

مهندسی ژنتیک به عنوان رویکردی قدرتمند در تولید پلاستیک‌های زیستی

سارا ملکی^۱، اسمعیل نظامی آلانق^۲ و خدیجه باقری^{۱*}

^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

^۲ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین

Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

چکیده

گیاهان می‌توانند منبع پایداری برای تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs) از پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر فراهم کنند. پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها گروهی از پلیمرها با ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که به لحاظ کاربردی با بسیاری از پلاستیک‌های تولید شده با منابع نفتی موجود در بازار، برابری می‌کنند. برخلاف پلاستیک‌های تولید شده با منابع نفتی، PHA می‌تواند از مواد اولیه تجدید پذیر بدست آید و به راحتی در بیشتر محیط‌های فعال بیولوژیکی تجزیه گردد. از سوی دیگر مهندسی ژنتیک گیاهی برای محققین افق‌های جدیدی به‌منظور تولید مواد خام اولیه مورد نیاز برای پلاستیک‌های زیست‌تخریب‌پذیر مانند PHA فراهم کرده است. مطالعه حاضر به معرفی کوتاه پلیمرهای زیستی و مهندسی ژنتیک گیاهی به عنوان ابزاری مناسب برای تولید این مواد اولیه حائز اهمیت از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی می‌پردازد.

کلمات کلیدی: مهندسی ژنتیک گیاهی، بیوتکنولوژی گیاهی، گیاهان تراریخته، پلاستیک‌های زیستی، پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها (PHAs).

مقدمه

یکی از مواد مصنوعی که تولید آن روز به روز در انواع و کاربردهای مختلف در حال افزایش است، پلاستیک و ترکیبات پلاستیکی است. در ساخت پلاستیک بطور عمده از پلیمرهایی مانند پروپیلن، پلی اتیلن، پلی وینیل کلراید، پلی استر و غیره برای کاهش وزن و افزایش کیفیت در عین حال کاهش هزینه تولید آن مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۹، ۳۰). مصرف این ماده در جهان از دو دهه گذشته به طور چشمگیری در حال افزایش است. در جهان سالانه حدود ۳۰۰ میلیون تن پلاستیک تولید می‌شود که بالغ بر ۱۵۰ میلیون تن آن وارد آب‌ها و اقیانوس‌ها شده و سبب آلودگی‌های زیست محیطی شدیدی می‌شود (۱۹، ۹). بازیافت این مواد بدلیل آزادسازی گازها و بخارهایی حاوی سموم بسیار خطرناک منجر به بروز مشکلاتی برای سلامتی انسان از جمله بیماری‌های پوستی و ریوی می‌شود. همچنین پلاستیک که یکی از اصلی‌ترین آلاینده‌های محیط زیست و بهترین ساخته‌های دست بشر محسوب می‌شود؛ هم‌اکنون به مشکل بزرگی برای محیط زیست و بشر امروزی تبدیل شده و زباله‌های پلاستیکی به جا مانده از محصولات غذایی همواره یک معضل بزرگ بوده است (۱۱، ۹).

با توجه به این‌که منابع فسیلی رو به کاهش است، تمایل صنعت نیز برای تولید پلاستیک‌های زیستی رو به افزایش است. حدود ۴ درصد از نفت تولیدی جهان برای تبدیل پلاستیک‌ها جهت مصارف عمومی از کیسه‌های پلاستیکی خرید گرفته تا قطعات تزئینی خودروها، استفاده می‌شود. چند درصد از منابع نفتی نیز صرف تامین مقدار قابل توجهی انرژی برای تولیدات پلاستیکی می‌شود (۲۸، ۵). سوزاندن سوخت باعث افزایش انتشار گازهای گلخانه‌ای مثل دی‌اکسیدکربن می‌شود. همچنین به‌طور طبیعی انتشار گاز دی‌اکسیدگوگرد نیز افزایش می‌یابد که این گاز باعث تولید باران اسیدی می‌شود که موجب نگرانی است (۲۱، ۱۷، ۶). تولید پلاستیک‌های زیستی در گیاه تراریخته برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ توسط پیوریر و همکارانش در *Arabidopsis thaliana* صورت گرفت (۱۸، ۲۵). بطور کلی خانواده پلاستیک‌های زیستی به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

- ۱- پلاستیک‌هایی که تمام یا قسمتی از آنها منشا زیستی دارند ولی غیر قابل تجزیه‌اند مانند PE (polyethylene) و PET (polyethylene terephthalate).

موجودات زنده به زیر واحدهای سازنده خود تجزیه شده و بنابراین در محیط باقی نمی ماند (۳۲،۶). پلیمرهای زیست تخریب پذیر زیادی شناسایی شده اند و یکی از مهمترین آنها پلی-هیدروکسی آلکانوات (PHA) استفاده از این گروه پلیمرهای زیست تخریب پذیر در کشاورزی و صنایع دارویی و غیره بسیار مورد توجه قرار گرفته است که دلیل آن سازگاری با محیط زیست و سامانه های حیاتی است. پلی هیدروکسی آلکانوات ها، پلیمرهای زیست تخریب پذیر هستند و به صورت ذرات درون سلولی در میکروارگانیسم های مختلف تشکیل می شوند. وزن مولکولی این پلیمرها در محدوده 2×10^5 تا 3×10^6 دالتون است. وزن مولکولی بر حسب نوع میکروارگانیسم و شرایط رشد تغییر می کند (۳۲). پلی-هیدروکسی آلکانوات دارای هموپلیمرهای بسیاری از جمله پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) (Polyhydroxybutyrate)، پلی-هیدروکسی والرات (polyhydroxyvalerate) و پلی هیدروکسی-اکتانوات (PHO) (polyhydroxyoctanoate) است که PHB یکی از مهمترین پلی-هیدروکسی آلکانوات ها به حساب می آید (۱۰،۸). PHB یک پلیمر خطی از ۳-

۲- پلاستیک هایی که زیست تخریب پذیرند و همچنین منشا زیستی دارند مثل PHA (polyhydroxyalkanoate) و PLA (polylactic acid).

۳- پلاستیک هایی که برگرفته از منابع فسیلی هستند ولی زیست تخریب پذیرند مانند PBAT (polybutyrate adipate terephthalate) (۲۸،۶).

پیشرفت در مهندسی ژنتیک گیاهی، به همراه نگرانی رو به رشد در مورد محیط زیست و کاهش ذخایر نفت، فرصت های جدیدی برای استفاده از گیاهان به عنوان بیوراکتور برای تولید پلیمرهای تجدیدپذیر و سازگار با محیط زیست مانند پلی هیدروکسی آلکانوات ها ایجاد کرده اند (۳۵،۳۱).

هدف از این مطالعه معرفی و آشنایی با پلاستیک های زیست تخریب پذیر تولید شده در گیاهان تراریخته توسط مهندسی ژنتیک است که دارای تمامی قابلیت های پلاستیک ولی فاقد زیان های زیست محیطی است که به منظور کمک به حل مشکلات زیست محیطی و نیز مدیریت مشکلات زباله تولید شده است.

انواع پلیمرهای زیست تخریب پذیر واژه زیست تخریب پذیر (Biodegradable) به معنی موادی است که به سادگی توسط فعالیت

برای پلیمرهای مشتق شده از مواد نفتی معرفی می‌کند (۳۴). بسیاری از گونه‌های میکروارگانیسم اعضای خانواده *Halobacteriaceae* قادر به تولید PHA هستند. تاکنون بیش از ۳۰۰ گونه از این میکروارگانیسم‌ها شناسایی شده و تعداد آن مرتبا در حال افزایش است (۲۲). باکتری‌ها قادر به سنتز طیف وسیعی از ترکیبات PHA هستند و تقریباً ۱۵۰ ترکیب متفاوت از پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها تاکنون شناسایی شده است. مطالعات بیوتکنولوژی نشان داده‌اند، وقتی باکتری تحت شرایط تعدیل شده‌ای از مواد غذایی که تنها به لحاظ یک ماده مغذی اصلی محدود شده است ولی دارای منابع غنی از کربن است، قرار می‌گیرد، پلیمرهای زیستی تولید می‌کند (۲). پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها که از سلول‌های باکتری‌ها گرفته می‌شوند دارای ویژگی‌های مشابه با پلاستیک‌های متداول نظیر پلی‌پروپیلن هستند (۳۰). پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها را براساس نوع مونومر به دو دسته می‌توان تقسیم کرد. دسته اول پلیمرهایی با زنجیره کوتاه هستند که دارای ۳ تا ۵ اتم کربن بوده و ترد و شکننده هستند. دسته دوم، پلیمرهایی با زنجیره متوسط که دارای ۶ تا ۱۴ اتم کربن بوده و دارای خاصیت الاستیکی هستند (۱۷، ۱۴) (شکل ۱).

هیدروکسی بوتیرات است و در اندازه‌های مختلفی از ذرات در داخل سلول موجود است. PHB به‌عنوان یک منبع ذخیره انرژی و کربن برای میکروارگانیسم است و تحت شرایطی مثل محدودیت نیتروژن، فسفر، اکسیژن، یون‌ها و غیره در داخل سلول تجمع می‌یابد و با رفع این محدودیت‌ها PHB تجزیه می‌شود. PHB جامد به‌عنوان یک پلی استر ترموپلاستیک زیست تخریب‌پذیر مورد توجه قرار گرفته است زیرا خواص شبیه به خواص تعداد زیادی از پلاستیک‌های سنتزی معمولی دارد (۲۸، ۳۵).

ویژگی‌های پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها PHB دارای خواص فیزیکی و شیمیایی شبیه به پلی اتیلن و پلی پروپیلن است و مانند پلاستیک‌های معمولی در زمینه‌های متعددی قابل استفاده است. به‌عنوان مثال می‌توان آن را قالب‌ریزی کرد، توسط پرکن‌های غیر آلی تقویت کرد، به صورت رشته‌هایی به هم تابید یا به شکل ورق درآورد و دارای خواص آب-بندی عالی است (۱۲، ۸).

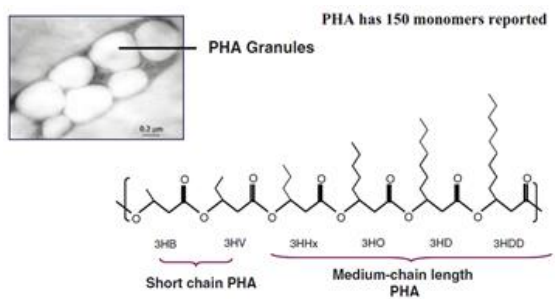
طی دو دهه گذشته پلی‌هیدروکسی آلکانوات‌ها بطور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. آنها قابل تجزیه و سازگار با محیط‌زیست بوده و از منابع تجدیدپذیر قابل دسترسی هستند. این ویژگی‌ها، آنها را بعنوان جایگزینی مناسب

(ketothiolase, استواستیل کوانزیم آ ردوکتاز) و PHA سنتتاز هستند که بترتیب توسط ژن-های *phaA*، *phaB* و *phaC* کد می‌شوند (۵).

باکتری *Ralstonia eutropha* مسئول این مسیر است. مسیر مربوط به تجزیه PHA شامل آنزیم‌های PHA دپلیمراز، هیدرولاز، هیدروکسی بوتیرات دهیدروژناز و استواستیل-کوانزیم آ در تعدیل سنتز و تجزیه PHA مشارکت می‌کند (۵). این مسیر در

استرین‌های باکتریایی *Rhodospirillum rubrum*، *Alcaligenes (A. eutrophus)*، *Klebsiella (K. Escherichia coli)*، *Nocardia aerogenes* and *K. oxytoca*، *Pseudomonas (p. (N. corallina) putida)* (۲۰).

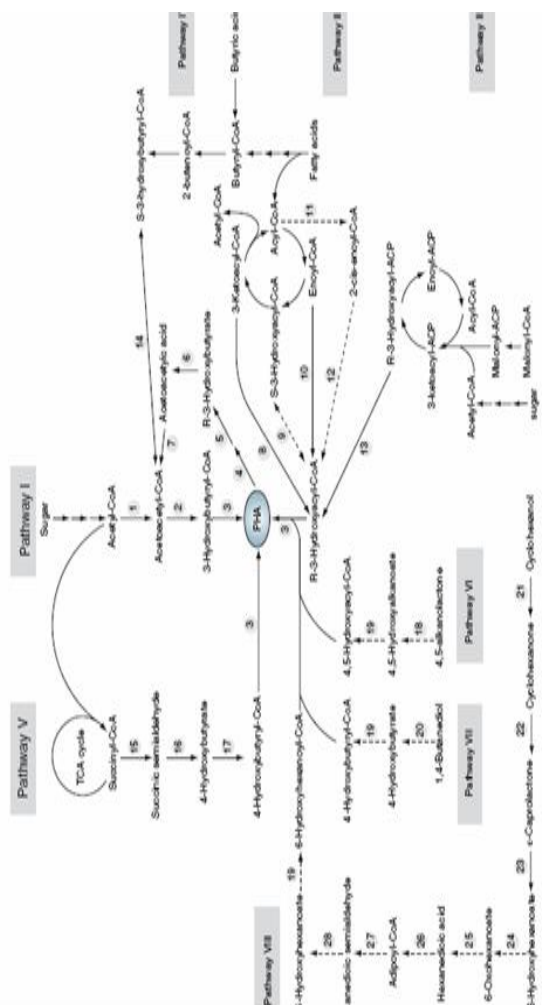
یکی از اصلی‌ترین پلیمرهای زیستی از خانواده PHA، PHB است که نحوه سنتز آن به شکل مجزا در شکل ۳ آورده شده است. باکتری *Ralstonia eutropha* می‌تواند PHB را از گلوکز سنتز کند و آن را بعنوان گرانول-های مجزا ذخیره کند (۲، ۳۰).



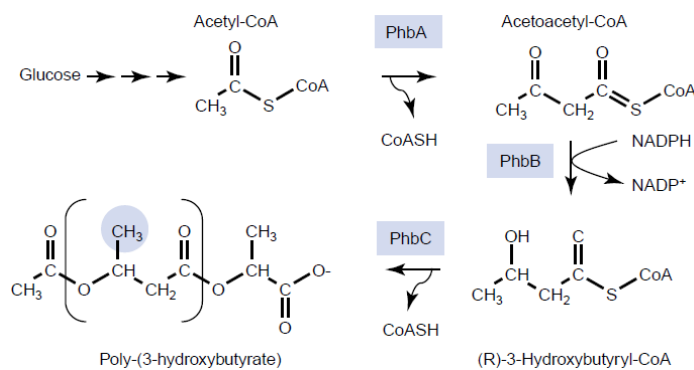
شکل ۱. ساختار مونومرهای PHA

PHA در فرایند بیولوژیکی هوازی و در محدوده دمایی 60°C و رطوبت ۵۵٪ به کمپوست تبدیل می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است که در فرایند دفن بهداشتی، ۸۵ درصد PHA تجزیه می‌شود. پلی هیدروکسی آلکانوات‌ها از گستره وسیعی از مواد اولیه همچون منابع تجدیدپذیر (ساکاروز، نشاسته، سلولز) و منابع فسیلی (متان، نفت خام، لیگنیت)، محصولات فرعی (ملاس، آب پنیر، گلیسرول)، اسیدهای آلی مثل (اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید بوتیریک) و دی-اکسیدکربن قابل دسترسی هستند (۱۷).

بیوسنتز PHA در هشت مسیر خلاصه می‌شود (شکل ۲) که ژن‌ها و آنزیم‌های مسیر شماره یک به گیاهان انتقال داده می‌شود. اولین مسیر شامل سه آنزیم کلیدی β -کتوتیولاز- β



شکل ۲- مسیر سنتز PHA



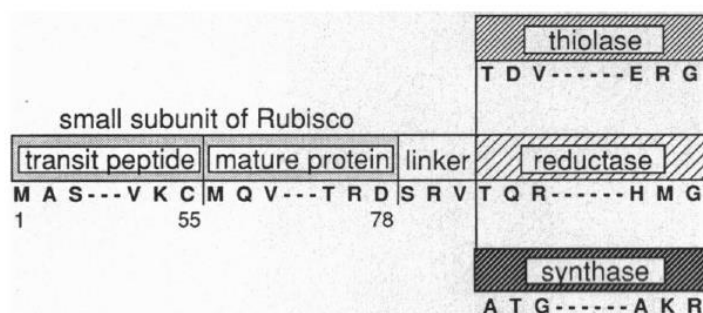
شکل ۳- مسیر بیوسنتز PHB

تولید پلیمر زیستی در گیاهان

"ملکی و همکاران، مهندسی ژنتیک به عنوان رویکردی قدرتمند ..."

جهت کد کردن ژن‌های *phb* (استخراج شده از باکتری *Alcaligenes eutrophus*) برای ورود به پلاستید گیاه *Arabidopsis thaliana* سه آنزیم باکتریایی ضروری برای تولید PHB (β -کتوتیولاز، استواستیل کوآنزیم آ ردوکتاز و PHB سنتتاز)، به قطعه دی.ان.ای کدکننده پپتید انتقالی زیر واحد کوچک ریبولوز بیس-فسفات کربوکسیلاز نخود فرنگی، متصل شدند (شکل ۴). برای بیان بهتر ژن‌ها در گیاه، نواحی کد کننده اصلاح شده با پروموتور ویروس موزاییک کلم 35S واقع در وکتور دوگانه پلاسمید Ti-pBI121 ادغام شد و در نتیجه سازه pBI-TP-Red، pBI-TP-Thio و pBI-TP-Syn حاصل شد. سه مجموعه از لاین‌های آراییدوپسیس تراریخته با تراریختن در داخل این وکتورها ایجاد شد که در هر کدام تنها یکی از سه سازه ژنی بیان می‌شد.

در سال ۱۹۹۲ محققان ژن‌های لازم برای تولید پلاستیک را از باکتری استخراج کرده و آن‌ها را به گیاه آراییدوپسیس انتقال دادند و اولین پلیمر گیاهی را تولید کردند. ولی با توجه به اینکه در سیتوپلاسم برگ سنتز PHA به میزان بسیار کمی صورت می‌گرفت؛ دانشمندان بر آن شدند تا اندام مورد هدف را محدود به پلاستیدها کنند. به دلیل وجود مقدار زیاد استیل کوآنزیم آ جهت سنتز و ذخیره اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه مورد نیاز گیاه، و در دسترس بودن ترکیبات و آنزیم‌های مورد نیاز ساخت پلیمر در پلاستیدها، می‌توانند محل بسیار مناسبی برای تولید پلیمرهای زیستی در داخل گیاهان باشند (۲۵،۲۱) که در زیر روند و مراحل کارهای صورت گرفته به اختصار آورده شده است:



شکل ۴- شماتیکی از اتصال توالی‌های اسیدآمینه‌های پپتید انتقالی و *Phb* برای تولید PHB در گیاهان تراریخته آراییدوپسیس

بین گیاهان وحشی و گیاهان تراریخته تولید کننده PHB هیچ تفاوتی در میزان جوانه‌زنی بذر آنها مشاهده نشد. با این حال، گیاهانی که دارای بیش از ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکروگرم PHB بازای هر گرم وزن تر آنها، هستند از نوع وحشی قابل تمایزند (۲۵). با توجه به این‌که کلروپلاست‌ها مکان اصلی فتوسنتز در گیاهان هستند، سنتز پلیمرهای زیستی در آنها موجب ممانعت از فتوسنتز که موتور اصلی متابولیسم گیاهی است، می‌شود و در نتیجه سبب به تاخیر انداختن رشد و کاهش عملکرد گیاه می‌شود (۳۶). در سایر گیاهان مانند تنباکو، پنبه، کتان، یونجه، صنوبر نیز جهت تولید پلیمرهای زیستی تحقیقاتی انجام شده است که در جدول (۱) درباره اندام مورد هدف تولید پلیمر و میزان پلیمر تولید شده و نیز اثرات ژن‌های انتقال‌یافته بر رشد آنها بیان شده است. در همه آنها از پروموتور ویروس موزاییک کلم 35S بعنوان پیش‌برنده ژن‌های تولید کننده PHA و PHB استخراج شده از باکتری *Alcaligenes eutrophus* استفاده شده است.

برای ایجاد لاین‌های گیاهی که شامل هر سه آنزیم PHB باشند، تلاقی‌های جنسی انجام شد. لاین تراریختی که میزان بالای استواستیل کوآنزیم آ ردوکتاز را بیان می‌کرد با گیاهان تراریختی که در آنها میزان بالای PHB سنتتاز بیان می‌شد، دگرگشن شدند. سپس دگرگشنی بین گیاهان دورگ حاصل (TP-Red/TP-) و گیاهان تراریخته دارای میزان بالای تیولاز انجام گرفت. میزان PHB تولید شده در دورگ‌های حاصل با آنالیزهای کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرم (GC-MS) حدود ۲۰ تا ۷۰۰ میکروگرم بازای هر گرم وزن تر، تشخیص داده شد. پروتئین‌های بیان شده توسط لاین‌های تراریخته با استفاده از آنتی-بادی‌های پروتئین‌های باکتریایی به عنوان کاوشگر برای وسترن بلات ژل SDS/ پلی-اکریل‌آمید حاوی عصاره شفاف‌شده هر کدام از لاین‌های تراریخته، شناسایی شدند. وزن مشخص آنزیم‌های PHB تجزیه شده روی وسترن بلات نشان داد که آنزیم‌های مورد انتظار به درستی در پلاستیدها مورد هدف واقع شده‌اند. آنالیز نورترن بلات آر.ان.ای حاصل از لاین‌های تراریخته حاوی کاوشگر با ژن‌های *phb* نشان داد که میزان نسبی mRNA برای هر ژن با میزان پلی‌پپتیدهای تشخیص داده شده توسط وسترن بلات مطابقت داشت.

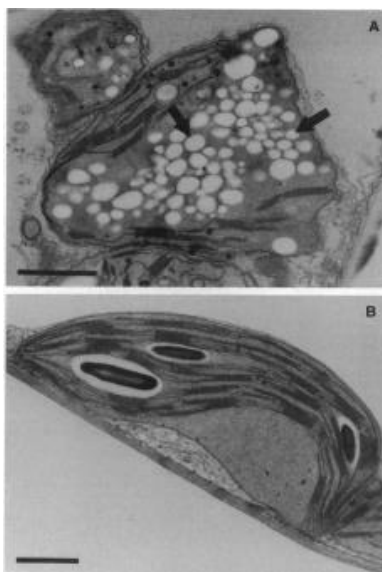
"ملکی و همکاران، مهندسی ژنتیک به عنوان رویکردی قدرتمند ..."

جدول ۱- گیاهان تراریخته شده به منظور تولید پلیمرهای زیستی

| گیاه مورد آزمایش | اندام مورد هدف | میزان تولید (dwt) | ویژگی‌های گیاه تراریخت | رفرنس |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|---|------------------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | سیتوپلاسم برگ | ٪ ۰/۱ | بازماندن از رشد (کوتاه ماندن) | Poirier et al., 1992 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | پلاستید | ٪ ۱۴ | کلرزگی خفیف در برگ‌های حاوی PHB بالا | Nawrath et al., 1994 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | پلاستید | ٪ ۱۳ | کاهش رشد شدید و کلرزگی | Valentin et al., 1999 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | پلاستید | ٪ ۴۰ | کاهش رشد شدید و کلرزگی | Bohmert et al., 2000 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | سیتوپلاسم | ٪ ۰ | — | Nawrath et al., 1995 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | سیتوپلاسم | ٪ ۰/۰۰۱ | — | Nakashita et al., 1999 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | پلاستید | ٪ ۰/۰۹ | — | Arai et al., 2001 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | پلاستید | ٪ ۰/۳۲ | — | Bohmert et al., 2002 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | پلاستید | ۴۰۰ ppm | کاهش رشد و نر عقیمی | Lössl et al., 2003 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | پلاستید | ٪ ۰/۱۴ | — | Lössl et al., 2005 |
| <i>Brassica napus</i> | پلاستید | ٪ ۹ | — | Valentin et al., 1999 |
| <i>Gossypium hirsutum</i> | سیتوپلاسم | ٪ ۰/۰-۰۰۳/۰۳۴ | گیاهانی نرمال با ظرفیت گرمایی و سرمایی بالا | John and Keller, 1996 |
| <i>Medicago sativa</i> | پلاستید | ٪ ۱/۸ | گیاهانی نرمال بدون باز ماندن از رشد | Saruul et al., 2002 |
| <i>Linum usitatissimum</i> | پلاستید بافت ساقه | ٪ ۰/۵ | کاهش رشدی نسبی با میزان تولید بذر دو برابر گیاه نرمال | Bohmert et al., 2000 |
| <i>Populus tremula</i> | پلاستید | ٪ ۳ | — | Dalton et al., 2012 |

گرانول‌های باکتریایی هستند. البته احتمال عدم تمایز این دانه‌ها با دانه‌های نشاسته با بررسی شکل ظاهری آنها از بین می‌رود؛ بدین صورت که دانه‌های نشاسته منفرد هستند و لایه الکترونی متراکمی که آنها را فرا می‌گیرد شکل بیضوی بخود می‌گیرد (شکل B-۵) در حالی که دانه‌های پلیمری دارای توده دایره‌ای از ابر الکترونی است (۲۶،۲۵).

روش تشخیص و استخراج پلیمر از گیاهان تراریخته با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) می‌توان پلیمر تجمع یافته را به شکل توده‌ای از گرانول‌ها در نمونه‌های برگ‌گی تراریخته شده مشاهده کرد (شکل A-۵) که این گرانول‌ها به لحاظ ظاهری بسیار شبیه



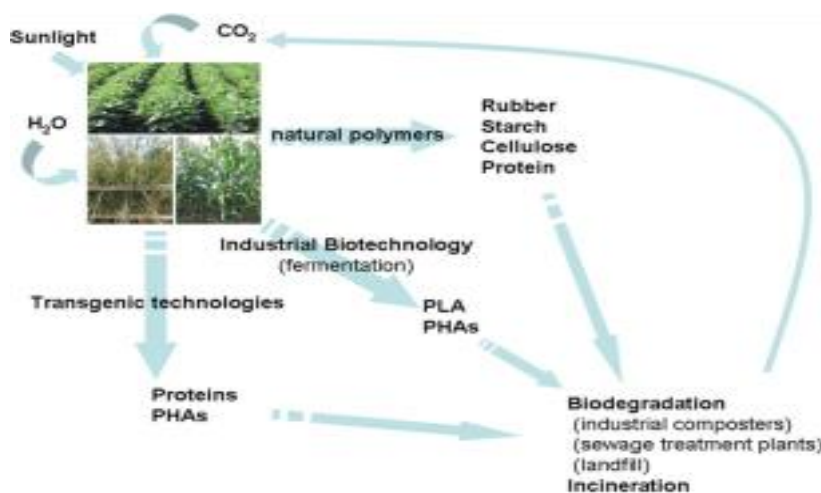
شکل ۵- بررسی با میکروسکوپ الکترونی. (A) اجتماع گرانول‌های PHB در کلروپلاست سلول‌های مزوفیل برگ در گیاه تراریخته. (B) بررسی سلول‌های مزوفیل برگ گیاه غیر تراریخته.

پلاستیک‌های زیستی در طبیعت براحتی توسط فعالیت میکروارگانیسم‌هایی مثل باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها تجزیه می‌شوند. طی فرایند تجزیه این پلیمرها CO_2 ، آب و ترکیبات غیر آلی بدست می‌آید که هیچ نوع اثر تخریبی بر محیط زیست و سایر موجودات زنده ندارد و هیچ نوع مواد سمی و مضر در طبیعت آزاد نمی‌شود (شکل ۶) (۲۱).

همچنین می‌توان از رنگ‌های فلوروسنتی برای تشخیص حضور گرانول‌های پلیمر در برگ‌های تراریخته استفاده کرد (۷). جهت تعیین میزان گرانول‌های پلیمری از کروماتوگرافی گازی و آنالیزهای کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی و نیز اسپکتوفتومتری صورت می‌گیرد (۷، ۲۹).

نحوه تجزیه پلاستیک زیستی در طبیعت

"ملکی و همکاران، مهندسی ژنتیک به عنوان رویکردی قدرتمند ..."



شکل ۶- چرخه تولید و تجزیه پلاستیک‌های زیستی

References

منابع مورد استفاده

- 1) Arai, Y., Nakashita, H., Yoshiharu, D. and Yamaguchi, I.(2001). Plastid targeting of polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway in tobacco. *plantbiotechnology*. 18:289-293.
- 2) Avérous, L. and Pollet, E. (2012). Environmental Silicate Nano-Biocomposites. *Green Energy Technology*. 50. Springer. doi:10.1007/978-1-4471-4108-2.
- 3) Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R.N. and Willmitzer, L. (2000). Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight. *Planta*. 211: 841-845. doi:10.1007/s004250000350
- 4) Bohmert, K., Balbo, I., Steinbu, A., Tischendorf, G., Willmitzer, L., Steinbüchel, A., Tischendorf, G., Willmitzer, L., Steinbu, A., Tischendorf, G., Willmitzer, L. and Steinbüchel, A. (2002). Constitutive Expression of the β -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants. A Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. *Plant Physiology*. 128:1282-1290. doi:10.1104/pp.010615
- 5) Chen, G.Q. (2010). Industrial Production of PHA. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. 14:121-132. doi:10.1007/978-3-642-03287
- 6) Chen, Y.J. (2014). Bioplastics and their role in achieving global sustainability. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 6: 226-231.
- 7) Dalton, D.A., Murthy, G. and Strauss, S. (2012). Bioplastic Production by Transgenic Poplar. *ISB News Report*. 4-7.
- 8) Endres, H. and Siebert-raths, A. (2011). Basics of PHA. *Bioplastics Mag*. 6: 42-45.
- 9) Gourmelon, G., Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K. and Aiello, C. (2015). Global Plastic Production Rises, Recycling Lags. *Rev. Tcnocientifica URU* 1-7. doi:2244-775X
- 10) Green, J. (2012). Report Topic: PLA and PHA biodegradation in the marine environment. *CalRecycle: California Department of Resources Recycling and Recovery*. 38.

- 11) Hopewell, J., Dvorak, R. and Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364:2115–2126. doi:10.1098/rstb.2008.0311
- 12) Jendrossek, D. and Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*. 16: 2357–2373. doi:10.1111/1462-2920.12356
- 13) John, M. and Keller, G. (1996). Metabolic pathway engineering in cotton: biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:12768–12773. doi:10.1073/pnas.93.23.12768
- 14) Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A. and Lant, P. (2014). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*. 39:397–442. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.06.008
- 15) Lössl, A., Bohmert, K., Harloff, H., Eibl, C., Mühlbauer, S. and Koop, H. (2005). Inducible trans-activation of plastid transgenes: Expression of the *R. eutropha* *phb* operon in transplastomic tobacco. *Plant Cell Physiology*. 46:1462–1471. doi:10.1093/pcp/pci157
- 16) Lössl, A., Eibl, C., Harloff, H.J., Jung, C. and Koop, H.U. (2003). Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with growth reduction. *Plant Cell Report*. 21:891–899. doi:10.1007/s00299-003-0610-0
- 17) Madison, L.L. and Huisman, G.W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63:21–53.
- 18) Mat Yunus, A.M., Ahmad Parveez, G.K. and Ho, C.L. (2008). Review: Transgenic plants producing polyhydroxyalkanoates. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 16:1–10.
- 19) McKinsey and Co. (2016). Rethinking the future of plastics. *Sustain. Resour. Product*.
- 20) Mitsky, T. (2016). Faculty Publications from the Center for Plant Science Innovation.
- 21) Mooney, B.P. (2009). The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochemical Journal*. 418:219–232. doi:10.1042/bj20081769
- 22) Muzaiyanah, A.R. and Amirul, A.A. (2013). Studies on the microbial synthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates containing 4-hydroxyvalerate using Valerolactone. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170:1194–1215. doi:10.1007/s12010-013-0247-6
- 23) Nakashita, H., Arai, Y., Yoshioka, K., Fukui, T., Doi, Y., Usami, R., Horikoshi, K. and Yamaguchi, I. (1999). Production of Biodegradable Polyester by a Transgenic Tobacco. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 63:870–874. doi:10.1271/bbb.63.870.
- 24) Nawrath, C., Poirier, Y. and Somerville, C. (1995). Plant polymers for biodegradable plastics: Cellulose, starch and polyhydroxyalkanoates. *Molecular Breeding*. 1:105-122. doi:10.1007/BF01249696.
- 25) Nawrath, C., Poirier, Y. and Somerville, C. (1994). Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:12760–12764. doi:10.1073/pnas.91.26.12760.
- 26) Poirier, Y. (1999). Production of new polymeric compounds in plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 10:181–185. doi:10.1016/S0958-1669(99)80032-9.

- 27) Poirier, Y., Dennis, D.E., Klomparens, K. and Somerville, C. (1992). Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science (New York, N.Y.)*. 256:520–3. doi:10.1126/science.256.5056.520.
- 28) Roland-Holst, D., Triolo, R., Heft-Neal, S. and Bayrami, B. (2013). Bioplastics in California: Economic assessment of market conditions for PHA/PHB bioplastics produced from waste methane. *California Department of Resources Recycling and Recovery* September 10:1-82.
- 29) Saruul, P., Srienc, F., Somers, D. and Samac, D. (2002). Production of a biodegradable plastic polymer, polyhydroxybutyrate, in transgenic alfalfa. *Crop Science*. 42:919–927. doi:10.2135/cropsci2002.0919.
- 30) Scheller, J. and Conrad, U. (2005). Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:188–196. doi:10.1016/j.pbi.2005.01.010.
- 31) Snell, K.D., Singh, V. and Brumbley, S.M. (2015). Production of novel biopolymers in plants: Recent technological advances and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*. 32:68–75. doi:10.1016/j.copbio.2014.11.005.
- 32) Somleva, M.N., Peoples, O.P. and Snell, K.D. (2013). PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops. *Plant Biotechnology Journal*. 11:233–252. doi:10.1111/pbi.12039.
- 33) Valentin, H.E., Broyles, D.L., Casagrande, L.A., Colburn, S.M., Creely, W.L., Delaquil, P.A., Felton, H.M., Gonzalez, K.A., Houmiel, K.L., Lutke, K., Mahadeo, D.A., Mitsky, T.A., Padgett, S.R., Reiser, S.E., Slater, S., Stark, D.M., Stock, R.T., Stone, D.A., Taylor, N.B., Thorne, G.M., Tran, M. and Gruys, K.J. (1999). PHA production, from bacteria to plants, in: *International Journal of Biological Macromolecules*. 25:303–306. doi:10.1016/S0141-8130(99)00045-8
- 34) Wang, Y., Yin, J. and Chen, G.Q. (2014). Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*:30, 59–65. doi:10.1016/j.copbio.2014.06.001
- 35) Yokoo, T., Matsumoto, K., Ooba, T., Morimoto, K. and Taguchi, S. (2015). Enhanced poly(3-hydroxybutyrate) production in transgenic tobacco BY-2 cells using engineered acetoacetyl-CoA reductase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 79:986–988. doi:10.1080/09168451.2014.1002448.
- 36) Zapalska, M and Kowalczyk, K. (2013). The use of transgenic plants for the development of selected bioproducts achievements of the polish scientists. *Acta scientiarum polonorum hortorum cultus*. 12:183–195.

Plant genetic engineering as powerful approaches in bioplastic production

Sara Maleki¹, Esmail Nezami-Alanagh², Khadijeh Bagheri^{1*}

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Zanjan University, Iran

2- Department of Biotechnology, Imam Khomeini International University (IKIU), Ghazvin, Iran

Bagheri.khadijeh@znu.ac.ir

Abstract

Plants can provide a sustainable supply of biodegradable plastics by means of (polyhydroxyalkanoate) PHAs production. PHAs are a class of polymers with some unique properties which make them functionally equivalent to many of the petroleum-based plastics that are currently in the market place. However, unlike most petroleum-derived plastics, PHAs can be attained from renewable feedstocks and easily degrade in most biologically active environments. Plant genetic engineering, on the other hands, has provided researches to new insights towards large scale for raw materials productions required for biodegradable plastics such as PHAs. This review highlights a brief introduction to biodegradable polymers and plant genetic engineering as proper alternative tools for production of these economically important raw materials.

Keywords: Plant genetic engineering, Plant biotechnology, Transgenic plants, Bioplastics, poly hydroxyl alkanooate (PHAs).