مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1390، دوره سوم، شماره نهم، صفحه 12-7

بررسی تولید آزمایشگاهی پلی هیدروکسی بوتیرات در برخی باسیلوسهای مزوفیل و ترموفیل جداسازی شده از خاک

عباس اخوان سپهی[1]، زینب هدایتی مایوان[1]، آنیتا خنافری[1]

1. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی.

نویسنده مسؤول: دکتر عباس اخوان سپهی. بخش میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
Akhavansepahy@Gmail.com

دریافت: 90/4/3 پذیرش: 90/6/26

چکیده

زمینه و هدف: پلیمرهای سنتتیک که از مواد نفتی ساخته می شوند به علت تجزیه ناپذیربودن مدت طولانی در خاک باقیمانده و موجب آلودگی خاکها می شوند، به این دلیل تولید پلی بتا هیدروکسی بوتیرات که از جمله پلیمرهای قابل تجزیه زیستی است اهمیت زیادی دارد. این پلیمر در بیش از **20** جنس باکتریایی از جمله: *باسیلوس*، *ازتوباکتر*، *آلکالی ژنز*، *سودوموناس*، *ریزوبیوم* و *رودوسپیریلیوم* به عنوان منبع ذخیره کربن و انرژی تولید می شوند. در این راستا هدف از انجام این تحقیق تولید این پلیمر در جدایه باسیلوس می باشد.

روش بررسی: دراین مطالعه **11** سویه از جنسهای مزوفیل *باسیلوس* که در دمای **30** درجه سانتی گراد و **7** سویه از جنسهای ترموفیل *باسیلوس* که در **50** درجه سانتی گراد رشد می کردند از خاک جنگل گلستان به روش پورپلیت جداسازی شدند. تولید پلیمر در این سویه ها ابتدا با روشهای اسپکتروفوتومتری بررسی شد و سپس با روشهای گازکروماتوگرافی جرمی و **FT-IR** تایید شد.

یافته ها: محدوده تولید پلیمر در مزوفیلها **% 72/6-48/70** و در ترموفیلها **84/3-39/21** درصد وزن خشک سلولی بود. بیشترین میزان تولید در مزوفیلها در سویه B_{11} با **48/70 %** و در ترموفیلها در سویه B_4 با **39/21%** بود. بهترین دور شیکر و دما برای سویه منتخب مزوفیل دور **200** و **32** درجه سانتی گراد و برای ترموفیل B_4 دور **200** و دمای **45** درجه بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نیازهای غذایی ساده و وفور اعضای جنس *باسیلوس* در خاک، می توان در آینده و با استفاده از فرمانتور از این دو سویه به عنوان یکی از تولیدکننده های این پلیمر استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس*، بیوپلیمر، مزوفیل، ترموفیل، گازکروماتوگرافی جرمی

www.SID.ir

مقدمه

امروزه پلاستیک ها در تولید انواع فرآورده های صنعتی، از صنعت خودرو سازی گرفته تا دنیای پزشکی به کار گرفته می شوند. این ترکیبات بسیار مفید بوده چون پلیمرهای سنتزی با ساختار قابل دستورزی اند و محدوده وسیعی از ساختار و استحکام را دارند (1). پلاستیک ها، باتوجه به تحقیقات انجام شده به علت خواص فیزیکی، مکانیکی و همچنین به علت سازگاری با بدن حتی در عمل های جراحی نیز دارای کاربرد وسیع می باشند. (7) اما نکته نامطلوب در کاربرد این ترکیبات، سخت تجزیه پذیری آنهاست. پلاستیک ها جزء زنوبیوتیک ها بوده و نسبت به تجزیه میکروبی مقاوم هستند (2). با توجه به هشدارهای سازمان های مختلف زیست محیطی در مورد مشکلات ناشی از رها شدن پلاستیک در طبیعت، در سالهای اخیر کوشش های قانونی برای جلوگیری از دورریز پلاستیک های تجزیه ناشدنی، افزایش یافته است. این کوشش ها صنعت گران پلاستیک را وا داشته تا در پی پلاستیک هایی باشند که پیامدهای زیست محیطی کمتری دارد (3). از میان پلاستیک های قابل تجزیه که تاکنون تهیه گردیده گروهی تحت عنوان PHAs (Polyhydroxyalkanoates) و کوپلیمرهای آن که بالغ بر چهل نوع ترکیب است به علت قابلیت تجزیه پذیری کامل، انعطاف پذیری، مقاومت 100% در برابر آب، پایین بودن نسبی هزینه تولید و همچنین سادگی فرآیند نسبت به سایر پلیمرهای زیستی تخریب پذیر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (4). این نوع بیوپلاستیک که به صورت گرانول در داخل سلول میکروارگانیسم تجمع یافته، تاکنون در انواعی از میکروارگانیسم ها شامل انواع گرم مثبت و منفی شناسایی گردیده است. از میکروارگانیسم هایی که توانایی تولید PHAs را دارند می توان به گونه های *باسیلوس*، *ازتوباکتر*، *سودوموناس*، *آلکالی ژنز* و برخی از هالوفیل ها اشاره کرد (5). یکی از مهمترین ترکیبات گروه PHAs پلی هیدروکسی بوتیرات می باشد. این پلیمر اولین بار در سال 1925 توسط میکروبیولوژیستی به نام لمون در انستیتو پاستور پاریس، کشف شد (6). در این تحقیق تولید بیوپلیمر در جدایه هائی از *باسیلوس* که از خاک جداسازی شدند مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

جمع آوری نمونه ها: در این پژوهش ابتدا از عمق 5 تا 15 سانتیمتری (ریزوسفر) خاک منطقه ای با طول جغرافیایی 35 و عرض 15و ارتفاع 5 پارک جنگلی استان گلستان با دمای 22 درجه سانتی گراد و pH=7/4 و با رعایت شرایط سترون، 7 نمونه خاک به منظور جداسازی و تخلیص بهترین جدایه *Bacillus* برای تولید PHB جمع آوری شد و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

روش جداسازی و شناسایی: برای جدا سازی میکروارگانیسم های مولد پلی هیدروکسی بوتیرات از نمونه های خاک، از محیط کشت نوترینت آگار به روش پورپلیت استفاده شد، و کلنی های تک از رقت های 10^{-7} و 10^{-8} جدا و تخلیص گردید. نمونه های مزوفیل در دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت و نمونه های ترموفیل در دمای 45 درجه سانتی گراد به مدت 48 ساعت گرماگذاری شدند. جدایه های *باسیلوس* پس از تجدید کشت در محیط نوترینت آگار خالص شد و سپس با استفاده از تست های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی سودان بررسی شدند.

سنجش میزان PHB تولید شده توسط جدایه *باسیلوس*: ازکلیه سلول هایی که تولید پلی بتا هیدروکسی بوتیرات در آنها با روش کیفی رنگ آمیزی سودان تایید شده بود، جهت تعیین میزان تولید پلی 3-هیدروکسی بوتیرات از روش توصیه شده توسط Quillaguaman استفاده شد (8). سوسپانسیونی در محیط کشت نوترینت براث مطابق با شاهد نیم مک فارلند تهیه و در انکوباتور شیکردار با دمای 30 درجه برای نمونه های مزوفیل و دمای 45 درجه برای نمونه های ترموفیل، با دورچرخش 200 rpm گرماگذاری گردید،30 میلی لیتر از محیط های تلقیح شده فوق بعد از 48 ساعت، به مدت 20 دقیقه در دور 4000 سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل دوبار با آب تقطیر شسته شده و در نهایت در دمای 75 درجه خشک و وزن آن تعیین گردید. برای آنالیز کمی، سلول های خشک شده حاوی پلی بتا هیدروکسی بوتیرات درون سلولی با استفاده از اسیدسولفوریک غلیظ هیدرولیز شدند. برای این منظور 10 میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ، به بیومس خشک شده در لوله های در پیچ دار افزوده شد و به مدت یک ساعت در بن ماری 100°C نگهداری گردید و حداکثر جذب نوری (λmax)

www.SID.ir
Archive of SID

در nm 235 بررسی و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (9).

PHB% = Absorbance in 235 nm / CDW ×10ml × 100

CDW= بیومس بر حسب میلی گرم
10 ml= حجم اسید سولفوریک در رقیق سازی اول

روش تایید تولید پلی بتا هیدروکسی بوتیرات شامل روشهای ذیل می باشد.

روش GC-Mass (Gas Chromatography): دانه های پلی بتا هیدروکسی بوتیرات برای آنالیز آماده شدند (10). ابتدا از کشت خالص باکتری مولد، سوسپانسیون با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد و از آن به محیط کشت مایع به میزان 1% تلقیح صورت گرفت. ارلن های مایر تلقیح شده نمونه های مزوفیل در دمای 30 درجه سانتی گراد و نمونه های ترموفیل در دمای 45 درجه و با دورrpm 200 گرماگذاری شدند. سپس 5 میلی لیتر از محیط کشت واجد باکتری در rpm 4000 به مدت 30 دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و بیومس حاصل دوبار با آب مقطر شسته شد. 2 میلی لیتر کلروفرم به همراه cc 0/85محلول متانول-اسید بنزوئیک (برای آماده سازی محلول، اسید بنزوئیک به 1 میلی لیتر متانول اضافه می شود) و 0/15 میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به بیومس در لوله اضافه شده و نمونه ها در دمای 100°C به مدت 15 دقیقه در داخل بن ماری قرار گرفتند. بعد از خنک شدن، نمونه ها به مدت 2 دقیقه هم زده شده و برای مدت 1 دقیقه در وضعیت سکون قرار گرفت تا فازهای تشکیل شده از هم جدا شوند. بعد از تشکیل دو فاز آبی و آلی کاملا مجزا، از فاز پائینی (فاز آلی) که واجد پلیمر محلول در کلروفرم بود، به میزان µl 1/2 به دستگاه GC تزریق شد. لازم به ذکر است که 0/002 گرم نمونه استاندارد پلی بتا هیدروکسی بوتیرات هم به روش فوق آماده سازی شد و بعد از استخراج جهت تایید روش به کار رفته برای GC برده شد. در این روش متیل استرهای مونومری با دستگاه Variancp-3800 gas chromatograp اندازه گیری شدند.

روش FT-IR: سوسپانسیون میکروبی از سویه های منتخب مزوفیل و ترموفیل که بیشترین میزان تولید PHB را داشتند به روش بالا تهیه شد و برای آنالیز کمی توسط دستگاه SHIMADZU FT/IR ساخت کشور ژاپن برده شد. بهینه سازی شرایط رشد برای تولید بیشینه بیوپلیمر در جدایه های منتخب مزوفیل و ترموفیل *باسیلوس* بصورت بررسی عوامل زیر انجام شد.

دما: محیط کشت نوترینت براث پایه تهیه و پس از افزودن کشت تلقیح به نسبت 4% محیط ها در محدوده دمایی25، 30، 32، 35، 37 برای سویه های مزوفیل و برای سویه های ترموفیل در محدوده دمایی 37، 40، 45، 50 و 55 درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند، سپس میزان تولید PHB با روش Quillaguaman تعیین گردید.

میزان هوادهی: محیط کشت نوترینت براث پایه تهیه و پس از افزودن کشت تلقیح به نسبت 4% محیط ها در دور چرخش 100، 150، 200 و 250 گرماگذاری شدند، سپس میزان تولید PHB با روش Quillaguaman تعیین گردید.

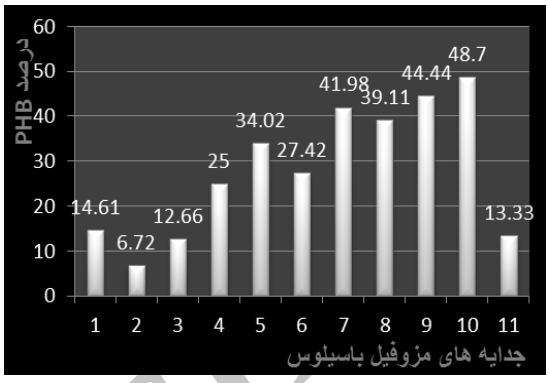
میزان کشت تلقیح: در این مرحله میزان تلقیح سوسپانسیون میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون میکروبی با غلظت 1%، 2%، 3%، 4%، 5%، 6% به کشت نوترینت براث تلقیح شد و در دمای 30 برای نمونه مزوفیل و 45 درجه سانتی گراد برای نمونه ترموفیل و دور rpm 200 گرماگذاری شدند، سپس میزان تولید PHB با روش Quillaguaman تعیین گردید. در همه مراحل فوق، به عنوان شاهد یک محیط کشت نوترینت براث استریل مورد استفاده قرار گرفت (11).

یافته ها

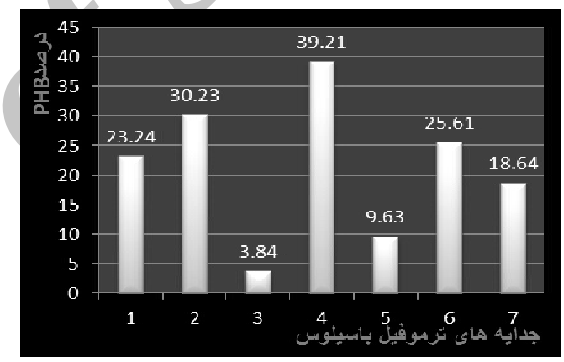
در این تحقیق ابتدا 11 جدایه مزوفیل و 7 جدایه ترموفیل *باسیلوس* از خاک جداسازی و تخلیص شدند و تولید پلی بتا هیدروکسی بوتیرات با استفاده از تست های اولیه و تائیدی از جمله رنگ آمیزی سودان مورد بررسی قرار گرفت و بهترین جدایه از نظر تولید PHB جدایه مزوفیل B_{11} و جدایه ترموفیل B_4 تعیین گردید. بیشینه میزان تولید PHB در جدایه مزوفیل B_{11} به میزان 48/70 % و در جدایه ترموفیل B_4 به میزان 39/21 % تعیین شد (نمودار 1و2). نتایج بیوشیمیایی حاصل از جدایه مزوفیل B_{11} که شامل (هیدرولیز ژلاتین، کازئین،

Archive of SID
www.SID.ir

نشاسته و لیستین مثبت، تخمیر قندهای مانیتول، آرابینوز و گزیلوز مثبت، تست حرکت مثبت و واکنش VP منفی) شباهت زیاد آنرا به اعضای *Bacillus megaterium* نشان می دهد.

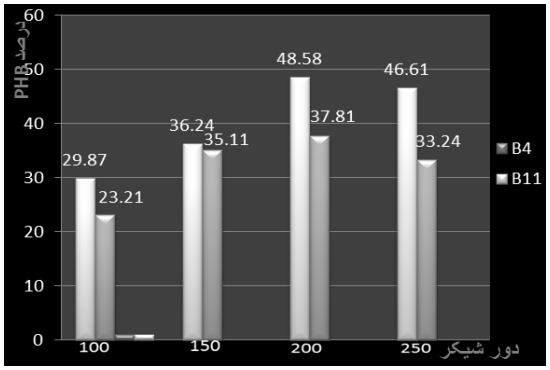


نمودار 1، میزان درصد تولید PHB در جدایه های مزوفیل *باسیلوس*

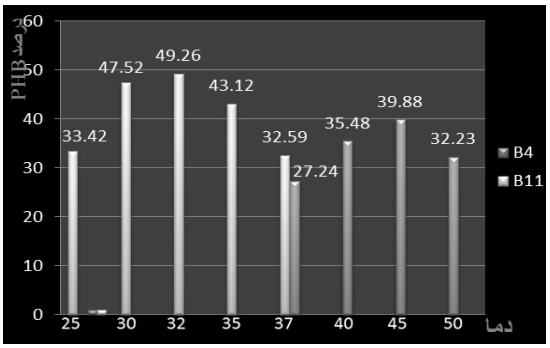


نمودار2، میزان درصد تولید PHB در جدایه های ترموفیل *باسیلوس*

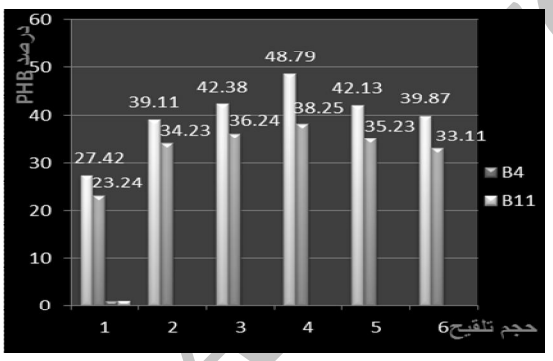
در مراحل بعد بهبود روش های کشت و شرایط رشد در جهت تولید بالاتر بیوپلیمر در جدایه منتخب مزوفیل (B_{11}) و جدایه منتخب ترموفیل (B_4) انجام گرفت، ابتدا با تغییر میزان تلقیح سوسپانسیون میکروبی، بهینه ی میزان تلقیح به دست آمد (نمودار 5). پس از بهینه سازی فاکتورهای محیطی مانند دور شیکر و دما، طی مراحل مختلف به محیط کشت باکتریها بررسی شد (نمودار 3 و 4)، و بهترین دور شیکر 200rpm و بهترین دما برای جدایه مزوفیل 32 درجه و برای جدایه ترموفیل 45 درجه تعیین شد و با تغییر میزان تلقیح از 1% تا 6%، بهینه میزان تلقیح سوسپانسیون میکروبی غلظت 4% تعیین گردید و در این غلظت بیشینه رشد باکتری و تولید بیوپلیمر مشاهده شد.



نمودار 3، اثر دور شیکر در تولید PHB در جدایه B_{11} و B_4



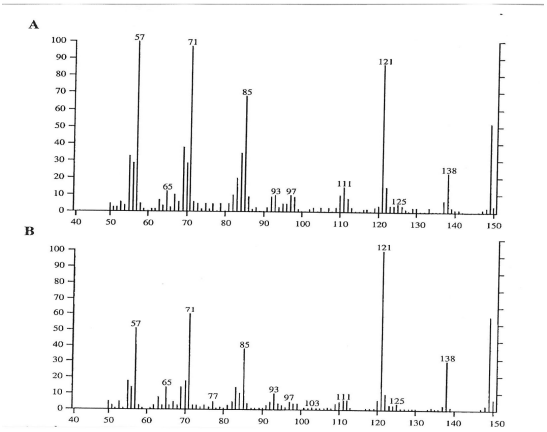
نمودار 4، اثر دما در تولید PHB در جدایه B_{11} و B_4



نمودار 5، اثر حجم تلقیح در تولید PHB در جدایه B_{11} و B_4

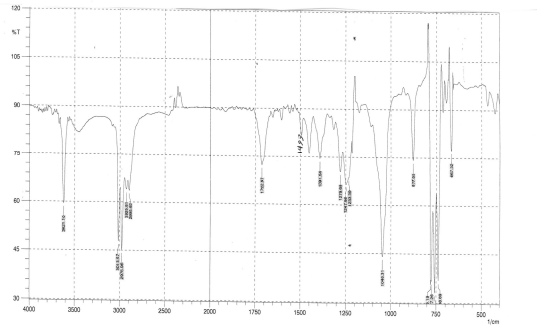
پلیمر به دست آمده و همچنین پلی 3-هیدروکسی بوتیراتی که به عنوان شاهد تهیه شده بودند، از فاز آلی (محلول کلروفرم) جدا شده و به دستگاه GC-Mass تزریق شد، در نهایت نمودار A به دست آمده و مقایسه آن با نمودارحاصل از نمونه شاهد (نمودار B)، نشان دهنده و تایید کننده وجود پلی هیدروکسی بوتیرات بود.

www.SID.ir

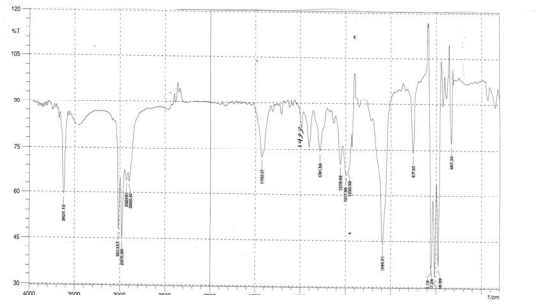


A نمودار GC-Mass حاصل از جدایه مزوفیل و ترموفیل
B نمودار GC-Mass حاصل از نمونه استاندارد پلی بتا هیدروکسی بوتیرات

همچنین پلیمر بدست آمده و محلول در کلروفرم به دستگاه FT-IR نیز تزریق شد و نمودار بدست آمده واجد باند جذبی در $1722,67Cm^{-1}$ بود که مربوط به گروه کربونیل (C=O) و در $1279,68\ Cm^{-1}$ مربوط به گروه CH– است که منعکس کننده ساختار PHB است.



نمودار حاصل از جدایه مزوفیل با دستگاه SHIMADZU FT/IR و استاندارد اعمال شده کلروفرم



نمودار حاصل از جدایه ترموفیل با دستگاه SHIMADZU FT/IR و استاندارد کلروفرم

بحث

در این پژوهش جداسازی سویه ای از *باسیلوس* بومی منطقه جنگل گلستان مد نظر قرار گرفت که بیشترین مولد پلی هیدروکسی آلکانات و بطور ویژه پلی هیدروکسی بوتیرات بوده است. در ادامه جدایه B_{11} و B_4 که بیشترین میزان تولید را نشان داد، شناسایی شده و اثر عوامل مختلف روی رشد و تولید پلیمر در آن بررسی شد. سپس جدایه های فوق از نظر صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی، ریخت شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی ها نشان دادند که باکتری B_{11} و B_4 باکتریهای هتروتروف، هوازی، گرم مثبت بوده و با توجه به خصوصیاتی از قبیل (وجود اسپور، واکنش کاتالاز و واکنش گرم) شباهت کامل به اعضای جنس *Bacillus* را نشان دادند. نتایج به دست آمده در این تحقیق، توانایی جدایه *باسیلوس* جداسازی شده از خاک به منظور تولید بیشینه پلی بتا هیدروکسی بوتیرات را نشان می دهد. جدایه مزوفیل در محیط کشت نوترینت آگار و دمای 30 و دور چرخش 200 rpm با میزان تولید 48/70%، و جدایه ترموفیل در دمای 45 درجه و دور چرخش 200rpm بیشترین میزان تولید بیوپلیمر یعنی 39/21% را نشان دادند و این نتایج با بررسی و مقایسه با سوسپانسیون باکتری کشت داده شده در محیط نوترینت براث و شرایط دما بدست آمد.

PHB در میان بیش از بیست جدایه باکتریایی از جمله *Rhizobium*، *Azotobacter*، *Bacillus*، *Beijerinckia*، *Pseudomonas*، *Alcaligenes* و *Rhodospirillum* دیده شده است، در میان جدایه های *باسیلوس* بیشترین میزان PHB در *B.megateriumY6* با (48,13%) و کمترین میزان آن در *B.subtilis* سویه K1 مشاهده شده است (12).

در طی بررسی انجام شده بر روی سویه های گوناگون *Cyanobacter* و در محیط BG11 بین65/00-10/80 % و در محیط Allen 85/45-11/89 % PHB مشاهده شده است. در بررسی دیگری بر روی تولید PHB در *Lactobacillus* و *Stereptococcus* نشان داد که میزان تولید PHB در جدایه های *Lactobacillus* 0/93-0/90%. و *Streptococcus* 5/47-21/15 % می باشد و بیشترین میزان تولید PHB در *S .thermophilus Ba21S* (21/15w/v %) گزارش شده است (13). Ghatnekar و همکارانش در سال 2002 نشان دادند که می توان PHB را در *Methylobacterium sp V49* با تغییر محیط کشت (محلول 5% SDS) به میزان 98%

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش داد (14). خنافری و همکاران در سال 2006 نشان دادند که می توان با کشت باکتری *ازتوباکتر* در محیط Whey broth در درجه حرارت 35 درجه سانتی گراد و 122rpm، میزان PHB را به 4 ml/lit رساند (15). Aslim و همکاران در سال 2002 با جایگزین کردن 1% گلوکز در محیط کشت جدایه *Bacillus* میزان PHB را 2/64-1/56µg تخمین زدند (16). شایان ذکر است کم شدن سرعت جریان کربن در چرخه تری کربوکسیلیک اسید (TCA)، عاملی برای بالا بردن حجم سلول و تجمع PHB است. به علت ویزگی های مفید، پلی هیدروکسی آلکانوات ها می توانند برای کاربردهای تکنیکی فراوانی به کار گرفته شوند چون این ترکیبات ترموپلاستیک هایی الاستومر، غیر سمی و تجزیه پذیر زیستی بوده و می توانند از منابع قابل تجدید تولید شوند (17). کوپلیمر پلی (3- هیدروکسی بوتیرات- 3- هیدروکسی والرات)، که با نام تجاری Biopol به فروش می رسد و هموپلیمر PHB، با فرمانتاسیون موتانت های مصرف کننده گلوکز باکتری *C.necator H16* به دست می آیند. این مواد زیستی از منابع قابل تجدید ایجاد شده و می توانند برای تولید مواد بسته بندی تجزیه پذیر زیستی مثل بطری و فویل به کار روند. همچنین کاربردهای بسیار زیادی برای این دسته از بیوپلیمرها پیشنهاد شده است که می توان به موارد زیر اشاره کرد. تولید بیوتکنولوژیک و نانو، کاربرد اکولوژیک، کاربردهای پزشکی، کاربردهای قلبی- عروقی، پیچ های پریکارد، افزایش رگ ها، دریچه های قلب، کاربردهای دندانی و آرواره ای، بازسازی هدایت شده بافت، بازسازی هدایت شده استخوان، ایمپلنت ها و قرص ها، حاملین ذره ای، پیش دارو، تعمیر اعصاب، استفاده در تغذیه، تغذیه انسان و حیوانات، ارتوپدی، اورولوژی، رسیدگی به زخم ها، نخ بخیه، ذرات پودری، زخم بندی و ترمیم بافت نرم (18).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که از میان 11 جدایه مزوفیل، جدایه B_{11} و از میان 7 جدایه ترموفیل، جدایه B_4 کاندیدهای بومی تولید بیشینه بیوپلیمر در شرایط بهینه رشد می باشد و با تغییر شرایط رشد باکتری (دما، میزان هوادهی، میزان تلقیح) می توان تولید بیوپلیمر را به میزان محسوس افزایش داد.

References

1. Madison LL, Huisman GW. *Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates) from DNA to plastic*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999; (63):1 21-53.
2. Flecher A. *Plastics from bacteria and for bacteria : PHA as natural, biodegradable polyesters*. Springer Verlag, New York.1993;pp: 77-93.
3. Warmer Bulletin, Special Report, No-43, November 1994,
4. Kumagai Y. *Enzymatic degradation of binary blends of microbialpoly (3-Hydroxy butyrate) with enzymatically active polymers*, Polym.Degrad. Stab. 37.1992; pp:253-256.
5. Hocking PJ, Marchessault RH. Biopolyesters In: Chemistry and Technology of Biodegradablepolymers. Chapman and Hall: London. 1994; pp: 48-96.
6. Griffin GJL. Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers. Chapman & Hall; London.1994; pp: 125-120.
7. Pelissero A. Update on Biodegradable Plastics Materials. Imballaggio. 1987; pp: 38-54.
8. Quillaguamán J, Doan-Van T, Guzmán H, Guzmán D, Martín J, Everest A, Hatti-Kaul R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by Halomonas boliviensis in fed-batch culture. Appl Microbiol Biotechnol. 2008; 78(2):227-32.
9. Choi J, Lee SY. Process Analysis and Economic Evaluation for poly-3-hydroxybutyrate Production by Fermentation. Bioprocess Eng. 1997; 17(6): 335-342.
10. Ataei SA. Determination of Effective Factors on the production of poly-hydroxyalkanoates by Activated Sludge. [disserration]. Tarbiat Modares Univ; 2005.
11. Lilli J.G, Rodriguez-Valera F. Effect of Culture Conditions on Poly-β-hydroxybutyrate Production by Haloferax mediterranei . Appl Environ. Microbiol, 1990, 56:2517-2521.
12. Aslim B, Caliskan F, Beyatli Y, Gunduz U, Poly-β-hydroxybutyrate Production by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Letters. 1998; 159: 293-297.
13. Yuksekdag Z, Beyatli Y. Production of Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) in Different Media by Streptococcus thermophilus Ba21S Strain. 2007; 74:981-986.
14. Ghatnekar MS, Pai J, SGanesh M. Production and Recovery of Poly-3-hydroxybutyrate From Methylobacterium SP V49. 2002; 77(4): 444-448.
15. Khanafari A, Akhavan Sepahei A, Mogharab M. Production and Recovery of poly-β-hydroxybutyrate from Whey Degradation by Azotobacter spIran. J. Environ. Health. Sci. Eng. 2006;3(3): 193-198.
16. Aslim B, Yuksekdag Z, Beyatil Y. Determination of PHB Growth Quantities of Certain Bacillus Species Isolated From Soil. Turkish Electronic Journal of Biotechnology. 2002; 24-30.
17. Philip S, Keshavarz T, Roy I. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers with a Range of Application. J Chem Technol Biotechnol. 2007; 82: 2333-247.
18. Williams SF, Martin DP. Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy. In: Steinbuchel A, Marchessault Rh eds. Biopolymers for Medical Pharmaceutical Applications. Wiley: Weinheim; 2005; pp: 125-89.

Archive of SID
www.SID.ir