نشریه علوم و مهندسی جداسازی
دوره سوم ، شماره دوم، سال۱۳۹۰، صفحه ۳۵ تا ۴۱

Journal of Separation Science and Engineering
Vol.3, No.2, pp. 35-41

جداسازی سویه ای از *Bacillus subtilis* از پساب کارخانه شیر پگاه کرمان برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات

آرمان محسنی[۱]، سید احمد عطائی[۲،*]، محمد حسن فضائلی پور[۳]

۱. کارشناس ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲. استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، (ataie@mail.uk.ac.ir)
۳. دانشیار مهندسی شیمی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۱۵ مرداد ۹۰
دریافت پس از اصلاح: ۱۶ مهر ۹۰
پذیرش نهایی: ۴ آبان ۹۰

کلمات کلیدی:
پلی‌هیدروکسی بوتیرات
جداسازی
باسیلوس سوبتیلیس

* عهده دار مکاتبات

چکیده

از میان پلاستیک‌های زیست تخریب پذیر پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات و کوپلیمرهای آن به علت قابلیت تجزیه پذیری کامل، انعطاف پذیری، مقاومت در برابر آب و همچنین سادگی فرآیند تولید، نسبت به سایر پلیمرهای زیست تخریب پذیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این پژوهش سویه ای از باسیلوس سوبتیلیس با قابلیت تولید پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات، از فاضلاب یک کارخانه تولید شیر پاستوریزه جدا شد. گلوکز و عصاره مخمر به ترتیب با غلظت ۳۰ و ۷/۵ گرم در لیتر به عنوان اجزای اصلی محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که مدت زمان لازم برای انجام فرایند تخمیر ۷۲ ساعت و مقدار بیوپلیمر تولید شده ۰/۵۹ گرم به ازای هر گرم وزن خشک سلول بود.

حقوق ناشر محفوظ است.

۱- مقدمه

امروزه پلاستیک‌ها در تولید انواع فرآورده‌های صنعتی، از صنعت خودروسازی گرفته تا دنیای پزشکی، دارای کاربرد بوده و تنها در ایالات متحده آمریکا سالانه نزدیک به ۵۰ میلیون تن انواع پلاستیک تولید می شود. اما این مواد به عنوان زباله‌های مقاوم به تجزیه میکروبی، چالش‌های زیست محیطی پیچیده‌ای به وجود آورده اند[۱]. استفاده از پلیمرهای صنعتی باعث بوجود آمدن مشکلاتی از قبیل دفن پسماندهای جامد و همچنین گرم شدن کره زمین می شود[۲]. تاکنون تعداد زیادی از پلاستیک‌های میکروبی نیز در جهان تولید گردیده اما تولید آن‌ها به علت عواملی چون بالا بودن قیمت سوبسترا، محصول دهی کم و همچنین هزینه‌های مربوط به استریل نگه داشتن محیط (جهت جلوگیری از آلوده شدن میکروب‌ها در کشت خالص) به صورت محدود انجام پذیرفته و باعث شده تا این گروه از پلیمرها نتوانند با سایر پلاستیک‌ها رقابت داشته باشند. بر اساس یکی از مطالعات انجام گرفته هزینه قابل توجه مواد اولیه علت اصلی بالا بودن قیمت پلاستیک‌های قابل تجزیه در مقایسه با پلاستیک‌های معمولی عنوان گردیده است[۳]. در گزارشی دیگرهزینه تولید پلیمرهای قابل تجزیه در کشت خالص در حدود ۲۰ برابر قیمت پلاستیک‌های مصنوعی برآورد شده است[۴].

از میان پلاستیک‌های قابل تجزیه که تاکنون تهیه گردیده گروهی تحت عنوان پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات[1] و کوپلیمرهای آن که بالغ بر چهل نوع ترکیب مختلف می باشند، به علت قابلیت تجزیه پذیری کامل، انعطاف پذیری، مقاومت ۱۰۰٪ در برابر آب، پایین بودن نسبی هزینه تولید و همچنین سادگی فرآیند تولید نسبت به سایر پلیمرهای زیست تخریب پذیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند[۵ و۶]. این نوع ترکیبات به علت خواص فیزیکی، مکانیکی و همچنین به علت سازگاری با بدن حتی در عمل‌های جراحی نیز دارای کاربرد هستند[۷].

این نوع بیوپلیمر که به صورت گرانول[2] در داخل سلول میکروارگانیسم تجمع یافته و پس از استخراج و خالص‌سازی به پودری سفید رنگ تبدیل می شود، توسط گروه‌های مختلف میکربی تولید می شود[۸]. تقریبا ۳۰۰ نوع میکروارگانیسم شامل انواع باکتری های گرم مثبت و منفی شناسایی گردیده که قادر به تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات می باشند. از جمله میکروارگانیسم‌هایی که توانایی تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات را دارند می‌توان به گونه‌های *باسیلوس*[3]، *ازتوباکتر*[4]، *سودوموناس*[5] و *آلکالی ژنز*[6] اشاره نمود[۹].

پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات[7] یکی از مهمترین ترکیبات پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات می باشد که میکروارگانیسم‌ها آن را به عنوان ذخیره انرژی به صورت درون سلولی در خود ذخیره می‌کنند. این ذخیره به دلیل کمبود منابع مغذی مانند فسفر، نیتروژن، پتاسیم و یا اکسیژن در حضور مقدار اضافی منابع کربن می‌باشد[۱۰]. در مقایسه با پلیمرهای صنعتی، پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات انرژی کمتری برای تولید نیاز دارد و به همین دلیل گازهای گلخانه‌ای کمتری تولید می شود[۱۱].

پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات‌ها به دلیل زیست تخریب پذیری و زیست سازگاری بالایی که دارند بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از آنجایی که پلی هیدروکسی آلکانوات ها را می توان از منابع تجدید پذیر بدست آورد و پس از تجزیه به دی‌اکسید کربن و آب تبدیل می شوند به آنها پلاستیک‌های دوستدار محیط زیست می گویند[۱۱].

محتوای پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات در واقع بهترین بیان کننده برای توجیه اقتصادی تولید بیوپلیمر می باشد. محتوای پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات عبارتست از میزان تولید بیوپلیمر نسبت به بیومس[8] تولیدی. افزایش این محتوا باعث افزایش بهره‌وری می شود[۱۲]. بیوسنتز پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات تا حد زیادی به نوع منبع کربنی که در اختیار میکروارگانیسم قرار دارد وابسته است. منابع کربن را می توان به دو دسته تقسیم بندی کرد: منابعی که ساختار آنها شبیه به ساختار بیوپلیمر تولیدی است و منابعی که ساختار آنها شباهتی به ساختار بیوپلیمر تولیدی ندارد[۱۳]. بیوپلیمرها بر اساس طول زنجیره کربنی به سه دسته تقسیم می‌شوند: زنجیره کوتاه[9] با زنجیره منومری ۳ تا ۵ اتم کربن، زنجیره متوسط[10] با زنجیره منومری ۶ تا ۱۴ اتم کربن و ترکیبی از زنجیره کوتاه و زنجیره متوسط که خواص فیزیکی و مکانیکی بهتری نسبت به دو گروه قبلی دارد[۱۳]. پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات خواص ترموپلاستیکی شبیه به پلیمرهای صنعتی دارد با این مزیت که زیست تخریب پذیر، زیست‌سازگار و قابل تهیه از منابع تجدید پذیر می‌باشد ولی به علت هزینه‌های بالای تولید توانایی رقابت با پلیمرهای صنعتی

1 -polyhydroxyalkonate
2 -granule

3 -*Bacillus*
4 -*Azotobacter*
5 -*Pseudomonas*
6 -Alcaligenes
7 -polyhydroxybutyrate
8 -Biomass
9 -Short chain length
10 -Medium chain length

را ندارد، حدود ۷۰ درصد از هزینه های تولید بیوپلیمرها مربوط به سوبسترای مورد استفاده و استخراج بیوپلیمر می باشد[۱۴].

هدف از انجام این پژوهش علاوه بر جداسازی گونه میکروبی مناسب و بومی استان جهت تولید بیوپلیمر، مشخص کردن زمان مناسب جهت پایان عمل تخمیر برای رسیدن به بالاترین بازده تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات و حداکثر بهره‌وری می باشد.

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- جداسازی گونه میکروبی

در این تحقیق از گونه‌های میکروبی بومی موجود در استان کرمان استفاده شد. برای این کار گونه‌های میکروبی موجود در فاضلاب کارخانجات روغن نباتی، نوشابه زمزم و شیر پگاه مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه‌های فاضلاب تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی گونه‌های میکروبی ۱ قطره از هر فاضلاب را با آب مقطر استریل، رقیق کرده و به روش استریک پلیت[1] بر روی محیط کشت نوترینت آگار[2] کشت داده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد[۱۵]. کلنی‌های مجزا به لحاظ شکل، رنگ و مشخصات ظاهری مجدداً با تکنیک کشت استریک پلیت جداسازی شدند. گونه‌های قارچ، کپک، مخمر و سایر میکروارگانیسم‌های مزاحم حذف و سپس نمونه‌های خالص روی اسلنت نگهداری شدند. برای اطمینان از خلوص نمونه‌ها رنگ آمیزی گرم[3] انجام شد[۱۵]. در این مرحله ۴۰ سویه میکروبی انتخاب شد.

۲-۲- انتخاب گونه‌های تولید کننده پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات

برای مشخص کردن گونه‌های تولیدکننده پلی‌هیدروکسی آلکانوات از روش رنگ آمیزی سودان سیاه[4] استفاده شد. پس از از انجام رنگ آمیزی، گونه‌هایی که توانایی بیشتری در تولید پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات داشتند انتخاب شدند[۱۶].

روش رنگ آمیزی سودان سیاه: یک قطره از سوسپانسیون باکتریایی بر روی لام قرار داده و پس از خشک شدن با عبور سریع لام از روی شعله تثبیت شد. سپس سطح اسمیر به محلول سودان سیاه (۰/۳ گرم سودان سیاه + ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪) آغشته شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه لام با آب مقطر شسته شده و پس از خشک شدن اسمیر با زایلن شستشو داده شد. پس از این اسمیر به مدت ۱۵ ثانیه با محلول ۰/۵٪ سافرانین آغشته شد. پس از شستشو با آب مقطر و خشک کردن لام با کاغذ صافی پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به صورت لکه‌های سیاه رنگ درون باکتری‌ها با لنز ۱۰۰ میکروسکوپ نوری مشاهده شد[۱۷].

۲-۳- کشت میکروارگانیسم

میکروارگانیسم مورد نظر توسط لوپ استریل از اسلنت به محیط کشت بذر با ترکیب ذیل تلقیح شد:

گلوکز ۹ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۲/۵گرم بر لیتر، KH_2PO_4، ۲/۵ گرم در لیتر، K_2HPO_4، ۲/۵ گرم در لیتر، NH_4NO_3، ۰/۵ گرم در لیتر، $(NH_4)_2HPO_4$، ۱ گرم در لیتر، $MnSO_4.7H_2O$، ۰/۰۰۷ گرم در لیتر، $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲ گرم در لیتر، $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱ گرم در لیتر.

بعد از گذشت ۴۸ ساعت از گرماگذاری کشت بذر مقدار ۱۰میلی‌لیتر از محیط کشت بذر به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تولید وارد و گرماگذاری شد. ترکیب محیط کشت تولید مشابه با ترکیب محیط کشت بذر بود با این تفاوت که غلظت گلوکز و عصاره مخمر در اینجا به ترتیب ۳۰ و ۷/۵ گرم بر لیتر بود. لازم به ذکر است که در هنگام تهیه محیط کشت به منظور جلوگیری از واکنشهای نامطلوب گلوکز و عصاره مخمر بصورت جداگانه استریل شدند.

۲-۴- بررسی میزان رشد

جهت بررسی میزان رشد از محیط کشت تخمیر در فواصل مشخص دو ساعته نمونه گیری شد. ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های گرفته شده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ[5] و مایع رویی دور ریخته شد. جهت حذف مواد اضافی، بیومس[6] ته نشین شده با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به صورت سوسپانسیون در آورده شد و دوباره به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بیومس بدست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای

1 -Streak plate
2 -Nutrient agar
3 -Gram staining
4- Sudan black

5 -Centrifuge
6 -Biomass

۹۰ درجه سانتی‌گراد تا تبخیر کامل آب و ثابت شدن وزن سلولی نگهداری شد و سپس وزن خشک سلولی اندازه گیری شد[۱۷].

۲-۵- آنالیز پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات با استفاده از کروماتوگراف گازی[1]

پس از پایان گرماگذاری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی دور ریخته شد. بیومس حاصل با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو و جهت حذف مواد اضافی ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. با دور ریختن مایع رویی مقدار ۲ میلی‌لیتر کلروفرم و ۱ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل ۸۵٪ متانول حجمی- حجمی، ۱۵٪ اسید سولفوریک حجمی- حجمی و ۴۵ گرم در لیتر اسید بنزوییک به عنوان استاندارد داخلی) به بیومس به دست آمده و نمونه استاندارد پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات اضافه شد. نمونه‌ها و استاندارد به مدت ۲ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد تا کامل شدن واکنش استری شدن نگهداری شدند. سپس به هر نمونه ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر اضافه و به مدت یک دقیقه به شدت تکان داده شد[۱۸،۱۷]. با تکان دادن شدید و آرام گرفتن، سه فاز مجزا تشکیل شد (فاز بالایی حاوی اسید سولفوریک، فاز میانی حاوی بقایای میکروبی و فاز پایینی حاوی متیل‌استر هیدروکسی‌آلکانوات)، دو فاز بالایی را توسط پیپت خودکار[2] دور ریخته و فاز زیرین توسط پیپت پاستور به لوله آزمایش تمیز منتقل و تا قبل از تزریق به دستگاه کروماتوگراف گازی درون یخچال نگهداری شد. مقدار دو میکرولیتر از نمونه‌ها و نمونه استاندارد، به صورت جداگانه به دستگاه کروماتوگراف گازی تزریق شدند.

مشخصات دستگاه به شرح زیر می‌باشد: کروماتوگراف گازی ساخت شرکت واریان[3] با ستون مویین[4] (CP-Cil 5CB طول ۳۰ متر و قطر ۰/۳۲ میلی‌متر)، نمایانگر[5] FID، دمای تزریق کننده[6] ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای نمایانگر[7] ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. هلیم به عنوان گاز حامل با دبی حجمی ۲ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. دستگاه به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس با شدت ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد و در نهایت با شدت ۳۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه به دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد رسید.

۳- بحث و نتایج

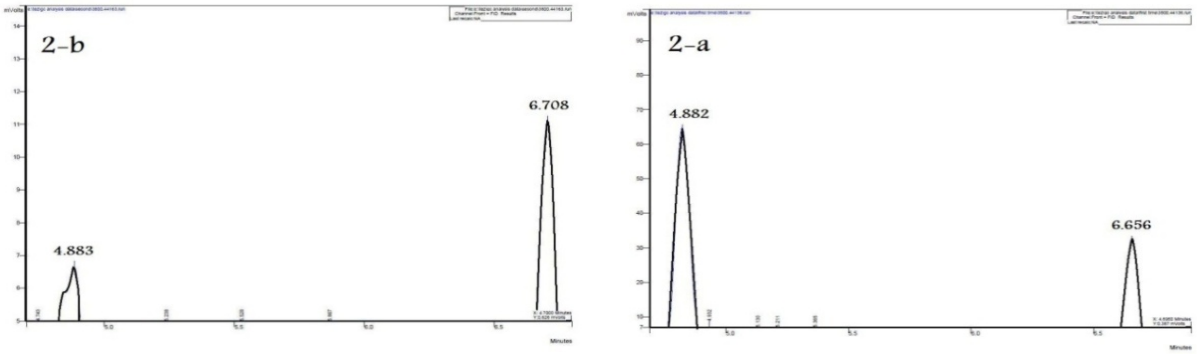
۳-۱- جداسازی گونه میکروبی

پس از رنگ آمیزی سودان سیاه و مشاهده بوسیله میکروسکوپ نوری با لنز ۱۰۰ گونه هائی که توانایی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات را داشتند انتخاب شدند. در این مرحله ۱۴ گونه تولید کننده انتخاب شدند. شکل ۱ تصویر رنگ آمیزی شده سودان سیاه را نشان می دهد.

شکل(۱) : گونه میکروبی به رنگ قرمز و گرانول‌های پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات به رنگ آبی تیره

با بررسی نمودارهای به دست آمده از دستگاه کروماتوگراف گازی مشخص شد گونه میکروبی *باسیلوس سوبتیلیس*[8] که از فاضلاب کارخانه شیر پگاه کرمان به دست آمده بود، بهترین تولید کننده پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در بین گونه‌های میکروبی جدا شده بود که توانست در مدت ۷۲ ساعت مقدار ۰/۹۴ گرم در لیتر بیوپلیمر تولید کند، پیک پلی‌هیدروکسی‌بوتیرات در دقیقه ۴/۸ و پیک استاندارد داخلی در دقیقه ۶/۶ ظاهر شد (شکل ۲).

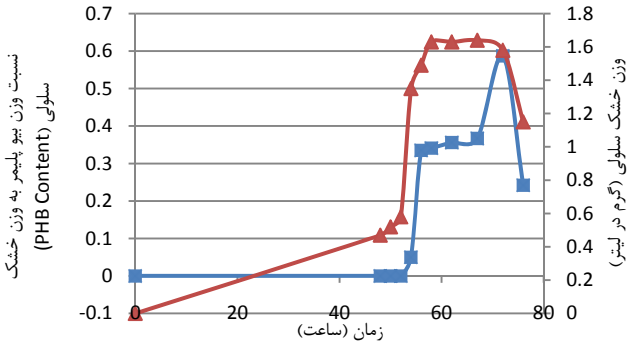
[1]- Gas chromatography
[2] -Sampler
[3] -Varian Co
[4] -Capillary column
[5] -FID detector
[6] -Injector temperature
[7] -Detector temperature
[8] -*Basillus subtilis*



شکل (۲) : (2-a) نمودار گروماتوگراف نمونه استاندارد، (2-b) نمودار کروماتوگراف پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده در گونه *باسیلوس سوبتیلیس* جدا شده از فاضلاب کارخانه شیر

۳-۲- بررسی روند تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با زمان

شکل شماره ۳ نشان دهنده رشد و توليد پلي-هيدروكسي‌بوتيرات در گونه *باسيلوس سوبتيليس* با زمان مي باشد. با بررسي اين نمودار متوجه مي شويم كه بعد از ۵۴ ساعت، فاز لگاريتمي رشد آغاز مي گردد و در همين زمان ميكروارگانيسم توليد پلي‌هيدروكسي‌بوتيرات را شروع مي كند و ميزان اين محصول درون سلول افزايش مي يابد، در اين زمان وزن خشک توده سلولي معادل ۱/۳۵ گرم در ليتر است. با گذشت زمان مواد مغذي (فسفر و نيتروژن) صرف رشد ميكروارگانيسم مي‌شود و ميزان آن كاهش مي يابد و اين موضوع باعث مي‌شود كه ميكروارگانيسم با كمبود مواد مغذي روبرو شده و پلي‌هيدروكسي‌بوتيرات بيشتري توليد كند. با گذشت ۵۸ ساعت فاز سكون آغاز مي‌شود كه در اين زمان وزن خشک سلولي به ۱/۶۳ و مقدار پليمر به ۰/۶ گرم در ليتر مي رسد. در اين فاز نيز مقداري از مواد مغذي صرف بقاي ميكروارگانيسم مي‌شود و اين كاهش باعث افزايش ميزان پلي-هيدروكسي‌بوتيرات مي‌شود. با گذشت ۷۲ ساعت (در انتهاي فاز سكون) وزن خشک سلولي به ۱/۵۸ و مقدار پليمر به ۰/۹۴ گرم در ليتر افزايش مي‌يابد. در اين مرحله ميزان مواد مغذي به كمترين مقدار خود رسيده است. ميكروارگانيسم جهت رفع اين مشكل حداكثر پلي‌هيدروكسي‌بوتيرات را در خود ذخيره مي كند. با رسيدن به فاز مرگ منابع در دسترس ميكروارگانيسم به شدت كاهش يافته و همچنين مقدار پليمر درون سلولي نيز كاهش مي‌يابد. اين موضوع را مي‌توان اينگونه تفسير كرد كه ميكروارگانيسم براي ادامه رشد و نيازهاي متابوليكي از ذخيره كربن درون سلولي خود (پلي‌هيدروكسي‌بوتيرات) استفاده مي كند در نتيجه ميزان اين ماده درون سلول كاهش مي يابد.



شکل (۳) : نمودار رشد و تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با زمان در گونه *باسیلوس سوبتیلیس* (▲ مربوط به نمودار رشد و ■ مربوط به تولید پلی هیدروکسی بوتیرات با زمان می باشد)

۴- نتيجه گيري

- از بين گونه هاي ميكروبي جداسازي شده براي توليد پلي‌هيدروكسي‌آلكانوات، بهترين گونه *باسيلوس سوبتيليس* بود. اين گونه ميكروبي از دسته باسيل‌هاي گرم مثبت است.
- بهترين زمان براي پايان واكنش تخميري توليد پلي-هيدروكسي‌بوتيرات در انتهاي فاز سكون مي‌باشد و گذشتن از اين زمان باعث كاهش ميزان اين محصول مي شود و بهره‌وري را كاهش مي دهد.

تشكر و قدردانی

با تشكر از جناب آقای دكتر محمد مرادی استادیار و آقایان سعید عادلی و محمد حسین صالحی كارشناسان آزمایشگاه گروه میكروب‌شناسی دانشكده پزشكی دانشگاه علوم پزشكی كرمان كه در شناسائی این گونه میكروبی كمک شایانی كردند.

مراجع

[1] N. Mokhtarani, H. Ganjidust, E. Vashaghani Farahani, and S. M. Khaleghi (2007) "Effect of volatile fatty acid in production of polyhydroxyalkanoate by activated sludge" *Journal of polymer technology*, 21, 80-93.

[2] W. H. Lee, C. Y. Loo, C. T. Nomura, and K. Sudesh, (2008) "Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors", *Bioresource technology*, 99, 6844-6851.

[3] H. Takabatake, H. Satoh, T. Mino, and T. Matsuo (2000) "Recovery of biodegradable plastics from activated sludge process", *Water Sci. Technol*., 42, 351-356.

[4] S.Y. Lee (1996) "Review bacterial polyhydroxy-alkanoates", *Biotechnol. and Bioeng*, 49, 1-14.

[5] H. Chua, P.H.F. Yu, and L.Y. Ho (1997), " Recovery of biodegradable polymers from food-processing wastewater activated sludge system", *Journal of Indo-European Studies*, 37(2): 9-13.

[6] Y. Kumagai (1992) "Enzymatic degradation of binary blends of microbial poly (3-Hydroxybutyrate) with enzymatically active polymers", *Polymer Degradation and Stability*, 37, 253-256.

[7] A. Pelissero (1987) " Update on Biodegradable Plastics Materials", *Imballaggio*, 38, 54.

[8] J.T. Pfeffer (1992) *Solid Waste Management Engineering, Prentice Hall*, 72-84.

[9] B. S. Kim, and H. N. Chang (1998) " Production of poly (3-hydroxybutyrate) from starch Azotobacter chroococcum", *Biothechnol Letters*; 20: 109-112.

[10] S. O. Kulkarni, P. P. Kanekar, S. S. Nilegaonkar, S. S. Sarnaik, and J. P. Job (2010) "Production & characterization of a biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India", *Bioresource Technology*, 101, 9765-9771.

[11] Y. Xie, D. Kohls, I. Noda, D. W. Schaefer, and Y. A. Akpalu (2009) "Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) nanocomposites with optimal mechanical properties", *Polymer*, 50, 4656-4670.

[12] M. R. Zakaria, H. Ariffin, N. A. M. Johar, S. Abd-Aziz, H. Nishida, Y. Shirai, and M. A. Hassan (2010) "Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer from wild-type *Comamonas* sp. EB172", *Polymer degradation and stability*, Xxx: 1-5.

[13] K. H. Chai, T. F. Ooi, A. Saika, T. Tsuge, and K. Sudesh (2010) "Biosynthesis & characterization of novel polyhydroxyalkanoate polymer with high elastic property by *Cupriavidus necatore* PHB-4 transformant", *Polymer Degradation and Stability*, 95, 2226-2232.

[14] M. G. E. Albuquerque, C. A. V. Torres, and M. A. M. Reis (2010) " Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influence substrate concentration on culture selection", *Water Research*, 44, 3419-3432.

[15] L. M. Prescott (2002) *Microbiology*, The McGraw−Hill Companies, United State, 1147.

[16] K. Mizuno, A. Ohta, M. Hyakutake, Y. Ichinomiya, and T. Tsuge (2010) "Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus Cereus* YB-4", *Polymer Degradation and Stability*, Xxx: 1-5.

[17] S. A. Ataei, E. Vashaghani Farahani, S. A. Shojaosadat, and H. Abdul Tehrani (2008) "Isolation of PHA-producing bacteria from a date syrup waste", *Macromolecule symposium*, 269, 11-16.

[18] A. Oehmen, B. K. Lehmann, R. J. Zeng, Z. Yuan, and J. Keller (2005) "Optimization of polyhydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal system", *Journal of Chromatography A*, 1070, 131-136.

Isolation of a strain of *Bacillus subtilis* from "Kerman Pegah milk factory" to produce Polyhydroxybutyrate

A. Mohseni [1], S. A. Ataei [2,*], M. H. Fazaelipoor [3]

1. M.Sc. in Chemical Engineering, Shahid Bahonar University of Kerman.
2. Assistant Professor of Chemical Engineering, Shahid Bahonar University of Kerman.
3. Associate Professor of Chemical Engineering, Shahid Bahonar University of Kerman.

A B S T R A C T

Among the biodegradable plastics, polyhydroxyalkanoates and their copolymers are superior due to their degradability, plasticity, resistance against water and also the simplicity of their production. In this research a strain of *Bacillus subtilis* was isolated from wastewater. The strain was grown in a basal mineral medium containing 30 g/L glucose and 7.5 g/L yeast extract. The results from the experiments showed that 72 hours was needed to obtain the optimum amount of poly hydroxy butyrate at 37 °C. The optimum amount was 0.59 g PHB/ g dried cell.

All right reserved.

A R T I C L E I N F O

Article history:
Received 6 Aug. 2011
Received in revised form 8 Oct. 2011
Accepted 26 Oct. 2011

Key words:
Polyhydroxyalkanote
Isolation
Bacillus subtilis
Production of biopolymer
Biodegradable

* Corresponding author