# تولید پروتئین تک یاخته از گاز طبیعی

سید عباس شجاع السادات[1]، فاطمه یزدیان[2*]

۱. گروه بیوتکنولوژی، بخش مهندسی شیمی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه تربیت مدرس، کدپستی ۱۴۳-۱۴۱۱۵ ، تهران

۲. مدیریت تحقیق وتوسعه شرکت ملی نفت ایران

fatemehyazdi@yahoo.com

نهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ایران

دانشگاه علم و صنعت ایران
۳-۵ آذر ماه ۱۳۸۳

## چکیده

**در این تحقیقات پس از نمونه گیری از مناطق نفت خیز جنوب جداسازی میکروارگانیزمهای مناسب. ارزیابی آنها برای مصرف متان به عنوان منبع کربن و تولید SCP به منظور پروتئین افزودنی به خوراک دام ، طیور و آبزیان انجام شد. در ادامه تحقیقات مصرف گاز متان توسط میکروارگانیزم در فلاسک انجام شد.نتایج بدست آمده بیانگر رشد میکروارگانیزم در حضور گاز متان در فاز مایع بود.طراحی سیستم مناسب برای تولیدSCP از گاز متان بصورت مداوم در ادامه کار در دستور کار قرار گرفت که نتایج متعاقباً اعلام خواهد شد.**

**کلمات کلیدی:** پروتئین تک یاخته،گاز طبیعی ،جداسازی میکروارگانیزم

## مقدمه

افزایش روزافزون جمعیت جهان نیاز به تولید مقدار بیشتری پروتئین را مطرح می‌سازد. فعالیتهای تولید در این راستا در اغلب کشورهای جهان با مشکل روبرو است. علت اصلی این امر شرائط نامطلوب آب و هوا، کمبود امکانات در بخش کشاورزی و به کارگیری روشهای سنتی است. از این رو کشورهائی که با مشکل جمعیت زیاد دست به گریبان هستند، برای رفع نیازهای غذائی مردم ناچار به وارد کردن مقادیر زیادی مواد اولیه پروتئین گیاهی و یا حیوانی به طور سالیانه هستند. گروه بیوتکنولوژی دانشکده فنی و مهندسی دانشگاه تربیت مدرس در طی یک دهه گذشته در پی منابع جدید پروتئین با تولید انبوه از میکروارگانیسم‌ها بوده‌اند و از توده سلولهای میکروبی به عنوان خوراک دام استفاده شده است. به این محصول پروتئین تک‌یاخته گفته می‌شود.

با توجه به شرایط کشور ما از جهت دارابودن منابع عظیم گاز طبیعی واز طرف دیگر نیاز شدید کشور به مواد افزودنی پروتئینی به خوراک دام و طیور و آبزیان تولید پروتئین از گاز طبیعی (که در خارج از کشور اخیرا تا مقیاس صنعتی تولید شده است) کاملاً منطقی و اقتصادی به نظر میرسد. در این تحقیق با همکاری و پشتیبانی شرکت ملی نفت تولید SCP از گاز طبیعی در دستور کار قرار گرفته است.

## انتخاب سوبسترا

به علت در دسترس بودن، فراوانی و ارزان بودن گاز طبیعی تولید CP S ازگاز طبیعی مدنظر قرار گرفته است.جدول (۱ ) نشاندهنده درصد ترکیبات موجود در گاز طبیعی است.

**جدول ۱- درصد ترکیبات موجود در گاز طبیعی**

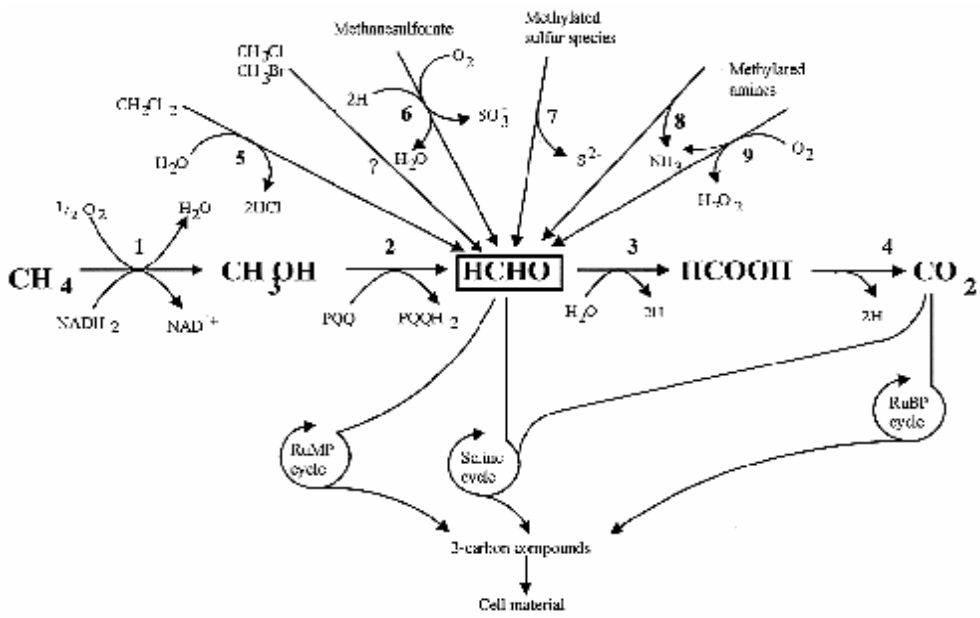
| | | |
|---|---|---|
| متان | $CH_4$ | ۷۰-۹۰ |
| اتان | $\mathbf{C_2H_6}$ | |
| پروپان | $C_3H_8$ | ۰-۲۰ |
| بوتان | $\mathbf{C_4H_{10}}$ | |
| دی اکسید کربن | $\mathbf{CO_2}$ | ۰-۸ |
| اکسیژن | $\mathbf{O_2}$ | ۰-.۲ |
| نیتروژن | $N_2$ | ۰-۵ |
| سولفید هیدروژن | $H_2S$ | ۰-۵ |
| **گازهای کمیاب** | $A,H_e,N_e,X_e$ | trace |

گاز طبیعی به آسانی و به صورت مداوم قابل اندازه‌گیری است، به آسانی از محصول نهائی جدا می‌شود، بسیار انتخابی است به طوریکه احتمال آلودگی با سایر میکروارگانیسم‌ها به حداقل می‌رسد و فرآیند تولید مداوم آن مؤثر و نسبتاً ارزان می‌باشد.

## میکروارگانیزم

میکروارگانیزمهای مصرف کننده متان گروهی از باکتریهای گرم منفی هستند که قدرت استفاده از متان به عنوان تنها منبع انرژی و کربن را دارند ودر زیر شاخه متیلوتروفها هستند.جدول (۲) باکتریهای مصرف کننده ترکیبات یک کربنه را نشان میدهد.

متانوتروفها در ابتدا توسط آنزیم مونواکسیژنازگاز طبیعی را به متانل اکسید می‌کنند و سپس متانل در ادامه به فرمالدئید توسط آنزیم دهیدروژناز متانل (آنزیم کلیدی در مسیر جذب و غیرجذب) تبدیل می‌شود. مقداری از فرمالدئید به توده‌زیستی (مسیر جذب) تبدیل می‌شود. الکترون آزاد شده در این مسیر به حلقه انتقال الکترون برای سنتز ATP فرستاده می‌شود. مواد باقی مانده به $CO_2$ اکسید می‌شود تا انرژی لازم برای رشد و متابولیسم فراهم شود (مسیر غیرجذب). تبدیل شدن C $O_2$ به اتانل مسیری مخالف در مقابل اکسیداسیون متان است که از دو مسیر ریبولوز مونوفسفات و سرین انجام می‌شود. در شکل زیر مسیر اکسیداسیون متان ارائه میگردد.




**شکل ۱- مسیر بیوشیمیائی مصرف متان توسط متانوتروفها**

جدول ۲- باکتریهای مصرف کننده ترکیبات $C_1$

| Microorganism | Serine Pathway | Ribulose Mono-Phosphate cycle | Obligate or Facultative | Substrate | Reference |
|---|---|---|---|---|---|
| Methylophius methylorophus NCIB 10515 | | + | obligate | CH4 Methanol | MCLENNAN et al.. 1970 |
| Methylomonas clara ATCC 31226 | | – | Obligate | CH4 Methanol | HOHENLOSER et al.. 1978 |
| Achromobacter methanophilia ATCC 21275 | | + | Obligate | Methanol | BYROM 1981 |
| Methylomonas methylovora ATCC 21963 | | + | Obligate | Methanol | KOUNO et al.. 1973 |
| Methylomonas methanolica NRRL B-5458 | | + | Obligate | Methanol | DOSTALEK et al.. 1972 |
| Methylococcus capsulatus ATCC 19069 | | + | Obligate | CH4 Methanol | WHITENBURY et al.. 1970 |
| Methylococcus thermophilus | | + | Obligate | CH4 | MALASHENKO and MALASHENKO 1981 |
| Methylocysis parcus NRRL B-11. 198 | + | | Obligate | CH4 Methanol | WHIITENBURY et al.. 1970 |
| Methylosinus trichosporum NRRL B-11, 196 | + | | Obligate | CH4 Methanol | - |
| Pseudomonas AMI NCIB 9133 | + | | Facultative | Methanol | TAYLOR and ANTHONY 1976 |
| Hyphomicrobium vulgare NCIB 9698 | + | | Facultative | Methanol | HIRSCH, 1964 |

## مواد و روشها

### نمونه برداری

برای بدست آوردن میکروارگانیزمهای مصرف کننده متان ،نمونه برداری از مناطقی که احتمال زیست این میکروارگانیزمها وجود داشت ،انجام گرفت.این مناطق شامل نواحی نفت خیز وگازی ،حاشیه چاههای نفتی ،پس آب پالایشگاههای نفتی و غیره می باشند.به همین منظور طی مسافرتی به مناطق نفت خیز جنوب ( دره خرسان در مسجد سلیمان )نمونه برداری شد..در شکل زیر این مناطق نشان داده شده است.

**شکل۲-دره خرسان در مسجد سلیمان که حاوی مواد نفتی در طی هزاران سال میباشد**

نمونه ها با لوازم سترون ودر ظروف سترون نمونه برداری جمع آوری گردید. در نمونه برداری از خاک ، نمونه ها از قسمت رویی تا عمق ۱۰-۵ سانتی متری برداشته شد، چون در این قسمت ها باکتریهای هوازی وجود دارند. برای نمونه برداری از پس آب ، با استفاده از سرنگ سترون ، نمونه برداری شد.برای اطمینان ، از هر کدام از مناطق تعیین شده ۵ نمونه برداشته شد.حدود ۷۰ نمونه ، در ظروف سترون جمع آوری شد. نمونه ها پس از جمع آوری ، برای آزمایش های غنی سازی و جداسازی در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل گردید.

## روش جداسازی و خالص سازی سویه ها

برای جداسازی باکتریهای مورد نظر از خاک ، ابتدا مقداری از خاک مورد نظر توزین شده وبه ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتری محیط کشت زیر منتقل شد. ارلن را درزبندی کرده و مخلوط گازی با نسبت ٪ ۲۰ متان و٪۸۰ هوا وارد شد. ارلن تحت دمای ۳۶ درجه سانتی گراد ودور بهم زن rpm ۱۵۰برای ۴۸ ساعت گرماگذاری شد.پس از رشد باکتریها ،مقداری از آن محیط به محیط کشت جا مد منتقل

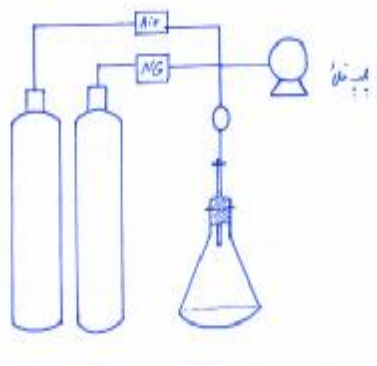
شد.گرماگذاری در دمای مذکور و به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت.برای خالص سازی وبدست آوردن کلنی تک از باکتریهای رشد یافته ، یک لوپ از باکتریها را برداشته و بصورت خطی روی محیط مورد نظرکشت داده شد.پس از گرماگذاری در دمای مذکور رشد باکتریها مورد بازبینی قرار گرفت.به منظور اطمینان از جداسازی تمامی باکتریها ،تمامی آزمایشها در سه بار تکرار صورت گرفت.با تکرارهای متعدد و انجام کشت خطی، باکتریها جدا ودر نهایت خالص سازی آنها صورت گرفت.

**جدول ۳- ترکیبات محیط کشت متان**

| | |
|---|---|
| $NH_4SO_4$ | .5 g/l |
| $KH_2PO_4$ | .3 g/l |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ | 1.8 g/l |
| $MgSO_4.7H_2O$ | .2 g/l |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 10 mg/l |
| $CuSO_4.H_2O$ | 1 mg/l |

بعد از جداسازی میکروارگانیزمهای مورد نظر ، ارلن حاوی ۲۰میلی لیتر محیط کشت ذکر شده سترون شد.تحت شرایط سترون به میزان ۵ تا ۱۰درصد تلقیح تزریق گردید.سپس دانسیته نوری نمونه مورد نظر در دستگاه جذب نوری اندازه گیری شد. مخلوط گازی(طبق شکل (۳)) با نسبت ۲۰٪ متان و۸۰٪ هوا وارد شد.ارلن درزبندی شد.

ارلن تحت دمای ۳۶ درجه سانتی گراد ودور بهم زن ۱۵۰r pm برای ۴۸ ساعت گرماگذاری شد.بعد از زمان ذکر شده برای اندازه گیری رشد سلولی نمونه ای ازمحتویات درون ارلن در شرایط سترون در دستگاه جذب نوری قرار داده شد.با انجام این آزمایشها در چند مرحله و اندازه گیری دانسیته نوری ، رشد سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. با تغییر نسبت متان و گاز طبیعی نسبت بهینه در مقیاس آزمایشگاهی در حال بررسی است. طبق شکل زیر منبع گاز طبیعی می تواند گاز شهری و یا کپسول گاز طبیعی فشرده شده(C NG) باشد.




**شکل ۳- فلاسک آزمایشگاهی تولید SCP**

## نتیجه وبحث

### غلظت متان واکسیژن

با توجه به آزمایشها مشخص است تحت شرائط غیرمداوم با ۹۷ درصد حجمی $O_2$، رشدی قابل ملاحظه اتفاق نمی‌افتد. با ۹۷ درصد متان رشد اندکی روی می‌دهد. درصد حجمی مساوی از متان و اکسیژن منجر به افزایش رشد می‌شود. رشد بهینه زمانی است که جریان گاز ورودی تأمین کننده مقادیر استوکیومتری از متان و اکسیژن حل شده در محیط‌کشت باشد. درصد مناسب گاز $O_2$ بین یک و ۹۷ درصد حجمی است. در صورت بکارگیری درصد حجمی ۹۷، اکسیژن اثرات سمی برجای می‌گذارد.

### pH

مقدار pH محیط‌کشت بر رشد باکتریهای متیلوتروف موثر است. برای اغلب این باکتریها pH بین ۵ تا ۷ است. مقادیرpH بالا و پائین سبب کاهش بازدهی می‌شود. در pH مناسب سرعت رشد ویژه به حداکثر می‌رسد .

معمولاً pH توسط سود و سولفات آمونیم تنظیم می‌شود. ولی برای تأمین منبع نیتروژن و خنثی‌سازی متابولیت‌های اسیدی، لازم ست که یون آمونیاک در محیط واکنش موجود باشد. در فرآیندهای مداوم، pH و مقدار نیتروژن محیط‌کشت به صورت خودکار تنظیم می‌شود.

### دما

تحمل دمای بالاتر یکی از خصوصیات مورد نظر برای سویه‌های باکتریائی در تولید SCP از هیدروکربن‌ها است. به عنوان مثال برای تولید SCP از متان هزینه کاهش دمای فرمانتور قابل توجه است. بنابراین باکتریهائی که در دمای بالاتر رشد می‌کنند و بازدهی وکیفیت مناسبی را دارا هستند، از نظر اقتصادی مناسب‌ترند .درجه حرارت کشت میکروارگانیسم‌ها برای تولید SCP بر سرعت رشد، ترکیب ماکرومولکولها، مقدار متابولیت‌های درون سلولی و در نهایت بر روی بازدهی توده‌زیستی موثر است .

### مواد معدنی محیط‌کشت

ترکیب اجزاء محیط‌کشت تأثیر زیادی بر کیفیت و کمیت سلولهای باکتریهائی تولید شده دارد. مناسب بودن محیط‌کشت به مقدار زیادی بر سرعت رشد، بازدهی و پایداری کشت میکروبی اثر می‌گذارد.مقادیر زیاد عناصر پر مقدار در محیط‌کشت (Mg, K, P, N, C) اثرات مشخصی را بر بازدهی توده‌زیستی دارد. در محیط‌کشت حداقل میزان یون منگنز ۰/۰۰۵g/L و یون آهن ۰/۰۰۰۱g/L می‌باشد .

# منابع و مراجع

1.Goldberg I.;"Single Cell Protein"; Springer-Verlag, 1985;67-125.

2. Peppler H.J. and perlman D; " Microbial Technology"; Academic Press; 1979; 1; 13-146.

3. Sharp D.H.; Bioprotein Manufacture; John Wiley & Sons; 1989; 53-105.

4. Abu – Ruwaida A.S., Banat I.M.and Hamadan I.Y.; "Large – Scale Production of Bacterial Biomass from Methanol for use as Milk-Replacer"; Biotechnology letters; 1990; 12; 139-144.

5. Bu'lock John & kristiansen Bjorb; " Basic Biotechnology" ; Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers; 1987; 285-300.

6.Greenshield Rod; "Resources and applications of Biotechnology"; the Macmillan Press htd; 1988; 141-50

7. Yoshiki Tani; "Methylotrophs for Biotechnology; Methanol as a Raw material for fermentation production"; Biotech. And Genetic Eng. Reviews; 1985; 3:111-135.

8.Levente Bodrossy, Kornel L. Kovacs, Ian R.McDonald, J. Colin Murell; "A novel thermophilic methane-Oxidising -proteobacterium"; 1999; 335-341

9. Anthony, C.; " Bacterial Oxidation of methane and Methanol"; Adv. Microb. Physiol. 1986;27: 113-210.

10. Anthony, C.; " Assimilation of Carbon in methylotrophs"; In I. Goldberg and J.S. Rokem (ed), Biology of methylotrophs. Butterworthy-Heinemann, Stone hum, Mass.1991;79-109.

11. Liefk E. and Onkenu; "Influence of total & Oxygen partial pressure on growth and metabolism of Methylomonas clara"; Biotechnal & Siaenge; 1992; 40; 719-24.

12. Whittenbury, R. K. Phillips, and J. G. Wilkinson; "Enrichment, isolation and some properties of methane utilizing bacterial"; J. Gen. Microbial. 1970; 61; 205-218.

13. Mette M. Svenning, Ingvild wartiainen, Anne Grethe Hestnes and Svend J. Binnerup; " Isolation of methane oxidising bacteria from soil by use of a soil substrate membrane system". 2003; 347-354.

14. Dalton, H. " Structure and mechanism of action of the enzymel involved in methane oxidation"; In J.W. Keley (ed) Applications of enzyme biotechnology. Plenum Press, New York. 1991; 55-68.

15. GB Pat. No. 1270006, Audrey House, Ely place, (1972), P, 1-12.

16.US Pat. No. 3930947, Morinaga; Yasushi, Yamanaka; Shigeru; Hirose, Yoshi. Et al, P, 1-6

17.GB pat. No. 1320722, Audrey House, Ely Place, (1973), P, 1-7.

18.US Pat No. 4042458, David E.F. Harrison; Harmannus J. Doddema et al, (1977), P, (1-6).

19. US Pat. No. 0138878A1; Johnnessen et al. (2003); P, 1-7.