Archive of SID

مطالعه اثر چربیهای اشباع و غیراشباع در تولید پلاستیک های دوستدار طبیعت توسط باکتری سویه بومی *Azotobacter chroococcum*

عباس اخوان سپهی[1*]، نسیم رمضانی[2]، آنیتا خنافری[1]

۱- دانشیار و عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی
۲- کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نهران شمال، دانشکده علوم پایه، رشته میکروب شناسی
(تاریخ دریافت: 89/5/16 تاریخ پذیرش: 89/7/22)

چکیده

کوپلیمر پلی بتا هیدروکسی آلکانات (PHAs) یکی از مهم ترین پلاستیک های زیست-تجزیه پذیر بوده که شناخته شده ترین مشتق آن پلی بتا هیدروکسی بو تیرات (PHB) می باشد. در این تحقیق به منظور دستیابی به این نوع از پلیمرها، ابتدا باکتری *Azotobacter* از خاک جدا و تخلیص گردید. با تغییر شرایط محیط کشت از جمله تغییر منابع کربن شامل چربیهای اشباع و غیر اشباع (اسید پالمتیک، روغن زیتون، روغن کرچک، روغن کنجد، روغن جوانه ی گندم، روغن بادام، روغن بادام شیرین، روغن نارگیل، روغن مار، روغن سیاهدانه، روغن مورد، روغن گردو، پارافین، اسید استئاریک، اسید اولئیک، گلیسیرین، روغن بابونه)، ازت، دما، درجه سانتیگراد و هوادهی شرایط رشد، جهت تولید بهینه بیوپلیمر مورد بررسی قرار گرفت. بررسی میزان تولید PHB با استفاده از روش های کمی و کیفی از جمله سنجش جذب نوری و روش گاز کروماتوگرافی (GC) انجام شد. در بین 10 جدایه ازتوباکتر جدایه Az7 توانایی تولید 80/793 ٪PHB را داشت. بیشترین میزان تولید این بیوپلیمر 84/48 ٪ در شرایط 2٪ روغن بادام به عنوان منبع کربن، 1٪ عصاره مخمر بعنوان منبع ازت، هوادهی 200rpm و دمای 33 °C مشاهده گردید. به نظر می رسد جدایه AZ7 با توانایی تولید 90-80٪ بیوپلیمر در شرایط مختلف رشد، نسبت به سویه های مشابه خارجی کاندید بومی مناسبی جهت تولید PHB باشد.

کلید واژه گان: *Azotobacter*، بیوپلیمر، چربیهای اشباع و غیر اشباع، پلاستیک های زیست تجزیه پذیر، PHB

1- مقدمه

در سالهای اخیر توجه زیادی به اثرات مضر پلاستیک های تولیدی صنایع پتروشیمیایی معطوف شده است. در واقع مکانیسم سوخت و ساز طبیعی نمی تواند روی آلوده کننده های جدید (به علت ساختار ناشناخته آنها برای طبیعت) عمل کند. این امر کشورهای زیادی را به توسعه روش های حذف آنها در طبیعت واداشته است. روشهای زیادی برای حذف پلاستیک ها از طبیعت استفاده گردیده است که از آن دسته می توان سوزاندن، بازیافت و تولید پلاستیک های تجزیه پذیر را نام برد.

کوپلیمر پلی بتا هیدروکسی آلکانات (PHAs) و مشتق پلی استری آن (پلی هیدروکسی بوتیرات PHB) بعنوان یکی از مهم ترین پلاستیک های زیست تجزیه پذیر شناخته شده است. این بیوپلیمر که بوسیله ی بسیاری از باکتری ها نظیر جدایه های *Rhodospirillum*, *Alcaligenes*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomona*, *Azotobacter*

* مسئول مکاتبات: akhavansepahy@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

تولید و در درون سلول ذخیره می شود.
کارایی و صرفه اقتصادی فرایند تولید انبوه پلی هیدروکسی بوتیرات، تحت تاثیر سویه باکتریایی، فرایند تخمیر و خالص سازی و منابع مغذی به کار رفته در طی تولید قرار دارد بنابراین جستجو برای یافتن باکتری های جدید که بصورت بالقوه توا نایی تولید مقادیر بالایی از پلیمررا دارند و تلاش برای بهبود شرایط تولید در آنها امری اجتناب پذیر است[1]. در این راستا هدف از انجام این تحقیق حاضر تغییر منابع چربی اشباع و غیراشباع در تولید بهینه PHB در جدایه ازتوباکتر می باشد.

2- روش بررسی

2-1- جمع آوری نمونه ها:

در این پژوهش ابتدا از عمق 5 تا 15 سانتیمتری خاک مناطق مختلف پارکهای جنگلی استان تهران ، با رعایت شرابط سترون،10 نمونه از خاک نواحی مختلف به منظور جداسازی و تخلیص بهترین جدایه *Azotobacter* برای تولید PHB جمع آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

2-2- روش جداسازی و شناسایی:

برای جداسازی میکروارگانیسم مولد پلی –بتا- هیدروکسی بوتیرات از نمونه های خاک، از محیط مانیت آگار (20 گرم مانیتول، 3 گرم کربنات کلسیم، 0/5 گرم سولفات منیزیم ،0/25 گرم فسفات منوپتاسیم، 0/75 گرم فسفات دی پتاسیم، 0/04گرم سولفات آهن، 0/02 مولیبدات سدیم20 گرم آگار (pH~7)) به روش کشت غربالی (Biotest) استفاده شد. نمونه ها در دمای30 °C به مدت 48 ساعت گرما گذاری گردید. جدایه ی *Azotobacter* پس از تجدید در محیط کشت مانیت آگار خالص گردید، سپس با استفاده از تست های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی سودان تایید شدند.

2-3- نگهداری جدایه ها:

برای این منظور جدایه های خالص شده به محیط کشت مانیت براث حاوی ٪ 1 گلیسیرین انتقال داده شده، پس از رشد در دمای 30 °C به مدت 48 ساعت در دور rpm 4000 سانتریفیوژ گردید. سپس از رسوب حاصل به لوله های اپندورف انتقال داده شد و به آن skim milk 10٪ و گلیسیرین اضافه گردید و در دمای20°C- نگهداری گردید[2].

2-4- سنجش میزان PHB تولید شده توسط جدایه ازتوباکتر

ازکلیه سلول هایی که تولید پلی – بتا- هیدروکسی بوتیرات در آنها با روش کیفی رنگ آمیزی سودان سیاه تایید شده بود، جهت تعیین میزان تولید پلی – 3- هیدروکسی بوتیرات از روش توصیه شده توسط Quillaguaman استفاده شد[3]. سوسپانسیونی در محیط کشت مانیت براث مطابق با شاهد نیم مک فارلند تهیه شد و در انکوباتور شیکردار با دمای۳۳ °C و دور چرخش۲۰۰ rpm گرماگذاری گردید. ۳۰ میلی لیتر از محیط های تلقیح شده فوق بعد از ۴۸ ساعت، به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. رسوب حاصل دوبار با آب دوبار تقطیر شسته شده و در نهایت دردمای۷۵ °C خشک و وزن آن تعیین گردید.
برای آنالیز کمی، سلول های خشک شده حاوی پلی – بتا- هیدروکسی بوتیرات درون سلولی با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ هیدرولیز شدند . برای این منظور ۱۰ ml اسید سولفوریک غلیظ، به بیومس خشک شده در لوله های در پیچ دار افزوده شد و به مدت یک ساعت در بن ماری100 °C نگهداری گردید و حداکثر جذب نوری (λmax) در طول موج 235 nm بررسی و با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید[4].

PHB% = Absorbance in ۲۳۵ nm / CDW / ۱۰ml * ۱۰۰

CDW= بیومس بر حسب میکروگرم

۱۰ml = حجم اسید سولفوریک در رقیق سازی اول

2-5- روش تایید تولید پلی – بتا- هیدروکسی بوتیرات

- روش**GC** (**Gas Chromatography**) دانه های پلی – بتا- هیدروکسی بوتیرات با استفاده از روش

www.SID.ir

Archive of SID

(عطایی و همکاران (2008) با تغییرات) برای آنالیز GC آماده شدند[5].

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 در دمای°C ۳۳ و با دور rpm ۲۰۰ گرماگذاری شدند.

سپس ۵ml از محیط کشت واجد باکتری درrpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شده و بیومس حاصل دو باربا آب دوبار تقطیر شسته شد. ۲ml کلروفرم به همراه 0.85 cc محلول متانل، اسید بنزوئیک (برای آماده سازی محلول متانول ، اسید بنزوئیک به ۱ml متانول اضافه می شود) و 0/15 ml اسید سولفوریک غلیظ به بیومس در لوله اضافه شده و نمونه ها در دمای°C ۱۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در داخل بن ماری قرار گرفتند. بعد از خنک شدن، نمونه ها به مدت ۲ دقیقه هم زده شده و برای مدت ۱ دقیقه در وضعیت سکون قرار گرفتند تا فازهای تشکیل شده از هم جدا شوند. بعد از تشکیل دو فاز آبی و آلی کاملا مجزا، از فاز پایینی (فاز آلی) که واجد پلی مر محلول در کلروفرم بود. به میزان 1/2µl 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 SHIMADZU GAS chromatograph ,GC-14A اندازه گیری شدند [5].

2-6- رسم منحنی رشد باکتری بر حسب میزان تولید PHB:

در این مرحله، جدایه ای که تولید بالاتر را نشان می داد انتخاب شد. ابتدا سوسپانسیونی از ازتو باکتر در محیط کشت مانیت براث و مطابق با شاهد نیم مک فارلند تهیه و در انکوباتور شیکردار با دمای °C 33 و دور 200 rpm گرماگذاری گردید. میزان رشد باکتری هر' 120 یکبار با استفاده از روشهای اسپکتوفتومتری در طول موج nm 600 و تعیین وزن خشک محاسبه گردید . میزان PHB تولید شده در هر مرحله با روش Quillaguaman تعیین شد.

2-7- بهینه سازی شرایط رشد برای تولید بیشینه بیوپلیمر در جدایه منتخب از توباکتر

2-7-1- منبع کربن

به منظور بررسی نقش منابع مختلف کربن بر میزان تولید بیوپلیمر، از محیط پایه مانیت براث استفاده شد و تنها منبع کربن محیط (مانیتول) از محیط کشت حذف گردید و جدایه منتخب ازتوباکتر بر روی محیط های حاوی هفده روغن (اسید پالمتیک، روغن زیتون، روغن کرچک، روغن کنجد، روغن جوانه ی گندم، روغن بادام، روغن بادام شیرین، روغن نارگیل، روغن مار، روغن سیاهدانه، روغن مورد، روغن گردو، پارافین، اسید استئاریک، اسید اولئیک، گلیسیرین، روغن بابونه) بطور جداگانه کشت داده شد و در دمای°C 33 و دور 200rpm برای مدت 48 ساعت گرماگذاری شد. طبق روش Quillaguaman ، میزان تولید پلی –بتا– هیدروکسی بوتیرات در هر یک از محیط ها با منابع کربن مختلف بررسی شد.

در این مرحله، به عنوان شاهد یک محیط کشت براث استریل حاوی روغن مورد نظر، مورد استفاده قرار گرفت.

2-7-2- منبع نیتروژن

به منظور بررسی نقش منابع نیتروژن مختلف بر میزان تولید بیو پلیمر، به محیط مانیت براث پایه منابع ازت آلی شامل پپتون، اوره، عصاره مخمرو ازت معدنی شامل آمونیوم استات و سولفات آمونیوم به میزان 1٪ اضافه گردید.

2-7-3- دما

محیط کشت مانیت براث پایه حاوی مناسبترین منابع کربن تهیه و پس از افزودن کشت تلقیح به نسبت ۲٪محیط ها در محدوده دمایی 30،27، 33، 35، 40 درجه سانتیگراد گرماگذاری شدند، سپس میزان تولید PHB با روش Quillaguaman تعیین گردید.

2-7-4- میزان هوادهی: محیط کشت مانیت براث پایه حاوی مناسبترین منابع کربن تهیه و پس از افزودن کشت

www.SID.ir

Archive of SID

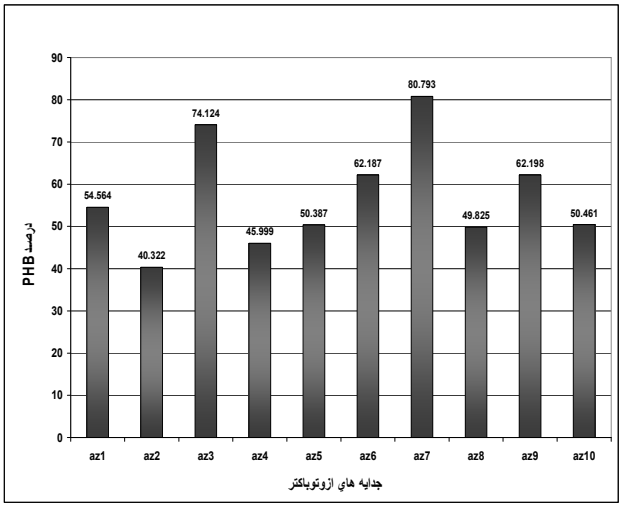
تلقیح بـه نسـبت ۲٪ محـیط هـا در دورrpm 150، 200، 250 گرماگذاری شدند، سپس میزان تولید PHB با روش Quillaguaman تعیین گردید.

2-7-5- میزان کشت تلقـیح: در ایـن مرحلـه میـزان تلقیح سوسپانسیون میکروبی مـورد بررسـی قـرار گرفـت ، سوسپانسیون میکروبی بـا غلظـت 1٪، 2٪، 3٪، 4٪، 5٪ و 6٪ به کشت مانیت براث تلقیح شدند و در دمـایC° 33 و دور rpm 200 گرماگذاری شدند، سـپس میـزان تولیـد PHB با روش Quillaguaman تعیین گردید.

در همه مراحل فوق، به عنـوان شـاهد یـک محـیط کشـت مانیت براث استریل مورد استفاده قرار [6] .

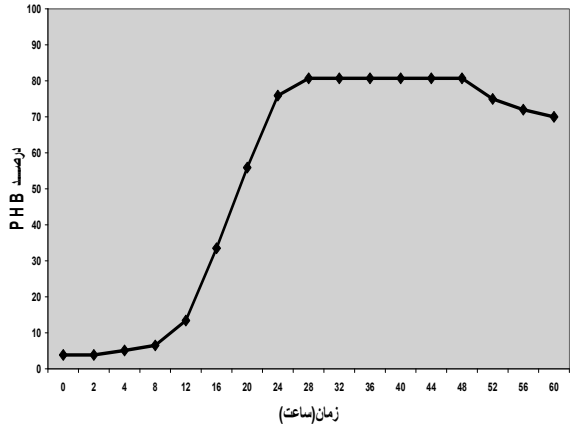
3- نتایج و بحث

در این تحقیق ابتدا 10 جدایه ازتوبـاکتر از خـاک جـدا و تخلیص شد و تولید بتا هیدروکسی بوتیرات بـا اسـتفاده از تست های اولیه و تائیدی از جمله رنـگ آمیـزی سـودان و تست های بیوشیمیائی مورد بررسی قرار گرفـت و بهتـرین جدایه (AZ7) تعیین گردید . بیشینه میزان تولیـد PHB در جدایهAZ ۷ به میزان 80.793٪تعیین شد(نمودار 1).



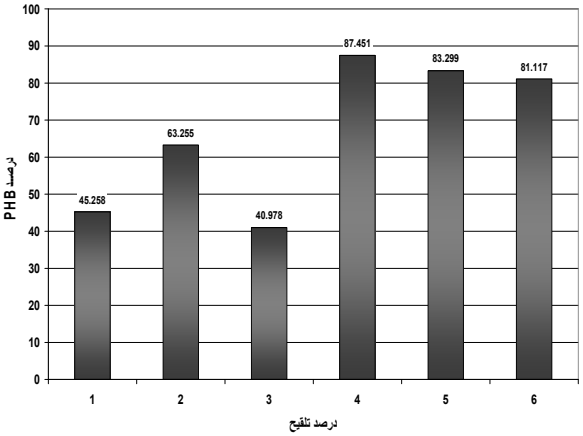
نمودار 1 میزان درصد تولید پلی هیدروکسی بوتیرات در جدایه های ازتوباکتر

در مراحل بعد بهبود روش های کشت و شـرایط رشـد در جهت تولید بالاتر بیوپلیمر در سلول انجام گرفت ، ابتدا بـا تغییر میزان تلقیح سوسپانسـیون میکروبـی، بهینـه ی میـزان تلقیح بـه دسـت آمـد. پـس از بهینـه سـازی فاکتورهـای محیطی مانند زمان، دما و دور شیکر، منـابع ازت مختلـف طی مراحل مختلف به محیط کشت بـاکتری افـزوده شـد و بهینه تولید PHB توسط جدایـه AZ ۷ در دمـایC°33، دور rpm 200 تعیین شد (نمودار 2).



نمودار 2 منحنی رشد لگاریتمی(جدایه AZ ۷ در دمای C° 33، دور rpm 200)

بـا تغییـر میـزان تلقـیح از 1٪تـا 6٪، بهینـه میـزان تلقـیح سوسپانسیون میکروبی غلظت 4٪ تعیـین گردیـد (نمـودار 3). در این غلظت بیشینه رشـد بـاکتری و تولیـد بیـوپلیمر مشاهده شد.



نمودار 3 نمودار میزان تولید پلی هیدروکسی بوتیرات نسبت به درصد تلقیح

پس از جایگزین کردن 17 منبع کربن مختلف اشباع و غیـر اشباع و تغییر میزان درصد تلقیح بهترین منبع جهـت تولیـد PHB چربی اشباع بادام تعیین شد. نتایج حاصل مبنـی بـر

www.SID.ir

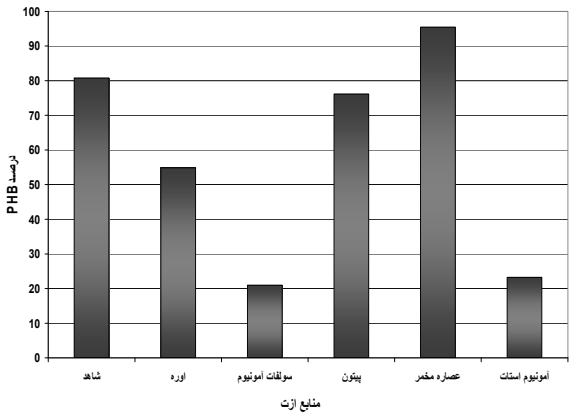
Archive of SID

تولید بیشتر PHB در حضور روغن های اشباع بود (جدول شماره 1).
پس از اضافه نمودن منابع ازت اوره ، عصاره مخمر، آمونیوم استات، سولفات آمونیوم، پپتون، بهترین منبع جهت تولید PHB عصاره مخمر، به میزان 1٪ تعیین شد (نمودار شماره 4).

جدول 1 بهینه تولید پلی هیدروکسی بوتیرات در حضور منابع روغن های اشباع و غیراشباع

carbon sources	OD(325nm)	CDW(mg/ml)	PHB%
SAMPLE (manitol)	1.95	0.24	80.793
(Castor oil)	0.21	0.54	39.11
(Snake oil)	0.34	0.70	48.70
(Coconut oil)	0.21	0.15	15.53
(Sesame oil)	1.39	0.20	68.98
(Olive oil)	1.71	0.22	76.90
(Myrtles oil)	1.05	0.13	41.02
(Nigella seeds oil)	1.51	0.19	78.75
(Oleic acid)	0.11	0.28	3.84
(Stearic acid)	0.37	0.54	6.79
(Sweet almond oil)	1.61	0.20	80.30
(Almond oil)	1.88	0.22	84.48
(Sprout wheat oil)	1.51	0.23	80.18
(Paraffin)	0.46	0.31	1.48
(Glycerin)	1.64	0.10	16.07
(Walnut oil)	1.00	0.24	41.98
(palmitic acid)	0.46	0.34	13.53
(Chamomile oil)	1.65	0.23	73.12

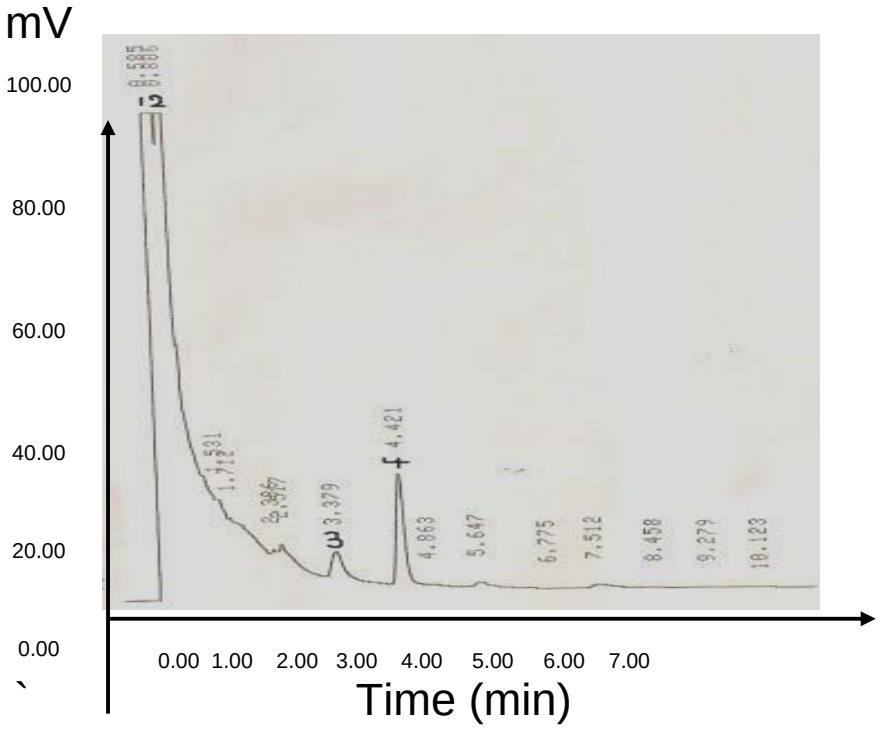
پلیمر به دست آمده و همچنین پلی -3- هیدروکسی بوتیراتی که به عنوان شاهد تهیه شده بودند، از فاز آلی (محلول کلروفرم) جدا شده و به دستگاه تزریق شدند.
در نهایت (نمودار شماره 5) به دست آمده و مقایسه آن با (نمودار شماره 6) به عنوان شاهد، نشان دهنده و تایید کننده وجود پلی هیدروکسی بوتیرات و همچنین پلی هیدروکسی والرات است.



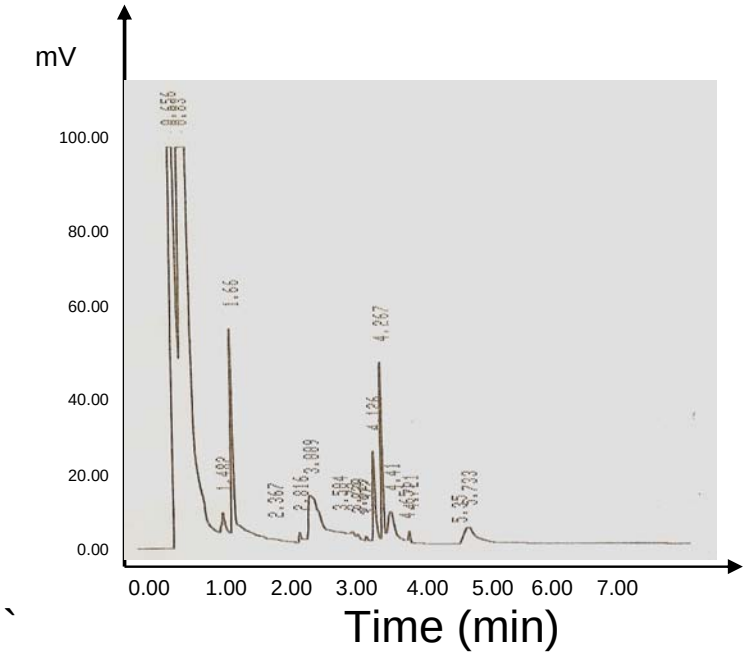
نمودار 4 میزان تولید پلی هیدروکسی بوتیرات در حضور منابع مختلف ازت

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار 5 طیف GC استاندارد به دست آمده از شاهد استاندارد. پیک 1 مربوط به حلال کلروفرم، پیک 2 پلی هیدروکسی بوتیرات، پیک شماره 3 پلی هیدروکسی والرات و پیک شماره 4 استاندارد داخلی یا همان اسید بنزوئیک است



نمودار 6 طیف GC به دست آمده از جدایه ازتوباکتر

5- بحث

www.SID.ir

Archive of SID

در این پژوهش جداسازی سویه ای از ازتوباکتر کروکوکوم بومی ایران مد نظر قرار گرفت که بیشترین مولد پلی هیدروکسی آلکانات و بطور ویژه پلی هیدروکسی بوتیرات بوده است. در ادامه جدایه AZ 7 که بیشترین تولید را نشان داد ، شناسایی شده و اثر عوامل مختلف روی رشد و تولید پلیمر در آن بررسی شد. سپس جدایه فوق از نظر صفات فیزیولوژیک ، بیوشیمیایی ، ریخت شناسی مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی ها نشان دادند که باکتری 7 AZ یک باکتری هتروتروف، هوازی، گرم منفی بوده ، این باکتری بیشتر به صورت دوتایی دیده می شود کلنی آن بصورت لزج–تیره رنگ است و قادر به تشکیل کیست می باشد که با توجه به تست های بیوشیمیایی انجام شده شباهت کامل به اعضای جنس *Azotobacter* نشان می دهد[7].

نتایج بدست آمده در این تحقیق، توانایی جدایه ازتوباکتر کروکوکوم جداسازی شده از خاک به منظور تولید بیشینه پلی– بتا- هیدروکسی بوتیرات نشان میدهد. این جدایه در محیط کشت بهینه سازی شده دارای روغن بادام به عنوان منبع کربن، عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن، pH خنثی و دمای 33 درجه سانتیگرادو دور چرخش 200 دور در دقیقه بیشترین میزان تولید بیوپلیمر(80.793 ٪) را از خود نشان داد و این نتیجه با بررسی و مقایسه با سوسپانسیون باکتری کشت داده شده در محیط مانیت براث با منابع کربن و نیتروژن و شرایط دما و pH مختلف بدست آمد.

PHB در میان بیش از بیست جدایه باکتریایی *Azotobacter , Bacillus, Beijerinckia ,Alcaligenes , Pseudomonas , Rhizobium , Rhodospirillum* دیده شده است، در میان جدایه های باسیلوس بیشترین میزان PHB در(48.13٪) *B.megateriumY6* و کمترین میزان آن در (6.53٪) *B.subtilis*سویه K1 مشاهده شده است[8].

در طی بررسی انجام شده بر روی سویه های گوناگون *Cyanobacter* و در محیط BG11 بین 65/00 – 10/80 ٪و در محیط Allen 85/45– 11/89 ٪ PHB مشاهده شده است.

در بررسی دیگری بر روی تولیدPHB در *Lactobacillus Streptococcus،Lactococcus* نشان داد که میزان تولید PHB در جدایه های *Lactobacillus*-09/00 7/09-16/00 ٪ و *actococcus*،0/93٪ و *Streptococcus*15/21 -5/47 ٪ می باشد و بیشترین میزان تولید PHB در (*S. thermophilus Ba21S* 21/15 w/v ٪) گزارش شده است[9].

Ghatnekar و همکارانش در سال 2002 نشان دادند که می توان میزان PHBرا در *Methylobacterium sp V49* با تغییر محیط کشت (محلول٪ 5 SDS) به میزان 98 ٪ افزایش داد[10].

خنافری و همکاران در سال 2006 نشان دادند که میتوان با کشت باکتری ازتوباکتر در محیط Whey broth در درجه حرارت 35درجه سانتیگراد وrpm 122، میزان PHB را بهml/lit 4 رساند[2].

Aslim B و همکاران در سال 2002 با جایگزین کردن 1٪ گلوکز در محیط کشت جدایه *Bacillus* میزان PHB را µg 1.56-2.64 تخمین زدند[11].

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 ویژگی های مفید، پلی هیدروکسی آلکانوات ها می توانند برای کاربردهای تکنیکی فراوانی به کار گرفته شوند چون این ترکیبات ترموپلاستیک هایی الاستوم، غیر سمی و تجزیه پذیر زیستی بوده و می توانند از منابع قابل تجدید تولید شوند[12]. 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:

www.SID.ir

Archive of SID

تولید بیوتکنولوژیک و نانو، کاربرد اکولوژیک، کاربردهای پزشکی، کاربردهای قلبی – عروقی، پچ های پریکارد، افزایش رگ ها، استنت های قلبی عروقی، ترمیم نقص های دهلیزی – بطنی، پیوند 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 [13]، ذرات پودری، زخم بندی و ترمیم بافت نرم [14].

6- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می دهد که از میان 10 جدایه *Azotobacter*، جدایه AZ7 کاندید بومی تولید بیشینه بیوپلیمر در شرایط بهینه رشد می باشد . استخراج PHB از باکتری *Azotobacter* در شرایط استفاده از منابع مختلف روغن و مقایسه آن با شاهدهای آزمایش مبنی بر افزایش تولید PHBاز 80.793٪ در محیط کشت حاوی قند مانیتول به 84.48٪ در محیط حاوی 2٪ روغن بادام (به عنوان سوبسترای ارزان قیمت) می باشد. همچنین با تغییر شرایط رشد باکتری (دما، میزان هوادهی، زمان ، میزان تلقیح و منبع نیتروژن) میتوان تولید بیوپلیمر را به میزان محسوس افزایش داد.

7- منابع

[1]Hocking P.J, Marchessault R.H, Biopolyesters, .In: Griggin GJL (ed) Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers. Chapman and Hall, London, pp 48-96, 1994.

[2] khanafari A,Akhavan Sepahi , Mogharab M, Production & Recovery of poly-β-Hydroxybutyrate from Whey Degradeation by Azotobacter,2008,Master Science Thesis of Microbiology

[3] 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 Microbiology and Biotechnology

[4] Choi J, Lee S.Y, Process Analysis and Economic Evaluation for poly-3-hydroxybutyrate Production by Fermentation. Bioprocess Eng 17:335-342, 1997.

[5] Ataei S.A., Vasheghani E. Farahani,. Shojaosadati S.A , Tehrani,"Poly (hydroxylbutyrate-co-hydroxyvalerate) production in a batch fermentation of cheap substrates with co-cultures of Propionibacterium *shermanii* and a *Bacillus* strain isolated from date syrup waste" ibid. 2008

[6] Lilli J.G, and Rodriguez-Valera F, Effect of Culture Conditions on Poly-β-hydroxybutyrate Production by *Haloferax mediterranei* .Appl. Environ. Microbiol, 56:2517-2521, 1990.

[7] Boone D.R, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Castenholz W.R, 2: 130-131-143-160, 2001

[8] Aslim B, Çalişkan F, Beyatli Y, Gündüz U, Poly-β-hydroxybutyrate Production by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiology Letters. 159: 293-297, 1998.

[9] Yuksekdag Z, Beyatli Y, Production of Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) in Different Media by *Streptococcus thermophilus* Ba21S Strain, 74:981-986, 2007**.**

[10] Ghatnekar M.S, Pai J.SGanesh M, Production and Recovery of Poly-3-hydroxybutyrate From Methylobacterium sp V49, 77, 4, 444-448(5), 2002.

[11] Aslim B, Yuksekdag Z, Beyatil Y, Determination of PHB Growth Quantities of Certain *Bacillus* Species Isolated From Soil, Turkish Electronic Journal of Biotechnology, p: 24-30, 2002.

[12] Philip S, Keshavarz T, Roy I, Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers with a Range of Application. J Chem Technol Biotchnol, 82: 2333-247, 2007.

[13]Williams S.F, Martin D.P, Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy. In: Steinbuchel A, Marchessault Rh (eds) Biopolymers for Medical Pharmaceutical Applications, Wiley, Weinheim, pp 89-125, 2005.

[14]Amozegar M A,Ramezani M,Hamedi J, Effect of Diffrent Nitrogen Sourses on Poly-B-Hydroxybutyrate (PHB) Production by a Novel

Halotolerant Bacterium Ocean imonas Strain gk2, Enzyme and microbial tech; 38:148-54. . 2009

www.SID.ir