن به تراکم سلولی بالا (که رمز موفقیت در تولید ارزان قیمت بسیاری از متابولیت‌های زیستی است) با مشکل مواجه می‌شود. علت اصلی این محدودیت‌ها این است که باید تخمیر در دو مرحله صورت گیرد، ابتدا فرایند تا رسیدن به غلظت سلولی مناسب هدایت شده (مرحله رشد)، سپس با تنظیم نسبت منابع کربن و نیتروژن و نامناسب نمودن شرایط برای رشد، مرحله تولید و تجمع پلیمر آغاز می‌شود. بدیهی است در چنین فرایند دو مرحله‌ای به علت زیاد شدن زمان فرایند، بهره‌دهی تولید کاهش می‌یابد [۹و۱۰].

(۱) Wella
(۲) High cell density culture
(۳) Mulchandani
(۴) Non growth related
(۵) Partially growth related

Archive of SID
www.SID.ir

سامانه پیوسته

با وجود این‌که در سامانه پیوسته، نسبت به روش ناپیوسته خوراک دهی شده، بهره‌دهی حجمی بالاتر است و غلظت سوبسترا نیز قابل کنترل می‌باشد، اما احتمال آلودگی خیلی بالا بوده و این امر از معایب اصلی سامانه پیوسته به‌شمار می‌رود. جدول ۲ فهرستی از انواع سامانه‌های تخمیری به کار رفته در تولید PHB را نشان می‌دهد [۳۱ ـ ۵۰].

در مقالات متعدد، شرایط کشت ریز سازواره‌های گوناگون در سامانه‌های مختلف مطالعه و برای رسیدن به تراکم سلولی بالا راهبردهایی ارایه شده که خلاصه‌ای از این تحقیقات در جدول ۳ گردآوری شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، در ارتباط با تولید PHB (مانند بسیاری از متابولیت‌های دیگر) دستیابی به تراکم سلولی در سامانه ناپیوسته خوراک‌دهی شده آسان‌تر است. این امر به دلیل لزوم کنترل دقیق منابع غذایی در محیط‌کشت تولید PHB است که در این سامانه‌ها عملی‌تر و آسان‌تر از سایرین است. در رابطه با تولید PHB در شرایط هتروتروفی مقاله‌های مروری بسیار جالبی در دهه اخیر به چاپ رسیده‌است [۶۲ ـ ۶۵]. در این پژوهش‌ها از سوبستراهای آلی مانند قندها، متانل و اسیدهای آلی استفاده شده و تولید PHAs با کارایی مناسب تنها در دانسیته سلولی خیلی بالا در کشت ناپیوسته خوراک‌دهی شده امکان‌پذیر بوده است [۶۷ ـ ۷۰]. اما تولید PHAs از CO_2 به عنوان تنها منبع کربن به‌ندرت مورد تحقیق قرار گرفته، زیراکشت اتوتروفیک باکتری‌های اکسیدکننده هیدروژن[۱] (HOB) با مشکلاتی مواجه است که عمده‌ترین آنها عبارتند از [۷۱ ـ ۷۵]:

۱- ترکیب گازی لازم برای رشد اکثر باکتری‌های HOB در فلاسک و روی بشقابک در حدود $H_2:O_2:CO_2 = 7:1:1$ است که این مخلوط بالای حد بحرانی و در گستره انفجار گاز است.

۲- حلالیت گازهای هیدروژن و اکسیژن در آب (در فشار و دماهای مرسوم برای رشد در سامانه‌های کشت HOB) بسیار پایین است.

۳- اکثر کشت‌های اتوتروفیک HOB با استفاده ازفرمنتورهای سنتی انجام می‌گیرد و سوبسترای گازی به طور مداوم خوراک‌دهی شده و گاز خروجی به هدر می‌رود. این امر باعث از دست رفتن سوبسترا و کاهش کارایی مصرف گاز می‌شود. برای جلوگیری از این مشکل دو نوع سامانه پیشنهاد شده‌است: سامانه‌های بی‌انتها[۲] و بازگردشی بسته گاز[۳]. در سامانه بی‌انتها، به علت فقدان خوراک‌دهی دایمی سوبسترای گازی، انتقال جرم به کندی انجام شده و بازده تولید پایین است که این امر نقص بزرگی برای این سامانه به شمار می‌رود. این در حالی است که در سامانه بازگردشی بسته انتقال جرم، با کارایی زیاد انجام می‌شود. در گزارش دیگری با استفاده از یک حس‌گر جدید هیدروژن محلول، ضریب انتقال جرم کلی حجمی[۴] هیدروژن یا $(K_La)_{H_2}$ در سامانه تخمیری اندازه‌گیری شده و با ضریب $(K_La)O_2$ مقایسه و ارتباط خطی آنها ارایه شده است. این دانشمندان فرمنتور جدیدی با هوای بالارونده[۵] و کارایی زیاد انتقال جرم اکسیژن طراحی کردند تا در حالی که غلظت اکسیژن کمتر از حد انفجار نگه داشته می‌شود، کشت اتوتروفیک باکتری و تولید PHB با کارایی مناسب انجام شود [۷۵]. در این تحقیق از هم‌زن سبدی شکل[۶] استفاده شد و خوراک‌دهی اکسیژن به‌طور مستقیم به فرمنتور صورت گرفت و ضریب انتقال جرم حجمی آن برابر $۲۹۷۰\ h^{-1}$ به‌دست آمد.

برای رسیدن به بهره‌دهی بالا در این سامانه مانند سایر فرایندهای تخمیری رسیدن به تراکم سلولی زیاد راهبرد اصلی است [۷۶ـ۷۸]. از مزایای این روش می‌توان کاهش حجم محیط‌کشت، تسهیل فرایندهای پایین‌دستی، کاهش مواد زاید و فاضلاب، کاهش هزینه تولید فراورده، کاهش هزینه‌های دستگاهی و افزایش بهره‌دهی را نام برد. معایب این روش نیز شامل مهارکنندگی سوبسترا، محدودیت ظرفیت انتقال اکسیژن، تشکیل محصولات جانبی مهار کننده رشد و محدودیت اتلاف حرارت می‌باشند [۷۹]. به هر حال راهبردهای متعددی برای توسعه و بهبود این سامانه‌ها در حال انجام هستند [۸۰ و ۸۱]. در مورد توسعه HCDC در تولید PHB با بهره‌دهی $۴\ gL^{-1}h^{-1}$ و ۳/۱۴ و غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۳۰ $g(DCW.L^{-1})$ گزارش شده است [۸۲ و۸۳]. در کشت اتوتروفیک HOB، رسیدن به غلظت سلولی زیاد آسان نیست زیرا سوبسترای گازی در آب حل نمی‌شود و بسیار قابل اشتعال است و در موارد محدودی به بهره‌دهی سلولی زیاد دست یافته‌اند [۸۴]. رسیدن به دانسیته سلولی زیاد در کشت HOB به شدت انتقال جرم سوبسترای گازی در محیط‌کشت بستگی دارد. به‌ویژه که محدودیت هیدروژن منجر به مهار تجمع سلولی می‌شود [۸۵]، از این رو افزودن ۰/۰۵ درصد

(۱) Hydrogen oxidizing bacteria
(۲) Dead end
(۳) Recycle closed circuit sytem
(۴) Total volumetric mass transfer
(۵) Air lift
(۶) Basket type

Archive of SID
www.SID.ir

کربوکسی متیل سلولز به منظور افزایش K_La پیشنهاد شده است [۸۵].

روش‌های استخراج پلیمر

روش‌های مختلفی برای استخراج و جداسازی پلیمرPHB از سلول باکتری گزارش شده است. قدیمی‌ترین این روش‌ها شامل استخراج با استفاده از حلال کلروفرم است. کارایی این روش پس از اعمال پیش‌تیمار با استن ، به ۷۰ درصد می‌رسد [۸۶]. عیب این روش افزایش ویسکوزیته محلول با غلظت بیش از (w/v) ۵ درصد پلیمر است که این امر به نوبه خود برای جداسازی لاشه‌های سلولی از محیط مایع مشکل ساز است. همچنین مصرف مقادیر زیاد حلال سمی در این روش قیمت نهایی محصول را بالا برده و مشکلات زیست محیطی می‌آفریند [۸۷و۸۸].

روش دیگر استخراج پلیمر PHB، هضم دیواره سلولی با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم می‌باشد [۲۸]. در این روش اگر زمان تماس سلول با مواد شیمیایی بیشتر از یک ساعت باشد، زنجیره‌های PHB شکسته شده و وزن مولکولی پلیمر به شدت کاهش می‌یابد [۸۹]. این روش اگرچه آسان و موثر است، اما به‌دلیل تخریب پلیمر در مقیاس زیاد استفاده نمی‌شود. برای کاهش تخریب پلی‌استر توسط هیپوکلریت سدیم لازم است مقدار توده سلولی، زمان تماس و pH بهینه شود. استفاده توام از هیپوکلریت سدیم و کلروفرم نیز به عنوان راه حلی دیگر برای جلوگیری از تخریب پلیمر پیشنهاد شده است، اگرچه این راهکار نیز منجر به مصرف مقدارهای قابل توجهی حلال می‌شود [۹۰ و ۹۱].

روش دیگر برای هضم دیواره سلولی استفاده از آنزیم است که با کارایی ۹۰ درصد گزارش شده است [۸۸]. بدیهی است که استفاده از مواد مصرفی گران و پیچیده بودن فرایند، توجیه اقتصادی تولید را زیر سوال می‌برد [۹۲]. همچنین استفاده از آنزیم به‌طور معمول باعث رها شدن ناگهانی نوکلئیک اسید در سوسپانسیون سلولی و افزایش گرانروی مخلوط شده، ادامه عملیات را با مشکل مواجه می‌کند. برای جلوگیری ازاین حالت، یک مرحله گرم کردن قبل از تیمار آنزیمی باعث تغییر ماهیت و درنتیجه حل شدن DNA در محلول می‌شود. به‌منظور خالص‌سازی و جداسازی PHA، روش استخراج با حلال و یا استفاده از خشک‌کن افشانه‌ای[۱] به‌کار می‌رود.

در پـژوهش دیگری که باکتری *اشریشیا کلی* نوترکیب انجـام شده است [۹۳] ضمن وارد کردن ژن مولد PHB، ژن مرتبط با تولید آنزیم آبکافت کننده دیواره سلولی نیز در داخل ژنوم باکتری جاسازی شده است. آنزیم در سیکل تکثیر باکتری تولید شده و پس از رسیدن به غلظت مشخص در زمان طراحی شده، دیواره سلول میزبان را آبکافت می‌کند. به عبارتی عمل گسستن دیواره سلولی از درون سلول انجام می‌شود. مشکل این روش عدم پایداری و توزیع پلاسمید در نسل‌های متوالی است و کارایی آن پس از گذشت زمان به شدت کاهش می‌یابد [۹۳].

به‌طور کلی می‌توان ادعا کرد گسستن دیواره سلولی با استفاده از روش‌های مکانیکی موفق‌تر از سایر روش‌ها معرفی شده‌اند زیرا بیشتر مقرون به صرفه هستند [۹۴]. *تیمر* و *مویانگ* برای گسستن دیواره سلولی و با هدف بازیافت PHB به مقایسه روش‌های شیمیایی و مکانیکی پرداختند [۹۵]. روش شیمیایی منتخب این دانشمندان شامل استفاده از سدیم دودسیل‌سولفات و هیپو کلریت سدیم بوده و به‌عنوان روش مکانیکی از آسیاب گلوله‌ای و همگن کننده در فشار بالا استفاده کردند. نتیجه این تحقیق نشان می‌دهد که استفاده از سدیم دودسیل‌سولفات به تنهایی روش موفقی نیست، اما استفاده توام آن (به مدت ۱ ساعت) به همراه تیمار ۲۴ ساعته با هیپوکلریت‌سدیم منجر به استخراج ۹۵ درصد کل پروتئین محلول سلولی (به عنوان معیار گسستن سلولی) می‌شود. دستگاه همگن‌کننده نیز پس از یک پیش‌تیمار شیمیایی موفق ظاهر می‌شود، اما انسداد نازل دستگاه و تولید حرارت در حین فرایند از نقاط ضعف آن به حساب می‌آید و استفاده از آن را برای استخراج مواد درون سلولی حساس به حرارت نامناسب می‌کند. به‌علاوه این روش تنها در غلظت‌های کم سلولی موفق است و در غلظت‌های بالا کارایی کمتری دارد [۹۵]. *هریسون* نشان داد که استفاده از بعضی مواد شیمیایی (مواد فعال سطحی آنیونی وکاتیونی تک ظرفیتی) یا پیش‌تیمار آنزیمی منجر به تضعیف دیواره سلولی و کاهش مصرف انرژی در همگن‌کننده‌ها شده و امکان انجام فرایند را در فشار کم و تعداد عبور محدود فراهم می‌کند [۹۴]. از نقطه نظر اجرایی استفاده از آسیاب گلوله‌ای بـرای استخراج پلیمر PHB توصیه می‌شود زیرا مصرف انرژی آن کم است [۱۴]. البته در این روش افزایش سرعت دور همزن و رسیدن آن به یک حد بحرانی منجر به افزایش ناگهانی مصرف انرژی شده و حرارت تولید می‌شود [۹۶]. اما اگر قبل از استفاده از این روش فرایندهای فیزیکی و شیمیایی روی سلول‌ها اعمال شود، اثـر مناسبی بـر کاهش انـرژی لازم در

(۱) Spray dryer

Archive of SID

www.SID.ir

دستگاه به‌همراه خواهد داشت. از جمله این فرایندها، استفاده از سدیم دو دسیل سولفات (برای تجزیه غشای خارجی و حذف لیپو پلی‌ساکاریدهای دیواره)، افزودن کلرورسدیم (برای تغییر در قدرت یونی اجزای پوشش سلولی)، آماده‌سازی با EDTA و اوره، عملیات حرارتی و نیز شوک قلیایی می‌باشد. البته این عملیات باید به صورتی انجام شود که باعث تخریب فراورده نگردد.

در سال ۲۰۰۳ برای اولین بار *حجازی* و *همکاران* استفاده از سیال فوق بحرانی را برای گسستن سلولی و با هدف استخراج PHB معرفی کردند[۱۸]. این فرایند شامل افت ناگهانی فشار پس از نفوذ سیال فوق بحرانی به داخل سلول‌ها و تورم آنها است. در اثر انبساط ناگهانی گاز داخل سلول، به دیواره باکتری نیرو وارد کرده و منجر به گسستن دیواره سلول می‌شود. این روش نسبت به سایر روش‌های مرسوم برای گسستن سلول ساده و در مقایسه با روش صوتی[۱] قابلیت افزایش مقیاس بیشتری دارد [۹۷] و به‌طور کامل محیط دوستانه و اقتصادی است، اما این تحقیق نشان داد که استفاده از سوسپانسیون سلول برای ورود به دستگاه سیال فوق بحرانی کارایی کمی دارد و از لحاظ مصرف برق و زمان مقرون به صرفه نیست.

در ادامه این تحقیق، *خسروی* و *همکاران* راهبردهای مهمی برای کاهش هزینه بازیافت PHB با روش سیال فوق بحرانی را در گزارش دیگری منتشر کردند [۱۹]. متغیرهای ۴ گانه موثر بر گسستن سلول در ۲ سطح تعریف شده و با استفاده از روش طرح عاملی کامل اثر متغیرهای اصلی و اندرکنش آنها بررسی شد. سپس با استفاده از طراحی تاگوچی اثر متغیرها در ۳ سطح مورد بررسی قرار گرفت. شرایط بهینه گسستن سلول با به کارگیری $SC\text{-}CO_2$ در مدت ۴۰ دقیقه به شرح ذیل گزارش شد:

فشار ۲۰۰ بار، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، تولوئن (به عنوان اصلاح‌گر) ۱ درصد حجمی همراه با ۲ بار تکرار افت فشار. کارایی استخراج پلیمر با این روش ۸۵ درصد و قابل مقایسه با دو روش مرسوم استفاده از حلال کلروفرم و سدیم هیپوکلریت بود. در همین گزارش به منظور بررسی اثر روش خشک‌کردن و آماده‌سازی سلول و با هدف تسهیل فرایند و کاهش مصرف انرژی در فرایندهای پایین‌دستی، گسستن دیواره سلولی باکتری‌های منجمد خشک شده، ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و باکتری‌های تازه مقایسه شد. اثر دو نوع اصلاح‌گر دیگر یعنی استن و متانل (با پیش فرض افزایش حلالیت کربن دی‌اکسید فوق بحرانی در آب) با تولوئن (با پیش فرض افزایش نفوذپذیری سلول از طریق انحلال چربی‌های دیواره) بر بازده گسستن سلولی و متوسط وزن مولکولی عددی پلیمر استخراج شده مورد مقایسه قرار گرفتند. اثر سن کشت بر کارایی فرایند بررسی شد. باکتری ۳۰ ساعته علاوه بر محتوای PHB مناسب مقاومت کمتری در برابر گسستن نشان داد.

همچنین با هدف تضعیف دیواره سلولی باکتری قبل از ورود به دستگاه فوق بحرانی، کاهش زمان فرایند و در نتیجه کاهش مصرف انرژی، راهبردهایی مانند اعمال شوک اسمزی (کلرایدسدیم ۱۴۰ میلی مولار و حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت) و شوک قلیایی (هیدروکسید سدیم ۰/۸-۰/۲ درصد وزنی) مورد بررسی قرار گرفته است [۱۹]. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش نسبت وزنی هیدروکسیدسدیم به توده‌زیستی، کارایی گسستن سلولی افزایش می‌یابد و در نسبت (w/w) ۰/۴ درصد بیشترین محتوای پروتئینی سلول در پی دوبار تکرار افت فشار آزاد می‌شود. الحاق پیش‌تیمار شوک اسمزی به قلیایی با نسبت (w/w) ۰/۴ درصد قلیا نیز بررسی شد. به این ترتیب بالاترین کارایی گسستن سلولی ۰/۹۵ درصد در پی تنها ۱ بار افت فشار حاصل شد. مشاهده سطح سلول‌های گسسته شده و انواع دست نخورده با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که روش گسستن با سیال فوق بحرانی منجر به قطعه قطعه شدن دیواره سلولی نمی‌شود [۱۹].

جدول۱- فهرست باکتری‌های مولد PHB با استفاده از منابع کربن مختلف.

باکتری	منبع کربن	مقدار (PHA درصد)	ترکیب PHA				مرجع
			۳HO[۳]	۳HHX[۲]	۳HV	۳HB	
آلکالی ژنز اوتروفوس H۱۶	گلوکانات ۵۰ درصد والرات ۰/۴ درصد	۶۸/۸ ۹۱/۴	۰ ۰	۰ ۰	۰ ۷۰/۳	۱۰۰ ۲۹/۷	۱۸

(۱) Sonication

(۲) Hydroxyoctanoic acid

(۳) Hydroxyhexanoic acid

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۱

آلکالی ژنز اوتروفوس H۱۶	هگزانوات ۰/۴ درصد	ن . م[1]	ن.م	ن.م	ن.م	ن.م	۱۸
	اکتانوات ۰/۴ درصد	۵۹/۱	۰	۰/۱	۰	۹۹/۷	
آلکالی ژنز اوتروفوس N۹A	گلوکانات ۵۰ درصد	۹۱/۵	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۸
	والرات ۰/۴ درصد	۹۳/۴	۰	۰	۶۷/۵	۳۲/۵	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	۷۳/۶	۰/۳	۰	۰	۹۹/۷	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	۸۷/۸	۰	۰/۱	۱۲/۱	۸۷/۸	
آلکالی ژنز اوتروفوس TF۹۳	گلوکانات ۵۰ درصد	۷۰/۱	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۸
	والرات ۰/۴ درصد	۹۰/۱	۰	۰	۶۵/۰	۳۵/۵	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	۶۲/۵	۰/۳	۰	۰	۹۹/۷	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	۸۱/۷	۰/۱	۰	۱۸/۲	۸۱/۷	
آلکالی ژنز اوتروفوس	گلوکانات ۵۰ درصد	۵۱/۱	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۹
	والرات ۰/۴ درصد	۸۷/۴	۰	۰	۷۰/۹	۲۹/۱	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	۴۳/۸	۰	۰/۲	۰	۹۹/۸	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	۷۹/۴	۰	۰/۱	۲۰/۵	۷۹/۴	
آلکالی ژنز اوتروفوس CH۳۴	گلوکانات ۵۰ درصد	۴۴/۵	۰	۰	۰	۱۰۰	۲۰
	والرات ۰/۴ درصد	۸۸/۲	۰	۰	۷۶/۷	۲۳/۳	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	۴۰/۸	۰/۲	۰	۰	۹۹/۸	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	۵۶/۰	۰/۱	۰	۹۹/۸	۵۶/۰	
آلکالی‌ژنز هیدروژنرفیلوس M۵۰	گلوکانات ۵۰ درصد	۷۲/۹	۰	۰	۰	۱۰۰	۲۱
	والرات ۰/۴ درصد	۹۲/۶	۰	۰	۷۷/۱	۲۲/۹	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	۸۰/۷	۰/۳	۰	۰	۹۹/۷	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	۷۹/۳	۰/۱	۰	۹۹/۳	۷۹/۳	
آلکالی ژنز لاتوس	گلوکانات ۵۰ درصد	۷۵/۶	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۸
	والرات ۰/۴ درصد	بدون رشد	–	–	–	–	
	هگزانوات ۰/۴ درصد		–	–	–	–	
	اکتانوات ۰/۴ درصد		–	–	–	–	
آکوآسپیریلیوم اتوتروکینلوم	گلوکانات ۵۰ درصد	۳۸/۳	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۸
	والرات ۰/۴ درصد	۴۴/۶	۰	۰	۳۳/۹	۶۶/۱	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	بدون رشد	–	–	–	–	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	۱۶/۰	۰	۰	۰	۱۰۰	
جنس ازتوباکتر	گلوکانات ۵۰ درصد	۶۵/۱	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۸
	والرات ۰/۴ درصد	۶۷/۳	۰	۰	۹۵/۳	۴/۷	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	ن.م	ن.م	ن.م	ن.م	ن.م	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	ن.م	ن.م	ن.م	ن.م	ن.م	
پاراکوکوس دنیتریفیکانس	گلوکانات ۵۰ درصد	۷۸/۹	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۸
	والرات ۰/۴ درصد	۵۶/۶	۰	۰	۹۷/۳	۲/۷	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	۹/۰	۰	۰	۰	۱۰۰/۰	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	ن . م	ن.م	ن.م	ن.م	ن.م	
تیوباسیلوس A_2	گلوکانات ۵۰ درصد	۷۴/۶	۰	۰	۰	۱۰۰	۱۸
	والرات ۰/۴ درصد	۸۷/۷	۰	۰	۹۱/۶	۸/۴	
	هگزانوات ۰/۴ درصد	بدون رشد	–	–	–	–	
	اکتانوات ۰/۴ درصد	بدون رشد	–	–	–	–	

(۱) نا مشخص

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- انواع سامانه‌های تخمیری به کار رفته در تولید PHB وPHBV.

باکتری	سامانه تخمیری	سوبسترا (منبع کربن)	PHB (درصد)	بازده تولید (g/L)	زمان (h)	مرجع
رالستونیا اوتروفا ۱۷۶۹۹	ناپیوسته/ فلاسک (۵۰۰mL)	روغن گیاه ورونیا گالامنزیز[۱]	۴۲/۸	گ . ن[۲]	گ . ن	۲۸
رالستونیا اوتروفا H ۱۶	ناپیوسته/ فرمنتور (۱۸ لیتر)	محیط معدنی در محدودیت آمونیم	۷۸	گ . ن	گ . ن	۲۹
ازتوباکتر وینلاندی ATCC۵۳۷۹۹	ن پ خ[۳]/ فرمنتور (۲/۵ لیتر)	گلوکز و پپتون ماهی ۵ درصد گلوکز و ملاس ۵ درصد	۸۵ ۶۶	۲۵ ۲۲	۳۷ ۳۶	۳۰
	ناپیوسته/ فلاسک (۵۰۰mL)	گلوکز و پپتون ماهی ۵ درصد گلوکز	گ . ن	۴ ۳	۱۸ ۱۲	
سودوموناس اولئووارانس و ردوکوکوس رابر	ناپیوسته/ فلاسک (۳۰۰mL)	Low rank coal liquefiction	۲–۸	۰/۲	۸۰	۳۱
رالستونیا اوتروفا و سودوموناس اولئووارانس	ناپیوسته/ فرمنتور CSTR[۴] (۳۰L)	روغن حاصل از تولید زیستی رامنوز	۱۷/۳–۱۹/۷	۹–۱۰/۹	۳۵	۳۲
	ن پ خ	روغن حاصل از تولید زیستی رامنوز	۳۸/۹–۴۱/۳	۶–۶/۴	۶۵	
رودوباکتر اسفه‌آروئیدس	ناپیوسته فلاسک	گلوکز+ آمونیم گلوتامات (۴۰ وmM ۱۰)	گ . ن	گ . ن	گ . ن	۳۳
		آمونیم + لاکتات آمونیم + استات آمونیم + پیروات آمونیم + سوسکسینات آمونیم + گلوکز	۰ ۴۰ ۰ ۲ ۶/۷	۰ ۱/۲ ۰ ۰/۰۴ ۰/۱۵	۱۴	
	ناپیوسته در فلاسک	لاکتات (بدون آمونیم) استات پیروات سوسکسینات گلوکز	۱۲ ۳۹ ۱۴ ۵ ۴	۰/۱۸ ۰/۶ ۰/۲۸ ۰/۰۷۵ ۰/۰۶	۲۰	۳۳
		گلوتامات + لاکتات گلوتامات + استات گلوتامات + پیروات	۱۰ ۲۵ ۶	۰/۳ ۰/۵ ۰/۱۸	۲۴	۳۳
جنس آلکالی ژنز	ناپیوسته/ فلاسک (۵۰۰mL)	n ـ آلکانوئیک اسیدها ($C_۲ - C_{۲۲}$) روغن Rapeseed روغن زیتون لارد روغن سویا روغن ذرت روغن Palm	۱–۶۰ ۴۴ ۶۱ ۳۱ ۳۳ ۳۹ ۴۰	۰/۲–۳/۲ ۲/۴۸ ۳/۱۱ ۲/۴۱ ۲/۴۱ ۲/۷۹ ۲/۱۳	۴۸ ۹۲ ۴۷ ۶۱ ۴۸ ۴۸ ۴۸	۳۴

(۱) Veronia Galamensis
(۲) گزارش نشده
(۳) ناپیوسته خوراک دهی شده
(۴) Continuous stirred tank reactor

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول ۲

ازتوباکتر وینلاندی UWD	ناپیوسته/ فلاسک (۵۰۰mL)	شربت ذرت ملاس نیشکر ملاس چغندر عصاره مالت آمونیم استات + گلوکز آمونیم استات + فروکتوز آمونیم استات + سوکرز آمونیم استات + مالتوز گلیسرول یا سدیم گلوتامات + گلوکز + فروکتوز + سوکرز + مالتوز	گ . ن	<۲ <۱/۵	گ ن	۳۵
ازتوباکتر وینلاندی ATCC۵۳۷۹۹	ناپیوسته/ فرمنتور (۲/۵ لیتری)	n– آلکانوآت + ملاس چغندر n– آلکانوآت بدون ملاس پروپیونات بوتیرات والرات پنتوآت اکتانوآت	۶۳:PHBV ۶۶ ۶۵ ۶۵ ۶۴ ۶۳	۴/۷ ۵/۳ ۴/۹ ۴/۷ ۷/۴ ۷/۳	۱۲	۳۵
جنس *آلکالی ژنز*	ناپیوسته/ فلاسک (۵۰۰mL)	آلکاندیوئیک اسید[۱] مانند: سوکسینیک (C_4) گلوتاریک (C_5) آدیپیک (C_6) سوبریک (C_8) آزلائیک (C_9) اسید چرب هیدروکسیله: ۱۲– هیدروکسی استئاریک رسینولئیک[۲] روغن کرچک[۳] هیدروکسی اکتانوئیک	۵۰ ۵۹ ۵۰ ۵۸ ۲۴ (PHBV) ۴۶ ۲۶ ۵۳ ۱۵	۰/۳۸ ۰/۴۰ ۰/۲۵ ۰/۳۵ ۰/۴۵ ۱/۴۴ ۰/۵۱ ۰/۸ ۰/۰۸	۴۸–۹۶	۳۶
سودوموناس[۴]	ناپیوسته/ (۱۵L) ن پ خ / (۱۵L)	متانل ≈ در محدودیت آمونیم ≈ در محدودیت منیزیم ≈ در محدودیت فسفات	۳۷ ۵۰ ۴۲/۵ ۳۴/۵	۶/۱ نامشخص نامشخص نامشخص	۳۰ ۴۰ ۴۰ ۴۰	۳۷
ازتوباکتر وینلاندی UWD	ناپیوسته/ فرمنتور (۲/۵ لیتر)	ملاس چغندر ۵ درصد همراه با اکسیژن محلول ۵ درصد ۱۰ درصد، ۲۰ درصد	۷۳ ۵۹ ۴۸	۰/۱۶ ۰/۲۸ ۱	۲۴	۳۹

(۱) اسیدهای با تعداد کربن زوج و فرد، PHB و اسیدهای هیدروکسیله با اتم‌های کربن فرد PHBV تولید می‌کنند.

(۲) Ricinoleic acid (۳) Castor (٤) Pseudomonas

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۲

سودوموناس ائروژینوزا IFO ۳۹۲۴	ناپیوسته/ فلاسک و فرمنتور (۰/۵ و ۵ L)	دکانوآت + اتانل + گلوکز	۲۳	۰/۵۰	۷۲	۴۰
سودوموناس ائروژینوزا PA۰۱	ناپیوسته/ فلاسک و فرمنتور(۰/۵ و ۵ L)	دکانوآت، اتانل وگلوکز[۱]	۱۰	۰/۲	۷۲	۴۰
سودوموناس ائروژینوزا IFO۳۷۵۵			۲۲	۰/۶۸	۷۲	
سودوموناس پوتیا IFO۱۴۱۶۴			۲۱	۰/۵۸	۷۲	
سودوموناس اولئووارانس	ناپیوسته	n ـ آلکانوئیک اسیدها نانوآت[۲] کاپرات هپتانوات اکتانوآت دکانوآت	 ۰/۴۹ ۵ ۲۲ ۴۱ ۳۷	 ۰/۷۳ ‹۰/۱ ۰/۲ ۰/۶ ۰/۴	۲۴	۴۱
رالستونیا اوتروفا H۱۶	ناپیوسته/ فلاسک (۵۰۰mL)	فروکتوز زایلوز فوماریک ایتاکونیک لاکتیک پرولیونیک	۷۰ ۱۱ ۲۲ ۱۳ ۴۷ ۵۸	۶/۹ ۰/۳۷ ۱/۲ ۰/۸۳ ›۳ ›۳	۲۴	۴۲
باسیلوس مگاتریوم B-۱۲۴	ناپیوسته/ فلاسک (۵۰۰mL)	سوکرز و کلرید آمونیم	۲۰	۱/۵	۴۸	۴۳
رالستونیا اوتروفا DSM۵۴۵	ن . پ . خ [۳] / فرمنتور (۴ لیتری)	آب پنیر به همران قند معکوس	PHBV ۳۷	۳۰	۱۲–۲۱	۴۴
سودوموناس اسیدووارانس[۴]	ن . پ . خ	۱و۴ بوتان دی ال و پنتانل	PHBV ۸–۱۹	۰/۳–۰/۵	۴۸–۹۶	۴۵

جدول ۳ – انواع سامانه‌های تخمیری در تولید PHAs با هدف رسیدن به تراکم سلولی بالا.

باکتری	سوبسترا	سامانه تخمیری	PHA (درصد)	غلظت سلول (g/L)	بهره‌دهی (g/L.h)	مرجع
سودوموناس اولئووارانس	محیط‌کشت ۲ فازی حاوی n– اکتان (۱۰ درصد v/v)	ن . پ . خ / (۳ لیتری)	۴۰	۱۱۲	۲	۴۶
	n– اکتان (۱۲/۵ درصد) + آمونیم ۱۶/۷ mM ≈ ۱۱۶/۶ mM	پیوسته (۳ لیتری) $D = ۰/۲\ h^{-۱}$	۳۵	۲–۳ ۱۱/۶	۰/۱۷ ۰/۵۸	۴۷
	n– اکتان (۱۵ درصد حجمی)	پیوسته (۳ لیتر) $D = ۰/۰۹\ h^{-۱}$ $D = ۰/۴۶\ h^{-۱}$	۴۶/۷ ۸/۳	۲/۲۵ ۱/۳۲	۰/۰۹ ۰/۰۵	۴۸
	n– اکتان (۱۵ درصد حجمی)	پیوسته ۲ مرحله در کموستات (۳ L)				

(۱) این باکتری قادر است با تولید داخل سلولی آنزیم PHB دهیدرژناز، PHB را به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی مصرف کند.

(۲) Nonaoate (۳) ناپیوسته خوراک‌دهی شده (۴) Pseudomonas acidovorance

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول ۳

		$h_1 = 0.2\ h^{-1}$ $h_2 = 0.04\ h^{-1}$ تک مرحله $h_1 = 0.2\ h^{-1}$	۳۸٫۵ ۶۳ ۴۱	۱۰٫۵ ۱۸ ۲٫۱۴	۱٫۰۶ ۱٫۰۶ ۰٫۱۷۵	۴۹
ناتریالبا[1] (جدا شده از خاک پرنمک مصر)	استات و بوتیریک اسید	ناپیوسته (۸ لیتر)	۵۳	۲٫۲۸	۰٫۱۹	۵۰
رالستونیا اوتروفا NCIMB۱۱۵۹۹	گلوکز ۱۰–۲۰g/L	ن . پ . خ (pH ستات)	۷۶	۱۶۴	۲٫۱۵۷	۵۱
سودوموناس	متانل ۰٫۵g/L اکسیژن محلول: ۲٫۵ ± ۰٫۵ ppm	ن . پ . خ	۶۶	۲۰۶	۲٫۷۴۶	۵۲
رالستونیا اوتروفا ATCC ۱۷۶۹۹	بوتیریک اسید ۳g/L	ن . پ . خ pHستات (۵ L)	۷۵	۳٫۴	۰٫۹	۵۳
	بوتیریک اسید و والریک ۳–۰٫۳g/L	ن . پ . خ (۵ L)	۴۹–۵۵	۱٫۴۲	۰٫۲۱	۵۴
	بوتیریک اسید ۳–۱g/L	ن . پ . خ (۵ L)	۵۳	۲٫۵	۰٫۲۵	۵۵
آلکالی ژنز لاتوس DSM–۱۱–۲۳	سوکرز ۳۰ g/L آمونیم سولفات (C/N=)	ناپیوسته ۲٫۵ L	۴۵	۱۷٫۶	۰٫۴۶	۵۶
واریووراکس پارادوکسوس	فنل و سدیم بنزوئات ۰٫۷۲g/L	پیوسته/ کموستات $D = 0.1\ h^{-1}$	۲۸	۲٫۵	۰٫۰۲۵	۵۷
رالستونیا اوتروفا DMSZ ۴۰۵۸	آمونیم ۰٫۳ g/L فنل ۱ g/L	پیوسته/ کموستات $D = 0.1\ h^{-1}$	۱۰	۳	۰٫۰۶	۵۷
آلکالی ژنز لاتوس ATCC ۲۹۷۱۴	سوکرز ۱٫۴–۵۶ g/L آمونیم ۰٫۲–۰٫۵g/L	ن پ pHستات در فرمانتور L ۸	۶۳	۲۱٫۹۶	۱٫۱۵	۵۸

(۱) Natrialba

تاریخ دریافت: ۸۳٫۸٫۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۲٫۱۲

مراجع

[1] Castella, J. M., Urmenta, J., Lafuente, R., Navarrte, A. and Guerrero, R., Biodegradation of Poly(hydroxy alkanoate) in Aerobic Sediments, *Inter. Biodeter. Biodeg.,* **74**, 155 (1995).

[2] Shimao, M., Biodegradation of Plastics, *Curr. Opinion Biotechnol.,* **12**, 242 (2001).

[3] Schlegel, H. G., Gotscholk, G. and Bartha, R., Formation and Utilization of Poly(hydroxy butyrate) by *Knallgas* Bacteria (*hydrogenomonos*), *Nature*, **191**, 463 (1961).

[4] Nishida, H. and Tokiwa, Y., Effects of Higher Order Structure of Poly(hydroxy butyrate) on it Biodegradation, I. Effects of Heat Treatment on Microbial Degradation, *J. Appl. Polym. Sci.,* **46**, 1467 (1992).

[5] Kumagai, Y. and Doi, Y., Enzymatic Degradation of Binary Blends of Microbial Poly(hydroxy

Archive of SID
www.SID.ir

butyrate) with Enzymatically Active Polymers, *Polym. Degrad. Stability,* **37**, 253 (1992).

[6] Swift, G., Biodegradability of Polymers in the Environment: Complexities and Significance of Definitions and Measurements, *FEMS Microbiol. Rev.,* **103**, 339 (1992).

[7] Aminabhavi, T. M. and Balunggi, H., A Review on Biodegradable Plastics, *Polym. Plast. Technol. Eng.,* **29**(3), 235 (1990).

[8] Brandl, H., Gross, C. A. N., Lenz, R. W. and Fuller, R. C., Plastics from Bacteria and for Bacteria: Poly(hydroxybutyrate) as Natural Biodegradable Polyesters, *Adv. Biochem. Eng.,* **41**, 77 (1990).

[9] Griffin, G. J. L., "Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers", Chapman & Hallm (1994).

[10] Doi, Y., "Microbial Polyesters", Chapman & Hallm (1990).

[11] Saad, B., Neuenschwander, P., Uhlschmid, G. K. and Suter, U. W., New Versatile Elastomeric Degradable Polymer Materials for Medicine, *Inter. J. Biomacromol.*,**13,** 158 (2001).

[12] Bariede, K., Transport Water and Molecule Mobility in Novel Barrier Membranes with Different Morphology Features, *Desalination,* **126**, 153 (1999).

[13] Ling, Y., Wong, H. H., Thomas, C. J., Williams, D. R. G. and Middelberg, A. P. J., Pilot Scale Extraction of Poly(β-hydroxybutyric acid) from Recombinant *E. coli* by Homogenization and Centrifugation, *Bioseparation,* **7**, 9 (1997).

[14] Tamer, I. M., Moo-Young, M. and Chisti, Y., Optimization of Poly(β-hydroxybutyric acid) Recovery from *Alcaligenes latus*: Combined Mechanical and Chemical Treatments, *Bioprocess Eng.,* **19**, 459 (1998).

[15] Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E. and Shojaosadati, S. A., Application of the Plackett-Burman Statistical Design to Optimize Poly(hydroxybutyrate) Production by *Ralstonia eutropha* in Batch Culture, *Iran. J. Biotechnol.*, **1**(3), 155 (2003).

[16] Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E., and Shojaosadati, S. A., Application of the Taguchi Design for Production of Poly(hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha, Iran. J. Chem. & Chem. Eng.,* **23**(1), 131 (2004).

[17] Tabandeh, F. and Vasheghani-Farahani, E., Biosynthesis of Poly(β-hydroxybutyrate)as a Biodegradable Polymer, *Iranian Polym. J.,* **12**, 37 (2003).

[18] Hejazi, P., Vasheghani-Farahani, E. and Yamini, Y., Supercritical Disruption of *Ralstonia eutropha* for Recovery of Poly(β-hydroxybutyrate), *Biotechnol. Prog.,* **19**, 15 (2003).

[19] Khosravi-Darani, K., Vasheghani-Farahani, E., Shojaosadati, S. A. and Yamini, Y., The Effect of Process Variable on Poly(R-hydroxybutyrate) Recovery by Supercritical Fluid Cell Disruption, *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1757 (2004).

[20] Shahhosseini, Sh., Sadeghi, M.T. and Khosravi-Darani, K., Simulation and Model Validation of Batch Poly(hydroxy butyrate) Production Process Using *Ralstonia eutropha, Iran. J. Chem. & Chem. Eng.,* **22**(2), 35 (2003).

Archive of SID

www.SID.ir

[21] Liebergesell, M., Hustede, E., Timm, A., Steinbuchel, A., Fuller, R. C., Len, Z. R. W. and Schlegel, H. G., Formation of Poly(hydroxyalkanoate) by Phototrophic and Chemolitho-autrophic Bacteria, *Arch. Microbiol.*, **155**, 415 (1991).

[22] Schwien, U. and Schmidt, E., Improved Degradation of Monochlorophenol by Constructed Strain, *Appl. Environ. Microbiol.,* **44**, 33 (1982).

[23] Mergeay, M., Houba, C. and Gerits, J., Extra Chromosomal Inheritance Controlling Resistance to Cadmium and Zinc Ions: Evidence from Curing in a *Psudomonas, Arch. Int. Physiol. Biochem.,* **86**, 440 (1978).

[24] Ohi, K., Takaida, N., Komemushi, S., Okazaki, M. and Miura, Y., A New Species of Hydrogen-Oxidizing Bacterium, *Appl. Microbiol.,* **25**, 53 (1979).

[25] Griffin, G. J. L., "Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers", Blackie Academic & Professional, London (1994).

[26] Juttner, R. R., Lafferty, R. M. and Knackmuss, H. J., A Simple Method for the Determination of the Poly(hydroxybutyrate) in Microbial Biomass, *Eur. J. Appl. Microbiol.,* **1**, 233 (1975).

[27] Jackson, F. A. and Edwin, A., Regulation of the Tricarboxylic Acid Cycle and Poly(hydroxy-butyrate) Metabolism in *Azotobacter beijirinki* Grown Under Nitrogen or Oxygen Limitation, *J. General. Microbiol.,* **97**, 303 (1976).

[28] Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K. F., Poly(β-hydroxyalkanotes), Biopolyesters from Renewable Resources: Physiological and Engineering Aspects, *J. Biotechnol.,* **65**, 127 (1998).

[29] Takahiro, S., Yamane, T. and Shimizu, S., Mass Production of Poly(hydroxybutyrate) by Fully Automated Fed Batch Culture of Methylotroph, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **23**, 322 (1986).

[30] Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K., Nuclear Magnetic Resonance Studies on Unusual Bacterial Copolyesters of 3HB and 4HB, *Macromolecules,* **21**, 2722 (1988).

[31] Ayorinde, F. O., Saeed, K. A., Eribo, E., Morrow, A., Collis, W. E., Mclnnis, F., Pollack, S. K. and Eribo, B., Production of Poly(hydroxybutyrate) from Saponified *Veronia galamesis* Oil by *Alcaligenesis eutrophus, J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 46 (1998).

[32] Sonneleitner, B., Heinzle, G., Braunegg, G. and Lafferty, R. M., Formal Kinetics of Poly(hydroxybutyrate) Production in *Alcaligenes eutrophus* H16 and *Mycoplana rubra* to the Dissolved Oxygen Tension in Ammonium-Limited Batch Cultures, *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **7**, 1 (1979).

[33] Page, W. J. and Cornish, A., Growth of A*zotobacter vinelandii* in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Pol(hydroxybutyarte), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 4236 (1993).

[34] Fuchtenbusch, B. and Steinbuchel, A., Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoate) from Low Rank Coal Liquefaction Products by *Pseudomonas oleovorance* and *Rhodococcus rubber, Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 91 (1999).

[35] Fuchtenbusch, B., Wullbrandt, D. and Steinbuchel, A., Production of Poly(hydroxyalkanoate) by *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas oleovorance* from an Oil Remaining from

Archive of SID

www.SID.ir

Biotechnological Rhamnose Production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **53**, 167 (2000).

[36] Khatipov, E., Miyake, M., Miyake, J. and Asads, Y., Accumulation of Poly(hydroxybutyrate) by *Rhodobacter sphearoides* on Various Carbon Source and Nitrogen Substrates, *FEMS Microbiol. Lett.*, **18**, 39 (1998).

[37] Akiyama, M., Taima, Y. M., Doi, Y., Production of Poly(hydroxybutyrate) by a Bacterium of the Genus *Alcaligenes* Utilizing Long Chain Fatty acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **37**, 698 (1992).

[38] Page, W. J., Production of Poly(hydroxybutyrate) by *Azotobacter vinelandii* UWD During Growth on Molasses and Other Complex Carbon Sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 329 (1989).

[39] Akiyama, M. and Doi, Y., Production of Poly(hydroxybutyrate) from Alkanedioic Acids and Hydroxylated Fatty Acids by *Alcaligenes* Sp, *Biotechnol. Lett.,* **15**(2), 163 (1993).

[40] Daniel, M., Choi, J. H., Kim, J. H. and Lebeault, J. M., Effect of Nutrient Deficiency on Accumulation and Relative Molecular Weight of Poly(hydroxybutyrate) by Methylotrophic Bacterium *Pseudomonas* 135, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **37**, 702 (1992).

[41] Daniel, M., Barbotin. J. N., Kim, J. H. and Lebeault, J. M., Partial Purification and Characterization of Poly(hydroxybutyrate) Dehydrogenases of a Methylotrophic Bacterium *Pseudomonas* 135, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **37**, 707 (1992).

[42] Chen, G. and Page, W. J., The Effect of Substrate on the Molecular Weight of Poly(hydroxy-butyrate) Produced by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.,* **16**(2), 155 (1994).

[43] Horib, K., Marsudi, S. and Unno, H., Simultaneous Production of Poly(hydroxyalkanoate) and Rhamnolipids by *Pseudomonas aeroginosa. Biotechnol. Bioeng.,* **78**(6), 699 (2002).

[44] Gross, R. A., DeMello, C., Lenz, R. W., Brandl, H. and Fuller, C., Biosynthesis and Characterization of Poly(hydroxyalkanoate) Produced by *Pseudomnas oleovorance, Macromolecules,* **22**, 1106 (1989).

[45] Linko, S., Vaheri, H. and Seppala, J., Production of Poly(hydroxy butyrate) by *Alcaligenes eutrophus* on Different Carbon Sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **39**, 11 (1993).

[46] Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. and Sakazawa, C., Production of Poly(hydroxybutyrate) Trimer by *Bacillus megaterium* B124, *J. Ferment. Bioeng.,* **73**(3), 246 (1992).

[47] Maranogoni, C., Furigo, A. and Glancia, M. F., Production of Poly(hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha* in Whey and Inverted Sugar with Propionic Acid Feeding, *Process Biochem.,* **38**, 137 (2002).

[48] Kimura, H., Yoshida, Y. and Doi, Y., Production of Poly(hydroxybutyrate) by *Pseudomonas acidovorance, Biotechnol. Lett.,* **14**(6), 149 (1992).

[49] Kellerhals, M. B., Hazenberg, W. and Witholt, B., High Cell Density Fermentation of *Pseudomonas oleovorance* for the Production of MCL-PHA in two Liquid Phase Media, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **24**, 111 (1999).

Archive of SID

www.SID.ir

[50] Preusting, H. and Hazenberg, W., Continuous Production of Poly(hydroxbutyrate) by *Pseudomonas oleovorance* in a High Cell Density, Two Liquid Phase Chemostat, *Enzyme Microbiol. Technol.,* **15**, 311 (1993).

[51] Preusting, H., Kingama, J. and Witholt, B., Physiology and Polyester Formation of *Pseudomonas oleovorance* in Continuous two Liquid Phase Cultures, *Enzyme Microbiol. Technol.,* **13**, 770 (1991).

[52] Jung, K., Hazenberg, W. and Prieto, M. W., Two Stage Continuous Process Development for the Production of Medium Chain Length PHAs. *Biotechnol. Bioeng.*, **72**(1), 19 (2001).

[53] Hezayen, F. F., Rehm, B. H. A. and Eberhardt, R., Polymer Production by 2 Newly Isolated Extremely Halophilic Archaea: Application of a Novel Corrosion Resistance Bioreactor. (2000).

[54] Kim, B. S., Lee, Sc., Lee, S. Y. and Chang, H. N., Production of Poly(hydroxybutyrate) by Fed Batch Culture of *Ralstonia eutropha* with Glucose Concentration Control. *Biotecnol. Bioeng.*, **43**, 892 (1994).

[55] Suzuki, T., Yamane, T. and Shimizu, S., Mass Production of Poly(hydroxybutyrate) by Fully Automatic Fed Batch Culture of Methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322 (1989).

[56] Shimizu, H., Tamira, S., Shioya, S. and Suga, K., Kinetics Study of Poly(hydroxybutyrate) Production and Its Molecular Weight Distribution Control in Fed Batch Culture of *A. eutrophus, J. Ferment. Bioeng.*, **76**(6) 465 (1993).

[57] Ishihara, Y., Shimizu, H. and Shioya, S., Mole Fraction Control of Poly(hydroxybutyrate) in Fed Batch Culture of *A. eutrophus, Biotechnol. Bioeng.*, **81**(5), 422 (1994).

[58] Shimizu, H., Kozaki, Y., Kodama, H. and Shioya, H., Maximum Production Strategy for Biodegradable Copolymer PHBV in Fed Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus, Biotehnol. Bioeng.,* **62**(5), 518 (1998).

[59] Cho, G. D., Yoo, J. Y., Oh, J. T. and Kim, W. S., Study on the Biosynthesis of Poly(hydroxy-butyrate) With *Alcaligenes latus, Hwahak Konghak*, **35**, 412 (1997).

[60] Masow, T. and Babel, W., Calorimetrically Recognized Maximum Yield of Poly(hydroxy-butyrate) Continuously Synthesized from Toxic Substrate, *J. Biotechnol.,* **77**, 247 (2000).

[61] Grothe, E. and Chisti, Y., Poly(hydroxybutyrate) Thermoplastic Production by *Alcaligenes latus* Behavior of Fed Batch Culture, *Biotechnol. Bioeng.,* **22**, 441 (2000).

[62] Choi, J. and Lee, S. Y., Process Analysis and Economic Evaluation for Poly(hydroxybutyrate) Production by Fermentation, *Bioprocess Eng.,* **17**, 335 (1997).

[63] Lee, S. Y., Bacterial Poly(hydroxyl alkanoates), *Biotechnol. Bioeng.,* **49**, 1 (1996).

[64] Steinbuchel, A. and Huchtenbusch, B., Bacterial and Other Biological Systems for Polyester Production, *Trends Biotechnol.,* **16**, 419 (1998).

[65] Sasikala, C. and Ramana, C. V., Biodegradable Polyesters, *Adv. Appl. Microbiol.,* **42**, 197 (1996).

Archive of SID

www.SID.ir

[66] Madison, Y., Pkaki, M., Ohi, K. and Nishimura, T., Growth Kinetics of Hydrogen Bacterium *Alcaligenes hydrogenophilus*, *Agric. Rev.*, **63**, 1 (1981).

[67] Yamane, L., Fukunaga, M., Dee, Y. W. Increase Poly(hydroxybutyrate) Production by High Cell Density Fed Batch Culture of *Alcaligenes Latus* ,a Growth Associated Poly(hydroxybutyrate) Producer, *Biotechnol. Boieng.,* **50**, 197 (1996).

[68] Wang, F., Lee, S. Y. Production of PHV by Fed Batch Culture of Fermentation Suppressed Recombinant *E.coli, Appl. Environ. Microbiol.,* **63**, 4765 (1997).

[69] Ahnwsipark, S. J., Lee, S. Y. Production of Poly(hydroxybutyrate) by Fed Batch Culture of Recombiant *E. coil* with a Highly Concentrated Whey Solution, *Appl. Environ. Microbiol.,* **66**, 3624 (2000).

[70] Rhee, Y. H., Jang, J. H. and Roger, P. L., Production of Copolymer Consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Fed Batch Culture of *Alcaligenes* Sp. SH-69, *Biotechnol. Lett.*, **15**, 377 (1993).

[71] Tanaka, K. and Ishizaki, A., Production of Poly(hydroxybutyrate) from CO2 by a Two Stage Culture Method Employing *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697, *J. Ferment. Bioeng.,* **77**(4), 425 (1997).

[72] Ishizaki, A. and Tanaka, K., Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697^T Using Recycled Gas Closed Circuit Culture System, *J. Ferment. Bioeng.,* **69**(3), 170 (1990).

[73] Tanaka, K., Ishizaki, A. and Stanbury, P. F., Accumulation of Polyphosphate and Substrate Gas Utilization Efficiency in Poly(hydroxybutyrate) Accumulation Phase of Autotrophic Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* ATCC17697, *J. Ferment. Bioeng.,* **74**(5), 288 (1992).

[74] Takeshita, T., Tanaka, K., Ishizaki, A. and Stanbury, P. F., Development of a Dissolved Hydrogen Sensor and Its Application of Evaluation of Hydrogen Mass Tranfer, *J. Fermen. Bioeng.,* **76**(2), 148 (1993).

[75] Tanaka, K., Ishizaki, A., Kanamaru, J. and Kawamo, T., Production of Poly(hydroxybutyrate) from CO_2, H_2 and O_2 by Cultivation of *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Bioeng.,* **45**, 268 (1995).

[76] Riesenberg, D., High Cell Density cultivation of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2**, 380 (1999).

[77] Markl, H., Zenneck, C., Dubach A. and Ogbonna, J. C., Cultivation of *Escherichia coli* to High Cell Densities in a Dialysis Reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **39**, 48 (1993).

[78] Lee, S. Y., High Cell Density of *Escherichia coli*, *Trends Biotechnol.*, **19**, 98 (1996).

[79] Vande Walle, M. and Shiloach, J., Proposed Mechanism of Acetate Accumulation in Two Recombinant *Escherichia coli* Strains During High Cell Density Fermentation, *Biotechnol. Bioeng.,* **57**, 71 (1998).

[80] Zhang, X. W., Sun, T., Liu, X., Gu, D. X. and Huang, X. N., Human Growth Hormone

Archive of SID

www.SID.ir

Production by High Cell Density Fermentation of Recombinant *Escherichia coli, Process Biochem.*, **33**, 683 (1998).

[81] Enfors, S. O. Physiological Responses to Mixing in Large-scale Bioreactors, *J. Biotechnol.,* **85**, 175 (2001).

[82] Ryu, H. W., Hahn, S. K., Chang, Y. K. and Chang, H. N., Production of Poly(hydroxy-butyrate) by High Cell Density Fed Batch Culture of *Alcaligenes eutrphu*s with Phosphate Limitation, *Biotechnol. Bioeng.,* **55**, 28 (1997).

[83] Preusting, H., Houten, R. V. and Hoefs, A., High Cell Density Cultivation of *P. oleovorans:* Growth and Production of Poly(hydroxybutyrate) on 2 Liqiud Phase Batch and Fed Batch System, *Biotechnol. Bioeng.,* **40**, 550 (1993).

[84] Ishizaki, A., Tanaka, K. and Taga, N., Microbial Production of Poly(hydroxybutyrate) from CO_2, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **57**, 6 (2001).

[85] Taga, N., Tanaka K. and Ishizaki A., Effects of Rheological Changes by Addition of Carboxy Methylcellulose in Culture Media of an Air- Lift Fermentor on Poly(hydroxybutyrate) Productivity in Autotrophic Culture of Hydrogen Oxidizing Bacterium, *Alcaligenes eutrophus, Biotechnol. Bioeng.,* **53**(5), 529 (1997).

[86] Ramsay, J. A., Berger, E., Voyer, R., Chavarie, C. and Ramsay, B. A., Extraction of Poly(R-hydroxybutyrate) Using Chlorinated Solvents, *Biotechnol. Tech.,* **8**, 589 (1994).

[87] Choi J. and Lee S .Y., Factors Affecting the Economics of Poly(R-hydroxyalkanoate) Production by Bacterial Fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* **51**, 13 (1995).

[88] Hocking, P. J. and Marchessault, R. H., Biopolyesters. In: "Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers", Griffin, G. J. L., Eds., London: Chapman and Hall: London, pp. 48-96 (1994).

[89] Harrison, S. T. L., Bacterial Cell Disruption: A Key Unit Operation in the Recovery of Intracellular Products, *Biotechnol. Adv.*, **9**, 217 (1991).

[90] Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., Lee, K. M. and Chang, H. N., The Recovery of Poly(R-hydroxybutyrate) by Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform, *Biotechnol. Tech.,* **7**, 209 (1993).

[91] Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S. and Chang, H. N., Optimization of Microbial Poly(R-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform, *Biotechnol. Bioeng.,* **44**, 256 (1994).

[92] Holmes, P. A. and Lim, G. B., Separation Process. U.S. Patent 4910145, (1990).

[93] Resch S., Gruber K., Wanner, G., Slater,S., Dennis,D. and Lbitz,W., Aqueous Release and Purification of Poly(hydroxybutyrate) from *Escherishia coli*, *J. Biotechnol.*, **65**, 173 (1998).

[94] Harrison, S. T. L., Dennis, J. S. and Chase, H. A., Combined Chemical and Mechanical Processes for the Disruption of Bacteria, *Bioseparation,* **2**, 95 (1991).

[95] Tamer, I. M., Chisti, Y. and Moo-Young, M., Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of

Archive of SID

www.SID.ir

Poly(β-hydroxybutyric acid): Comparison of High Pressure Homogenization, Bead Milling and Chemically Induced Lysis. *Ind. Eng. Chem. Res.,* **37**, 1807 (1998).

[96] Schutte, H., Kroner, K. H., Hustedt, H. and Kula, M. R., Experiences With a 20 Liter Industrial Bead Mill for the Disruption of Microorganisms, *Enzyme Microbiol. Technol.,* **5**, 143 (1983).

[97] Juhasz T., Szekely E., Simandi B., Szengyel Zs. and Reczey K., Recovery of a Recombinant Thermostable Endoglucanase from *E. coli* Using Supercritical Carbon Dioxide Cell Disruption, *Chem. Biochem. Eng.,* **17**, 131 (2003).

Archive of SID

www.SID.ir