Review Article

Polymerization
Quarterly, 2020
Volume 10, Number 2
Pages 48-58
ISSN: 2252-0449

An Overview on the Production Methods of Polyhydroxyalkanoate Natural Polymers Relying on Productivity Optimization

Ezat Asgarani* and Farzaneh Barati
Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University,
Postal Code 1993893973, Tehran, Iran

Received: 6 August 2019, Accepted: 7 January 2020

Abstract

Today, plastics are one of the most widely used materials in human life. The physical and chemical properties of these polymers are increasingly expanding their range of applications. However, they cannot be degraded in the environment for a long time and produce toxic substances during their prolonged degradation processes. Replacing oil-based plastics by biodegradable plastics with sustainable sources could be an environmentally friendly solution. An important group of biopolymers are polyhydroxyalkanoates, which are naturally produced by some microorganisms under nutrient stress conditions and act as carbon and energy reserve. Many studies have used different methods such as genetic engineering, optimization of production conditions and utilization of inexpensive culture media such as waste waters, to produce, increase the product amount, or reduce the production costs of these biopolymers by organisms. In this paper, the production of polyhydroxyalkanoates in wild and transgenic organisms and the economic aspects of replacing chemical plastics with these natural polymers are reviewed. Cost is a critical and limiting factor in the biopolymer production industry. Therefore, their production is not yet able to compete with the chemical plastics industry. Researchers and craftsmen around the world continue their efforts to reduce production costs. Undoubtedly, in the near future, due to the high pollution caused by chemical plastics and also the decline of fossil fuels consumption, the cost of producing these natural plastics will be justified.

Key Words

biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, polyhydroxybutyrate, transgenic organism, industrial production of bioplastic

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: e.asgarani@alzahra.ac.ir

مقاله مروری

بسپارش
فصلنامه علمی
سال دهم، شماره ۲،
صفحه ۵۸-۴۸، ۱۳۹۹
ISSN: 2252-0449

مروری بر روش‌های تولید پلیمرهای طبیعی پلی‌هیدروکسی آلکانوات با تکیه بر بهینه‌سازی بهره‌وری

عزت عسگرانی[1*]، فرزانه براتی[2]

تهران، دانشگاه الزهرا، دانشکدهٔ علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، کد پستی ۱۹۹۳۸۹۳۹۷۳

دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۵، پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷

چکیده

امروزه پلاستیک‌ها از جمله پرکاربردترین مواد در زندگی بشر هستند. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی این پلیمرها طیف کاربرد آن‌ها را به‌طور روزافزون گسترده‌تر می‌کند. پلاستیک‌های سنتزی، دارای منشأ تجدیدناپذیر و در برابر تخریب طبیعی مقاوم‌اند و طی روند طولانی‌مدت تخریب در طبیعت، مواد سمی تولید می‌کنند. جایگزینی پلاستیک‌های برپایه نفت با پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر دارای منابع پایدار، می‌تواند راه‌حل دوست‌دار زیست‌محیط باشد. دستهٔ مهمی از زیست‌پلیمرها، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها هستند که به‌طور طبیعی توسط برخی میکروانداگان در شرایط تنش ماده مغذی تولید می‌شوند و به‌عنوان ذخیره کربن و انرژی عمل می‌کنند. در مطالعات بسیاری از روش‌هایی همچون مهندسی ژنتیک، بهینه‌سازی شرایط تولید و استفاده از محیط کشت‌های ارزان‌قیمت مانند پساب‌ها به‌منظور ساخت، افزایش مقدار یا کاهش هزینه‌های تولید این زیست‌پلی‌استرها در موجودات زنده انجام گرفته است. در این مقاله، تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در اندامگان وحشی و تراژنی مرور شده و جنبه‌های اقتصادی جایگزینی پلاستیک‌های شیمیایی با این پلیمرهای طبیعی بررسی شده است. هزینه، عامل بحرانی و محدودکننده در صنعت تولید این زیست‌پلیمرهاست، از این رو، هنوز تولید آن‌ها قابلیت رقابت با صنعت تولید پلاستیک‌های شیمیایی را ندارد. تلاش‌های پژوهشگران و صنعتگران جهان به‌منظور کاهش هزینه‌های تولید، همچنان ادامه دارد. بی‌شک در آینده‌ای نه‌چندان دور، به‌دلیل آلایندگی بسیار ناشی از پلاستیک‌های شیمیایی و همچنین محدودشدن مصرف سوخت‌های فسیلی، هزینه تولید این پلاستیک‌های طبیعی قابل توجیه خواهد بود.

عزت عسگرانی

فرزانه براتی

واژگان کلیدی

پلاستیک زیست‌تخریب‌پذیر،
پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات،
پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات،
اندامگان تراژنی،
تولید صنعتی زیست‌پلاستیک

* مسئول مکاتبات، پیام‌نگار:
e.asgarani@alzahra.ac.ir

مقدمه

پلاستیک‌ها تقریباً در هر صنعت تولیدی، از خودرو تا پزشکی استفاده می‌شوند. این پلیمرهای سنتزی، وزن مولکولی $50-100\ kg.mol^{-1}$ دارند و عمدتاً شامل پلی‌اتیلن، پلی‌وینیل‌کلرید و پلی‌استیرن‌های سنتزی هستند. پلاستیک‌ها مقاومت شیمیایی زیادی دارند و می‌توان آن‌ها را تقریباً با هر شکل و استحکامی تولید کرد. این ویژگی‌ها، به ایجاد طیف گسترده‌ای از کاربردها برای این مواد منجر شده است [۱].

از معایب پلاستیک‌ها، مقاومت در برابر زیست‌تخریب که به‌طور عمده به حجیم‌بودن مولکول‌های آن‌ها بازمی‌گردد. این مسئله موجب پایداری این پلیمرها در خاک برای مدت زمان طولانی می‌شود. در سال‌های اخیر، نگرانی‌های فزاینده‌ای نسبت به اثرهای مضر مواد پلاستیکی مشتق از نفت بر محیط زیست ایجاد شده است. چرا که این مواد افزون بر داشتن روند تجزیهٔ طولانی در طبیعت، طی تخریب مواد سمی نیز تولید می‌کنند [۲].

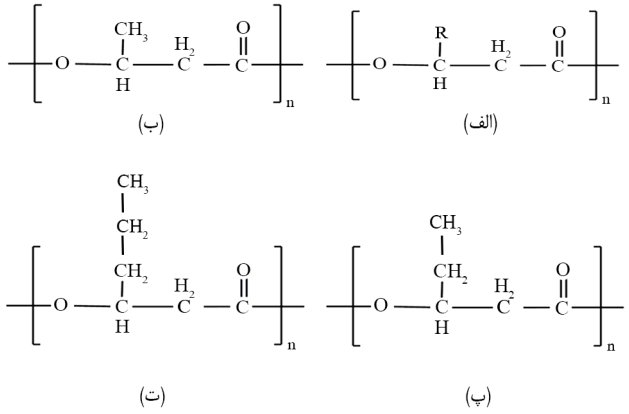
سوزاندن یکی از گزینه‌های دفع پسماندهای پلاستیکی تخریب‌ناپذیر است. این روش افزون بر هزینه‌بری، خطرناک نیز هست. زیرا طی سوزاندن، مواد شیمیایی مضری مانند هیدروژن کلرید و هیدروژن سیانید آزاد می‌شوند. راه حل دیگر بازیافت است که افزون بر مزایای آن، معایبی نیز دارد. به‌عنوان مثال، تفکیک طیف گسترده‌ای از پلاستیک‌ها دشوار است و این کار اغلب به‌درستی انجام نمی‌شود. بنابراین طی بازیافت، تغییراتی در آن‌ها رخ می‌دهد که کاربردهای آن‌ها را محدود می‌کند [۳].

ازسوی دیگر، جهان صنعتی امروز به‌شدت وابسته به سوخت‌های فسیلی به‌عنوان منبع انرژی است و این سوخت‌ها منابع محدودی دارند. سالانه $14\times10^{10}\ kg$ پلاستیک در سراسر جهان مصرف می‌شود. برای تهیهٔ این مقدار، حدود $15\times10^{10}\ kg$ سوخت فسیلی استفاده می‌شود که جایگزینی آن دشوار است. بنابراین، تولید پلاستیک‌ها از مواد دارای منابع تجدیدپذیر پایدار که به‌آسانی با روش‌های سازگار با محیط زیست از طبیعت دفع می‌شوند، مورد توجه قرار گرفته است. تولید زیست‌پلاستیک‌ها، می‌تواند راه حلی برای غلبه بر این مشکلات باشد. زیست‌پلاستیک‌ها، پلیمرهای طبیعی هستند که به‌کمک اندامگان (organism) مختلف به‌عنوان مواد ذخیره تولید می‌شوند. از گروه‌های مهم این زیست‌پلیمرها، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHA) هستند [۴]. از این رو، با توجه به اهمیت پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به‌عنوان جایگزین مناسبی برای پلاستیک‌های مشتق از نفت، مطالعهٔ حاضر به بررسی تولید این زیست‌مولکول‌ها در اندامگان پیش‌هسته‌ای (prokaryote) و هوهسته‌ای (eukaryote) وحشی و تراژنی و امکان‌سنجی اقتصادی این جایگزینی پرداخته است.

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها

دسته‌ای از پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها هستند. این زیست‌پلیمرها پلی‌استرهایی هستند که توسط بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و منفی (حداقل ۷۵ جنس مختلف) به‌شکل درون‌سلولی و در شرایط تنش مواد مغذی، مانند کربن اضافی همراه با محدودیت نیتروژن، فسفر و اکسیژن، ساخته می‌شوند و به‌عنوان ذخیره‌های کربن و انرژی عمل می‌کنند. پلاستیک‌های مشتق از نفت، خواص خود را مدیون زنجیرهای بلند پیوندهای کربن-کربن هستند. جرم مولکولی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در محدودهٔ $50-1000\ kg.mol^{-1}$ است. این وزن مولکولی زیاد، ویژگی‌هایی شبیه به پلاستیک‌های شیمیایی مانند پلی‌پروپیلن به آن‌ها بخشیده است [۴].

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها از مونومرهای اسیدهای چرب هیدروکسیل‌دار ساخته شده‌اند که پلی‌استرهای خطی سر به دم را تشکیل می‌دهند (شکل ۱). معمولاً این ساختارها از 10^3 تا 10^4 مونومر تشکیل شده‌اند که به‌شکل دانه‌هایی به قطر $0/2-0/5\ \mu m$ و بدون هیچ‌گونه اثر خطرناکی بر میزبان، تولید و ذخیره می‌شوند. ساختار، ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی، اندازهٔ دانه‌ها، نوع مونومر و تعداد آن‌ها بسته به اندامگان متغیر است.



شکل ۱- ساختار شیمیایی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در باکتری‌ها: (الف) پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات از اسیدهای چرب هیدروکسیل‌دار، (ب) پلی(۳-هیدروکسی‌بوتیرات) با گروه آلکیلی متیل، (پ) پلی(۳-هیدروکسی‌والرات) با گروه آلکیلی اتیل و (ت) پلی(۳-هیدروکسی‌هگزانوات) با گروه آلکیلی پروپیل [۵].

گروه‌های آلکیلی روی کربن موقعیت ۳، می‌توانند طولی بین ۱ تا ۱۴ کربن داشته باشند. مونومرهای پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به‌طور معمول شامل ۳-هیدروکسی‌بوتیرات، ۳-هیدروکسی‌والرات، ۳-هیدروکسی‌هگزانوات، ۴-هیدروکسی‌بوتیرات، ۳-هیدروکسی-اُکتانوات و ۳-هیدروکسی‌دکانوات هستند. شناخته‌شده‌ترین پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات (PHB) است که هوموپلیمری از ۳-هیدروکسی‌بوتیرات بوده و به‌طور گسترده مطالعه شده است. کوپلیمرهای پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات از بیش از یک نوع مونومر ساخته شده‌اند [۵].

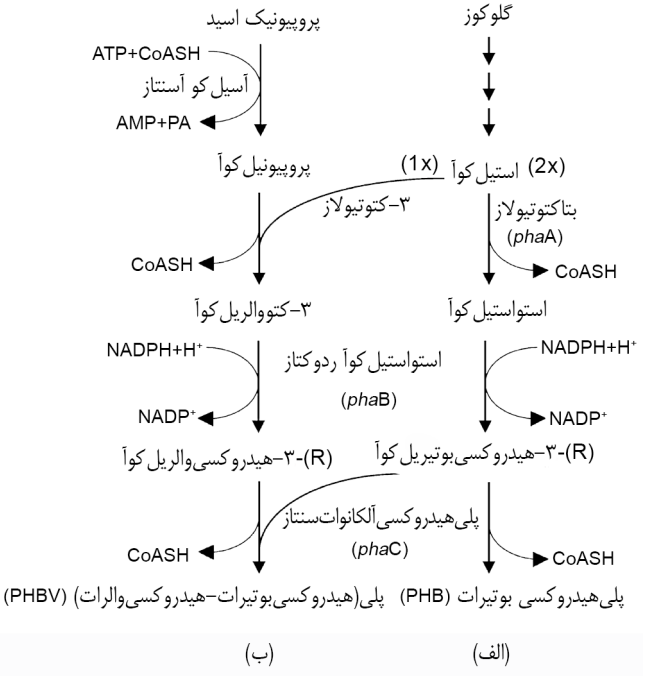
تنوع در مونومرهای سازندهٔ پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، طیف گسترده‌ای از پلیمرهای این خانواده را با خواص فیزیکی مختلف فراهم می‌سازد. معمولاً هر چه گروه‌های آلکیلی موجود در مونومرها بلندتر باشد، کشسانی این پلی‌استرها افزایش می‌یابد. کوپلیمرهایی که از ۳-هیدروکسی‌بوتیرات و مونومرهای دارای گروه آلکیلی بلندتر مانند ۳-هیدروکسی‌والرات، ۳-هیدروکسی‌هگزانوات و ۳-هیدروکسی‌اُکتانوات ساخته شده‌اند، پلاستیک‌های انعطاف‌پذیرتر و محکم‌تری هستند. خواص متنوع در خانوادهٔ این زیست‌پلیمرها به کاربردهای گسترده‌ای منجر شده است. از جمله کاربردهای این پلی‌استرها می‌توان صنایع بسته‌بندی، تولید ظروف، ساخت لایه‌های مقاوم به آب برای کاغذ، فیلم، مقوا و پشت‌پوش‌های پوشک و کاربردهای پزشکی مانند تهیهٔ کاشتینه‌ها، گاز پانسمان و نخ‌های جراحی را نام برد. همچنین، پلیمرهای مزبور را می‌توان به‌عنوان حامل‌های زیست‌تخریب‌پذیر برای رهایش آرام داروها، هورمون‌ها، حشره‌کش‌ها و علف‌کش‌ها، ماتریس کشت‌های سلولی برون‌تنی و نیز به‌عنوان پیش‌سازهای کایرال برای ساخت شیمیایی ترکیبات فعال نوری استفاده کرد [۳،۶،۷].

ساخت پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در پیش‌هسته‌ای‌ها

ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در ساخت در باکتری‌های وحشی

R. eutropha H16 باکتری شیمی‌کانی‌پروردی (chemolithotroph) است که قابلیت رشد با هیدروژن مولکولی به‌عنوان دهندهٔ الکترون و انرژی را داراست. در این سویه مقادیر زیادی پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات ذخیره می‌شود و به‌عنوان یک اندامگان مدل برای مطالعهٔ جنبه‌های مختلف متابولیسم پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها مطرح است. ژن‌های متعلق به این سویه که مربوط به ساخت پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها هستند، به‌طور موفقیت‌آمیزی در باکتری‌ها، مخمرها، گیاهان و سلول‌های حشرات بیان شده و همچنین مطالعات زیادی نیز روی دست‌ورزی تولید در خود این باکتری متمرکز شده‌اند [۸].

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها تنوع شیمیایی زیادی دارند. شناخته‌شده‌ترین عضو این خانواده پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات است که ساده‌ترین مسیر تولید را دارد. سه آنزیم و ژن‌های رمزگذار آن‌ها این مسیر را هدایت می‌کنند. آنزیم بتاکتوتیولاز که توسط ژن *pha*A رمز می‌شود، اولین آنزیم این مسیر است که مسئول ترکیب‌کردن دو مولکول استیل‌کوآ به‌منظور تشکیل استواستیل‌کوآست. مرحلهٔ بعد کاهش استواستیل‌کوآ به (R)-۳-هیدروکسی‌بوتیریل‌کوآست که با استواستیل‌کوآ ردوکتاز انجام می‌شود. این آنزیم با ژن *pha*B رمز شده و وابسته به NADPH است. آخرین مرحله، پلیمرشدن مونومرهای (R)-۳-هیدروکسی‌بوتیریل‌کوآست که به‌وسیلهٔ پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات سنتاز انجام می‌شود (شکل ۲-الف). ژن رمزگذار این آنزیم *pha*C است. افزودن پروپیونیک اسید یا والریک اسید به محیط کشت باکتری (شکل ۲-ب) به تولید کوپلیمرهای ساخته‌شده از هیدروکسی‌بوتیرات و هیدروکسی‌والرات منجر می‌شود. در این مسیر ترکیب‌شدن پروپیونیل‌کوآ با استیل‌کوآ، با استفاده از یک کتوتیولاز (ketothiolase) مجزا به نام ۳-کتوتیولاز انجام می‌شود. کاهش ۳-کتووالریل‌کوآ به (R)-۳-هیدروکسی‌والریل‌کوآ و پلیمرشدن بعدی برای شکل‌دهی پلی(هیدروکسی‌بوتیرات-هیدروکسی‌والرات) (PHBV) به‌وسیله آنزیم‌های مشابه با آنزیم‌های



شکل ۲- مسیر ساخت: (الف) PHB و (ب) PHBV در *Ralstonia eutropha* [۵].

درگیر در ساخت پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات یعنی استواستیل‌کوآ ردوکتاز و پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات سنتاز کاتالیز شده‌اند [۹،۱۰].

سوخت‌وساز کاتالیزی (catabolism) اسیدهای چرب، از مشهورترین مسیرها برای تأمین مونومرهای تشکیل‌دهندهٔ پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌هاست. حدواسط‌های تولیدشده طی بتااکسایش اسیدهای چرب، می‌توانند پیش‌ساز ۳-هیدروکسی‌آسیل‌کوآ باشند که به‌طور مستقیم در ساخت پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها استفاده می‌شوند [۶].

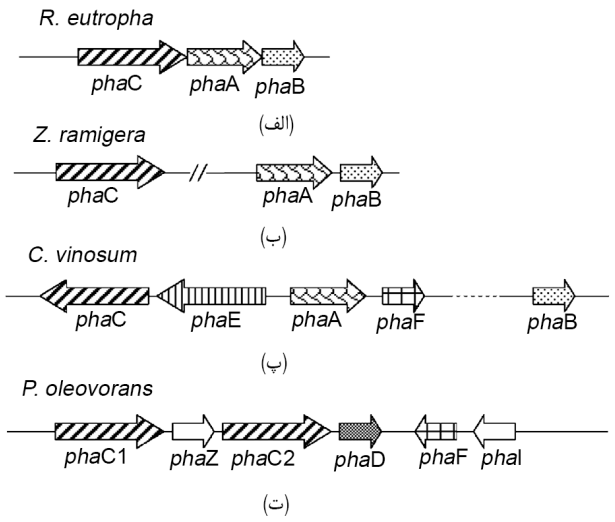
ژن‌های مربوط به تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها لزوماً به‌طور دسته‌ای نبوده و سازمان‌دهی آن‌ها از گونه‌ای به گونهٔ دیگر متفاوت است. در *Ralstonia eutropha*، *Alcaligenes latus*، *Pseudomonas acidophila* و گونه‌های جنس *Acinetobacter*، ژن‌های *pha* یک اپرون (operon) تشکیل داده‌اند (شکل ۳-الف). این سه ژن در گونه‌های نام‌برده ترتیب یکسانی ندارند.

در *Paracoccus denitrificans*، *Rhizobium meliloti* و *Zoogloea ramigera*، *phaA* و *phaB* در یک اپرون قرار دارند و *phaC* در جایگاه (locus) ژن متفاوتی قرار دارد (شکل ۳-ب). در برخی گونه‌ها شامل *Chromatium vinosum*، *Thiocystis violacea*، *Thiocapsa pfennigii* و گونه‌ای از جنس *Synechocystis*، آنزیم پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات سنتاز توسط دو ژن *phaC* و *phaE* رمز می‌شود. *phaAB* و *phaEC* در یک جایگاه ژن اما در خلاف جهت یکدیگر قرار گرفته‌اند. ژن *phaF* در تحکیم دانه‌ها نقش دارد و همچنین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده عمل می‌کند (شکل ۳-پ).

اپرون در *Burkholderia caryophylli*، *Pseudomonas oleovorans* و *Pseudomonas aeruginosa* به‌صورت *phaC1ZC2D* بوده که دارای دو ژن *phaC* (رمزگذار پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات سنتاز) است که با ژن *phaZ* از یکدیگر جدا شده‌اند. *phaZ*، کدکنندهٔ پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات دپلیمراز است. *phaI* در تشکیل و تحکیم گرانول‌ها مشارکت دارد و نقش *phaD* هنوز مشخص نیست (شکل ۳-ت) [۲،۵].

تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در باکتری‌های نوترکیب

بسیاری از باکتری‌های تولیدکننده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به‌طور طبیعی، مدت زمان طولانی برای رشد احتیاج دارند، اغلب به‌سختی کافت (lysis) می‌شوند و دارای مسیرهای تخریب این پلی‌استرها نیز هستند. باکتری‌هایی مانند *E.coli* قابلیت تولید این پلیمرها را ندارند، با وجود این سریع رشد می‌کنند، قابلیت تخریب این ساختارها را ندارند و کافت آن‌ها آسان است. رشد سریع، می‌تواند



شکل ۳-سازمان‌دهی ژن‌های درگیر در تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در میکروواندامگان‌های مختلف [۵].

به *E. coli* قابلیت تجمع مقادیر زیادی از این مولکول را بدهد. کافت آسان سلول‌ها موجب صرفه‌جویی در هزینه‌های خالص‌سازی دانه‌های این پلیمر می‌شود. تلاش‌های گسترده‌ای برای به حداکثر رساندن تولید در میکروواندامگانی که تولیدکنندگان طبیعی نیستند، انجام شده، اما در بسیاری از این سویه‌ها سطح انباشت این زیست‌مولکول حتی به اندازهٔ برخی سویه‌های تولیدکنندهٔ طبیعی نبوده است. یکی از موانع عمدهٔ تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در اندامگان نوترکیب، مربوط به ناپایداری ژن‌های واردشده به میزبان است [۳،۹].

مهندسی متابولیک همچنین به گسترش دامنهٔ بسترهای قابل استفاده توجه داشته است. بدین‌منظور دو روش پیشنهاد می‌شود. اول، بیان‌کردن ژن‌های استفاده از بستر ارزان‌قیمت در تولیدکنندگان پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، دوم، بیان ژن‌های ساخت این زیست‌پلاستیک در سویه‌هایی که تولیدکنندهٔ طبیعی نیستند، اما می‌توانند از بسترهای ارزان‌قیمت استفاده کنند. درحال حاضر، رویکرد دوم به‌نظر امیدوارکننده‌تر است. *E. coli* می‌تواند از منابع کربنی مختلف مانند گلوکوز، سوکروز، لاکتوز و زایلوز استفاده کند. بنابراین، با بسترهای ارزانی همچون ملاس، آب پنیر و همی‌سلولوز آبکافت‌شده، کاهش بزرگی در هزینه‌های تولید این پلیمرها امکان‌پذیر می‌شود [۴،۹].

در یک مطالعه، اپرون *phaCAB* مربوط به *R. eutropha* H16 در *E. coli* همسانه‌سازی (cloning) شده است. محیط کشت استفاده‌شده حاوی ملاس پیش‌عمل‌آوری‌شده با سولفوریک اسید غلیظ و مکمل‌های مغذی مانند برخی نمک‌هاست. مقدار

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تولیدشده در این باکتری ٪۲۲/۵ وزن خشک سلولی است [۱۱].

همچنین، به‌منظور افزایش تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، تعدادی از مطالعات درباره مهندسی آنزیم پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات سنتاز انجام گرفته است. به‌عنوان مثال، اصلاحی از راه جهش‌زایی تصادفی با استفاده از واکنش زنجیری پلیمراز در ژن *pha*C مربوط به *Aeromonas caviae*، به افزایش ۶/۵ برابری تجمع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در *E. coli* نوترکیب نسبت به *A. caviae* منجر شده است [۱۲]. همچنین، مطالعاتی درباره بیش‌بیان ژن‌های سنتز پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در سویه‌های تولیدکنندهٔ طبیعی انجام گرفته است.

در پژوهشی، سه گروه *Ralstonia eutropha* تراژن، با واردکردن سه دسته پلازمید نوترکیب حاوی ژن‌های *pha*AB، *pha*CAB و *pha*C ایجاد شده است. بررسی‌ها نشان داده است، تراژن‌های دارای پلازمید حاوی *pha*C بیشترین تولید را داشته‌اند. ظرفیت تولید توسط تراژن‌های دارای *pha*AB، *pha*CAB، *pha*C و سویهٔ وحشی به‌ترتیب ۳/۳۲، ۳/۲، ۲/۸ و ۲/۷ $kg.m^{-3}$ بوده است. باکتری‌های نوترکیبی که پلازمید حاوی *pha*C را دریافت کرده‌اند، تولید تقریباً مشابهی با دریافت‌کننده‌های *pha*CAB دارند. تراژن‌های دارای *pha*AB افزایش معناداری در تولید این زیست‌پلیمر نسبت به سویه والد نشان نداده‌اند [۱۳]. همچنین در مطالعهٔ دیگری، ژن *pha*C مربوط به *Alcaligenes latus* در خود این سویه همسانه‌سازی شده است. مقدار تولید پلی‌استر مدنظر در سویهٔ تراژنی نسبت به سویهٔ وحشی ۱/۲ برابر افزایش یافته و از ٪۳۶ به ٪۴۳/۷ رسیده است [۱۴]. این مطالعات نشان داده‌اند، آنزیم PHA سنتاز مهم‌ترین آنزیم در مسیر زیست‌سنتز پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌هاست [۱۳،۱۴].

تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در سیانوباکتری‌ها

سیانوباکتری‌ها گروهی از باکتری‌های فوتوسنتزکننده هستند که به‌علت حداقل نیازهای تغذیه‌ای و ماهیت نورپرورد (phototroph) می‌توانند به‌عنوان گزینهٔ مناسبی برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در نظر گرفته شوند. استفاده از سیانوباکتری‌ها به‌عنوان تولیدکنندگان این پلیمر، فایدهٔ تبدیل کربن دی‌اکسید (یک گاز گلخانه‌ای) به پلاستیک‌های سازگار با محیط زیست با استفاده از انرژی خورشیدی را دربردارد. اولین گونهٔ سیانوباکتریایی که وجود پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در آن گزارش شده، *Chlorogoea fritschii* در سال ۱۹۹۶ بوده است. همچنین، این زیست‌مولکول در گونه‌های جنس‌های *Spirulina*، *Aphanothece*، *Gloeothece*، *Synechococcus*، *Gleocapsa*، *Nostoc* و گونه‌های *Oscillatoria limosa*، *Microcystis aeroginosa* و *Trichodesmium thiebautii* مشاهده شده است. از سوی دیگر، در مطالعاتی تعدادی از سیانوباکتری‌هایی که قابلیت تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات نداشته‌اند، از راه دریافت ژن‌های *pha* مربوط به *R. eutropha*، به‌لحاظ ژنتیکی مهندسی شده‌اند که به تجمع این پلیمر در آن‌ها منجر شده است [۱۰،۱۵].

سیانوباکتری‌ها به‌دلیل قابلیت استفاده از نیتروژن و فسفر معدنی، به‌طور موفقیت‌آمیزی در پساب‌هایی همچون فاضلاب مزارع و کارخانه‌های فراوری محصولات کشاورزی، مزارع پرورش ماهی، صنایع لاستیک و کارخانه‌های تصفیه پساب کشت داده شده‌اند که منابع غنی از نیتروژن و فسفر هستند. به‌عنوان مثال، در طرح پژوهشی-کاربردی Oli-PHA، به‌منظور تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، سیانوباکتری‌هایی که تحت دست‌ورزی ژنتیکی قرار گرفته و افزایش معنادار تولید نسبت به سویه‌های وحشی نشان داده‌اند، از پساب کارخانه‌های روغن زیتون به‌عنوان منبع غذایی استفاده کرده‌اند [۱۵،۱۶].

تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در سلول‌های هوهسته‌ای

در مقایسه با پلاستیک‌های مشتق از نفت، تولید زیست‌پلاستیک‌ها در باکتری‌ها به‌علت هزینهٔ زیاد محدود است. این موضوع، نیروی محرکه‌ای برای جست‌وجوی سامانه‌های هوهسته‌ای، به‌ویژه محصولات کشاورزی، به‌عنوان میزبان برای تولید است. همچنین، مسیرهای زیست‌سنتز پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در مخمرها و سلول‌های حشرات با کمک مهندسی متابولیک طراحی و تولید این پلیمرها مطالعه شده است. بازده تولید در مخمرها و سلول‌های حشرات بسیار کم است، اما این مطالعات می‌تواند اطلاعات ارزشمندی درباره نحوهٔ قراردادن این مسیرها در گیاهان فراهم کند [۵].

تولید در گیاهان تراژنی

تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در باکتری‌ها و مخمرها، نیازمند رشد در شرایط سترون، درون تخمیرگاه (fermentor) با استفاده از منابع انرژی خارجی مانند برق است. در مقابل، تولید این زیست‌مولکول‌ها در گیاهان به‌طور درخور توجهی ارزان‌تر است، زیرا تنها به آب، مواد مغذی خاک، کربن دی‌اکسید جو و نور خورشید بستگی دارد. ظرفیت تولید این پلیمرها با استفاده از محصولات کشاورزی 10^9 kg است، درحالی که برای تخمیرگاه تا 10^6 kg است. اگر مقدار پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات ٪۴۰-۲۰ وزن خشک گیاه باشد، هر کیلوگرم از این زیست‌پلاستیک با هزینهٔ

۰/۵-۰/۲ دلار تولید می‌شود، بنابراین با پلاستیک‌های برپایهٔ نفت قابل رقابت است. بر خلاف سلول‌های باکتریایی، سلول گیاهی دارای بخش‌های زیرسلولی مختلف است. برای تولید این پلیمر در گیاهان، محصول بیان ژن‌های *pha* باید در اتاقک‌هایی از سلول‌های گیاهی قرار گیرد که غلظت استیل‌کوآ در آن‌ها زیاد است. بنابراین، ساخت این مولکول‌ها در سیتوسل، پلاستیدها و پراکسی‌زوم‌ها امکان‌پذیر است [۱۷].

سنتز سیتوسلی

مطالعات آغازی برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در گیاهان، روی بیان سیتوسلی (cytosol) متمرکز شده است. به‌طور طبیعی در سیتوسل گیاهان عالی، جایی که در سنتز موالونات (پیش‌ساز ایزوپرنوئیدها) شرکت می‌کند، یک بتاکتوتیولاز وجود دارد که اولین آنزیم در سنتز پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات است. بنابراین، برای تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در سیتوسل فقط بیان استواستیل‌کوآ ردوکتاز و پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات سنتاز نیاز است [۱۷].

اولین تلاش برای تولید این زیست‌پلاستیک در گیاهان تراژنی، با *Arabidopsis thaliana*، یک گیاه مدل با ژنوم نسبتاً کوچک و چرخهٔ زندگی کوتاه انجام شده است که می‌تواند به‌آسانی به‌وسیلهٔ *Agrobacterium tumefaciens* تبدیل شود. در این مطالعه، ژن *pha*B و *pha*C مربوط به *R.eutropha* را در سلول‌های این گیاه، تحت کنترل پیش‌برنده CaMV35S (ویروس موزائیک کلم)، بدون سیگنال هدف‌گذاری اندامک خاصی بیان کردند. گرانول‌های پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در بافت‌های مختلف گیاه مانند ریشه، برگ و دانه مشاهده شد. بیشترین مقدار این زیست‌پلاستیک فقط ۰/۱٪ وزن خشک برگ‌ها بود [۱۸]. آزمایش‌های مشابهی نیز به‌منظور تولید سیتوسل پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در ذرت مکزیکی سیاه، تنباکو و سیب‌زمینی انجام گرفته است. در این مطالعات و همچنین مطالعهٔ اول، گیاهان تراژنی افزون بر بازده کم تولید پلیمر، کاهش شدید رشد نشان دادند. احتمال داده شد، انحراف استیل‌کوآ و استواستیل‌کوآ سیتوسلی از مسیرهای ساخت ایزوپرنوئید و فلاوونوئید، سلول را از متابولیت‌های ضروری خالی کرده و بنابراین رشد گیاه تراژنی تحت تأثیر قرار گرفته است [۲۱-۱۹].

مسیر ساخت ایزوپرنوئید در تشکیل هورمون‌های ضروری رشد گیاه (سیتوکینین‌ها، ژیبرلین‌ها و براسینواستروئیدها) همکاری می‌کند. استیل‌کوآ و استواستیل‌کوآ سیتوپلاسمی همچنین در سنتز استرول‌ها و اجزای ضروری غشاهای سلولی نقش دارند. تغییرات کوچک در این هورمون‌ها و استرول‌ها، به‌شدت بر رشد گیاه اثرگذار است [۲۱].

سنتز در پلاستیدها

مقدار کم پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در سیتوسل (کمتر از ۰/۵٪ وزن خشک)، با موجودی محدود استیل‌کوآ مرتبط است. در مقابل، مقادیر نسبتاً زیادی از استیل‌کوآ در پلاستیدها وجود دارد. این اندامک‌ها محل زیست‌سنتز اسیدهای چرب بوده، بنابراین به‌شدت به ورودی استیل‌کوآ وابسته هستند. به‌دلیل عدم وجود کتوتیولاز اندوژن در پلاستیدها، تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در این اندامک‌ها، مستلزم واردکردن ژن‌های باکتریایی کدکنندهٔ کتوتیولاز افزون بر ژن‌های کدکنندهٔ استواستیل‌کوآ ردوکتاز و پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات سنتاز است [۱۷].

در پژوهشی تلاش شده است، سه ژن باکتریایی مسئول تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، درون ژنوم هسته‌ای گیاه *Arabidopsis* درج شوند. این ساختارهای ژنی، دربردارندهٔ قطعهٔ DNA کدکنندهٔ پپتید دارای حق عبور از کلروپلاست بوده‌اند. آنزیم‌های نوترکیب تولیدشده در سیتوپلاسم، از طریق اتصال پپتید عبوری از کلروپلاست، که مربوط به زیرواحد کوچک ریبولوز بیس‌فسفات‌کربوکسیلاز نخود است، به گیرندهٔ پروتئین‌دار، وارد کلروپلاست شده‌اند. سپس یک پروتئاز استرومایی، پپتید عبوری را جدا کرده و پروتئین بالغ را آزاد می‌کند تا در پلاستیدها عملکرد داشته باشد. هرکدام از این تراژن‌ها به‌طور مستقل، تحت کنترل پیش‌برنده CaMV35S بیان شده‌اند. دانه‌های پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تنها در پلاستیدها مشاهده شده‌اند و اندازه و ظاهر دانه‌ها، مشابه دانه‌های تولیدی در باکتری‌هاست. حداکثر مقدار این پلیمر در اندام برگ، kg ۱۰-۵ به‌ازای هر kg ۱۰-۳ وزن برگ تازه بوده که تقریبا ۱۴٪ وزن خشک آن است. اگرچه کلروز برگ در این گیاهان وجود داشته، اما اثرهای زیانباری بر رشد و باروری گیاه مشاهده نشده است. در این مطالعهٔ، این سه ژن به‌طور جداگانه در چند جایگاه قرار گرفته‌اند، بنابراین به کاهش در کپی ژنی و کاهش تولید زیست‌پلاستیک در نسل‌های بعدی منجر شده است [۲۲]. یک ساختار ژنی دیگر به‌صورت یک ناقل (vector) دربردارندهٔ این سه ژن، برای سنتز پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات پلاستیدی در *Arabidopsis* ایجاد شده است. هر یک از این ژن‌ها در این ساختار با یک قطعه DNA کدکنندهٔ پپتید عبوری از کلروپلاست، یک پیش‌برنده CaMV35S و خاتمهٔ رونویسی همراه شده‌اند. پس از تراریختگی (transformation)، افزایش چشمگیری در تولید این زیست‌پلاستیک (تا ۴۰٪ وزن خشک) مشاهده شده است. این گیاهان شکل‌شناسی تغییریافته از

جمله کوتاه‌بودن یا بی‌دانگی را نشان داده‌اند [۲۳].

پلاستیدها ژنوم دارند و می‌توانند از اپرون‌ها، mRNAهای پلی‌سیسترونیک رونویسی کنند. بنابراین، تراژنی‌کردن ژنوم‌های پلاستیدی می‌تواند از گسترش تراژن‌ها به گیاهان وحشی در محیط زیست جلوگیری کند. تراژنی‌کردن پلاستیدهای تنباکو با اپرون *pha* (*pha*CAB) مربوط به *R. eutropha* تحت کنترل پیش‌برنده اپرون rRNA پلاستیدی (*prrn*) با بمباران ذرات طلا انجام شده است. تولید در برگ‌های رده‌های تراژنی، تنها شامل مقدار قابل تشخیصی (مقدار خیلی کم) از پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات است [۲۴]. در مطالعهٔ دیگری، با واردکردن اپرون *pha* تنظیم‌شونده با پیش‌برنده *prrn* به ژنوم پلاستید، مقدار کمی از این پلیمر در برگ‌های تنباکو تولید شده است [۲۵]. همچنین طی تلاشی، گیاه تنباکو با اپرون *pha* تحت کنترل پیش‌برنده psbA (پیش‌برنده دارای بیان زیاد در پلاستیدها) تراژنی شده است. رده‌های تراژنی، زیست‌پلاستیکی را تا ٪۱/۷ وزن خشک تولید کرده، اما کندی رشد و عقیمی نشان داده‌اند [۲۶].

سنتز در پراکسی‌زوم‌ها

پراکسی‌زوم‌ها اندامک‌هایی با اندازهٔ μm ۱-۰/۱ هستند که به‌وسیلهٔ یک لیپید دولایه‌ای محصور شده‌اند. گلی‌اکسی‌زوم‌ها، پراکسی‌زوم‌های اختصاصی هستند که در بتااکسایش اسیدهای چرب و هدایت استیل‌کوآ به‌سمت تولید کربوهیدرات برای حمایت از رشد جوانه درگیر هستند [۲۷]. غلظت زیاد استیل‌کوآی حاصل از بتااکسایش در این اندامک، نشان از مناسب‌بودن این مکان برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات دارد. افزون بر این، هیدروکسی‌آسیل‌کوآهای حد واسط در مسیر بتااکسایش، می‌توانند به‌عنوان پیش‌ساز در زیست‌سنتز پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها استفاده شوند [۱۷]. در مطالعه‌ای، به‌منظور تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، بیان سه ژن مربوط به *R.eutropha* در ذرت مکزیکی سیاه انجام شده است. این ساختار ژنی به‌گونه‌ای طراحی شده است که محصولات ترجمه، به‌دلیل حضور رزیدوهای آمینواسیدی RAVARL در انتهای کربوکسیل خود، پراکسی‌زوم‌ها را هدف قرار می‌دهند. پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات تا ٪۲ وزن خشک در گیاه تراژنی تجمع یافته است [۲۸].

فعالیت بتااکسایش و چرخهٔ گلی‌اکسالات طی جوانه‌زنی بذر و پیرشدن برگ‌ها (هنگامی که اسیدهای چرب به کربوهیدرات تبدیل می‌شوند) زیاد است و زمانی که فوتوسنتز در جوانه‌ها شروع می‌شود، به‌تدریج کاهش می‌یابد. این تفاوت متابولیکی با انباشت مقدار زیادی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در جوانه‌های تراژنی ۷ روزه (12×10^{-8} kg به‌ازای 10^{-3} kg وزن خشک) و فقط $2/2\times10^{-9}$ kg (به‌ازای 10^{-3} kg وزن خشک) در برگ گیاهان تراژنی ۲۸ روزه نشان داده شده است. مقدار این زیست‌پلیمر در برگ گیاهان تراژنی ۶۰ روزه، زمانی‌که بتااکسایش دوباره افزایش می‌یابد به 23×8^{-10} kg (به‌ازای 10^{-3} kgوزن خشک) افزایش یافته است [۲۹].

تولید صنعتی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها

با وجود گسترهٔ وسیعی از انواع پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها، تنها چهار عضو از این خانواده که عبارتند از هوموپلیمر پلی(۳-هیدروکسی‌بوتیرات) و کوپلیمرهای پلی(۳-هیدروکسی بوتیرات -۴-هیدروکسی‌والرات)، پلی(۳- هیدروکسی-بوتیرات-۴-هیدروکسی‌بوتیرات) (P3HB4HB) و پلی(۳-هیدروکسی‌بوتیرات-۳-هیدروکسی‌هگزانوات) (PHBHHx) در مقیاس گسترده برای مقاصد تجاری تولید شده‌اند. در سطح جهان ۲۴ شرکت شناخته‌شده وجود دارند که تولیدکنندهٔ این پلیمرهای تجاری بوده و دارای بخش تحقیق و توسعه هستند (جدول ۱). فعالیت برخی از آن‌ها به‌طور عمده در دههٔ ۱۹۹۰، با توجه به قیمت کم نفت متوقف شده است. از طرفی، با توجه به ناپایداری وضعیت منابع نفتی و همچنین به‌دلیل کمک بزرگ زیست‌پلاستیک‌ها به محیط زیست، بسیاری از این شرکت‌ها به روند تولید ادامه داده‌اند، هرچند به‌لحاظ اقتصادی قادر به رقابت با پلاستیک‌های نفتی نیستند [۷،۳۰،۳۱].

طبق اطلاعات در دسترس از اندامگان مورد استفاده در تولید صنعتی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات، شرکت‌های Chemie Linz اتریش و Biomers آلمان از *A. latus*، ICI انگلستان از *R. eutropha* H16 نوترکیب، شرکت‌های Metabolix آمریکا و Tianjin Green Bioscience چین از سویه‌های *E. coli* نوترکیب و *R.eutropha*، Procter and Gamble آمریکا از *Aeromonas hydrophila* و Tianjin Northern Food چین از *R.eutropha* استفاده کرده‌اند [۷،۳۱].

اگرچه انواعی از پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به بازار عرضه شده‌اند، اما هزینه‌های تولید، مانع استفادهٔ گسترده از آن‌ها شده است. به‌منظور کاهش قیمت تولید در مقیاس وسیع، راهبردهای مختلفی به‌کار گرفته شده است، از جمله استفاده از سویه‌های مهندسی‌شده، سویه‌های وحشی با تولید زیاد و سویه‌هایی که از منابع کربنی ارزان استفاده می‌کنند [۳۰].

جدول ۱- تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در سراسر جهان [۷،۳۰].

نام شرکت و کشور سازنده	PHA تولیدشده	ظرفیت تولید $10^3\times$(kg/year)	بازهٔ فعالیت
ICI، انگلستان	PHBV	۳۰۰	۱۹۸۰-۱۹۹۰
Chemie Linz، اتریش	PHB	۲۰-۱۰۰	دهۀ ۱۹۸۰
BTF، اتریش	PHB	۲۰-۱۰۰	دهۀ ۱۹۹۰
Biomers، آلمان	PHB	نامعلوم	دهۀ ۱۹۹۰ تا کنون
BASF، آلمان	PHB و PHBV	مقیاس نیمه‌صنعتی	۱۹۸۰-۲۰۰۵
Metabolix، ایالات متحده آمریکا	چند نوع PHA	نامعلوم	۱۹۸۰ تا کنون
Tepha، ایالات متحده آمریکا	چند نوع PHA	تولید کاشتینه‌های پزشکی	۱۹۹۰ تا کنون
ADM، ایالات متحده آمریکا به‌همراه Metabolix	چند نوع PHA	۵۰۰۰۰	۲۰۰۵ تا کنون
Procter and Gamble (P&G)، ایالات متحده آمریکا	چند نوع PHA	تولید قراردادی	۱۹۸۰-۲۰۰۵
Monsanto، ایالات متحده آمریکا	PHB و PHBV	تولید PHA گیاهی	دهۀ ۱۹۹۰
Meredian، ایالات متحده آمریکا	چند نوع PHA	۱۰۰۰۰	۲۰۰۷ تا کنون
Kaneka، ژاپن به‌همراه P&G	چند نوع PHA	نامعلوم	۱۹۹۰ تاکنون
Mitsubishi، ژاپن	PHB	۱۰	دهۀ ۱۹۹۰
Biocycles، برزیل	PHB	۱۰۰	۱۹۹۰ تا کنون
Bio-On، ایتالیا	نامعلوم	۱۰۰۰۰	۲۰۰۸ تا کنون
Zhejiang Tian An، چین	PHBV	۲۰۰۰	۱۹۹۰ تا کنون
Jiangmen Biotech Center، چین	PHBHHx	نامعلوم	دهۀ ۱۹۹۰
Yikeman، چین	نامعلوم	۳۰۰۰	۲۰۰۸ تا کنون
Tianjin Northern Food، چین	PHB	مقیاس نیمه‌صنعتی	دهۀ ۱۹۹۰
Shantou Lianyi Biotech، چین	چند نوع PHA	مقیاس نیمه‌صنعتی	۱۹۹۰-۲۰۰۵
Jiangsu Nan Tian، چین	PHB	مقیاس نیمه‌صنعتی	۱۹۹۰ تا کنون
Shenzhen O'Bioer، چین	چند نوع PHA	نامعلوم	۲۰۰۴ تا کنون
Tianjin Green Bioscience، چین	P3HB4HB	۱۰۰۰۰	۲۰۰۴ تا کنون
Shandong Lukang، چین	چند نوع PHA	مقیاس نیمه‌صنعتی	۲۰۰۵ تا کنون

نتیجه‌گیری

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها دارای ساختارهای کاملا زیست‌تخریب‌پذیر هستند و از منابع تجدیدپذیر به‌دست می‌آیند. تولید این پلاستیک‌ها در باکتری‌ها، پنج تا ده برابر هزینهٔ بیشتری نسبت به پلاستیک‌های مشتق از نفت دارد. با این وجود، با توسعهٔ میکروانداگان تراژنی تولیدکننده، انتظار می‌رود تا هزینه‌ها بسیار کاهش یابد. سامانه‌های تراژنی مزایایی همچون عدم وجود سامانه دپلیمراز، قابلیت استفاده از سویه‌های با رشد سریع‌تر و استفاده از منابع کربنی ارزان‌قیمت را دارند. از سویی، به‌دست‌آوردن اندامگان تراژنی پایدار نیز چالش دیگری است که باید مورد توجه قرار گیرد. سنتز پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها در گیاهان که به کربن دی‌اکسید و نور متکی هستند، نشان از رویکرد باصرفه‌تری برای تولید در مقیاس بزرگ دارد. از سوی دیگر، تولید در این اندامگان نیز دارای موانع مرتبط با بیان تراژن‌ها، وضعیت متابولیکی رشد گیاه و مسائل زیست‌محیطی گیاهان تراژنی است. بنابراین، ساخت این زیست‌پلیمرها با استفاده از گیاهان امکان‌پذیر است، اما در مقیاس وسیع هنوز نیازمند امکان‌سنجی‌های اقتصادی و پژوهش‌های درخور توجه است. همان‌طور که طرح Oli-PHA نشان داده است، سیانوباکتری‌ها به‌دلیل استفاده از بسترهای ارزان‌قیمت و قابلیت

استفاده از پساب‌ها، می‌توانند گزینه باصرفه و امیدوارکننده‌ای برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها باشند. نکته مهم و بحرانی برای تولید صنعتی این پلیمرها، هزینه‌بری آن است. در حال حاضر در سراسر جهان، تمام تلاش‌ها بر کاهش هزینهٔ تولید متمرکز شده‌اند.

مراجع

1. Hawas J., El-Banna T.E.-S., Belal E.B.A., and El-Aziz A., Production of Bioplastic from Some Selected Bacterial Strains, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, **5**, 10-22, 2016.
2. Reddy C.S.K., Ghai R., and Kalia V.C., Polyhydroxy alkanoates: An Overview, *Bioresour. Technol.*, **87**, 137-146, 2003.
3. Tan G.Y., Chen C.L., Li L., Ge L., Wang L., Mutiara I., Razaad N., Li Y., Zhao L., Mo Y., and Wang J.-Y., Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review, *Polymers*, **6**, 706-754, 2014.
4. Kaur L., Khajuria R., Parihar L., and Singh G, Polyhydroxyalkanoates: Biosynthesis to Commercial Production-A Review, *J. Microbiol. Biotechnol. Food. Sci.*, **6**, 1098-1106, 2017.
5. Suriyamongkol P., Weselake R., Narine S., Moloney M., and Shah S., Biotechnological Approaches for the Production of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms and Plants- A Review, *Biotechnol. Adv.*, **25**, 148-175, 2007.
6. Verlinden R.A., Hill D.J., Kenward M.A., Williams C.D., and Radecka I., Bacterial Synthesis of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates, *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 1437-1449, 2007.
7. Chen G.Q., *Plastics from Bacteria*, Springer, Germany, 17-37, 2010.
8. Reinecke F. and Steinbuchel A., Ralstonia Eutropha Strain H16 As Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 91-108, 2009.
9. Peña C., Castillo T., García A., Millán M., and Segura D., Biotechnological Strategies to Improve Production of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate): A Review of Recent Research Work, *Microb. Biotechnol.*, **7**, 278-293, 2014.
10. Balaji S., Gopi K., and Muthuvelan B., A Review on Production of Poly β hydroxybutyrates from Cyanobacteria for the Production of Bioplastics, *Algal Res.*, **2**, 278-285, 2013.
11. Tran H.D., Huynh V.H., Pham C.H., Chung A.D., and Tran Q.D., Cloning *phb*CABoperon of *Alcaligeneseutrophus* H16 into *Escherichia coli* DH5α to Manufacture Poly 3-hydroxybutyrate Using Molasses As Carbon Source, *Int. J. Biol. Med. Res.,* **7**, 5609-5613, 2016
12. Kichise T., Taguchi S., and Doi Y., Enhanced Accumulation and Changed Monomer Composition in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolyester by In Vitro Evolution of Aeromonas Caviae PHA Synthase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2411-2419, 2002.
13. Park J.S., Park H.C., Huh T.L., and Lee Y.H., Production of Poly-β-hydroxybutyrate by *Alcaligenes Eutrophus* Transformants Harbouring Cloned *phb*CAB Genes, *Biotechnol. Lett.*, **17**, 735-740, 1995.
14. Seo I.S., Jung Y.M., and Lee Y.H., Production of P(3-hydroxy-butyrate-3-hydroxyvalerate) and P(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) Using Transformant Alcaligenes Latus Enforcing Its Own phbC Gene, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 333-336, 2001.
15. Bhati R., Samantaray S., Sharma L., and Mallick N., Poly-beta-hydroxybutyrate Accumulation in Cyanobacteria Under Photoautotrophy, *Biotechnol. J.*, **5**, 1181-1185, 2010.
16. Cinelli P., Lazzeri A., Anguillesi I., and Bugnicourt E., Oli-PHA A Novel and Efficient Method for the Production of Polyhydroxyalkanoate Polymer-based Packaging from Olive Oil Waste Water, *3rd International Conference on Industrial and Hazardous Waste Management*, Chania, Crete, Greece, 8, 12-14 September, 2012.
17. Snell K.D., Singh V., and Brumbley S.M., Production of Novel Biopolymers in Plants: Recent Technological Advances and Future Prospects, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **32**, 68-75, 2015.
18. Poirier Y., Dennis D.E., Klomparens K., and Somerville C., Polyhydroxybutyrate, A Biodegradable Thermoplastic, Produced in Transgenic Plants, *Science*, **256**, 520-523, 1992.
19. Hahn J.J., Eschenlauer A.C., Narrol M.H., Somers D.A., and Srienc F., Growth Kinetics, Nutrient Uptake, and Expression of the Alcaligenes Eutrophus Poly(beta-hydroxybutyrate)

Synthesis Pathway in Transgenic Maize Cell Suspension Cultures, *Biotechnol. Prog.*, **13**, 347-354, 1997.

20. Nakashita H., Arai Y., Yoshioka K., Fukui T., Doi Y., Usami R., Horikoshi K., and Yamaguchi I., Production of Biodegradable Polyester by a Transgenic Tobacco, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 870-874, 1999.
21. Snell K.D. and Peoples O.P., Polyhydroxyalkanoate Polymers and their Production in Transgenic Plants, *Metab. Eng.*, **4**, 29-40, 2002.
22. Nawrath C., Poirier Y., and Somerville C., Targeting of the Polyhydroxybutyrate Biosynthetic Pathway to the Plastids of Arabidopsis Thaliana Results in High Levels of Polymer Accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12760-12764, 1994.
23. Bohmert K., Balbo I., Kopka J., Mittendorf V., Nawrath C., Poirier Y., Tischendorf G., Trethewey R.N., and Willmitzer L., Transgenic Arabidopsis Plants Can Accumulate Polyhydroxybutyrate to Up to 4% of their Fresh Weight, *Planta*, **211**, 841-845, 2000.
24. Nakashita H., Arai Y., Shikanai T., Doi Y., and Yamaguchi I., Introduction of Bacterial Metabolism into Higher Plants by Polycistronic Transgene Expression, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1688-16891, 2001.
25. Arai Y., Shikanai T., Doi Y., Yoshida S., Yamaguchi I., and Nakashita H., Production of Polyhydroxybutyrate by Polycistronic Expression of Bacterial Genes in Tobacco Plastid, *Plant Cell Physiol.*, **45**, 1176-1184, 2004.
26. Lossl A., Eibl C., Harloff H.J., Jung C., and Koop H.U., Polyester Synthesis in Transplastomic Tobacco (Nicotiana Tabacum L.): Significant Contents of Polyhydroxybutyrate are Associated with Growth Reduction, *Plant Cell Rep.*, **21**, 891-899, 2003.
27. Brown L.A. and Baker A., Peroxisome Biogenesis and the Role of Protein Import, *J. Cell. Mol. Med.*, **7**, 388-400, 2003.
28. Hahn J.J., Eschenlauer A.C., Sleytr U.B., Somers D.A., and Srienc F., Peroxisomes as Sites for Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Transgenic Plants, *Biotechnol. Progr.*, **15**, 1053-1057, 1999.
29. Arai Y., Nakashita H., Suzuki Y., Kobayashi Y., Shimizu T., Yasuda M., Doi Y., and Yamaguchi I., Synthesis of a Novel Class of Polyhydroxyalkanoates in Arabidopsis Peroxisomes, and Their Use in Monitoring Short-Chain-Length Intermediates of β-Oxidation, *Plant Cell Physiol.*, **43**, 555-562, 2002.
30. Wang Y., Yin J., and Chen G.Q., Polyhydroxyalkanoates, Challenges and Opportunities, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **30**, 59-65, 2014.
31. Anjum A., Zuber M., Zia K.M., Noreen A., Anjum M.N., and Tabasum S., Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) and Its Copolymers: A Review of Recent Advancements, *Int. J. Biol. Macromol.*, **89**, 161-174, 2016.