Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) using enzymes *Azospirillum brasilense* in vitro

Soheila Abbasi
M.Sc. of Microbiology, University of Isfahan, Iran, soheila522003@yahoo.com
Giti Emtiazi *
Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, emtiazi@sci.ui.ac.ir
Rasoul Roghanian
Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, rasoul_roghanian@yahoo.com

Abstract

Introduction: Polyhydroxyalkaniates (PHA_S) are bacterial polymers that are formed as naturally occurring storage polyesters by a wide range of microorganisms usually under unbalanced growth conditions. Mechanical properties of PHA_S make them suitable replacements for petrochemically produced bulk plastics (polyethylene, polypropylene etc.), but in contrast to these commodity plastics PHA are completely degradable to carbon dioxide and water through natural microbiological mineralization. PHA_S can be produced by biotechnological processes under controlled conditions. Polyhydroxybotyric acid (PHB) was the first of the PHAS discovered and is the most abundant polyester found in bacteria.

Materials and methods: First, a rich bacterial suspension prepared from poly(3-hydroxybutyrate), then the cells were broken down and ensure the absence of live cells. The cell free enzymes were added to M9 medium. Then the sample turbidity was measured at a wavelength of 600 nm and incubated at 30°C and centrifiuged at 120rpm. Next, the amount of PHB as well as solution turbidity were measured and compared with control. The physical and chemical analyzes of extracted PHB samples such as UV absorbtion, FTIR, HPLC and HNMR assesed and compared with standard sample.

Results: In twelve days this experiment was conducted, from the third day, the amount of polyhydroxybutyrate was measurable and the highest polyhydroxybutyrate was gained on the tenth day. The level of PHB was constant. Moreover, the level of glucose was decreased gradually till the tenth day. By Physico-chemical analysis, production of polyhydroxybutyrate was approved.

Discussion and conclusion: In this experiment, the reaction efficiency was 37.5 percent. Probably the rest of glucose could be changed to other intermediate compounds by other enzymes in the sample. Therefore, by purification of the enzyme, usage of specific substrate and optimization of conditions outside the cell could help the production of polyhydroxybutyrate continually. Production is very cost-effective, by this method.

Key words: PHB, Polyester, *Azospirillum brasilense*, HPLC, NMR, FTIR

* Corresponding author
Received: February 6, 2016/ **Accepted:** November 2, 2016

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۲، تابستان ۱۳۹۶، صفحه ۱۲۷- ۱۴۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۸/۱۲

تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات با استفاده از عصارهٔ آنزیمی *آزوسپریلوم‌برازیلنس* در محیط عاری از سلول

سهیلا عباسی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه اصفهان، ایران، soheila522003@yahoo.com
گیتی امتیازی *: استاد میکروب‌شناسی، دانشگاه اصفهان، ایران، emtiazi@sci.ui.ac.ir
رسول روغنیان: استاد میکروب‌شناسی، دانشگاه اصفهان، ایران، rasoul_roghanian@yahoo.com

چکیده

مقدمه: پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHA_S) پلیمرهای باکتریایی هستند که معمولاً به‌عنوان پلی‌استر ذخیره‌ای توسط طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها تحت شرایط عدم‌تعادل مواد غذایی ساخته می‌شوند و خواص مکانیکی پلی هیدروکسی‌آلکانوات‌ها آنها را جهت جایگزینی با پلاستیک‌های تولیدشده از مواد پتروشیمی مشابه مناسب ساخته است.؛اما برخلاف پلاستیک‌های رایج در طبیعت به‌طور کامل به CO_2 و H_2O تبدیل می‌شود. PHA می‌تواند به‌وسیلهٔ روش‌های بیوتکنولوژی تحت شرایط کنترل‌شده تولید شود.

مواد و روش‌ها: ابتدا یک سوسپانسیون میکروبی غنی از PHB آماده شد و پس از شکستن سلول‌ها و اطمینان از نبودِ سلول زنده، به محیط حداقل یا محیط M9 اضافه شد. سپس کدورت نمونه در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۲۰ rpm انجام شد. بعد از طی مدت‌زمان تعیین‌شده کدورت محلول و میزان PHB موجود در محیط اندازه‌گیری شد و از مقدار شاهد کسر گردید. میزان گلوکز محیط نیز اندازه‌گیری شد؛ سپس روی نمونهٔ PHB استخراج‌شده آنالیزهای فیزیکی و شیمیایی جذب UV، FTIR، HPLC و HNMR[1] انجام شد و با نمونهٔ استاندارد مقایسه گردید.

نتایج: در آزمایش‌های انجام‌شده در دوازده روز متوالی از روز سوم میزان پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات قابلِ‌اندازه‌گیری بود. و در روز دهم بیشترین مقدار پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات که ۰/۳ گرم در صد بود حاصل شد و بعد از آن میزان پلی هیدروکسی‌بوتیرات ثابت ماند. در ضمن میزان قند نمونه هر روز کاهش پیدا می‌کرد و در روز دهم به مقدار ۰/۲ گرم برلیتر رسید، آنالیز فیزیکوشیمیایی نیز تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را تأیید کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: در این پژوهش آزمایش با استفاده از کلیهٔ آنزیم‌های باکتری در خارج از سلول انجام گرفت با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش بازده واکنش ۳۷/۵درصد است که با خالص‌سازی آنزیم و استفاده از سوبسترای اختصاصی و بهینه‌کردن شرایط آنزیم می‌توان تولید PHB را به‌طور مستمر در خارج از سلول ادامه داد.

واژه‌های کلیدی: PHB، پلی‌استر، *آزوسپریلوم‌برازیلنس*، FTIR،NMR،HPLC

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

طیف گسترده و متنوعی از پلیمرها توسط موجودات زنده سنتز می شوند که از میان آنها پلی استرها بیشتر از بقیه مورد توجه قرار گرفته اند (۱). برخی از باکتری ها این توانایی را دارند که ترکیبات پلیمری را سنتز کنند که به‌لحاظ خواص، مشابه برخی از انواع پلاستیک های صنعتی هستند. این ترکیبات شامل گروه گسترده و پیچیده‌ای از اسیدهای هیدروکسی آلکانوئیک هستند که با نام کلی پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها (PHAs) شناخته می‌شوند (۲). PHAs انواع مختلفی از پلی‌اکسواستر هستند که توسط باکتری های حقیقی و حتی اعضای خانواده هالو باکتر آرکی‌ها ساخته می‌شوند (۳).

میکروارگانیسم های یوکاریوت و جانوران قادر به سنتز این پلیمرها نیستند. این ترکیبات خصوصیات قابل‌توجهی دارند (۴). آنها زیست‌تجزیه‌پذیر و زیست سازگار هستند و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاصی دارند که آنها را جهت کاربردهای صنعتی، کشاورزی، پزشکی و داروسازی مستعد می کند (۵)؛ لذا اول مشکل دفع زباله ها را حل می کنند و دوم در بسیاری از موارد که پلاستیک های صنعتی را نمی توان استفاده کرد یا استفاده از آنها مشکلاتی را به‌همراه دارد، نظیر بسیاری از کاربردهای پزشکی، قابلیت استفاده دارند. مهم ترین مشکل در راه جایگزینی این دسته از پلیمرها به‌جای پلاستیک‌های صنعتی، هزینهٔ بالای فرایند تولید آنها است. اگر ما بخواهیم از این پلیمر استفاده کنیم، لازم به نظر می رسد که فرایند تولید آن را ازنظر اقتصادی بهبود بخشیم.

بیوسنتز پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها به محض اینکه سوبسترای موردنظر یا هیدروکسی آسیل کوآتیواستر در داخل سلول مهیا شد، شروع می شود. در حالت عادی آنزیم پلی‌هیدروکسی آلکانوات سنتاز در میزان کم و به‌طور مداوم در سلول تولید می‌شود. به محض افزایش سوبسترا، این آنزیم شروع به کاتالیز و سنتز پلی استر با وزن مولکولی بالا می کند (۶). در ابتدا متراکم کردن دو مولکول از استیل کوآ به استواستیل کوآ توسط آنزیم بتاکتو تیولاز صورت می گیرد سپس احیای این مولکول به هیدروکسی‌بوتیریل کوآ توسط آنزیم استواستیل کوآ ردوکتاز وابسته به NADP صورت می گیرد. د نهایت با فعالیت آنزیم سنتاز مونومرهای موردنظر به یکدیگر متصل شده و زنجیره‌های هیدروکسی آلکانوات‌ها ساخته می‌شوند (۷).

در قرن بیستم رشدی سریع در تولید پلاستیک های حاصل از مواد نفتی و به‌دلیل قیمت پایین آنها انجام شد و درنتیجه این پلاستیک‌ها به‌واسطهٔ نیاز روزافزون به آنها و به‌میزان غیرقابل‌تصور تولید شدند؛ اما امروزه به یکی از معضلات زیست‌محیطی در جوامع بشری تبدیل شده‌اند (۸). صنایع بسته‌بندی یکی از مهم‌ترین و بزرگ‌ترین مصرف‌کننده‌های این پلیمرها هستند. با وجود اینکه در حال حاضر بازیافت این پلاستیک‌ها به‌طور مداوم صورت می گیرد، به‌جرأت می‌توان گفت که پلاستیک ها دومین معضل جدی برای محیط زیست بعد از آلودگی هوا هستند. همچنین با توجه به ارزش نفت و احتمال کاهش ذخایر نفتی نیاز روزافزون به یک جایگزین احساس می‌شود.؛ازاین‌رو در دههٔ اخیر میزان استفاده از پلاستیک های سبز و سازگار با محیط زیست رو به افزایش است (۹). این پلیمر توانایی ترکیب شدن با پلیمرهای دیگر و تشکیل ترکیب را دارد و درنتیجه این خصوصیات پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، آن را گزینه‌ای مناسب جهت کاربرد در صنایع دسته‌بندی و پلاستیک‌سازی می کند (۱۰).

به‌دلیل تجزیه‌پذیربودن پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در خاک می‌توان از آن به‌عنوان یک ناقل تجزیه‌پذیر برای

حشره‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، کودها و یا یک پوشش پلاستیکی برای جوانه‌زدن بذرها و یا نگه‌داشتن نهال‌ها استفاده کرد (۱۱).

مونومرهای حاصل از تجزیهٔ پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در بدن، هیدروکسی‌بوتیریک‌اسید است که یک حد واسط متابولیک در ارگانیسم‌های عالی به شمار می‌رود؛ بنابراین پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات سازگار با بدن موجودات زنده است و می‌توان از آن به‌عنوان مواد پلیمری زیست‌سازگار برای کاربردهای گسترده در پزشکی و داروسازی استفاده کرد (۱۲).

مهم‌ترین کاربرد پزشکی آن عبارت است از:

ارسال دارو: یعنی کنترل فارماکوکینتیک و پخش دارو در بدن به‌منظور محدودکردن فعالیت آنها تنها در بافت هدف و نگه‌داشتن غلظت دارو در یک سطح قابل‌قبول از نظر درمانی برای مدت‌زمان خاص به این منظور از سیستم‌های کلوئید ارسال دارو استفاده می‌شود (۱۳). سیستم‌های کلوئید ارسال دارو شامل لیپوزوم (liposome)، دندریمرها (Dendrimer)، میسل‌ها (Micelle) میکروامولسیون‌ها و نانوپارتیکل‌ها هستند. نانوپارتیکل‌ها ذرات جامد کلوئیدی هستند که از پلیمرهای طبیعی و یا سنتزی با قطر ۱۰ نانومتر تا ۱ میکرومتر ساخته می‌شوند که برای اهداف درمانی و یا تشخیصی به کار رفته‌اند. مولکول‌های فعال بیولوژیکی می‌توانند به سطح نانوپارتیکل‌ها جذب یا متصل و یا در داخل آنها حل و یا کپسوله شوند و یا به دام افتند. نانوپارتیکل یک نام عمومی برای نانواسفرها و نانوکپسول‌ها هستند (۱۴).

مهندسی بافت: یعنی کمک به بازیابی، ابقا یا افزایش فعالیت بافت یا ارگان ازطریق میان‌کنش هم‌زمان سلول‌های زنده و مواد زیستی تولید شده است (۱۵).

عملکرد حفاظتی: الیاف الکتروریسی‌شده به‌عنوان پوشش‌دهندهٔ زخم استفاده می‌شود. درواقع پوشش‌های متخلخل متشکل از ساختارهای لیفی، زخم را از نفوذ باکتری با مکانیسم به‌دام‌انداختن ذرات آئروسل محافظت کرده؛ درحالی‌که الگوی مناسبی را برای انتقال بخار تأمین می‌کند (۱۶).

خواص ساختاری پلی‌استر سنتازها: تاکنون ساختمان دقیق این آنزیم‌ها مشخص نشده است، ساختمان ثانویه نیز ازطریق نحوهٔ قرارگرفتن و توالی اسیدآمینه‌ها تعیین شده است. بررسی‌های دستگاهی نشان داده که ساختمان ثانویه دارای لوپ‌های متغیری است که از مارپیچ آلفا و صفحات بتا تشکیل شده است. در شرایط آزمایشگاهی، پلی‌استر سنتاز به‌صورت مخلوط تعادلی از حالت مونومری و دایمری وجود دارد و در حضور سوبسترا و یا آنالوگ‌های کو آنزیم A سه‌تایی به‌سرعت دی‌مریزه می‌شود. در حضور آنالوگ‌های سه‌تایی، یک افت در شروع کار آنزیم مشاهده می‌شود؛ درحالی‌که فعالیت ویژهٔ آن افزایش می‌یابد. آنزیم دایمر نسبت به مونومر فعالیت بالایی دارد (۴). پلی‌استر سنتاز دارای زنجیرهٔ سیستئین به‌عنوان محل کاتالیزوری نوکلئوفیل است و مانند پروتئاز عمل می‌کند؛ چرا که پروتئاز نیز دارای زنجیرهٔ سیستئین است.

دو گروه تیول موجود در پلی‌استر سنتازها در واکنش پلی‌مریزاسیون نقش عمده‌ای دارند و ازآنجایی‌که فقط یک زیرواحد سیستئینی در تمامی پلی‌استر سنتازها وجود دارد نقش مهمی را ایفا می‌نماید.

پلی‌استر سنتاز محلول در هنگام طویل‌سازی زنجیرهٔ پلی‌استر تبدیل به یک مولکول دوگانه دوست می‌شود. این عمل باعث خودتجمعی گرانول‌های پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات می‌شود که قسمت فعال پلی‌استر سنتاز در سطح و چربی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوئیک در مرکز قرار می‌گیرد. این حالت در اثر خاصیت قرارگرفتن

چربی در آب به وجود می‌آید.

تجزیه و تحلیل فعالیت آنزیمی که در سطح قرار گرفته است، نشان می‌دهد که این آنزیم موجود در سطح، حدود ۴۰ برابر فعال تر از آنزیم محلول است. درواقع سطوح گرانول مانند آنزیم لیپاز کروی عمل می‌کند (۱۵).

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات (PHA)یکی از پلی استرهای میکروبی است که از مواد اولیهٔ تخمیری تولید می شود. با وجود آنکه این پلیمر دارای کاربرد خاصی در تولید پلاستیک تجزیه‌پذیر است، کاربرد متنوعی درزمینهٔ ریز زیست‌فناوری دارد. با استفاده از دامین متصل‌شونده به سوبسترا (SBD)آنزیم PHA دپلی‌مراز می‌توان پروتئین‌های موردنظر را روی سطحPHA تثبیت کرد (۱۷).

تثبیت مولکول‌های زیستی چون پروتئین‌ها پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک در سطح جامد برای تولید حسگرهای زیستی و میکروآرایه‌ها ضرورت دارد (۱۱).

مواد و روش‌ها

سویهٔ باکتری: سویهٔ مورداستفاده در این پژوهش *آزوسپریلوم‌برازیلنس* جداشده از پاراندول علف هرز است که در مقایسه با *آزوسپریلوم‌برازیلنس* سویه‌های Sp_7 وSP_{245} قادر به تولید میزان بیشتری پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات است (جدول ۱).

جدول ۱- مقایسهٔ سویهٔ جداشده با سویه‌های استاندارد

Type of strain	CDW g/lit	PHB g/lit	PHBcomponent %dry weight
SP7	۷/۴۴۸	۵/۶۵	٪۷۶
SP245	۶/۷۱	۵/۳۰	٪۷۹
Wild strain	۹/۴۶	۸/۱۳	٪۸۶

شرایط رشد و تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: یک کشت تازه از باکتری‌های غربالگری‌شده روی محیط TSA تهیه شد؛ سپس کدورت معادل نیم‌مک‌فارلند تهیه شد و تلقیح به محیط M9 انجام شد (جدول ۲). ارلن‌های تلقیح‌شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۵۰ rpm انکوبه شدند.

جدول ۲- محیط حداقل نمکی M9 جهت غربالگری باکتری با توانایی تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات

مقدار موردنیازg/lit	ترکیبات موردنیاز
۰/۵	NaCl
۱	KH_2PO_4
۲	K_2HPO_4
۰/۵	Yeast extract
۱۰	Glucose
۰/۰۱۵	$CaCl_2$
۰/۵	$MgSO_4$
۰/۰۵	NH_4Cl

pH این محیط نزدیک به ۷/۲ تنظیم شد.

تعیین میزان پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از روش شیمیایی: ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت سانتریفوژ (rpm ۴۰۰۰ و به‌مدت ۲۰ دقیقه) و پلت سلولی در PH برابر ۷/۴ شسته شد. ۱۰ میلی‌لیتر از محلول قلیایی هیپوکلریت‌سدیم (۵درصد کلر فعال با pH برابر ۱۰) به پلت سلولی اضافه شد و به‌مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوباسیون انجام شد. سپس سانتریفیوژ و شستشوی مجدد رسوب سفیدرنگ توسط آب مقطر انجام شد؛ علاوه بر این، رسوب سفیدرنگ جهت حذف ناخالصی‌های پروتئینی و لیپیدی توسط الکل ۹۶درصد و استون به نسبت مساوی شسته شد. درنهایت پودر سفیدرنگ در آون و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به‌طور کامل خشک شد (۷).

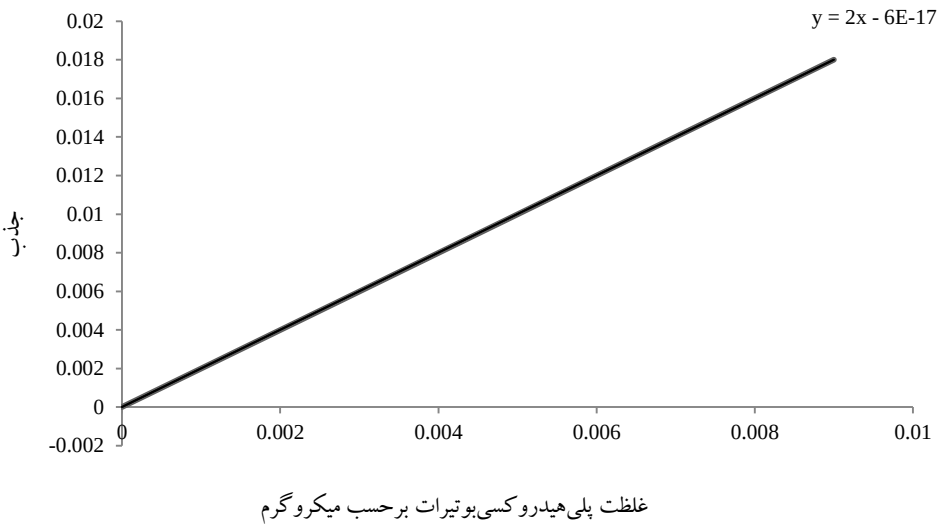
سپس یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه شد و در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم انکوباسیون انجام شد.

اسیدسولفوریک غلیظ، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات را تبدیل به کورتونیک‌اسید می‌کند. درنهایت بعد از سردشدن محلول فوق، جذب نوری کورتونیک‌اسید در طول‌موج ۲۳۵ نانومتر (طول‌موج ماکزیمم) در مقابل اسیدسولفوریک غلیظ به‌عنوان شاهد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Specord S10, CarelZeiss Tech بررسی شد و با منحنی استاندارد مقایسه شد (۷).

رسم منحنی استاندارد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: برای به‌دست‌آوردن طول‌موج ماکزیمم مقدار مشخص (۰/۰۱ گرم) وزن‌شده از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ در یک لوله اپندروف اضافه شد و در بن ماری آب جوش به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و با استفاده از گزینهٔ رسم منحنی دستگاه اسپکتروفتومتر طیف جذبی کورتونیک‌اسید رسم شد و طبق منحنی ماکزیمم جذب ۲۳۵ به دست آمد.

سپس منحنی استاندارد با استفاده از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات خالص از شرکت سیگما رسم شد؛ به این صورت که یک مقدار مشخص وزن شده از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات به یک میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ در یک لولهٔ آزمایش اضافه شد و در یک بن ماری جوش ۱۰۰درجه سانتیگراد قرار گرفت. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تحت حرارت و اثر اسیدسولفوریک به کورتونیک‌اسید تبدیل می‌شود. این محصول در ۲۳۵ نانومتر دارای حداکثر جذب است و درنتیجه می‌توان با مطالعه و اندازه‌گیری جذب کورتونیک‌اسید در این طول‌موج، مقدار پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تولیدشده توسط سلول‌ها را تعیین کرد.

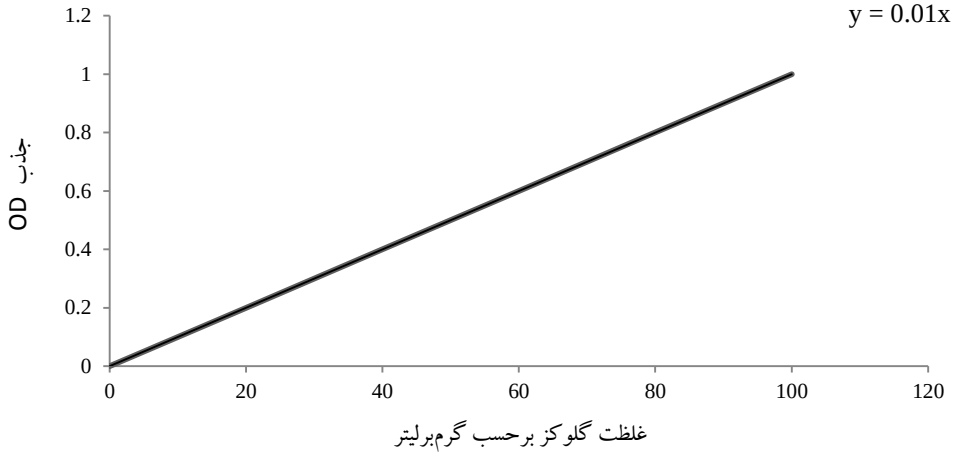
اگر جذب نوری محلول تهیه‌شده بیشتر از یک باشد، باید نمونه را با اسیدسولفوریک غلیظ به‌نسبت ۱ به ۱۰ رقیق کنیم تا جذب آن در طول‌موج موردنظر به زیر یک کاهش یابد. سپس رقت‌های موردنظر از این نمونه تهیه و جذب نوری آنها تعیین شد. درنهایت منحنی استاندارد از طریق رسم غلظت پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (میکروگرم پلیمر در یک میلی‌لیتر از اسیدسولفوریک) و جذب در ۲۳۵ نانومتر و رابطهٔ خطی بین آنها رسم شد (شکل ۱).



شکل ۱- منحنی استاندارد پلی‌هیدوکسی‌بوتیرات

رسم منحنی استاندارد گلوکز: رقت‌های متفاوت از گلوکز تهیه‌شده از کمپانی MERK (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰) گرم‌برلیتر تهیه شد و به یک میلی‌لیتر از هر رقت یک میلی‌لیتر معرف DNS اضافه شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۹۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. بعد از این مدت تغییر رنگ قرمز تا قهوه‌ای مشاهده شد و با توجه به اینکه طول‌موج ماکزیمم ۵۲۳ نانومتر است، منحنی استاندارد براساس غلظت گلوکز و جذب نوری در ۵۲۳ نانومتر رسم شد (شکل ۲).

طرز تهیهٔ معرف DNS: به ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱/۶ گرم سود اضافه و هم زده شود. سپس به این محلول قلیایی، ۱ گرم دی‌نیترو سالیسیلیک‌اسید و ۲۵ گرم نمک تارتارات مضاعف سدیم- پتاسیم اضافه شود و به‌خوبی حل گردد. سپس حجم نهایی به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده و در تاریکی و یخچال نگهداری شود. به این نکته دقت شود که دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید باید به آب قلیایی اضافه شود تا به‌خوبی حل گردد.



شکل ۲- منحنی استاندارد گلوکز

بررسی تولید PHBدر خارج سلول توسط آنزیم

جداسازی آنزیم: ابتدا ۵درصد از سوسپانسیون میکروبی نیم‌مک‌فارلند به محیط کشت بهینهٔ M9 broth تلقیح شد و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس و۱۲۰rpm محتوای ارلن سانتریفیوژ شد و ته‌نشین آن با بافرفسفات نمکی دو بار شستشو داده شد. ته‌نشین به یک ظرف کوچک شیشه‌ای جهت شکستن سلول‌ها با اولتراسونیک انتقال داده شد و ۲ میلی‌لیتر بافرفسفات نمکی به آن اضافه شد. بعد از شکستن سلول‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر از آن به محیط کشت Nutriant broth برده شد تا اطمینان حاصل شود که سلول زنده باقی نمانده است. سپس سوسپانسیون سلولی به ۱۰۰میلی‌لیتر از محیط کشت M9 برده شد و انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۲۰rpm انجام شد.

هم‌زمان یک نمونه با همان شرایط قبلی آماده شد و سلول‌ها شکسته شد. سپس هم‌حجم با سوسپانسیون سلولی (۲ میلی‌لیتر) کلروفرم در یک میکروتیوپ پلاستیکی به آن اضافه شد. یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد کلروفرم جدا شد و در یک میکروتیوپ دیگر با وزن مشخص ریخته شد و در

آون قرار داده شد. پس از تبخیر کلروفرم دوباره میکروتیوپ وزن شد و میزان چربی سلول‌ها جهت محاسبات بعدی تعیین شد.

همچنین یک نمونهٔ شاهد با تمام شرایط فوق منتها بدون شکستن سلول‌ها گذاشته شد تا میزان پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تولیدشده در داخل و خارج سلول در طی این مدت‌زمان محاسبه شود.

جداسازی PHB از محیط کشت در این آزمایش: قبل از جداسازی کدورت محلول در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر در مقابل شاهد که همان محیط کشت قبل از تلقیح است خوانده شد.

برای جداسازی پلیمر پلی‌هیدروکسی‌بوتیریک از محیط کشت از حلال کلروفرم استفاده شد. هم‌حجم محیط کشت، کلروفرم به محیط اضافه شد و یک ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس قرار گرفت؛ سپس درون قیف جداکننده ریخته شد و با دقت کلروفرم از محلول رویی درون یک ظرف با وزن مشخص جدا شد و بعد در آون کلروفرم تبخیر شد و پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات باقیمانده با الکل و استن شستشو داده و جهت آنالیزهای بعدی استفاده شد.

جهت اطمینان از تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، پودر به‌دست‌آمده در این روش جهت آنالیز فیزیکوشیمیایی استفاده شد.

آنالیز فیزیکو- شیمیایی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات

طیف ماوراءبنفش پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: ۲ میلی گرم پلیمر وزن شده و به یک بالن ژوژه منتقل می‌شود؛ سپس حجم آن توسط اسیدسولفوریک غلیظ به ۱۰ میلی لیتر رسید. سپس ۱۲۵ میکرولیتر از آن به بالن ژوژه دیگر انتقال داده شد و توسط اسیدسولفوریک غلیظ به حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر رسید. غلظت پلیمر در این محلول معادل ۵ میلی گرم برلیتر است که طیف ماوراءبنفش آن در طول موج‌های بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Specord S10,Carel Zeiss Techمطالعه شد.

آنالیز طیف‌سنجی تبدیل فوریر مادون قرمز [1]: طیف سنجی تبدیل فوریر مادون قرمز یک تکنیک بسیار مفید برای شناسایی مواد شیمیایی آلی و معدنی است. از این تکنیک می توان برای تعیین مقدار یک ماده در یک مخلوط استفاده کرد.

این تکنیک می تواند برای شناسایی مواد شیمیایی در رنگ‌ها، پلیمرها و داروها به کار رود. این روش یکی از قدرتمندترین تکنیک‌ها برای شناسایی پیوندهای شیمیایی[2] و گروه‌های عاملی[3] است. جذب نور در طول‌موج‌های خاص، یکی از خصوصیات باندهای شیمیایی است که می‌تواند برای شناسایی آنها در یک طیف گسترده از طول موج توسط FT-IR به کار رود. با تغییر این طول‌موج‌ها در یک طیف جذبی می‌توان به وجود باندهای شیمیایی در یک مولکول پی برد. طیف FT-IR برای مواد شیمیایی خالص همانند یک اثرانگشت[4] است که برای هر ترکیب به‌صورت اختصاصی وجود دارد. برای شناسایی ترکیباتی که تاکنون شناسایی نشده‌اند و اطلاعات و داده‌های کمی در مورد آنها وجود دارد، باید از ترکیب این تکنیک با سایر تکنیک‌های شناسایی مثل NMR استفاده کرد. در مورد ترکیباتی که شناسایی شده‌اند و داده‌های زیادی دربارهٔ ساختار آنها وجود دارد، تنها می‌توان با مقایسهٔ طیف جذبی ماده استاندارد با نمونهٔ موردنظر، آن را شناسایی کرد.

آنالیز با NMR اسپکتروسکوپی: متد NMR اسپکتروسکوپی برای PHB امروزه اطلاعات جدیدی از

بیولوژی و شیمی‌فیزیک PHB در داخل سلول می‌دهد. متد NMR می‌تواند مشخصات و اندازه PHB در پلیمر را حتی قبل از استخراج از سلول تعیین کند. (Nuclear magnetic resonance)NMR یا طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته شاید مهم‌ترین طیف‌سنجی در شناسایی ساختار گستردهٔ ترکیبات آلی باشد.

تکنیک طیف‌سنجی رزونانس مغناطیس هسته‌ای براساس اندازه‌گیری تابش الکترومغناطیسی در ناحیهٔ فرکانس رادیویی به‌طور تقریبی ۴ تا ۶۰۰ مگا هرتز است. برخلاف جذب‌های فرابنفش، مرئی و زیر قرمز که الکترون‌ها در فرایند جذب درگیرند، در این تکنیک هسته اتم‌ها در فرایند جذب درگیر هستند. هسته‌های اتمی خاص، خواص اسپین و گشتاور مغناطیسی دارند که درنتیجهٔ قرارگرفتن در یک میدان به شکافتگی انرژی آنها منجر می‌شود. روش‌های عمدهٔ این تکنیک شامل طیف‌سنجی هیدروژن (HNMR)، کربن (CNMR) و فسفر (PNMR) هستند.

اهمیت HNMR در آن است که به‌طور تقریبی تمامی ترکیبات آلی، دارای هیدروژن هستند و چون درواقع تمامی هیدروژن‌های موجود در ترکیبات آلی دارای ایزوتوپ پروتون هستند، بنابراین تمامی ترکیبات آلی قابل‌استفاده در این دستگاه هستند. اطلاعاتی که این دستگاه به ما می‌دهد، نقش بسیار مهمی در یافتن ساختار گستردهٔ مولکول دارد و به‌طور عملی بدون این طیف‌سنجی ساختار گسترده‌ای که رسم می‌کنیم بسیار نامطمئن خواهد بود. این دستگاه نمونه را تخریب نکرده و می‌توان نمونه را دوباره بازیابی کرد.

برخی هسته‌ها، مانند الکترون به دور محور خود حرکت چرخشی دارند. در حضور یک میدان آهنربایی خارجی، یک هسته در حال چرخش تنها تعداد معدودی جهت‌گیری پایدار دارد. رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) هنگامی ایجاد می‌شود که یک هستهٔ اسپین‌دار با جذب تابش الکترومغناطیسی به‌مقدار کافی، در حضور یک میدان آهنربایی از یک جهت‌گیری با انرژی پایین‌تر به یک جهت‌گیری باانرژی بالاتر برانگیخته شود. طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته شامل اندازه‌گیری میزان انرژی لازم برای تغییر هسته‌های اسپین‌دار از یک جهت‌گیری پایدار به جهت‌گیری ناپایدارتر در یک میدان مغناطیسی است.

ازآنجاکه هسته‌های اسپین‌دار در میدان مغناطیسی در فرکانس‌های مختلف تغییر جهت می‌دهند، فرکانس متفاوتی از تابش جذبی برای عوض‌کردن جهت‌گیری هسته‌های اسپین‌دار نیاز است. فرکانسی که در آن جذب صورت می‌گیرد، برای تجزیه و طیف‌سنجی به کار برده می‌شود.

^{1}HNMR برای تشخیص بین ۳- هیدروکسی بوتیریک‌اسید با دیگر اسیدهای چرب ۳- هیدروکسی در یک هتروپلیمر PHA استفاده می‌شود و همچنین برای روشن‌کردن ساختمان مونومرهای غیراشباع در MCL-PHA به کار می‌رود. نیم گرم از PHB تولیدشده در شرایط بهینه جهت آنالیز NMR به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان فرستاده شد.

آنالیز با HPLC: HPLC یکی از ابزار بسیار قدرتمند در آنالیز شیمیایی است که توانایی جداسازی، تشخیص و اندازه‌گیری مقدار ترکیبات موجود در نمونه‌هایی را دارد که می‌توانند در مایع حل شوند. امروزه ترکیبات با غلظت خیلی خیلی کم در حد (parts per trillion) ppt به‌آسانی با این روش تشخیص داده می‌شود. نیم گرم از PHB تولیدشده در شرایط بهینه جهت آنالیز HPLC به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه اصفهان فرستاده شد.

نتایج

پس از انتخاب بهترین سویهٔ تولیدکنندهٔ پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات و انتخاب بهترین شرایط برای تولید حداکثری بیوماس سلولی باکتری در محیط M9 کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و ۱۲۰rpm انکوبه شد. پس از سه روز سوسپانسیون سلولی تهیه و سلول‌ها با اولتراسونیک شکسته شد. به یکی از نمونه‌ها کلروفرم اضافه شد و پس از یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس، کلروفرم خارج شد و بعد از تبخیر حلال، میزان چربی موجود در سوسپانسیون سلولی اندازه‌گیری شد که در جدول ۳ آورده شده است.

تولید PHB در خارج از سلول: تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در خارج سلول به‌ترتیبی که در فصل دوم گفته شد انجام شده و برای اولین بار بعد از یک هفته با سه تکرار آزمایش نتایج ارائه‌شده در جدول ۳ به دست آمد.

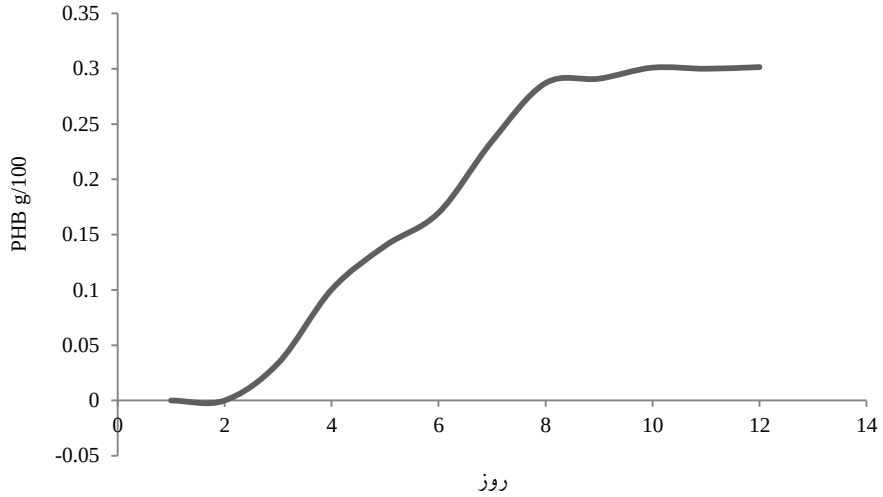
اما درون ارلن که چربی سوسپانسیون با کلروفرم خارج‌شده به‌دلیل دناتوره‌شدن آنزیم هیچ تولید PHB نداشتیم.

جدول۳- میزان PHB تولیدشده در خارج سلول پس از یک هفته

دفعات آزمایش	میزان PHBتولیدشده در 100ml	میزان چربی باقیمانده از بقایای سلول
تکرار اول	۰/۲۰۷۱	۰/۰۹۱۰
تکرار دوم	۰/۲۲۸۰	۰/۱۰۰۱
تکرار سوم	۰/۲۱۸۷	۰/۹۸۰
شاهد	۰/۱۰۱۰	–

این آزمایش با دوازده ارلن در دوازده روز متوالی تکرار شد و هر روز میزان پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات اندازه‌گیری شد. مطابق آنچه در شکل دیده می‌شود، از روز سوم میزان پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات قابل‌اندازه‌گیری بود و در روز دهم بیشترین مقدار پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات که ۰/۳ گرم در صد بود حاصل شد (شکل ۳).

اندازه‌گیری میزان کدورت محلول هر روز نشان داد که با افزایش میزان پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات کدورت محلول نیز افزایش یافت.



شکل۳- نمودار تولید PHB در خارج از سلول با آنزیم خارج‌شده از سلول باکتری *آزوسپریلوم* در شرایط بهینهٔ رشد در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط M9.

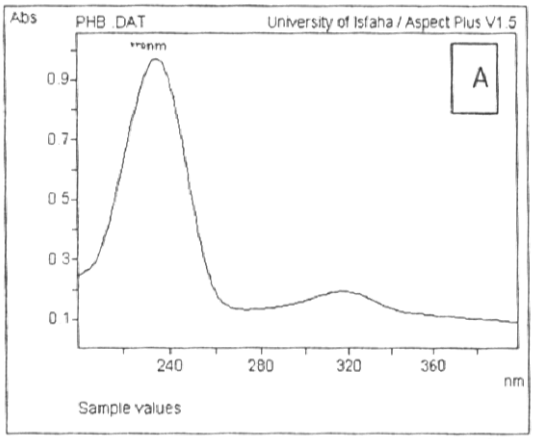
این آزمایش با استفاده از کلیهٔ آنزیم‌های باکتری انجام گرفت و به‌طور روزانه PHB محتویات یک ارلن با استفاده از استخراج با کلروفرم جداشده اندازه‌گیری شد و منهای مقدار چربی اولیهٔ باکتری‌ها (که با نمونهٔ شاهد اندازه‌گیری شده بود) گردید و روی نمونه‌های ارلن اندازه‌گیری قند انجام گرفت. هر روز جذب قند کاهش پیدا می‌کرد تا روز دهم به مقدار ۰/۲ گرم‌درلیتر رسید. به احتمال زیاد، مابقی قند توسط آنزیم‌های دیگر موجود در نمونه به ترکیبات حد واسط دیگر تبدیل شده است. با خالص‌سازی آنزیم و استفاده از سوبسترای اختصاصی و بهینه‌کردن شرایط آنزیم می‌توان تولید PHB را به‌طور مستمر در خارج از سلول داشت.

آنالیز فیزیکو- شیمیایی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات

طیف جذبی: طیف جذبی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات از روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج‌های بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر بررسی شد (شکل۴). حداکثر جذب پلیمر(طول‌موج ماکزیمم) در طول‌موج ۲۳۵ نانومتر قابل‌مشاهده است.

آنالیز FT-IR: FTIR برای تشخیص PHA در سوسپانسیون سلولی استفاده می‌شود؛ ولی دارای فقدان اختصاصیت لازم برای تشخیص بین مونومرهای متفاوت است و بنابراین با این روش نمی‌توان کوپلیمرهای مرکب PHA را تشخیص داد.

طیف مادون‌قرمز: طیف مادون‌قرمز پاسخ شناساگر را به‌صورت درصد عبور Transmittance(T%) بر محور عمودی (Y) و فرکانس IR را به‌صورت شماره موج بر محور افقی (X) نشان می‌دهد. پاسخ شناساگر بیانگر وسعت میان‌کنش اشعهٔ الکترومگنتیک مادون‌قرمز با نمونه است و ازاین‌رو متناسب با شدت اشعهٔ مادون‌قرمز است.

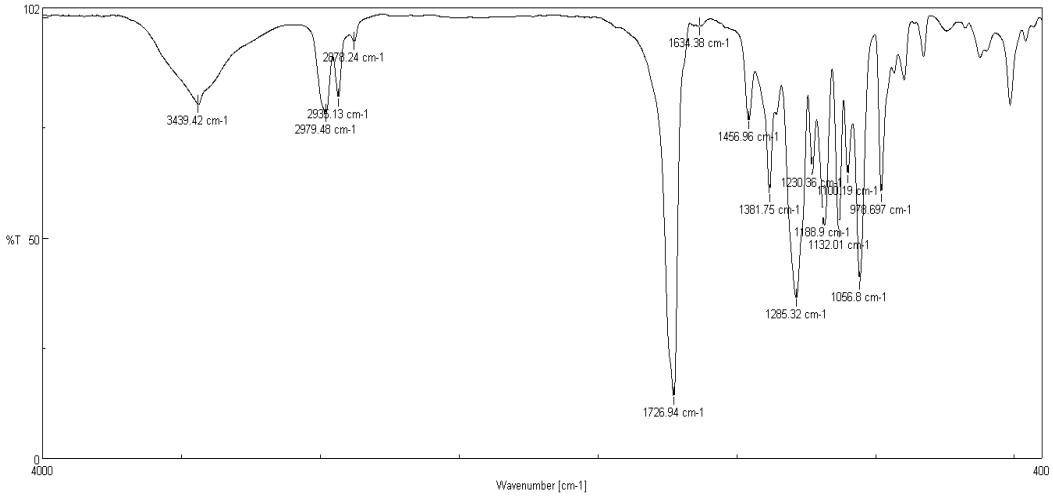


شکل۴- طیف جذبی کورتونیک‌اسید با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر: ماکزیمم جذب ۲۳۵ است.

ناحیهٔ میانی مادون‌قرمز[۵]: شامل یک طیف گسترده با استفادهٔ وسیع در آنالیز شیمیایی مواد در ناحیهٔ میانی است. این ناحیه دارای دامنهٔ فرکانس از 500 تا $4000cm^{-1}$ را شامل می‌شود. این ناحیه می‌تواند به زیر ناحیه‌هایی با فرکانس‌های مشخص تقسیم شود (جدول ۴).

N-H, O- H (3000 – 4000 cm^{-1})-
C- H stretch region (2800 -3000 cm^{-1})-
Window region (1800 – 2800 cm^{-1})-
Carbonyl region (1500 – 1800 cm^{-1})-
Finger print region (500 – 1300 cm^{-1})-

وجود و یا نبود این باندهای اختصاصی برای گروه‌های عاملی برای تعیین خصوصیات ساختار مولکولی ترکیب موردنظر بسیار مهم هستند. باندهای جذبی در ناحیهٔ اثرانگشتی به‌همراه دیگر باندهای ذکرشده در بالا می‌توانند برای تفسیر ساختار مولکولی ترکیب موردآنالیز به کار روند (شکل ۵).



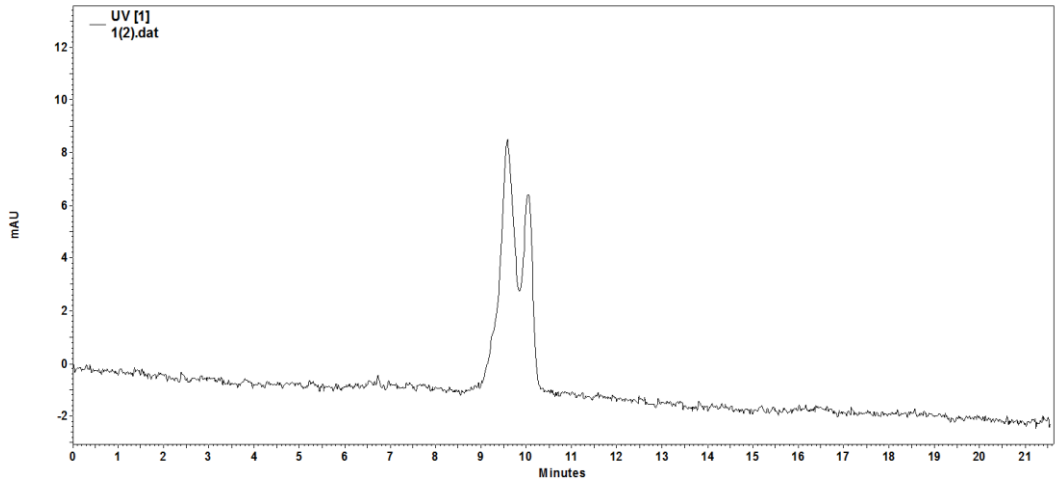
شکل۵- طیف FTIR پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات: در این طیف، باند کربونیل‌استر در عدد موج $1726cm^{-1}$ (باند شاخص پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات) قابل‌مشاهده است. بیش از ده باند (جدول ۳) در ناحیهٔ اثرانگشتی و در ارتباط با پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات دیده می‌شود. وجود این باندها به‌همراه باند شاخص پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در تشخیص این پلیمر به کار می‌رود.

جدول ۴- طیف FT-IR از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات استخراج‌شده از باکتری *آزوسپریلوم‌برازیلنس* جداشده

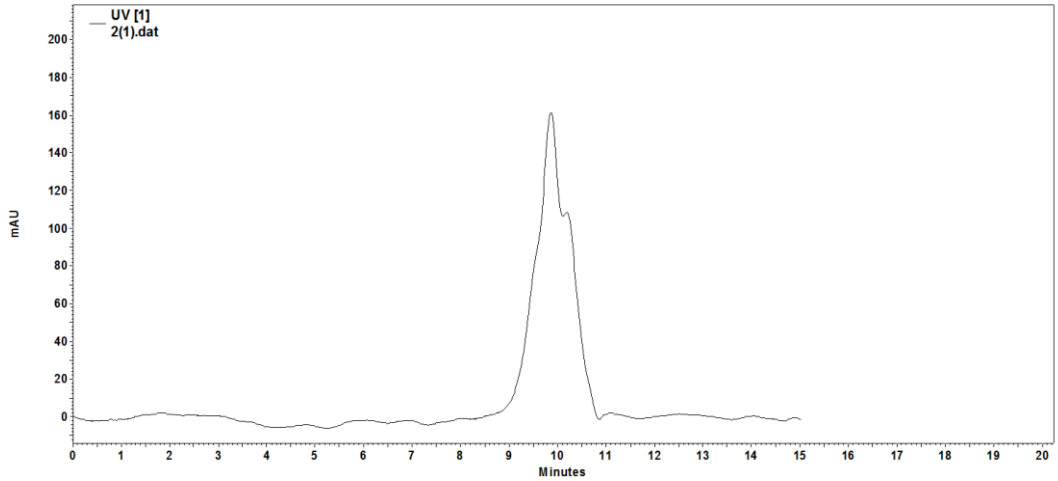
نوع پیوند	عدد موج
C-O stretch	۱۰۵۰،۱۰۹۶،۱۱۲۸،۱۱۸۰
C-O-C stretch, crystalline	۱۱۲۸،۱۱۶۳،۱۲۷۸،۱۲۸۹
C-O-C stretch, crystalline	۱۲۵۹،۱۳۰۲
CH3 symmetric deformation	۱۳۷۸
CH3 asymmetric deformation	۱۴۴۹
CH2 deformation	۱۴۵۸
C=O stretch, crystalline	۱۷۲۶
C=O stretch, amorphous	۱۷۴۰
CH2, CH3, symmetric stretch	۲۸۷۵
CH2 asymmetric stretch	۲۹۳۳
CH3 asymmetric stretch, crystalline	۲۹۶۷
CH3 asymmetric stretch, crystalline	۲۹۷۴
CH3 asymmetric stretch, amorphous	۲۹۸۳
CH3 asymmetric stretch, crystalline	۲۹۹۵
CH3 asymmetric stretch, crystalline	۳۰۰۹
C=O overtone, crystalline	۳۴۳۶

آنالیز HPLC[۶]: HPLC برای تشخیص هیدروکسی‌بوتیرات از هیدروکسی‌والرات به کار می‌رود. از این روش می‌توان برای تعیین PHB در بیوماس سلولی هم استفاده کرد. همچنین با HPLC می‌توان cis- و trans- کورتونیک‌اسید را تشخیص داد (شکل ۶ و ۷).

در روش HPLC چون نیاز به نمونه مواد لئوفیلیزه ندارد، طول مدت آنالیز سریع‌تر است؛ چون نیاز به خشک‌کردن نمونه نیست.



شکل۶- کروماتوگرام HPLC مربوط به PHB استاندارد: دارای زمان شروع ۸/۹۸۹ و زمان خروج ۱۰/۳۲۸ و وزن مولکولی ۲۲۴۷ کیلو دالتون است.

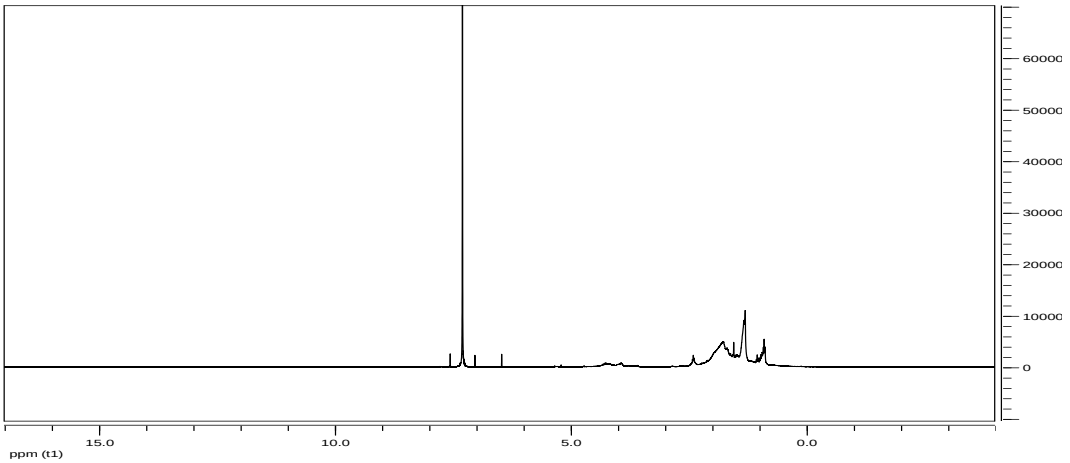


شکل۷- کروماتوگرام HPLC مربوط به نمونهٔ PHB تولیدشده با آنزیم در خارج سلول: مشابه PHB استاندارد دارای زمان شروع ۹/۳۲۳ و زمان خروج ۱۰/۹۸۴ و وزن مولکولی ۱۲۲۳ کیلو دالتون است.

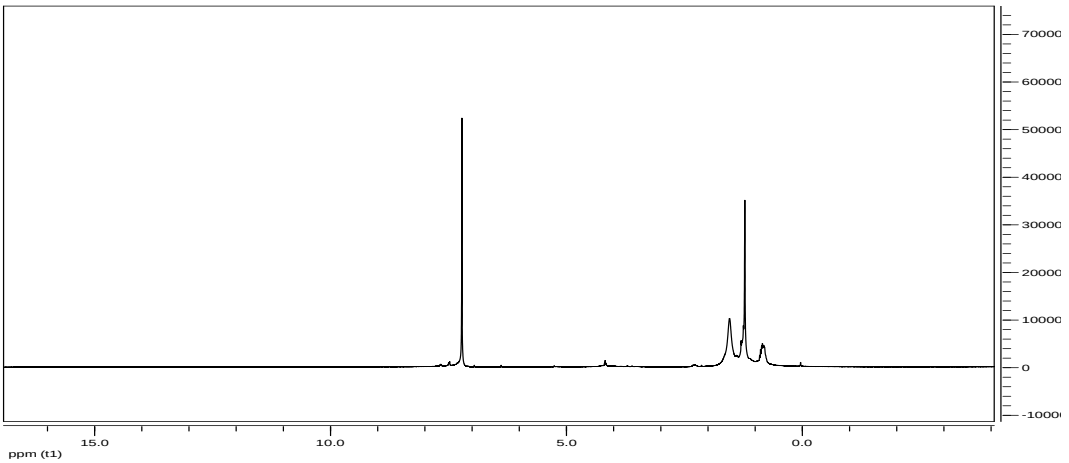
آنالیز باNMR اسپکتروسکوپی: ^{1}HNMR از PHB در دستگاه MSL- 300 (BRUker, Germany) در فرکانس ۴۰۰ مگاهرتز انجام شد و بررسی شیمیایی از ppm برابر صفر شروع شد. پروتون‌های باقیمانده از کلروفرم یا $CDCl_3$ در ppm برابر ۷/۲۷ وجود دارد. پارامترهای آزمایش بر ۱درصد پلیمر در محلول کلروفرم- د و۳۱۳K و ۲/۵ s طول مدت فراگیری (Acquistio time) و ۴۰۰۰ هرتز پهنای طیف تنظیم شد.

استاندارد PHB برای به‌دست‌آوردن آنالیز بهتر استفاده شد (شکل ۸ و ۹).

تمام طول طیف رزونانس برای PHB نشان می‌دهد که سیگنال گروه متیل یا CH_3 در ppm برابر ۱/۲۵ و سیگنال گروه متیلن یا CH_2 درppm بین ۲/۴۵ و ۲/۶۵ و گروه متین یا CH در ppm برابر ۵/۲۵ وجود دارد. یک سیگنال دیگر هم در ppm برابر ۷/۲۵وجود دارد که مربوط به کلروفرم است.



شکل ۸- طیف NMR مربوط به PHB استاندارد: در این طیف باندهای مربوط به سیگنال گروه متیل یا CH3 در ppm برابر ۱/۲۵ و سیگنال گروه متیلن یا CH2 درppm بین ۲/۴۵و ۲/۶۵ و گروه متین یا CH در ppm برابر ۵/۲۵ وجود دارد. یک سیگنال دیگر هم در ppm برابر ۷/۲۵ وجود دارد که مربوط به کلروفرم است.



شکل ۹- طیف NMR مربوط به تولید PHB در خارج سلول: در این طیف همانند طیف استاندارد باندهای مربوط سیگنال گروه متیل یا CH3 در ppm برابر ۱/۲۵ و سیگنال گروه متیلن یا CH2 در ppm بین ۲/۴۵ و ۲/۶۵ و گروه متین یا CH در ppm برابر ۵/۲۵ وجود دارد. یک سیگنال دیگر هم در ppm برابر ۷/۲۵ وجود دارد که مربوط به کلروفرم است.

بحث و نتیجه‌گیری

برای تولید پلاستیک‌های سازگار با محیط زیست با منشأ زیستی روش‌های گوناگونی در دست است؛ برای مثال این امکان وجود دارد که سویه‌های طبیعی تولیدکنندهٔ این ترکیبات را به‌صورت صنعتی کشت کنیم (۱۸). این امر اگرچه در ابتدا جالب به نظر می‌رسد، مشکلات حین فرایند مانع از تولید گستردهٔ صنعتی با هزینهٔ قابل‌قبول می‌شود و تاکنون عمده مانع بر سر راه استفادهٔ تجاری از این ترکیبات و جایگزین‌شدن کامل آنها به‌جای پلاستیک‌های صنعتی همین مسئلهٔ هزینه بوده است.

سویه‌های تولیدکنندهٔ طبیعی این ترکیبات دورهٔ رشد طولانی دارند و برای ذخیره‌کردن این ترکیبات باید محیط کشت آنها را از شرایط بهینه خارج کرد که این امر خود دورهٔ رشدی آنها را طولانی‌تر نیز می‌کند؛ همچنین استحصال محصول نیز در آنها به‌آسانی صورت نمی‌گیرد

و روش‌های مهندسی ژنتیک نیز برای آنها بهینه‌سازی نشده است؛ به‌علاوه، آنها مسیرهایی برای هضم پلی‌استرهای تولیدشده دارند که به‌طور طبیعی به کاهش میزان محصول می‌انجامد.

مهم‌ترین مشکل در راه جایگزینی این دسته از پلیمرها به‌جای پلاستیک‌های صنعتی، هزینهٔ بالای فرایند تولید آنها است که این امر حتی با استفاده از سوبستراهای ارزان‌قیمت (۱۹) و میزبان‌های سریع‌رشدی نظیر *E.coli* نیز هنوز رفع نشده است (۲۰).

یکی از علل بالابودن هزینه‌های تولید، هزینه‌های مربوط به فرآوری‌های پایین‌دستی، یعنی هزینه‌های مربوط به استحصال و خالص‌سازی است. استفاده از ترکیبات شیمیایی و آنزیم‌ها جهت لیز باکتری اول هزینهٔ بالایی را به فرایند تحمیل می‌کند و دوم خود به مراحل تخلیص می‌افزاید. روش‌های فیزیکی نیز مشکلات مربوط به دما و نیز برهم‌زدن ساختار گرانول‌های حاوی پلیمر را به‌همراه دارد.

با توجه به مشکلات فوق، استفاده از آنزیم جهت تولید در خارج از سلول ضروری به نظر می‌رسد و تا به حال چندین گزارش از تولیدPHB در خارج از سلول گزارش‌شده که یکی از قابل‌توجه‌ترین آنها توسط Tajima et al در سال ۲۰۰۳ که با خالص‌سازی phaC و تثبیت آن بر روی رزین چیتوپال (Chitopal) با استفاده از استات (۴۰ میلی‌مولار) و گلوکز (۲۰ میلی‌مولار) و COA (۰/۵ میلی‌مولار) و آنزیم‌ها و ATP و NADH در محیط و استفاده از 3HB-COA به‌عنوان سوبسترا در مدت ۲۴ ساعت ۹۰درصد سوبسترا به پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تبدیل شده است (۲۱).

بیشترین مقدار PHB به‌دست آمده در ایران با استفاده از بیوماس سلولی و در سویهٔ *سینوریزوبیوم‌ملیلوتی* که تثبیت کنندهٔ هم‌زیست ازت است، معادل ۱۰/۴۳ درصد بوده است (۲۲).

در این پژوهش آزمایش با استفاده از کلیهٔ آنزیم‌های باکتری انجام گرفت و به‌طور روزانهPHB محتویات یک ارلن با استفاده از روش استخراج با کلروفرم جدا شد سپس اندازه‌گیری شد و منهای مقدار چربی اولیهٔ باکتری‌ها که با نمونهٔ شاهد اندازه‌گیری شده بود، گردید و روی نمونه‌های ارلن اندازه‌گیری قند انجام گرفت. هر روز جذب قند کاهش پیدا می‌کرد تا روز دهم به مقدار ۰/۲ گرم‌درلیتر رسید.

در روز دهم به‌میزان ۰/۳ گرم‌درلیتر PHB تولید گردید و بازده واکنش ۳۷/۵درصد بود. به احتمال زیاد مابقی قند توسط آنزیم‌های دیگر موجود در نمونه به ترکیبات حد واسط دیگر تبدیل شده است؛ بنابراین با خالص‌سازی آنزیم و استفاده از سوبسترای اختصاصی و بهینه‌کردن شرایط آنزیم می‌توان تولید PHB را به‌طور مستمر در خارج از سلول داشت.

از مزایای این روش که در صورت کامل‌شدن، یک روش مؤثر در تولید PHB است، می‌توان به نکات زیر اشاره کرد:

الف) PHB تولیدشده توسط باکتری دپلیمریزه نمی‌شود.

ب) هزینه‌های مربوط به رشد طولانی‌مدت باکتری و شکستن باکتری و استخراج محصول تا حدود زیادی کاهش پیدا می‌کند.

ج) هدر رفت محصول در طی فرایند خالص‌سازی به‌مراتب کمتر می‌شود.

د) با این روش می‌توان با استفاده از آنزیم‌های باکتری *آزوسپریلوم‌برازیلنس* پلیمرهای طولانی از PHB تولید کرد.

References

(1) Sakai K., Miyake S., Iwama K. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation potential and PHA accumulating microbial communities in various activated sludge processes of municipal wastewater treatment plants. *Journal of applied microbiology* 2015; 118(1): 255-266.

(2) Erickson B., Nelson JE and Winters P. Perspective on opportunities in industrial biotechnologyin renewable chemicals. *Biotechnology Journal* 2011; 7(3): 176-185.

(3) GiedraityteGand Kalediene L. Purification and characterization of polyhydroxybutyrate produced from thermophilic*Geobacillus*sp AY 946034. *Strain chemija* 2015; 26(4): 38–45.

(4) Wältermann M., Steinbüchel A. Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *Journal of bacteriology* 2005; 187(11): 3607-3619.

(5) Xu Y., Wang R.H., Koutinas A.A., Webb C. Microbial biodegradable plastic production from a wheat-based biorefining strategy. *Process Biochemistry* 2010; 45(2): 153–163.

(6) Mozumder S.I., Goormachtigh L., Garcia-Gonzalez L., Wever Hand Volcke E. Modeling pure culture heterotrophic production of polyhydroxybutyrate(PHB). *Bioresource Technology* 2014; 155 (4): 272–280.

(7) Shah K. R. Optimization and production of Polyhydroxybutarate (PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1from soil.*Curr.Microbiol* 2014; 5(3): 377-387.

(8) Chua H., Wang Y.J., Hua F.L., Tseng Y.F., Chan S.Y., Sin S.N. Synthesis of PHAs from waster under various C: N ratios. *Bioresource Technology* 2007; 98 (3): 1690-1693.

(9) Madison L.L., and Huisman G.W. Metabolic Engineering of Poly (3-ydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*1999; 63(1): 21-22.

(10) Yun S.I., Gadd G.E., Latella B.A., Lo V., Russell R.A., HoldenP.J. Mechanical properties of biodegradable polyhydroxyalkanoates/single wall carbon nanotube nanocomposite films.*Trends in Biotechnology* 2008; 6(2): 267-275.

(11) Philip S., Keshavarz T., Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007; 82 (1): 233–247.

(12) Chen G.Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) bio- based and materials industry.*Chemical Society Reviews* 2009; 38(8)**:** 2434-46

(13) .Misra S.K., Valappil S.P., Roy I., Boccaccini A.R. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 2006: 7(8): 2249-58.

(14) Zinn M., Witholt B., Egli T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced drug delivery reviews* 2001; 53(1): 5-21.

(15) Steinbüchel A., Füchtenbusch B. Bacterial and other biological systems for polyesterproduction. *Trends in Biotechnology* 1998; 16 (3): 419–427.

(16) Christopher T., Taguchi N., Taguchi S. PHA synthase engineering toward superbiocatalysts for custom-made biopolymers.*MicrobiolBiotechno*l 2007; 73 (1): 969–979.

(17) Nomura CT., Taguchi S. PHA synthase engineering toward superbiocatalysts for custom-made biopolymers. *Applied microbiology and biotechnology* 2007; 73(5): 969-979.

(18) Shakeri S., Roghanian R., Emtiazi G. Comparison of intracellular polyhydroxybutyrate granules formation between different bacterial cell subpopulations by flow cytometry. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2015; 2011(13): 1-10.

(19) Kalousek S., Lubitz W. High-level poly (β-hydroxybutyrate) production in recombinant *Escherichia coli* in sugar-free, complex medium. *Canadian journal of microbiology* 1995; 41(12): 216-221.

(20) Choi J-i., Lee SY., Han K. Cloning of the *Alcaligeneslatus*polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* 1998; 64(12): 4897-4903.

(21) Tajima K., Tannai H., Satoh Y., et al. Synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) by immobilized poly (3-hydroxybutyrate) synthase. *Polymer jornal* 2003; 35 (5): 407-410.

(22) Hashemi Beidokhti M., Nakhaei Moghaddam M. Biodegradable plastics from sinorhizobiummeliloti as plastics compatible with the environment and humanhealth. *Biologicaljornal of microorganism* 2016; 4(16): 55-64.

[1]- Fourier transform infrared spectroscopy
[2]- Chemical bound
[3]- Functional groups
[4]- Fingerprint
[5]- Mid- infrared region
[6]- High performance liquid chromatography