

**BIOSINTESIS DAN PENCIRIAN KOPOLIMER POLI(3-HIDROKSIBUTIRAT-
ko-4-HIDROKSIBUTIRAT) DARIPADA *CUPRIAVIDUS* sp. USMAA1020**

oleh

AMIRUL AL-ASHRAF BALAKRISHNAN BIN ABDULLAH

**Tesis yang diserahkan untuk memenuhi
keperluan bagi Ijazah Doktor Falsafah**

Januari 2007

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Penyayang Lagi Maha Pengampun Setinggi-tinggi kesyukuran dipanjatkan ke hadrat Ilahi kerana dengan limpah kurniaNya, saya dapat menyiapkan penyelidikan dan juga tesis ini.

Jutaan terima kasih saya tujukan kepada penyelia saya, Profesor Dato' Mohamed Isa Abdul Majid dan Profesor Madya Dr. Mohd. Azizan Mohd. Noor atas tunjuk ajar dan nasihat yang berguna sepanjang saya menjalankan projek ini. Ribuan terima kasih juga saya ucapkan kepada seorang lagi penyelia saya iaitu Dr. Sudesh Kumar di atas segala nasihat dan tunjuk ajar. Selagi hayat dikandung badan, segala budi baik serta keprihatinan mereka akan tetap dikenang. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada rakan-rakan saya Dr. Ahmad Ramli, Dr. Tengku Sifzizul, Dr. Alex, Dr. Yahya, Dr. Nasir dan Dr. Coswald atas sokongan dan dorongan mereka untuk saya menyiapkan tesis ini. Saya juga ingin mengambil kesempatan ini untuk mengucapkan terima kasih kepada Cik Rahayu Ahmad dan Cik Tengku Fahima Azira Tuan Mat kerana banyak membantu saya dalam menyiapkan tesis ini.

Saya juga ingin mengucapkan terima kasih kepada Universiti Sains Malaysia di atas bantuan kewangan melalui geran jangka pendek. Tanpa bantuan tersebut sudah pasti projek ini tidak mungkin berjaya. Ucapan penghargaan ini juga ditujukan kepada semua kakitangan Pusat Racun Negara, Pengajian Pengajian Sains Farmasi, Pusat Pengajian Sains Kajihayat dan juga Institut Farmaseutikal dan Nutraseutikal Malaysia atas segala bantuan yang dihulurkan dalam menjayakan projek ini.

Sekalung ucapan penghargaan yang tidak terhingga ditujukan khas buat isteri yang sentiasa memberi sokongan, galakan dan dorongan untuk saya menyiapkan tesis ini. Akhir sekali, saya ingin mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang terlibat secara langsung atau tidak langsung dalam membantu saya menjayakan projek ini.

kepada
isteri saya, Zurini Hassan
dan anak-anak saya, Fasnim Al-Ashraf dan Ajuwad Al-Ashraf

SUSUNAN KANDUNGAN

	Muka surat
PENGHARGAAN	ii
JADUAL KANDUNGAN	iv
SENARAI JADUAL	xiii
SENARAI RAJAH	xvii
SENARAI GAMBARFOTO	xxi
SENARAI LAMPIRAN	xxiii
SENARAI SINGKATAN	xxv
ABSTRAK	xxvii
ABSTRACT	xxix

BAB SATU : PENGENALAN

1.0	Pengenalan	1
1.1	Penyelidikan biopolimer	1
1.2	Polihidroksialkanoat (PHA)	4
	1.2.1 Kepelbagaian PHA	5
	1.2.2 Granul PHA	8
	1.2.3 Biosintesis PHA	9
	1.2.3.1 PHA sintase	12
	1.2.3.2 Mekanisme PHA sintase	14
	1.2.3.3 Laluan-laluan bagi biosintesis PHA	15
	1.2.4 Fisiologi metabolisme PHA	20
1.3	Poli(3-hidroksialkanoat-ko-4-hidroksialkanoat) [P(3HB-ko-4HB)]	22
	1.3.1 Struktur dan sifat	23
	1.3.2 Laluan biosintesis P(3HB-ko-4HB)	26
	1.3.3 Mikroorganisma penghasil P(3HB-ko-4HB)	28
	1.3.3.1 <i>Ralstonia eutropha</i> (<i>Alcaligenes eutrophus</i>)	28
	1.3.3.2 <i>Comamonas acidovorans</i> (<i>Pseudomonas acidovorans</i>)	28
	1.3.3.3 <i>Alcaligenes latus</i>	29

1.3.3.4	<i>Comamonas testosteronii</i>	30
1.3.3.5	<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	30
1.3.4	Jenis substrat bagi penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	30
1.3.4.1	Asid 4-hidroksibutirik	31
1.3.4.2	γ -Butirolakton	32
1.3.4.3	1,4-Butanadiol dan ω -alkanadiol lain	32
1.3.4.4	Asid 4-klorobutirik	33
1.3.5	Biodegradasi P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	33
1.3.6	Aplikasi dan kegunaan P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	35
1.4	Objektif kajian	37

BAB DUA : BAHAN DAN KAEDAH

2.0	Bahan Dan Kaedah	39
2.1	Bahan kimia dan pelarut	39
2.2	Bakteria penghasil kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	39
2.3	Kaedah am	39
2.3.1	Penimbangan bahan	39
2.3.2	Pengadukan bahan	39
2.3.3	Pemanasan medium	39
2.3.4	Penentuan pH	40
2.3.5	Penentuan ketumpatan optik	40
2.3.6	Kaedah pensterilan	40
2.3.7	Pengeraman kultur	40
2.3.8	Kaedah penceriaan larutan kaldu	40
2.3.9	Kaedah pengeringan sel	41
2.3.10	Kaedah pengestrakan polimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) daripada sel kering bakteria	41
2.3.11	Kaedah penyediaan filem biopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	41

2.4	Penyediaan medium	42
2.4.1	Medium pemeliharaan mikroorganisma	42
2.4.2	Medium pertumbuhan bakteria	42
2.4.3	Medium penghasilan biopolimer	42
2.4.4	Medium kaldu pemencilan yang mengandungi γ -butirolakton	43
2.4.5	Medium agar penyebaran dan penyaringan	43
2.5	Pemeliharaan bakteria USMAA1020	43
2.6	Penyimpanan bakteria USMAA1020	43
2.7	Pertumbuhan dan penyediaan ampaiian sel bakteria USMAA1020	44
2.8	Kaedah Analisis	44
2.8.1	Penentuan berat kering sel	44
2.8.2	Penentuan kepekatan γ -butirolakton tertinggal di dalam medium	44
2.8.3	Penentuan sumber nitrogen tertinggal di dalam medium	45
2.8.4	Penentuan nitrogen total di dalam medium	45
2.8.5	Penentuan kepekatan protein	46
2.8.6	Penentuan biopolimer dengan kaedah kromatografi gas	46
2.8.6.1	Proses metanolisis biopolimer dan penyediaan sampel untuk analisis kromatografi gas	46
2.8.6.2	Penentuan biopolimer dengan kromatografi gas	47
2.8.7	Penentuan berat molekul biopolimer dengan kromatografi penelapan gel (Gel permeation chromatography, GPC)	47
2.8.8	Pemerhatian granul PHA melalui mikroskop elektron transmisi	49
2.8.9	Pemerhatian sel bakteria dengan kaedah mikroskop elektron secara pewarnaan negatif	50
2.8.10	Pemerhatian filem PHA melalui mikroskop elektron penskanan	50

2.9	Bahan dan kaedah yang terlibat dalam pemencilan dan penyaringan penghasil P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	51
2.9.1	Pemencilan penghasil P(3HB- <i>ko</i> -4HB) daripada persekitaran	51
2.9.2	Penyaringan bakteria penghasil P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dengan kaedah pewarnaan Nile Red dan kromatografi gas	51
2.9.3	Pemilihan bakteria penghasil P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	52
2.10	Bahan dan kaedah yang terlibat dalam pengenalpastian polimer yang dihasilkan oleh penghasil PHA terpilih	53
2.10.1	Pengenalpastian P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dengan kromatografi gas	53
2.10.2	Pengesahan polimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dengan analisis NMR	53
2.11	Bahan dan kaedah yang terlibat dalam pengecaman penghasil P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	53
2.11.1	Penyediaan medium	53
2.11.1.1	Medium pemilihan selektif agar MacConkey II	53
2.11.1.2	Medium penyaringan Hugh-Leifson	54
2.11.1.3	Medium gelatin	54
2.11.1.4	Medium kanji	54
2.11.1.5	Kaldu triptofan	55
2.11.1.6	Medium tanpa sumber karbon	55
2.11.1.7	Medium fermentasi karbohidrat	55
2.11.1.8	Kaldu urea	55
2.11.1.9	Medium separa pepejal	56
2.11.2	Pemerhatian sifat-sifat kultur	56
2.11.2.1	Morfologi koloni	56
2.11.2.2	Morfologi mikroorganisma dalam kaldu nutrien	56
2.11.2.3	Ujian motiliti	56
2.11.3	Pewarnaan Gram	57

2.11.4	Pertumbuhan mikrob dengan oksigen bebas	57
		57
2.11.5	Pertumbuhan pada Agar MacConkey 11	
2.11.6	Ujian biokimia	58
2.11.6.1	Ujian penggunaan medium separa pepejal Hugh-Leifson	58
2.11.6.2	Ujian metabolisme pengoksidaan dan fermentasi sumber karbon dengan medium OF (Hugh-Leifson)	58
		58
2.11.7	Ujian oksidase	59
2.11.8	Ujian katalase	59
2.11.9	Ujian penurunan nitrat	59
2.11.10	Ujian utilisasi gelatin	59
2.11.11	Ujian hidrolisis kanji	60
2.11.12	Ujian Indol	60
2.11.13	Ujian kemampuan menfermentasikan karbohidrat	60
2.11.14	Ujian hidrolisis urea	60
2.11.15	Ujian penggunaan sumber karbon	61
2.11.16	Kesan suhu ke atas pertumbuhan	61
2.11.17	Ujian pengelasan cepat API KIT-20NE	61
2.12	Pengesahan genus bakteria	61
2.12.1	Ujian morfologi dan biokimia	62
2.12.2	Analisis jujukan gen 16S rDNA	62
2.12.3	Analisis profil asid lemak sel	63
2.12.4	Analisis komposisi bes DNA	63
2.13	Penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) oleh bakteria <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	64
2.13.1	Penghasilan poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat) secara pengkulturan satu peringkat	64
2.13.2	Penghasilan poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat) secara pengkulturan dua peringkat	64

2.14	Pengoptimuman keadaan pengkulturan bagi penghasilan biopolimer secara dua peringkat	65
2.14.1	Kesan kepekatan sel	65
2.14.2	Kesan pembilasan sel	65
2.14.3	Kesan pengeraman sel	66
2.14.4	Kesan jenis sumber karbon yang berbeza	66
2.14.5	Kesan kepekatan sumber karbon	66
2.14.6	Kesan unsur magnesium	66
2.14.7	Kesan nisbah isipadu kultur kepada isipadu kelalang	67
2.14.8	Kesan unsur fosfat	67
2.14.9	Kesan nisbah berbeza sumber fosfat	67
2.14.10	Kesan suhu pengkulturan	67
2.14.11	Kesan kadar goncangan yang berbeza	68
2.14.12	Kesan nisbah isipadu kepada saiz kelalang	68
2.14.13	Kesan penambahan sumber karbon yang lain	68
2.14.14	Kesan penambahan 1,4-butanadiol	68
2.14.15	Kesan nisbah γ -butirolakton kepada 1,4-butanadiol	69
2.15	Profil penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dalam keadaan nutrisi terhadap	69
2.16	Pencirian biopolimer P(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat)	69
2.16.1	Penentuan sifat terma kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	69
2.16.2	Penentuan berat molekul kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	70
2.16.3	Analisis tensil	70
2.16.4	Penentuan kekristalan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	70
2.16.5	Analisis secara spektroskopi resonans magnetik nukleus	71
2.16.6	Ujian sitotoksiti (bioserasi)	71
2.16.6.1	Kultur sel L929	71

2.16.6.2	Pertumbuhan sel L929 di atas filem P(3HB-ko-4HB)	72
2.16.6.3	Kajian kedayahidupan sel dan proliferasi	72
2.16.6.4	Pemerhatian sel di atas filem secara SEM	73

BAB TIGA : KEPUTUSAN

3.0	Keputusan	74
3.1	Pemencilan dan penyaringan penghasil P(3HB-ko-4HB)	74
3.1.1	Pemencilan penghasil P(3HB-ko-4HB) dari persekitaran	74
3.1.2	Penyaringan bakteria penghasil P(3HB-ko-4HB) dengan kaedah pewarnaan Nile Red dan kromatografi gas	78
3.1.3	Pemilihan bakteria penghasil P(3HB-ko-4HB)	83
3.2	Pengenalpastian polimer P(3HB-ko-4HB) yang dihasilkan oleh pencilan USMAA1020	85
3.2.1	Pemerhatian granul PHA dengan mikroskop elektron	85
3.2.2	Pengenalpastian dan pengesahan P(3HB-ko-4HB) dengan kromatografi gas dan analisis NMR	85
3.3	Pengecaman pencilan USMAA1020	90
3.3.1	Ujian morfologi, fisiologi dan ujian biokimia	90
3.3.2	Ujian pengesahan USMAA1020	101
3.4	Penghasilan P(3HB-ko-4HB) oleh bakteria <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	110
3.4.1	Penghasilan poli(3-hidroksibutirat-ko-4-hidroksibutirat) secara pengkulturan satu peringkat	110
3.4.2	Penghasilan poli(3-hidroksibutirat-ko-4-hidroksibutirat) secara pengkulturan dua peringkat	120
3.5	Pengoptimuman keadaan pengkulturan bagi penghasilan biopolimer secara pengkulturan dua peringkat	123
3.5.1	Kesan pembilasan sel	124
3.5.2	Kesan pengeraman sel	127
3.5.3	Kesan kepekatan sel	129

3.5.4	Kesan jenis sumber karbon yang berbeza	134
3.5.5	Kesan kepekatan γ -butirolakton	138
3.5.6	Kesan unsur magnesium	143
3.5.7	Kesan nisbah isipadu kultur kepada isipadu kelalang	146
3.5.8	Kesan unsur fosfat	150
3.5.9	Kesan nisbah mol sumber fosfat	154
3.5.10	Kesan suhu pengkulturan	158
3.5.11	Kesan kadar goncangan	161
3.5.12	Kesan nisbah isipadu kultur kepada saiz kelalang yang berbeza	164
3.5.13	Kesan penambahan sumber karbon yang lain	167
3.5.14	Kesan penambahan 1,4-butanadiol	171
3.5.15	Kesan nisbah γ -butirolakton kepada 1,4-butanadiol	174
3.6	Profil penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dalam keadaan nutrisi terhad	178
3.6.1	Perbandingan penghasilan biosim sel dan biopolimer hasil pengubahsuaian kadar pengudaraan	190
3.7	Pencirian kopolimer P(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat)	192
3.7.1	Analisis kandungan dan kerawakan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	192
3.7.2	Berat molekul kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	195
3.7.3	Sifat terma kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	198
3.7.4	Sifat kekristalan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	200
3.7.5	Sifat tensil kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	204
3.7.6	Sifat sitotoksiti (biokeserasian) biopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	212

BAB EMPAT : PERBINCANGAN

4.0	Perbincangan	219
4.1	Pemencilan dan penyaringan mikroorganisma penghasil poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat)	219
4.2	Pengenalpastian dan pengesahan poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat) daripada <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	224

4.3	Pengecaman bakteria USMAA1020	227
4.4	Penghasilan poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat) secara satu dan dua peringkat	230
4.5	Pengoptimuman penghasilan poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat) oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	234
4.6	Biosintesis kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	264
4.7	Pencirian kopolimer poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat)	271

BAB LIMA : KESIMPULAN

5.0	Kesimpulan	282
-----	------------	-----

RUJUKAN	287
----------------	-----

LAMPIRAN	306
-----------------	-----

SENARAI PENERBITAN	327
---------------------------	-----

SENARAI JADUAL

		Muka surat
Jadual 1.1	Tiga jenis kelas PHA sintase	13
Jadual 1.2	Ciri-ciri fizikal dan terma P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dengan komposisi 4HB yang berbeza	24
Jadual 3.1	Pemencilan bakteria dari persekitaran tempatan	75
Jadual 3.2	Penyaringan bakteria penghasil PHA dengan kaedah coretan di atas medium agar yang mengandungi γ -butirolakton dan pewarna Nile Red	76
Jadual 3.3	Penyaringan bakteria penghasil PHA dengan menggunakan mikroskop sinaran ultra ungu serta kaedah kromatografi gas	79
Jadual 3.4	Penghasilan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) oleh pencilan	87
Jadual 3.5	Kandungan polimer PHA yang diekstrak daripada pencilan USMAA10-20	91
Jadual 3.6	Sifat-sifat morfologi koloni bakteria USMAA1020 selepas 2 hari di atas agar nutrien	96
Jadual 3.7	Sifat-sifat morfologi bagi bakteria USMAA1020 yang ditumbuhkan pada kaldu nutrien	97
Jadual 3.8	Pertumbuhan bakteria USMAA1020 dalam kaldu nutrien pada suhu yang berbeza	98
Jadual 3.9	Ujian biokimia bagi USMAA1020	99
Jadual 3.10	Ujian penggunaan medium OF oleh bakteria <i>Cupriavidus</i> sp. USM1020	100
Jadual 3.11	Ujian pengelasan cepat API 20NE ke atas <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	102
Jadual 3.12	Ciri-ciri bakteria USMAA1020 berdasarkan ujian yang dijalankan oleh DSMZ	104
Jadual 3.13	Jujukan gen 16S rRNA yang bersaiz 1529 bp bagi bakteria USMAA1020	106
Jadual 3.14	Peratus kesamaan jujukan gen 16S rRNA bagi USMAA1020 dengan taksa berkaitan	107
Jadual 3.15	Perbezaan kriteria fenotik bagi <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 dan spesies lain <i>Cupriavidus</i>	109

Jadual 3.16	Taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 pada nisbah C/N yang berbeza dengan γ -butirolakton sebagai sumber karbon tunggal	117
Jadual 3.17	Kesan nisbah C/N yang berbeza ke atas nilai koefisien penghasilan biojisim dan biopolimer (Y)	119
Jadual 3.18	Taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat dengan γ -butirolakton sebagai sumber karbon	121
Jadual 3.19	Kesan pembilasan sel ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat dengan γ -butirolakton sebagai sumber karbon	125
Jadual 3.20	Kesan kepekatan sel ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat dengan γ -butirolakton sebagai sumber karbon	130
Jadual 3.21	Kesan jenis sumber karbon yang berbeza ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	135
Jadual 3.22	Kesan kepekatan γ -butirolakton yang berbeza ke atas taburan komposisi polimer dan berat molekul yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	139
Jadual 3.23	Kesan kepekatan magnesium yang berbeza ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	144
Jadual 3.24	Kesan nisbah isipadu kultur kepada isipadu kelalang ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	148
Jadual 3.25	Kesan kepekatan sumber fosfat yang berbeza ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	151
Jadual 3.26	Kesan nisbah mol K_2HPO_4 kepada KH_2PO_4 ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	155

Jadual 3.27	Kesan suhu pengkulturan ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	159
Jadual 3.28	Kesan kadar goncangan yang berbeza ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	162
Jadual 3.29	Kesan nisbah isipadu kultur kepada saiz kelalang yang berbeza ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	165
Jadual 3.30	Kesan penambahan sumber karbon yang lain ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	169
Jadual 3.31	Kesan penambahan 1,4-butanadiol ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	172
Jadual 3.32	Kesan nisbah γ -butirolakton kepada 1,4-butanadiol ke atas taburan komposisi polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat	176
Jadual 3.33	Taburan komposisi dan berat molekul polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 30/250	179
Jadual 3.34	Taburan komposisi dan berat molekul polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 80/250	182
Jadual 3.35	Taburan komposisi dan berat molekul polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 40/250	185
Jadual 3.36	Taburan komposisi dan berat molekul polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 50/250	186
Jadual 3.37	Taburan komposisi dan berat molekul polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 65/250	187

Jadual 3.38	Taburan komposisi dan berat molekul polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 50/250 dengan menggunakan kombinasi γ -butirolakton dan 1,4-butanadiol	188
Jadual 3.39	Taburan komposisi dan berat molekul polimer yang dihasilkan oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 secara pengkulturan dua peringkat apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang diubahsuai	191
Jadual 3.40	Komposisi dan taburan jujukan diad polimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang telah diekstrak daripada sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	193
Jadual 3.41	Berat molekul dan indeks polidispersiti kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang telah diekstrak daripada sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	196
Jadual 3.42	Ciri-ciri terma bagi polimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang telah diekstrak daripada sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	199
Jadual 3.43	Darjah kekristalan bagi polimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang telah diekstrak daripada sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	203
Jadual 3.44	Ciri-ciri tensil bagi polimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang telah diekstrak daripada sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	206
Jadual 4.1	Perbandingan komposisi 4HB yang diekstrak dengan kaedah yang berbeza	225
Jadual 4.2	Nisbah luas permukaan kepada isipadu kultur dalam saiz kelalang yang berbeza	253
Jadual 4.3	Kesan keadaan pengkulturan ke atas penghasilan biopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dan taburan komposisi 4HB	265

SENARAI RAJAH

		Muka surat
Rajah 1.1	Struktur kimia am PHA dan sebahagian daripada monomer-monomernya	7
Rajah 1.2	Laluan biosintesis P(3HB) dan gen pengkodan enzim oleh <i>R. eutropha</i>	11
Rajah 1.3	Cadangan mekanisme pemangkinan berasaskan lipase bagi PHA sintase kelas III dalam <i>A. vinosum</i>	16
Rajah 1.4	Laluan-laluan metabolik yang menyumbangkan berbagai monomer hidroksialkanoat untuk biosintesis PHA	18
Rajah 1.5	Struktur kopolimer P(3HB-ko-4HB)	23
Rajah 1.6	Laluan metabolisme P(3HB-ko-4HB) dalam <i>Ralstonia eutropha</i>	27
Rajah 3.1	Spektrum kromatografi gas bagi P(3HB-ko-4HB) daripada pencilan USMAA1020	88
Rajah 3.2	Spektrum kromatografi gas bagi polimer tulen	89
Rajah 3.3	Spektrum ¹³ C-NMR kopolimer P(3HB-ko-4HB) yang dihasilkan oleh pencilan USMAA1020	92
Rajah 3.4	Spektrum ¹ H-NMR kopolimer P(3HB-ko-4HB) yang dihasilkan oleh pencilan USMAA1020	93
Rajah 3.5	Dendrogram filogenetik yang dihasilkan daripada jarak evolusi berdasarkan kaedah penyambungan bersebelahan (neighbor-joining method)	108
Rajah 3.6	Penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi satu peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	113
Rajah 3.7	Penghasilan kopolimer P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi satu peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	115
Rajah 3.8	Perhubungan di antara hasil PHA dengan substrat yang digunakan	118
Rajah 3.9	Penghasilan kopolimer P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	122
Rajah 3.10	Kesan bilangan pembilasan sel ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	126

Rajah 3.11	Kesan pengeraman sel sebelum penambahan γ -butirolakton ke atas pertumbuhan <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 dalam medium penghasilan polimer	128
Rajah 3.12	Kesan kepekatan sel ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	131
Rajah 3.13	Kesan kepekatan sel ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	133
Rajah 3.14	Kesan jenis sumber karbon yang berbeza ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	137
Rajah 3.15	Kesan kepekatan γ -butirolakton yang berbeza ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	141
Rajah 3.16	Kesan kepekatan magnesium yang berbeza ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	145
Rajah 3.17	Kesan isipadu kultur kepada isipadu kelalang ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	149
Rajah 3.18	Kesan kepekatan sumber fosfat yang berbeza ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	153
Rajah 3.19	Kesan nisbah mol K_2HPO_4 kepada KH_2PO_4 ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	157
Rajah 3.20	Kesan suhu pengkulturan ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	160
Rajah 3.21	Kesan kadar goncangan ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	163
Rajah 3.22	Kesan nisbah isipadu kultur kepada saiz kelalang yang berbeza ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	166
Rajah 3.23	Kesan penambahan sumber karbon lain ke atas penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020.	170

Rajah 3.24	Kesan penambahan 1,4-butanadiol ke atas penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	173
Rajah 3.25	Kesan nisbah γ -butirolakton kepada 1,4-butanadiol ke atas penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	177
Rajah 3.26	Profil penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 30/250	180
Rajah 3.27	Profil penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 80/250	183
Rajah 3.28	Profil penghasilan P(3HB- <i>ko</i> -4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 50/250 dengan menggunakan kombinasi γ -butirolakton dan 1,4-butanadiol	189
Rajah 3.29	Spektrum ^{13}C -NMR bahagian resonan karbon karbonil dalam sampel kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -66mol%4HB)	194
Rajah 3.30	Berat molekul purata-nombor dan indeks polidispersiti bagi P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dengan komposisi 4HB berbeza yang telah diekstrak daripada sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	197
Rajah 3.31	Corak serakan sinar-X bagi filem P(3HB- <i>ko</i> -23mol%4HB) yang dibentuk daripada pemeruapan kloroform.	201
Rajah 3.32	Corak serakan sinar-X bagi filem P(3HB- <i>ko</i> -75mol%4HB) yang dibentuk daripada pemeruapan kloroform	202
Rajah 3.33	Hubungan antara penyerapan MTS pada 490 nm dan bilangan sel L929	215
Rajah 3.34	Pertumbuhan sel L929 di atas filem P(3HB- <i>ko</i> -4HB) dengan komposisi 4HB yang berbeza	216
Rajah 4.1	Laluan metabolisme putatif untuk sintesis PHA bagi <i>H. pseudoflava</i> dengan menggunakan γ -butirolakton sebagai sumber karbon	235
Rajah 4.2	Sumber 4-hidroksibutiril-KoA bagi biosintesis PHA yang mengandungi konstituen 4HB	242

Rajah 4.3 Cadangan laluan metabolik bagi biosintesis P(3HB-ko-4HB) dalam *Cupriavidus* sp. USMAA1020

270

SENARAI GAMBARFOTO

		Muka surat
Gambarfoto 3.1	Coretan bakteria di atas medium agar yang menunjukkan warna berpendaflour merah jambu atau oren	77
Gambarfoto 3.2	Granul PHA berpendaflour oren diperhatikan selepas pewarnaan Nile Red di bawah mikroskop cahaya sinaran ultraungu bagi isolat USMAA1020	82
Gambarfoto 3.3a	Granul PHA di dalam sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 yang dikulturkan dalam sumber karbon γ -butirolakton	86
Gambarfoto 3.3b	Granul PHA di dalam sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 yang dikulturkan dalam sumber karbon asid 4-hidroksibutirik	86
Gambarfoto 3.4a	Sel <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 yang telah dikeringkan secara pengering sejuk-beku	87
Gambarfoto 3.4b	Polimer yang telah diekstrak daripada sel kering bakteria <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020	87
Gambarfoto 3.5	Koloni bakteria <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 di atas agar nutrien	94
Gambarfoto 3.6	Mikrograf TEM (pewarnaan negatif) bakteria USMAA1020	94
Gambarfoto 3.7	Filem kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang telah ditebuk dengan penebuk keluli ASTM	205
Gambarfoto 3.8	Mikrograf SEM bagi permukaan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang mengandungi 23 mol% 4HB sebelum dan selepas ujian tensil	207
Gambarfoto 3.9	Mikrograf SEM bagi permukaan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang mengandungi 36 mol% 4HB sebelum dan selepas ujian tensil	208
Gambarfoto 3.10	Mikrograf SEM bagi permukaan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang mengandungi 45 mol% 4HB sebelum dan selepas ujian tensil	209
Gambarfoto 3.11	Mikrograf SEM bagi permukaan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang mengandungi 66 mol% 4HB sebelum dan selepas ujian tensil	210

Gambafoto 3.12	Mikrograf SEM bagi permukaan kopolimer P(3HB- <i>ko</i> -4HB) yang mengandungi 75 mol% 4HB sebelum dan selepas ujian tensil	211
Gambarfoto 3.13	Pertumbuhan sel L929 di dalam medium DMEM yang dilihat melalui mikroskop terbalikan fasa selepas 3 hari dikulturkan	213
Gambarfoto 3.14	Pertumbuhan sel L929 di atas filem P(3HB- <i>ko</i> -75mol%4HB) yang dilihat melalui mikroskop terbalikan fasa selepas 4 hari dikulturkan	213
Gambarfoto 3.15	Mikrograf SEM filem P(3HB- <i>ko</i> -23mol%4HB) yang ditumbuhi sel L929 selepas 48 jam dikulturkan	217
Gambarfoto 3.16	Mikrograf SEM filem P(3HB- <i>ko</i> -66mol%4HB) yang ditumbuhi sel L929 selepas 48 jam dikulturkan	217
Gambarfoto 3.17	Mikrograf SEM filem P(3HB- <i>ko</i> -75mol%4HB) yang ditumbuhi sel L929 selepas 48 jam dikulturkan	218

SENARAI LAMPIRAN

		Muka surat
Lampiran 1	Lengkuk piawai ketumpatan optik melawan berat kering sel dari kaldu nutrien	306
Lampiran 2	Lengkuk piawai ketumpatan optik melawan berat kering sel dari medium penghasilan polimer	307
Lampiran 3	Lengkuk piawai penentuan γ -butirolakton dengan kromatografi gas	308
Lampiran 4	Lengkuk piawai ketumpatan optik melawan kepekatan nitrogen (ammonium sulfat)	309
Lampiran 5	Lengkuk piawai kepekatan protein dengan menggunakan serum albumin bovin	310
Lampiran 6	Kaedah pengiraan kandungan PHA dan komposisi 4HB daripada data kromatografi gas	311
Lampiran 7	Lengkuk piawai polistirena dan P(3HB-ko-4HB) yang setara dengan P(3HB) untuk penentuan berat molekul menggunakan kaedah kromatografi penelapan gel	312
Lampiran 8	Contoh analisis statistic ANOVA sehala untuk data-data kandungan PHA dan ujian Tukey (Kesan kepekatan γ -butirolakton)	313
Lampiran 9	Contoh analisis statistik ANOVA sehala untuk data-data komposisi 4HB dan Ujian Tukey (Kesan kepekatan γ -butirolakton)	315
Lampiran 10	Profil penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 apabila nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 40/250	317
Lampiran 11	Profil penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 pada nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 50/250	318
Lampiran 12	Profil penghasilan P(3HB-ko-4HB) secara fermentasi dua peringkat oleh <i>Cupriavidus</i> sp. USMAA1020 pada nisbah isipadu kultur kepada kelalang adalah 65/250	319
Lampiran 13	Graf kalorimeter pengimbasan pembezaan bagi polimer P(3HB)	320
Lampiran 14	Graf kalorimeter pengimbasan pembezaan bagi polimer P(3HB-ko-23mol% 4HB)	321

Lampiran 15	Graf kalorimeter pengimbangan polimer P(3HB- <i>ko</i> -36mol% 4HB)	pembezaan bagi	322
Lampiran 16	Graf kalorimeter pengimbangan polimer P(3HB- <i>ko</i> -45mol% 4HB)	pembezaan bagi	323
Lampiran 17	Graf kalorimeter pengimbangan polimer P(3HB- <i>ko</i> -66mol% 4HB)	pembezaan bagi	324
Lampiran 18	Graf kalorimeter pengimbangan polimer P(3HB- <i>ko</i> -75mol% 4HB)	pembezaan bagi	325
Lampiran 19	Graf kalorimeter pengimbangan polimer P(3HB- <i>ko</i> -50mol% 4HB) yang dihasilkan dengan kombinasi sumber karbon γ -butirolakton dan 1,4-butanadiol	pembezaan bagi	326

SENARAI SINGKATAN

ANOVA	Analisis varian
ATP	Adenosine triphosphate, adenosina trifosfat
b/b	Berat/berat
b/l	Berat/isipadu
bp	Base pair, pasangan bes
C/N	Carbon /Nitrogen, Karbon /Nitrogen
CME	Caprylic acid methyl ester, asid kaprilik metil ester
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, medium Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimethyl sulphoxide, dimetil sulfoksida
DNA	Deoxyribonucleic acid, asid deoksiribonukleik
FAD	Flavin adenine dinucleotide, flavin adenina dinukleotida
FADH	Flavin adenine dinucleotide (reduced form), flavin adenina dinukleotida (bentuk terturun)
FID	Flame ionization detector, pengesan pengionan nyala
GC	Gas chromatography, kromatografi gas
GC-MS	Gas chromatography-Mass spectroscopy, kromatografi gas-spektroskopi jisim
GPa	Giga Pascal
GPC	Gel permeation chromatography, kromatografi penelapan gel
3HA	3-hydroxyalkanoate, 3-hidroksialkanoat
4HA	4-Hydroxyalkanoate, 4-hidroksialkanoat
3HB	3-Hydroxybutyrate, 3-hidroksibutirat
3HB-KoA	3-Hydroxybutyryl-CoA, 3-hidroksibutiril-KoA
4HB	4-Hydroxybutyrate, 4-hidroksibutirat
4HB-KoA	4-Hydroxybutyryl-CoA, 4-Hidroksibutiril-KoA
HMDS	Hexamethyldisilazane, heksametildisilazana
i/i	Isipadu/isipadu
MCL	Medium-chain-length, rantai sederhana panjang
M_n	Number-average molecular weight, berat molekul purata-nombor
MPa	Mega Pascal
MR-VP	Metyl red-Voges Prokauer, metal merah-Voges Prokauer
MTS	(3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt
M_w	Weight-average molecular weight, berat molekul purata-berat

NA	Nutrient agar, agar nutrien
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide, nikotinamida adenina dinukleotida
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form), nikotinamida adenina dinukleotida (bentuk terturun)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form), nikotinamida adenina dinukleotida fosfat (bentuk terturun)
NMR	Nuclear magnetic resonance, resonans magnet nukleus
NR	Nile red
OF	Oxidation and fermentation, pengoksidan dan fermentasi
P(3HA)	Poly(3-hydroxyalkanoate), poli(3-hidroksialkanoat)
P(3HB)	Poly(3-hydroxybutyrate), poli(3-hidroksibutirat)
P(3HB- <i>ko</i> -3HV)	Poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -3-hidroksivalerat)
P(3HB- <i>ko</i> -4HB)	Poli(3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -4-hidroksibutirat)
P(4HB)	Poly(4-hydroxybutyrate), poli-4(hidroksibutirat)
PBS	Phosphate buffer saline, penimbal fosfat
PCR	Polymerase chain reaction, tindak balas rantai polimerase
PHA	Polyhydroxyalkanoate, polihidroksialkanoat
PMS	Phenazine methosulfate
Rpm	Revolutions per minute, putaran per minit
SCL	Short-chain-length, rantai panjang pendek
SEM	Scanning electron microscope, mikroskop elektron penskanan
TCA	Tricarboxylic acid cycle, kitar asid trikarboksilik
TEM	Transmission electron microscope, mikroskop elektron transmisi
T_g	Glass transition temperature, suhu peralihan kaca
T_m	Melting temperature, suhu melebur
UV	Ultra violet, ultra lembayung
$Y_{PHA/S}$	Koefisien penghasilan biopolimer
$Y_{x/S}$	Koefisien penghasilan biojisim

BIOSINTESIS DAN PENCIRIAN KOPOLIMER POLI(3-HIDROKSIBUTIRAT-*ko*-4-HIDROKSIBUTIRAT) DARIPADA *CUPRIAVIDUS* sp. USMAA1020

ABSTRAK

Suatu bakteria Gram negatif dilabelkan sebagai USMAA1020 yang menunjukkan keupayaan menghasilkan polimer poli(3-hidroksibutirat-*ko*-4-hidroksibutirat) [P(3HB-*ko*-4HB)] dengan menggunakan γ -butirolakton telah dipencilkan dari persekitaran Malaysia. Polimer tersebut telah dituliskan daripada sel kering bakteria ini dan dianalisis secara spektroskopi resonans nukleus (NMR). Keputusan NMR ^1H dan ^{13}C mengesahkan bahawa kopolimer tersebut mengandungi kedua-dua unit 3HB dan 4HB. Pencirian biokimia dan fisiologi, analisis rRNA 16S, analisis asid lemak sel dan nisbah komposisi bes DNA (G+C) menunjukkan bahawa pencilan USMAA1020 kemungkinan suatu spesies baru dalam genus *Cupriavidus* dan dinamakan sebagai *Cupriavidus* sp. USMAA1020. Bakteria ini didapati berupaya bertumbuh dan menghasilkan 67% P(3HB-*co*-8mol%4HB) berdasarkan berat kering sel dalam pengkulturan satu peringkat dengan menggunakan γ -butirolakton sebagai sumber karbon tunggal. Bakteria ini juga mampu menghasilkan kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) dengan komposisi 4HB yang tinggi (53 mol%) apabila dikulturkan secara pengkulturan dua peringkat dalam medium tanpa nitrogen yang mengandungi γ -butirolakton. Biosintesis kopolimer juga dapat dilakukan dengan menggunakan asid 4-hidroksibutirik dan alkanadiol dengan bilangan atom karbon genap seperti 1,4-butanadiol, 1,6-heksanadiol, 1,8-oktanadiol, 1,10-dekanadiol dan 1,12-dodekanadiol. Komposisi 4HB dalam kopolimer ini berubah daripada 10 hingga 51 mol% bergantung kepada sumber karbon yang digunakan. Apabila γ -butirolakton digunakan sebagai sumber karbon, komposisi 4HB dalam kopolimer tersebut meningkat daripada 25 hingga 60 mol% apabila kepekataannya ditingkatkan. Namun begitu, peningkatan kepekatan γ -butirolakton merendahkan kandungan P(3HB-*ko*-4HB) serta berat molekul polimer secara signifikan. Pengubahsuaian keadaan pengkulturan seperti kepekatan magnesium,

sumber fosfat, pengudaraan, suhu pengkulturan dan penambahan sumber karbon seperti 1,4-butanadiol didapati mempengaruhi penghasilan P(3HB-*ko*-4HB) dan komposisi 4HB. Antara parameter-parameter tersebut, pengubahsuaian kadar pengudaraan dalam medium didapati memberikan kesan yang signifikan. Kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) dengan komposisi 4HB antara 23 hingga 75 mol% berjaya dihasilkan dengan mengubahsuai pengudaraan medium. Pencirian sifat fizikal dan mekanikal kopolimer tersebut telah dilakukan secara spektroskopi resonans nukleus (NMR), kromatografi penelapan gel (GPC), penyerakan sinar-X, ujian tensil dan kalorimetri pengimbasan pembezaan (DSC). Berat molekul purata-nombor kopolimer yang dihasilkan adalah antara 260×10^3 hingga 590×10^3 Dalton dengan indeks polidispersiti antara 1.8 hingga 3.0 dan peningkatan komposisi 4HB didapati merendahkan berat molekul polimer tersebut. Kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) yang dihasilkan juga menunjukkan bahawa peningkatan pecahan 4HB menyebabkan kopolimer tersebut berubah daripada termoplastik kristal kepada elastomer yang kuat. Di samping itu, peningkatan komposisi 4HB dalam kopolimer ini juga didapati mempengaruhi kerawakan polimer, suhu melebur (T_m), suhu peralihan kaca (T_g), darjah kekristalan, kekuatan tensil dan pemanjangan untuk putus. Ujian biokeserasian yang dijalankan secara *in vitro* ke atas kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) menunjukkan bahawa kopolimer ini dapat menyokong pertumbuhan dan proliferasi sel fibroblas.

BIOSYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-co-4-HYDROXYBUTYRATE) COPOLYMER FROM CUPRIAVIDUS sp. USMAA1020

ABSTRACT

A Gram negative bacterium designated as USMAA1020 with an ability to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] when grown on γ -butyrolactone as the sole carbon source was isolated from Malaysian environment. The polyester was purified from freeze-dried cells and analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. ^1H and ^{13}C NMR results confirmed the presence of 3HB and 4HB monomers. Biochemical and physiological characterization, 16S rRNA sequence analysis, cellular fatty acids analysis and DNA base ratio determination (G+C) revealed that strain USMAA1020 may represent a new species within the genus *Cupriavidus* and named as *Cupriavidus* sp. USMAA1020. The bacterial cells were able to grow and produce 67 wt% P(3HB-co-8mol%4HB) of the dry cell weight in a one-step cultivation process using γ -butyrolactone as the sole carbon source. It accumulated P(3HB-co-4HB) copolyester with a higher 4HB fraction (53 mol%) when grown in a nitrogen-free mineral medium containing γ -butyrolactone through a two-step cultivation process. The biosynthesis of P(3HB-co-4HB) was also achieved by using 4-hydroxybutyric acid and alkanediols with even carbon numbers such as 1,4-butanediol, 1,6-hexanediol, 1,8-octanediol, 1,10-decanediol, and 1,12-dodecanediol. The composition of copolyesters varied from 10 to 51 mol% 4HB, depending on the carbon sources supplied. When γ -butyrolactone was used as the sole carbon source, the 4HB fraction in copolyester increased from 25 to 60 mol% as the concentration of γ -butyrolactone in the culture medium was increased. However, this lowered the P(3HB-co-4HB) content and molecular weight significantly. Manipulating the culture conditions such as magnesium and phosphate concentration, aeration, temperature and 1,4-butanediol addition affected the production of P(3HB-co-4HB) and 4HB composition. Among these parameters, the composition of P(3HB-co-4HB) was most affected by the

changes of culture aeration. P(3HB-co-4HB) copolymer with 4HB compositions ranging from 23 to 75 mol% 4HB were successfully produced by varying the medium aeration. The physical and mechanical properties of P(3HB-co-4HB) copolymers were characterized by NMR spectroscopy, gel-permeation chromatography, X-ray diffraction, tensile test, and differential scanning calorimetry. The number-average molecular weights (M_n) of copolymers ranged from 260×10^3 to 590×10^3 Dalton, and the polydispersities (M_w/M_n) were between 1.8 and 3.0. Increases in the 4HB composition lowered the molecular weight of these copolymers. The P(3HB-co-4HB) copolymers exhibit a wide variety of characteristics from crystalline thermoplastic to strong elastomer when 4HB composition increases. In addition, the increase in 4HB composition affected the randomness of copolymer, melting temperature (T_m), glass transition temperature (T_g), degree of crystallinity, tensile strength, and elongation to break. The biocompatibility of P(3HB-co-4HB) copolymers were evaluated and these copolymers have been shown to support the growth and proliferation of fibroblast cells.

1.0 PENGENALAN

1.1 Penyelidikan biopolimer

Pertumbuhan penduduk dunia yang mendadak telah menyebabkan pengumpulan bahan sisa tidak terbiodegradasi di serata dunia. Lantaran itu, keadaan kehidupan dalam biosfera turut berubah dengan hebat dan seterusnya kehadiran bahan tidak terbiodegradasi ini memberi kesan ke atas kehidupan pelbagai spesies. Dengan itu, banyak negara mengorak langkah ke arah menghasilkan bahan yang boleh disingkirkan dari biosfera. Kajian telah dijalankan untuk mencari bahan alternatif untuk menggantikan plastik sintetik yang boleh membawa kesan buruk kepada persekitaran. Kini, perkembangan plastik yang boleh terbiodegradasi telah menarik perhatian pelbagai pihak terutamanya pihak perindustrian (Leaversuch, 1987; Poirier *et al.*, 1995).

Biopolimer adalah bio-bahan yang disintesis secara semula jadi dan dikatabolismekan oleh pelbagai organisma di bawah keadaan nutrien dan persekitaran yang berbeza (Madison dan Huisman, 1999) dan telah dikenalpasti mempunyai pelbagai kegunaan bioteknologi. Bahan ini boleh diasimilasikan oleh pelbagai spesies (biodegradasi) dan tidak menyebabkan kesan toksik dalam perumah (bioserasi) (Zinn *et al.*, 2001; Williams dan Martin, 2002). Ini menunjukkan biopolimer mempunyai kelebihan tersendiri berbanding dengan produk sintetik yang konvensional. Polihidroksialkanoat (PHA) merupakan sejenis bioplastik poliester yang terdiri daripada polimer hidroksialkanoat yang dihasilkan sebagai bahan simpanan karbon dan tenaga dalam pelbagai mikroorganisma (Barnard dan Sander, 1989; Anderson and Dawes, 1990; Doi, 1990; Steinbüchel, 1991; Lee, 1996a; Sudesh *et al.*, 2000) dan boleh mencapai setinggi 90% berat kering sel (Madison dan Huisman, 1999). PHA disintesis dan dikumpulkan secara intrasel dalam granul, biasanya ia disintesis dalam keadaan yang terdapatnya faktor penghad komponen pertumbuhan dan dalam kehadiran sumber karbon yang berlebihan. Setakat ini, PHA telah dikenalpasti boleh

disintesis oleh pelbagai bakteria Gram negatif dan Gram positif daripada lebih kurang 75 genus yang berbeza (Reddy *et al.*, 2003). Di samping itu, lebih daripada 150 unit monomer yang berbeza telah dikenalpasti sebagai konstituen PHA yang hadir dalam bentuk homopolimer atau kopolimer (Steinbüchel dan Lütke-Eversloh, 2003).

Sesetengah bioplastik yang dihasilkan secara fermentasi bakteria telah digunakan secara komersial dalam pembuatan bekas makanan, plastik dan sebagainya. PHA merupakan salah satu sumber polimer yang digemari berdasarkan kepada sifat-sifatnya (Kenji *et al.*, 2003). PHA mempunyai sifat kimia dan fizikal (Lee *et al.*, 1999) yang menyerupai polimer sintetik dan boleh dibiodegradasi (Jendrossek *et al.*, 1996). Bioplastik adalah lebih baik daripada polimer petrokimia dalam beberapa aspek yang melibatkan bioserasi dan biodegradasi (Steinbüchel, 2001). Sejak kebelakangan ini, pelbagai jenis biopolimer yang sepadan dengan kehidupan manusia dan mesra kepada alam sekitar telah dijumpai. Sifat biodegradasi ini menjadikan PHA sejenis produk mesra alam yang mengurangkan pencemaran persekitaran. Sifat bioserasi PHA yang tidak mengakibatkan kesan negatif kepada pengguna membolehkan ia memainkan peranan yang penting dalam bidang bioperubatan (Lafferty *et al.*, 1988). Antara pelbagai bahan polimer biodegradasi, PHA merupakan pengganti plastik sintetik yang sesuai kerana ia mempunyai ciri-ciri fizikal yang hampir dengan polimer sintetik dan boleh wujud sebagai termoplastik, polimer berhabluran atau elastomer yang berbentuk getah serta kebolehan biodegradasi yang lengkap di bawah pelbagai keadaan persekitaran (Steinbüchel, 1992). Poliester ini termasuklah bahan yang keras dan rapuh seperti poli(3-hidroksibutirat) ke elastomer seperti poli(3-hidroksioktanoat). Komposisi monomer sesuatu PHA bergantung kepada strain bakteria, keadaan pengkulturan dan sumber karbon yang digunakan untuk pertumbuhan sel. Setiap poliester ini mempunyai ciri-cirinya yang tersendiri dan poliester ini boleh digunakan dalam pelbagai bidang yang boleh memanfaatkan manusia.

Mikroorganisma dapat menghasilkan biopolimer dalam pelbagai bentuk seperti homopoliester, kopoliester atau gabungan poliester (Steinbüchel, 2001). Poli(3-hidroksibutirat-*ko*-4-hidroksibutirat) [P(3HB-*ko*-4HB)] merupakan salah satu jenis kopoliester yang didapati mempamerkan sifat luar biasa dalam pelbagai kegunaan jika dibanding dengan jenis PHA yang lain. Kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) ialah sejenis polimer termoplastik yang bersifat elastomer, kenyal dan tidak mudah larut dalam air tanpa kehadiran mikroorganisma pengurai biopolimer. Sifat unik ini yang membezakan P(3HB-*ko*-4HB) daripada PHA lain yang rapuh, keras serta sensitif terhadap air (Saito *et al.*, 1996).

P(3HB-*ko*-4HB) boleh dihasilkan dalam pelbagai bentuk bahan polimer daripada plastik yang kristal kepada getah yang elastik dengan mengubahsuaikan komposisi monomer 4HB (Saito *et al.*, 1996). Selain daripada itu, kadar penguraian secara *in vivo* bagi P(3HB-*ko*-4HB) adalah tinggi secara relatif jika dibandingkan dengan polihidroksialkanoat yang lain dan ianya juga boleh dikawal dengan pecahan 4HB (Martin dan Williams, 2003). Di samping itu, P(3HB-*ko*-4HB) telah didapati mempunyai sifat mekanikal yang baik untuk digunakan dalam bidang perubatan dan farmaseutikal (Williams dan Martin, 2002). P(3HB-*ko*-4HB) dengan julat komposisi monomer yang luas dapat disintesis dengan menggunakan dua sumber karbon yang berbeza yang setiap satu untuk penghasilan 3HB dan 4HB. Sumber karbon yang biasa digunakan untuk menjana 3HB ialah fruktosa, sukrosa, glukosa dan asid butirik manakala 4HB pula dijana dengan menggunakan asid 4-hidroksibutirik, γ -butirolakton dan 1,4-butanadiol bergantung kepada jenis mikroorganisma (Lee *et al.*, 2004).

1.2 Polihidroksialkanoat (PHA)

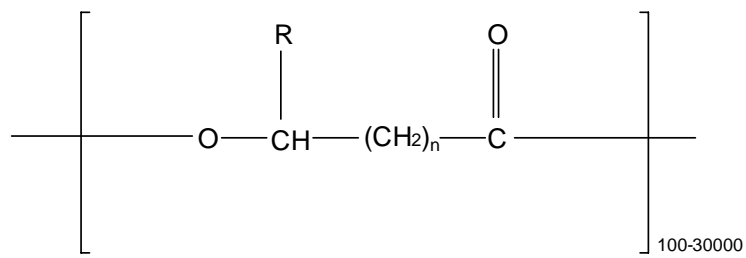
Polihidroksialkanoat (PHA) berasal daripada kumpulan poliester dan merupakan sejenis poliester semula jadi (Steinbüchel & Doi, 2001). PHA merupakan poliester mikrob yang aktif secara optik yang mengandungi unit monomer HA (Anderson dan Dawes, 1990). PHA mempunyai berat molekul yang tinggi iaitu di antara 200,000 hingga 3,000,000 Da yang berat molekulnya bergantung pada organisma penghasil dan juga keadaan pengkulturan (Anderson dan Dawes, 1990; Braunegg *et al.*, 1998). PHA merupakan biopolimer yang dapat disintesisikan oleh pelbagai bakteria dan disimpan dalam bentuk granul sebagai sumber karbon dan tenaga secara intrasel apabila nutrien tertentu adalah terhad (Anderson dan Dawes, 1990). Polimer PHA wujud dalam bentuk granul di dalam sitoplasma, berdiameter 0.2 hingga 0.7 μm dan ia boleh dilihat dengan jelas melalui mikroskop cahaya beza fasa (Dawes dan Senior, 1973). Granul poli(3-hidroksibutirat) [P(3HB)] merupakan PHA yang pertama dijumpai oleh Lemoigne pada tahun 1927 dalam *Bacillus megaterium* (Doi, 1990). Ia berfungsi sebagai bahan simpanan untuk karbon dan tenaga bagi bakteria penghasilnya (Macrae dan Wilkinson, 1958; Doudoroff dan Stanier, 1959). PHA yang mempunyai berat molekul yang tinggi dan berketerlarutan yang rendah membolehkan sel menyimpan sumber karbon terturun ini dalam kuantiti yang besar iaitu 8 hingga 12 granul dalam satu sel, tanpa menjejaskan tekanan osmosis terhadap sel (Dawes dan Senior, 1973; Anderson dan Dawes, 1990). PHA juga berfungsi sebagai takungan untuk tenaga penurunan atau pengawalatur redoks dalam sel (Senior dan Dawes, 1973). Nilai berat molekul PHA yang tinggi menunjukkan ciri polimer yang menyerupai plastik konvensional seperti polipropilena (Doi, 1990). Oleh itu, PHA boleh digunakan untuk menghasilkan bioplastik yang boleh diuraikan oleh mikroorganisma persekitaran yang mengeluarkan enzim hidrolase dan PHA depolimerase (Jendrossek *et al.*, 1996).

1.2.1 Kepelbagaian PHA

Pelbagai jenis PHA dalam bentuk homopoliester, kopoliester atau gabungan poliester boleh dihasilkan oleh bakteria penghasil PHA (Steinbüchel, 2001). PHA mempunyai pelbagai ciri-ciri fizikal iaitu dari sifat rapuh kepada fleksibel atau elastik, bergantung kepada struktur monomernya (Chen *et al.*, 1991; Byrom, 1992). Terdapat lebih daripada 300 jenis mikroorganisma yang diketahui mampu mensintesiskan PHA secara intrasel (Lee *et al.*, 1999). Kini, diketahui bahawa lebih daripada 160 jenis PHA telah dipencilkan daripada pelbagai bakteria yang mengandungi monomer, 3-hidroksialkanoat (3HA) yang berjulat dari asid 3-hidroksipropanoik sehingga kepada asid 3-hidroksiheksadekanoik (Merrick, 2002; Luengo *et al.*, 2003). Terdapat PHA yang terdiri daripada asid 3-hidroksialkenoik tak tepu yang mempunyai satu atau dua ikatan berganda dalam kumpulan alkil (R). PHA yang lain mempunyai 3HA dengan kumpulan metil pada kedudukan berbeza pada kumpulan alkil (R) dan setengahnya berlaku pada monomer bukan 3HA seperti pelbagai asid 4-, 5-, atau 6-hidroksialkanoik. Pelbagai kumpulan berfungsi seperti halogen, fenoksi, fenil dan siano juga boleh hadir pada sesuatu monomer (Steinbüchel dan Doi, 2001). Pengelasan jenis PHA telah diulas oleh Steinbüchel dan Valentin (1995). PHA yang mengandungi 3 hingga 5 atom karbon monomer dirujuk sebagai PHA berantai pendek (PHA_{SCL}) manakala PHA yang mengandungi 6 hingga 16 atom karbon dalam unit monomer pula dirujuk sebagai PHA berantai sederhana (PHA_{MCL}). Pelbagai PHA disintesiskan dengan suapan substrat prekursor seperti asid lemak atau karbon alifatik yang secara strukturnya berkaitan dengan konstituen monomer.

Ahli-ahli daripada kumpulan PHA merangkumi pelbagai jenis homopoliester seperti poli([R]-3-hidroksibutirat) [P(3HB)] dan poli([R]-4-hidroksibutirat) [P(4HB)] serta kopoliester seperti poli(3-hidroksibutirat-ko-4-hidroksibutirat) [P(3HB)-ko-4HB)], poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) [P(3HB-ko-3HV)] dan poli(3-hidroksiheksanoat-ko-

3-hidroksioktanoat) [P(3HHx-ko-3HO)] (Steinbüchel dan Lütke-Eversloh, 2003). PHA lain adalah seperti poli(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat-ko-4-hidroksibutirat) [P(3HB-ko-3HV-ko-4HB)] yang disintesisakan oleh *Ralstonia eutropha* (Madden *et al.*, 2000). Pelbagai jenis kopoliester didapati boleh dihasilkan jika suatu bakteria dikulturkan dalam medium yang mempunyai prekursor yang berbeza (Sudesh *et al.*, 2000). Daripada pelbagai jenis poliester yang dihasilkan, poli(3HB-ko-4HB) didapati mempunyai ciri-ciri istimewa seperti perubahan sifat fizikal, mekanikal dan biodegradasi yang ketara apabila komposisi 4HB meningkat berbanding dengan PHA yang lain. Dengan itu, kopolimer ini menunjukkan ciri bahan yang meluas dengan peningkatan komposisi 4HB. Struktur kimia am bagi PHA ditunjukkan dalam Rajah 1.1.



	Monomer
n = 1, R = hidrogen	3-hidroksipropionat
R = metil	3-hidroksibutirat
R = etil	3-hidroksivalerat
R = propil	3-hidroksiheksanoat
R = pentil	3-hidroksioktanoat
R = nonil	3-hidroksidodekanoat
n = 2, R = hidrogen	4-hidroksibutirat
R = metil	4-hidroksivalerat
n = 3, R = metil	5-hidroksivalerat
R = etil	5-hidroksiheksanoat
n = 4, R = heksil	6-hidroksidodekanoat

Rajah 1.1 : Struktur kimia am PHA dan sebahagian daripada monomer-monomernya (Lee, 1996a).

1.2.2 Granul PHA

Granul PHA terdiri daripada bahagian utama PHA yang amorfus dan hidrofobik yang dilingkungi oleh membran yang mengandungi protein dan lipid. Ia kelihatan sebagai badan elektron yang tumpat apabila diperhatikan melalui mikroskop elektron (Sudesh *et al.*, 2000). Membran granul PHA adalah terdiri daripada monolapisan lipid dan terdapat berbagai protein seperti PHA sintase (Haywood *et al.*, 1989; Gerngross *et al.*, 1994), PHA depolimerase (Griebel dan Merrick, 1971; Saito *et al.*, 1992) dan sekumpulan protein bukan katabolisme yang dikenali fasin. Protein fasin bertanggungjawab terhadap pembentukan granul PHA dan pengawalan saiz granul PHA secara *in vivo* (Steinbuchel *et al.*, 1995; Valentin *et al.*, 1998). Protein fasin telah dikenalpasti dalam beberapa jenis bakteria. Dalam *R. eutropha*, protein ini bersaiz 24 kDa yang dikodkan oleh lokus *phaP* telah dikenalpasti secara analisis genetik (Wieczorek *et al.*, 1995). Dalam organisma ini, protein berberat 24 kDa (GA24) ini merupakan komponen utama membran granul yang terikat kepada granul dan tidak bebas dalam sitoplasma serta merangkumi 5% daripada protein total sel di dalam sel yang mengandungi poli(3HB). Protein ini menentukan saiz dan bilangan poli(3HB) serta ia diperlukan untuk pembentukan poli(3HB) yang maksimum. Protein-protein yang serupa dengan fasin telah diterangkan dalam *Rhodococcus ruber* (GA14; Pieper-Fürst *et al.*, 1995), *Methylobacterium rhodococcus* (GA20 dan GA11; Föllner *et al.*, 1997), GA13 daripada *Acinetobacter* (Schembri *et al.*, 1995) dan protein GA14 daripada *Allochromatium vinosum*. Suatu model bagi pembentukan granul PHA telah dicadangkan oleh Madison dan Huisman (1999).

Granul PHA dapat dianalisis menggunakan teknik terkini iaitu secara mikroskopik daya atomik dan spektroskopik Raman kon-fokus (Luengo *et al.*, 2003). Selain itu, terdapat banyak cara untuk menganalisis komposisi dan struktur PHA dalam sel seperti analisis komposisi PHA dengan menggunakan kromatografi gas selepas pengekstrakan PHA

dalam pelarut dan pengesterifikasi hidrolitik polimer (Braunegg *et al.*, 1978), pirolisis dengan nitrogen bagi pengekstrakan PHA dan diikuti dengan analisis spektrometer jisim kromatografi gas serta pelbagai teknik NMR seperti ^1H dan ^{13}C (Doi, 1990). Selain dari itu, teknik kualitatif seperti pewarnaan biasa dilakukan sebelum granul diamati di bawah mikroskop fasa kontras atau floresen. Pewarnaan seperti Nile Blue A (Ostle dan Holt, 1982) dan Nile Red (Gorenflo *et al.*, 1999) digunakan untuk melihat kehadiran granul PHA dalam bakteria penghasil. Teknik pewarnaan menunjukkan Nile Blue A dan keadaan oxazon floresen Nile Red boleh digunakan untuk mengesan PHA secara terus pada koloni bakteria yang sedang tumbuh (Spiekermann *et al.*, 1999). Selain daripada kaedah pewarnaan digunakan untuk pengenalpastian PHA, analisis kimia juga digunakan untuk menentukan komposisi monomer PHA seperti kromatografi gas (GC) (Riis dan Mai, 1988) dan spektroskopi resonan magnetik nukleus (NMR) (Sudesh *et al.*, 2000). Apabila kromatografi gas digabungkan dengan pengesanan jisim, maklumat tentang jisim dan identiti monomer yang terlibat diperolehi (Rijk *et al.*, 2002). Sifat-sifat fizik seperti berat molekul dan suhu lebur bagi PHA juga boleh ditentukan dengan menggunakan pelbagai alatan seperti kromatografi penelapan gel (GPC) dan kalorimeter pengimbasan pembezaan (DSC).

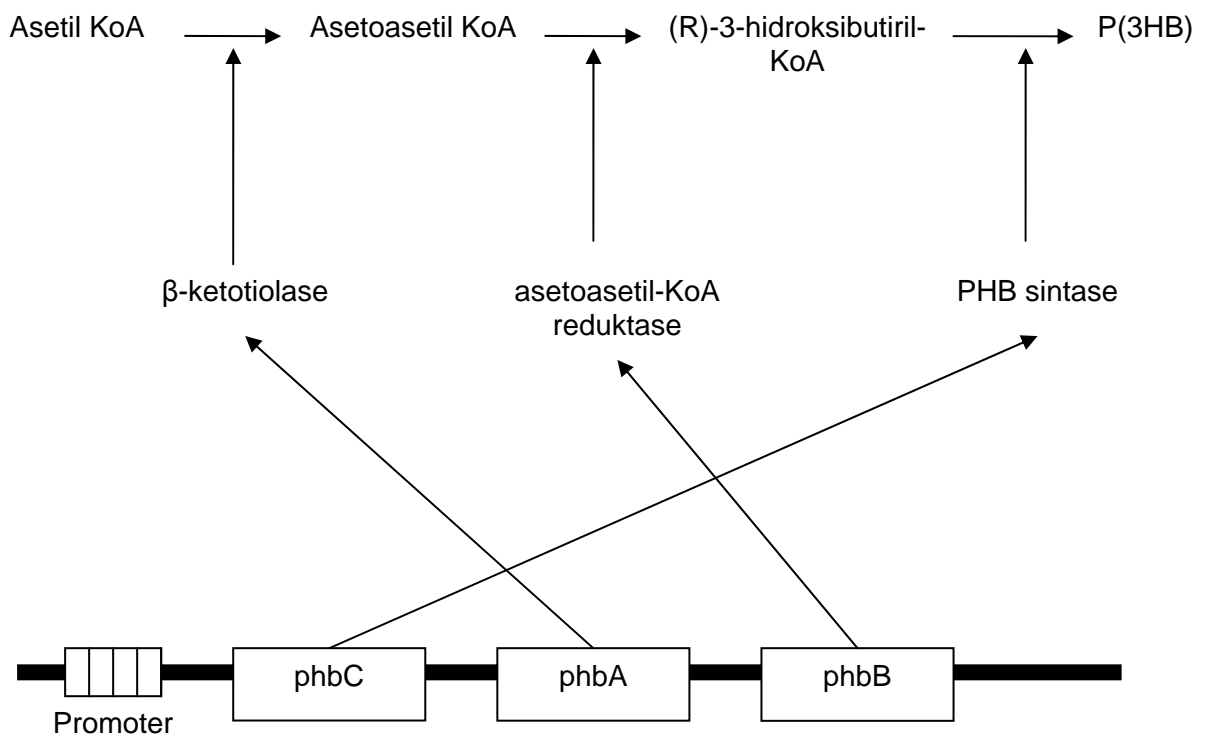
1.2.3 Biosintesis PHA

Biosintesis PHA pada umumnya melibatkan 2 langkah tindak balas enzim, yang pertama melibatkan pembekalan substrat monomer dan yang kedua adalah pempolimeran unit-unit monomer yang terbentuk (Taguchi *et al.*, 2002). Secara amnya sumber karbon yang dibekalkan dalam medium pengkulturan akan diasimilasi oleh mikroorganisma penghasil PHA dan ditukar kepada bahan perantaraan iaitu monomer. Enzim-enzim yang terlibat dalam biosintesis PHA akan menukarkan bahan-bahan perantaraan tersebut kepada PHA. Setiap jenis mikroorganisma yang berlainan akan mempunyai laluan biosintesis PHA yang berbeza. Namun, kebanyakan kajian telah menumpukan perhatian kepada laluan biosintesis P(3HB) yang merupakan laluan asas

bagi pembentukan PHA. Laluan biosintesis P(3HB) bagi *R. eutropha* ditunjukkan dalam Rajah 1.2.

Berbagai gen pengkodan enzim yang terlibat dalam pembentukan PHA telah diklonkan dan dicirikan daripada pelbagai mikroorganisma (Reddy *et al.*, 2003). Merujuk kepada laluan tersebut (Rajah 1.2), terdapat tiga jenis enzim yang memangkinkan tindak balas dalam biosintesis P(3HB). Gen bagi operon *phbCAB* didapati mengkodkan ketiga-tiga enzim ini (Madison dan Huisman, 1999). Proses ini dimulakan dengan dua molekul asetil-koenzim A (asetil-KoA) dikondensasi kepada asetoasetil-KoA. Proses ini dimangkinkan oleh enzim β -ketotiolase (pengkodan oleh *PhbA*). Asetoasetil-KoA kemudian diturunkan kepada enantiomer (R)-3-hidroksibutiril-KoA dengan tindakan enzim asetoasetil-KoA reduktase (pengkodan oleh *PhbB*). Akhir sekali, (R)-3-hidroksibutiril-KoA akan membentuk P(3HB) melalui tindak balas pempolimeran oleh enzim PHA sintase (pengkodan oleh *PhbC*) (Huisman *et al.*, 1989; Houmiel *et al.*, 1999).

Selain daripada enzim asetoasetil-KoA reduktase yang memainkan peranan dalam menyumbangkan monomer untuk pembentukan PHA, dua lagi enzim yang memainkan peranan yang sama telah dikenalpasti. Enzim-enzim tersebut ialah enzim transferase (R)-3-hidroksiasil-ACP-KoA (pengkodan oleh *PhaG*) dan enoil-KoA hidratase spesifik-R (pengkodan oleh *PhaJ*). Enzim transferase (R)-3-hidroksiasil-ACP-KoA dikenalpasti sebagai suatu penghubung metabolik yang menghubungkan biosintesis asid lemak *de novo* dan biosintesis PHA (Rehm *et al.*, 1998). Enzim ini memangkinkan tindak balas penukaran perantara biosintesis asid lemak (R)-3-hidroksiasil-ACP kepada terbitan KoA dan seterusnya menghasilkan (R)-3-hidroksiasil-KoA untuk pembentukan PHA.



Rajah 1.2 : Laluan biosintesis P(3HB) dan gen pengkodan enzim oleh *R. eutropha* (Madison dan Huisman, 1999; Reddy *et al.*, 2003)

Manakala enzim enoil-KoA hidratase spesifik-R pula telah dikenalpasti sebagai penukar bahan perantara pengoksidaan- β kepada unit monomer (R)-3-hidroksibutiril-KoA untuk biosintesis PHA dalam *A. caviae* (Fukui *et al.*, 1998). Enzim ini didapati menunjukkan aktiviti penghidratan spesifik-R terhadap trans-2-enoil-KoA dengan 4 hingga 6 atom karbon.

1.2.3.1 PHA sintase

Buat masa ini tidak kurang daripada 60 gen PHA sintase (phaC) dari pelbagai bakteria telah diklonkan dan diujukkan (Steinbüchel dan Lütke-Eversloh, 2003). Berdasarkan kepada struktur primer, kespesifikan substrat dan komposisi subunit yang didapati daripada jujukan ini, enzim-enzim PHA sintase dapat dikelaskan kepada tiga kelas yang berbeza dan ditunjukkan dalam Jadual 1.1. PHA sintase kelas I dan kelas II terdiri daripada enzim dengan hanya satu subunit (PhaC) dengan berat molekul di antara 61 kDa dan 73 kDa. Dari segi kespesifikan substrat didapati PHA sintase kelas I (*R. eutropha*) menggunakan tioester KoA dari pelbagai 3HA_{SCL} yang mengandungi 3 hingga 5 atom karbon, manakala PHA sintase kelas 2 (*P. aeruginosa*) pula menggunakan tioester KoA daripada pelbagai 3HA_{MCL} yang mengandungi sekurang-kurangnya 6 atom karbon. PHA kelas III (*A. vinosum*) pula terdiri daripada 2 subunit, pertama subunit PhaC (berat molekul lebih kurang 40 kDa) yang mengandungi kesamaan jujukan asid amino sebanyak 21 hingga 28% dengan kelas I dan yang kedua subunit PhaE (berat molekul lebih kurang 40 kDa) yang tidak mempunyai kesamaan dengan enzim PHA sintase. PHA sintase ini menggunakan tioester KoA bagi 3HA_{SCL} (Rehm dan Steinbüchel, 2002).

Namun begitu, terdapat beberapa sisihan yang berlaku daripada ketiga-tiga kelas PHA sintase yang diterangkan di atas. Enzim tersebut ialah enzim PHA sintase daripada *Thiocapsa pfennigii* (2 subunit berbeza dengan 85% kesamaan kepada PHA sintase kelas III), daripada *Aeromonas caviae* (satu subunit yang mempunyai 45%

Jadual 1.1: Tiga jenis kelas PHA sintase (Rehm dan Steinbüchel, 2002)

Kelas	Spesies	Bilangan subunit	Kespesifikan substrat (3HA-KoA)
I	<i>Ralstonia eutropha</i>	1 (PhaC)	C3-C5
II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (PhaC)	C6-C14
III	<i>Allochromatium vinosum</i>	2(PhaE/PhaC)	C3-C5

kesamaan dengan PHA sintase kelas I) dan daripada *Pseudomonas* sp. 61-3 (PhaC1 dan PhaC2 yang mempunyai 80% kesamaan dengan PHA sintase kelas II) dengan kespesifikan substrat tertentu (Rehm dan Steinbüchel, 2002). PHA sintase dari *T. pfennigii* telah dicirikan dengan julat substrat yang luas yang mengandungi tioester KoA bagi 3HA_{SCL} dan 3HA_{MCL} (Liebergesell *et al.*, 1993) manakala PHA sintase daripada *A. caviae* memangkinkan pempolimeran kopoliester bagi 3HB dan 3HHx (Fukui dan Doi, 1997). PHA sintase PhaC1 dan PhaC2 daripada *Pseudomonas* sp. 61-3 pula memangkinkan pempolimeran kopoliester 3HB dan 3HA_{MCL} (Matsusaki *et al.*, 1998). Walau bagaimanapun, kajian kespesifikan substrat secara *in vivo* bagi PHA sintase daripada *R. eutropha* yang dihasilkan dalam *E.coli* rekombinan menunjukkan bahawa PHA sintase kelas I mempunyai keupayaan menerima tioester 3HA_{MCL}-KoA sebagai substrat, apabila tioester ditambah secara *in vivo* (Dennis *et al.*, 1998; Antonio *et al.*, 2000). Pemerhatian ini menunjukkan bahawa PHA sintase menunjukkan kespesifikan substrat yang meluas.

1.2.3.2 Mekanisme PHA sintase

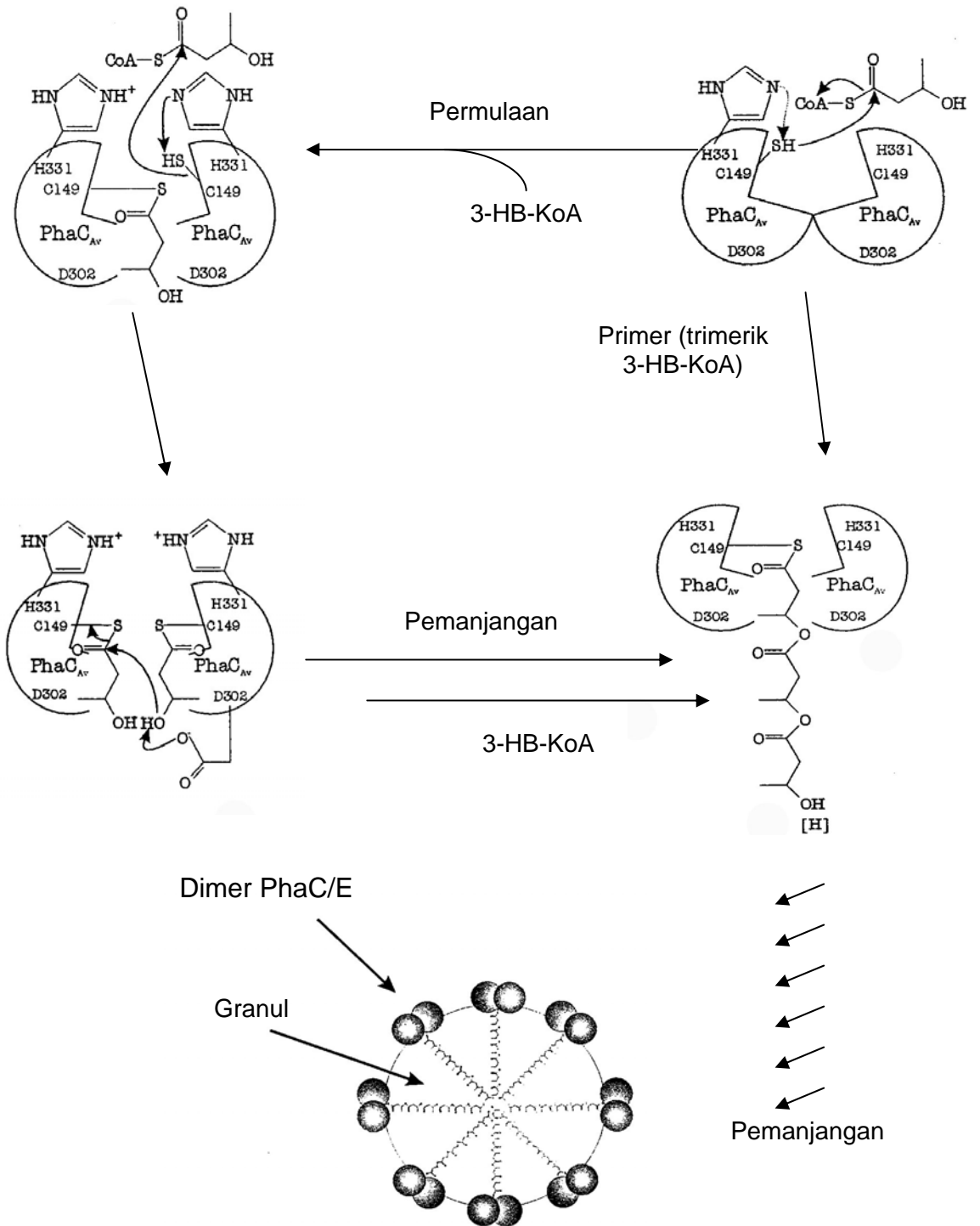
Pada awalnya postulat mekanisme pemangkinan enzim PHA sintase adalah berdasarkan mekanisme tindak balas bagi sintase asid lemak (β -ketoasil ACP sintase) (Griebel *et al.*, 1968; Griebel dan Merrick, 1971). Dalam model ini, dua kumpulan tiol telah dicadangkan memainkan peranan utama dalam pemangkinan kovalen. Satu kumpulan tiol bertindak sebagai tapak penambatan bagi 3HB-KoA manakala kumpulan yang kedua bertindak sebagai tapak pengikatan dan pemanjangan. Residu sisteina (Cys319 dalam PHA sintase *R. eutropha* dan Cys149 bagi PHA sintase *A. vinosum*) telah ditunjukkan terlibat dalam pemangkinan kovalen ini (Wodzinska *et al.*, 1996; Müh *et al.*, 1999).

Namun begitu, pembangunan model struktur bagi PHA sintase *A. vinosum* berdasarkan homologi lipase dan analisis mutasi residu-residu pada PHA sintase telah

membawa kepada suatu cadangan mekanisme pemangkinan yang baru untuk PHA sintase (Jia *et al.*, 2000). Berdasarkan model ini, residu asid amino Cys149, Asp302 dan His331 (kedudukan berpandukan PHA sintase *A.vinosum*) telah dikenalpasti berada berdekatan dengan struktur utama pada model yang dicadangkan serta tapak aktif putatif Cys149 berada pada siku bebenang heliks (Rajah 1.3). Oleh kerana PHA sintase menggunakan sisteina sebagai nukleofil tapak aktif, pemangkin bes His331 pula hanya bertindak sebagai pengaktif nukleofil seperti mana yang ditunjukkan bagi protease sisteina (Chen *et al.*, 1998). Walau bagaimanapun, pemangkin bes yang kedua, Asp302 dalam PHA sintase diperlukan untuk mengaktifkan kumpulan 3-hidroksil pada 3HB-KoA atau membolehkan 3HB yang terikat kepada tindakan nukleofilik pada enzim terasil (Rajah 1.3). Fungsi Asp302 ini telah dikaji dengan mutan spesifik dan didapati Asp302 memainkan peranan utama dalam pemanjangan rantai (Jia *et al.*, 2000). Mekanisme pemangkinan berdasarkan lipase ini memberikan suatu model yang baik untuk semua jenis PHA sintase seperti mana yang dinyatakan secara analisis mutasi bagi PHA sintase kelas I *R. eutropha* (Jia *et al.*, 2001) dan boleh digunakan untuk membangunkan model struktur berasaskan lipase bagi PHA sintase kelas II daripada *P. aeruginosa* (Rehm dan Steinbüchel, 2002).

1.2.3.3 Laluan-laluan bagi biosintesis PHA

Sejak kebelakangan ini, berbagai laluan metabolik ke arah penyumbangan monomer hidroksialkanoat untuk biosintesis PHA telah dikenalpasti. Biosintesis PHA oleh mikroorganisma kebanyakannya bergantung kepada jenis sumber karbon yang dibekalkan. Secara umumnya, sumber karbon boleh dirujuk sebagai sumber karbon yang berkaitan dan tidak berkaitan dengan monomer PHA. Sumber karbon berkaitan bermaksud sumber karbon yang menghasilkan monomer PHA dengan struktur kimia yang sama atau hampir sama dengan sumber karbon yang dibekalkan. Manakala

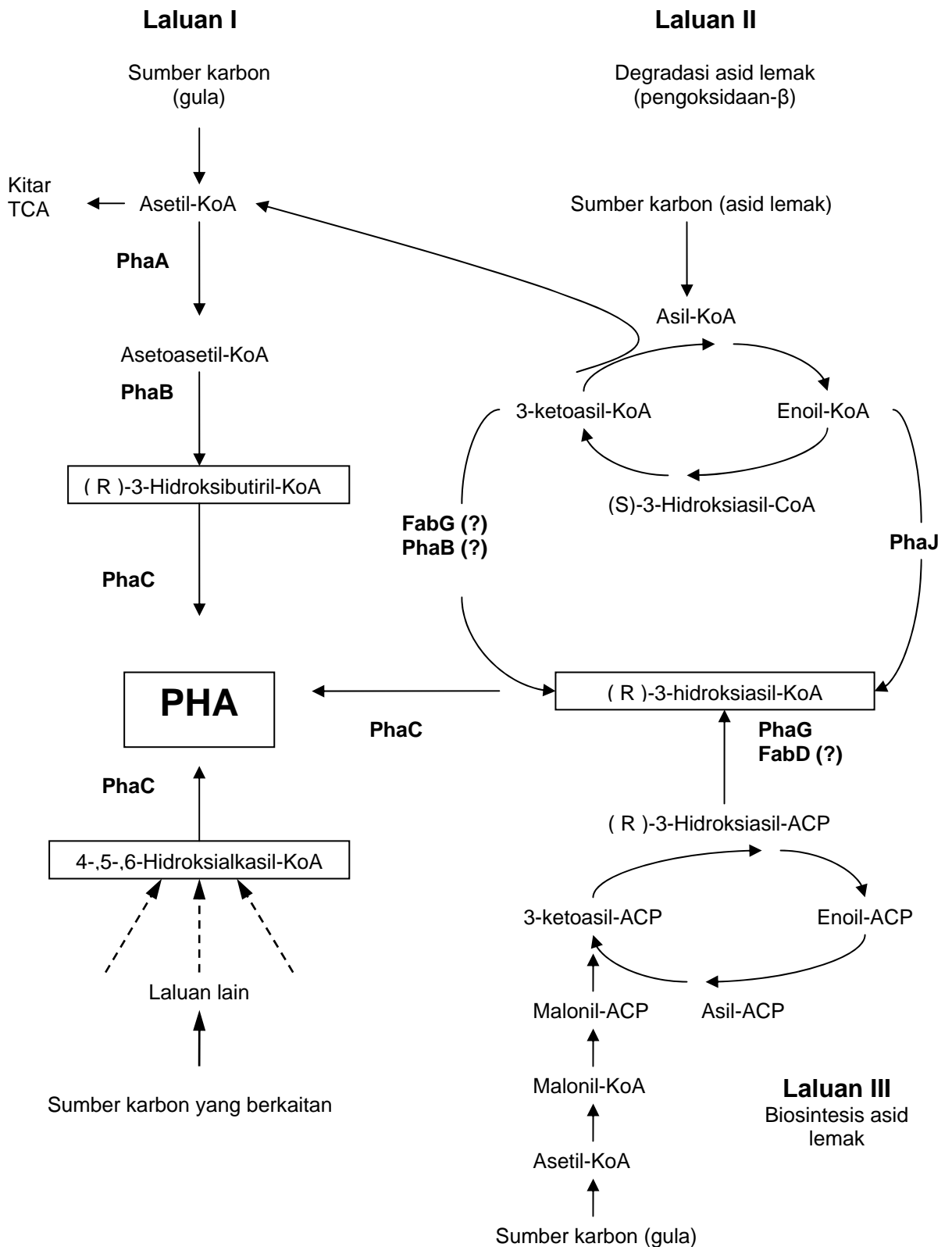


Rajah 1.3: Cadangan mekanisme pemangkinan berasaskan lipase bagi PHA sintase kelas III dalam *A. vinosum* (Rehm dan Steinbüchel, 2002).

sumber karbon yang tidak berkaitan pula membekalkan monomer hidroksialkanoat dengan struktur yang berlainan jika dibandingkan sumber karbon yang dibekalkan. Perbezaan ini adalah disebabkan oleh jenis laluan yang terdapat dalam sesuatu mikroorganisma (Taguchi *et al.*, 2002).

Tiga jenis laluan utama yang terlibat dalam biosintesis PHA diringkaskan dalam Rajah 1.4 (Taguchi *et al.*, 2002). Laluan I yang mana menghasilkan monomer 3HB hasil daripada kondensasi asetil-KoA yang terdapat secara meluas dalam mikroorganisma. Laluan ini tidak bergantung kepada jenis sumber karbon yang dibekalkan, asetil-KoA dapat dihasilkan dalam semua hidupan dan ini menerangkan mengapa P(3HB) terdapat secara meluas dalam sampel-sampel dari persekitaran. Dalam sesetengah bakteria seperti *Rhodospirillum rubrum*, suatu langkah tambahan melibatkan dua enzim enoil-KoA hidratase diperlukan untuk menukar (S)-isomer bagi 3-hidroksibutiril-KoA kepada jenis (R)-isomer yang merupakan isomer yang boleh digunakan oleh enzim PHA sintase (Moskowitz and Merrick, 1969). Tidak seperti enzim NADH-asetoasetil-KoA reduktase bagi *R. eutropha* (PhaB_{re}) menghasilkan secara langsung (R)-3-hidroksibutiril-KoA. Keadaan serupa ditunjukkan oleh enzim yang sama dalam *A. vinosum* menghasilkan isomer jenis R bagi 3-hidroksibutiril-KoA (Steinbüchel and Fuchtenbusch, 1998).

Berdasarkan kajian yang menunjukkan asid lemak adalah sumber karbon sesuai bagi biosintesis PHA, laluan yang melibatkan metabolisme asid lemak didapati boleh menghasilkan pelbagai monomer hidroksialkanoat untuk biosintesis PHA (Lageveen *et al.*, 1988). Penggunaan asid lemak oleh bakteria memerlukan induksi terkawal enzim-enzim dalam laluan pengoksidaan- β asid lemak. Oleh kerana PHA sintase hanya aktif terhadap isomer R yang bergabung dengan KoA, bahan perantara bagi pengoksidaan- β asid lemak (laluan II) perlulah ditukar. Enzim yang terlibat dalam penukaran telah dikenalpasti dan dicirikan pada aras genetik. Antaranya ialah protein PhaJ (enoil-KoA



Rajah 1.4: Laluan-laluan metabolik yang menyumbangkan berbagai monomer hidroksialkanoat untuk biosintesis PHA. PhaA, β-ketotilase; PhaB, NADPH-asetoasetil-KoA reduktase; PhaC, PHA sintase; PhaG, 3-hidroksiasil-ACP-KoA transferase; PhaJ, (R)-enoil-KoA hidratase; FabD, malonil-KoA-ACP transasilase; FabG, 3-ketoasil-ACP reduktase (Taguchi *et al.*, 2002)

hidratase spesifik –R), yang gennya ditemui berkluster dengan gen lain yang terlibat dalam biosintesis PHA pada *A. caviae* (Fukui dan Doi, 1997; Fukui *et al.*, 1998).

Terdapat juga sesetengah bakteria yang berupaya menghasilkan PHA berantai sederhana, poli(HA_{MCL}) daripada asid lemak, juga mampu membekalkan R-3-hidroksibutiril-KoA daripada glukosa dan sumber karbon yang tidak berkaitan (Huijberts *et al.*, 1992). Biosintesis PHA daripada glukosa dalam bakteria-bakteria ini adalah berkaitan dengan laluan biosintesis asid lemak (laluan III) (Huijberts *et al.*, 1994). Didapati beberapa strain *Pseudomonas* menghasilkan PHA_{MCL} yang monomer utamanya ialah R-3-hidroksidekanoat dan lain-lain monomer sampingan seperti 3-hidroksiheksanoat, 3-hidroksioktanoat dan 3-hidroksidodekanoat apabila dikulturkan dalam sumber karbon yang tidak berkaitan. Kesamaan komposisi PHA yang terbentuk dalam pelbagai sumber karbon yang tidak berkaitan menunjukkan bahawa bahan perantara yang terdapat dalam metabolisme substrat tersebut juga merupakan prekursor dalam sintesis monomer PHA. Kemungkinan besar bahan perantara tersebut adalah asetil-KoA. Penghasilan pelbagai monomer bagi biosintesis PHA daripada sumber karbon yang tidak berkaitan dan ringkas merupakan suatu faktor yang penting dalam penghasilan PHA dengan kos yang murah. Berdasarkan penemuan ini, laluan biosintesis asid lemak merupakan sesuatu yang mendapat perhatian. Dalam usaha menyumbangkan perantara yang sesuai bagi biosintesis asid lemak untuk biosintesis PHA, perantara R-3-hidroksiasil perlu ditukar daripada protein pembawa asil (ACP) kepada bentuk KoA. Kehadiran enzim yang terlibat telah lama diketemui dan gen (PhaG) telah dikenalpasti terlibat dalam penukaran ini. Penemuan enzim transasilase asil-ACP-KoA telah menghubungkan di antara sintesis asid lemak dengan biosintesis PHA (Rehm *et al.*, 1998).

Selain daripada tiga laluan utama yang diterangkan, terdapat juga laluan lain yang menyumbangkan 4-hidroksialkasil-KoA dalam proses penghasilan poli(4HA). Antara

yang pernah dilaporkan adalah 4-hidroksibutirat (Doi, 1990), 4-hidroksivalerat (Valentin dan Steinbüchel, 1995), 4-hidroksiheksanoat (Valentin *et al.*, 1994), 4-hidroksiheptanoat dan 4-hidroksioktanoat (Valentin *et al.*, 1996). Penghasilan PHA yang terdiri daripada monomer 4HB hanya dapat dilakukan dengan menggunakan sumber karbon yang berkaitan seperti asid 4-hidroksibutirik, 1,4-butanadiol dan γ -butirolakton (Saito dan Doi, 1994a).

1.2.4 Fisiologi metabolisme PHA

Keadaan persekitaran dan fisiologi sel memainkan fungsi utama dalam regulasi sintesis dan degradasi PHA. Kehadiran sumber karbon, nitrogen dan oksigen mempengaruhi metabolisme PHA. Secara umumnya, polimer dihasilkan dengan banyak dalam medium yang terdapat kelebihan sumber karbon dan tenaga untuk organisma tetapi sumber nitrogen yang berkurangan (Doudoroff, 1966). Kesan keadaan pengkulturan ke atas metabolisme PHA dilaporkan pertama kali oleh Macrae dan Wilkinson (Macrae dan Wilkinson, 1958). Pemerhatian mereka menunjukkan bahawa peningkatan nisbah karbon kepada nitrogen (C/N) meningkatkan pengumpulan PHA. Ini mencadangkan bahawa kelakuan mengumpul PHA merupakan satu tindak balas terhadap pertumbuhan sel yang tidak seimbang akibat daripada kekurangan sesuatu nutrien.

Pengumpulan PHA didapati berlaku apabila sel kekurangan satu set nutrien yang lengkap untuk pembahagian sel tetapi mempunyai sumber karbon yang berlebihan (Dawes dan Senior, 1973). Biosintesis PHA berlaku disebabkan kekurangan nutrien terutamanya nitrogen dalam *R. eutropha* (Anderson dan Dawes, 1990; Doi, 1990; Steinbüchel dan Schlegel, 1991). Di samping itu, kekurangan nutrien seperti magnesium, sulfat, fosfat (Dawes dan Senior, 1973; Repaske dan Repaske, 1976; Anderson dan Dawes, 1990; Schembri *et al.*, 1995) dan/atau oksigen (Oeding dan

Schlegel, 1973; Page dan Knosp 1989; Manchak dan Page, 1994) juga mempengaruhi pengumpulan PHA dalam sel.

Pada mulanya, PHA dikaitkan dengan pensporaasi bakteria secara fisiologi (Slepecky dan Law, 1961). Kajian menunjukkan bahawa biosintesis PHA berlaku sebelum pensporaasi dan penggunaan semula PHA pula mendahului proses pensporaasi. Walau bagaimanapun, pengumpulan PHA tidak selalu dihubungkan dengan pensporaasi kerana tidak semua penghasil spora menghasilkan polimer. Namun sekiranya terdapat pengumpulan PHA, ianya menjadi sumber karbon dan tenaga yang tersedia untuk proses pensporaasi (Emeruwa dan Hawirko, 1973). Bagi kebanyakan bakteria penghasil PHA, fungsi utama PHA ialah sebagai sumber karbon dan tenaga yang boleh digunakan sewaktu berlaku kekurangan makanan. PHA merupakan sumber karbon dan tenaga yang merupakan bahan simpanan yang ideal kerana keterlarutan yang rendah dan berat molekul yang tinggi tanpa menjejaskan tekanan osmotik sel secara signifikan (Dawes dan Senior, 1973; Anderson dan Dawes, 1990).

Di samping itu, terdapat bakteria-bakteria seperti *A. latus* (Hrabak, 1992) dan strain mutan *Azotobacter vinelandii* (Page dan Knosp, 1989) diketahui mengumpul PHA sewaktu fasa pertumbuhan tanpa kekurangan sebarang nutrien penting. Penghasilan PHA pada fasa pertumbuhan akan menyebabkan berlakunya persaingan dalam pengagihan sumber karbon dan tenaga bagi pertumbuhan sel bakteria. Dengan itu, kecekapan penghasilan PHA akan menurun (Ramsay *et al.*, 1992). Dua keadaan yang diterangkan di atas menunjukkan bahawa biosintesis PHA dalam sel berlaku pada fasa yang berlainan. Satu keadaan di mana pengumpulan PHA berlaku semasa fasa pertumbuhan apabila kekurangan nutrien yang penting, contohnya dalam sel *R. eutropha*. Manakala dalam *A. latus*, pengumpulan PHA berlaku semasa fasa pertumbuhan eksponen.

Selain PHA bertindak sebagai sumber karbon dan tenaga simpanan, kajian juga menunjukkan bahawa ianya menjadi takungan untuk tenaga penurunan atau pengawalatur redoks dalam sel (Senior dan Dawes, 1973). Fungsi PHA ini jelas untuk ahli-ahli Azotobacteriaceae semasa kekurangan oksigen. Contohnya biosintesis P(3HB) dalam sel *A. beijerinckii* yang kekurangan oksigen memberikan sel-sel tersebut suatu mekanisme untuk mengoksidakan semula tenaga penurun (NADH) (Senior dan Dawes, 1973). Langkah-langkah penurunan dalam laluan biosintesis PHA bertindak sebagai takungan elektron untuk tenaga penurun yang terkumpul semasa berlakunya pergerakan elektron melalui rantai pemindahan elektron yang tidak sempurna akibat daripada kekurangan oksigen. Di samping itu, PHA juga dicadangkan bertindak sebagai sumber tenaga untuk proses pengikatan nitrogen secara simbiosis dalam *Rhizobium* sp. (Karr *et al.*, 1984) dan *Bradyrhizobium* (McDermott *et al.*, 1989). Dua peranan yang mungkin untuk proses degradasi PHA semasa berlakunya pengikatan nitrogen dalam *Rhizobium* sp. iaitu memberi perlindungan kepada nitrogenase semasa berlakunya peningkatan kepekatan oksigen dalam nodul dan kedua bertindak sebagai sumber karbon dan tenaga semasa berlaku kebuluran di luar nodul. PHA juga dicadangkan berfungsi dalam pengawalaturan tenaga penurunan untuk operasi nitrogenase (McDermott *et al.*, 1989).

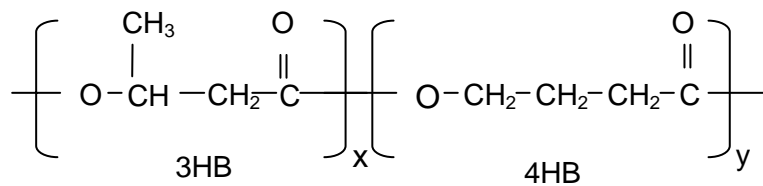
1.3 Poli(3-hidroksibutirat-ko-4-hidroksibutirat) [P(3HB-ko-4HB)]

Poli(3-hidroksibutirat-ko-4-hidroksibutirat), [P(3HB-ko-4HB)] merupakan sejenis kopolimer yang buat pertama kali dijumpai dalam *Ralstonia eutropha* (dahulu dikenali sebagai *Alcaligenes eutrophus*) pada tahun 1988 (Kunioka *et al.*, 1988). Kopolimer P(3HB-ko-4HB) dapat dihasilkan oleh *R. eutropha* daripada substrat karbon seperti asid 4-hidroksibutirik, asid 4-klorobutirik, γ -butirolakton, 1,4-butanadiol dan 1,6-heksanadiol (Doi *et al.*, 1989; Kunioka *et al.*, 1989). Kopolimer ini boleh dihasilkan dengan kepelbagaian kandungan polimer yang luas iaitu daripada plastik kristal yang keras kepada getah yang elastik bergantung kepada komposisi monomer 3HB dan

4HB (Saito *et al.*, 1996). PHA terdiri daripada komposisi monomer yang berlainan yang memberikan potensi yang amat tinggi sebagai bahan mudah terurai dan kopolimer poli(3-hidroksibutirat-*ko*-4-hidroksibutirat) merupakan salah satu daripadanya (Sudesh *et al.*, 1998).

1.3.1 Struktur dan sifat

Struktur kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) ditunjukkan dalam Rajah 1.5.



Rajah 1.5 : Struktur kopolimer P(3HB-*ko*-4HB)

Kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) merupakan sejenis PHA yang terdiri daripada 2 monomer berbeza iaitu monomer 3HB dan monomer 4HB. Kopolimer ini mempunyai kualiti yang lebih tinggi berbanding dengan homopolimer kerana ia lebih bersifat elastomer dan kenyal jika dibandingkan dengan homopolimer P(3HB) (Doi, 1990). Ciri-ciri fizikal kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) yang mempunyai 0 hingga 100 mol% 4HB menunjukkan kebolehannya sebagai bahan biodegradasi dan kadar penguraian terhadap kopolimer itu adalah tinggi dengan kehadiran komposisi 4HB (Saito *et al.*, 1996). Disebabkan 4HB merupakan monomer yang linear, ia mempunyai keistimewaan tambahan iaitu ia boleh diurai dengan menggunakan enzim lipase dan depolimerase (Saito dan Doi, 1994). Selain itu, sifat-sifat fizik polimer seperti sifat kristaliniti, suhu lebur (T_m), suhu peralihan kaca (T_g) dan sifat-sifat mekanikal seperti tegangan tensil bagi kopolimer P(3HB-*ko*-4HB) juga berubah bergantung kepada komposisi 4HB yang hadir (Saito dan Doi, 1994b). Ciri-ciri fizikal P(3HB-*ko*-4HB) dengan komposisi 4HB yang berbeza ditunjukkan dalam Jadual 1.2.

Jadual 1.2: Ciri-ciri fizikal dan terma P(3HB-ko-4HB) dengan komposisi 4HB yang berbeza (Saito dan Doi, 1994a)

Ciri-ciri	P(3HB-ko-4HB) dengan pecahan 4HB										
	0	3	7	10	16	27	64	78	82	90	100
Takat lebur (°C)	178	-	172		130	-	50	49	52	50	53
Suhu peralihan kaca (°C)	4	-	-2		-7	-	-35	-37	-39	-42	-48
Kekristalan (%)	60	55	50	45	45	40	15	17	18	28	34
Kekuatan tensil (MPa)	43	28	-	24	26	-	17	42	58	65	104
Pemanjangan sewaktu putus (%)	5	45	-	242	444	-	591	1120	1320	1080	1000