



EGE ÜNİVERSİTESİ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pseudomonas aureofaciens'de mcl-
POLİHİDROKSİALKANOATLARIN HÜCRE İÇİ
YIKIM METABOLİTLERİNİN GC-MS İLE
PROFİLLENMESİ

Tuncay AVCI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi:24.07.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Pseudomonas aureofaciens'de mcl-
POLİHİDROKSİALKANOATLARIN HÜCRE İÇİ
YIKIM METABOLİTLERİNİN GC-MS İLE
PROFİLLENMESİ

Tuncay AVCI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi:24.07.2017

**Bornova-İZMİR
2017**

Tuncay AVCI tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “*Pseudomonas aureofaciens*’de mcl-Polihidroksialkanoat’ların Hücre içi Yıkım Metabolitlerinin GC-MS ile Profillenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim Ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.07.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Seray Sankir

.....
.....
.....

Raportör Üye: Doç. Dr. Serap Evran

.....

Üye : Doç. Dr. Gülşah SANLI
MOHAMED

.....
.....

Üye :

.....

Üye :

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca yüksek lisans tezi olarak sunduğum “*Pseudomonas aureofaciens*’de mcl-Polihidroksialkanoatların Hücre içi Yıkım Metabolitlerinin GC-MS ile Profillenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitesi de başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

24/07/2017

İMZASI



ADI-SOYADI

Tuncay Altın

ÖZET***Pseudomonas aureofaciens*'de MCL-POLİHİDROKSİALKANOATLARIN HÜCRE İÇİ YIKIM METABOLİTLERİNİN GC-MS İLE PROFİLLENMESİ**

AVCI, Tuncay

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Temmuz 2017, 72 sayfa

Polihidroksialkanoatlar (PHA), aşırı karbon kaynağının bulunduğu azot sınırlamalı stress koşulları altında bakterilerde granüler halde enerji rezervi depolanan biyopolimerlerdir. Fiziksel ve kimyasal özelliklerinin petrol-türevli polimerlere benzer oluşu bu biyopolimerlerin petrol-türevli plastiklerin yerini alabilmesine olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda biyoyumlu ve biyobozunur özellikte olmaları nedeniyle PHA'lar doku mühendisliği ve biyomedikal alanında da kullanım potansiyeline sahiptir.

Endüstriyel olarak üretimi ve kullanım açısından üzerine yapılmış ve devam eden birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar ağırlıklı olarak üretim veriminin artırılması ve kullanım potansiyelleri yönündedir. Ancak üretici mikroorganizmada yıkım da devam etmektedir. Bu işlem ise hücre içi PHA depolimerazlar olarak adlandırılan enzimler tarafından yapılmaktadır.

PHA sentezinin artırılması yanında, yıkımının da bloke edilmesinin/hızının azaltılmasının üretim verimini daha da arttıracak olduğu açıktır. Bu işlemin getireceği bir diğer avantaj, üretim süresinin azalması, üretim maliyetinin düşürülmesi anlamına gelmektedir. Mevcut literatürler incelendiğinde PHA'ların hücre içi yıkım yollarının belirlenmesi üzerine yapılmış araştırmalar oldukça azdır.

Bu tez çalışmasında, PHA üretici olarak *Pseudomonas aureofaciens* seçilmiştir ve karbon kaynağı olarak oktanoik asit kullanılarak üç farklı koşulda mcl-PHA metabolizması incelenmiştir. PHA üretiminin teşvik edildiği, açlık ve PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda belirli periyotlarla örnek alınarak bu örneklerdeki PHA profilleri çıkartılmış ve yağ asidi türevli metabolitler GC-MS

ile analizlenmiştir. Yapılan analizler sonucu elde edilen metabolitlerden 3-hidroksioktanoat, trans/cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asidin doğrudan poli-3-hidroksikoktanoat (PHO) metabolizmasıyla ilişkili olduğu ve polimerin biyosentez ve yıkımının bu metabolitler üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Diğer metabolitlerin ise dolaylı yollardan temel metabolitlerin ileri dönüşüm ürünleri veya organizmanın rutin metaboliti olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen bu veriler ile PHO metabolizmasının anlaşılmasına yardımcı olabilecek literatür bilgisinin sağlanacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Biyopolimerler, Polihidroksialkanoatlar, *Pseudomonas aerofaciens*, Metabolik Profilleme, GC-MS



ABSTRACT**METABOLIC PROFILING OF INTRACELLULAR MCL-POLYHYDROXYALKANOATE DEGRADATION IN *Pseudomonas aureofaciens* WITH GC-MS**

AVCI, Tuncay

MSc Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

July 2017, 72 pages

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biopolymers and stored in the cell in granular form as energy reserve by bacteria under stress conditions such as the limited nitrogen and excessive carbon sources. These biopolymers are alternative to petroleum-derived polymers because they have different physical and chemical properties. Also they are biocompatible and biodegradable so PHAs can be used in most of biomedical applications including tissue engineering as a tissue scaffold, controlled drug release and biomedical implants.

There are lots of ungoing studies about their production and applications. These investigations are focused on increasing production yields and defining the potential applications. However, producing microorganisms are also capable to degrade polyhydroxyalkanoates. Enzymes called as intracellular PHA depolymerases carry out this process.

PHA production yield can be increased by increasing PHA synthesis and by decreasing of PHA degradation rate or blocking the degradation metabolism. This process also provides reducing the cost of production and minimizing of production time. Although the recent literature gives information about extracellular PHA degradation, there is not enough knowledge about determination of intracellular degradation pathways.

In this study, *Pseudomonas aureofaciens* was used as PHA producer organism. Octanoic acid was used as carbon source and mcl-PHA metabolism was investigated in three different metabolic conditions. Fatty acid based metabolites

were analysed with GC-MS in induced PHA producing, starving and non-induce PHA producing conditions and PHA profiles were obtained.

As a result of analysis, it was found that 3-hydroxyoctanoate, trans/cis-3-octenoic acid and 2-octenoic acid are directly related with poly-3-hydroxyoktanoate (PHO) metabolism and biosynthesis and degradation of polymer are occured due to these metabolites. Furthermore, it was suggested that, the other metabolites are further transformation products of the main metabolites or common metabolites of organism.

According to these results, this project will provide basic knowledge about PHO metabolism.

Anahtar kelimeler: Biopolymers, Polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas aeuropaciens*, Metabolic Profiling, GC-MS

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans döneminde, bana inanarak ve güvenerek öğrencisi olarak kabul eden, laboratuvarında çalışma imkanı tanıyan, engin bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU'na ve Danışmanım Prof. Dr. Şenay ŞANLIER'e; her daim yardımına koşan, bilgi ve birikimini benimle paylaşan, özveriyle ve sevgiyle benimle ilgilenen Öğr. Gör. Dr. Emre ERDEN ÇAKMAKLI'ya; tanıştığımız günden beri her anlamda bana yardım eden, arkadaşlığını hiç esirgemeyen, bilgi ve birikimini her daim benimle paylaşan, can dostum Y.L. Öğrencisi Gözde ODABAŞ'a; tüm hayatım boyunca yanımda olan, bana her türlü imkanı sağlayan, desteğini bir an bile esirgemeyen, ne kadar teşekkür etsem de haklarını ödeyemeyeceğim AİLEM'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (14-FEN-015) ve Tübitak (1001-113Z813) tarafından desteklenmiştir



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1 Polihidroksialkanoatlar	3
1.2 Polihidroksialkanoatların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
1.3 Polihidroksialkanoatların Kullanım Alanları	8
1.4 Polihidroksialkanoatların Biyosentezi	10
1.5 Polihidroksialkanoatların Degradasyonu	14
1.5.1 Ekstraselüler PHA Degradasyonu	14
1.5.2 İntraselüler PHA Degradasyonu	16
1.5.3 PHA depolimerazlar (EC 3.1.1.75, EC 3.1.1.76)	18
1.6 Metabolit Profilleme	19
1.7 Gaz Kromatografisi/Kütle spektrometresi (GC/MS)	20
1.7.1 Gaz Kromatografisi (GC)	21
1.7.2 Kütle spektrometresi (MS)	22
2. MATERYAL ve YÖNTEM	24
2.1 Mikroorganizmalar	24
2.2 Kimyasallar ve Çözeltiler	24
2.3 Cihazlar	25
2.4 Üç Farklı Metabolik Koşul oluşturularak mcl-PHA Profillerinin İncelenmesi	25
2.4.1 mcl-PHA Üretiminin Teşviki	25
2.4.2 mcl-PHA yıkımının (degradasyon-açlık koşulları) teşviki	26
2.4.3 mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulun oluşturulması	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini	26
2.6 Kuru Kütle Tayini	27
2.7 mcl-PHA'ların Kantitatif Tayini	27
2.8 GC-MS ile karbon kaynağı (Oktanoat) konsantrasyonunun tayini.....	28
2.9 Berthelot yöntemi ile azot tayini	29
2.10 mcl-PHA'nın saflaştırılması	30
2.11 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve GC-MS ile analizi.....	31
2.11.1 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi	31
2.11.2 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin GC-MS ile analizi	31
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	34
3.1 <i>P. aureofaciens</i> 'ten çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretimi.....	34
Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
3.2 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini	36
3.3 Hücre İçi Metabolitlerin GC-MS ile Analizi	37
3.3.1 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen metabolit analizleri.....	37
3.3.2 Açlık koşullarında <i>P. aureofaciens</i> ' de mcl-PHA'nın yıkım profilinin oluşturulması.....	42
3.3.3 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulun oluşturulması.....	48
4. DEĞERLENDİRME.....	53
4.1 Poli-3-hidroksioktanoatın (PHO) biyosentezi.....	53
4.2 Poli-3-hidroksioktanoatın Hücre İçi Yıkımı	55
KAYNAKLAR DİZİNİ	64
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>Wautersia euttropha</i> H16 suşuna ait PHA granullerinin Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) ve faz kontrast mikroskobu görüntüleri	3
1.2 Polihidroksialkanoatların genel yapısı.....	4
1.3 Mikrobiyal PHA üretim yolları.....	12
1.4 PHA'nın doğal ve denatüre haldeki fiziksel durumu	10
1.5 Aerobik arıtma çamurunda P(3HB-3HV) 'nin biyobozunumu	14
1.6 3HA'ların asetil-COA'ya parçalanması	14
1.7 <i>Ralstonia euttropha</i> ' da PHB' in biosentezi ve yıkımı	17
1.8 GC/MS sisteminin şematik gösterimi.....	22
1.9 Metanole ait kütle spektrumu, elektron iyonizasyon ile.....	23
2.1 Krotonik Asit Standart Grafiği.....	28
2.2 Oktanoik asit metil ester standart grafiği	28
2.3 NH ₄ Cl Standart Grafiği	30
2.4 Metil 3-Hidroksidodekanoat Standart Grafiği	32
2.5 Metil 3-Hidroksiheksanoat Standart Grafiği.....	32
2.6 Metil 3-Hidroksioktanoat Standart Grafiği.....	33
2.7 Metil 3-Hidroksitetradekanoat Standart Grafiği	33
3.1 mcl-PHA üretim profili	35
3.2 Üretim ortamından farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde PHA'nın kalitatif tayini	36
3.3 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda PHA ve 3-hidroksioktanoat miktarının değişimi	36
3.4 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 0. saate ait gaz kromatogramı.....	36
3.5 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait gaz kromatogramı	37

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 18. saate ait gaz kromatogramı.....	37
3.7 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 24. saate ait gaz kromatogramı	37
3.8 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait gaz kromatogramı	37
3.9 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait gaz kromatogramı.....	38
3.10 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 54. saate ait gaz kromatogramı.....	38
3.11 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait gaz kromatogramı.....	38
3.12 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait gaz kromatogramı	38
3.13 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait gaz kromatogramı	39
3.14 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait gaz kromatogramı	39
3.15 mcl-PHA yıkım profili (açlık koşullarında).....	43
3.16 Açlık koşullarına ait PHA ve 3-Hidroksioktanoat miktarının değişimi.....	44
3.17 Açlık koşullarına ait 0. saat gaz kromatogramı.....	44
3.18 Açlık koşullarına ait 6. saat gaz kromatogramı.....	45
3.19 Açlık koşullarına ait 12. saat gaz kromatogramı.....	45
3.20 Açlık koşullarına ait 24. saat gaz kromatogramı.....	45
3.21 Açlık koşullarına ait 48. saat gaz kromatogramı.....	45
3.22 Açlık koşullarına ait 60. saat gaz kromatogramı.....	46
3.23 Açlık koşullarına ait 72. saat gaz kromatogramı.....	46
3.24 Açlık koşullarına ait 96. saat gaz kromatogramı.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.24 Açlık koşullarına ait 96. saat gaz kromatogramı.....	46
3.25 Açlık koşullarına ait 120. saat gaz kromatogramı.....	46
3.26 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullardaki mcl-PHA profili.....	48
3.27 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 0. saat gaz kromatogramı.....	49
3.28 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 24. saat gaz kromatogramı.....	49
3.29 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 54. saat gaz kromatogramı.....	50
3.30 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 60. saat gaz kromatogramı.....	50
3.31 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 72. saat gaz kromatogramı.....	50
3.32 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 96. saat gaz kromatogramı.....	51
3.33 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 120. saat gaz kromatogramı.....	51
4.1 PHA' ların genel biyosentez şeması	53
4.2 Mucor sp' de oktenoik asit için önerilen metabolik yol	57
4.3 Rekombinant <i>M. extorquens</i> ' te 7-oktenoik asit ve 5-hekzenoik asitten mcl-PHA birimlerinin üretimi için önerilen metabolik yol.....	57
4.4 Piruvatın hekzanole fermentasyonu.....	59
4.5 8-amino-7-okzonanoat biyosentezi.....	60
4.6 Linoleattan traumatın ve (Z)-3-hekzen-1-yl asetat biyosentezi.....	60
4.7 Oktan oksidasyonu.....	61
4.8 Siklopropan yağ asitleri sentezi.....	62
4.9 Palmitat biyosentezi.....	62
4.10 Palmitoleat (9-hekzenoik asit) sentezi.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Mikrobiyal biyoplastiklerin farklı kriterlere göre sınıflandırılması.....	5
1.2 PHB, P(HB-co-HV), P(4HB) ve polipropilenin fiziksel özellikleri.....	7
1.3 PHA üretim yollarında görev alan enzimler.....	13
2.1 Berthelot Yöntemi.....	29
3.1 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait örnek baz alınmıştır).....	41
3.2 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	42
3.3 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (Açlık koşullarında 24. saate ait örnek baz alınmıştır).....	47
3.4 Açlık koşullarında hücre içi mcl-PHA üretiminin izlendiği analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	47
3.5 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 72. saate ait örnek baz alınmıştır).....	51
3.6 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri.....	52
4.1 Farklı üretim koşullarında GC-MS ile tayin edilen metabolitler.....	52

1. GİRİŞ

Petrol türevli sentetik plastikler piyasaya girdiği 1950'li yıllardan beri gündelik yaşantımızda büyük öneme sahip bir hammadde haline geldi (Loo and Sudesh, 2007). Plastikler, dayanıklı ve ucuz olması, kolay şekil alabilmesi, hafif olması ve nakliyesinin kolay olması gibi özelliklerinden ötürü evsel, medikal, otomobil, ambalajlama, gıda ve elektronik gibi çeşitli alanlarda kullanılan metal, ahşap, cam ve kağıt gibi çeşitli malzemelerin yerini başarı ile alarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Philip et al, 2007).

Petrol türevli plastiklerin gündelik yaşantımızda bu denli kullanım alanının olması ve sıklıkla tek kullanımlık olmalarına bağlı olarak kullanılıp doğaya atılmaları çevre kirliliğini de beraberinde getirmektedir. Oldukça dayanıklı olmaları ve çevrede bozunmamaları, atılan bu plastiklerin kara, göl ve akarsu ekosistemlerinde birikmelerine sebep olmakta ve bu ekosistemlerin kirlenmesine sebebiyet vermektedir (Loo and Sudesh, 2007). Haliyle doğada biriken bu plastik atıklarının giderimi fazladan zaman ve maliyeti de beraberinde getirmektedir. Atık plastiklerin bertarafı için toprağa gömme, yakma ve geri dönüşüm gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yakma işlemi maliyeti oldukça yüksek olan bir yöntemdir. Bunun yanı sıra yakma işlemi sırasında dioksin gibi çevre ve insan sağlığı açısından oldukça toksik olan küçük moleküller açığa çıkmaktadır. Diğer bir yöntem olan geri dönüşüm yöntemi de zaman ve maliyet açısından düşük verimli bir yöntem olmakla birlikte geri dönüşüme tabi tutulan plastik birkaç tekrardan sonra mekanik özelliklerini kaybetmektedir (Loo and Sudesh, 2007; Suriyamongkol et al., 2007).

Petrol türevli sentetik plastiklerin çevre üzerindeki olumsuz sonuçlarının olması ve petrol fiyatlarındaki artışlar ile birlikte doğada kendiliğinden dönüşüme uğrayabilen biyobozunur plastıklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Biyobozunur plastikler temelde üç grup altında toplanabilir:

1. *Kimyasal yolla sentezlenen polimerler*: Poliglikolik asit, polilaktik asit, poli(ϵ -kaprolakton), polivinil alkol, poli(etilen oksit) bu grupta yer almaktadır. Bunlar enzimatik ve mikrobiyal saldırılara karşı oldukça duyarlıdırlar. Fakat plastiklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini karşılayamamaları, onların ticari anlamda plastiklerin yerine geçmesinde en büyük engeldir (Khanna, and Srivastava, 2005).

2. *Nişasta tabanlı biyobozunur plastikler*: Bu tür plastikler, nişasta ve plastiğin bir çapraz bağlayıcı molekül vasıtasıyla bir araya getirilmesi sonucu oluşturulurlar, örneğin; nişasta-polietilen. Nişastanın toprak mikroorganizmaları tarafından yıkımı sonucu polimer matriks kolaylıkla parçalanır. Böylelikle plastik yıkımın süresi dikkate değer bir şekilde azaltılır. Fakat böyle oluşturulan plastikler kısmi olarak yıkılabilirler. Nişasta ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra mikroorganizma tarafından dönüşüme uğratılamayan kısımlar toprakta uzun bir süre kalacaktır (Khanna, and Srivastava, 2005).

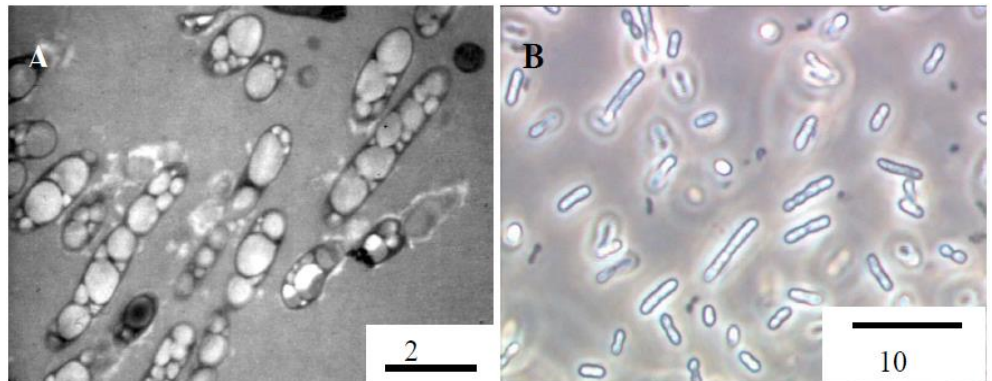
3. *Polihidroksialkanoatlar (PHA)*: PHA'lar doğada tamamen bozunabilen, (biyobozunur) özelliktedirler. Mikroorganizmalar tarafından sentezlenen birçok hidroksialkanoat mevcuttur ve doğada toprakta, denizlerde, göl sularında, lağım sularında yaşayan mikroorganizmalar tarafından yıkıma uğratılırlar. Ayrıca fiziksel ve kimyasal özellikleri açısından petrol türevli plastiklere benzer olması PHA'ların ilgi odağı haline gelmesindeki en önemli etmenlerden biridir (Khanna, and Srivastava, 2005). Buna karşın PHA'ların üretim maliyetlerinin oldukça yüksek oluşu sentetik plastiklerin yerini alabilmesinde büyük bir engel teşkil etmektedir (Purwadi, 2006). Bu amaca yönelik olarak yüksek verimlilikte PHA üreten suşların geliştirilmesi, daha ucuz karbon kaynakları kullanılarak proses maliyetinin düşürülmesi, PHA üretim prosesinin etkin bir şekilde kontrol ve optimizasyonu, PHA üreten organizmaların metabolizmalarının belirlenmesi, bu metabolizmaların modifikasyonu ve yönlendirilmesi gibi stratejiler izlenilebilir ve bu durumun önüne geçilebilir. (Chen, 2009)

1.1 Polihidroksialkanoatlar

Polihidroksialkanoatlar (PHA), çeşitli mikroorganizmalar tarafından stres koşulları altında sentezlenen hidroksialkanoat temelli biyopolimerlerdir. Bu stres koşulları karbon kaynağının aşırısının bulunduğu fakat esansiyel (N, P, S, O ve Mg gibi) elementlerin sınırlandırıldığı koşullardır ve mikroorganizma PHA' yı karbon, enerji ve/veya indirgeyici güç olarak sentezler (Keshavarz and Roy, 2010; Choi et al., 1998; Madison and Huisman, 1999; Lee, and Choi, 1999). Günümüzde PHA sentezleyen ve hücre içerisinde biriktiren 300'den fazla mikroorganizma bilinmektedir (Lee, and Choi, 1999) ve bunların 250'den fazlası gram (+) ve gram (-) bakteriden oluşmaktadır (Ojumu et al, 2004).

PHA' lar bilinen ilk örneği Poli(3-hidroksibütirat, PHB)' tir ve bir bakteri türü olan *Bacillus megaterium*'da Fransız mikrobiyolog Lemoigne tarafından 1920'li yıllarda keşfedilmiştir, o günden günümüze kadar farklı karbon atomu sayısına ve farklı tipte yan gruba sahip birçok PHA keşfedilmiştir (Lemoigne, 1927; Lee, and Choi, 1999). Günümüzde polihidroksialkanoatlara dahil olan yaklaşık 150 farklı hidroksialkanoat türünün olduğu bilinmektedir (Castilho et al, 2009).

PHA mikroorganizmalar tarafından hücre içi granüller halinde depolanır ve yine hücre tarafından sentezlenen depolimerazlar ile kolaylıkla parçalanarak metabolize edilir. Şekil 1.1'de hücre içi PHA granüllerine ilişkin farklı gösterimler verilmektedir (Loo and Sudesh, 2007).

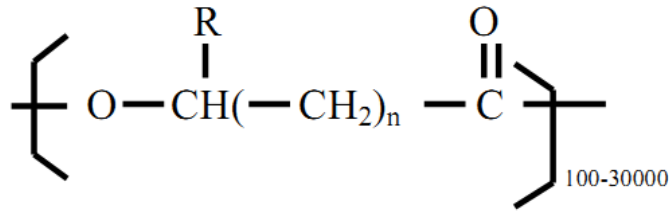


Şekil 1.1. *Wautersia eutropha* H16 suşuna ait PHA granüllerinin Transmission Elektron Mikroskobu (TEM) ve faz kontrast mikroskobu görüntüleri

PHA'lar doğal üretici organizmalara buldukları çevrede çeşitli avantajlar kazandırmaktadır. Yapılan çalışmalar mikroorganizmanın PHA' ları kullanarak çeşitli ekolojik ortamlarda sınırlı besin şartlarında hayatta kalabilmelerine, hücre hareketleri ve biyolojik azot fiksasyonu için enerji sağlamaya, spor ve kist oluşturmaya, ekzopolisakkarit üretiminin kontrolüne; sıcaklık, soğukluk, ozmotik basınç gibi çeşitli çevresel stres koşullarına dayanabilmelerine yardımcı oldukları belirlenmiştir (Chen, 2010). Aynı zamanda PHA'ların birçok mikroorganizma türü tarafından toprak, göl ve akarsu gibi doğal bir ekosistemde kolaylıkla parçalanabildiğine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Boyandin et. al. 2012; Margaert et. al., 1996; Mukai et. al., 1993). Bu çalışmalar PHA'ların bir biyobozunur polimer ailesi olduğunu açıkça göstermektedir.

PHA'lar R-hidroksialkanoik asit monomerlerinden oluşan termoplastik ya da elastomerik özellikteki poliesterlerdir ve her bir monomerinin yapısında bulunan karbon atomu sayısına bağlı olarak üç temel gruba ayrılabilirler (Keshavarz and Roy, 2010; Lee, and Choi, 1999; Suriyamongkol et. al., 2007). Şekil 1.2'de PHA'ların genel yapısı şematize edilmiştir (Ojumu et. al., 2004).

- Kısa yan zincirli PHA'lar (scl); 3-5 karbon atomu,
- Orta yan zincirli PHA'lar (mcl); 6-14 karbon atomu,
- Uzun yan zincirli PHA'lar (lcl); 14'ten daha fazla karbon atomu içerenler



n=1	R= hidrojen	Poli (-3-hidroksipropiyonat)
	Metil	Poli (-3-hidroksibütirat)
	Etil	Poli (-3- hidroksivalerat)
	Propil	Poli (-3-hidroksihegzanoat)
	Pentil	Poli (-3-hidroksioktanoat)
	Nonil	Poli (-3-hidroksidodekanoat)
n=2	R= hidrojen	Poli (-4-hidroksibütirat)
n=3	R= hidrojen	Poli (-5-hidroksivalerat)

Şekil 1.2 Polihidroksialkanoatların genel yapısı

PHA' lar arasında bu denli farklılıkların olması monomer büyüklükleriyle ve bu monomerlerini tanıyan PHA sentaz (polimeraz) enzimlerinin substrat spesifisitesi ile ilişkilidir. Bu durum üretici mikroorganizmaya ve substrat kombinasyonlarındaki değişikliklere bağlı olarak çeşitli tiplerde polimerler üretebileceğini göstermektedir (Purwadi, 2006).

Aynı zamanda PHA' ların da dahil olduğu mikrobiyal biyoplastikleri farklı şekilde sınıflandırmakta mümkündür. Bu sınıflandırmaya Çizelge 1.1'de değinilmiştir (Luengo et al, 2003).

Çizelge 1.1 Mikrobiyal biyoplastiklerin farklı kriterlere göre sınıflandırılması

SINIF	ALT SINIF
Biyosentetik Orijin	Doğal biyoplastikler: Bu tür biyoplastikler mikroorganizmalar tarafından genel metabolitlerden üretilirler.(Örneğin; PHB' ler ve alifatik PHA' lar)
	Yarı sentetik biyoplastikler: Mikroorganizmalar tarafından sentezlenemeyen bazı çıkış bileşenlerinin kültür sıvısına eklenmesi yoluyla oluşturulurlar.(Örneğin; aromatik monomer içeren PHA' lar)
	Sentetik biyoplastikler: Doğal polyesterlere benzerler fakat sadece kimyasal yolla sentezlenebilirler.(Örneğin; Sentetik termoplastikler polimerler)
Monomerlerin Kimyasal Yapısı	Alifatik yağ asidi türevlerini içeren biyoplastikler: Doymuş veya doymamış (çift ya da üçlü bağ içeren) monomerler; düz veya dallanmış monomerler; monomer yapısında fonksiyonel grup içeren yada içermeyenler.
	Aromatik yağ asidi türevlerinin içeren biyoplastikler
	Aromatik ve alifatik yağ asidi türevlerinin her ikisini de içeren biyoplastikler
	Diğer Bileşikler içeren biyoplastikler. Örneğin; poli- γ -glutamik asit, poli- ϵ -L-lizin, poli- β -L-malik asit, poliglikolik acit, siyanofisin
Monomerlerin Büyüklüğü	Kısa zincirli biyoplastikler. 3-5 karbon atomlu monomer içeren PHA' lar
	Orta zincir uzunluklu biyoplastikler. 6-14 karbon atomlu monomer içeren PHA' lar
	Uzun zincirli biyoplastikler. 14 ' ten fazla karbon atomuna sahip monomerleri içeren PHA' lar
Poliester Yapısındaki Monomerlerin Sayısı	Homopolimerik biyoplastikler: Yapısında tek bir monomer bulunduranlar
	Heteropolimerik biyoplastikler (kopolimerler): Yapısında birden fazla farklı monomer bulunduranlar

Bunla birlikte en çok bilinen ve çalışılan PHA türü PHB'tır ve PHA'ların fiziksel özellikleri PHB ve kopolimerlerinden yola çıkılarak belirlenmiştir (Madison, and Huisman, 1999).

1.2 Polihidroksialkanoatların Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen PHA' lar, yapısında kısa zincirli 3-hidroksi yağ asitlerini içeren ve tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun biyopolimerlerdir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Bir PHA zinciride, bir 3-hidroksi yağ monomerinin karboksil grubu ile bir sonraki monomerin hidroksil grubu ester bağı yapar ve 50 KDa ile 1000 KDa arasında değişen molekül ağırlığına sahiptir polimer oluşur (Madison and Huisman, 1999).

PHA molekülleri hücre içerisinde 0,2-0,5 µm çapında inklüzyonlar halinde biriktirilirler ve suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir, ayrıca polimerler optik olarak aktif ve yüksek kristal özelliktedir (Suriyamongkol at al. 2007; Reddy et al., 2003).

Polimer yapısındaki monomerin yan zincir uzunluğu PHA'ların termal ve mekanik özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. PHA'lar bu kompozisyon farklılıkları nedeniyle farklı fiziksel özelliklere sahiptir (Khanna and Srivastava, 2005). Fiziksel özelliklerine bakıldığında kısa yan zincirli (scl) PHA moleküllerinin sert, kırılğan ve yüksek kristallenme derecesine sahip olduğu görülürken diğer yandan orta yan zincirli (mcl) PHA'lar esnektir ve daha düşük kristallenme derecesine, gerilme kuvvetine ve erime noktasına sahiptir (Philip et al. 2007). Bu nedenlerden ötürü scl-PHA'lar termoplastik özellik gösterir ve polipropilen veya polietilen gibi geleneksel plastiklere benzer fiziksel özelliklere sahiptirler, bununla birlikte mcl-PHA'lar ise amorf yapıdadır ve elastomerik özellik gösterirler (Li et al., 2007).

Örneğin scl-PHA grubuna ait olan PHB, D(-) konfigürasyondaki asimetric karbon atomuna bağlı olarak %100 stereospesifik, sert, kırılğan ve kristal yapıda bir termoplastiktir. PHB' in erime sıcaklığı 175°C ve termal degradasyon sıcaklığı olan 185°C' ye oldukça yakındır. Bu da termal işlenmesinde olumsuz sonuçlar doğurmaktadır (Ojumu et al, 2004).

Neme dirençli olması, suda çözünmemesi ve optik saflık gibi bir çok kullanışlı özelliği ile PHB, suda çözünen ya da neme duyarlı diğer biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerden farklılık gösterir. Ayrıca PHB oksijene karşı

oldukça dayanıklıdır. PHB'nin UV ışınlarına dirençli, fakat asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir PHB, hücre içerisinde sıvı ve atmosferde katı iken organik özütlenme yoluyla hücre dışına alındığında ise kristalize formda bulunur (Madison, and Huisman, 1999; Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

PHB' in 3-hidroksivalerat(3HV) gibi komonomerlerle birleştirilmesi ya da başka polimerlerle karıştırılması sonucu oluşan yapıların daha az sert ve daha az kırılğan olduğu bilinmektedir (Ojumu et al, 2004). Özellikle P(HB-co-HV), erime sıcaklığını ve kristalliğinin daha düşük olduğu gözlenmektedir. Polimerdeki 3HV molünün yüzdesine bağlı olarak Çizelge 1.2'de görülebileceği gibi fiziksel özellikleri de değişmektedir (Ojumu et al, 2004; Madison, and Huisman, 1999; Philip et al, 2007; Lee, 1996). Oluşan polimerler darbelere karşı daha dayanıklı ve daha esnek hale gelmektedir. 3HV molünün yüzdesindeki artışla birlikte uzamanın da arttığı bildirilmiştir. P(HB-co-HV), erime sıcaklığındaki düşüş termal proseslerde degradasyona uğramadan işlenebilirliğini kolaylaştırmaktadır (Ojumu et al, 2004). Poli(4-hidroksibütirat), P(4HB), kuvvetli ve kolay işlenebilen bir termoplastiktir. Polipropilenle kıyaslanabilecek derecede gerilme direncine ve elastik özelliklere sahiptir (Philip et al, 2007).

Çizelge 1.2 PHB, P(HB-co-HV), P(4HB) ve polipropilenin fiziksel özellikleri

Özellik	PHB	P(HB-co-HV)				P(4HB)	Polipropilen
		3 mol (%)	14 mol (%)	20 mol (%)	25 mol (%)		
Erime noktası (°C)	175	169	150	145	137	60	176
Cam geçiş sıcaklığı (°C)	15	-	-	-1	-1	-50	-10
Kristalinite (%)	80	-	-	56	40	-	70
Kopma mukavemeti (MPa)	40	38	35	32	30	104	34,5
Darbe dayanımı (v/m)	50	60	120	200	400	-	45

1.3 Polihidroksialkanoatların Kullanım Alanları

Polihidroksialkanoatlar, petrol türevli plastiklerle benzer fiziksel özelliklere sahip oluşu, biyobozunur olması, canlı sistemlerde toksik olmaması ve farklı fermantasyon stratejileri ile istenilen özelliklerde üretilebilmesi sayesinde bir çok alanda hammadde ve biyomateryal olarak kullanım olanağı bulabilmektedir (Lee, 1996; Chen, 2010).

Örneğin PHB ve kopolimeri P(3HB-co-3HV), gıda ve kozmetik alanındaki paketlenme maddeleri, tarım, kişisel temizlik araçları ve biyomedikal ürünler gibi alanlarda çok geniş potansiyel uygulamalara açıktır. Hidroksiasit uzun yan zincirli PHB'lar basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılmaktadır. PHB, lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların yapımını sağlayabilirler (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Biyoyumlu olan PHB monomerleri insan vücudunda bulunan doğal metabolit olması nedeniyle, polimer vücutta sadece çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur. Vücut içinde biyolojik parçalanması oldukça yavaştır. İnsan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır (Williams et al., 1996).

Biyobozunur olması ve insan vücudunda oldukça yavaş parçalanmasından dolayı eczacılık alanında ilaçların ve hormonların, uzun süreli ve uygun dozajda kontrollü salınımında kullanılmaktadır. Ayrıca tarım alanda çeşitli böcek ve zararlı otların öldürülmesi amacıyla kullanılan ilaçların kontrollü salınımında da kullanılmaktadır. Ayrıca optikçe aktif kimyasalların sentezi için kiral çıkış bileşeni olarak kullanılmaktadır. (Khanna, and Srivastava, 2005).

PHA'ların biyoyumlu oluşunun yanı sıra piezoelektrik özellikleri nedeniyle osteosentetik materyal olarak kemik büyütülmesinde, kemik değiştirilmesi ve cerrahi plakalarda kullanılmaktadır. Ayrıca kan damarı değiştirilmesinde de kullanılmaktadır (Khanna, and Srivastava, 2005). Örneğin P4HB ve P3HB-4HB'ın kardiyovasküler doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılabilirliğine yönelik bir çok çalışma mevcuttur. P4HB'in esnekliği ve etkin

degradasyon süresi sayesinde dolaşım sisteminde kullanım için alternatif bir biyomateryal olduğu ileri sürülmüştür. Bu özellikleri sayesinde vasküler graflar ve kalp kapakçığı yapımında da kullanılabilirliğine dair birçok çalışma bildirilmiştir (Freier, 2006).

Aşağıda PHA'ların yukarıda bahsi geçen ve diğer kullanım alanları maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Ambalaj filmleri, poşetler, torbalar, çeşitli kaplar üretimi
2. Kontrollü ilaç ve gübre salınımı
3. Tek kullanımlık tıraş bıçağı, bebek bezi, çatal, bıçak, tabak üretimi
4. Şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamaları
5. Cerrahi pens, ameliyat ipliğı, eldiven, önlük ve maske üretimi
6. Pansuman sargısı üretimi
7. Kemik değiştirilmesi ve cerrahi plakalar üretimi
8. Bitki sulama boruları, bitki yapraklarının kaplanması
9. Kiral bileşenler üretiminde çıkış materyali
10. Piezoelektrik özelliklerinden yararlanılarak kemik büyütülmesi ve tedavisi
11. Kan damarı değiştirilmesi
12. Gıda ürünlerinde nem ve oksijene karşı koruma
13. Gıda ürünlerinde parlaklık sağlama, aroma kaybını önleme

1.4 Polihidroksialkanoatların Biyosentezi

Karbon kaynağının aşırısının ve azot düşük konsantrasyonlarda bulunduğu stres koşulları altında 90' dan fazla genus ait 250'den fazla Gram (+) ve Gram (-) bakteri çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanarak PHA sentezleyebilme yeteneğine sahiptir (Castilho et al, 2009; Reddy et al., 2003 ; Domb et al., 1998; Keshavarz and Roy, 2010). Üretilen polimerin kompozisyonu bu karbon kaynaklarını kullanan bakterinin PHA biyosentez yolağında görevli olan enzimlerin substrat spesifikliğine bağlı olarak değişmektedir (Domb et al., 1998).

Hücredeki PHA üretimi birçok faktörden etkilenmektedir, dolayısıyla PHA'lara ilişkin moleküler ağırlıkları ve polimerin büyüklüğü gibi son ürün özellikleri de etkilenmektedir. PHA'ların molekül ağırlıkları, üretim ortamının pH değeri ve karbon kaynağının konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Polimer miktarı %80'e eriştiğinde, hücrelerin çoğalması yavaşlamaktadır, dolayısıyla bu gibi fiziksel kısıtlamalar da biyopolimerin hücre içerisinde birikimi için sınırlayıcı faktörlerden biri olabilmektedir (Purwadi, 2006).

PHA'lara ilişkin biyosentez yolları günümüzde oldukça iyi aydınlatılmıştır. Buna karşın PHA metabolizmasının regülasyonu oldukça karmaşıktır. Öncelikli olarak metabolitlerin kullanılabilirliği ve kofaktör inhibisyonu ile enzimatik düzeyde, ikincil olarak da spesifik veya genel transkripsiyonel düzenleyici faktörler sayesinde transkripsiyonel düzeyde regüle edildiği düşünülmektedir. PHB-üreten bakterilerde PHA metabolizmasının regülasyonu ayrıntılı bir şekilde araştırılmasına rağmen, Pseudomonadlarda çok sınırlı araştırmalar mevcuttur. Özellikle enzimatik ve fizyolojik düzeylerde mcl-PHA üretiminin regülasyonu hakkında çok az bilgi mevcuttur (Escapa et al, 2012; Kessler and Witholt , 2001; Eugenio et al, 2010; Hoffman and Rhem, 2005)

Asetil-CoA molekülü, çeşitli uzunluklardaki 3-hidroksialkanoil-CoA monomerlerinin biyosentezindeki temel bileşendir. Ayrıca PHA'ları oluşturan bu monomerler farklı zincir uzunluklarına sahip yağ asitlerinin β oksidasyonu ile de sentezlenebilmektedir. Farklı canlılarda gerçekleşen PHA biyosentezi sekiz yolda özetlenebilir. Bu sekiz farklı yolak Şekil 1.3'te gösterilmiştir. Ayrıca

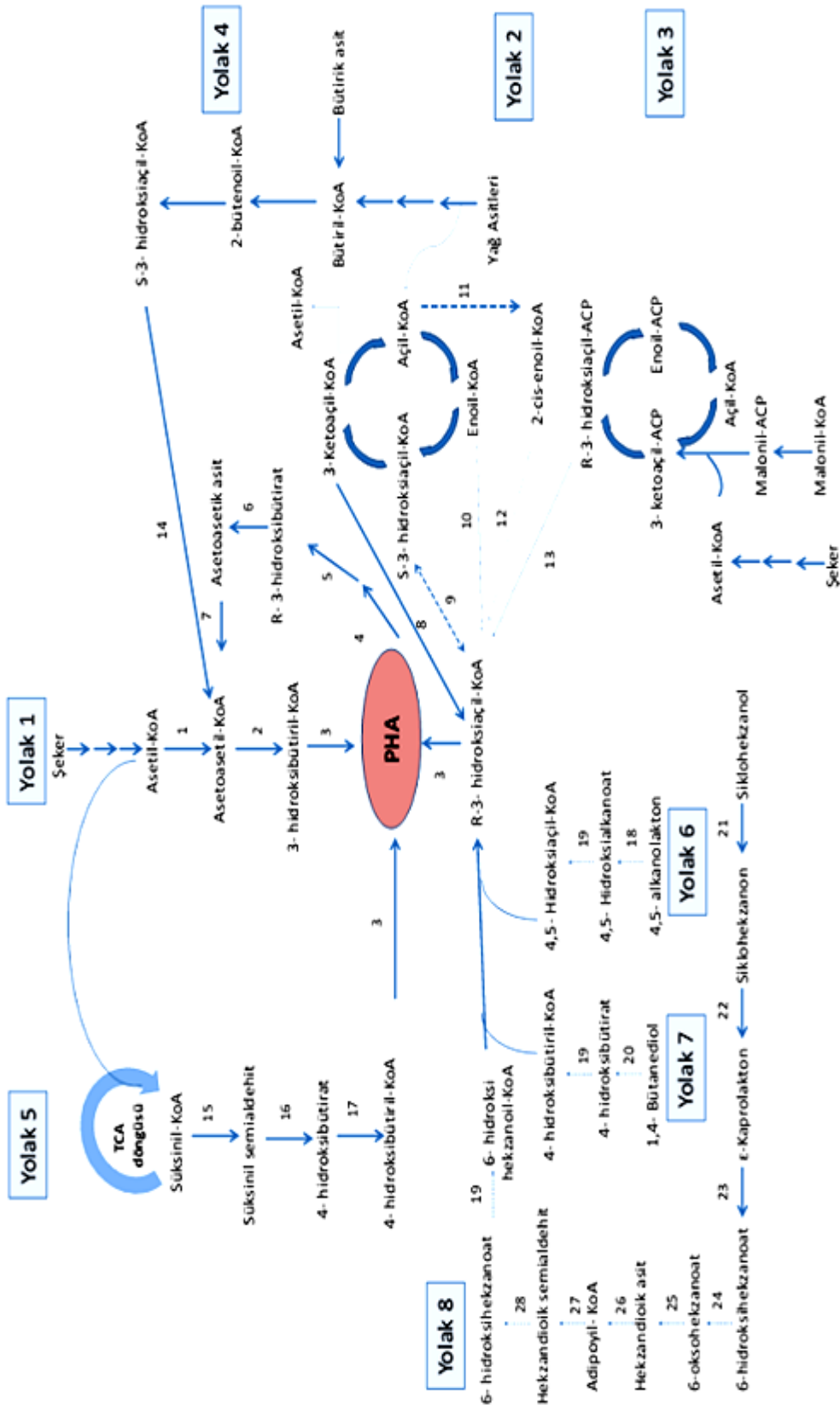
Çizelge 1.3' te PHA biyosentezinde görev alan genlere ve enzimlere basitçe değinilmiştir (Chen, 2010).

Basit şekerlerin PHA sentezinde kullanıldığı I.yolakta sırasıyla *phaA*, *phaB* ve *phaC* genleri tarafından kodlanan beta-ketotiyolaz, NADPH-bağımlı asetoasil-CoA redüktaz ve PHA sentaz (polimeraz) enzimleri görev almaktadır. Kısa zincir uzunluklu PHA' ların biyosentezi genellikle bu yol üzerinden yürür. *Alcaligenes latus* ve *Ralstonia eutropha* bu yolağı kullanarak PHA sentezini gerçekleştirmektedir.

İkinci PHA sentez yolağı yağ asitlerinin β -oksidasyonu ile ilişkilidir. Özellikle mcl-PHA' ların biyosentezi temelde bu yolla üzerinde gerçekleşir. Yağ asidinin β -oksidasyonundan sonra açıl-CoA PHA monomerinin sentezlenme sürecine girer. 3-ketoaçıl-CoA redüktaz, epimeraz, (R)-enoil-CoA hidrataz/enoil-CoA hidrataz I, açıl-CoA oksidaz (olası) ve enoil-CoA hidrataz I' i (olası) içeren enzimler biyopolimerin sentezlenmesi için PHA öncülleri olan 3-hidroksiaçıl-CoA'nın sağlanmasında görev almaktadırlar. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *A. hydrophila* orta yan zincirli (mcl) PHA ya da (R)-3-hidroksibütirat ve (R)-3-hidroksihekzanoat kopolimerini sentezlemek için yolak II'yi kullanmaktadırlar (Chen, 2010).

Basit şekerlerin kullanıldığı diğer bir yolak olan yolak III,3-hidroksiaçıl-ACP-CoA transferaz (PhaG) ve PHA monomeri 3-hidroksiaçıl-CoA'yı oluşturmak için 3-hidroksiaçıl-ACP sağlanmasına yardım eden malonil-CoA-ACP transaçılaz (FabD) enzimlerini içermektedir ve PHA sentaz enziminin etkisi altında PHA oluşumunu sağlamaktadır. Mcl-PHA' lar bu yolak üzerinden de sentezlenebilmektedir (Chen, 2010; Philip et al, 2007).

Yolak IV üzerinden izlene biyokimyasal reaksiyonda ise NADH bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz enzimini (S)-(+)-3-hidroksibütiril-CoA'yı okside etmek için kullanılmaktadır. NADPH'nin NADP⁺'ya olan oranının yüksek olması *Rhizobium* sp. CC1192'de indirgeyicinin nitrojenaza iletimini hızlandırabilir. Bu ayrıca, poli[(R)-3-hidroksibütirat] (PHB) sentezi için asetoasetilCoA'nın indirgenmesini de sağlamaktadır.



Şekil 1.3 Mikrobiyal PHA üretim yolları

Yolak V 4-hidroksibütirat içeren PHA oluşturmak için süksiniksemialdehit dehidrogenaz (SucD), 4-hidroksibütirat dehidrogenaz (4hbD) ve 4-hidroksibütirat-CoA:CoA transferaz (OrfZ) enzimlerini 4-hidroksibütiril-CoA sentezlemek için kullanmaktadır.

Yolak VI PHA sentezinde olası laktonaz ve hidroksiaçil-CoA sentaz enzimlerini 4,5 alkanolaktonu 4,5-hidroksiaçil-CoA'ya dönüştürmek için kullanmaktadır. Yolak VII, *A. hydrophila* 4AK4'da bulunan olası alkol dehidrogenaz üzerine kuruludur. Yolak VII de, 4-hidroksibütirat içeren PHA sentezi için 1,4-butanediol 4-hidroksibütirata ve ardından 4-hidroksibütiril-CoA'ya okside edilir. Yolak VIII sekiz enzimin çalıştığı bir reaksiyon zincirinde 6-hidroksiheksanoatı, 6-hidroksiheksanoat içeren PHA ya dönüştürür (Chen, 2010).

Çizelge 1.3 PHA üretim yollarında görev alan enzimler

No	Yolak	Gen-Kısaltma	Enzim
1	Yolak I	PhaA	β -ketotiyolaz
2		PhaB	NADPH- bağımlı asetoastil-CoAredüktaz
3		PhaC	PHA sentaz
4		PhaZ	PHA depolimeraz
5			Dimerhidrolaz
6			(R)-3-Hidroksibütirat dehidrogenaz
7			Asetoastil-CoA sentaz
8	Yolak II	FabG	3-Ketoaçil-CoA redüktaz
9			Epimeraz
10		PhaJ	Enoil-CoA hidrataz/enoil-CoA hidrataz I
11			Açil-CoA oksidaz (olası)
12			Enoil-CoA hidrataz I (olası)
13	Yolak III	PhaG FabD	3-hidroksiaçil-ACP-CoA transferaz malonil-CoA-ACP transaçilaz
14	Yolak IV		NADPH- bağımlı asetoastil-CoAredüktaz
15		SucD	Süksiniksemialdehit dehidrogenaz
16	Yolak V	4hbD	4-hidroksibütirat dehidrogenaz
17		OrfZ	4 -hidroksibütirat-CoA:CoAtransferaz
18	Yolak VI		Laktonaz (olası)
19			Hidroksiaçil-CoA sentaz (olası)
20	Yolak VII		Alkol dehidrogenaz (olası)
21	Yolak VIII	ChnA	Sikloheksanol dehidrogenaz
22		ChnB	Sikloheksanon monooksigenaz
23		ChnC	Kaprolakton dehidrogenaz
24		ChnD	6-Hidroksiheksanoat dehidrogenaz
25		ChnE	6-Oksoheksanoat dehidrogenaz
26			Semialdehiddehidrogenaz (olası)
27			6-Hidroksiheksanoat dehidrogenaz (olası)
28			Hidroksiaçil-CoA sentaz (olası)

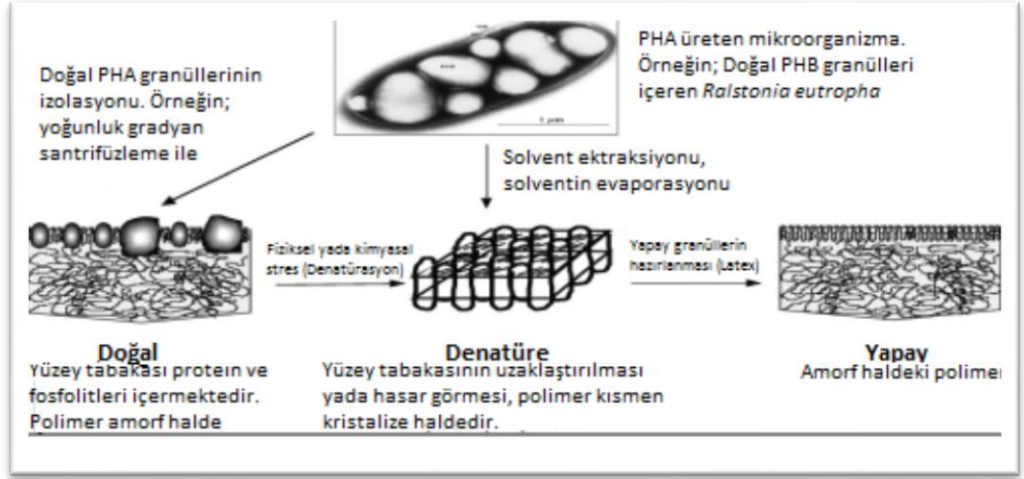
1.5 Polihidroksialkanoatların Degradasyonu

PHA'lar toprak, çamur ve deniz suyu gibi farklı ekosistemlerde yaşayan bakteri ve fungus gibi birçok mikroorganizma tarafından biyolojik olarak H₂O ve CO₂'e kadar parçalanabilmektedir (Santimono et al., 2009). Katı ve sıvı halde bulunan PHA molekülleri bu mikroorganizmalar tarafından salgılanan depolimeraz ya da hidrolaz enzimleri aracılığıyla suda çözünebilen oligomer veya monomerlere parçalanırlar ve bu parçalanma ürünleri besin kaynağı olarak ya da tekrardan PHA' ların biyosentezinde kullanılırlar. Kısa zincir uzunluklu ve orta zincir uzunlukta PHA' ların degradasyonu bunlara spesifik PHA depolimeraz enzimleri ile gerçekleştirilmektedir (Domb et al., 1998; Madison and Huisman, 1999).

PHA'ların, PHA depolimeraz ile enzimatik hidrolizi; iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi ekstraselüler (hücre dışı) PHA degradasyonu, diğeri ise intraselüler (hücre içi) PHA degradasyonudur (Jendrossek and Handrick, 2002).

1.5.1 Ekstraselüler PHA Degradasyonu

Ekstraselüler PHA degradasyonu; ekstraselüler PHA depolimeraz sentezleyen bir mikroorganizma tarafından, PHA biriktiren bakterilerin ölümü ve hücre lizisi sonrası açığa çıkan PHA'ların kullanımınıdır. Bilindiği gibi PHA hücre içerisinde granüler halde depolanır ve granül içerisindeki PHA polyesterleri amorf haldedirler. Bu granüller fiziksel ve kimyasal strese duyarlı protein ve fosfolipidlerden oluşan yüzey tabakasına sahiptirler. PHA hücreden ekstrakte edildiğinde, granül yüzeyi hasar görmekte ve polimer zincir helikal konformasyona adapte olma eğilimi göstermektedir. Buna bağlı olarak da polimer intraselüler polimerazların etki edemeyeceği kristalize hale gelmektedir (Şekil 1.4) (Amara and Salem, 2007; Jendrossek and Handrick, 2002).



Şekil 1.4 PHA'nın doğal ve denatüre haldeki fiziksel durumu (Jendrossek and Handrick, 2002)

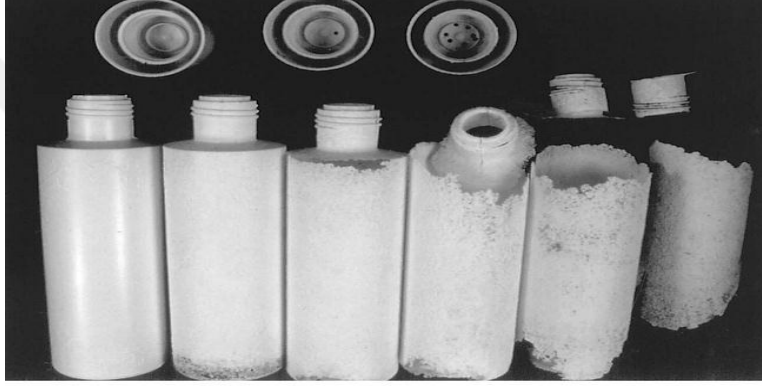
Kristalize haldeki polimerler sadece ekstraselüler PHA depolimerazlar tarafından hidrolizlenmektedir. Mikroorganizmaların PHA'ları ekstraselüler olarak degrade edebilme yeteneği hücre dışına ekstraselüler PHA depolimeraz enzimini salgılayabilmesine bağlıdır ve bu sayede hücre suda çözünemeyen polimeri suda çözünebilen monomer ve/veya oligomerlere hidrolizleyebilmektedir (Jendrossek and Handrick, 2002).

Ekstraselüler depolimerazlar üzerine yapılan çalışmalarda genellikle *Paucimonas [Pseudomonas] lemoignei* bakterisi kullanılmıştır ve 7 tane depolimeraz sentezlediği saptanmıştır (PhaZ1-PhaZ7). Bu depolimerazlar amorf PHB'nin hidrolizinde kooperatif etki gösterirler. Kısa zincir uzunluklu ve orta zincir uzunlukta PHA'ların degradasyonu bunlara spesifik PHA depolimeraz enzimleri ile gerçekleştirilmektedir (Jendrossek and Handrick, 2002). Günümüzde prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmalardan 80'den fazla ekstraselüler PHA depolimeraz enzimi saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir (Kim et al, 2005).

Ekstraselüler depolimerazlar benzer enzimatik özelliklere sahiptirler benzer. Örneğin; sıcaklık, iyon şiddeti ve pH değişimlerine karşı yüksek stabilite gösterirler. Molekül ağırlıkları diğer depolimerazlara nazaran küçüktür (<70kDa), genellikle tek bir polipeptitten oluşurlar. Alkali pH değerlerinde aktivite gösterirler (pH 7,5-9,8) ve hidrofobik materyallere yüksek afinite

göstermelerinden dolayı saflaştırılmalarında hidrofobik etkileşim kromatografisi kullanılır (Jendrossek and Handrick, 2002).

PHA biyopolimerlerinin doğada parçalanması polimerin kompozisyonuna, fiziksel yapısına (amorf, kristal), boyutuna ve en önemli olarak da çevre koşullarına bağlıdır. PHB filminin doğadaki bozunma hızı anaerobik çamurda birkaç hafta iken denizsel ekosistemlerde ise birkaç yıl sürebilmektedir (Madison and Huisman, 1999). Canlı sistemlerde ise PHA'lar kan ve dokularda yer alan enzimler tarafından parçalanmaktadır (Keshavarz and Roy, 2010; Ojumu, et al, 2004).



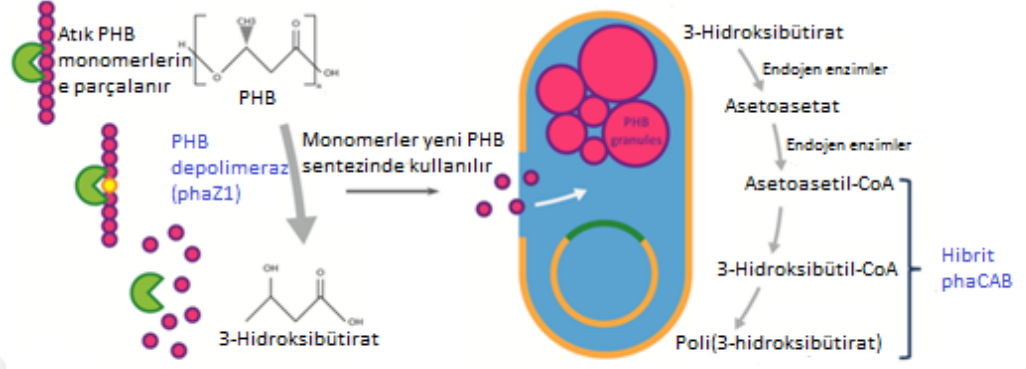
Şekil 1.5. Aerobik arıtma çamurunda P(3HB-3HV) 'nin biyobozunumu. P(3HB- 3HV) 'den yapılan şişeler yaz süresince (ortalama 20°C) aerobik arıtma çamurunda inkübe edilmişlerdir. Fotoğrafta görülen şişeler 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 hafta sonunda çamurdan alınıp fotoğrafları çekilmiştir (Madison and Huisman, 1999).

1.5.2 İntraselüler PHA Degradasyonu

İntraselüler PHA degradasyonu polimerin hücre içerisindeki hidrolizi anlamına gelmektedir ve PHA biriktiren bakterinin kendisi tarafından gerçekleştirilmektedir. İntraselüler PHA degradasyonu buna spesifik olan intaselüler depolimeraz enzimi tarafından katalizlenmektedir. İntraselüler depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, sıvı haldeki doğal PHA polimerlerini hidrolizlemektedir. Fakat intraselüler degradasyonunun mekanizması ve regülasyonu tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

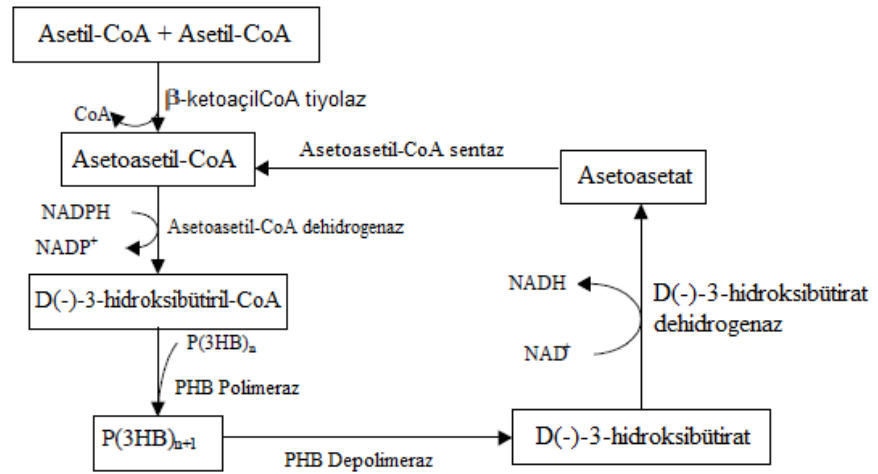
PHA'ların intraselüler degradasyonu için yapılan çalışmalar sonucunda 3HA'ların degradasyonu aydınlatılmıştır (Jendrossek et al, 2002). Şekil 1.6' da 3HA'ların Asetil-CoA'ya parçalanma mekanizması şematize edilmiştir. Şekilden

de görüleceği gibi PHA depolimeraz enzimi PHA granülünü 3 HA monomerlerine parçalar ve ardından bir dehidrojenaz enzimi aracılığıyla bu monomerler asetilasetata oksitlenir. Sonrasında β -ketotiyolaz enzimi asetilasetatı Asetil-CoA'ya parçalamaktadır. Oksijenli bir ortamda asetil-CoA sitrik asit döngüsünde CO₂'e kadar parçalanmaktadır (Keshavarz and Roy, 2007; Ojumu et al, 2004).



Şekil 1.6 3HA'ların Asetil-CoA'ya parçalanması (Plasticity, 2013)

Şekil 1.7'de *Ralstonia eutropha*'daki PHB'nin biyosentezi ve yıkımı gösterilmektedir. Yıkım basamağında PHB depolimeraz, D(-)-3-hidroksibütirat dehidrojenaz ve Asetoasetil-CoA sentaz enzimleri görev almaktadır. Oluşan asetoasetat organizmanın ihtiyacına göre Asetil-CoA'ya dönüştürülerek metabolizmada kullanılabileceği gibi Asetoasetil-CoA sentaz enzimiyle tekrar polimer sentezine de katılabilmektedir (Khanna, and Srivastava, 2005).



Şekil 1.7. *Ralstonia eutropha*' da PHB' in biyosentezi ve yıkımı (Khanna, and Srivastava, 2005).

1.5.3 PHA depolimerazlar (EC 3.1.1.75, EC 3.1.1.76)

PHA depolimerazlar (EC 3.1.1.75, EC 3.1.1.76) mono ve/veya oligomerik hidroksi alkanoat polyesterlerinin hidrolizini katalizlerler. PHA'ların, PHA depolimeraz ile enzimatik hidrolizi; iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birincisi ekstraselüler (dışı hücre) PHA degradasyonu, diğeri ise intraselüler (hücre içi) PHA degradasyonudur. Ekstraselüler PHA degradasyonu; ekstraselüler PHA depolimeraz (e-PHA depolimeraz) sentezleyen bir mikroorganizma tarafından, PHA biriktiren bakterilerin ölümü ve hücre lizisi sonrası açığa çıkan PHA'ların kullanımınıdır. İntraselüler PHA degradasyonu polimerin hücre içerisindeki hidrolizi anlamına gelmektedir ve PHA biriktiren bakterinin kendisi tarafından gerçekleştirilmektedir. İntraselüler PHA degradasyonu buna spesifik olan intraselüler depolimeraz enzimi (i-PHA depolimeraz) tarafından katalizlenmektedir. İntraselüler depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, sıvı haldeki doğal PHA polimerlerini hidrolizlemektedir (Papageorgiou et al., 2008).

PHA'lar tamamen amorf yapıda ve yüzeyinde temelde proteinler bulunur. Bu tip PHA'lara doğal PHA'lar olarak adlandırılırlar. PHA granülleri bu yüzey tabakalarını kaybettiklerinde ya da bakteriden hücrenin dışına salındıklarında (liziz yoluyla) hızlıca denatüre olurlar ve para kristalin bir yapı oluşur (denatüre PHA'lar). Denatüre PHA'lar e-PHA depolimerazlar tarafından hidrolizlenirler. i-PHA depolimerazların biyokimyası ve kristal yapısına ilişkin çok az bilgi mevcuttur. Buna karşın 20'den fazla e-PHB depolimeraz enzimi saflaştırılıp, biyokimyasal olarak ve gen seviyesinde karakterize edilmiştir. Çoğu e-PHB depolimeraz üç domainden oluşan serin hidrolaz sınıfına aittir. Bu domainler büyük bir katalitik C-terminal domaini, substrat bağlanan N terminal domaini ve bağlayıcı (linker) domainidir (Papageorgiou et al., 2008).

İki farklı katalitik domain, primer yapıdaki lipaz-box dizisinin GX SXG (X burada herhangi bir amino asidi ifade eder) ortada ya da N-terminala yakın olmasına bağlı olarak I veya II olarak adlandırılır. Ayrıca bu zamana kadar üç farklı bağlayıcı domain ve iki farklı substrat bağlayan domain karakterize edilmiştir. Substrat bağlayan domain enzimin biyopolimere adsorpsiyonuna ve hidrojen bağlarını kırılmasına yardımcı olur. e-PHB depolimerazlar yukarıda bahsedilen domain yapılarına göre sınıflandırılmalarına rağmen iki istisna

bulunmaktadır. Bunlar *Penicillium funiculosum*'un e-PHB depolimerazı ve *Paucimonas lemoignei*'ye ait *phaZ7* PHB depolimerazdır. Bu depolimerazlar tek bir domain içerirler ve diğer depolimerazlarla amino asit homolojisi yoktur. İkisi de aynı biyolojik reaksiyonu katalizlemelerine rağmen *P. funiculosum* depolimeraz para kristalin yapıdaki PHA'yı parçalarken *P. lemoignei* *PhaZ7* depolimeraz amorf yapıdaki polimeri parçalar. Ayrıca *P. lemoignei* *PhaZ7* depolimeraz tip I iken *P. funiculosum* depolimeraz tip II depolimeraz sınıfına aittir (Papageorgiou et al., 2008).

P. funiculosum PHB depolimeraz bilinen en küçük e-depolimerazdır ve moleküler ağırlığı 33 kDa'dur (Papageorgiou et al., 2008).

P. fluorescens PHA dehidrogenazlar, EC 3.1.1.76-Poli(3-hidroksioktanoat) depolimeraz, polihidroksioktanoat (PHO) yapısındaki C-O bağının hidrolizini katalizler. Uzun süreli inkübasyonlarda temel ürün dimerdir. 3-hidroksioktanoat polimerinin hidrolizinin yanı sıra diğer orta zincir uzunluklu (C6-C12) hidroksialkanoik asitlerin ve kopolimerlerinin hidrolizini de katalizler. Aynı zamanda yağ asitlerinin p-nitrofenil esterlerinin de hidrolizini gerçekleştirir. Poli[(R)-3-hidroksi bütanoik asit] ve poli[(R)-3-hidroksipentanoik asit] gibi kısa zincir uzunluklu polimerlerin hidrolizini katalizleyemez. Poli(3-hidroksioktanoat-co-3-hidroksiheksanoat) (lateks süspansiyon) substrat olarak kullanıldığında temel ürün (R)-3-hidroksioktanoattır (BRENDA, 2016).

1.6 Metabolit Profilleme

Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda lipid, karbohidratlar, vitaminler, hormonlar ve diğer hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasıdır (Bren L, 2005). Metabolit ise canlılarda çeşitli tepkimeler sırasında ortaya çıkan ve normal olarak vücutta birikmeyerek başka bileşiklere dönüşen kimyasal bileşiklerdir. Canlı sistemlerdeki metabolitler peptitler, oligonükleotidler, şekerler, nükleozidler, organik asitler, ketonlar, aldehitler, aminler, amino asitler, lipitler, steroidler, alkaloidler gibi insan ve mikroorganizma ürünleridir ve molekül ağırlıkları 1.500 Da'un altındadır (Goodacre, 2005). Metabolomik; adli tıpta, ilaç bulma ve tasarımı, ekolojik araştırmalarda, genetiği değiştirilmiş

organizmaların test edilmesinde, tarım ve gıda sektöründe, sağlık tarama ve hastalık tanısında biyobelirteç bulmada, metabolik yol izlerine dayalı tüm çalışmalarda, gen fonksiyon analizlerinde ve sistem biyolojisinde kullanılmaktadır (Gomez-Casati et al, 2013).

Metabolomik; biyoloji, kimya ve matematik içeren ve çok değişkenli veri analiz yöntemleriyle birleştirilmiş kromatografi, moleküler spektroskopi ve kütle spektrometresi gibi analitik tekniklere ihtiyaç duyan multi-disipliner bir bilimdir. (German et al., 2005). Metabolomik analizlerde, NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), MS (Kütle Spektrometresi), FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), GC (Gaz Kromatografisi), GC-MS (Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi), LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi), CE-MS (Kapiller Elektroferez-Kütle Spektrometresi gibi yüksek verimli analiz yöntemleri kullanılır (Fukui et al, 2014).

1.7 Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS)

Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS), kompleks matrislerdeki organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizinde en yaygın kullanılan analitik tekniklerden biridir. GC/MS, çevre bilimleri, adli bilimler, medikal ve biyolojik araştırmalar, sağlık ve güvenlik, gıda kalite ve aroma kontrol, ambalajlama, ilaç geliştirme, metabolik analizler ve birçok alanda kullanım alanı bulabilmektedir.

GC/MS, iki güçlü mikro analitik tekniğin birbirinin etkisini arttıracak şekilde birleştirildiği bir sistemdir. Gaz kromatografisi, karışımın bileşenlerini ayırır, kütle spektrometresi ise her bir bileşenin yapısal karakterizasyonunda yardımcı olacak bilgiyi sağlar. Gaz kromatografisinin ayırmış olduğu her bir bileşiğe ait kütle spektrumları kalitatif analiz amacıyla kullanılabilir. Ayrıca bu kütle spektrumları aynı bileşiğin kantitasyonunda da bilgi sağlamaktadır.

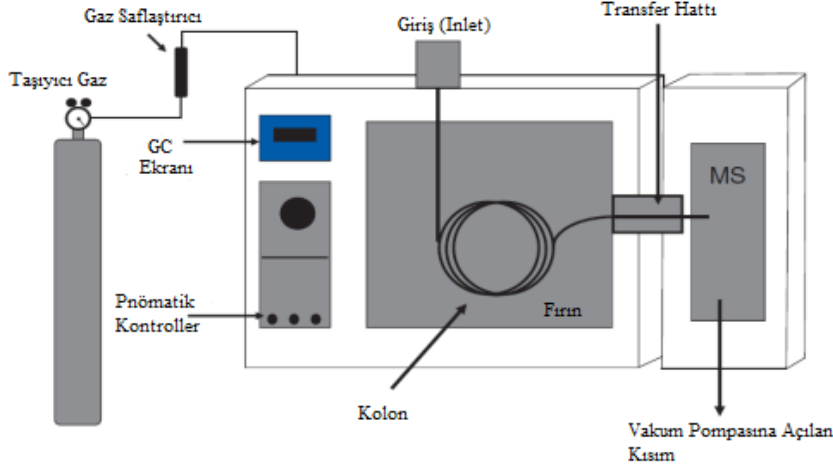
GC/MS sistemi, birkaç femtomol analite ait tam bir kütle spektrumunu oluşturabilir. Bu kütle spektrumu, bileşiklere ait karakteristik fragmentasyon düzenini ya da kimyasal parmak izini açığa çıkartır ve gaz kromatografisindeki alıkonma zamanıyla birlikte bileşiğin temel olarak tanımlanmasında kullanılabilir.

1.7.1 Gaz Kromatografisi (GC)

Gaz Kromatografisi (GC) tekniği ilk defa James ve Martin tarafından 1952 yılında kullanılmıştır (James and Martin, 1952). GC'nin temel çalışma prensibi, örneğin ısıtılmış bir inlet ya da gaz kromatografisinin enjektörü zerisinde buharlaştırılmasını, ardından karışımın bileşenlerinin özel hazırlanmış kolon tarafından ayrılmasını içermektedir. Sadece buharlaşma ile yapısı bozunmayan bileşikler GC analizleri için uygundur. Solventler ve pestisitler, esansiyel yağlar, hidrokarbon yakıtlar, ilaçlar bu bileşiklere örnektir. Ayrıca asitler, amino asitler, aminler, amitler, uçucu olmayan ilaçlar, sakkaritler ve steroid gibi uçucu olmayan bileşikler ise uuculuklarını arttırmak amacıyla trevlendirmeye ihtiyaç duyarlar.

Taşıyıcı gaz (Mobil faz olarak da isimlendirilebilir), genellikle hidrojen ya da helyum, örneğin enjektörden kolon boyunca dedektör ya da kütle spektrometresine transferinde kullanılır. Günümüzde kullanılan kolonların büyük çoğunluğu i yüzeyine durağan faz kaplanmış kapiller tüplerdir. Her bir bileşik, mobil faz (taşıyıcı gaz) ve durağan faz arasındaki dağılımına (ayrımına) bağlı olarak belirlenir. Durağan faz tarafından daha az alıkonan yani kolonda daha az süre geçiren bileşik daha önce elye olacaktır. Kolondan elye olan bileşikler taşıyıcı gaz akışıyla birlikte dedektöre ya da kütle spektrometresine transfer edilirler. Termal iletkenlik (Thermal conductivity, TCD), alev iyonizasyon (Flame ionization, FID), azot-fosfor (Nitrogen–phosphorus, NPD), alev fotometrik (flame photometric, FPD) ve elektron yakalama (electron capture, ECD) dedektörleri GC için tasarlanmış özel dedektörlerdir. Kütle spektrometresi (MS) ise daha kompleks bir sistemdir ve kromatografik bir n ayırım örneğin gaz kromatografisi ile kullanılabileceği gibi n ayırım olmasızın kullanımı da mümkündür.

Gaz kromatografisinin en önemli özelliklerinden biri enjektörleri, kolonu, her bir dedektörü ve MS transfer hattını ısıtan fırınların ayrı olmasıdır. Kolon ve bazen de enjektör fırınları düzenli oranlarda sıcaklığı arttırmamızı sağlar (sıcaklık programlama). Buda rnek içerisindeki farklı uçuculuktaki bileşiklerin ayrımına olanak tanır. Şekil 1.8' de temel bir GC-MS sistemi Şematize edilmiştir (Sparkman et al., 2011).



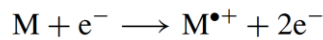
Şekil 1.8. GC/MS sisteminin şematik gösterimi.

1.7.2 Kütle spektrometresi (MS)

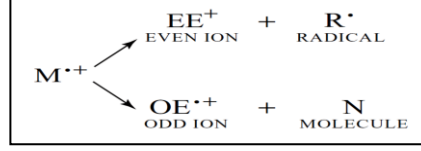
Kütle spektrometresinin, yüksek hassasiyeti, dedeksiyon sınırları, hız ve uygulamaları alanlarının çeşitliliği diğer analitik yöntemler arasından ön plana çıkmasındaki temel özellikleridir. Analitik kimyadaki uygulamalar günümüzde daha çok proteom, metabolom, ilaç geliştirme ve metabolizma gibi biyokimyasal konulara yönelmektedir. Diğer analitik uygulamalar ise çevre kirliliğinin kontrolü, gıda kontrolü, adli bilimler, doğal ürünler ve proseslerin izlenmesi gibi rutin analizleri içeren uygulamalardır. Bu uygulamalar atomik fizik, reaksiyon fiziğini, reaksiyon kinetiğini, anorganik kimya analizlerini, iyon-molekül reaksiyonlarını ve termodinamik parametrelerin belirlenmesi gibi uygulamaları da içermektedir.

Kütle spektrometresi, 1995 ve 2005 yılları arasından hızlı bir şekilde gelişmiştir. Bu gelişim yeni cihazların geliştirilmesine de olanak sağlamıştır. Yeni atmosferik basınç kaynakları geliştirilmiş, var olan analiz cihazları iyileştirilmiştir ve analiz cihazlarının birleştirilmesi ile yeni hibrit cihazları oluşturulmuştur. Bu sayede yeni uygulama alanları ortaya çıkmıştır. Örneğin ilk defa tam, yapısı bozulmamış bir virüsün ve oldukça büyük non-kovalent komplekslerin spektrumları elde edilmiş. Aynı zamanda kütle spektrometresindeki yeni buluşlar proteomik, metabolomik ve diğer omiklerin ihtiyaçlarını da karşılamaktadır.

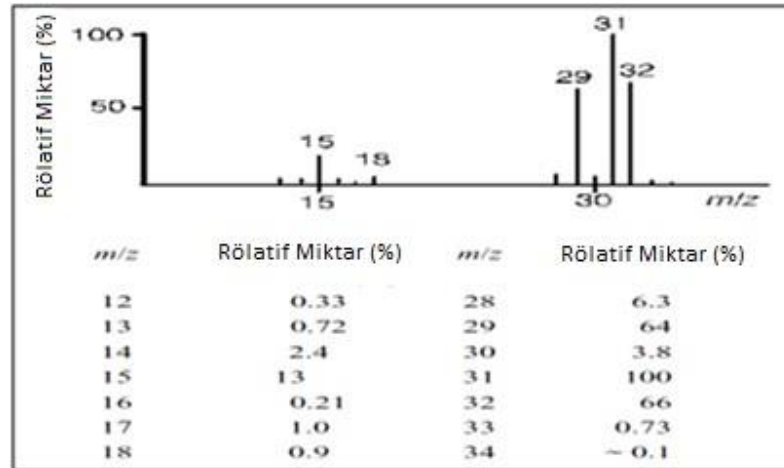
Kütle spektrometresindeki temel prensip şu şekilde özetlenebilir; ilk olarak bileşiğin gaz iyonları oluşturulur, örneğin elektron iyonizasyon ile.



Bu moleküler iyonlar fragmentasyona uğrarlar. Çünkü bu iyonlar tek sayıda elektrona sahip radikal katyondurlar ve çift sayıda elektron içeren iyon ve radikale ya da yeni bir radikal katyona ve moleküle parçalanabilirler.



Bu iki tip iyon farklı kimyasal özelliklere sahiptirler. Moleküler iyonlardan türetilen her bir primer ürün iyon da fragmentasyona uğrayabilir. Bu iyonlar kütle spektrometresinden kütle-yük oranına (m/z) göre ayrılırlar ve miktarlar (abundance) oranlarına göre dedekte edilirler. Bir moleküle ait kütle spektrumu bu şekilde oluşturulur ve iyonun m/z 'ye karşı miktar (abundance) grafiğini verir. Şekil 2.9' da gösterildiği gibi kütle spektrumu bar grafiği ya da tablo olarak verilebilir. Her iki gösterimde de en yoğun pik temel(base) pik olarak adlandırılır ve isteğe bağlı olarak rölatif miktar (relative abundance) %100 olarak belirlenir. Diğer tüm piklerin miktarı ise bu temel(base) pikin yüzdesine göre oranlanır. Birçok yayında, kütle spektrumunun y ekseninde, iyonların numarası, iyon sayısı ya da rölatif yoğunluk gösterilir. Fakat rölatif miktar (abundance) ifadesi, kütle spektrumundaki iyon numaralarının belirtilmesi için en uygun kullanım şeklidir.



Şekil 1.9. Metanole ait kütle spektrumu (elektron iyonizasyon, EI).

Pozitif iyonların çoğunun sadece bir elektron kaybetmelerine bağlı olarak bir yüke sahiptirler. Büyük moleküllerde ise çoklu yüke sahip iyonlar elde edilebilir. Kütle spektrumundaki x eksenini kütle-yük oranını temsil eder ve m/z ile ifade edilir (Hoffmann and Stroobant 2007).

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Mikroorganizmalar

Bu yüksek lisans tezi kapsamında Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Almanya'dan temin edilen *Pseudomonas aureofaciens* (DSM 6698) mikroorganizması kullanıldı. Liyofilize haldeki *P. aureofaciens* suşu nütrient agarda 26°C'de aktive edildi.

2.2 Kimyasallar ve Çözeltiler

Bu çalışma kapsamında kimyasallar analitik saflıktadır ya da yüksek saflıktadır (GC Grade). Kimyasalların temin edildiği firmalar ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan çözeltiler aşağıda listelenmektedir:

- Amonyum Dihidrojen Fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) (Merck)
- Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4) (Merck)
- Magnezyum Sülfat (MgSO_4) (Merck)
- Sodyum Hipoklorit (NaOH) (Sigma)
- Sülfürik asit (H_2SO_4) (Merck)
- Kloroform (Merck)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Tripton (Sigma)
- Yeast Ekstrakt (Maya Ekstraktı)
- Sodyum Oktanoat (Sigma)
- Hekzan (Merck)
- Sodyum Sitrat (Merck)
- Sudan Black B (Sigma)
- Safranin (Merck)
- 3-Hidroksioktanoat (Sigma)
- 3-Hidroksihekzanoat (Sigma)
- 3-Hidroksidodekanoatnoat (Sigma)
- 3-Hidroksitetradekanoatnoat (Sigma)
- Tridekanoik asit (Sigma)
- Metanol (Merck)
- Metil-Tert-Butil Eter (Merck)
- Hidroklorik Asit (HCl)
- İz element çözeltisi: 1,0 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/L $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L H_3BO_3 , 0,25 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L NH_4NO_3 , 0,5 g/L $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 5 ml/L derişik H_2SO_4

2.3 Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan bütün genel laboratuvar cihazları aşağıda listelenmiştir:

- UV Kabin (ESCO Class II BSC)
- Otoklav (HIYARAMA HVE 50)
- Soğutmalı-Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick, Innova 40R)
- Spektrofotometre (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer)
- Santrifüj (Hettich Universal 30 RF, Hettich Micro 120, Sigma 16K-L)
- pH metre (HANNA pH 211)
- Isıtmalı karıştırıcı (CHILTERN HS 31)
- Etüv (Heraeus)
- Analitik terazi (AND GR 200)
- Su banyosu (GFL 1083)
- Vorteks (WhirliMixer TM)
- GC-MS (Agilent 7890B GC System Gaz kromatografisi, Agilent 5977E MSD MS dedektör ve DB-5MS kolon)

2.4 Üç Farklı Metabolik Koşul Oluşturularak mcl-PHA Profillerinin İncelenmesi

Mcl-PHA üretiminin ve metabolitlerinin değişimini incelemek amacıyla mcl-PHA üretiminin ve yıkımının teşvik edildiği ayrıca üretimin gözlenmediği üç farklı metabolik koşul oluşturuldu. İlgili metabolik koşullar aşağıda yer almaktadır.

2.4.1 mcl-PHA Üretiminin Teşviki

Çalışma kapsamından *P. aurefaciens'* te mcl-PHA üretimi, Dr. Emre ERDEN ÇAKMAKLI' nın doktora tezinde yapmış olduğu optimizasyon çalışmaları temel alınarak aşağıda verildiği şekli ile gerçekleştirilmiştir (Çakmaklı, 2015).

P. aurefaciens, LB (Luria Broth) ortamında (10 g/L tripton, 5 g/L yeast ekstrakt, 10 g/L NaCl; pH:7.0) 26°C'de 165 rpm'de 9 saat boyunca kültive edildi. Ası kültüründen 15 g/L sodyum oktanoat, 1 g/L NH₄H₂PO₄, 1.5 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L tripton, 1.4 g/L MgSO₄, 1 g/L sitrat ve 1 ml/L iz element çözeltisi içeren üretim ortamlarına (pH:7) %5'lik inokulasyon yapıldı. 26°C'de ve 135 rpm'de

inkübe edildi. 6 saatlik periyotlarla 120 saat boyunca kültür ortamından örnek alındı ve +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Hücre pelleti mcl-PHA üretiminin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanıldı. Süpernatant ise karbon ve azot kaynağı konsantrasyonunun tayininde kullanıldı. Tüm örnekler - 80°C' de stoklandı.

2.4.2 mcl-PHA yıkımının (degradasyon-açlık koşulları) teşviki

Doğal üretici *P. aureofaciens* LB ortamında 26°C'de 165 rpm'de 9 saat boyunca kültive edildi ve aşı kültürü hazırlandı. Hazırlanan aşı kültüründen bölüm 2.4' de verilen mcl-PHA üretim ortamına %5'lik aşılama yapılarak hücreler eksponansiyel fazın sonuna kadar (60. saat) 26°C'de 135 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kültür ortamı 12000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüjlendi ve hücre pelleti yıkanarak ortam bileşenleri uzaklaştırıldı. Yıkanan hücre pelleti aseptik koşullarda karbon kaynağı içermeyen taze kültür ortamlarına inokülasyon miktarı %20 olacak şekilde inokule edilerek 26°C'de 135 rpm'de kültivasyona devam edildi. Karbon açlığı koşullarında 6 saatlik periyotlarla 120 saat boyunca kültür ortamından örnek alındı ve +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Hücre pelleti mcl-PHA üretiminin kantitatif tayininde ve GC-MS ile metabolit analizinde kullanıldı. Süpernatant ise azot kaynağı konsantrasyonunun tayininde kullanıldı.

2.4.3 mcl-PHA Üretiminin Teşvik Edilmediği Koşulun Oluşturulması

Doğal üretici *P. aureofaciens* LB ortamında 26°C'de 165 rpm'de 9 saat boyunca kültive edildi ve aşı kültürü hazırlandı. Hazırlanan aşı kültüründen LB ortamlarına %5'lik aşılama yapılarak hücreler 120 saat boyunca 26°C'de 135 rpm'de inkübe edildi. Bu süre zarfında 6 saatlik periyotlarla kültür ortamından örnek alındı ve +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Hücre pelleti kuru kütle, mcl-PHA üretiminin kantitatif tayininde ve metabolit analizinde kullanıldı.

2.5 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini

PHA üretiminin kalitatif tayini için Sudan Black boyama prosedürü kullanıldı. Bu amaçla;

- Bakteri kültüründen bir miktar alınarak 2 kez steril d.H₂O ile yıkama yapıldı, santrifüjlendi ve steril d.H₂O ile tekrar süspansiyon edildi.
- Hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak lam üzerine ince bir katman halinde yayıldı ve kurumaya bırakıldı.
- Lam, Sudan Black B (%60'luk etanolde %0,3 w/v) ile 10 dk boyandı.
- d.H₂O ile lam kısa süre yıkandı.
- Lam, %0,5'lik safranin çözeltisi ile 10 sn boyandı ve ardından d.H₂O ile yıkandı ve mikroskop altında incelendi.

2.6 Kuru Kütle Tayini

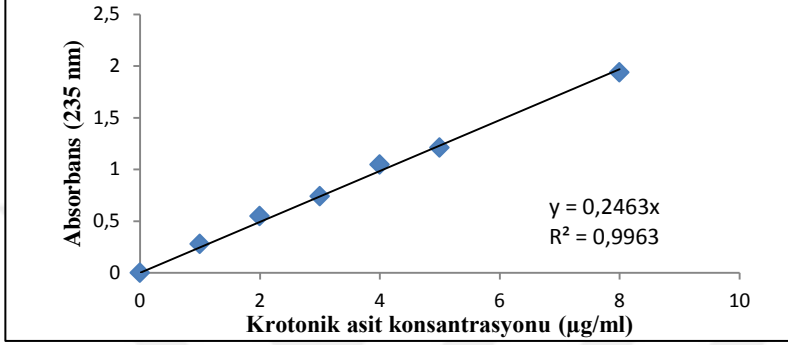
Ortamlarından alınan 5 ml örnek darası alınmış tüplere aktarıldı. +4°C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi ve hücre pelleti steril d.H₂O ile yıkandı. Yıkanan hücre pelleti 50°C'de etüvde sabit kütleye kadar kurutuldu ve örneklerdeki kuru kütle miktarı tayin edildi.

2.7 mcl-PHA'ların Kantitatif Tayini

Örneklerdeki PHA miktarının spektrofotometrik tayini aşağıda belirtilen modifiye edilmiş yönteme göre yapıldı:

1. İnkübasyon sonrasında üretim ortamlarından 1 ml örnek alındı ve 13000 rpm'de 5 dk. santrifüjlendi. Ardından hücre pelleti 1 ml d.H₂O ve 1 ml sodyum hipoklorit (%10-15) ile çözüldü.
2. Karışıma 2 ml kloroform eklendi ve 37 °C'de 300 rpm'de 3 saat inkübe edildi.
3. İnkübasyonun ardından tüpler 4000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi.
4. Santrifüj sonrasında hipoklorit fazı uzaklaştırıldı ve ara faza zarar vermeden kloroform fazı yeni bir tüpe aktarıldı.
5. Elde edilen kloroform fazından yeni tüplere 100'er µl alındı ve kloroform uçuncaya kadar 80°C'de etüvde bekletildi.
6. Kloroform uzaklaştırıldıktan sonra tüplere 5'er ml derişik H₂SO₄ eklendi ve 100 °C'de sıcak su banyosunda 20 dk inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda tüpler su banyosundan alındı ve soğutuldu. Ardından 235 nm'de absorbans ölçüldü.

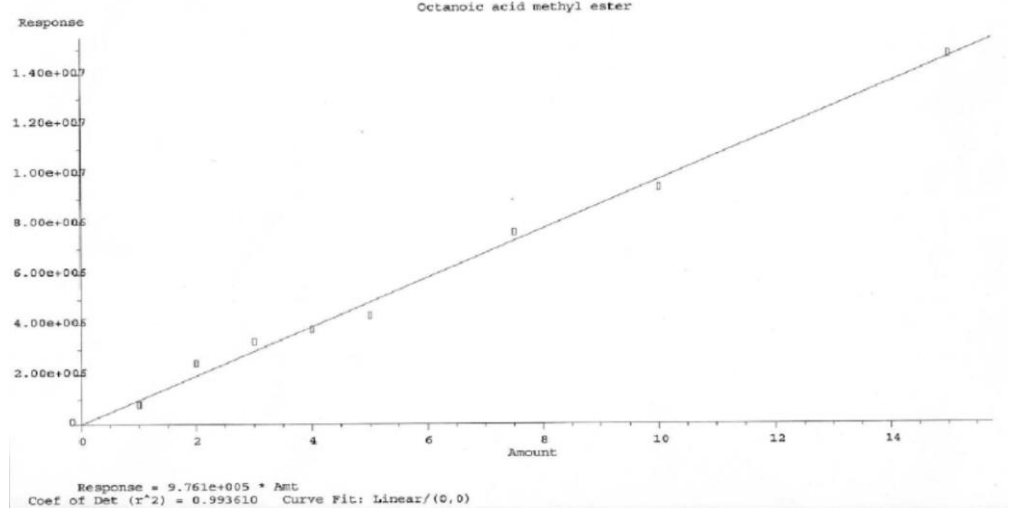
Yukarıdaki yöntemin prensibi, hücre içerisindeki PHA'ların ekstraksiyonu ve ardından derişik sülfürik asit ile 3-hidroksi yağ asitleri krotonik aside indirgenmesi esasına dayanır. Bu nedenle 1, 2, 3, 4, 5, 8 ve 10 µg/ml standart krotonik asit çözeltileri hazırlandı ve krotonik asit standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.1). Örneklerdeki mcl-PHA miktarları bu standart grafiği kullanılarak hesaplandı.



Şekil 2.1 Krotonik Asit Standart Grafiği

2.8 GC-MS ile karbon kaynağı (Oktanoat) konsantrasyonunun tayini

Üretim ortamına karbon kaynağı olarak eklenen oktanoatın konsantrasyonun belirlenebilmesi için üretim ortamından örnekler alındı ve +4 °C'de 12000 rpm'de 20 dk santrifüjlendi. Süpernatant içerisindeki oktanoatın, GC-MS ile analizlenebilmesi için öncelikle türevlendirme işlemleri gerçekleştirildi. Bu amaçla, 500 µl örnek üzerine metanol içerisinde hazırlanmış 2500 µl %2 H₂SO₄ çözeltisi eklendi ve bu karışım 90 dakika boyunca 60°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından uçucu metil esterine dönüştürülen oktanoat, 1 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Analiz için Agilent 7890B GC System gaz kromatografisi, Agilent 5977E MSD MS dedektör ve DB-5MS kolon (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm film kalınlığı) kapiler kolon kullanıldı. 1 µl örnek enjeksiyonu gerçekleştirildi. Taşıyıcı gaz helyum, sabit akışta akış hızı 1 ml/min, Septum Purge: 3 ml/min, Enjeksiyon sıcaklığı 250 °C olarak kullanıldı. Fırın Sıcaklık Programı: 100 °C'de 8 dk, Ramp 20 °C, 180 °C'de 3 dk olarak belirlendi. MS parametreleri ise interface sıcaklığı 280 °C, Electron Multiplier Voltage 1750 ile 2100 V aralığında kullanıldı ve scan mode m/z 45-500 aralığında çalışıldı. Oktanoik asit metil ester standart grafiğinden (Şekil 2.2) yararlanılarak üretim ortamında arta kalan oktanoat miktarı belirlendi.



Şekil 2.2 Oktanoik asit metil ester standart grafiği

2.9 Berthelot yöntemi ile azot tayini

Örneklerdeki azot miktarını tayin etmek için Berthelot yöntemi kullanıldı (Çizelge 2.1). Değişik konsantrasyonlarda standart NH_4Cl çözeltileri (1-20 $\mu\text{g/ml}$) hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu (Şekil 2.3) ve oluşturulan standart grafiği kullanılarak örneklerdeki azot miktarı tayin edildi.

Fenol reaktifi : A- 1 g fenol/10 ml distile su

B- 25 mg sodyumnitroprussiyat / 50 ml distile su

A ve B çözeltileri kullanmadan hemen önce eşit hacimde karıştırılarak taze kullanılır.

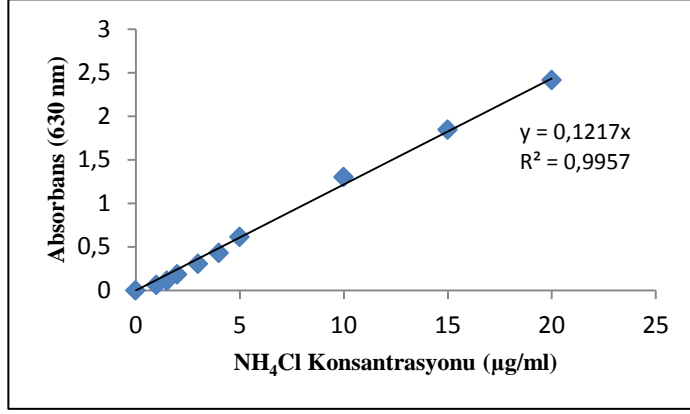
Alkali hipoklorür: A- %5 NaOH

B- litrede 26 g NaOCl bulunan ticari hipoklorür

A ve B eşit hacimde karıştırılır.

Çizelge 2.1 Berthelot Yöntemi

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Distile su	2,0	-
Örnek	-	2,0
Fenol reaktifi	0,5	0,5
Alkali hipoklorür çözeltisi	0,5	0,5
55 °C su banyosunda 5 dk inkübe edilir ve 630 nm'de absorbans okunur		



Şekil 2.3 NH₄Cl Standart Grafiği

2.10 mcl-PHA'nın saflaştırılması

P. aureofaciens hücreleri tarafından optimum koşullarda üretilen mcl-PHA biyopolimerinin saflaştırılması amacıyla Strazzullo ve arkadaşlarından alınan yöntem kullanılmıştır. Kullanılan yöntemin adımları aşağıdaki gibidir (Strazzullo et al., 2008):

- 1) Kültivasyonun ardından elde edilen hücreler 9000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüjlendi.
- 2) 1 g hücre pelleti 50 ml saf suda çözüldü.
- 3) Elde edilen karışım 20 dk. boyunca sonikasyona tabi tutuldu.
- 4) Sonikasyonun ardından yağ hücre ağırlığı kadar SDS eklendi ve 50°C'de 1 saat inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon işleminin ardından hücre karışımı 121°C'de 20 dk. otoklavlandı.
- 6) Otoklavın ardından hücre lizatı soğutuldu ve 10000 rpm'de +4 °C'de 30 dk. boyunca santrifüjlendi.
- 8) Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen mcl-PHA pelleti liyofilize edildi. Liyofilize edilen ürün +4 °C'de muhafaza edildi.

2.11 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve GC-MS ile analizi

Hücre içi mcl-PHA üretiminin (aşırı karbon kaynağı ve sınırlı azot içeren koşullarda) ve degradasyonunun (açlık koşullarında - karbon kaynağı içermeyen

ortamlarda) teşvik edildiği koşullarda ilişkin metabolit profillerini oluşturmak amacıyla alınan hücre pelletlerinden metabolitler ekstrakte edildikten sonra türevlendirme işlemi yapılarak uçucu metil esterlerine dönüştürüldü ve GC-MS ile analizlendi. Bu amaçla aşağıdaki yöntemler uygulandı.

2.11.1 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi

Hücre içerisindeki metabolitlerin ekstraksiyonu Hoffman ve arkadaşları (Hoffman et al., 2008) ve Chao ve arkadaşlarının (Chao et al., 2010) kullandığı yöntemler modifiye edilerek gerçekleştirildi.

1. -80°C' de saklanan 2 ml ortama ait hücre pelleti eritilmeden üzerine 1 ml 3,75 M NaOH (1:1 MeOH/d.H₂O' da hazırlanmış) ve 100 ppm olacak şekilde internal standart olarak tridekanoik asit (heksanda) eklenerek vidalı kapaklı tüplere transfer edildi. (Not: açlık koşullarında metabolit analizlerinde 5 ml ortama ait hücre pelleti kullanıldı.)

2. Örnekler 80°C'de 30 dk boyunca su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonun 15. dakikasında vorteklenerek inkübasyona devam edildi.

3. Tüplere 2 ml 3,25 M HCl (1:1,18) (Metanol/6 M HCl) eklendi ve 80°C'de 10 dk boyunca su banyosunda inkübe edildi.

4. Tüplere 1,5 ml 1:1 hekzan/metil-tert butil eter eklendi ve 10 dk boyunca yavaşça alt üst edildi.

5. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 3 ml d.H₂O' da hazırlanmış 0,3 M NaOH eklendi. 5 dk boyunca yavaşça alt üst edildi.

6. Faz ayrımı gözlendikten sonra üst faz GC-MS' de analizlendi.

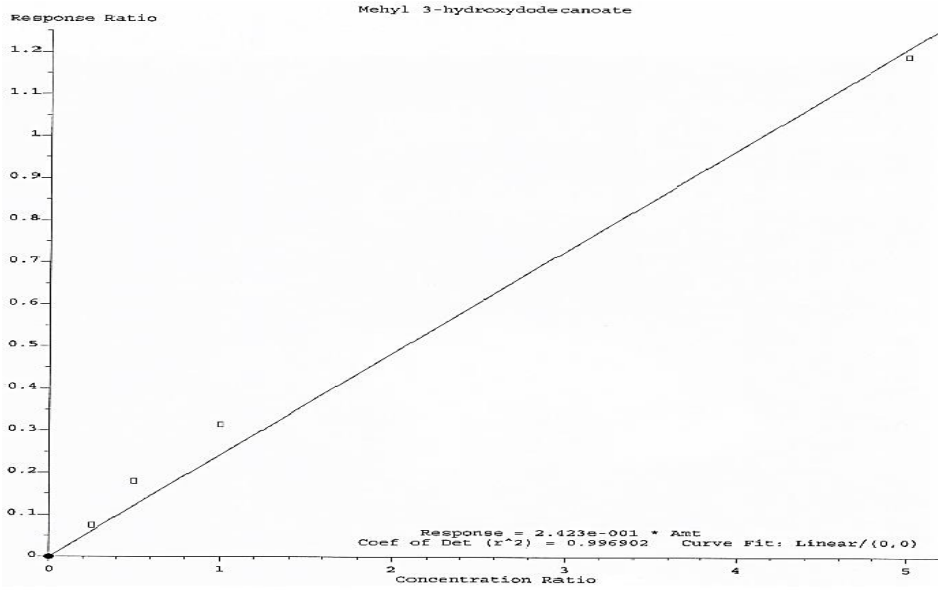
2.11.2 Hücre içi yağ asidi türevli metabolitlerin GC-MS ile analizi

Yağ asidi türevli metabolitleri analizlemek amacıyla literatür taraması yapıldı ve literatürde kullanılan yöntemlerden en verimli olanı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla Chao ve arkadaşları (Chao et al., 2010), García ve arkadaşları (García et al., 2010) ve Casado ve arkadaşlarının (Casado et al., 1998) kullandığı analiz yöntemleri denendi. Gaz kromatogramları sonucunda en etkin sonuç Casado ve

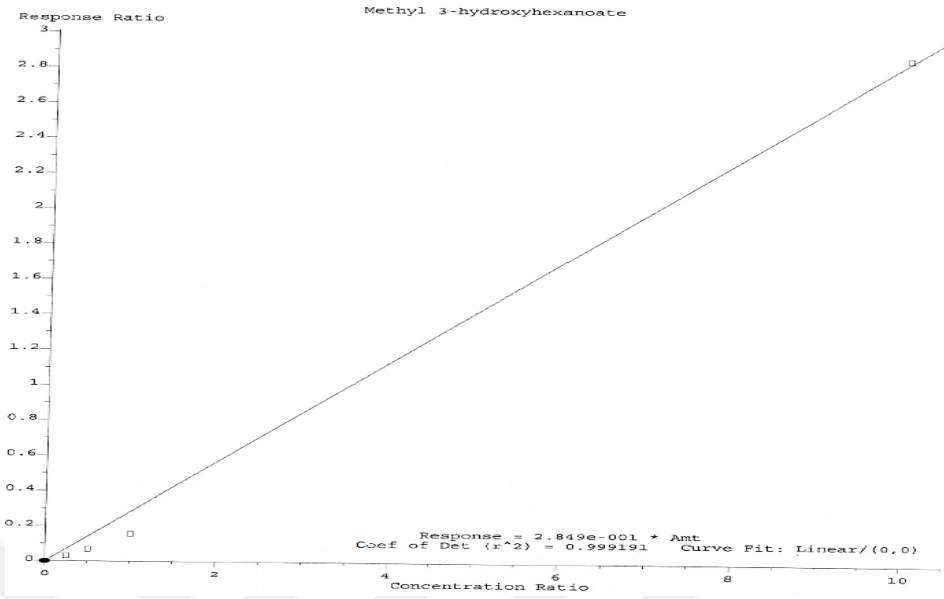
arkadaşlarının (Casado et al., 1998) kullandığı yöntemde alındı ve bu yöntem üzerinde modifikasyonlar yapıldı. Başlangıç sıcaklığı (50-75°C), süresi (1-8-10 dk), Ramp sıcaklığı (8-15-20-30 °C), bitiş sıcaklığı (270-275°C) ve süresi (1-7-10 dk) gibi parametreler üzerinde değişiklikler yapılarak analiz için yöntem geliştirildi.

Analiz için Agilent 7890B GC System gaz kromatografisi, Agilent 5977E MSD MS dedektör ve DB-5MS kolon (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm film kalınlığı) kapiler kolon kullanıldı. Cihaza 1 µl örnek enjekte edildi. Total Flow: 100 ml/min, taşıyıcı gaz helyum, sabit akışta akış hızı 1,6 ml/min, Septum Purge: 3 ml/min, Enjeksiyon sıcaklığı 250°C olarak kullanıldı. Fırın Sıcaklık Programı: 50°C' de 8 dk, Ramp 20°C, 275°C' de 10 dk olarak belirlendi. MS parametreleri ise interface sıcaklığı 280°C, Electron Multiplier Voltage 1750 ile 2100 V aralığında kullanıldı ve scan mode m/z 45-500 aralığında çalışıldı.

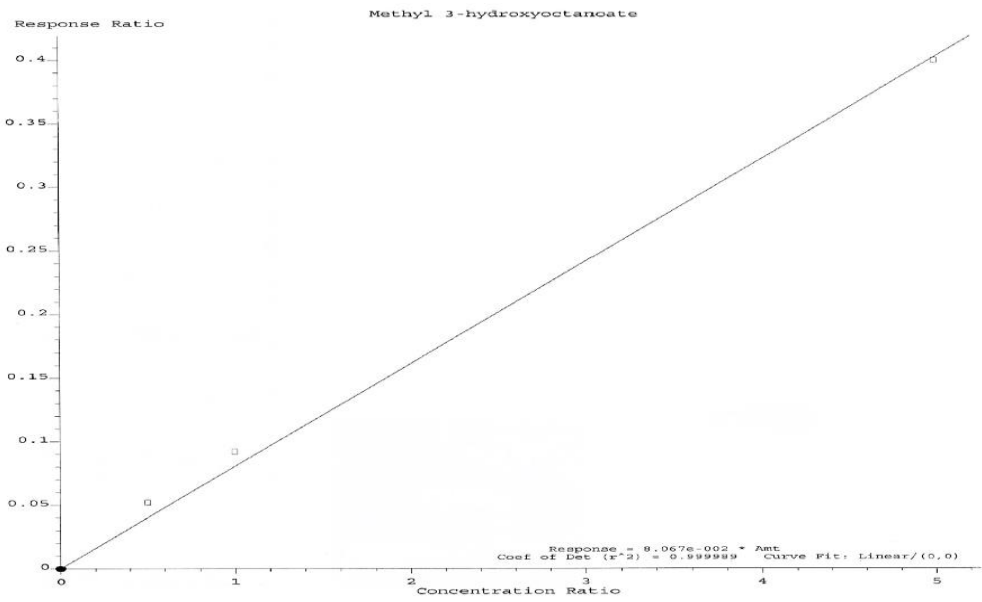
Ayrıca yukarıda bahsedilen türevlendirme ve analiz yöntemi kullanılarak ticari olarak temin edilen yüksek saflıktaki 3-hidroksidodekanoat (Şekil 2.4), 3-hidroksiheksanoat (Şekil 2.5), 3-hidroksioktanoat (Şekil 2.6) ve 3-hidroksitetradekanoat (Şekil 2.7) standart grafikleri oluşturuldu. İlgili standart grafikleri kullanılarak örneklerdeki metabolitler tayin edildi.



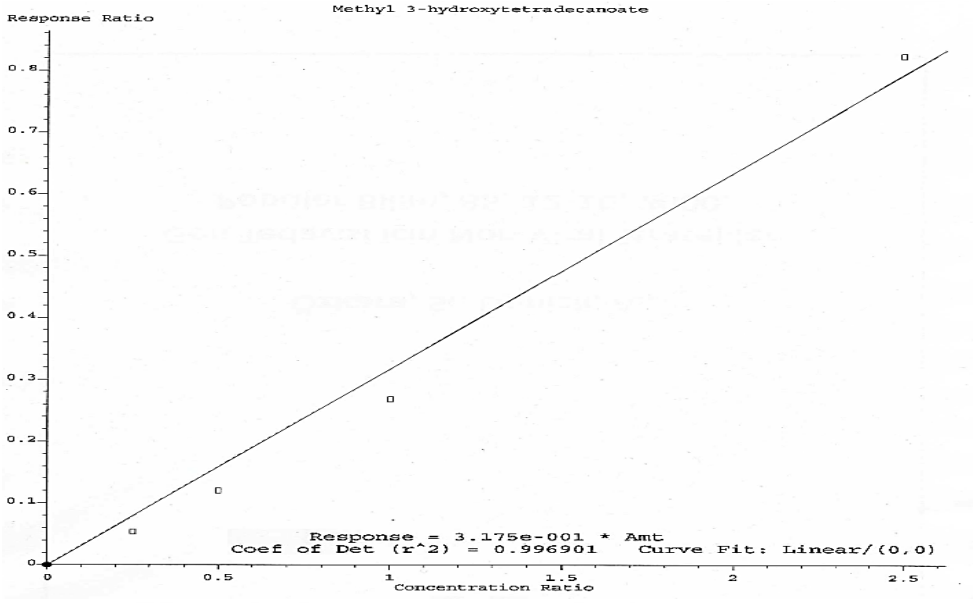
Şekil 2.4 Metil 3-Hidroksidodekanoat Standart Grafiği



Şekil 2.5 Metil 3-Hidroksihekzanoat Standart Grafiği



Şekil 2.6 Metil 3-Hidroksioktanoat Standart Grafiği



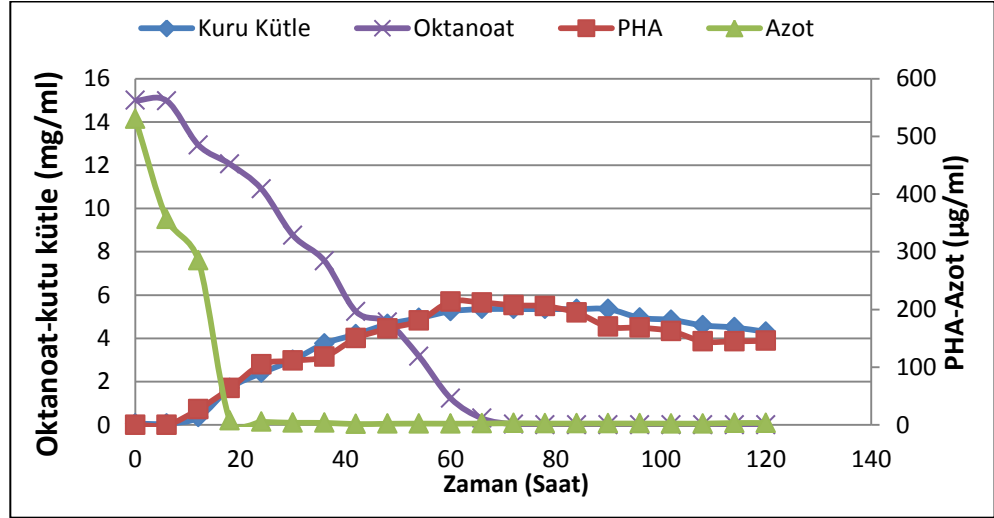
Şekil 2.7 Metil 3-Hidroksitetradekanoat Standart Grafiği

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

3.1 *P. aureofaciens*'ten çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretimi

P. aureofaciens' in hücre içi PHA yıkım mekanizmasını araştırabilmek amacıyla öncelikle hücrenin PHA üretim profilinin detaylı bir şekilde bilinmesi gerekir. PHA üretim profilinden elde edilecek veriler yıkım mekanizmasının yorumlanmasında önemli veri kaynaklarından birini oluşturacaktır. Bu veriler vasıtasıyla hücrenin hangi saat aralığında PHA ürettiğini, ne zaman yıkıma başladığını, üretim ve yıkım sırasında ortamda ne gibi değişiklikler olduğunu görmek mümkün olacaktır.

P. aureofaciens' in PHA üretim profilini belirlemek amacıyla 6 saatlik periyotlar ile 120 saat boyunca örnek alındı ve bu örneklerde kuru kütle ve PHA tayini yapıldı. Aynı zamanda PHA üretiminde en etkin faktörlerden olan karbon ve azot kaynaklarının konsantrasyonundaki değişimi izlendi. Bu analizlerin yanı sıra aynı saatlere ilişkin örneklerin bir kısmı hücre içi metabolitlerin analizleri için -80°C' de saklandı. Genel PHA üretim profiline ilişkin elde edilen veriler Şekil 3.1'de verilmektedir.



Şekil 3.1 mcl-PHA üretim profili

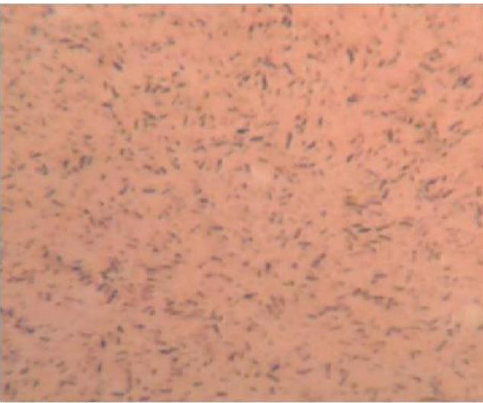
PHA üretim profili incelendiğinde ilk 6 saat boyunca hücrenin lag fazda, 6.-60. saatler arasında logaritmik evrede olduğu, 60. saatten sonra ise stasyoner evreye girdiği görülmektedir. Hücre azot kaynağının büyük bir kısmını lag fazında

yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek amacıyla genetik materyal ve protein sentezi için kullanılmaktadır. Azot kaynağı 36. saatten sonra 2-3 µg/ml aralığında sabit kalmaktadır. Başlangıçta ortamda 15 g/L oktanoat varken logaritmik evrede karbon kaynağını hızlı bir şekilde tüketilmiştir. 72. saatteki ortamdaki oktanoat miktarı 0,04 g/L olarak tayin edilmiş ve 72. saatten sonra da tamamen tüketildiği tespit edilmiştir. Eksponansiyel fazın sonunda (60. saatte) maksimum PHA miktarı 213,67 µg/ml'dir. Bu saatten sonra PHA üretimi yerine ortamda karbon kaynağının tükenmesine bağlı olarak mcl-PHA'nın degradasyonu söz konusudur. 60. saatten sonra hücre karbon kaynağı olarak depoladığı mcl-PHA'yı kullanabilmek için PHA yıkım yolağını aktive etmektedir. Hücre 96. saatten sonra ölüm fazına girmiştir ve biyokütlesinde düşüş gözlenmektedir. Elde edilen bu verilerle birlikte hücre içerisinde PHA yıkımın gerçekleştirildiği desteklenmiştir.

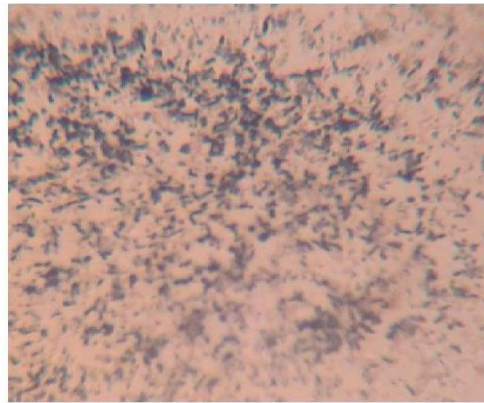
Üretim ortamında (C/N oranı yüksek ortam-pozitif kontrol) arta kalan karbon kaynağının tayini için belirli aralıklarla ortamdaki örnek alındı ve santrifüjlendi. Süpernatant Bölüm 2.10'da bahsedilen protokole göre türevlendirildi ve GC-MS ile analizlendi.

3.2 mcl-PHA'ların Kalitatif Tayini

Üretim ortamlarından alınarak örneklerde mcl-PHA üretimi Sudan Black ile boyama yapılarak kalitatif olarak izlenmiştir (Şekil 3.2). Şekil 3.2'de verilen görüntüler incelendiğinde PHA konsantrasyonunun 60. saatte arttığı net bir şekilde görülmektedir.



(24. saat)



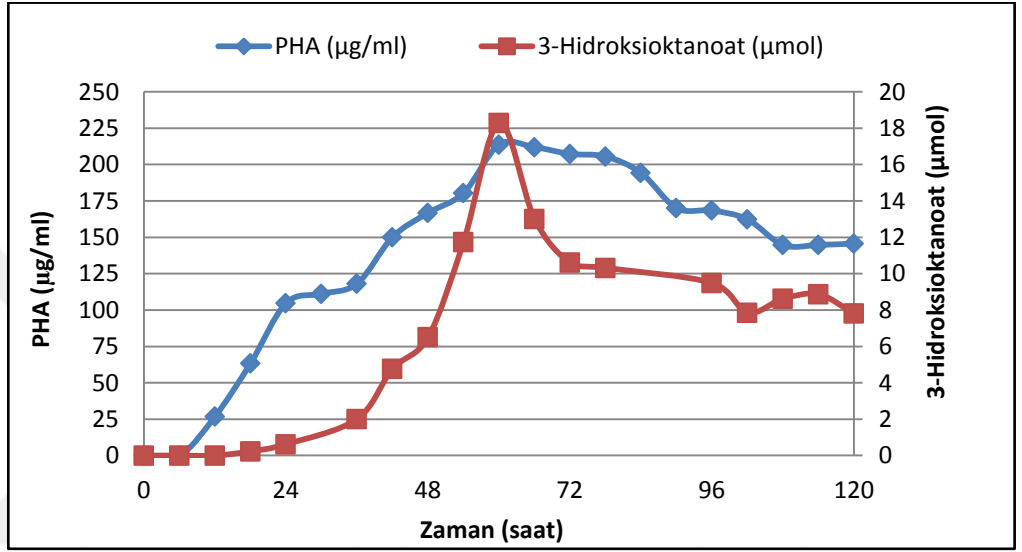
(60. saat)

Şekil 3.2 Üretim ortamından farklı zaman aralıklarında alınan örneklerde PHA'nın kalitatif tayini

3.3 Hücre İçi Metabolitlerin GC-MS ile Analizi

3.3.1 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen metabolit analizleri

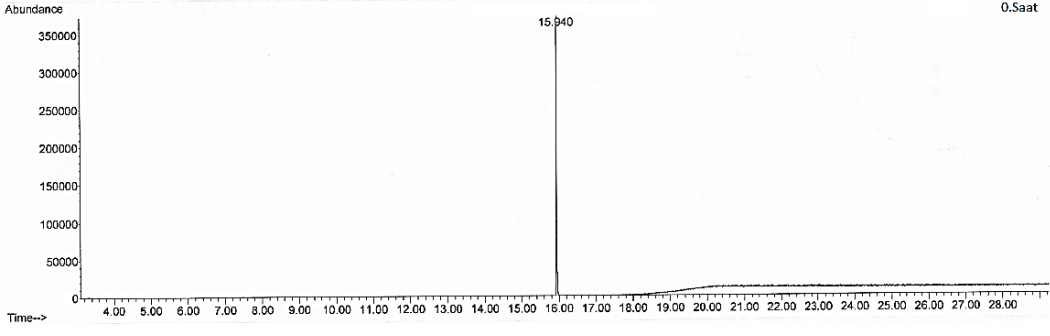
Hücresinin PHA üretim koşullarındaki metabolizmasını incelemek amacıyla 6 saatlik periyotlar boyunca alınan örneklerde Bölüm 2.13' de verilen yöntem ile metabolit analizleri gerçekleştirildi. PHA üretimi sırasında açığa çıkan 3-Hidroksioktanoatın değişimine ilişkin veriler Şekil 3.3' te yer almaktadır.



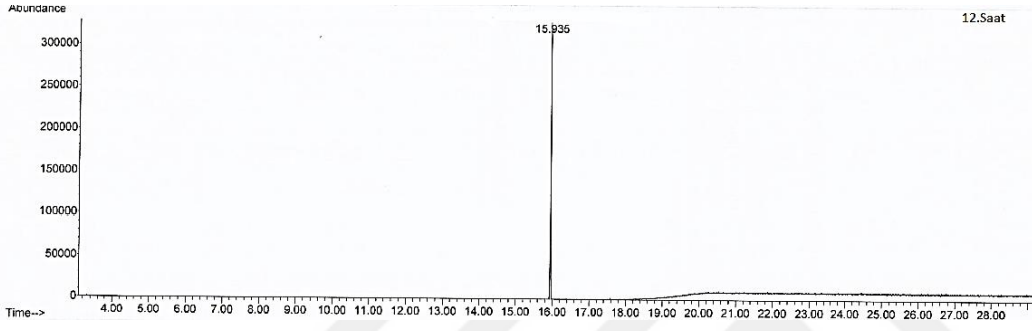
Şekil 3.3 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda PHA ve 3-hidroksioktanoat miktarının değişimi

PHA polimerinin oluşturan 3-hidroksioktanoat monomerlerinin miktarı, 3-hidroksioktanoat standart grafiği kullanılarak hesaplandı ve PHA miktarına paralel bir şekilde değiştiği gözlemlendi. PHA miktarı 60. saatte maksimum değerine ulaşırken, benzer şekilde hücre içerisindeki 3-hidroksioktanoat miktarı da 60. saatte maksimum değerine ulaşmış ve bu değerden sonra azalmaya başlamıştır. mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda elde edilen, PHA miktarı, biyokütle ve azot miktarındaki değişimler bu değerler ile de paralellik göstermektedir ve birbirini desteklemektedir. Tahmin edilebileceği gibi polimer değişimi ve monomer değişimi birbiri içerisinde tutarlılık göstermektedir.

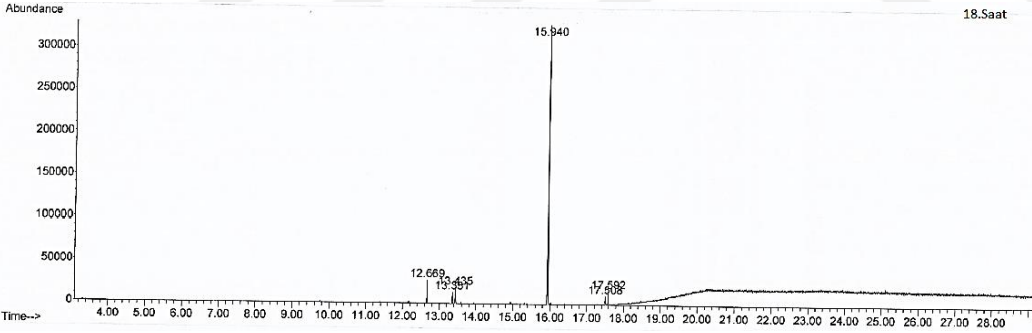
Belirli zaman aralıklarıyla alınan örneklerde gerçekleştirilen metabolit analizleri sonucunda elde edilen gaz kromatogramları Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14'te verilmektedir.



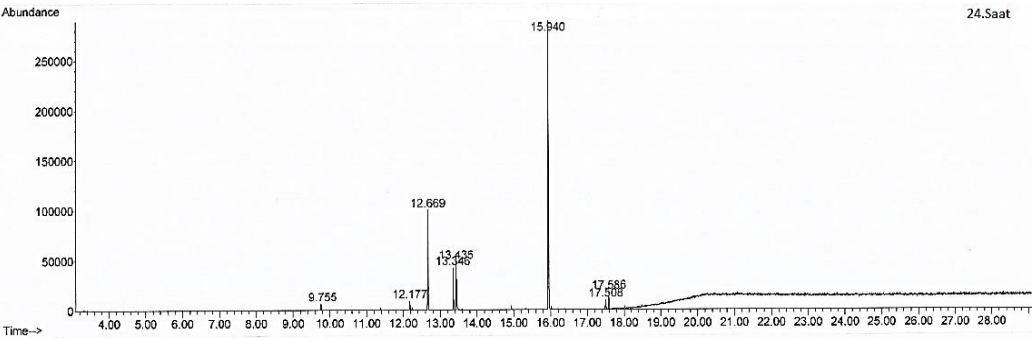
Şekil 3.4 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 0. saate ait gaz kromatogramı



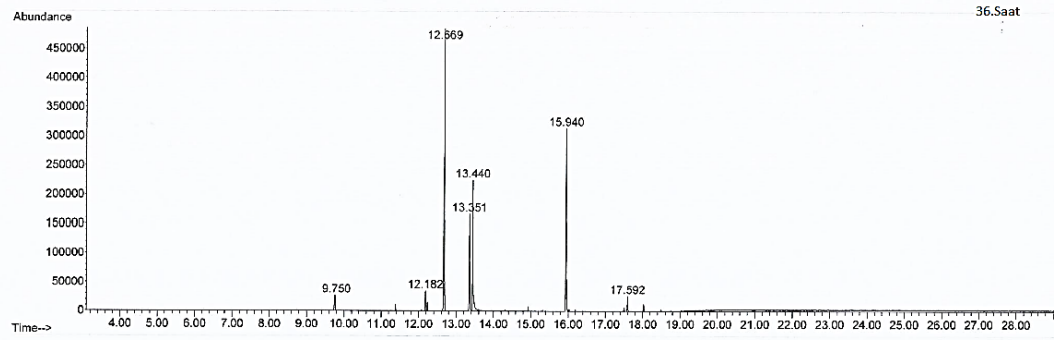
Şekil 3.5 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 12. saate ait gaz kromatogramı



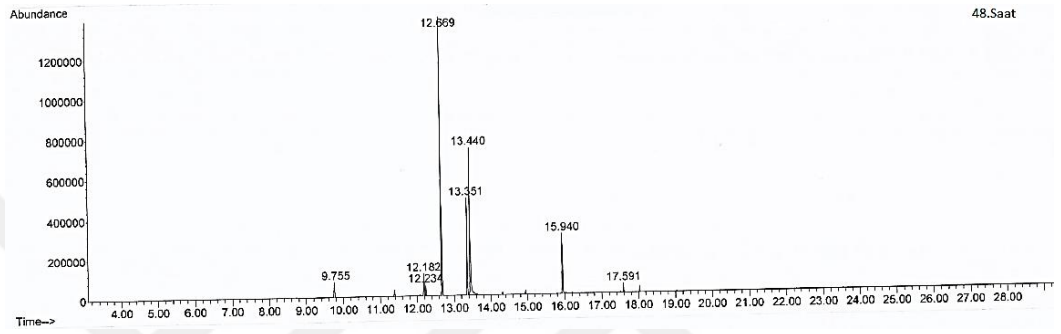
Şekil 3.6 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 18. saate ait gaz kromatogramı



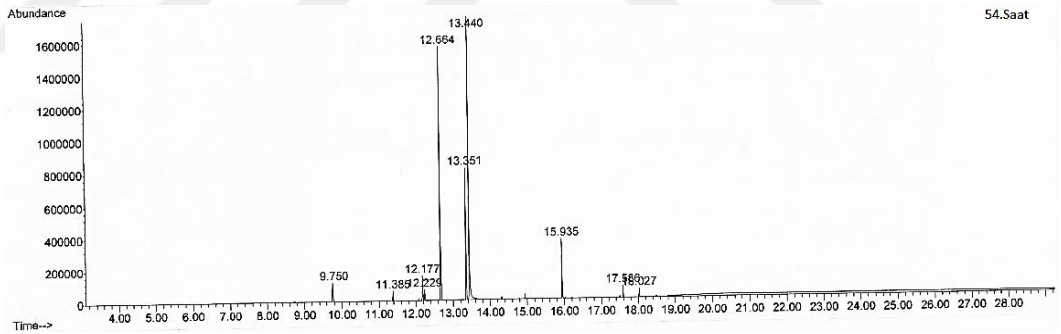
Şekil 3.7 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 24. saate ait gaz kromatogramı



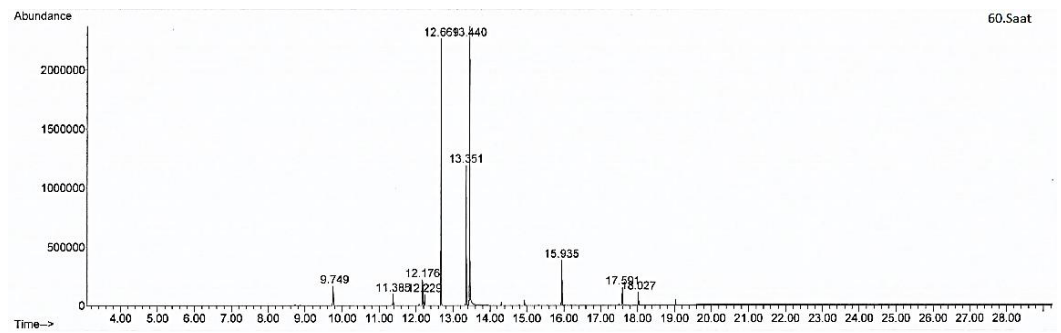
Şekil 3.8 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 36. saate ait gaz kromatogramı



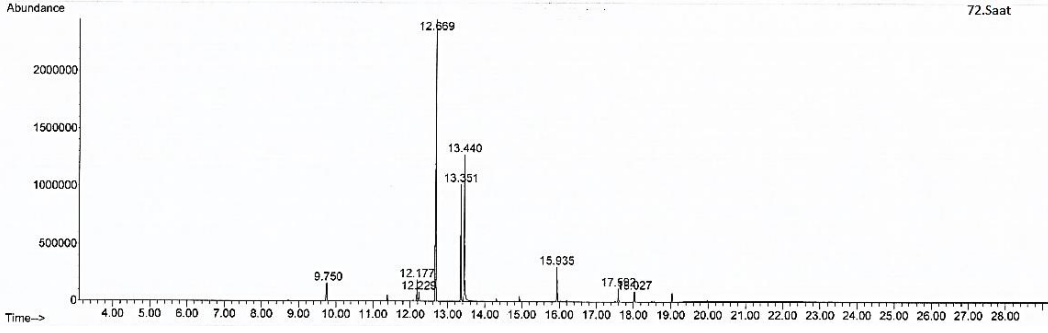
Şekil 3.9 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 48. saate ait gaz kromatogramı



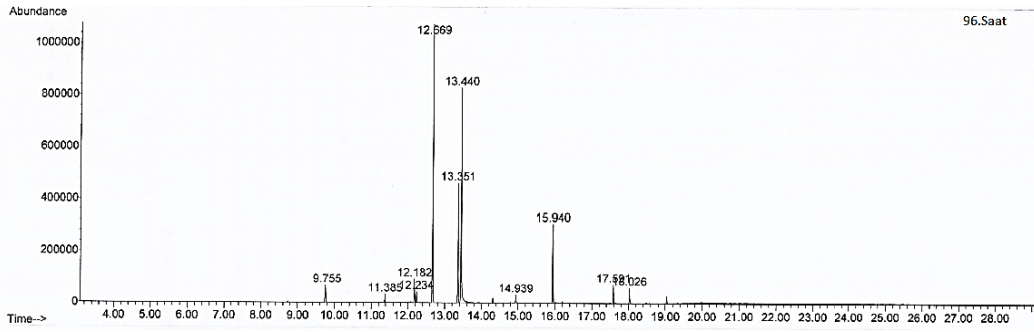
Şekil 3.10 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 54. saate ait gaz kromatogramı



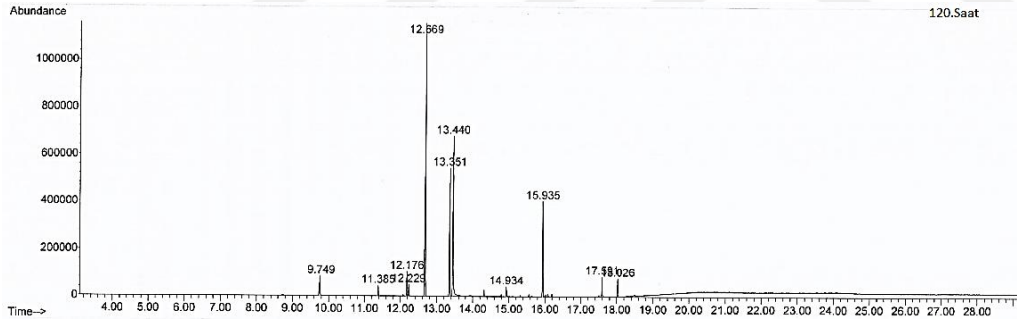
Şekil 3.11 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait gaz kromatogramı



Şekil 3.12 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 72. saate ait gaz kromatogramı



Şekil 3.13 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 96. saate ait gaz kromatogramı



Şekil 3.14 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 120. saate ait gaz kromatogramı

Gaz kromatogramları incelendiğinde 18. saatten sonra, 3-hidroksioktanoat dışında hücre içerisinde çeşitli yağ asidi türevli metabolitlerin varlığına da rastlanmaktadır. Bu metabolitlerin neler olabileceğine ilişkin veriler belirli saat aralığında alınan örneklere ait kromatogramlarda ve MS kütüphanesinden (Wiley7Nist05) elde edilen verilerden oluşturulan Çizelge 3.1' de yer almaktadır.

Çizelge 3.1 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda 60. saate ait örnek baz alınmıştır)

Alıkonma Zamanı	Bileşik İsmi	Qual Değeri
9.749	2-Hekzenoik asit, metil ester	95
12.176	Trans-3-oktenoik asit, metil ester	72
12.229	Cis-3-oktenoik asit, metil ester	93
12.669	2-Oktenoik asit, metil ester	93
13.440	3-Hidroksioktanoat, metil ester	97
15.935	Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	98
17.591	Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	99
18.027	Siklopropan oktanoik asit, 2 hekzil	95

Kromatogramlardan da görüleceği gibi 3-hidroksioktanoat miktarı PHA miktarına paralel şekilde artıp azalmaktadır. Kromatogramlarda hekzenoik asit türevli bileşiklere rastlanmıştır fakat diğer 3-hidroksi yağ asitlerinin varlığı tespit edilememiştir.

Trans-3-oktenoik asit, cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asidin PHA metabolizmasında oktanoattan 3-hidroksioktanoat ve PHA sentezinde ara metabolitler oldukları düşünülmektedir. Biyosentez ve yıkım mekanizmalarında benzer adımlar üzerinde bir dizi izomerizasyon reaksiyonları ile dönüşümün gerçekleştiği var sayılmaktadır. 15.935 alıkonma zamanında gelen pik tridekanoik aside ait olup, internal standart olarak eklenmiştir. Bu pikten sonra genel diğer piklerin organizmanın doğal metabolitleri olduğu düşünülmektedir ve bunu doğrulamak amacıyla PHA üretiminin gerçekleşmediği genel bir besi yerinde metabolit profilleri çıkartılmıştır.

Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.

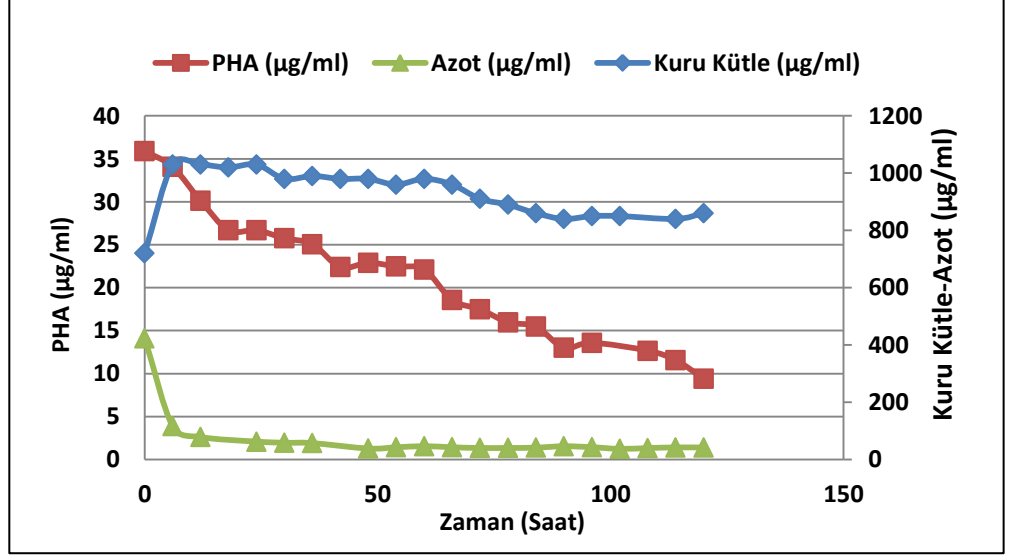
Çizelge 3.2 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

Metabolit/Zaman (Saat)	0	12	18	24	36	48	54	60	72	96	120
Hekzanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Oktanal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2-Oktenoik asit, metil ester	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Hidroksioktanoat, metil ester	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9-hekzadekanoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktenoik asit, 2 hekzil	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(+ metabolitin varlığına rastlandığını, - ise rastlanmadığını ifade eder.)

3.3.2 Açlık koşullarında *P. aureofaciens'* de mcl-PHA'nın yıkım profilinin oluşturulması

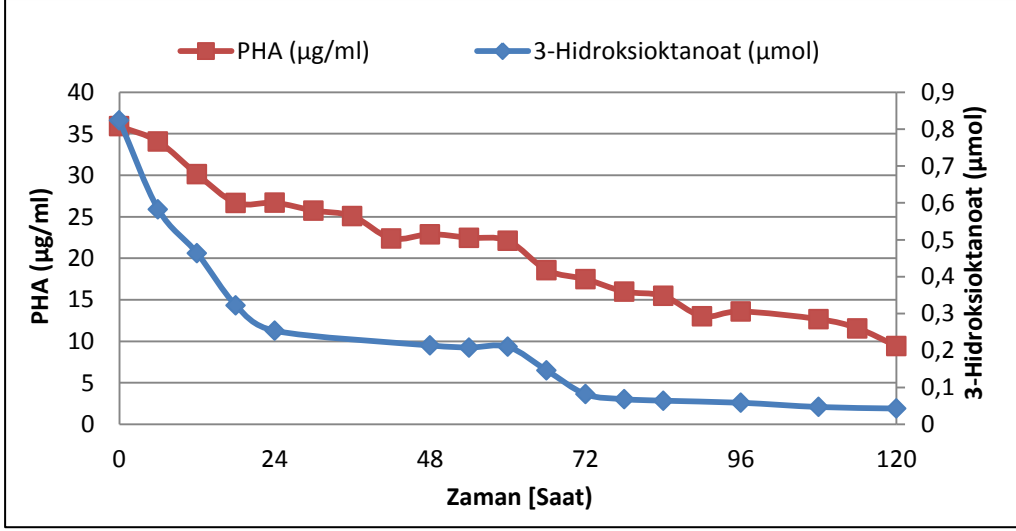
Doğal üretici *P. aureofaciens'* de PHA yıkımının teşviki amacıyla Bölüm 2.5 başlığı altındaki koşullarda üretim yapıldı. Karbon açlığı koşullarında mikroorganizmanın hücre içi mcl-PHA'ları karbon kaynağı olarak kullanması beklendiğinden 6 saatlik periyotlarla 120 saat boyunca kültür ortamından örnek alınarak hücre içi yıkım profilini oluşturmak amacıyla mcl-PHA, kuru kütle ve ortamdaki serbest azot miktarındaki değişimler izlendi. İlgili mcl-PHA yıkım profili Şekil 3.15'de yer almaktadır.



Şekil 3.15 mcl-PHA yıkım profili (açlık koşullarında)

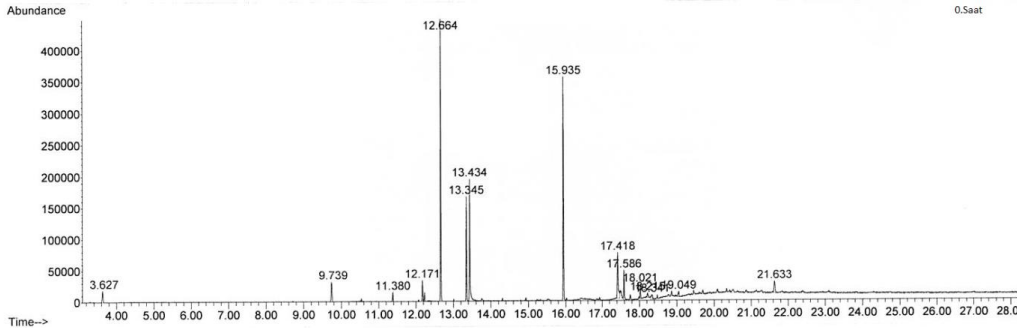
Yapılan analiz sonucunda beklendiği gibi hücre PHA'yı stres koşulları altında, karbon kaynağının bulunmadığı ortamda, yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. mcl-PHA miktarı 120. saatin sonunda 9 µg/ml' ye kadar düşmektedir. 0 ile 6. saat arasında hücrenin biyokütlesinde küçük bir artış gözlenmektedir. Serbest azot miktarında aynı sürede yüksek miktarda azalmakta ve 30. saatten sonra azalış yavaşlamakta ve 48. saatten sonra yaklaşık olarak sabit kalarak sifıra doğru yaklaşmaktadır. Hücre 0-6 saat aralığında PHA' yı depolimerize ve metabolize etmek için gerekli enzimleri üretmek amacıyla ortamdaki serbest azotu kullanmaktadır. Biyoküttele ise 12. saatten sonra bir azalma gözlenmektedir. Bu azalmanın sebebi ortamdaki karbon kaynağının azlığı ve azot kaynağının yetersizliğidir. 30. saatten sonrada 60. saate kadar sabit biyokütle gözlenmektedir. Hücre aşırı stres koşullarına maruz kaldığı için yaşamsal faaliyetlerini sürdürmekte güçlük çekmektedir ve 60. saatten sonra biyoküttele yine bir azalma gözlenmektedir ve 90 ile 120. saat aralığında yaklaşık olarak sabit kalmaktadır.

Alınan örneklerde aynı zamanda GC-MS ile genel profile benzer şekilde yıkıma ilişkin metabolit analizi yapıldı. 3-hidroksikoktanoat miktarındaki değişim Şekil 3.16' da yer almaktadır.

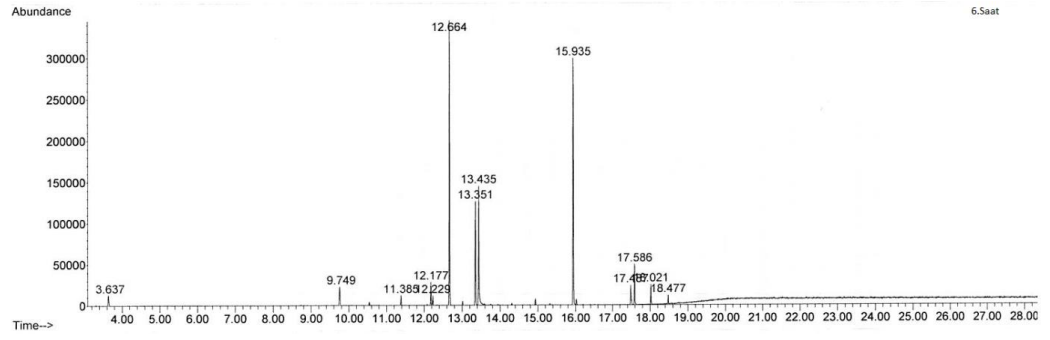


Şekil 3.16 Açlık koşullarına ait PHA ve 3-Hidroksioktanoat miktarının değişimi

Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullardaki profilde olduğu gibi açlık koşullarına ait profilde de benzer bir durum söz konusudur. PHA miktarındaki değişim beklendiği gibi 3-Hidroksioktanoat miktarındaki değişime paraleldir. Başlangıçtaki PHA miktarının azlığına bağlı olarak ölçülen 3-hidroksi oktanoat miktarı da oldukça az olmaktadır ve kromatogramlarda görülen pikler oldukça küçüktür. Hatta 120.saatte 0,1 µmolün altına düşmektedir. Bundan dolayı 120. saatteki 3-hidroksioktanoat pikinin integrasyon değeri gözükmemektedir. Benzer durum ortamdaki diğer piklerde de gözlenmektedir. İlgili gaz kromatogramları ve MS kütüphanesinden elde edilen diğer metabolitlere ilişkin veriler Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24, Şekil 3.25, ve Çizelge 3.3' te yer almaktadır.



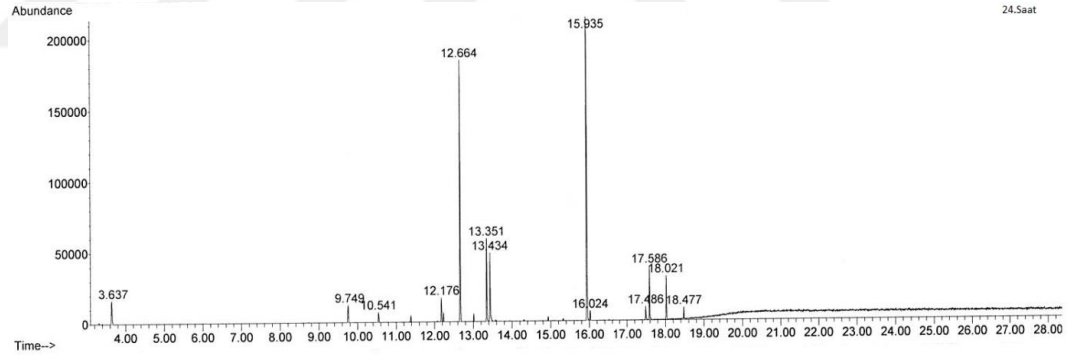
Şekil 3.17 Açlık koşullarına ait 0. saat gaz kromatogramı



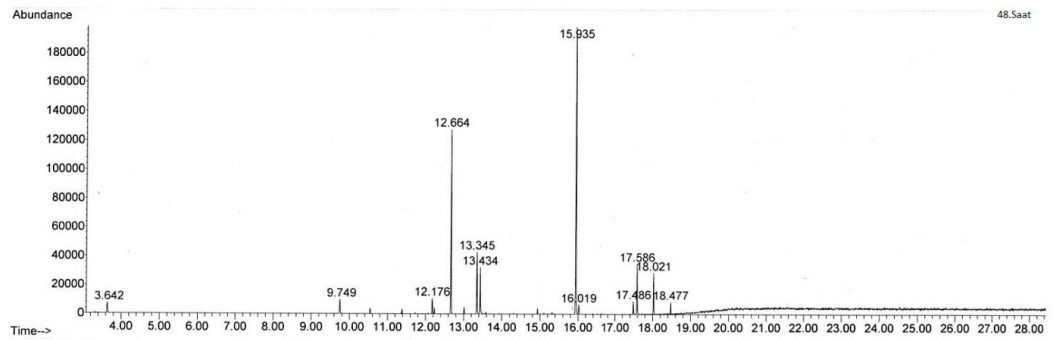
Şekil 3.18 Açlık koşullarına ait 6. saat gaz kromatogramı



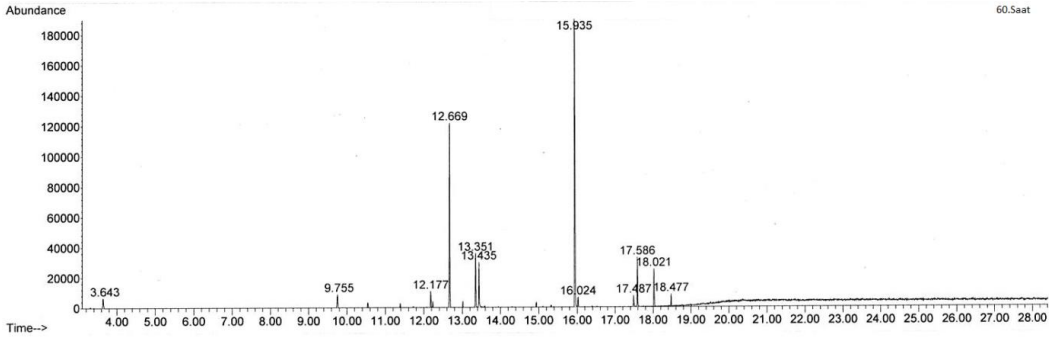
Şekil 3.19 Açlık koşullarına ait 12. saat gaz kromatogramı



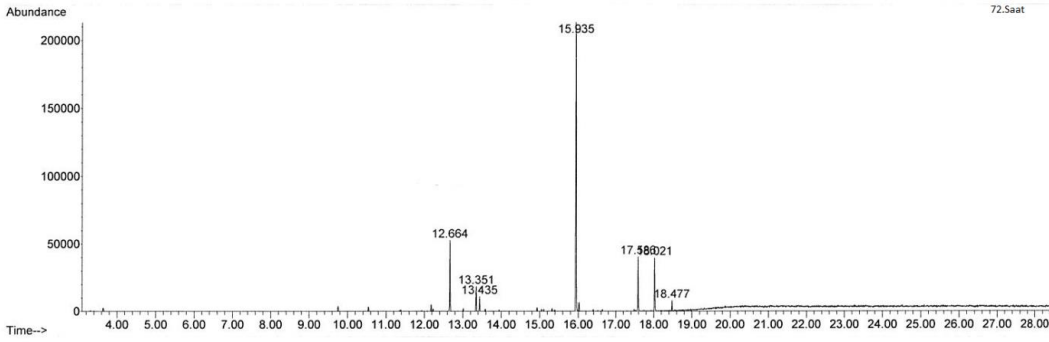
Şekil 3.20 Açlık koşullarına ait 24. saat gaz kromatogramı



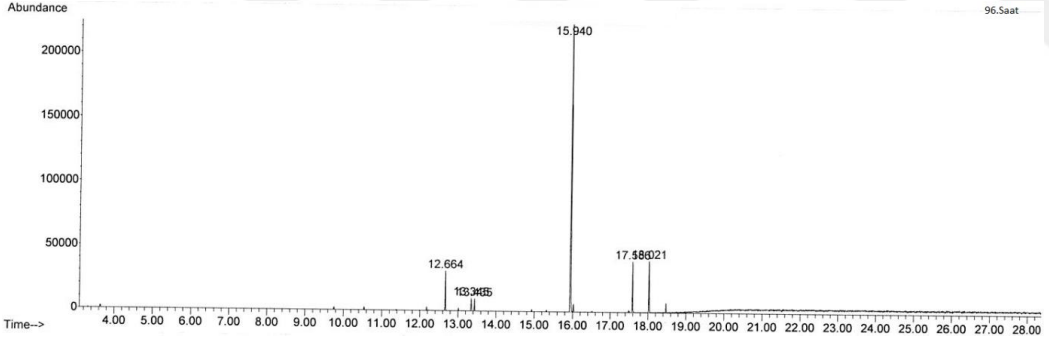
Şekil 3.21 Açlık koşullarına ait 48. saat gaz kromatogramı



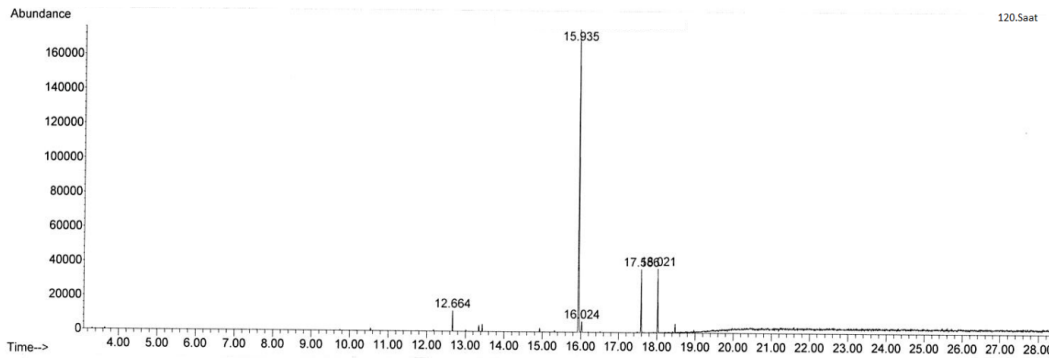
Şekil 3.22 Açlık koşullarına ait 60. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.23 Açlık koşullarına ait 72. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.24 Açlık koşullarına ait 96. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.25 Açlık koşullarına ait 120. saat gaz kromatogramı

Kromatogramlardan da görüleceği gibi 3-hidroksioktanoat miktarı PHA miktarına paralel şekilde azalmaktadır. 60.saatten sonra birçok metabolite ilişkin pikler kaybolmaktadır. Bu saatlerden sonra artık hücrenin kullanabileceği kaynak miktarı oldukça azalmaktadır. Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullardan farklı olarak hekzanal, oktanal gibi bazı aldehit türevli bileşiklerin varlığı gözlenmektedir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (Açlık koşullarında 24. saate ait örnek baz alınmıştır)

Altkonma Zamanı	Bileşik İsmi	Qual Değeri
3.637	Hekzanal	78
9.479	2-hekzenoik asiti, metil ester	87
10.541	Oktanal	72
12.176	Cis-3-oktenoik asit, metil ester	64
12.664	2-oktenoik asit, metil ester	83
13.434	3-hidroksioktanoat, metil ester	95
15.935	Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	98
17.486	9-hekzadekanoik asit, metil ester	58
17.586	Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	98
18.021	Siklopropan oktanoik asit, 2 hekzil	91

Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.4 Açlık koşullarında hücre içi mcl-PHA üretiminin izlendiği analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

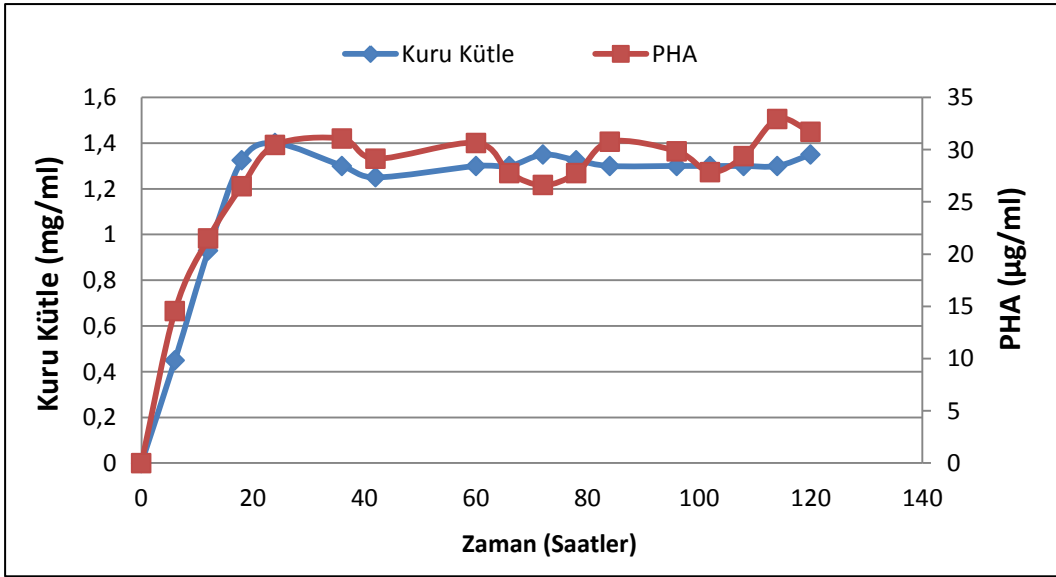
Metabolit/Zaman (Saat)	0	12	24	48	60	72	96	120
Hekzanal	+	+	+	+	+	-	-	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	-	-	-
Oktanal	-	-	+	-	-	-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-	-
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	-	-	-
2-Oktenoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	+	+	+
3-Hidroksioktanoat, metil ester	+	+	+	+	+	+	+	+
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	+	+	+	+	+	+	+	+
9-hekzadekanoik asit, metil ester	+	+	+	+	+	-	-	-
Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	+	+	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktanoik asit, 2 hekzil	+	+	+	+	+	+	+	+

(+ metabolitin varlığına rastlandığını, - ise rastlanmadığını ifade eder.)

Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda da olduğu gibi cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asit gibi metabolitler gözlenmektedir. Önceden de bahsedildiği gibi bunların PHA metabolizmasıyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Trans-3-oktenoik asit gözlenmemiştir. Fakat cis türevli izomerinin pikinin yanında oldukça küçük bir pik bulunmakta ve dedeksiyon limitinin altında kaldığı düşünülmektedir. Ayrıca cis-3-oktenoik asit pikinde ufak bir kayma olduğu ve trans izomerinin olması gerektiği yerde geldiği düşünülmektedir. Nitekim Qual değeri de hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullara nazaran düşük gelmiştir (Çizelge 3.3). Örneklerdeki metabolit miktarları azaldıkça dedeksiyonları da bir o kadar zorlaşmaktadır. Ayrıca izomer karakterli bileşiklerin benzer yapılarından dolayı ayrılmaları da bir o kadar zordur. İnternal standarttan sonra gelen piklerin ise organizmanın doğal metabolizmasıyla ilişkisi olduğu düşünülmektedir.

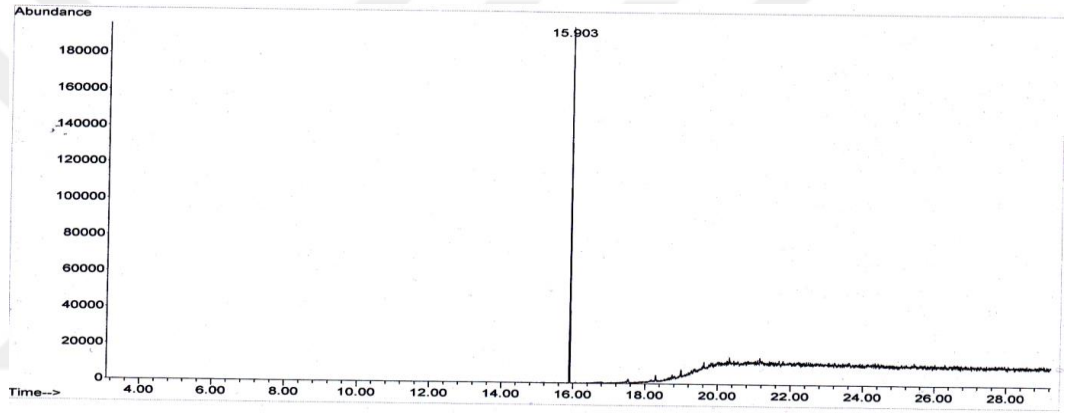
3.3.3 Çalkalamalı kültürlerde mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulun oluşturulması

P. aureofaciens' in PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullardaki profilini belirlemek amacıyla LB ortamında yapılan üretimlerden 6 saatlik periyotlar ile 120 saat boyunca örnek alındı ve bu örneklerde kuru kütle ve PHA tayini yapıldı. Yapılan analizlere ilişkin profil Şekil 3.33' te yer almaktadır.

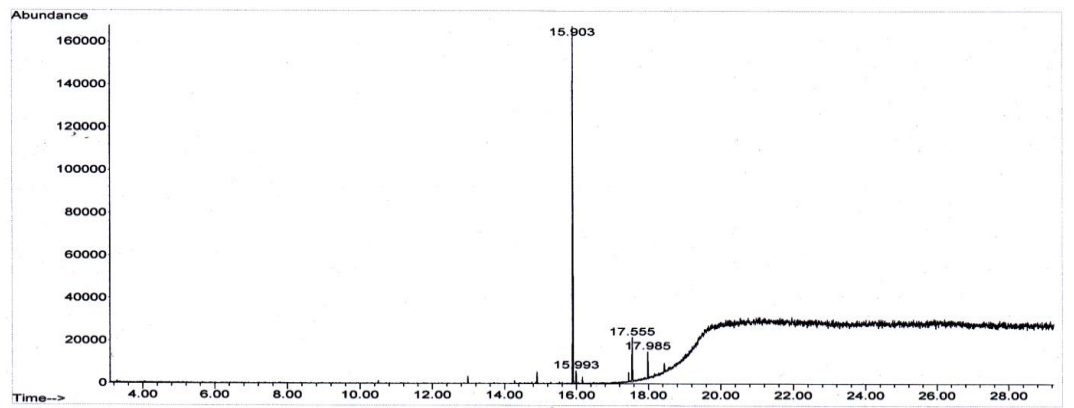


Şekil 3.26 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullardaki mcl-PHA profili

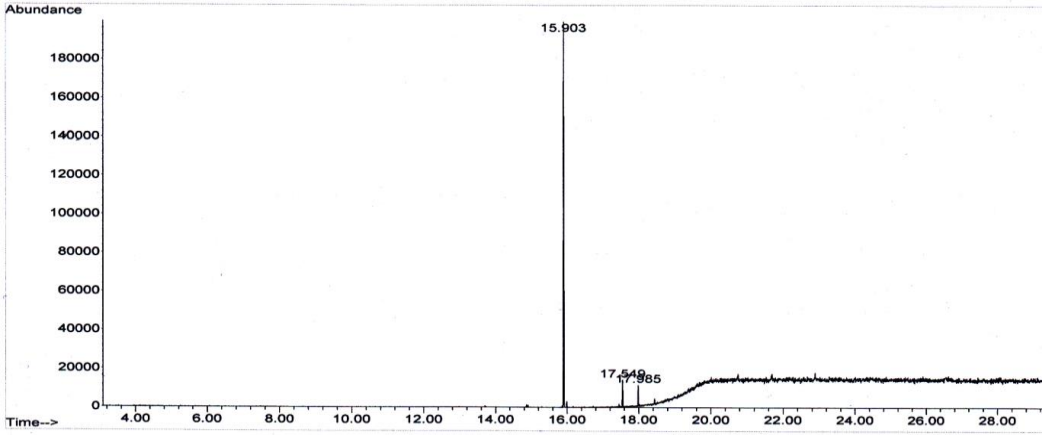
Yapılan analizler sonucunda hücrenin PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda da düşük seviyede PHA ürettiği fakat hücrenin bu PHA' yı kullanma yolunu tercih etmediği gözlenmektedir. 24. saatten sonra hem kuru kütlenin hem de PHA miktarının yaklaşık olarak sabit kaldığı gözlenmektedir. Kuru kütle miktarı 24. saatten sonra yaklaşık olarak 1.3 mg/ml değerinde sabit kalırken, PHA miktarı da 30 µg/ml dolaylarında sabit kalmaktadır. Hücrenin PHA' yı kullanmadığı yapılan metabolit analizleriyle de doğrulanmaktadır. Yapılan metabolit analizlerine ilişkin kromatogramlar Şekil 3.27, Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30, Şekil 3.31, Şekil 3.32 ve Şekil 3.33' te yer almaktadır.



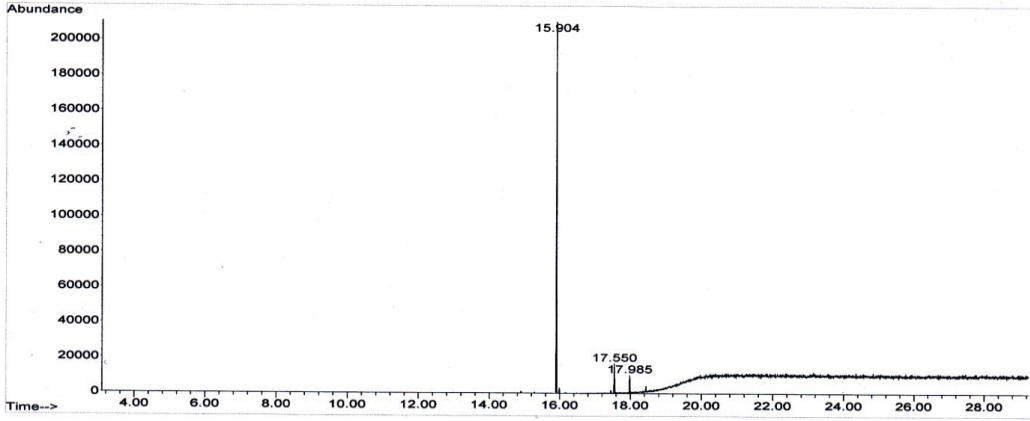
Şekil 3.27 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 0. saat gaz kromatogramı



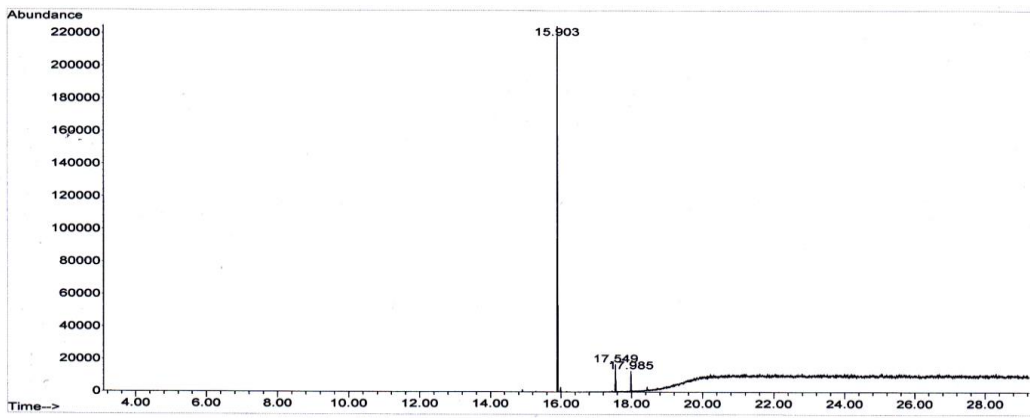
Şekil 3.28 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 24. saat gaz kromatogramı



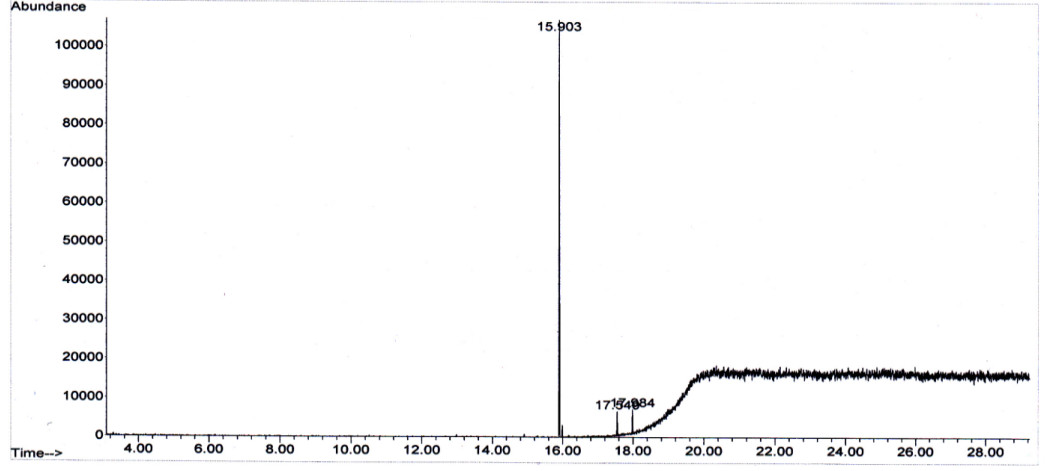
Şekil 3.29 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 54. saat gaz kromatogramı



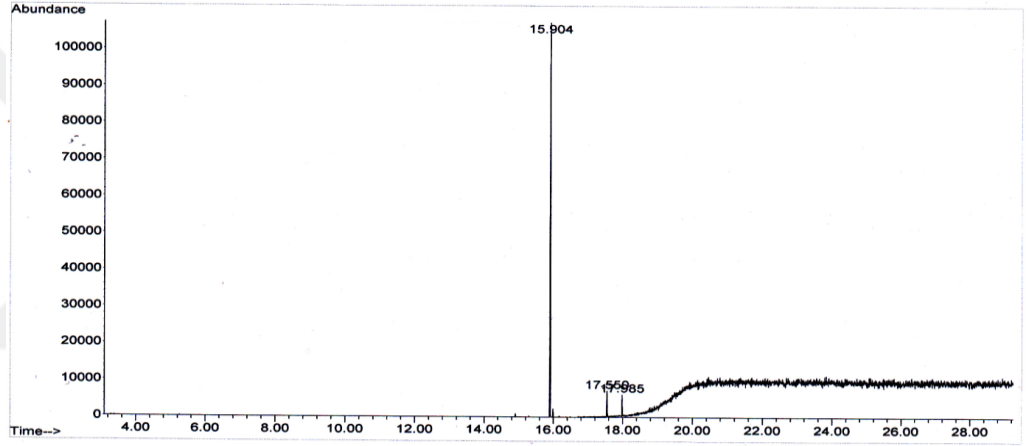
Şekil 3.30 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 60. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.31 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 72. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.32 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 96. saat gaz kromatogramı



Şekil 3.33 PHA üretiminin teşvik edilmediği koşula ait 120. saat gaz kromatogramı

Çizelge 3.5 MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri (PHA üretiminin teşvik edilmediği koşulda 72. saate ait örnek baz alınmıştır)

Alınma Zamanı	Bileşik İsmi	Qual Değeri
15.903	Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	96
17.549	Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	97
17.985	7-hekzadekanoik asit, metil ester / 9-hekzadekanoik asit, metil ester	58/45

Alınan örneklerde yapılan analizler sonucu elde edilen veriler Çizelge 3.6'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.6 Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

Metabolit/Zaman (Saat)	0	24	54	60	72	96	120
Hekzanal	-	-	-	-	-	-	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
Oktanal	-	-	-	-	-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
2-Oktenoik asit, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
3-Hidroksioktanoat, metil ester	-	-	-	-	-	-	-
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	+	+	+	+	+	+	+
9-hekzadekanoik asit, metil ester	-	+	+	+	+	+	+
Hekzadekanoik asit (Palmitik asit), metil ester	-	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktanoik asit, 2 hegzil	-	-	-	-	-	-	-

(+ metabolitin varlığına rastlandığını, - ise rastlanmadığını ifade eder.)

Gaz kromatogramları ve MS kütüphanesinden elde edilen veriler incelendiğinde PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda PHA metabolizmasına ilişkin metabolitler gözlenmemektedir. Hücrenin bu koşullarda ürettiği eser düzeydeki PHA' yı metabolize etmediği düşünülmektedir. Nitekim PHA miktarının tayinindeki değişimler ile bu durum doğrulanmıştır. Şekil 3.26' dan da gözleneceği gibi 24. saatten sonra PHA miktarı sabit kalmakta ve herhangi bir azalma gözlenmemektedir. PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda PHA üretiminin ve yıkımının teşvik edildiği koşullarla benzerlik gösteren sadece iki metabolit mevcuttur. Bunlardan birincisi hekzadekanoik asit iken diğeri ise bu yağ asidinin bir türevi olan 9-hekzadekanoik asittir. Bu veriler ise bu iki yağ asidinin hücrenin rutin metaboliti olduğu ve PHA metabolizması ile ilişkili olmadığı sonucunu doğurmaktadır.

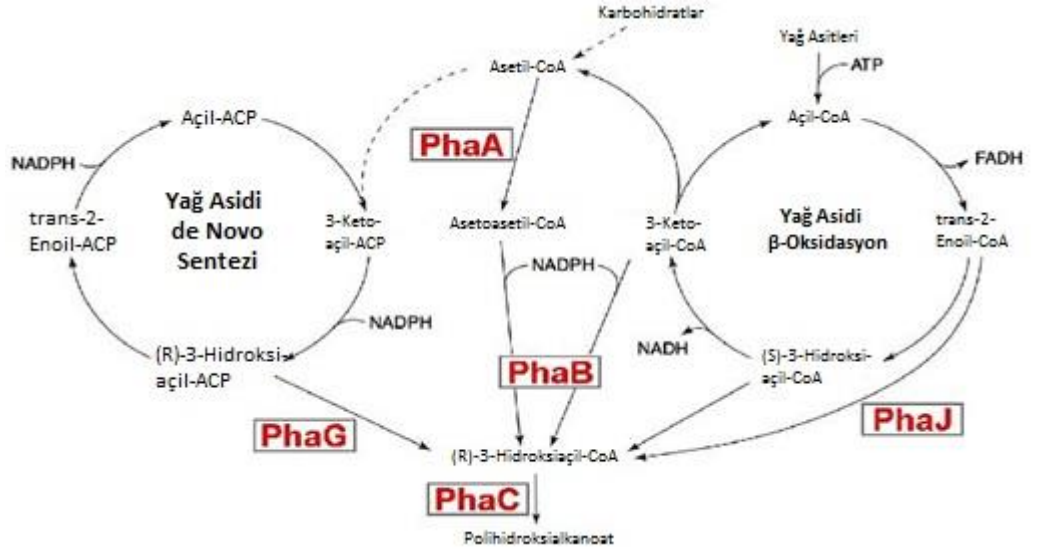
4. DEĞERLENDİRME

P. aureofaciens' te mcl-PHA metabolitler üç farklı üretim koşulunda izlendi ve bu metabolitler GC-MS kütüphanesi ile belirlendi. Bu metabolitlerin üç farklı koşuldaki kalitatif değişimi Çizelge 4.1 de özetlenmiştir.

Verilen metabolitlerin yer alabildiği metabolik yollar ile ilgili bilgiler BioCyc veri tabanının bir üyesi olan MetaCyc veri tabanı kullanılarak aşağıda verilmektedir. Her bir metabolit metabolizmadaki olası rolünü anlamak amacıyla tek tek ele alınmış ve bir birleriyle olan ilişkileri irdelenmiştir.

4.1 Poli-3-hidroksioktanoatın (PHO) biyosentezi

PHA' ların biyosentezine ilişkin bilgilere Giriş bölümünde değinilmiştir. Fakat bu kısımda da metabolizmaya ilgili yorumları yapabilmek amacıyla PHO biyosentezine değinilecektir. Şekil 4.1' de mcl ve diğer PHA' ların biyosentezi şematize edilmiştir. Çalışma kapsamında karbon kaynağı olarak kullanılan oktanoatın yağ asidi yolağı üzerinden β -oksidasyona girerek PHO sentezlendiği düşünülmektedir. Nitekim Öğr. Gör Emre Erden Çakmaklı' nın doktora tezi kapsamında yapılan polimer karakterizasyonu çalışmaları ile üretilen polimerin 3-hidroksioktanoat (3-HO) monomerlerinden oluşan poli-3-hidroksioktanoat olduğu doğrulanmıştır.



Şekil 4.1 PHA' ların genel biyosentez şeması (igem, 2008)

Çizelge 4.1 Farklı üretim koşullarında* GC-MS ile tayin edilen metabolitler

Metabolit/Zaman (Saat)	0			12			18			24			36			48			54			60			72			96			120					
Üretim Koşulu*	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N	P	S	N
Hekzanal	-	+	-	-	+	-	-			-	+	-	-			-	+	-	-			-	+	-	-			-	+	-	-			-	+	-
2-Hekzenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+	-	-			+	+	-	+			+	+	-	+			+	+	-	+			+	+	-	+			+	+	-
Oktanal	-	-	-	-	-	-	-			-	+	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-	-			-	-	-
Trans-3-oktenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+	-	-			+	+	-	+			+	+	-	+			+	+	-	+			+	+	-	+			+	+	-
Cis-3-oktenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+	-	-			-	+	-	-			+	+	-	+			-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
2-Oktenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+	-	+			+	+	-	+			+	+	-	+			-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
3-Hidroksioktanoat, metil ester	-	+	+	-	+	+	+			+	+	+	+			+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tridekanoik asit, metil ester (İnternal Standart)	-	+	-	-	+	-	+			+	+	+	+			+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
9-hekzadenoik asit, metil ester	-	+	-	-	+	+	-			-	+	+	-			-	+	+	-			+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Hekzadenoik asit (Palmitik asit), metil ester	-	+	-	-	+	-	+			+	+	+	+			+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Siklopropan oktanoik asit, 2 heksil	-	+	-	-	+	-	-			-	+	-	-			-	+	-	+			-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-

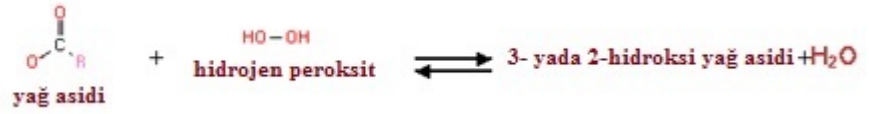
*P: Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edildiği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

S: Açlık koşullarında hücre içi mcl-PHA üretiminin izlendiği analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

N: Hücre içi mcl-PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda gerçekleştirilen analizlerde MS kütüphanesinden elde edilen metabolit profilleri

3-hidroksioktanoatın biyosentezi için alternatif bir yolda aşağıdaki gibi önerilebilir.

3-hidroksioktanoat, (3-Hidroksikaprilik asit) orta zincirli yağ asiti oksidasyonunun bir metaboliti olan bir organik (3-hidroksi dikarboksilik) asittir. 3- veya 2- hidroksioktanoik asitlerin oktanoattan aşağıdaki reaksiyon uyarınca bir 'yağ asiti peroksigenaz enzimi' (EC 1.11.2.4) tarafından katalizlenerek oluştuğu düşünülmektedir (MetaCyc, 2016).

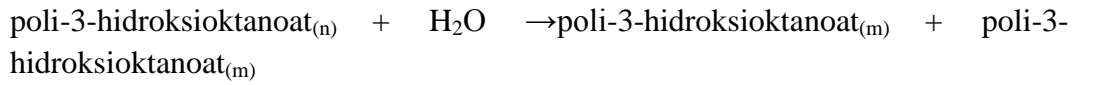


Oluşan bu yağ asidi yine PHA polimeraz enzimi vasıtasıyla PHO' ya dönüştürülebilir. Fakat bunun ile ilgili literatürde bir bilgi yer almamaktadır.

4.2 Poli-3-hidroksioktanoatın Hücre İçi Yıkımı

Oluşan Poli-3-hidroksioktanoatın yıkımıyla ilgili olduğu düşünülen metabolitlere ve bu metabolitlerin gözlemlendiği metabolik yollara aşağıda değinilmiştir.

Poli-3-hidroksioktanoat, hücre içi *poli-3-hidroksioktanoat depolimeraz* enzimi (EC 3.1.1.76) tarafından hidrolizlenerek aşağıdaki reaksiyon uyarınca daha kısa zincirli/serbest poli-3-hidroksi oktanoat birimleri oluşturulmaktadır. Bu reaksiyon diğer orta zincirli PHA'lar ile gerçekleşir.



Hücre içi/dışı poly(3-hidroksioktanoat) depolimeraz/(poli[(R)-3-hidroksioktanoat] hidrolaz) enzimleri (EC 3.1.1.76) *P.fluorescens*'te (iki alt birimli) ve *P. putida*'da tanımlanmış (bir alt birimli) olmakla beraber *P. aerofaciens*'in PHA depolimeraz enzimleri ile ilgili bir çalışma veri tabanlarına henüz girmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada değerlendirmeler bu iki organizmaya ait verilerden yola çıkılarak yapılmıştır.

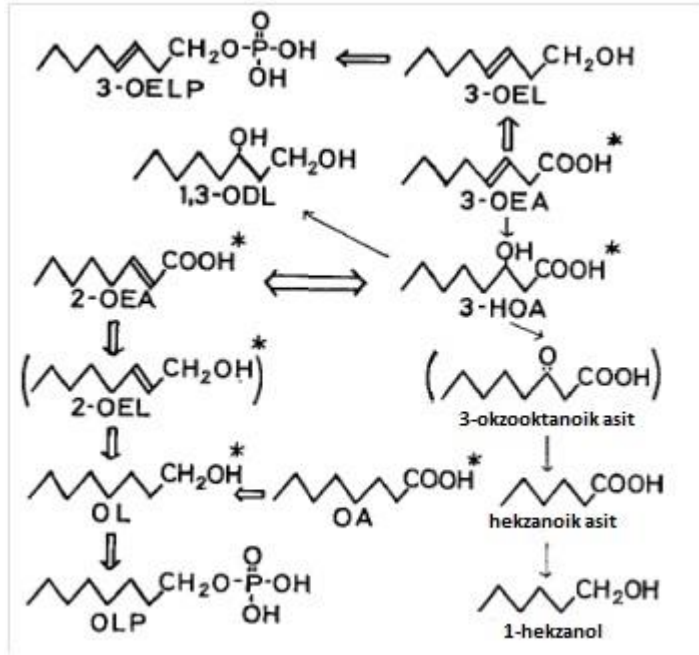


Yapılan analizler sonucunda 3-hidroksioktanoat, 2-oktenoik asit, cis ve trans-3-oktenoik asit hem PHA üretimin teşvik edildiği koşullarda hem de açlık yani yıkım koşullarında gözlenmektedir, fakat PHA üretiminin teşvik edilmediği koşullarda varlığına rastlanmamaktadır. Bu bulgular bu metabolitlerin doğrudan PHO metabolizmasıyla ilişkili olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. 3-hidroksioktanoat PHO metabolizmasının hem polimerin sentez ürünü hem de yıkımının temel ürünüdür. 2-oktenoik asit, cis ve trans-3-oktenoik asitin serbest 3-hidroksioktanoatın dönüşüm ürünleri olduğu düşünülmektedir. Gerek biyosentez sırasında gerekse yıkım sırasında 3-hidroksioktanoat bu üç metabolite dönüşmektedir.

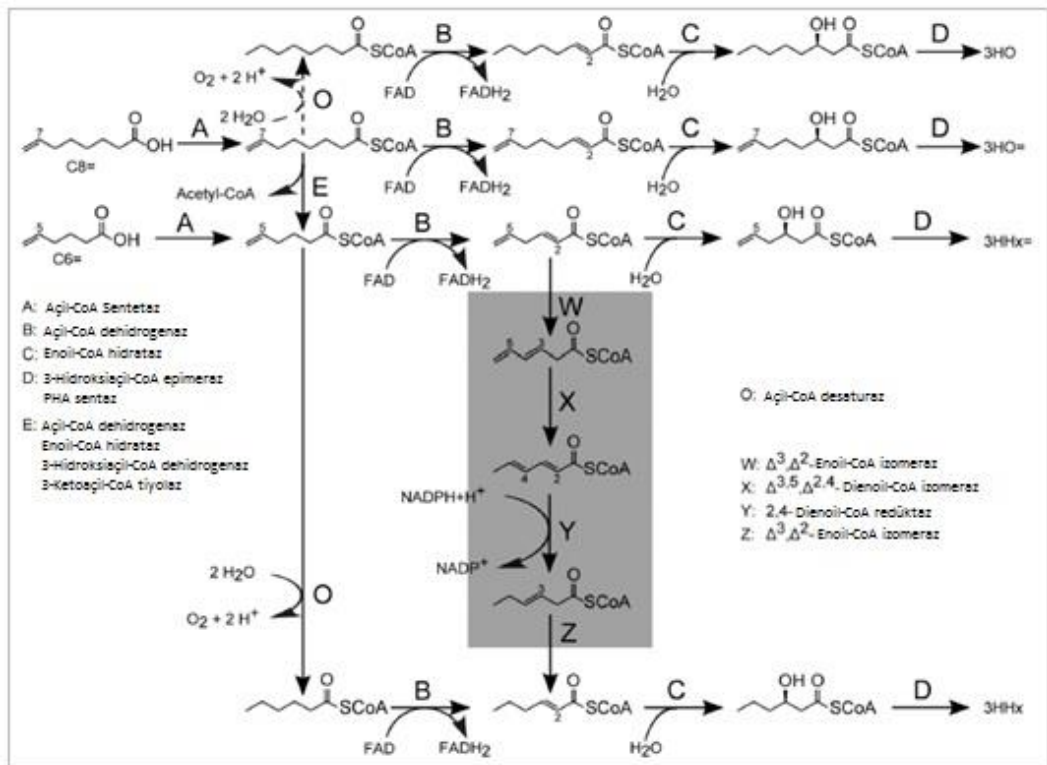
Öncelikli olarak 3-hidroksioktanoatın OH grubunun eliminasyonu ile cis/trans-3-oktenoik asite dönüştüğü ardından izomerizasyon reaksiyonu ile 2-oktenoik asite dönüştüğü düşünülmektedir. Funguslarda bu metabolitler arasında benzer dönüşümler olduğu Tahara ve arkadaşları tarafında önerilmiştir (Şekil 4.2).

Oluşan 2-oktenoik asitin eldeki MS kütüphanesinden trans ya da cis forumda mı olduğu doğrulanamamıştır. Oluşan 2-oktenoik asidin tekrardan enoil-CoA üzerinden β -oksidasyona katılarak metabolik ihtiyaca göre PHO biyosentezinde veya asetil-CoA sentezinde kullanıldığı düşünülmektedir. Höfer ve arkadaşlarının 7-oktenoik asit için önermiş olduğu metabolik yoldaki benzer mekanizmanın 2-oktenoik asit için de geçerli olabileceğini düşündürmektedir (Höfer et al, 2011).

Diğer metabolitlerin ise doğrudan PHO metabolizmasında ilişkili olmadığı PHO metabolizmasının ileri dönüşümleri sonucu diğer metabolik yollardaki metabolitler ile ilişkili olduğu veya hücrenin rutin metabolitleri olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.2 *Mucor sp'* de oktenoik asit için önerilen metabolik yol (3-HOA: 3-hidroksioktanoat, 2-OEA: trans-2-oktenoik asit, 3-OEA: trans-3-oktenoik) (Tahara et al, 1977).



Şekil 4.3 Rekombinant *M. extorquens'* te 7-oktenoik asit ve 5-hekzenoik asitten mcl-PHA birimlerinin üretimi için önerilen metabolik yol (Höfer et al, 2011).

2-Hekzenoik asit; asetil-CoA ve malonil-CoA prekürsörlerinden yağ asiti sentazların etkisi ile oluşturulan yağ asitleridir. Spesifik olarak, (R)-3-Hidroksiheksanoik asit ve yağ asiti sentaz arasındaki reaksiyonun ürünüdür. 2-Hekzenoik asitin PHA metabolizmasıyla doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim hem üretimin hem de yıkımın teşvik edildiği koşullarda varlığına rastlanmaktadır. Yapılan analizler sonucu serbest 3-Hidroksiheksanoat varlığına rastlanmamasına rağmen 2-Hekzenoik asitin 3-Hidroksiheksanoatın dönüşüm ürünü olduğu düşünülmektedir. 2-Hekzenoik asitin Şekil 4.3' te 5-hekzenoik için önerilen yola benzer şekilde 3-Hidroksiheksanoata dönüşebileceği ve polimerin yapısına eser düzeyde 3-Hidroksiheksanoat katılarak kopolimer oluşturabileceği düşünülmektedir.

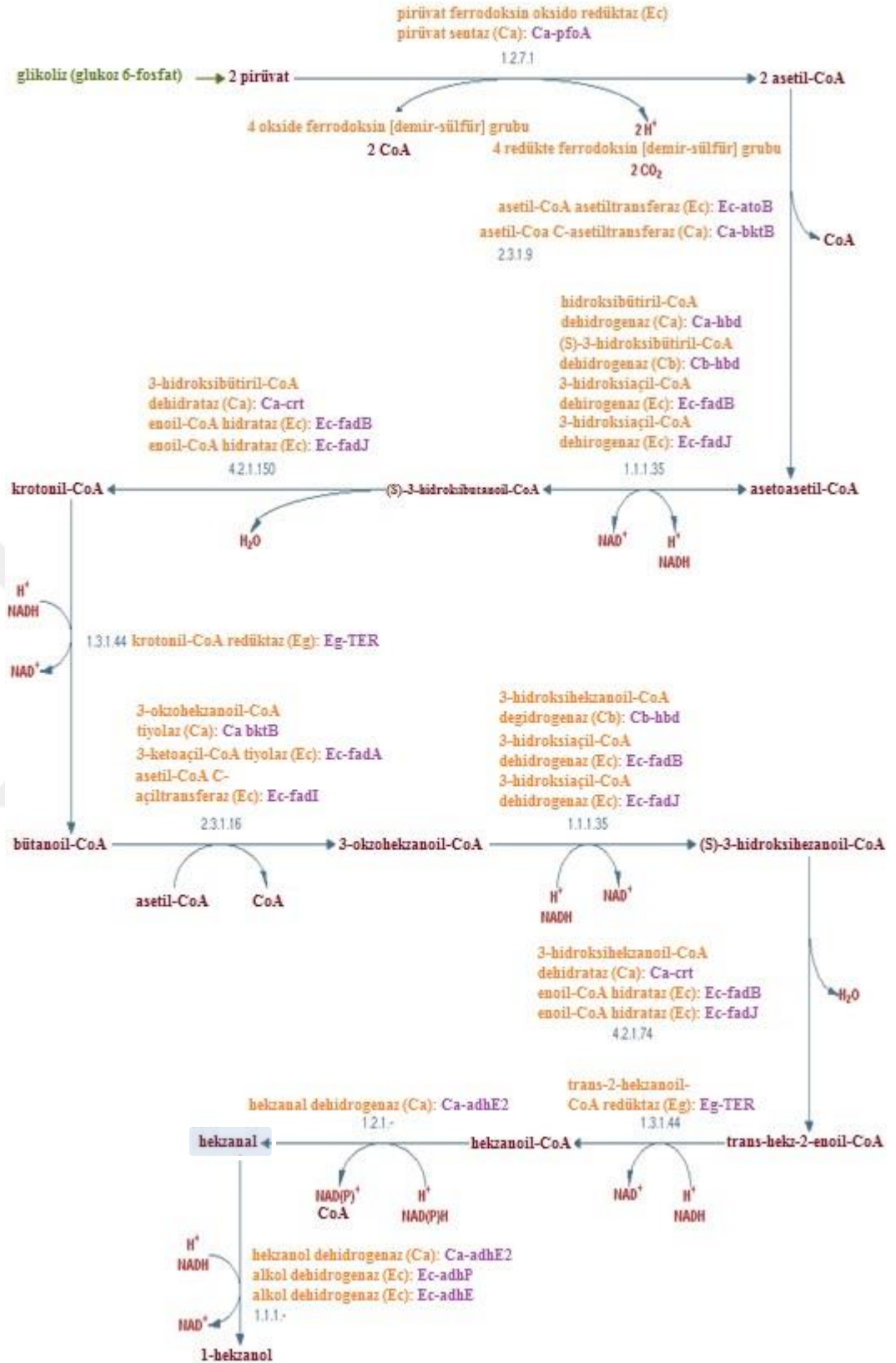
Hekzanal, oktanal ve siklopropan oktanoik asitin önceden bahsedilen metabolitlerdeki gibi doğrudan PHA metabolizmasıyla ilişkisi olmadığı düşünülmektedir. PHA metabolitlerinin farklı metabolik yollara katılması sonucu oluşabilecek ara ürünler ya da PHA gibi stres koşulları altında üretilen metabolitler olabileceği düşünülmektedir. Aşağıda hekzanal, oktanal ve siklopropan oktanoik asitin gözlendiği metabolik yollardan bahsedilmiştir.

Hekzanal (heksaldehid) piruvat fermentasyonu sırasında hekzanoil-CoA ve NADP⁺ ve H⁺ varlığında (Şekil 4.4), 8-amino-7-oxonanoat biyosentezinde (Şekil 4.5), traumatin ve (Z)-3-hekzen-1-yl asetat biyosentezinde üretilirken (Şekil 4.6), piruvatın hekzanole fermentasyonunda bir ara ürün oluşarak (Şekil 4.4.) tüketilebilmektedir.

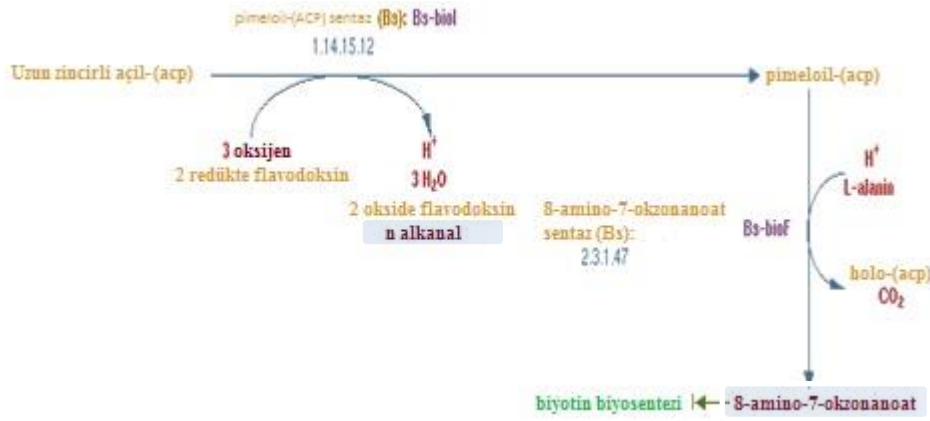
Oktanal (1-Oktaldehid, 1-Oktilaldehid, 1-Caprilaldehide, 1-oktanal, n-oktanal) yağ asidi aldehit dehidrogenaz ve alkol dehidrogenaz enzimlerinin bir substratıdır.

8-amino-7-oxonanoat biyosentezinde üretilirken (Şekil 4.5) oktan oksidasyonu ile tüketilmektedir (Şekil 4.7). 1-oktanolden oktanol dehidrogenaz tarafından katalizlenerek oktanal üretim adımı tersinirdir.

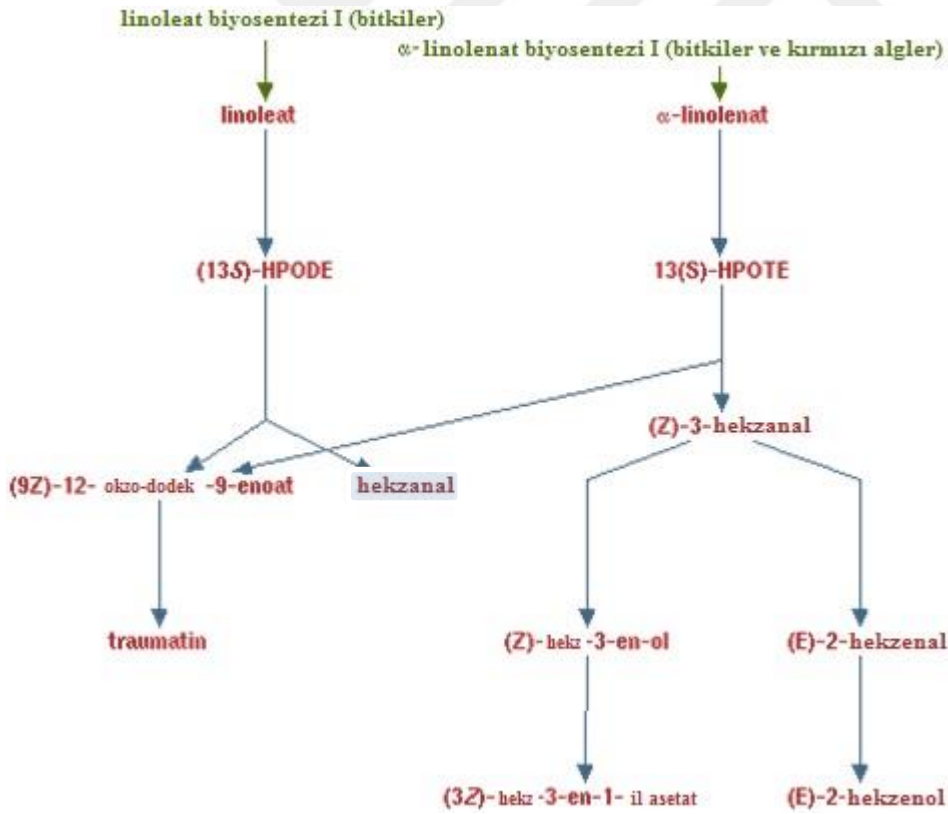
Oktanal ve hekzanal'in sadece PHA yıkımının teşvik edildiği koşullarda tespit edilmesi bu metabolitlerin PHO degradasyonu ile açığa çıkan ürünlerin farklı metabolik yollara katılması sonucu açığa çıkan ara ürünler olduklarını düşündürmektedir.



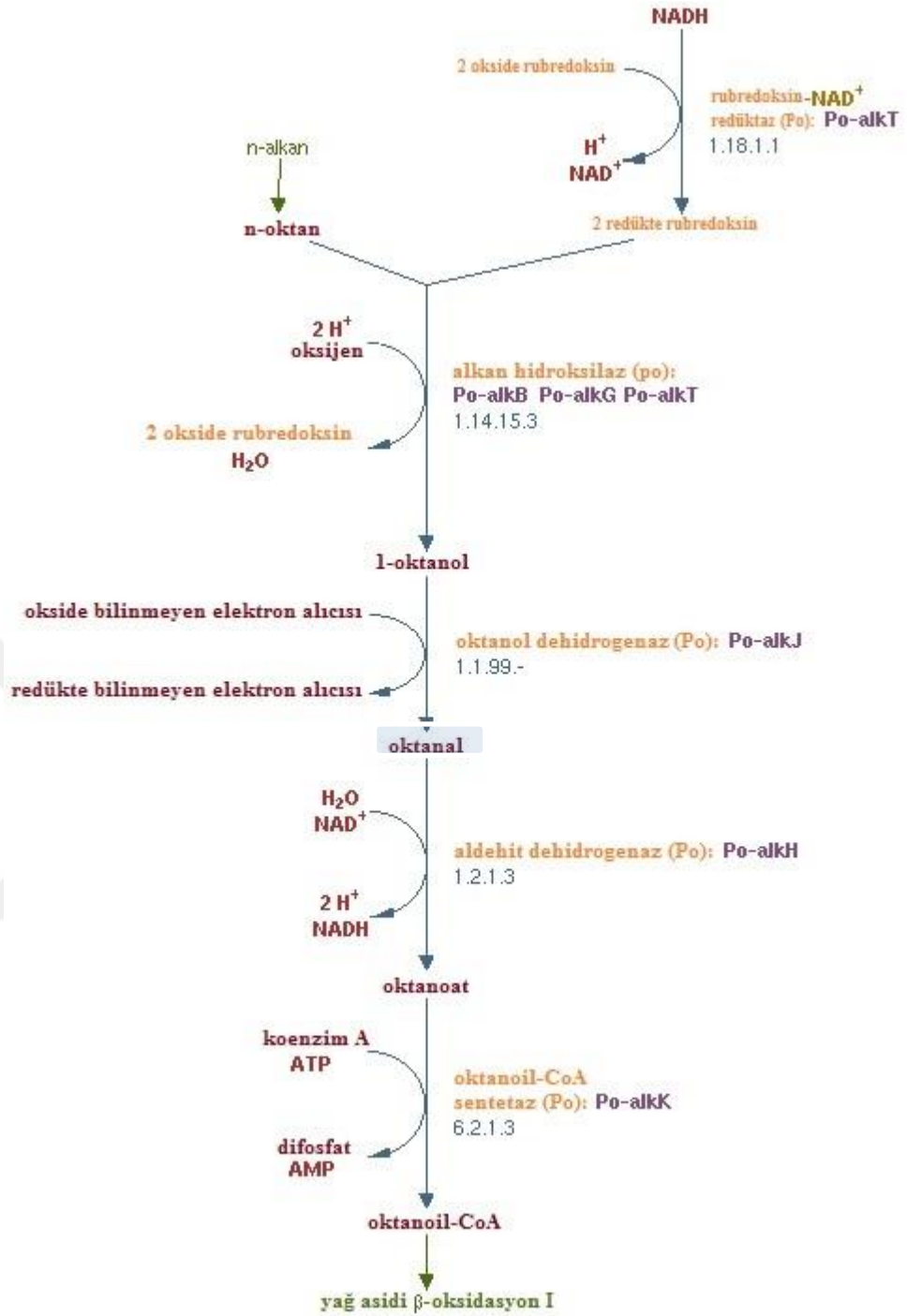
Şekil 4.4 Pirüvatın heksanole fermentasyonu (MetaCyc, 2016)



Şekil 4.5 8-amino-7-okzonanoat biyosentezi (MetaCyc, 2016)



Şekil 4.6 Linoleattan traumatin ve (Z)-3-hekzen-1-yl asetat biyosentezi (MetaCyc, 2016)



Şekil 4.7 Oktan oksidasyonu (MetaCyc, 2016)

Siklopropan oktanoik asit, 2-hekzil: Siklopropan yağ asitleri genel olarak *siklopropan yağ asiti (CFA) sentaz* doymamış yağ asiti zincirlerinin S-Adenozil metiyonini kullanarak metilenasyonu yolu ile fosfolipit çift tabakaların açıl zincirlerinin modifikasyonunu katalizlemesi ile sentezlenirler (Şekil 4.8).

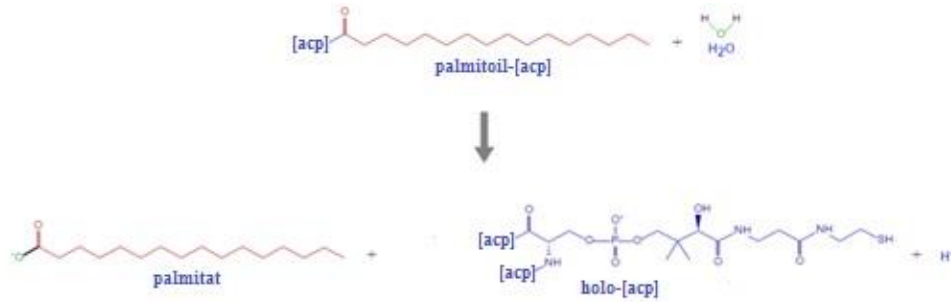


Şekil 4.8 Siklopropan yağ asitleri sentezi (MetaCyc, 2016)

Siklopropan oktanoik asit, 2-hekzil, hücre içi mcl-PHA üretimin teşvik edildiği koşullarda 54. Saatten itibaren izlenmeye başlamış ve açlık koşullarında da tespit edilmiştir. Bununla birlikte, hücre içi mcl-PHA üretimin teşvik edilmediği koşullarda gözlenmemiştir. Bu durum, mcl-PHA sentez ve yıkım metabolizmalarının her ikisinin de ara ürünü olabileceğini göstermektedir.

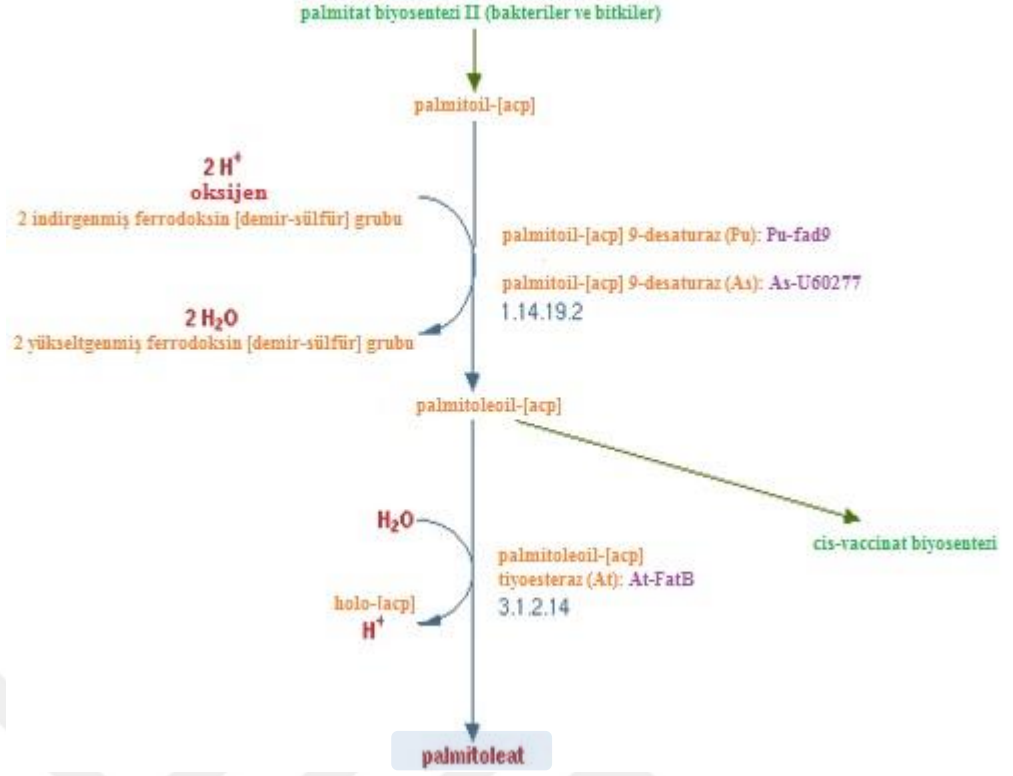
Yukarıda bahse geçen metabolitlerin haricinde her üç koşulda da gözlenen sadece hegzadekanoik asit ve 9-hegzadekanoik asittir. Bu durum bu iki metabolitin doğrudan PHA metabolizmasıyla ilişkisinin olmadığını ve hücrenin rutin bir metaboliti olduğunu göstermektedir.

Hekzadekanoik asit (palmitik asit), en yaygın doymuş yağ asitlerindedir. Palmitat biyosentez yolağı ile üretilir (Şekil 4.9). Alkan oksidasyonu, yağ asidi α -oksidasyonu yolları ile tüketilir. Test edilen her üç koşulda da palmitik asit tayin edilmiştir.



Şekil 4.9 Palmitat biyosentezi (MetaCyc, 2016)

9-Hekzadekanoik asit (palmitoleik asit (16:1 Δ 9), palmitoleik asit, (9Z)-hekzadecenoik asit, cis-9-hegzadecenoik asit, (9Z)-hekzadecenoat, cis-9-hegzadecenoat), bakterilerde yaygın olarak bulunan doymamış bir yağ asidi olup, diğer yağ asitleri gibi nadiren serbest formda bulunur. Palmitoleat, Δ 9 *desaturaz* enziminin etkisi ile doymuş yağ asidi palmitattan doğrudan oluşturulabilir. Genellikle ya açıl taşıyıcı proteinlerle ya da CoA ile lipitlere katılırlar (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Palmitoleat (9-hekzanoik asit) sentezi (MetaCyc, 2016)

Bu bulgular doğrultusunda elde edilen metabolitlerden 3-hidroksioktanoat, trans/cis-3-oktenoik asit ve 2-oktenoik asidin doğrudan poli-3-hidroksikoktanoat (PHO) metabolizmasıyla ilişkili olduğu ve polimerin biyosentez ve yıkımının bu metabolitler üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Diğer metabolitlerin ise dolaylı yollardan temel metabolitlerin ileri dönüşüm ürünleri veya organizmanın rutin metaboliti olduğu düşünülmektedir.

Elde edilen bu veriler ile PHO metabolizmasının anlaşılmasına yardımcı olabilecek literatür bilgisinin sağlanacağı düşünülmektedir. mcl-PHA' ların yıkım mekanizması detaylı bir biçimde aydınlatıldığında sadece PHA sentezinin artırılması değil yıkımının da bloke edilmesine ya da hızının azaltılmasına yönelik çalışmalar yapılarak PHA üretim verimini artırılabilirliği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Amara A.A., Salem R.S.,** 2007, Characterization of PHA depolymerase in phenol degrading bacteria. *Int. J. Biotechnol. Biochem.*, 3: 69-81 pp.
- Boyandin, A.N., Prudnikova, S.V., Filipenko, M.L., Khrapov, E.A., Vasil'ev, A.D., and Volova, T.G.,** 2012, Biodegradation of Polyhydroxyalkanoates by Soil Microbial Communities of Different Structures and Detection of PHA Degrading Microorganisms, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 48(1): 35-44 pp.
- Bren L.,** 2005, Metabolomics: Working toward personalized medicine. *FDA Consum.*, 39: 28-33 pp.
- BRENDA,** 2016, Information on EC 3.1.1.76 - poly(3-hydroxyoctanoate) depolymerase and Organism(s) *Pseudomonas fluorescens*, <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.1.76&Suchword=&organism%5B%5D=Pseudomonas+fluorescens>, Son Erişim Tarihi: 29.04.2016
- Casado G.A., Hernandez E.J.A. and Viálchez J.L.,** 1998, Determination of fatty acids (C8-C22) in urban wastewater by GC-MS, *Water Research*, 32: 3168- 3172 pp.
- Castilho L.R., Mitchell D.A., and Freire D.M.G.,** 2009, Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation, *Bioresource Technology* 100: 5996–6009 pp.
- Chao J., Wolfaardt G.M., and Arts M.T.,** 2010, Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* fatty acid profiles in biofilms and batch planktonic cultures, *Can. J. Microbiol.*, 56: 1028–1039 pp.
- Chen, G-Q.,** 2009, A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry, *Chemical Society Reviews*, 38: 2434-2446 pp.
- Chen G-Q.,** 2010, *Plastics from bacteria: Natural functions and applications*, Springer, chapter: Industrial production of PHA.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Choi, Jong-il, Sang YUP Lee, and Kyuboem Han.,** 1998, Cloning of the *Citric acid cycle* genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 64: 4897-4903 pp.
- ÇAKMAKLI ERDEN Emre, 2015,** *Pseudomonas sp.*'den Karıştırmalı Tank Reaktöründe Polihidroksialkanoatların Üretim Optimizasyonu, Kinetik Modellendirilmesi, İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Biyomateryal Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.
- Domb A. J., Kost J. and Wiseman D.M.,** 1998, Handbook of Biodegradable Polymers, CRC Press, 544 pp.
- Escapa I.F., Garcia J.L., Bühler B., Blank L.M., Prieto M.A.,** 2012, The polyhydroxyalkanoate metabolism controls carbon and energy spillage in *Pseudomonas putida*, *Environmental Microbiology*, 14(4): 1049-1063 pp.
- Eugenio L.I., Galan B., Escapa I.F., Maestro B., Sanz J.M., García J.L., Prieto M.A.,** 2010, The PhaD regulator controls the simultaneous expression of pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442 , *Environ. Microbiol.*, 12: 1591-1603 pp.
- Freier, T.,** 2006, Biopolyesters in tissue engineering applications, *Adv. Poly. Sci.*, 203: 1-63 pp.
- Fukui T., Chou K., Harada K., Orita I., Nakayama Y., Bamba T., Nakamura S. and Fukusaki E.,** 2014, Metabolite profiles of polyhydroxyalkanoate producing *Ralstonia eutropha* H16, *Metabolomics*, 10:190-202 pp.
- García G.Y., Nungaray J., Córdova J., Reynoso O.,G., Koller M., Atlic A., Braunegg G.,** 2008, Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 35: 629-633 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- German JB, Hammock BD, Watkins SM.,** 2005, Metabolomics: Building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics*, 1: 3-9 pp.
- Gomez-Casati D.F., Maria I. Zanor M.I. and Busi M.V.,** 2013, *Metabolomics in Plants and Humans: Applications in the Prevention and Diagnosis of Diseases*, BioMed Research International, 2013.
- Goodacre R.,** 2005, Metabolomics-the way forward. *Metabolomics*, 1: 1-2 pp.
- Hoffmann E., Stroobant V.,** 2007, *Mass Spectrometry Principles and Applications Third Edition*, 1-2 pp.
- Hoffman N., Rhem B.H.A.,** 2005, Nitrogen-dependent regulation of medium-chain length polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes in pseudomonads, *FEMS Microbiol. Lett.*, 27: 279-282 pp.
- Hoffmann M., Keys C. E., Song K.Y., , Brown E. W., S. Fry F. S., Whittaker P.,** 2008, Evaluation of multiple strains of *Enterobacter sakazakii* using fatty acid profiles, *Food Chemistry*, 107: 1623–1628 pp.
- Höfer P., Vermette P. and Groleau D.,** 2011, Introducing a new Bioengineered Bug: *Methylobacterium extorquens* tuned as a microbial bioplastic factory, *Bioengineered Bugs*, 2:2: 71-79 pp.
- igem,** 2008, <http://2008.igem.org/Team:Paris/Perspectives> (Erişim Tarihi: 22 Mayıs 2016)
- James, A. T., Martin, A. J. P. ,** 1952, Gas-liquid partition chromatography: the separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *Biochem. J.*, 50(5): 679–690 pp.
- Jendrossek D., Handrick R. ,** 2002, Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 403-432 pp.
- Keshavarz T., and Roy I.,** 2010, Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda, *Current Opinion in Microbiology*, 13: 1–6 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kessler B., Witholt B.**, 2001, Factors involved in regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism, *J. Biotechnol*, 86: 97-104 pp.
- Khanna, S., and Srivastava, A. K.**, 2005, Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochem.*, 40: 607-619 pp.
- Kim Y. D., Kim H. C., Kim S. Y., Rhee Y.H.**, 2005, Molecular Characterization of Extracellular Medium-chain-length Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase Genes from *Pseudomonas alcaligenes* Strains, *The Journal of Microbiology*, 43 (3): 285-294 pp.
- Lee S. Y.**, 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 1-14 pp.
- Lee S. Y., and Choi J.**, 1999, Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment, *Waste Management*, 19: 133 - 139 pp.
- Lemoigne M.**, 1927, Études sur l'autolyse microbienne origine de l'acide boxybutyrique formé par autolyse. *Ann Inst Pasteur*; 41: 148-65 pp.
- Li, R., Zhang, H. X., and Qi, Q. S.**, 2007, The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*, *Bioresource Technol.*, 98: 2313-2320 pp.
- Loo, C., and Sudesh, K.**, 2007, Polyhydroxyalkanoates : Bio-based microbial plastics and their properties, *Polymer Journal*, 2: 31-57 pp.
- Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval A., Naharro, G., and Olivera E.R.**, 2003, Bioplastics from microorganisms. *Current opinion in Microbiology*, 6: 251-260 pp.
- Madison, L. L. and Huisman, G. W.**, 1999, Metabolic Engineering of Poly 3-Hydroxyalkanoates : From DNA to Plastic, *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 21-53 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mergaert, J., and Swings, J.,** 1996, Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polymers, *J. Ind. Microbiol.*, 17: 463-469 pp.
- MetaCyc,** 2016, <http://metacyc.org/> (Erişim Tarihi: 22 Mayıs 2016).
- Mukai, K., Doi, Y., Sema, Y., and Tomita, K.,** 1993, Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotechnol Lett* 15(6): 601-604 pp.
- Ojumu, T.V., Yu, J., and Solomon, B.O.,** 2004, Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, *African Journal of Biotechnology*, 3(1): 18-24 pp.
- Papageorgiou A.C, Hermawan S., Singh C.B. and Jendrossek D.,** 2008, Structural Basis of Poly(3-Hydroxybutyrate) Hydrolysis by PhaZ7 Depolymerase from *Paucimonas lemoignei*, *J. Mol. Biol.*, 382: 1184–1194 pp.
- Philip, S., Keshavarz, T. and Roy, I.,** 2007, Polyhydroxyalkanoates : biodegradable polymers with a range of applications, *Chemical Technology*, 247: 233-247 pp.
- Plasticity,2013,**http://2013.igem.org/Team:Imperial_College/BioPlastic_Recycling:_PHB (Erişim tarihi: 18 Ekim 2015).
- Purwadi, R.,** 2006, Fermentation production of poly 3-hydroxyalkanoates, Manuscript.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R. and Kalia, V. C.,** 2003, Polyhydroxyalkanoates : an overview, *Bioresource Technology*, 87: 137-146 pp.
- Sparkman O.D., Penton Z. E., Kitson F.G.,** 2011, Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide 2nd ed., 3-15 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Strazzullo, G., Gambacorta, A., Monica, F., Immirzi, B., Romano, I., Calandrelli, V. and Nicolaus, B.,** 2008, Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of *Halomonas campaniensis*, *Applied Microbiology*, 1513-1519 pp.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S.,** 2007, Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review., *Biotechnology Advances*, 25: 148-75 pp.
- Tahara S., Suzuki Y. and Mizutani J.,** 1977, Fungal Metabolism of trans-2-Octenoic Acid, *Agric. BioI. Chem.*, 41 (9): 1643-1650 pp.
- Williams, S. F. and Martin, D. P.,** 1996, Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy, *Medicine*, 1-38 pp.
- Yılmaz M., ve Beyathı Y.,** 2003, Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB), *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1: 1-33 pp.

ÖZGEÇMİŞ
KİŞİSEL BİLGİLER

Adı:	Tuncay
Soyadı:	AVCI
Doğum Yeri:	İzmir
Doğum Tarihi:	25/12/1990
Uyruğu:	T.C.
T.C Kimlik No:	40339402106
Medeni Durum:	Bekar
Askerlik Durumu:	Yapıldı
Adres:	Gazi Paşa Mah. 718 Sok. No:14 Menderes/İZMİR
Telefon:	Cep: 0554 922 39 31
e-mail:	tuncay.avci53@gmail.com
Sürücü Belgesi	B Sınıfı (2009)

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Bölüm/Program	Okul	Yıl	Not Ortalaması
Y. Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Ana Bilim Dalı	Ege Üniversitesi	2013-2017	4,00 / 4,00
Lisans	Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü	Ege Üniversitesi	2009-2013	3,48 / 4,00
Lise	Anadolu Lisesi	Menderes Anadolu Lisesi	2005-2009	83,84/ 100,00

Lisans Tez Başlığı ve Danışmanı:

“Rekombinant *Escherichia coli*’ den PHB (Polihidroksibütirik asit) Üretiminde Kuru Üzüm Proses Artığının Kullanım Potansiyelinin Araştırılması, Kesikli Sistemlerde PHB Üretim Koşullarının Optimizasyonu”

Danışman: Prof. Dr. Nurdan Kaşıkara Pazarlıoğlu

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Tez Danışmanı:

“*Pseudomonas aureofaciens*’de mcl-PHA’ların Hücre içi Yıkım Metabolitlerinin GC-MS ile Profillenmesi.”

Danışman: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

ULUSAL VE ULUSLARARASI KONGRELER VE EĞİTİMLER

- Gaz Kromatografisi (GC) Eğitimi, 13-14 Ağustos 2016, İzmir/Türkiye, ETC Danışmanlık
- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Eğitimi, 13-14 Ağustos 2016, İzmir/Türkiye, ETC Danışmanlık
- 8th European Symposium on Biopolymers, ESBP 2015, "Metabolic Profiling of Intracellular mcl-Polyhydroxyalkanoate Degradation in Pseudomonas aureofaciens" 15-18 Eylül, Roma/İtalya G. Odabaş, T. Avcı, E. Erden and N. Kasikara Pazarlıoğlu (Poster Sunumu).
- 8th European Symposium on Biopolymers, ESBP 2015, Poster Presentation "Polyhydroxybutyrate Production from Recombinant Escherichia coli by Using Raisin Process Wastes" 15-18 Eylül, Roma/İtalya T. Avcı, Y. Ensari and A.Akkaya (Poster Sunumu).
- XII. Ne Üretelim? Etkinlikleri ve Proje Yarışması, "Rekombinant Escherichia coli' den PHB (Polihidroksibütirik asit) Üretiminde Kuru Üzüm Proses Artığının Kullanım Potansiyelinin Araştırılması ve Kesikli Sistemlerde PHB Üretim Koşullarının Optimizasyonu" 11-12 Eylül 2014, İYTE Kimya Mühendisliği Bölümü Urla/İzmir, T. Avcı, Y. Ensari ve A. Akkaya (Poster Sunumu)
- Eppendorf New Bruswick Semineri, Çalkalayıcı İnkübatörlerde Temel Prensipler ve Kullanım Alanları, CO₂ ' li İnkübasyon ve Çalkalama, Biyoproses, İçecekler, 8 Nisan 2014, İzmir/Türkiye
- Biochemical Agents in Detergents: Enzymes International Cleaning & Personal Care Products and Production Technologies Symposium and Exhibition, 7-9 Kasım 2013, Çeşme/İzmir, Pazarlıoğlu, N., G. Odabaş, T. Avcı, E. Erden Çakmaklı (Sözlü Bildiri).
- I. Ege Nano Teknoloji Günleri, 18-19 Nisan 2013, İzmir/Türkiye (Dinleyici).
- TS EN ISO/IEC 17025:2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar Sertifika Eğitim Programı, 15 Ekim 2011, Biyokimyagerler Derneği, İzmir/Türkiye
- Geleneksel 3.Kök Hücre Sempozyumu, 30 Nisan 2011, İzmir/Türkiye (Dinleyici).
- ISO 9001-2008 Kalite Yönetim Sistemi İç Tetkik Eğitimi, 15 Mayıs 2010, N&N Danışmanlık ve Eğitim Merkezi, İzmir/Türkiye
- Biyogirişimcilik Günü Sempozyumu, 5 Mart 2010, İzmir/Türkiye (Dinleyici).

GÖREV ALDIĞI PROJELER

- TÜBİTAK 113Z813- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı- “Pseudomonas aureofaciens’de mcl-PHA’ların Hücre içi Yıkım Metabolitlerinin Profillenmesi”. (Bursiyer 24 ay)

STAJLAR

- Temmuz- Ağustos 2012 - Genmar Laboratuvarları / Laboratuvar Asistanı
- Erasmus: 24.09.2014-31.12.2014 - Greifswalt University, Biotechnology and Enzyme Catalysis

İŞ TECRÜBESİ

- 01.05.2016- İnto Biyoteknoloji San ve Tic. Lim. Şti. / ARGE Laboratuvarı Uzmanı

BİLGİSAYAR BİLGİSİ

- MS Office programları (Word, Excel, PowerPoint, Outlook)

YABANCI DİL

- İngilizce

Öğrenildiği Yer: Yurt Dışı, Kurs

Okuma	Yazma	Konuşma
İyi	İyi	İyi