اصطناع البوليمير الحيوي بولي هيدروكسي بوتيرات "Poly Hydroxy Butyrate: PHB" من عشبة زهرة النيل

د. أحمد قره علي*
د. حسام الدين لايقه**
رئبال منى***

(تاريخ الإيداع 23 / 6 / 2020. قُبِل للنشر في 1 / 10 /2020)

□ ملخّص □

يركز هذا البحث على ناحية بيئة واقتصادية، حيث يعتمد على استخدام عشبة زهرة النيل الضارة كمادة فعالة في انتاج البوليمير الحيوي بولي هيدروكسي بوتيرات "polyhydroxybutyrate PHB" بواسطة البكتريا "*Bacillus subtilis*". تمت معالجة العينات وتهضميها لاستخلاص البوليمير بولي هيدروكسي بوتيرات (PHB) وذلك باستخدام طريقة الكلوروفورم. نفّذت بعض الاختبارات لتؤكد هوية هذا البوليمير كقياس درجة انصهار المنتج ودراسة المجموعات الوظيفية لـ PHB المستخلص باستخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء (FTIR).

بينت النتائج تطابق اختبارات البوليمير المستخلص من عشبة زهرة النيل مع اختبارات البوليمير PHB القياسي مما يبين أهمية هذا البحث في التوصل لطريقة للتخلص من هذا العشب الضار الذي يعد مشكلة بيئية وعبئ اقتصادي كبير عن طريق استثماره في انتاج البوليمير PHB الحيوي.

الكلمات المفتاحية: بولي هيدروكسي بوتيرات، زهرة النيل، *Bacillus Subtilis*، FTIR.

* أستاذ – قسم الكيمياء البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
** أستاذ مساعد – قسم الكيمياء البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
*** طالب دراسات عليا (دكتوراه) – قسم الكيمياء البحرية، المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

Synthesis of Bio-Polymer PolyHydroxyButyrate (PHB) from Water Hyacinth Weed

Dr. Ahmad Ibrahim Kara-Ali*
Dr. Hussam Eddin Laika**
Reabal Mona***

(Received 23 / 6 / 2020. Accepted 1 / 10 /2020)

□ ABSTRACT □

This research focuses on an environmental and economic aspect, as it depends on using the harmful water hyacinth weed as an effective material to product the biopolymer "polyhydroxybutyrate: PHB" by *Bacillus subtilis*.
The samples were processed and digested to extract the polymer polyhydroxybutyrate (PHB) using chloroform method. Some tests were carried out to confirm the identity of this polymer, such as measuring the melting point of the product and studying the functional groups of the extracted PHB using the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).
The results obtained by the extracted polymer from the water hyacinth weed showed conformity to the referential PHB polymer tests, which shows the importance of this research in determining a way to get rid of this harmful weed, which is an environmental problem and a large economic burden by investing it in the production of biopolymer PHB.

Keywords: polyhydroxybutyrate, water hyacinth, *Bacillus Subtilis*, FTIR.

* **Professor - High Institute of Marine Research, Tishreen University, Lattakia, Syria. E-mail: ahmadkaraali@gmail.com**
** **Associate Professor - High Institute of Marine Research, Tishreen University, Lattakia, Syria. E-mail: dr. hussameddin.laika@tishreen.edu.sy**
*** **Postgraduate Student (PhD) - Marine Chemistry Department, Higher Institute of Marine Research, Tishreen University, Lattakia, Syria. E-Mail: reabal87@gmail.com**

مقدمة:

تعد عشبة زهرة النيل من أسوأ الأعشاب المائية الضارة في العديد من دول العالم لأنها تدمر البيئات المائية وتكلف مليارات الدولارات كل عام من خسائر اقتصادية وتكاليف للتخلص منها، حيث تتواجد هذه العشبة في العديد من المسطحات المائية في سورية (النهر الكبير الشمالي، نهر العاصي، نهر الفرات، سد الأبرش، وغيرهم الكثير..) (الشكل 1) (Syria Trust for Development, 2019).

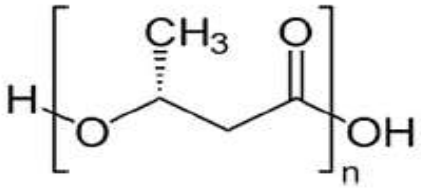
يشكل انتشار زهرة النيل مشكلة بيئية حقيقية نتيجة نموها وانتشارها السريع في الأنهار والبحيرات والسدود وقنوات الري وتجعلها راكدة وتستنزف المغذيات والأكسجين منها الأمر الذي يؤثر سلباً في نمو الكائنات الحية الأخرى، كما يقلل من جودة المياه عن طريق منع التمثيل الضوئي وهذا يخلق تأثيرات متتالية عن طريق الحد من الحياة تحت الماء. بالنتيجة، فإن هذا يحمل الدولة مجهوداً وتكاليف مادية كبيرة تزداد عاماً بعد عام وهذا ما بينته العديد من الدراسات العالمية (Gedefaw, 2018; Dersseh *et al.,* 2019).

الشكل 1: زهرة النيل تغطي كامل بحيرة سد محردة وتهدد بتوقف مجموعة ضخ المياه العائمة على سطح البحيرة التي تؤمن مياه التبريد اللازمة لعمل محطة توليد محردة

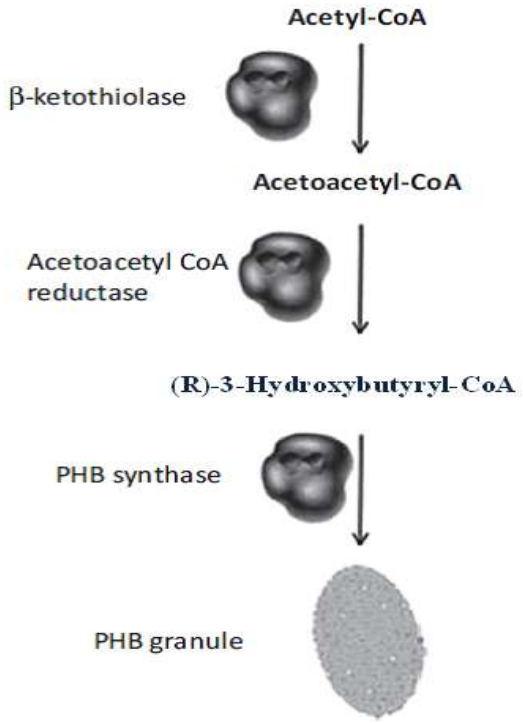
نظراً للطبيعة الليغنوسليلوزية لعشبة زهرة النيل والتي يمكن تحويلها إلى مصدر للكربون منخفض التكلفة لإنتاج البوليمير بولي هيدروكسي بوتيرات، والذي يعتبر مادة خام في صناعة البلاستيك القابل للتحلل الحيوي (Cherly Anto Frezina, 2013).

تم عزل وتوصيف البوليمير PHB لأول مرة في عام 1925 من قبل عالم الأحياء الدقيقة الفرنسي "Maurice Lemoigne"، على أنه بوليمر ينتمي إلى فئة البولي إستر ذات الاستخدامات الهامة والمتعددة مثل البلاستيك الحيوي القابل للتحلل، و من المعروف أن العديد من الكائنات الحية الدقيقة تُراكم PHB داخل خلاياها كمواد تخزين ضمن الخلايا كمصدر للكربون والطاقة. أما في الميكروبات فيحدث اصطناع PHB من خلال سلسلة من التفاعلات التي يتم تحفيزها بواسطة ثلاث إنزيمات؛ 3-ketothiolase، acetoacetyl-CoA reductase، PHB

synthase، حيث يتم تحفيز الخطوة الأولى بواسطة إنزيم 3–ketothiolase الذي يكثف acetyl–CoA لإعطاء acetoacetyl–CoA. يتم إرجاع هذا المركب الوسطي إلى 3–hydroxybutyryl–CoA عن طريق عامل مرجع مساعد NADPH (Nicotinamide Adenine DinucleotidePhosphate) التابع لـ acetoacetyl–CoA reductase، ثم يحفز الإنزيم PHB synthase بلمرة المونومير إلى PHB، (الشكل 2، 3) (; Jin *et al.*, 2012 Singh *et al.*, 2019).



الشكل 2: بنية البوليمير بولي هيدروكسي بوتيرات (Sindhu *et al.*, 2015)



الشكل 3: آلية الاصطناع الحيوي لـ PHB ضمن الخلايا البكتيرية (Sindhu *et al.*, 2015 ; Sharma, 2019)

يعتبر PHB بديل متجدد محتمل لبعض المواد البلاستيكية البتروكيماوية وذلك لأن خصائصه تشبه خصائص بعض المواد البلاستيكية المتاحة تجاريًا (Sudesh *et al.*, 2000)، فهو مشابه في خصائصه للبولي بروبلن (PP) المشتق من الوقود الاحفوري على الرغم من أن البوليميرين لهما تركيبان كيميائيان مختلفان تماماً، لكن PHB قابل للتحلل الحيوي بسرعة ويتأثر تركيبه بالسلالات البكتيرية وكذلك بالنوع والجودة والكمية النسبية لمصادر الكربون المزودة لوسط

النمو (Steinbuchel *et al.,* 2003). إضافة إلى ذلك، فإن PHB يتحلل هوائيا بالكامل إلى CO_2 وH_2O عن طريق الكائنات الحية الدقيقة (Anderson and Dawes, 1990).

إن طبيعة PHB الحيوية وقابليته للتحلل الحيوي سيكون لها فوائد طويلة الأمد في الحد من تراكم النفايات البلاستيكية والتلوث وظاهرة الاحتباس الحراري والاعتماد على الوقود الأحفوري، إضافةً لامتلاكه تطبيقات واسعة في العديد من المجالات، أبرزها: الزراعية والصناعية والطبية الحيوية المبتكرة (Song *et al.,* 1999).

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

تعتبر عشبة زهرة النيل مشكلة حقيقية في سورية نظراً للخسائر الاقتصادية الكبيرة في السيطرة عليها بالتالي فإن تحويل هذه العشبة الضارة إلى منتجات صديقة للبيئة يخفف من أعبائها البيئية من جهة والاقتصادية من جهة أخرى.

إنتاج البوليمير الحيوي PHB من زهرة النيل ليكون بديلاً متجدداً محتملاً لبعض المواد البلاستيكية البتروكيماوية، آمن للأنظمة البيئية، وبصورة خاصة البيئة البحرية. إضافةً إلى أن البلاستيك الحيوي يملك فوائد مضاعفة في حفاظه على الموارد الأحفورية، وخفض انبعاثات غاز ثنائي أكسيد الكربون إلى الثلثين مقارنة مع البلاستيك الصناعي خلال عملية الانتاج، مما يجعله ابتكاراً مهماً للتنمية المستدامة.

يمتلك PHB تطبيقات محتملة في العديد من المجالات: الصناعية، والزراعية. وبسب خاصية التحلل الهوائي الكامل لـPHB فهو يستخدم على نطاق واسع في المجالات الطبية الحيوية المبتكرة.

عادةً ما تشكل المواد الأولية ثلث التكلفة النهائية في عمليات الإنتاج، لذلك فإن توفر عشبة زهرة النيل بشكل شبه مجاني وعلى مدار العام أمر مهم جداً من الناحية الاقتصادية ويجعل أسعار منتجات PHB تنافسية مقارنة مع البوليميرات المنتجة من البترول.

أهداف البحث:

- ✓ اصطناع البوليمير الحيوي بولي هيدروكسي بوتيرات "PHB" من عشبة زهرة النيل وذلك باستخدام عزلات نقية من بكتريا "*Bacillus subtilis*".
- ✓ دراسة بعض خصائص البوليمير الناتج.

طرائق البحث ومواده:

جمع العينات:

تم جمع العينات من مجرى نهر العاصي في منطقة العشارنة – الصقيلبية – محافظة حماة، كما هو مبين في الشكل (4)، ونقلت إلى مختبر المعهد العالي للبحوث البحرية – اللاذقية لإجراء المعالجات اللازمة.

الشكل 4: انتشار عشبة زهرة النيل في مجرى نهر العاصي

تجهيز العينة:

غسلت أوراق زهرة النيل بالماء جيداً عدة مرات لإزالة الأوساخ ثم وضعت في المجفف عند الدرجة 70°C لمدة 24h وبعد ذلك تم طحنها إلى مسحوق ناعم (Pumiput *et al.,* 2008).

تحضير الركيزة:

وضع 20g من مسحوق زهرة النيل الجاف في أوتوغلاف عند 121°C لمدة 20 min بهدف تعقيم العينات، ثم وضعت العينة في 1000 ml ماء مقطر وسخنت حتى الغليان لمدة 30 min ليتثنى تخريب البنية النسيجية للنبات، والترشيح باستخدام قماش قطني.

أجريت المعالجة الحمضية وذلك بإضافة حمض كلور الماء بتركيز (1% HCl v/v) للعينة ثم وضعت في أوتوغلاف عند 121°C لمدة 20 min دقيقة وبعدها عدّل الوسط إلى pH = 7.2 وذلك باستخدام محلول NaOH وتم إزالة الراسب بالفلترة بورق ترشيح والاحتفاظ بالخلاصة (Pumiput *et al.,* 2008).

تحضير المزرعة البكتيرية:

نُشّطت عزلات نقية من بكتريا "*Bacillus subtilis*" المحضرة مسبقاً في مختبر المعهد العالي للبحوث البحرية باستخدام وسط مغذٍ عام "تيو" وذلك بحضنها لمدة 24h ساعة عند الدرجة 37 °C لاستخدامها في إنتاج PHB (Upadhayay *et al.,* 2019).

تم تحضير وسط مرق مغذٍ مكون من: (10g) غلوكوز و(5g) بيبتون و(3g) مستخلص الخميرة و(5g) كلوريد الصوديوم في (1000 ml) من خلاصة زهرة النيل، ثم تم تلقيح الوسط بـ 10% من المزرعة البكتيرية " *Bacillus subtilis*". ثم تم حضن الدورق في حاضن هزاز 150 rpm عند 37 °C مدة 72 h (Muralidharan and Radha, 2015).

استخلاص البوليمير "PHB":

تم فصل البكتريا عن الوسط بتثفيل المزرعة بجهاز الطرد المركزي عند 5000 rpm مدة 15 min عند الدرجة 25°C. تم التخلص من السائل وتركت الحبيبات المتبقية إلى اليوم التالي لتجفف، ثم وضعت الحبيبات المجففة في محلول هيبوكلوريت الصوديوم بحجم مساوٍ للحجم الأصلي لوسط الاستزراع، وحُضن المزيج عند الدرجة 30°C مدة 2h. تم تثفيل المحلول بجهاز الطرد المركزي عند 5000 rpm مدة 15 min. أزيل الوسط السائل وجمعت الحبيبات الناتجة، ثم غسلت الحبيبات بالماء المقطر مرتين وبالأسيتون للتخلص من أي أثر لمادة عضوية والماء. حُلّت الحبيبات في كلوروفورم مغلي وصُبَّ المحلول على صينية زجاجية معقمة وتُرِك ليتبخر المذيب عند درجة حرارة الغرفة للحصول على المنتج النهائي ثم حفظ عند الدرجة 4 °C كما هو مبين في الشكل (5) (Radhika and Murugesan, 2012).

الشكل 5: مسحوق PHB المستخلص من عشبة زهرة النيل

اختبار نقطة الانصهار

تم قياس نقطة انصهار البوليمير الناتج باستخدام جهاز تحديد نقطة انصهار "Stuart-melting point SMP 30". ضبطت عملية التسخين بدءاً من الدرجة 40 °C بمعدل ارتفاع في درجات الحرارة (10 °C / min)، وسجلت درجة حرارة بداية انصهار العينة (وهي نقطة الانصهار) ودرجة الحرارة عند الانصهار الكامل للعينة (Wellen *et al.,* 2015).

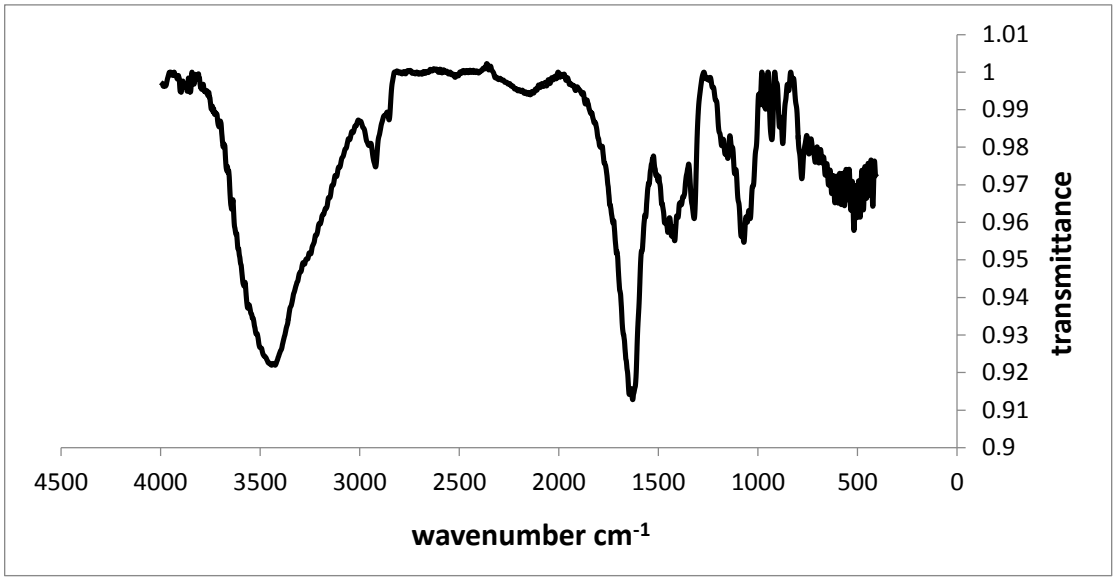
مطيافية الأشعة تحت الحمراء (FTIR)

استخدمت مطيافية الاشعة تحت الحمراء لتحديد المجموعات الوظيفية الموجودة في البوليمير، من أجل ذلك تم مزج 1 mg من العينة الجافة مع 10 mg من KBr الجاف النقي وحولت إلى حبيبات، وبعد ذلك تم قياس الكثافة النسبية لنقل طاقة الضوء مقابل الطول الموجي للامتصاص بين 400-4000 cm^{-1} (Pandiyan *et al.,* 2010).

النتائج والمناقشة:

دلَّ اختبار نقطة الانصهار أن نقطة انصهار البوليمير المستخلص هي 170 °C إلى 182 °C وهي مطابقة لنقطة انصهار البوليمير PHB مرجعياً 170 °C إلى 180 °C (Sindhu, *et al.,* 2015)، ويوضح هذا التطابق في نقطة انصهار أن البوليمير الناتج هو PHB (Wellen *et al.,* 2015).

تم تحديد المجموعات الوظيفية الموجودة في PHB المستخلص من زهرة النيل باستخدام جهاز التحليل الطيفي FTIR (الشكل 6).

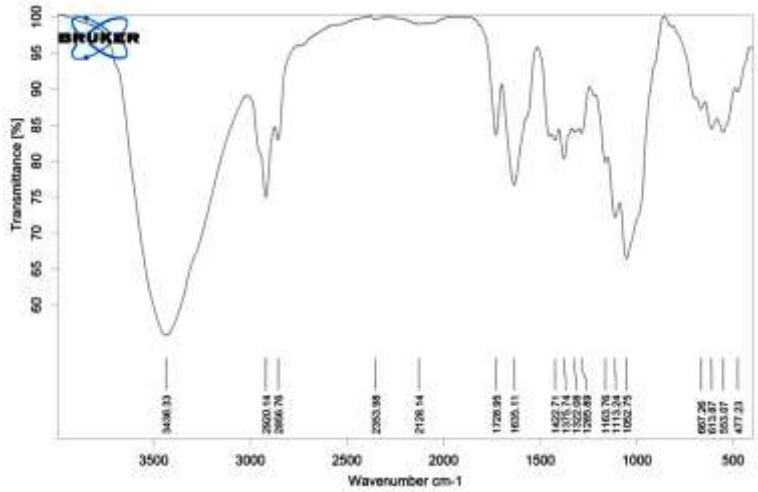


الشكل 6: طيف FTIR لجزيء PHB المستخلص من زهرة النيل

تم تسجيل طيف FTIR للمنتج في نطاق $400–4000\ cm^{-1}$، حيث يشير العدد الموجي للقيم الطيفية التي تم الحصول عليها إلى أن المنتج يملك بنية مشابهة لـ PHB المرجعي. يوضح طيف الـ FTIR وجود قمة امتصاص عند العدد الموجي $3442.779\ cm^{-1}$ وهي تشير إلى رابطة قوية وواسعة لامتطاط المجموعة الوظيفية OH– بين الجزيئات، وأما القمم عند $2935.022\ cm^{-1}$ و $2888.588\ cm^{-1}$ فهي تقابل الامتطاط C–H الناشئ من الألكان (Sandhya *et al.,* 2012).

يمثل طيف FTIR بين $1646.169\ cm^{-1}$ و $1725\ cm^{-1}$ امتطاط C=O قوي ناشئ من الكيتون الأليفاتي، كما توافق قمم الامتصاص عند $1456.189\ cm^{-1}$ و $1413.74\ cm^{-1}$ الرابطة C–H متوسطة القوة لمجموعة الميتيل، في حين تتوافق الرابطة عند القمة $1084.909\ cm^{-1}$ مع الامتطاط C–O القوي الناشئ من الإيتر الأليفاتي (Preethi *et al.,* 2015).

دلت هذه الدراسة أن طيف الاشعة تحت الحمراء للبوليمير الناتج يتطابق مع طيوف FTIR لـ PHB في دراسات السابقة، حيث يوضح الشكل (7) طيف الـ FTIR للبوليمير PHB القياسي.



الشكل 7: طيف FTIR لجزيء PHB مرجعي (Preethi *et al.,* 2015)

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1. تم الحصول على البوليمير PHB من زهرة النيل باستخدام البكتيريا *Bacillus subtilis*.

2. أظهرت النتائج تطابق نقطة انصهار البوليمير المستخلص مع جزيء PHB مرجعي.

3. إمكانية التخلص من عشبة زهرة النيل والتي تشكل مشكلة بيئية وعبئ اقتصادي كبير عن طريق استثمارها في انتاج البوليمير PHB الحيوي.

4. يعد البوليمير PHB الحيوي المستخلص من عشبة زهرة النيل ذو تكلفة منخفضة نتيجة انخفاض تكاليف المواد اللازمة لاستخلاصه مما يجعل أسعاره تنافسية مقارنة مع تكاليف اصطناع البوليميرات التقليدية.

التوصيات:

الاستمرار في مثل هذه الدراسات لما لها من أثر كبير في حل مشكلات بيئية كبيرة وإمكانية الاستفادة من ذلك في صنع مواد جديدة والاستفادة منها اقتصادياً.

References:

1. ANDERSON, A. J. and DAWES, E. A. *Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*. Microbiology Reviews, Vol. 54, N°. 4, 1990, pp. 450–472.

2. CHERLY ANTO FREZINA, N. *Assessment and Utilization of Water Hyacinth in the Water Bodies of Tamil Nadu*. International Journal of Scientific Research and Reviews, Vol. 2, N°. 1, 2013, pp. 58- 77.

3. DERSSEH, M. G. ; MELESSE, A. M. ; TILAHUN, S. A. ; ABATE, M. and DAGNEW, D. C. Water hyacinth: review of its impacts on hydrology and ecosystem services— Lessons for management of Lake Tana. Extreme Hydrology and Climate Variability, 2019, pp. 237-251.

4. GEDEFAW, E. *Socio Economic Impact Of Water Hyasion In Ethiopia For Lake Tana*. Senior Seminar On The Socio Economic Impacts Of Water Hyacinth Invasion In Ethiopia. College of Agriculture and Rural Transformation, Department of Agricultural Economics, Gondar, Ethiopia. 2019, pp. 38.

5. MURALIDHARAN, R. and RADHA, K.V. *A kinetic study of polyhydroxybutyrate production on nitrogen limited medium using Bacillus subtilis MTCC 9763 through a two stage cultivation strategy.* JEB, Vol. 36, 2015, pp: 537-542.

6. JIN, H.; SONG Z. and NIKOLAU B, J. *Reverse genetic characterization of two paralogous acetoacetyl CoA thiolase genes in Arabidopsis reveals their importance in plant growth and development*. Plant J., Vol. 70, 2012, pp: 1015–1032.

7. PANDIAN, S. R. ; DEEPAK, V. ; KALISHWARALAL, K. ; RAMESHKUMAR, N. ; JEYARAJ, M. and GURUNATHAN, S. *Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by Bacillus megaterium SRKP-3*. In Bioresource Technology, Vol. 101, 2010, pp: 705-711.

8. PREETHI, K.; VINEETHA, and UMESH, M. *Water Hyacinth: A Potential Substrate for Bioplastic (PHA) Production Using Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Applied Research, Vol. 1, No. 11, 2015, pp. 349-354.

9. PUMIPUT, P.; CHUNTRANULUCK, S.; KITPREECHAVANICH, V.; PUNSURON, V. and Vaithanomstat, P. *Production process of hydrolysate from steam explosion of oil trunk for xylitol fermentation*. Kasetsart journal (National Science). 2008; 42:73-78.

10. Radhika, D. and Murugesan, A.G. *Bioproduction, statistical optimization and characterization of microbial plastic (poly 3-hydroxy butyrate) employing various hydrolysates of water hyacinth (Eichhornia crassipes) as sole carbon source*. Bioresource Technology, Vol. 121, 2012, pp: 83–92.

11. SANDHYA, M.; ARAVIND, J. and KANMANI, P. *Production of polyhydroxyalkanoates from Ralstonia eutropha using paddy straw as cheap substrate.* International Journal of Environmental Science and Technology, Vol. 9, No. 4, 2012. DOI 10.1007/s13762-012-0070-6.

12. SHARMA, N. *Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria and its Application as Biodegradable Plastic in Various Industries*. Academic Journal of Polymer, Vol. 2, Issue 3, 2019.

13. SINGH, M. K.; RAI, P. K.; RAI, A.; SINGH, S. and SINGH, J. S. *Poly-β-Hydroxybutyrate Production by the Cyanobacterium Scytonema geitleri Bharadwaja under Varying Environmental Conditions*. Biomolecules, Vol. 9, 2019, pp. 198.

14. SINDHU, R.; BINOD, P. and PANDEY, A. *Microbial Poly-3-Hydroxybutyrate and Related Copolymers*. Industrial Biorefineries and White Biotechnology, 2015, pp. 575-605.

15. SONG, S.; HEIN, S. and STEINBUCHEL, A. *Production of poly(4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of Escherichia coli*. Biotechnology Letter, Vol. 21, 1999, pp. 193–197

16. STEINBÜCHEL, A. and LÜTKE-EVERSLOH, T. *Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms*. Biochemical Engineering Journal, Vol. 16, Issue 2, 2003, pp. 81–96.

17. SUDESH, K. ; ABE, H. and DOI, Y. *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters*, Progress in Polymer Science, Vol. 25, Issue 10, 2000, pp.1503–1555.

18. Syrian Trust for Development meeting, *Medicinal Plants And Investing Some Of Their Types*. Intervention of the Deputy Minister of Higher Education on the problem of the Water Hyacinth and considering it a governmental requirement, 2019.

19. Upadhayay, V.; Verma, S. and Kuila, A. *Production of poly hydroxy butyrate (PHB) from Eichhornia crassipes through microbial fermentation process*. Plant Science Today, Vol. 6(sp1), 2019, pp. 541-550.

20. Wellen, R. M. R.; Rabello, M. S.; Júnior, I. C. A.; Fechine, G. J. M. and Canedo, E. L. *Melting and crystallization of poly(3-hydroxybutyrate): effect of heating/cooling rates on phase transformation*. Polímeros, Vol. 25, No. 3, 2015, pp: 296-304