تأثير طرائق الاستخلاص المتعددة في كميةمتعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت (PHB)المستخلص من بكتريا *Burkholderia cepacia* وتأثيرها في وزنه الجزيئي

وجدان رضا تاج الدين ، شذى سلمان حسن

جامعة بابل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة ، جامعة بغداد/ كلية العلوم/ قسم علوم الحياة

الخلاصة

استخدمت خمسة طرائق مختلفة لاستخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت (PHB)من بكتريا *Burkholderia cepacia* المعزولة محليا وهي الاستخلاص بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتراكيز مختلفة و الاستخلاص بتكسير الخلايا بوساطة الموجات الصوتية الفائقةو الاستخلاص بالكحول الاثيلي والكلورفورم و الاستخلاص بالخرز الزجاجية و SDS وهايبوكلورات الصوديوم و الاستخلاص باستخدام هيدروكسيد الصوديوم(NaOH). بينت النتائج ان احسن طريقة للاستخلاص هي طريقة التكسير بالخرز الزجاجية مع المواد الماسخة SDS بوجود هايبوكلورات الصوديوم إذ كانت النسبة المئوية لاستخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت 57% من الوزن الجاف للخلايا في رقم هيدروجيني 11 وبدرجة 50° تلتها طريقة هايبوكلورات الصوديوم 51.3%. درس تأثير طرائق الاستخلاص في الوزن الجزيئي لـPHB المستخلص من بكتريا*Burkholderia cepacia* حيث لوحظ ان الوزن الجزيئي لـPHB المستخلص بطريقة الكلورفورم اعلى من غيره (المستخلص بالطرائق الاخرى) وكان 4.7×10^5 دالتون ثم تلاه المستخلص بطريقة الخزر الزجاجية وSDS – هايبوكلورات الصوديوم 3.8×10^5 دالتون و 2.4×10^5 دالتون بطريقة هيدروكسيد الصوديوم في حين انخفض الوزن الجزيئي عن هذه الحدود في طرائق الاستخلاص الاخرى

Abstract

PHB was extracted from Burkholderia cepacia locally isolated by five different methods iculding sodium hypochlorite(with different concentration) ,by sonication ,glass beads –SDS- sodium hypochlorite,ethyl alcohol –chloroform and sodium hydroxide .The glass beads –SDS- sodium hypochlorite method at 50°and pH 11 was more efficient than other methods in PHB extraction 57%PHB from cell dry weight than sodium hypochlorite method 51%PHB.The effect of extraction methods on molecular weight was studied,it observed The molecular weight of the PHB was 4.7×10^5 dalton when ethanol –chloroform was used while it was 3.8×10^5,3.8×10^5 ,2.4×10^5 dalton when sodium hypochloriteand , sonication , glass beads –SDS- sodium hypochlorite , sodium hydroxide respectively .

المقدمة

تشكل خطوة استخلاص وتنقية PHB خطوة مكملة للانتاج وتضيف هذه الخطوة كلفة لعملية الانتاج الى جانب كلف الاوساط الزرعية ومتطلبات عمليات الانتاج. وفي العقدين الماضيين بحثت ودرست عدة طرائق استخلاص المادة لغرض ايجاد طريقة اقتصادية تفي بالغرض.

هنالك عدة طرائق لاستخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت تشمل:

١. الاستخلاص بالمذيبات Solvent extraction.

٢. الهضم بهايبوكلورات الصوديوم hypochlorite digestion.

٣. الهضم بالانزيمات Enzymatic digestion.

١. الاستخلاص بالمذيبات Solvent extraction.

تستخدم هذه الطريقة اما على مستوى ضيق كما في التجارب المختبرية وعلى نطاق واسع لاغراض الانتاج التجاري ، وهي طريقة شائعة الاستعمال ويمكن تطبيقها على العديد من الاحياء المجهرية التي تنتج متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت.يذوب متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت في المذيبات العضوية مثل الكلورفورم ومثيلين كلورايد و١، ٢–ثنائي كلوريد الايثان(1,2-dichloroethane) وهذه المذيبات الثلاثة تستخدم لاستخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت من الكتلة الحيوية للبكتريا. ان طريقة استخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت بالكلورفورم بمعاملته بالكلورفورم الساخن، وفصل

المتعدد عن باقي الدهون بواسطة الترسيب مع ثنائي اثيل ايثر او الهكسان او الميثانول وغيرها واعيد اذابة متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت في الكلورفورم(Doi,1990).استخدمت ثلاثة مذيبات مكلورة مختلفة وهي الكلورفورم وكلوريد المثيلين و١،٢-ثنائي كلوريد الايثان وقد حصل على احسن طريقة للاستخلاصه عند استخدام الكلوفورم وكلوريد المثيلين و١،٢-ثنائي كلوريد الايثان على التوالي(Ramsay *et al*.1994)

٢. الهضم باستخدام هايبوكلورات الصوديوم

يؤدي هايبوكلورات الصوديوم الى اذابة جميع المكونات الخلوية ماعدا متعدد هيدروكسي الكانوتيز أي انه يترك متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت سليماً بدون تغير. وهضم الكتلة الحيوية بهايبوكلورات الصوديوم يؤدى الى حدوث نقصان في الوزن الجزيئي يقارب ٥٠% من البوليمر(Berger *et al* .١٩٨٩)استخلص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت من بكتريا *R.eutropha* بطريقة الهضم بهايبوكلورايت تسبقه معاملة اولية بمادة ماسخة مثل (Sodium dodecyl sulfate) (SDS) الدي يزيل ٨٥% من البروتين ١٠% بواسطة الهضم بهايبوكلورات الصوديوم. في هذه الطريقة تم الحصول على وزن جزيئي عالي للبوليمر. وبهذه الطريقة يمكن المحافظة على حبيبات متعدد هيدروكسي بيوتاريت مما يتيح استخدامها في عدة مجالات.(Ramsay *et al.* 1990)

٣. طريقة الهضم بالانزيمات

بسبب الكلفة العالية لطريقة الاستخلاص بالمذيبات استبدلت بطريقة الهضم بالانزيمات وطورت من قبل شركة Imperial Chemical Industeries (ICI) تتضمن الطريقة الخطوات الاتية: معاملة حرارية بدرجة تتراوح بين ١٠٠-١٥٠°م لتكسير الخلايا ومسخ الاحماض النووية ثم الهضم بالانزيمات والغسل باستخدام المنظفات الايونية السالبة (anionic surfactant) لاذابة المكونات الخلوية ماعدا متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت وفي النهاية قصر متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت مع بيروكسيد الهيدروجين . ان الانزيمات التي تستخدم في الهضم هي اللايسوزايم وفوسفورلايبيز (phospholipase) ليسيتنز (Licithinace)والبروتيز(protease)، تعمل هذه الانزيمات على هضم اغلب المكونات الخلوية ماعدا متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت الذي يبقى سليماً.بحث نظام استرداد حبيبات متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت من بكتريا *E.coli* بواسطة متغير جين لـT7bacteriophage لانزيم اللايسورايم. ان انزيم اللايسوزايم ينفذ الى الخلايا ويحطمها ويؤدي ذلك الى اطلاق حبيبات متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت وان هذه الطريقة اتبعت مسبقاً من قبل Kalousek وجماعته ووجد ان هذه الطريقة غير فعالة بسبب عدم السيطرة على بروتين الفاجات للحصول على التحرر في اعلى مستوى لتجميع متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت، وفي طريقة اخرى استخدم بلازميد مفصول وبدأ التعبير عنه في مستوى قليل خلال دورة الخلايا وفي نهاية طور التجميع حصد ت الخلايا وخلطت مع ethylene diaminetetraacetate. ان هذه الطريقة فعالة لان اللايسورايم سوف يحطم التراكيب الخلوية ويحرر حبيبات متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت في الوقت الذي يصل به تجميع متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت الى اعلى مستوى (Fidler and Dennis.,1992). اتبعت في هذه الدراسة خمس طرائق مختلفة للمقارنة بين كفاءتها في استخلاص ومعرفة الاسلوب الافضل لاستخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت من بكتريا PS3 *B.cepacia*.

المواد وطرائق العمل

السلالة البكتيرية :-تم استخدام بكتيريا *Burkholderia cepacia* المعزولة محليا من الماء .

الاوساط الزرعية :- استخدم وسط الاملاح المعدنية الذي يتكون من :- كلوكوز 10غم وK_2HPO_4 1غم وNH_4Cl 0.5 غم و$MgSO_4.7H_2O$. 0.2غم و$FeCl_3.6H_2O$ 0.005 غم ذوبت المواد في كمية من الماء المقطر، ثم اكمل الحجم الى لتر وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7. وعقم الوسط بالموصدة بدرجة 121° لمدة 10 دقائق.

طرائق الاستخلاص

استخدمت ٥ طرائق لتكسير واستخلاص مادة بيتا هيدروكسي بيوتاريت من خلايا البكتريا.

الاستخلاص بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (Aslim *et al.,* 2002)

استخدمت في هذه الطريقة تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم وهي (٠.٢%، ١%، ٢%، ٣%، ٥%).

– نبذ ١٠ مللتر من المزروع البكتيري بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ١٥ دقيقة واخذ الراسب، اضيف اليه ١٠ مللتر من محلول هايبوكلورات الصوديوم وحضنت الانابيب بدرجة ٣٧°م لمدة ساعة.

– نبذ المحلول بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ١٥ دقيقة واخذ الراسب وغسل بالماء المقطر المعقم.

– اضيف الى الراسب ١٠ مللتر من الايثانول ثم نبذ بجهاز النبذ المركزي واهمل الطافي واخذ الراسب.

– اضيف ١٠ مللتر من الاسيتون ونبذ بجهاز النبذ المركزي واهمل الطافي واخذ الراسب.

– اضيف له ١٠ مللتر من الكلورفورم الساخن وجففت المادة المتبقية PHB بتبخير الكلورفورم.غسل PHBبالماء المقطر وجفف بدرجة ٤٥م لمدة٢ساعة .

الاستخلاص بتكسير الخلايا بوساطة الموجات الصوتية الفائقة(Mercan *et al*.,2002)

-نبذ ١٠ مللتر من المزروع البكتيري بجهاز الطرد المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ١٥ دقيقة، اهمل الطافي واخذ الراسب.-اضيف الى الراسب ٥مللتر من الماء المقطر المعقم ومزجت جيداً بوساطة جهاز المازج الكهربائي (Vortex).، كسرت الخلايا بتعريضها الى الموجات الصوتية الفائقة باقصى طاقة للجهاز لفترات (٢، ٤، ٦ دقيقة) كلاً على حدة.-اضيف ٢ مللتر من حامض الهيدروكلوريك الى المحلول بتركيز (2N) لكل ٢ مللتر من محلول عالق الخلايا وحضن بدرجة الغليان في حمام مائي لمدة ٢ ساعة.

-نبذ المحلول بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٥ دقيقة واهمل الطافي واخذ الراسب.

-اضيف الى الراسب ٥مللتر من الكلورفورم وحضن بالحاضنة الهزازة بسرعة ١٥٠ دورة/ دقيقة بدرجة ٢٨°م طوال الليل.-نبذ المحلول بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة، واهمل الطافي واخذ الراسب والذي يمثل PHB وجففت بدرجة ٤٥°م لمدة ٢ ساعة.

الاستخلاص بالكحول الاثيلي والكلورفورم (Das *et al.,* 2004)

– نبذ ١٠ مل عن المزروع البكتيري بجهاز الطرد المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة ، واخذ الراسب، وغسلت الخلايا بالماء المقطر.

– اضيف ١٠ مللتر من الكحول الاثيلي الى الراسب بتركيز ٨٠% وبدرجة ٥٠°م ولمدة ساعة ، ثم نبذ بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة واخذ الراسب.

– اضيف له ١٠ مللتر من الكلورفورم الساخن وحضن في حمام مائي بدرجة ٨٠°م لمدة ساعة، اخذ الجزء الرائق ونقل الى انبوب زجاجي نظيف وبخر الكلورفورم (بوضعه في حمام ماء مغلي بدرجة الغليان ليتبخر) للحصول على PHB.

الاستخلاص بالخرز الزجاجية و SDS وهايبوكلورات الصوديوم(Tamer *et al*.,1998)

– نبذ ١٠ مللتر من المزروع البكتيري بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة ، اهمل الراشح واخذ الراسب.

– اضيف ٥مللتر من دارئ الفوسفات برقم هيدروجيني ٧.١ الى الخلايا واضيف اليه الخرز الزجاجية المعقمة بقطر 0.5 ملم وكسرت الخلايا باستعمال المازج الكهربائي (Vortex) لمدة ٣٠ دقيقة بفترات متقطعة.

– نبذ المحلول بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة ، واهمل الراشح واخذ الراسب.

– مزج الراسب مع SDS [بتركيز ١.٥% وبرقم هيدروجيني ١١ و١٣ وبدرجتين مختلفتين (٣٧ و٥٠)°م كل تجربة على حدة] لمدة ساعة.

– نبذ المحلول بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٥٠٠٠ دقيقة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة واهمل الطافي واخذ الراسب ، غسل الراسب بالماء المقطر الخالي من الايونات.ثم

بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز ٥.٦٤% ونبذ واخذ الراسب وغسل بالماء المقطر المزال الايونات ثم جففت بدرجة ٤٥°م.

الاستخلاص باستخدام هيدروكسيد الصوديوم(NaOH) (Lee *et al*.,1999)

– نبذ ١٠ مللتر من المزروع البكتيري بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة، اهمل الطافي واخذ الراسب، وغسلت الخلايا بالماء المقطر.

-مزجت الخلايا مع ١٠ مللتر من محلول NaOH المحضر بتراكيزعيارية مختلفة (4N, 3N, 2N, 1N) كلاً على حدة وحضن بدرجتين حراريتين ٣٠°م و٦٠°م لمدة ساعة.

- نبذ المحلول بجهاز النبذ المركزي بسرعة ٢٥٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة، اهمل الطافي واخذ الراسب وهو يمثل PHB .

- غسل PHB بالماء المقطر وجفف بدرجة ٤٥م لمدة ٢ساعة .

التحليل النوعي لمتعدد هيدروكسي الكانويتز (Hong *et al*., 1999)

تم تحليل مادة متعدد هيدروكسي الكانوتيز نوعياً بطريقة :

دراسة الاطياف تحت الحمراء باستخدام جهاز FT-IR

باطوال موجية تراوحت 500-4000 سم$^{-1}$،مع اخذ كمية قليلة من PHB المستخلصة من البكتريا بطرائق الاستخلاص المختلفة المستخدمة في الدراسة ومن انواع البكتريا المعزولة.

تقدير محتوى الخلايا من متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت (Das *et al.*,2004)

تم تحديد محتوى الخلايا البكتيرية من متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت وذلك من خلال:

- **تقدير الوزن الجاف للخلايا** cell dry mass

نبذ ١٠ مللتر من المزروع البكتيري في جهاز النبذ المركزي بسرعة ٦٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة واهمل الطافي واخذ الراسب (الخلايا) وغسلت مرتين بالماء المقطر الخالي من الايونات ثم جففت الخلايا بدرجة ٤٠°م لمدة ٢٤ ساعة ثم بردت في desiccator ووزنت بميزان حساس.

-تقدير وزن متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت

استخلص PHB من الخلايا وجففت بدرجة ٥٠°م لمدة ٢ ساعة ووزن بميزان حساس.

-وقد تم في جميع التجارب حساب محتوي الخلايا من متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت من خلال حساب النسبة المئوية لـPHB الى الوزن الجاف للخلايا [وزن pHB (بالغرام/ وزن الخلايا الجاف (بالغرام) ×١٠٠.

تقدير الوزن الجزيئي (Akita *et al*., 1976)

قدر الوزن الجزيئي في جميع التجارب الخاصة بالاستخلاص والتحلل الحراري والكيمياوي بطريقة قياس اللزوجة باستخدام مقياس اللزوجة viscometery، حضرت تخافيف من مادة PHB (٠.٢، ٠.٥، ١، ١.٥غم) المذابة في ١٠٠ مللتر من الكلورفورم وحسب زمن الجريان لكل تركيز وذلك من خلال امرار ٧ مللتر من كل تركيز، و٣ مللتر من كل تركيز يحسب له الكثافة، وحسب زمن الجريان للمذيب ثم نحسب اللزوجة النوعية النسبية من خلال القانون التالي:

$$\frac{\mu}{\mu_0} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0}$$

$\frac{\mu}{\mu_0}$ = اللزوجة النسبية.

ρ = الكثافة لكل تركيز t = زمن جريان لكل تركيز.

ρ_0 = كثافة المذيب t_0 = زمن جريان المذيب

ومن خلال رسم العلاقة مابين اللزوجة النوعية $\left(\frac{\mu}{\mu_0} - 1\right)$ لتركيز المادة وحسب اللزوجة وهي نقطة التقاطع مع محور Y ثم نحسب الوزن الجزيئي من القانون التالي:

$$|\mu| = k\mu_r^{\alpha}$$

k =10^{-5}×٧.٧ ، α =٠.٧٤ k و α ثوابت خاصة بالمذيب (الكلورفورم) .

μ_r = الوزن الجزيئي $|\mu|$ = اللزوجة المطلقة.

النتائج والمناقشة

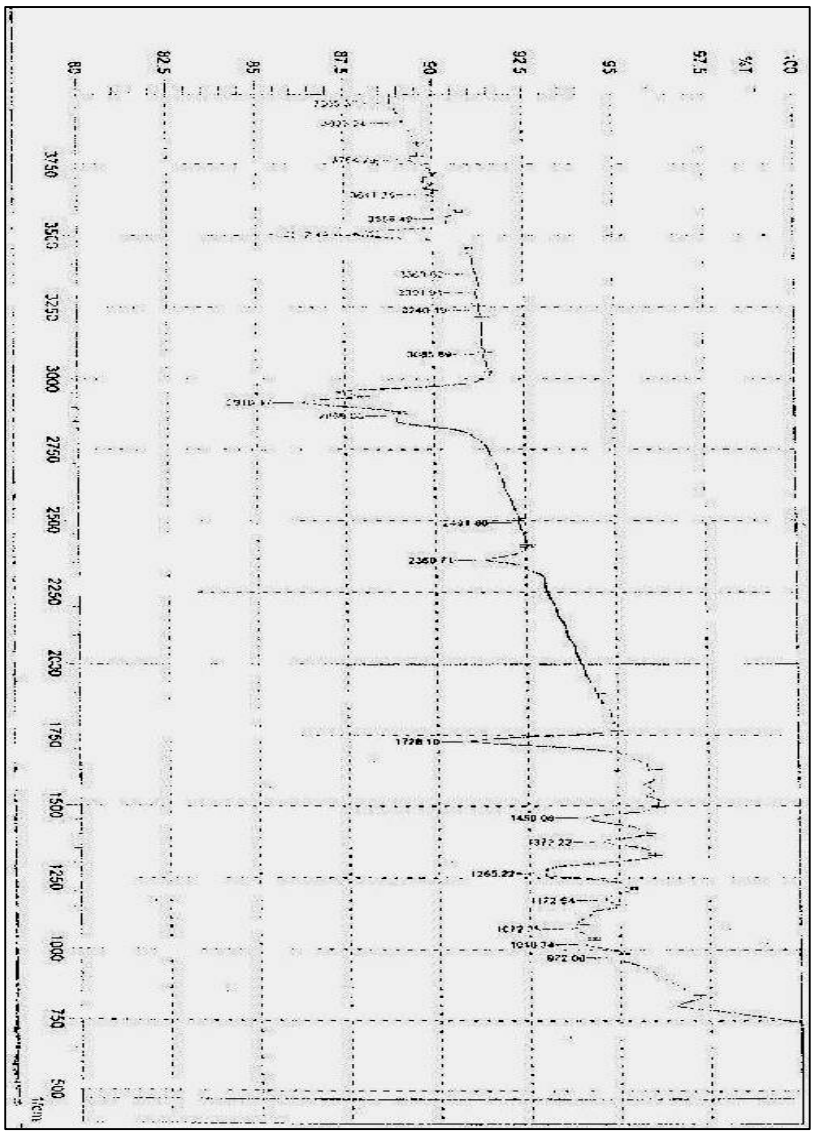
التحليل النوعي لمتعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت (PHB)

تحليل PHB بجهاز الاطياف تحت الحمراء

بينت نتائج قراءة امتصاص مادة PHB المستخلصة من البكتريا باطوال موجية تراوحت بين ٥٠٠-٤٠٠٠سم$^{-١}$ بجهاز مطياف الاشعة تحت الحمراء FT- IR اعطت حزمة امتصاص الطول الموجي ١٧٢٨ان ظهور حزمة امتصاص عند الطول الموجي ١٧٢٨سم$^{-١}$ دليل على ان البكتريا تجمع متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت وليس نوعا آخر من انواع متعدد هيدروكسي الكانويتز. لان الانواع الاخرى من متعدد هيدروكسي الكانويتز تعطي طيف امتصاص عند اطوال موجية مختلفة مثلاً ان متعدد هيدروكسي الكانويتز الذي يتكون من وحدات احادية من (HO) Hydroxyoctanoate و Hydroxydecanoat يعطي طيف امتصاص عند الاطوال الموجبة ١٧٤٠سم$^{-١}$ (Hong *et al.,* 1999) ان ظهور حزم امتصاص عند الطول الموجي مابين٩٠٠-١٤٥٠ سم$^{-١}$يدل على مجموعة الكاربوكسيل وان ظهور حزم امتصاص ٢٠٠٠-٣٠٠٠ سم$^{-١}$ يدل على مجاميع المثيلين والمثيل وكذلك عند الطول الموجي ٣٥٠٠ سم$^{-١}$ دليل على مجموعة الهيدروكسيل (Hong *et al.,* 1999) شكل (١).ان طريقة تحليل المتعدد بوساطة المطياف المعتمد على الاشعة تحت الحمراء طريقة لها عدة مميزات ايجابية منها انها طريقة سهلة وسريعة ولا تحتاج الى وقت طويل إذ ان وقت التحليل لا يتجاوز ٣٠ دقيقة ولا يحتاج الى مذيبات وكمية العينة المراد تحليلها قليلة جداً ٠.٤ ملغم تقريباً (Kansiz *et al.,* 2000; Hong *et al.,* 1999).بينما الطرائق الاخرى التي تستخدم في تحليل PHB مثل كروماتوغرافيا الغاز (GC) طريقة شاقة وغير سريعة وتحتاج الى وقت وكثير من المذيبات (Riis and Mai,1988; Huijberts *et al.,*1992)، وطريقة Flow cytometry تعتمد على تلوين الخلايا مع صبغة النيل الاحمر المتفلورة (Degelau *et al.,*1995;Muller *et*).

تأثير طرائق تكسير الخلايا المختلفة في استخلاص PHB

ان من اهم العوامل التي تؤثر في كمية متعدد بيتا هيدروكسي من الناحية الاقتصادية هو عملية استخلاصه من البكتريا (Poirier *et al.,* 1995) وهنالك عدة طرائق لاستخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت من الخلايا البكتيرية منها طريقة الاستخلاص بالمذيبات العضوية(Organic solvent extraction) (Ramsay *et al.,* 1994; Brandl *et al.,* 1990) والهضم بالانزيمات (Holmes and Lim, 1990) والطرائق الآلية (Machenical methods) (Yoshida *et al.,* 1995) وغيرها من الطرائق العديدة. اتبعت في هذه الدراسة خمس طرائق مختلفة للمقارنة بين كفاءتها في استخلاص ومعرفة الاسلوب الافضل لاستخلاص متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت من بكتريا*B.cepacia* PS3.بينت النتائج ان احسن طريقة للاستخلاص هي طريقة التكسير بالخرز الزجاجية مع المواد الماسخة SDS بوجود هايبوكلورات الصوديوم بدرجة حرارة ٥٥°م إذ كانت النسبة المئوية لتجميع متعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت ٥٧% من الوزن الجاف للخلايا في رقم هيدروجيني ١١ وبدرجة ٥٥°م تلتها طريقة هايبوكلورات الصوديوم ٥١.٣% جدول (١).ولوحظ ان احسن تركيز لهايبوكلورات الصوديوم لاستخلاص PHB هو ٥.٦%. إذ يعمل هايبوكلورات الصوديوم على تكسير الخلايا واذابة المكونات الخلوية عدا PHB. ان المعاملة بهايبوكلورات الصوديوم فعالة في اذابة المكونات الخلوية الا انه يقوم بتكسير المتعدد PHB (Hahn *et al.,* 1994; Ramsay *et al.,* 1990) وهو مؤكسد قوي وبذلك فانه يؤثر في الوزن الجزيئي لـPHB، فضلاً عن ذلك فان الاستخلاص بهايبوكلورات الصوديوم يترك فضلات مكلورة (Chlorinated waste) ملوثة للبيئة، وتستخدم هذه الطريقة في التحضيرات المختبرية (Budwill *et al.,* 1992; Ramsay *et al.,* 1990).في بعض الحالات يستعمل هايبوكلورات الصوديوم مع مذيبات عضوية كالاسيتون والكحول وهي مذيبات متوسطة القطبية (Mild polar) تعمل على اذابة معظم المكونات الخلوية مثل الاحماض النووية



شكل (١) أمتصاصية المتعدد PHB بجهاز FT-IR

والدهون الفوسفاتية والببتدوكلايكان والمواد البروتينيةب ه ذؤ طبث ظابف ذوة ٥٠°م يساعد في تكسير الخلايا بشكل افضل من درجة ٣٧°م مما يسهل استخلاص المتعدد جدول(١). تستخدم طريقة تكسير الخلايا بالخرز الزجاجية بشكل واسع لاسترداد البروتينات الداخلية (Chisti and Moo-Young,1996;1994; Harrison,1991;Kula and Schutte, 1987; Middelberg, 1995) ويضاف SDS للمساعدة في التكسير وذلك من خلال تفاعله مع المكونات الدهنية لغشاء الخلية مما يؤدى الى زيادة حجمها ومن ثم الى انفجار الغشاء لينتج مذيلات (micelles) من SDS والفوسفات الدهنية للغشاء وبذلك سوف يترك حبيبات PHB مغلفة بالببتدوكلايكان وبقايا الخلية (Ramsay *et al.*, 1990).إذ ليس لـSDS القابلية على تكسير الخلايا بشكل يسمح باطلاق جميع بروتيناتها الداخلية وقد لوحظ خلال دراسة على الخميرة *Sacchromyces cervisiae* المهندسة وراثياً ان استخدام SDS مع الكلوروفورم لم يكن طريقة فعالة في تحلل الخلايا الا ان تحلل الخلايا يكون اكفأ عند معاملة الخلايا بالخرز الزجاجية (Garrido *et al.*, 1994). في هذه الدراسة استخدم مع الخرز الزجاجية وSDS هايبوكلورات الصوديوم وهو طريقة كفوءة في تحلل الخلايا (Tamer *et al.*, 1998)ولم تكن طريقة الاستخلاص بالمذيبات العضوية كفوءة في الاستخلاص فقد كانت نسبة PHB هي ٣٧.٨%. وهنالك عدة مذيبات عضوية غير الكلوروفورم استخدمت في استخلاص PHB وهي dichloroethane و-1,1,2 trichloroethane و Aceticanhydride وpropylene-carbonate.ثم استخدمت الشركة الانجليزية ICI في بداية

استخلاص PHB المذيبات العضوية(Berger *et al* .,1989)، الا انه هذه الطريقة مكلفة وباهظة الثمن PHB (Poirier *et al.,* 1995) .تحتاج عملية الاستخلاص بالمذيبات العضوية مثل الكلورفورم الى كميات كبيرة من الكلورفورم لان المحلول يكون لزجاً جداً ويصعب استخلاص PHB منه (Lee *et al.,* 1999) . ان الاستخلاص بالمذيبات العضوية فضلا عن انه باهظ الثمن فانه يحطم شكل حبيبات PHB وهذه الناحية مهمة في بعض التطبيقات المهمة مثل انتاج الالياف القوية (Strong fiber) (Ramsay *et al.,* 1990; Barham, 1990). ان طريقة تكسير الخلايا باستخدام هيدروكسيد الصوديوم طريقة سهلة وبسيطة ورخيصة الثمن وغير ضارة بالبيئة أذ ان فضلات الاستخلاص غير مضرة ولايحدث تحلل لPHB خلال الاستخلاص (Ramsay *et al* . , 1989).

جدول (١): النسب المئوية لمتعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت في طرائق الاستخلاص المختلفة

طريقة الاستخلاص	النسبة المئوية لمتعدد PHB
١. طريقة هايبوكلورات الصوديوم	
أ. ٠.٢%	%١٣
ب. ١%	%٢٣
جـ. ٣%	%٣٦.٧
د. ٥.٦%	%٥١.٣
٢. طريقة استخدام الامواج فوق الصوتية	
أ. لمدة ٢ دقيقة	%١١
ب. لمدة ٤ دقيقة	%٢٦.٥
جـ. لمدة ٦ دقيقة	%٢١.٣
٣. الاستخلاص بالكلورفورم	%٣٧.٨
٤. الاستخلاص بـNaOH	
أ. بدرجة ٣٠°م لمدة ساعة	
1عياري	%٨
2 عياري	%٢٠
3 عياري	%٣٠.٨
4 عياري	%٢٦.١
٥. بدرجة ٦٠°م لمدة ساعة	
1 عياري	%١٤.٣
2 عياري	%٣٣
3 عياري	%٢١.١
4 عياري	%١٧.٧
٥. تكسير الخلايا بالخرز الزجاجية + المواد الماسخة SDS+ هايبوكلورايت الصوديوم	
أ. SDS برقم هيدروجيني ١١ وبدرجة حرارة ٣٧°م.	%٤١
ب. برقم ١١ ودرجة حرارة ٥٠°م	%٥٧
ج. برقم هيدروجيني ١٣ وبدرجة حرارة ٣٧°م	%٣٢.٥

الوزن الجزيئي

ان من ابرز السمات التي تؤخذ بنظر الاعتبار للبوليمرات(polymers)هي اوزانها الجزيئية، لان الوزن الجزيئي هو من اهم العوامل التي تؤثر في صفاته الفيزيائية مثل الشد والمرونة التي لها اهمية في التطبيقات الصناعية، تقل هذه الصفات بصورة واضحة عندما يكون الوزن الجزيئي اقل من ٤×١٠^{٥} دالتون ويصبح المتعدد PHB مادة هشة جداً عندما يكون الوزن الجزيئي اقل من ٢٠٠٠٠٠ دالتون (Wong *et al.,* 2005). وهنالك عدة عوامل تؤثر في الوزن الجزيئي للمتعدد منها طريقة الاستخلاص وطبيعة وتركيب وسط نمو للكائن المنتج.

تأثير طرائق الاستخلاص في الوزن الجزيئي لـPHB

تؤثر طريقة الاستخلاص في الوزن الجزيئي للمتعدد لذا يجب ان تكون طريقة الاستخلاص كفوءة وملائمة للمحافظة على الوزن الجزيئي على الاقل ٤٠٠٠٠٠ دالتون ليكون مناسب لتطبيقات البلاستك الحرارية (Luzier, 1992). لوحظ من خلال النتائج ان الوزن جزيئي لـPHB المستخلص من بكتريا *Pseudomonas cepacia* PS3بطريقة الكلورفورم اعلى من غيره (المستخلص بالطرائق الاخرى) وكان ٤.٧×١٠^{٥} دالتون ثم تلاه المستخلص بطريقة الخزر الزجاجية وSDS – هايبوكلورات الصوديوم ٣.٨×١٠^{٥} دالتون في حين انخفض الوزن الجزيئي عن هذه الحدود في طرائق الاستخلاص الاخرى (جدول٢). يختلف الوزن الجزيئي لمتعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت باختلاف الكائن المجهري المنتج له فالوزن الجزيئي لـPHB المستخلص بطريقة الكلورفورم من بكتريا *Azotobacter vinelandii* UWD كان ٣.٤×١٠^{٦} دالتون اما الوزن الجزيئي للمتعدد المستخلص بطريقة هايبوكلورات الصوديوم فكان ٢.٨٣×١٠^{٦} دالتون (Page & Cornish,1993)، ان الوزن الجزيئي لـPHB المستخلص من بكتريا *E.coli* المهندسة وراثياً هو ١×١٠^{٦} دالتون (Zhang *et al.,* 1994). وقدرالوزن الجزيئي لـPHB المستخلص من بكتريا *A.eutrophus* ب٣.٥٣×١٠^{٥} دالتون و*A.latus* ٢.٩٠×١٠^{٥} دالتون (Turesin *et al.,* 2000). وبالمقارنة لسلالة اخرى لبكتريا*Pseudomonas cepacia* قدر الوزن الجزيئي لـPHB المستخلص بطريقة الكلورفورم ٥.٣٧×١٠^{٥} دالتوان (Ramsay *et al.,* 1989).وقدر الوزن الجزيئي لـpHB المستخلص من بكتريا *Pseudomonas* sp.K بـ٣×١٠^{٥} دالتون (Suzuki *et al.,* 1986). بينما كان الوزن الجزيئي لـ PHB المستخلص من بكتريا *Pseudomonas*135 هو ٣.٧×١٠^{٥} دالتون (Daniel *et al.,* 1992) وقدر الوزن الجزيئي لبكتريا .*Methylocystis* SPP عند نموها على الميثان ب٢×١٠^{٦} دالتون (Wendlandt, 2001).

جدول (٢): الوزن الجزيئي لمتعدد بيتا هيدروكسي بيوتاريت في طرائق الاستخلاص المختلفة

طريقة الاستخلاص	الوزن الجزيئي (دالتون)
١. الاستخلاص بالكلورفورم	١٠^{٥}×٤.٧
٢. الاستخلاص بالخرز الزجاجية–SDS –هايبوكلورايت الصوديوم	١٠^{٥}×٣.٨
٣. الاستخلاص بهيدروكسيد الصوديوم	١٠^{٥}×٣.٥
٤. الاستخلاص بالامواج فوق الصوتية	١٠^{٥}×٢.٤
٥. الاستخلاص بهايبوكلورايت الصوديوم بتركيز ٠.٢%	١٠^{٥}×٣.٧

المصادر

Akita, S.; Einaga, Y.; Miyaki, Y. & Fujita, H. (1976). Solution properties of poly (D-β-hydroxybutyrate). Biosynthesis & characterization. Macromolecules 9: 774-780.

Akita, S.; Einaga, Y.; Miyaki, Y. & Fujita, H. (1976). Solution properties of poly (D-β-hydroxybutyrate). Biosynthesis & characterization. Macromolecules 9: 774-780.

Anderson, A. J.; Williams, D. R.; Taidi, B.; Dawes, E. A. & Ewing, D. F. (1992). Studies on coplyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and Factors Influencing the Molecular Mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobocterium extorquen & Alcoligenes* eutrophus FEMS Microbiology Reviews 130: 93-102. (Abstract).

Aslim, B.; Yuksekdag, Z. N. & Beyatli, Y. (2002). Determination of PHB growth Quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. Turkish Electronic Journal of biotechnology. 24-30.

Atlas, R. M.; Brown, A. E. & Parks, L. C. (1995). Laboratory Manual Experimental Microbilogy by Mosby-year book. Inc. USA.

Barham, P. J. (1990). Physical properties of poly (hydroxy butrate) and poly (Hydroxybutyrate-Co- hydroxy valerate). In Novel Biodegradable Microbial polymers Dawes , E. A.; Ed.; Kulwer; Dordrecht, PP.81-96.

Berger, E.; Ramsay, B. A.; Ramsay, J. A.; Chavarie, C. & Braunegg, G. (1989). PHB recovery by hypochlorile digestion of non- pHB biomass. Biorechnol. Lett.3:27-232.

Brandl, H.; Gross, R. A.; Lenz, R. W. & Fuller, R. C. (1990). Plastics from bacteria & for bacteria: poly (β-hydroxy butyrate) as natural biocompatible & biodegradable polyesters. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol 41: 77-93.

Budwill, K.; Fedorak, P. M. &Page, W. J. (1992). Methanogenic degradation of poly (3-gydroxy alkanoates). Appl. Environ. Microbiol. 58: 1398-1401.

Chisti, Y. & Moo-Young, M. (1994). Sepuration techniques in industerial Bioprocessing. J. Chem. E. Symp. Ser. 137: 135-146.

Chisti, Y. & Moo-Young, M. (1996). Disruption of Microbial cells for intracallular products-Enzyme Microb. Technol. 8: 194-204.

Das, Q.; Chowdhury, J. U. & Anwar, M. N. (2004). Isolation, Purification & Characterization of biodegradable polymer producing bacteria *Listeria murrayi* . Pakistan Journal of Biological sciences 7(11): 2018-2021.

Degelau, A.; Scheper, T.; Baley, J. E. & Guske, A. (1995). Fluorometric measurement & poly-β-hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry & spectrofluorometry. Appl. Microbial biotechnol. 42: 653-657.

Denial,M.;Choi,J.H.;Kim,J.H.&Lebeault,J.M.(1992).Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of Poly-β-hydroxybutyric acid by methylotrophic bacteria,Pseudomonas 135 Appl.Microbiol.Biotechnol.37(6):702-706.

Doi, Y. (1990). Microbial Polyesters. VCH publisher, Inc. Yokohama, Japan.

Fidler, S. V. Dennis, D. (1992). Polyhydroxy alkanoate production in Recombinant *Escherichia coli* FEMS Microbiology Reviews 103: 231-236.

Garrido, F. ; Banerjee, U. C.; Chisti, Y.; & Moo-Young, M. (1994). Disruption of a recombinant yeast for the release of β- Galactosidase – Bioseparation 4: 319-328.

Hahn, S. K.; Chang, Y. K.; Kim, B. S. & Chang, H. N. (1994). Optimization of microbiol poly (3-hydroxy butyrate) recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. Biotechnol. Bioeng. 44: 256-261.

Harrison, S. T. L. (1991). Bacterial cell disruptions Akey unit operation in the recovery of intracellular products. Biotechnol. Adv. 9. 217-240.

Holmes, P. A. & Lim, G. B. (1990). Sepasation process, Us putent 4: 145-910.

Hong, K.; Sun, S.; Tian, W.; Chen, G. Q. & Huang, W. (1999). Arapid method for detecting bacterial polyhydroxy alkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. Appl. Microbiol Biotechnol. 51(4): 523-526.

Huijberts, G. N. M.; Eggink, G.; De waard, P.; Huisman, G. W. & Witholt, B. (1992). *Pseudomonas putida* KT2442 Cultuivated on glucose accumulates polyl 3-hydroxyalkanoate consisting of saturated & Unsaturated monomers. Appl. Environ. Microbiol. 58: 536-544.

Kansiz, M.; Jacobe, H. B. & McNaughton, D. (2000). Quantitative determination of the biodegrable polymer poly(β-hydroxybutyrate) in a Recombinaut *Escherichia coli* strain by use of Mid- Infrared spectroscopy & multivariative statistics. 66(8): 3415-3420.

Kula, M. R. & Schutte, H. (1987). Purification proteins and the disruption of Microbial cells Biotechnol. Prog. 3: 31-42.

Lee, S. Y.; Choi, J. I.; Han, K. & Song, J. Y. (1999). Removal of Endotoxin during purification of poly (3-hydroxybutyrate) from Gram-Negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 65(6): 2762-2764.

Luzier, W. D. (1992). Materials derived from biomass lbiodegradable materials. Proc. Nat1. Acad. Sci. USA 89: 839-842.

Mercan , N.; Aslim, B.; Yukeskdag, Z. N. & Beyatli, Y. (2002). Production of poly -β-hydroxybutyrate (PHB) by some *Rhizobium* bacteria.Turk. J. Biol 26: 215-219.

Middelberg,A.P.(1995). Process-Scale disruption of Microorganisms. Biotechnol. Adv. 13: 491-551.

Muller, S.; Bley, T. & Babel, W. (1999). Adaptive responses of *Ralstonia eutropha* to feast & famine conditions analysed by flow cytometry. J. Biotechnol. 75: 81-97.

Page, W. J. & Cornish , A. (1993). Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish pepton medium & simplified Extraction of poly - β-hydroxybutyrate. Appl. Environ. Microbiol 59(12): 4236-4244.

Page, W. J. (1992). Production pf poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars & complex nitrogen sources. Appl. Microbiol 38: 117-121.

Poirier, Y.; Nawrath; C. & Somerville, C. (1995). Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics & Elastomers, in Bacteria & plants. Biotechnology 13: 142-150.

Ramsay, B. A.; Lomaliza, K.; Chavarie, C.; Dube, B.; Bataille, P. & Ramsay, J. A. (1990). Production of poly-(β-hydroxybutyric-Co-β-hydroxyvaleric) Acids. Appl. Environ. Microbial. 56(7): 2093-2098.

Ramsay, B. A.; Ramsay, J. A. & Cooper, D. G. (1989). Production of poly-β-hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*. Appl. Microbial. 55: 584-589.

Ramsay, J. A.; Berger, E.; Ramsay, B. A. & Chavarie,S. (1994). Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant - hypochlorite treatment. Biotechnol. Lett. 4: 221-226.

Riis, V. & Mai, W. (1988). Gas chromatographic determination of poly-β-hydroxybutyric acid in Microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. J. Chromatogr. 445: 285-289.

Suzuki,T.;Yamane,T.&Shimizu,S.(1986).Kintics&effect of nitrogen source feeding on production of poly- β-hydroxybutyric acid by fed-batch culture .Appl. Microbiol.Lett.24:366-369.

Tamer, I. M.; Moo-Young, M.; & Chisti, Y. (1998). Disruption of *Acaligenes latus* for recovery of poly (β- hydroxybutyric acid) comparsion of high pressure homogenization , bead milling & chemically induced lysis. Ind. Eng. Chem. Res. 37: 1807-1814.

Turesin, F.; Gumusyazici, Z.; Kok, F. N.; Gursel, I.; Alauddinoglu, N. & Hasirci (2000). Biosynthesis of poly hydroxybutyrate & its copsynthesis & their use in controlled Drug Release. Turk. J. Med. Sci. 30: 335-541.

Wendlandt, K. D.; Jechorek, M.; Helm, J. & Stottmeister, U. (2001). Producng poly-3-hydroxy butyrate with ahigh molecular mass from methane. J. Biotechnol . 86: 127-133.

Wong, P. A. L.; Cheung, M. K.; Lo, W.; Chua, H. & Yu, P. H. F. (2005). Effects of types of food waste As carbon source on the Moleculor distributions and thermal properties of the biopolymer (polyhydroxy butyrate) produced by two strians of Microorganisms.

Yoshida, S.; Matsushita, H. Tawara, T. (1995). Poly-3-hydroxy butyrate purification method. J. P. 7: 177-894.

Zhang, H.; Obias, V.; Gonyer, K. & Dennis, K. (1994). Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose ulitlizing recombinant *Escherichia coli* & *Klebsiella* strians. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1198-1205.