

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI RHIZOBIUM TÜRLERİNİN POLİHİDROKSİBÜTİRAT  
(PHB) VERİMLERİ ÜZERİNE FARKLI ORTAM  
ŞARTLARININ ETKİLERİ**

Mehtap İLHAN BAYSAK

Tez Yöneticisi  
Yrd.Doç.Dr. Seher GÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ, 2008

T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI RHIZOBIUM TÜRLERİNİN POLİHİDROKSİBÜTİRAT  
(PHB) VERİMLERİ ÜZERİNE FARKLI ORTAM  
ŞARTLARININ ETKİLERİ**

Mehtap İLHAN BAYSAK

Yüksek Lisans Tezi  
Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez, ..... tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği /oyçokluğu ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

## **TEŐEKKÖR**

Bu alıŐma esnasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve gÖrüşlerinden faydalandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Seher GÖR'e, bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr.Ahmet ŞAHİN'e, laboratuvar çalıŐmalarımnda her türlü kolaylığı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya ve yardımlarından dolayı ArŐ. Gör. Venhar ÇELİK'e teŐekkürlerimi sunarım.

Mehtap İLHAN BAYSAK

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b> .....	<b>III</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ</b> .....	<b>V</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Çevre Kirliliği .....	1
1.2. Plastikler ve Çevre Kirliliği .....	3
1.3. PHB'nin Keşfi ve Tarihi Gelişimi .....	4
1.4. PHB'nin Kimyasal Yapısı .....	5
1.5. PHB'nin Genel Özellikleri ve Sentezi .....	7
1.6. PHB'nin Biyolojik Olarak Parçalanabilirliği ve PHB'yi Parçalayan Mikroorganizmalar .....	10
1.7. PHB'nin Kullanım Alanları .....	12
1.8. PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar ve PHB'nin Ucuz Üretimi .....	14
1.9. PHB Üreten Canlılar .....	15
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>20</b>
2.1 Materyal .....	20
2.1.1. Bakteri Kültürleri .....	20
2.2.2 Besiyerleri .....	20
2.2. Metot .....	21
2.2.1. Suşların İzolasyonu .....	21
2.2.2. Suşların Kültürel Özelliklerinin Tespiti .....	21
2.2.3. Suşların Muhafaza Edilmesi.....	21

2.2.4. Analitik Ölçüm İçin PHB Metodu .....	22
2.2.4.1. Farklı Çalkalama Hızlarında PHB Verimlerinin Tespiti .....	22
2.2.4.2. Farklı Şeker Konsantrasyonlarında PHB Verimlerinin Tespiti .....	22
2.2.4.3. Farklı İnkübasyon Sürelerinde PHB Verimlerinin Tespiti .....	23
2.2.5. PHB'ye Ait Standart Grafiğın Hazırlanması .....	23
<b>3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>25</b>
3.1. Suşların Kültürel Özellikleri .....	25
3.2. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi .....	25
3.3. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi .....	34
3.4. PHB Verimlerinin Belirlenmesi .....	41
<b>4. KAYNAKLAR .....</b>	<b>50</b>

## TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 3.2.1.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 50 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	26
<b>Tablo 3.2.2.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 100 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	26
<b>Tablo 3.2.3.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 150 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	27
<b>Tablo 3.2.4.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 200 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	27
<b>Tablo 3.2.5.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 0,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	28
<b>Tablo 3.2.6.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 1'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	28
<b>Tablo 3.2.7.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 1,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	29
<b>Tablo 3.2.8.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 2'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	29
<b>Tablo 3.2.9.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	30
<b>Tablo 3.2.10.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	30
<b>Tablo 3.2.11.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	31
<b>Tablo 3.2.12.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l) .....	31
<b>Tablo 3.3.13.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 50 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l) .....	34
<b>Tablo 3.3.14.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 100 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l) .....	34
<b>Tablo 3.3.15.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 150 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l) .....	35
<b>Tablo 3.3.16.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 200 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l) .....	35
<b>Tablo 3.3.17.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 0,5'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l) .....	36
<b>Tablo 3.3.18.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 1'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l) .....	36
<b>Tablo 3.3.19.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 1,5'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l) .....	37
<b>Tablo 3.3.20.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 2'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l) .....	37
<b>Tablo 3.3.21.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l) .....	38
<b>Tablo 3.3.22.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l) .....	38
<b>Tablo 3.3.23.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l) .....	39

<b>Tablo 3.3.24.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l)	39
<b>Tablo 3.4.25.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 50 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	42
<b>Tablo 3.4.26.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 100 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	42
<b>Tablo 3.4.27.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 150 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	43
<b>Tablo 3.4.28.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 200 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	43
<b>Tablo 3.3.29.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 0,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları ağırlıklarına göre % PHB verimleri	44
<b>Tablo 3.3.30.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 1'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	44
<b>Tablo 3.3.31.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 1,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	45
<b>Tablo 3.3.32.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının % 2'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	45
<b>Tablo 3.4.33.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	46
<b>Tablo 3.4.34.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	46
<b>Tablo 3.4.35.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	47
<b>Tablo 3.4.36.</b> <i>R phaseoli</i> suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	47

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil1: Dünyada nüfus artışı, ikiye katlanma süresi ve ortalama ömür .....	2
Şekil 2: Hücre sitoplazmasında poli-beta-hidroksibütirat granülleri .....	4
Şekil 3: PHB'nin kimyasal yapısı .....	6
Şekil 4: Anormal büyüme koşullarında PHB üretimi .....	7
Şekil 5: PHB sentezi .....	8
Şekil 6: PHB'nin parçalanması ve yeniden sentezi.....	11
Şekil 7: PHB'nin karbon döngüsü.....	11
Şekil 8: Standart PHB'nin krotonik asit formundaki absorbands taraması.....	24
Şekil 9: Krotonik asit formundaki standart PHB'nin 235 nm dalga boyunda miktara bağlı (µg/ml) standart grafiği .....	24



## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### BAZI RHIZOBIUM TÜLERİNİN POLİHİDROKSİBÜTİRAT (PHB) VERİMLERİ ÜZERİNE FARKLI ORTAM ŞARTLARININ ETKİLERİ

Mehtap İLHAN BAYSAK

Fırat Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

2008, Sayfa: 54

Bu araştırmada Elazığ ili merkez ve Elazığ ili ilçelerine bağlı köylerden 1996 yılında alınan toprak örneklerinden “Bitki İnfeksiyon Metodu” kullanılarak izole edilen doğal *Rhizobium* suşlarının Poli-β-hidroksibütirat verimleri üzerine farklı ortam şartlarının etkileri tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak Ankara Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü’nden temin edilen *Rhizobium phaseoli* CIAT 899 suşu kullanılmıştır. *Rhizobium* cinsine ait suşlar, Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyerinde 28 °C’de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler santrifüjlenmiş, elde edilen biomass kurutulmuştur. Kuru ağırlıkları tespit edildikten sonra sonikasyon işlemleri ile PHB elde edilmiştir. PHB sülfirik asit ile krotonik asite dönüştürülmüş, son maddenin miktarı, 235 nm. UV spektrofotometrede ölçülmüştür. *Rhizobium phaseoli* CIAT 899 suşunun hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi, 200 rpm çalkalama hızında % 23,10, % 0,5’lik şeker konsantrasyonunda % 24,22, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda % 29,58 olarak tespit edilmiştir.

Çalışılan diğer *Rhizobium* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri, farklı çalkalama hızlarında %16,88- %26,38 arasında, farklı şeker konsantrasyonlarında % 16,08-% 26,84 arasında, farklı inkübasyon sürelerinde, % 2,53- % 31,16 arasında bulunmuştur. Farklı çalkalama hızlarındaki hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi, 24F kodlu izolatta, 200 rpm çalkalama hızında % 26,38 olarak tespit edilmiştir. Farklı şeker konsantrasyonlarındaki hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi, 23F kodlu izolatta, % 0,5’lik şeker konsantrasyonunda % 26,84 olarak tespit edilmiştir. Farklı inkübasyon sürelerindeki hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi, 24F kodlu izolatta, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda % 31,16 olarak tespit edilmiştir.

**Anahatar Kelimeler :** *Rhizobium phaseoli*, Poli-β-hidroksibütirat, plastikler

## ABSTRACT

MSc Thesis

### PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) BY SOME RHIZOBIUM STRAINS DIFFERENT REGIONS

Mehtap İLHAN BAYSAK

Firat University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

2008, Page:54

In this research, production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by *Rhizobium* strains which are isolated from the soil which is taken from different regions of Elazığ province and its districts in 1996 using “Plant Infection Method” was studied. *Rhizobium phaseoli* CIAT 899 strains which is taken from Ankara Soil and Fertilizer Research Institute, is control group. *Rhizobium* strains were grown in Yeast Ekstract Mannitol (YEM) medium at 28 °C temperature for 48 hours. After incubation period cultures were centrifugated and biomass which are obtained were dried. After dry cell weigh had been measured, PHB were obtained by ultrasonication. PHB is converted to crotonic asit by using sulfuric acid. The amount of the last substance is measurad by using UV spectrophotometer at 235 nm. According to *Rhizobium phaseoli* CIAT strain cell's dry weights, maximum PHB yields were obtained %23,10 percent in 200 rpm rinseing speed, %24,22 percent in %0,5 percent sugar's consantration and %29,58 percent after in 96 hours incubation time.

According to be worked *Rhizobium phaseoli* CIAT strain cell's dry weights, PHB yields were obtained between %16,88 - %26,38 percent in different rinseing speeds , %16,08 - %26,84 percent in different sugar consantrations , and %2,53 - %31,16 percent in different incubation times. According to cell's dry weights in different rinseing speeds maximum PHB yield was obtained %26,38 percent in labelled 24F extract and in 200 rpm rinseing speed. According to cell's dry weights in different sugar consantrations maximum PHB yield was obtained, in labelled 23F extract, %26,84 percent in %0,5 percent sugar concentration. According to cell's dry weights in different incubation times, maximum PHB yield was obtained %31,16 percent, in labelled 24F extract, after 96 hour's incubation times.

Key Words: *Rhizobium phaseoli* , Poli- $\beta$ -hidroksibutyrate, plastics

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Çevre ve Kirliliği

Dünyada bütün canlılar, organik ya da inorganik maddelerden oluşmuş belli bir ortamda ve karşılıklı etkileşim içinde, yaşamlarını sürdürürler. Canlı varlıkların yaşamsal bağlarla bağlı oldukları, etkiledikleri ve aynı zamanda çeşitli yollardan etkilendikleri bu alana çevre ya da ortam denir [1].

Canlı ile aynı mekanı paylaşan ve canlı üzerinde direkt veya dolaylı olarak etkili olan diğer tüm canlı varlıklar, canlı çevreyi, canlılığın içinde veya üzerinde yaşadığı, canlı üzerinde etkili olan fiziksel ve kimyasal tüm cansız faktörler, cansız çevreyi oluşturur [2].

Dünya, üzerinde yaşayan tüm insanların ihtiyaçlarını karşılayacak düzeydedir ancak insanlar yüzünden, dünyanın dengesi her geçen gün bozulmaktadır. İnsanoğlunun, refah seviyesini yükseltmek için doğaya egemen olmaya başlamasıyla birlikte, gelişen teknolojiyi de kullanarak, yaşadığı çevre ile sürekli mücadele etmekte ve ortam şartlarını kendi isteği doğrultusunda değiştirerek yapay bir çevre oluşturmaktadır. Bunun sonucunda, canlı ve cansız varlıklar arasında varolan doğal denge, canlıların yaşamlarını etkileyecek biçimde bozulmakta ve insanlığın geleceğini tehdit eden çevre sorunları da, bu mücadelenin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Çevrede meydana gelen değişiklikler, olumsuz ve bozucu özellikte ise, bunlar çevre sorunları olarak değerlendirilmektedir [2, 3, 4, 5].

Çevre kirlenmesinin yoğunluk kazandığı bölgeler, kirlenme sorununu oluşturan ve arttıran etmenlerin yer aldığı bölgelerdir. Bu bölgelerin başında kentleşmenin yoğunlaştığı anakent alanlar gelir. Bu durum, çevre kirlenmesi konusunda bu bölgeler için uzun süreli politikalar geliştirilmesini gerekli kılmaktadır [6].

Dünya’da 1955 yılında 48 yıl olan doğumda beklenen yaşam süresinin, 2002 yılında 65,4 yıla ulaştığı görülmektedir [7, 8]. 2020 yılında ise doğumda beklenen yaşam süresinin her iki cinsten 68,1, erkeklerde 65,9 ve kadınlarda, 70,4 yıla ulaşacağı tahmin edilmektedir [8]. Türkiye’de ise 1985 yılında %4,2 olan 65 yaş ve üzeri nüfusun, 2000’de %5,6 olduğu görülmektedir.2020 yılında ise bu oranın %7,7’ye yükselmesi beklenmektedir. Aynı şekilde, 2002 yılında 70 yıl olan doğumda beklenen yaşam süresinin 2020 yılında 73,9’a ulaşacağı tahmin edilmektedir[8].

Zaman	Dünya Nüfusu	Artış %	İkiye Katlama Süresi	Ortalama Ömür (Yaklaşık)
M.Ö. 10.000 Yıl	86 Milyon			20 Yıl
Milâd	250 Milyon	%0001	2000 Yıl	
1650	500 Milyon	%005	1650 Yıl	
1750	730 Milyon	%01	700 Yıl	35 Yıl
1800	900 Milyon	%03	400 Yıl	
1850	1.1 Milyar	%05	240 Yıl	
1900	1.6 Milyar	%010	140 Yıl	45 Yıl
1950	2.5 Milyar	%1.1	70 Yıl	55 Yıl
2000	6 Milyar	%1.7	41 Yıl	65 Yıl

Şekil 1:Dünyada nüfus artışı, ikiye katlanma süresi ve ortalama ömür [9].

Dünya nüfusu, 1950 yılından sonra, %125 oranında artmıştır. Gelecek 50 yılda dünya nüfusunun %67 oranında artacağı tahmin edilmektedir. Şekil 1’de görüldüğü gibi 2000 yılında yaklaşık 5,5 milyar olan dünya nüfusunun, 2020 yılında, 8 milyara yaklaşacağı görülmektedir. Bu durum beraberinde, dünyanın geleceğini tehdit eden çevre sorunlarını da getirecektir [10, 11].

Çevre kirliliği ve kirliliğin çevreye verdiği zararlar, katı, sıvı ve gaz halindeki maddelerin çevreye yayılması ile oluşur. Bu maddelerin çevreye karşı nötr, kirlitici veya zararlı olması, maddenin yapısına, miktarına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Genelde çevrede tehlike ve kirlilik oluşturan maddeleri üç grupta toplayabiliriz [12].

Kendileri direkt olarak zehirli olan maddeler; civa ve kadmiyum bileşikler gibi. Çevreye direkt olarak zarar verici özelliği olmayan, fakat sekonder olarak zarar veren maddeler; kloroflorohidrokarbonlar gibi (bunlar atmosferin ozon tabakasının incelmeye sebep olurlar). Çevreye direkt olarak zararı olmayan, fakat çevrede kirlilik yapan maddeler; çeşitli atıklar, inşaat malzemeleri olarak sayılabilir [12].

Çevrenin korunmasına ilişkin, hükümetlerce alınan önlemlerle yetinmeyen birçok işletme, kendi koruma önlemini kendi almak istemekte ve bunu da başarıyla uygulamaktadır. ABD’de bugün pek çok küçük işletmede muhasebe, personel ve idari bölümlerin yanı sıra birde çevreyle ilgili birim vardır. Bu birimler, işletmenin türüne göre yapılan üretim atıklarının nasıl geri kazanılacağı, atık varsa bunların çevreye olan kirliliğinin nasıl önleneceği üzerinde çalışmaktadır [13].

Üretilen malların ambalajlarına, “çevre dostu”, “çevreyle barışık” gibi yazılar yazılarak, ürünlerin daha cazip hale gelmesi sağlanmakta, böylece satış hacimleri artmaktadır. Batı ülkelerinde gelişen çevrecilik hareketleri sonucu, çevre korumacı özelliklere sahip maddelerin üretilmesine başlanmıştır. Bazı ülkelerde organik naylon torba yerine, inorganik maddelerle yapılan torbaya gösterilen ilgi, tüketicilerin gittikçe yoğunlaşan çevre sorununun firmalar tarafından göz ardı edilmeyecek bir noktaya geldiğini göstermektedir [13]. Yine Amerika'nın dünya çapında büyük bir hamburger şirketi, 1988'den itibaren, CFC (kloroflorokarbon) ile üretilen plastik kapları kullanmama kararı almıştır [13, 14].

Sadece üretici firmalar değil, tüketiciler de, davranışlarıyla büyük çevre kirliliklerine yol açmaktadırlar. Ev çöpleri, özelliklerine göre evlerde ayrılarak, daha sonra mahalle ya da sokak çöp tanklarında ayrı ayrı istiflenebilir. Pillerin, metal parçaların, cam parçalarının, minerallerin, atık yağların, kağıtların, kartonların, atık sebze ve meyve kabuklarının, plastiklerin v.b. ayrı ayrı istiflenmesi gerekmektedir [12]. Bu maddelerden plastikler, geleceğimizi tehdit eden önemli atıklardandır.

## **1.2. Plastikler ve Çevre Kirliliği**

Plastikler, ekonomiklikleri, uygulama kolaylıkları ve özelliklerinin her geçen gün geliştirilmeleri nedeniyle kullanım alanlarını ve miktarlarını giderek arttırmaktadırlar. Elektrikli ev aletlerinde, otomobil sektöründe, mutfak eşyası, park, bahçe alanlarında, plastiğe dayalı inşaat malzemesi, gıda malzemesi ambalajı, kozmetik, temizlik malzemesi, tarım ürünleri, tekstil, konfeksiyon ambalajı ve sağlık alanında plastiğe dayalı araç gereç kullanımı ile günlük yaşantımızın her alanında plastik ile karşılaşmaktadır [15]. Günlük hayatımızın bir parçası olan plastik ürünler, kanıtlanmış pek çok dezavantajlarına rağmen; kolay şekil alma, nakliyede rahatlık ve ucuzluk gibi nedenlerden dolayı tercih edilen malzemeler olmuşlardır. Ancak plastiğin kullanılıp atılabilmeye özelliği, şimdiden çevre kirliliği açısından, en büyük sorunlardan biri haline gelmiştir [16].

Günümüzde halen kullanılmakta olan plastikler, petrolden elde edilen polietilen maddesinden yapılmaktadır ki, bu madenin tabiatta parçalanması yüzlerce yıl almaktadır [17]. Plastiklere olan talebin artması, atık plastik miktarında artışa yol açmakta ve uzun süre çeşitli kirlilikler oluşturmaktadır. Plastiklerin doğada parçalanmaları için geçen ömürlerinin yüksek olması ve yeniden kullanım oranlarının düşüklüğü atık plastik miktarını hızla arttırmaktadır. Her yıl birkaç yüz bin ton plastik, denizlere atılmakta ve okyanuslarda birikmektedir [15].

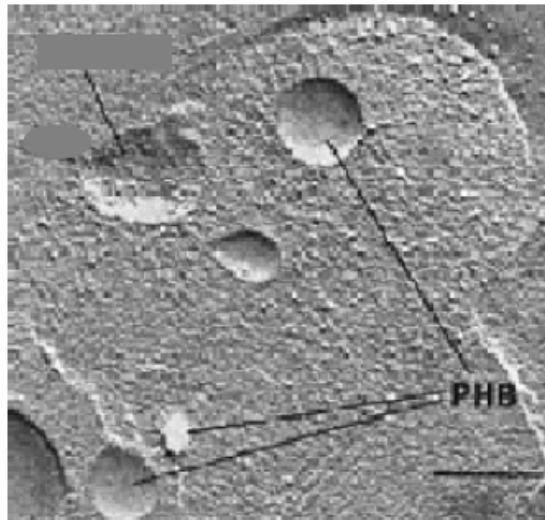
Dünyada biriken yıllık plastik miktarı, 25 milyon ton kadardır [18]. 1990'lı yıllarda, 100 milyon tonun üzerinde üretilen ve 2000 yılında, bu rakamın 150 milyon ton olduğu kabul edilen

sentetik polimerlerin, yerine kullanılabilir başka bir malzeme türü olmadığı sürece, çevre ve insan sağlığına getireceği yükler gittikçe artacaktır [19, 20].

### 1.3. PHB'nin Keşfi ve Tarihi Gelişimi

Petrolden elde edilen sentetik polimerler, plastik atık olarak doğaya terk edildiklerinde, toprakta uzun süre parçalanamadığından, çevre kirliliğine ve toksik madde birikimine sebep olmaktadır. Bu nedenle, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretimi önem kazanmış ve petrol kökenli polimerlerin yerini almalarına yönelik çalışmalar artmıştır [19].

İşte bu sebeplerden dolayı bilim adamlarının dikkatini, doğada mikroorganizmalarca parçalanabilen biyoplastik maddesi çekmiştir [17]. Petrokimyasal kaynaklı plastiklerin doğada uzun süre parçalanmadan kalmalarıyla meydana gelen çevre kirliliğinin önlenmesi amacıyla yapılan araştırmalarda mikroorganizmaların, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere, stres koşullarında depoladıkları lipid granüllerinin plastik özellikte olması ve bu plastik materyalin, doğada mikroorganizmalar tarafından parçalanması, mikroorganizmalar kullanılarak, plastik madde üretimini kapsayan bir sektörün gelişmesine neden olmuştur [21]. Biyolojik yolla parçalanabilen polimerlerin, (mikrobiyal termoplastik) üretimi önem kazanmıştır. Mikrobiyal plastiğin hammaddesini, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) oluşturmaktadır [22]. PHB granülleri ilk kez, *Bacillus megaterium* ve *Azotobacter beyerinckii*'nin hücre ekstraktından izole edilmiştir [22]. Biyolojik olarak parçalanabilen bir termoplastik materyal olarak PHB'nin özellikleri, 20 yıldan daha fazla bir zamandır dikkat çekmektedir. Mikrobiyoloji alanında mikroskopların kullanılmasından bu yana bakteri hücrelerinde küçük yağ damlacıkları tanımlanmıştır [17]. (Şekil 2).



Şekil 2: Hücre sitoplazmasında poli-beta-hidroksibütirat granülleri [17].

Birçok mikrobiyolog, bakterilerdeki lipofilik granülleri çok önceden tanımlamış olmalarına rağmen, ilk kez Lemoigne tarafından bu partikülün kompozisyonu teşhis edilmiştir [23]. Lemoigne, 1920'li yıllarda topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksibütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri (PHB) olarak tanımlamıştır. Lemoigne (1926-1927) yapmış olduğu araştırmalarda *Bacillus subtilis* kültürlerini distile suda otoliz ettiği zaman bilinmeyen bir asidin oluşması ile, pH değerinin azaldığını gözlemlemiştir. Daha, sonraki çalışmalarda ise, monomerik  $\beta$ -hidroksibütirik asidin, kaynağının hücre içi poli- $\beta$ -hidroksibütirik asit olarak *Bacillus megaterium*'un otolizi sırasında oluştuğunu kesin olarak ortaya koymuştur [24, 25].

PHB'in petrol türevli plastiklerin yerini almak için ticari olarak üretimi çalışmaları, 1960'lı yıllarda başlamıştır [16]. Ellar (1968) , Jensen ve Sieko (1971 ) yaptıkları çalışmalarla granüllerin 100-800 nm çapında olup, 2-4 nm kalınlığında birim olmayan bir zarla örtüldüğünü bulmuşlardır [26]. PHB'in ilk endüstriyel üretimi, 1970'li yıllarda gerçekleşmiştir. Üretilen bu ticari ürün biopol adıyla patentlenmiştir [16]. Bu yıllarda İngiltere'de Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) birçok bakteriyel türü, potansiyel PHB üretimi açısından incelemiş ve endüstriyel üretimde, hücre kuru ağırlığının %90'ı üzerinde PHB biriktiren *Alcaligenes eutrophus* bakterisini kullanmaya başlamıştır [27]. Daha sonraki yıllarda PHB ile ilgili çalışmalar, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Bacillus* vb. bakteri cinsleriyle devam etmiş; PHB'in fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metodları, metabolizması, iç ve dış parçalanması gibi çok yönlü özellikleri incelenmiştir [16].

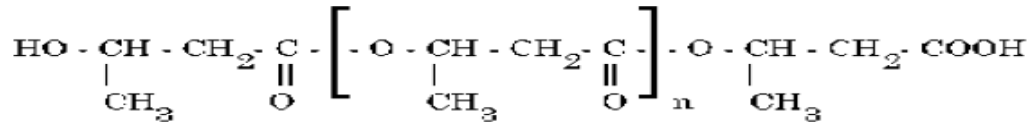
#### **1.4. PHB'nin Kimyasal Yapısı**

Bakteriyel plastik veya biyoplastik de denilen ve petrokimyasal plastiklerin neden olduğu çevresel kirliliğe alternatif olarak ortaya çıkan poli- $\beta$ -hidroksialkanatlar (PHA), geleneksel plastik potansiyeline sahip mikrobiyal olarak üretilen polimerlerdir. PHA'ların, insanlardaki yağ veya bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bildirilmektedir [16]. Çeşitli bakteriler tarafından sentezlenen PHA'nın hücre içi depo polimeri granüller olduğu ve bakteri için karbon ve yüksek enerji kaynağı olduğu bildirilmiştir [28]. PHA oluşumu glikojenin PHA'ya transformasyonu sonucu meydana gelir ve bu oluşumun biyolojik mekanizmasında fazla fosfatın hücreden giderilmesinde önemlidir [29]. Poly-3-hidroksialkanoat (PHA) nitrojen, fosfor, oksijen veya mikroelement yetersizliği sentezlenen bakterial polyesterlerdir. PHA'nın moleküler ağırlığı türe bağlıdır. Polimerizasyon derecesinin düzeyi bakterial üretim sistemi ve fermentasyon fizyolojik parametrelerinin seçimini içeren faktörlerin sayısına çok bağlıdır [15]. Bir çok çeşidi bulunan PHA'lar, linear, uzun, 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden ibaret, aktif

mikrobiyal polyesterlerdir. Bunlar içinde yer alan poli-Beta-hidroksibütirat (PHB), PHA'ların en yaygın ve geniş kapsamlı olarak çalışılan tipidir ve polimerin bu sınıfa ticari ilginin doğmasına neden olan PHA'dır [27].

PHB'nin yapısı esasen lineer (head to tail) baş-kuyruk 3-hidroksi yağ asit monomerlerinden oluşan bir poliesterdir. Bu polimer de, bir monomerin karboksil grubu yanındaki monomerin hidroksil grubu ile bir ester bant oluşturur. C-3 veya  $\beta$  pozisyonundaki karbona bir alkil grubu (burada bir metil grubu) bağlanmıştır (Şekil 3). Fakat bu alkil grubu her zaman doymuş değil, aromatik, doymamış, halojen ve dallı monomerlerde görünmüştür. Yan zincirlerin kompozisyonu ve uzunluğundaki değişimler, termobiyoplastik polimer ailesinin çeşitliliği ve çok geniş potansiyel uygulamalarda kullanılmasının temelini oluşturur. Bakteriler P(3HB) depolama yeteneklerine göre sınıflandırılırlar. P(3HB)'in kopolimerleri, ek besin kullanılarak oluşabilir ve 3-hidroksi valerat (3HV) veya 4-hidroksibütirat (4HB) gibi monomerleri içeren polimerler ortaya çıkabilir. PHB yağ asitlerinden veya başka alifatik karbon kaynaklarından sentezlenir ve genellikle ortaya çıkan PHB polimerinin kompozisyonu, kullanılan substratlara göre değişir [17].

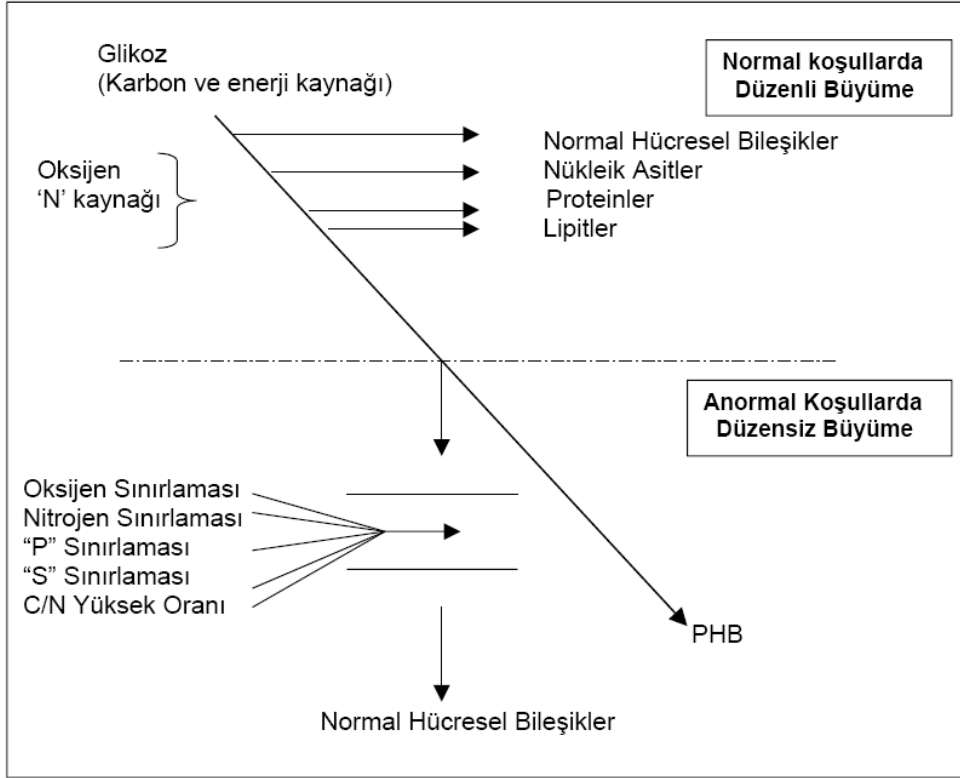
Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB ın genel formülü  $(C_4H_6O_2)_n$  şeklindedir (Şekil 1). (n) sayısı 35 000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabildiği gösterilmiştir [27].



Şekil 3: PHB'nin kimyasal yapısı [17].

PHB granüller içerisinde toplanıp, hücre kuru ağırlığının %90'lara varan seviyelerine kadar oluşturabilir. Depo materyalleri dengesiz büyüme koşulları gibi özel koşullar altında organizmalar tarafından sentezlenen maddeler olarak bilinir. Bakterilerin aldıkları besin miktarlarında bir dengesizlik varsa aldıkları fazla besin hücre içinde depolanır. Hücre içinde çözünebilir ara metabolitler polimerize hale getirilir. Böylece hem bu maddeler hücrenin osmotik dengesini bozmadan depolanırlar hem de bu değerli maddelerin hücreden atılmaları engellenir. Dengesiz büyüme koşulları ya belirli bir makroelement (C, H, N, O) ya da bir mikroelement (P, Mg vb.) içeren uygun besi ortamının total olarak eksikliği veya suboptimal konsantrasyonların bulunması ile meydana gelir [17].





Şekil 4: Anormal büyüme koşullarında PHB üretimi [17].

Polimerin moleküler ağırlığı, mikroorganizma ve büyüme şartlarına bağlı olarak  $2 \times 10^5$  ile  $3 \times 10^6$  Dalton arasındadır. PHA depolayan mikroorganizmalar, Sudan Black veya Nile Blue A boyaları ile kolayca tanımlenebilir. 300 den fazla gram negatif ve gram pozitif bakteri türünde farklı PHA ların (PHB, PHV, PHO...) depolandığı rapor edilmiştir [30].

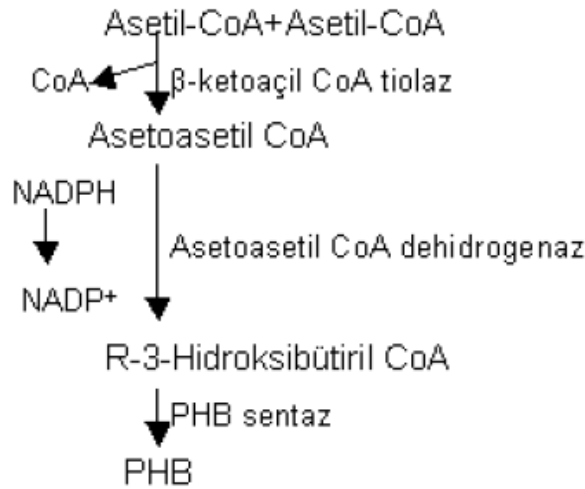
### 1.5. PHB'nin Genel Özellikleri ve Sentezi

Mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan PHB oksijen konsantrasyonlarının düzenlenmesinde, sporulasyon için enerji sağlanmasında ve redükleyici eküvalentler için elektron havuzu olarak da görev alır. Aynı zamanda hücrede redoks düzenleyicidir [27]

Araştırmacılar, PHB'in birçok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulduğunu ve PHB birikiminin genellikle, fazlaca karbon kaynağı varlığında, ancak büyüme için gerekli nitrojen kaynağı, oksijen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe vb.) gibi besleyici maddelerin eksikliğinde gerçekleştiğini bildirmektedirler [16]. Ancak *Rhizobium etli* ve *Azotobacter vinelandii* UWD suşu gibi bazı bakterilerde eksponansiyel gelişme devresinde de biriktirildiğini rapor etmişlerdir [31]. Yapılan araştırmalarda, büyüme ve PHB biriktirimi arasında yakın bir ilgi tespit edilmiştir. Buna göre, bakteri gelişiminin

eksponansiyel fazında PHB birikimi artmakta, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise maksimum düzeye ulaşmaktadır. Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir. Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir [18]. Yapılan bir çalışmada, *Rhizobium* bakterilerinde, kültür ortamının asitleşmesine bağlı olarak hücre ölümünün arttığı ve PHB içeriğinin buna bağlı olarak düştüğü bildirilmiştir [32].

Polimerin biyosentezi, monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi, iki enzimatik aşama gerektirir. Üretim seviyesi, zincir uzunluğu ve oluşan kopolimerlerin kompozisyonu, bu enzimlerin performansına bağlıdır. Hücre içinde PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek asetil-CoA ve düşük serbest CoA düzeyinin olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu, mikroorganizmalara göre değişmekle beraber genelde nitrojen, potasyum, sülfür veya oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır. En kapsamlı karakterize edilen polimer olan PHB'nin biyosentezi, üç değişik enzim tarafından katalize edilen, üç enzim reaksiyonundan oluşmaktadır [33]. (Şekil 5).



Şekil 5: PHB sentezi [18].

İlk reaksiyon, iki Asetil-CoA molekülünün, β-ketoaçil CoA tiolaz tarafından, Asetoasetil CoA'ya dönüştürülmesini içermektedir. İkinci reaksiyon, Asetoasetil CoA'nın NADPH bağlı bir Asetoasetil CoA dehidrogenaz tarafından, R-3 Hidroksibütiril CoA'ya indirgenmesidir. Son olarak, R-3 Hidroksibütiril CoA monomerleri PHB sentaz tarafından, PHB'ye polimerize olmaktadır. Asetil CoA ve 3-Hidroksibütiril CoA, PHB sentezindeki ara araçlardır. Asetat ve PHB, Asetil CoA'nın konsantrasyonunu arttırabilir ve hücrede 3-Hidroksibütiril CoA ve 3H'nin sentezini bundan dolayı kolaylaştırır. Prokaryot hücrelerde

PHB'nin hücre içi sentezi için başlangıç bileşiği, Asetil CoA'dır. Substrat ve Asetil CoA'nın hücre içi konsantrasyonunun artmasıyla oluşan koşullar, sentezde pozitif bir etkiye sahiptir. Bu aynı zamanda PHB sentezini basitleştirmektedir. Enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonun düzenleyici mekanizma idaresi altında olması bunun nedeni PHB oluşumunda ilk basamağı katalizleyen,  $\beta$ -ketoaçil CoA tiolaz (phbA geni ile kodlanan), açil-CoA+asetil-CoA'daki substratların tiolitik ayrılmasını içeren enzim ailesinin bir üyesidir. Yüksek ökaryotlardan, mayalara ve prokaryotlara kadar doğal olarak bulunurlar [27].

Faz kontrast veya elektron mikroskobu kullanıldığında, bakteriyel hücrelerde PHB granülleri kolaylıkla gözlenebilir. PHB, genellikle küre şeklinde olup, her granül çap olarak 100-800 nm arasındadır. Bunlar 2-4 nm kalınlığında üniter olmayan bir membranla çevrilidir. Granüllerin yaklaşık % 98'i PHB, % 2'si ise protein içermektedir. Yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında, granülün içte yer alan bir merkezi kısım ve birkaç tabakalı membranla çevrilmiş kabukdan oluştuğu bildirilmiştir [34]. PHB'ler, polipropilen gibi petrol türevli yaygın plastiklere benzer materyal özellikler gösterirler. Ancak, bir termoplastik olan PHB'nin sertliği, polietilene kıyasla dört misli fazladır. Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden özütlendiğinde kristalize olur. Katı ama kırılğan bir materyal olan PHB'nin erime sıcaklığı, 157-188 °C olup, bu, polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakındır. PHB termoplastik olduğundan preslenip şekil verilebilir [16].

PHB'nin, UV ışınlarına dirençli olduğu ancak, asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf dirence sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, polimerin su ve hava geçirmez oluşu hidrolitik parçalanmaya karşı direnç sağladığından PHB'nin kullanım olanakları genişlemektedir [35].

Biyoplastiklerin yeniden oluşum devresi, sentez-parçalanma-sentez olarak gösterilmiştir. Bu devir tabiatta olabileceğinden çevre korunmasında da önemli görülmüştür. Toprakta mikroorganizmalar yolu ile aerobik ortamda biyoplastik su ve CO<sub>2</sub>'e parçalanmaktadır. Parçalanma sırasında azot oksit oluşmadığından çevre korunmasında önemlidir. Parçalanmış biyoplastik bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir [36].

Biyoplastiler, prokaryot ve ökaryot birçok organizmada bulunmuştur. Aynı zamanda insan kan plazmasında da yüksek oranda rastlanmıştır ve memeli dokularında toksik bir etkisi yoktur [37].

Bakterilerce üretilen P(3HB), polimer özelliklerini göstermek için yeterince yüksek moleküler ağırlığa sahiptirler, bunlar propilen gibi geleneksel plastiklere benzerlik göstermektedirler. En baştaki biyoteknolojik gelişmelerin amacı PHB'nin daha kullanışlı hale getirilmesiydi. 3HV'in P(3HB) ile birleştirilmesi poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksi valerat) [P(3HB-3HV)] kopolimerin oluşmasına sebep olmuştur. Bu kopolimer P(3HB)'e göre

kırılganlık ve sertliği daha az olup ve polipropilenlere benzer mükemmel bir su ve gaz bariyer özelliği gösterdikleri nedeni ile zarların yapımında kullanılır [36].

En çok bilinen ve en yaygın kullanım alanına sahip olan PHB'nin fiziksel özellikleri petrol kökenli polipropilen ile karşılaştırıldığında; PHB'nin daha kristal bir yapıya sahip olduğu, özgül ağırlığının daha yüksek olduğu, UV direncinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Öne çıkan bu gibi özelliklerden dolayı PHB propilenin yetersiz kaldığı birçok uygulama için iyi bir seçenek olarak bildirilmiştir [17].

### **1.6. PHB'nin Biyolojik Olarak Parçalanabilirliği ve PHB'yi Parçalayan Mikroorganizmalar**

PHB'nin en önemli özelliklerinden biri, toprak, insan vücudu vb. yerlerde toksik ürün oluşturmaksızın tamamen biyoparçalanabilir olabilmesidir ve bu özelliği sayesinde, bir kez kullanılıp atılan eşyaların üretiminde büyük avantaj sağlar. Depo materyali olarak poli- $\beta$ -hidroksibütiratı (PHB) üretebilen bakterilerin büyük bir çoğunluğu doğada bulunabilir (toprak, atık çöpler, deniz suyu vb.). PHB bu nedenden dolayı çoğunlukla kolay elde edilebilecek ve aynı zamanda kolayca biyodegrede olabilen bir maddedir [17].

1994 yılında Annon, termoplastik maddelerin toprak mikroorganizmaları ile su ve karbondioksite parçalandığını bildirmiştir, PHB ve kopolimerlerinin anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise, karbondioksit ve metandır [36].

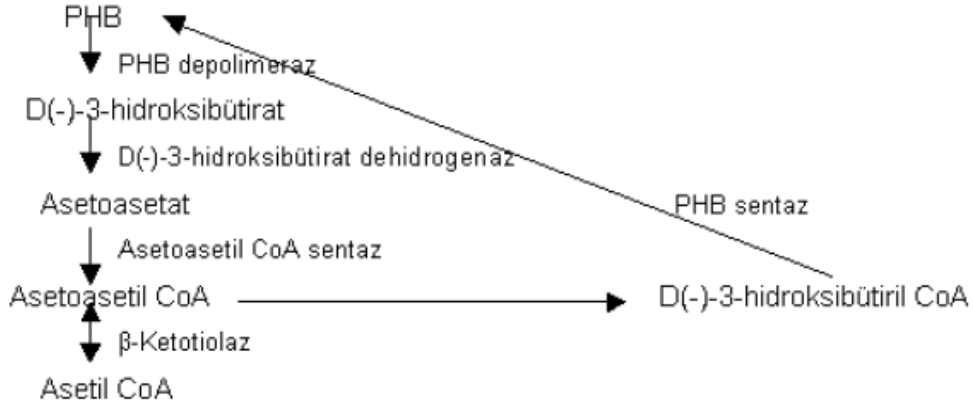
PHB'nin parçalanma süresi bir kaç aydan (anaerobik), bir kaç yıla (denizsuyu) kadar, katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanmada nitrojen oksidi oluşmaması, çevre korunmasında önemlidir. Parçalanan biyoplastik bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir. Polimerin parçalanmasında, bakteri, mantar, ve yüksek organizmalar biyolojik faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon kimyasal faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir [27]. Tamamen parçalanma için gereken zaman ve biyoparçalanma oranının, kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal nüfus gibi etkenlere bağlı olarak değiştii bildirilmiştir [18].

Nguyen ve arkadaşları, PHB, PHV ve P(HB-HV) (polihidroksibütirat-co-hidroksivalerat) kopolimerlerinde, ısıya bağlı (170-200 °C) parçalanmayı araştırdıkları çalışmalarında, reaksiyonun ilk birkaç saatindeki tabakalaşmayı, ısı etkisiyle erimenin takip ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ısı etkisiyle PHB parçalanmasının hızlandığını belirterek, bunun polimerlerin oligomer formlarının krotonat son grupları ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir [38].

Mergaert ve arkadaşları ise, PHB'ın toprakta ve steril tampon çözeltide parçalanmasını araştırdıkları çalışmada, her iki ortamda da moleköl ağırlığının düştüğünü, ancak kütle

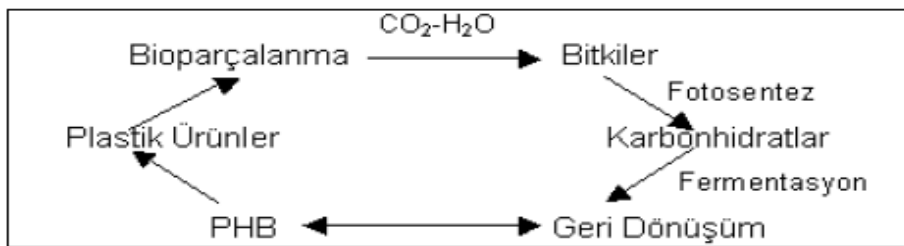
miktarındaki azalmanın sadece toprakta görüldüğünü ve bunun toprak çeşidine bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Buna göre, kütle azalmasındaki en yüksek düzeye killi toprakta ulaşılmıştır. Bazı araştırmacılar da, topraktaki P(HB-HV) biyoparçalanırlık yüzdesinin toprağın çeşidi ve içerdiği su miktarına bağlı olarak değiştiği bildirmektedirler [39].

PHB'ın, karbon ve enerji kaynağı olarak bakteriler tarafından kullanılabilmesi için depolimerize olması gerekmektedir. Depolimerizasyon sonucu oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır [16].



Şekil 6: PHB'nin parçalanması ve yeniden sentezi [18]

PHB'nin biyolojik karakterleri ve biyolojik olarak parçalanabilir olması kadar önemli olan bir başka özellik de onun üretim kaynaklarının yenilenebilir yeteneğine sahip olmasıdır. PHB'nin fermantasyon yoldan üretiminde, şekerler ve yağ asitleri gibi tarım ürünleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılıyor. Bu tarım ürünleri, karbondioksit ve sudan ortaya çıkmış ve biyolojik olarak parçalanabilen PHB'ye dönüştükten sonra da yine CO<sub>2</sub> ve suya parçalanabilir [17]. Bir doğal materyal olan bu polyester bakteriyel orijinlidir ve gerçekten birçok mikroorganizma, bu makromolekülü parçalama yeteneğindedir. Bunun yanı sıra, petrokimyasal termoplastlar gibi, geri dönüştürülebilir bir biyoparçalanma gösterirler [27].



Şekil 7: PHB'nin karbon döngüsü [18]

Savenkova et al. (2000) tarafından yapılan bir araştırmada toprak mikroorganizmalarından PHB parçalayan başlıca mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında en önemli bakteri cinsleri; *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Streptomyces* ve *Trichoderma* sayılabilir [40].

Charles ve arkadaşları, *Rhizobium meliloti*'de PHB'nin parçalanma iz yolunu etkileyen genlerin kromozom ve mega plazmidde yerleştiğini tespit etmişlerdir [41].

### 1.7. PHB'nin Kullanım Alanları

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte, son zamanlardaki en ilginç uygulamalar biyolojik uygunluğu ve maliyetinden dolayı tıp ve eczacılık alanlarındadır. Bu alanlardaki gelişmeler de oldukça ilerlemiş safhadadır [16].

Biyoyumlu olan PHB monomerleri insan vücudunda bulunan doğal metabolit olması nedeniyle, polimer vücutta sadece çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur. Bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü salınımı için test edilmiştir. Böyle çalışmalarda ilaç, PHB'den yapılmış bir hap içine sıkıştırılmış ve ağız yoluyla hastalara verilmiştir. PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. İnsan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB pansuman sargısı, cerrahi dikişler, eldiven, önlük, maske, yapay kan damarları, protezler, ortopedik plaka, çubuk, vida ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır [33].

Kronik osteomyelitis hastalarının tedavisinde biyoparçalanabilir, biyoyum ve kemik geçirgenliğini sağlayan piezoelektrik özellikleri bulunan P(HB-co-HV) kopolimeri kullanılarak, bu kopolimerden hazırlanan kapsüller içine antibiyotik konmuştur. Tavşanın tibia kemiği içine yerleştirilen kapsülün, ilaç salınımının etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, kopolimerin antibiyotik taşıyıcı bir sistem olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir [42].

PHB'nin hastanelerde cerrahi sargılar ve eldivenler içinde bir yağlayıcı madde olarak veya ince toz formunda kullanılması oldukça ilginçtir. Ayrıca biyolojik parçalanabilirliğiyle ilgisi olmaksızın yarada kalabilecek olan bu PHB sargılarındaki fibrillerin, normal sargılardakilerden çok farklı delik yapısına sahip oluşu bir avantaj da sağlar. Yüksek teknolojiyle PHB'nin geleceğe yönelik kullanım alanlarından biri de; uygun ölçülerde su geçirmez bir tüp formunda düzenlenen çok ince fibrillerden meydana gelen kan damarı veya bir vasküler aşı gibi kullanılmasıdır. Bu aşı vücut içinde gelişen yeni dokular için geçici bir yapı iskelesi olarak rol alabilir ve sonuçta doğal dokular tarafından tamamen eski haline gelebilir. Bu, vücudun doğrudan tepkisini alan sentetik damarlardaki engelleme ve pıhtı oluşum problemini tamamen yok eder. PHB ve kopolimerlerinin önemli bir özelliği de polipeptitler, polinükleotitler, polisakkaritler ve proteinler gibi piezoelektrik polimer olmasıdır. PHB ve kopolimerleri polivinilidon, florit polimeri gibi kesikli piezoelektrisite göstermektedir. Poliviniliden florit polimerinin filmleri kemiği elektriksel stimülasyon ile kuvvetlendirebildiği ve kemiğin onarıldığı bilinmektedir. Bu durumda bir kemik kırığını sabitleyen levhalar benzer mekanik özelliklere sahip takviyeli bir PHB karışımından yapılırsa, uyarılan kemik büyür ve

gelişir. Böyle bir kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından bulunduğu yerde yavaşça emilebilir. Bu sırada kemik de kaynar ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir operasyona gerek kalmaz [16, 33].

Metal yapı iskeleleri yerine emilebilen maddelerin kullanılmasının en önemli avantajları, bunların metabolize olabilmeleri, operasyon sonrasında istenmeyen cerrahi değişimlerin engellenmesi ve oluşan damarların iskeletin sağlanabilmesidir. Ayrıca yapı iskelelerinin emilmesi sayesinde, ilaç serbestleştirici farmakolojik ajanların vücuda dahil edilmesi mümkün olur [43].

Veteriner hekimliğinde ilaçların salınımı için biyolojik parçalanabilen bir matriks olarak PHB'nin birçok kullanım alanı vardır. Polimer özellikle sığırların rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir. Bu konuda çok tipik bir örnek olarak bir yıl boyunca hayvanların kurtlanmasını önlemek için antihelmitik ilaç içeren PHB'nin büyük kapsülleri yapılarak onların parazitlenmesini engellemişlerdir [16].

PHB'nin ziraattede çeşitli kullanım alanları vardır ve özellikle toprakta biyoparçalanma gerektiren uygulamalar için çok uygundur. Örneğin, ekin sulaması için PHA'lardan yapılacak oluklar kullanılabilir. Bu durumda hasat mevsiminin sonunda bunların tarladan toplanması gerekmeyecektir. Ayrıca bunlar tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre ya da pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak kullanılabilir [33].

PHB bazı kimyasalların eldesinde de kullanılmaktadır. (R)-(-)-hidroksi karboksilik asitler, büyük oranda antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve feromonlar gibi ince kimyasalların sentezi için kiral yapı blokları olarak kullanılabilirler [44].

PHB endüstriyel alanda, kalıp yapımı, sıkıştırılmış film ve bazı fibrillerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Yapılan paket filmleri mükemmel bir gaz bariyeri özelliğindedir. 25 µm kalınlığındaki bir PHB filmi  $45 \text{ cm}^3/\text{m}^2/\text{gün}$ 'lük bir oksijen geçirgenliğine sahiptir. Düşük olan bu oksijen geçirgenliğinden dolayı gıda maddelerinin paketlenmesinde PHB filmleri rahatlıkla kullanılabilir. Bu PHB filmleri polipropilen filmleri kadar güçlüdür, fakat poli-etileter fitalat kadar dayanıklı değildir. Oysa cam takviyeli PHB kalıpları naylon benzerlerine göre daha sert ve dayanıklıdır. Fakat bunların da sıcaklığa dayanıklılığı mühendislik açısından iyi değildir. Ancak birçok plastik, cam-fiber dolgusu ilavesiyle kuvvetlendirilebilmiştir. PHB gaz bariyer özelliğinden dolayı, film şeklinde kaplamacılıkta kullanılmıştır. Kanada'daki Hamur ve Kağıt Araştırma Enstitüsü, Montreal'deki Mc Gill Üniversitesi ile PHA laktik üreten bir firma olan Ecole Politeknik ve Imperial Kimya Şirketi arasındaki ortak bir projeye PHB, kaplanmış kağıt ve yüksek kalitede film yapmak için

kullanılmıştır. Bu kaplanmış kağıtlar tamamen biyolojik olarak parçalanabilmektedir ve ticari olarak, kaplanmış kağıtlarda geri dönüşüm daha kolay olmuştur [45].

PHB poşet, torba, tek kullanımlık çocuk bezi, jilet, çatal, bıçak, tabak, mutfak kapları, şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamalarının yapımında da kullanılmıştır [17].

Ayrıca, taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı koruma veya parlaklık sağlama, aroma kaybını önleme amacıyla da PHB kullanılmıştır [18].

### **1.8. PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar ve PHB'nin Ucuz Üretimi**

PHB üretebilen mikroorganizmalar tabiatta doğal olarak bulunmaktadır. Çeşitli araştırmacılar PHB'nin genellikle toprak mikroorganizmaları tarafından üretildiğini belirtmişlerdir. Toprak mikroorganizmaları için uygun ortam sağlandığında PHB'nin üretim miktarının arttığı ve biyopolimere sahip mikroorganizmaların daha dirençli oldukları bildirilmiştir [17].

PHB ve çeşitli PHA'ların üretimi için kullanılan substratlar özellikle karbon kaynağı açısından bakıldığında, glukoz, sükroz ve yağ asitleri ile alkanlar ve kloroalkanoik asitler gibi kimyasal bileşenlerdir. Ayrıca, bütirik ve pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit, L-Laktat gibi karbon kaynakları kullanımı da denenmiştir [16].

PHB üretiminin ticari üretimini ve pazarlanmasını sınırlandıran başlıca faktörlerden biri üretimde kullanılan karbon substratının özellikle de şeker substratının fiyatıdır [15].

Hanzlikova (1985), toprak mikroorganizmaları ile yaptığı araştırmada glukoz içeren ve içermeyen besi ortamlarında geliştirilen bakterilerin glukoz içermeyen besi ortamında 1.56-2.64 µg PHB tespit ederken %1 glukoz içeren besi ortamında geliştirilen bakterilerde ise bu oranın 20 kat arttığını belirlemiştir [46].

King (1982), yaptığı çalışmalarda glukozun PHB üretiminde maliyeti artırdığı ve maliyet artışının istenmeyen bir durum olduğu, bunun için daha ucuz karbon kaynakları kullanımının tercih edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, PHB üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz ve sakkaroz kullanıldığında verim oldukça yüksektir. Ama maliyeti düşürmek için C<sub>1</sub> bileşikleri (metanol, metan), C<sub>2</sub> bileşikleri (asetik asit, etanol) ve C<sub>4</sub> bileşikleri (Bütirik asit) kullanılır. Ayrıca sakkaroz kullanarak yapılan üretimin en ucuz olduğu da belirtilmiştir [47].



Ekonomik biyoplastik üretimi için melas, ksiloz, arpa ve soya atık suları ve peynir altı suyunun kullanılması araştırılmaktadır. Özellikle melas, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Ucuz karbon kaynakları ve hatta peyniraltı suyu gibi atıklardan PHB üretimi yapılarak verimin artırılması amaçlanmaktadır [15].

### 1.9. PHB Üreten Canlılar

Bitkiler birer PHB üreticisi olmamalarına karşın, PHB genlerinin taşıyıcısı olabildiklerinden, PHB üretebildikleri ve bu nedenle, transgenik bitkilerin çok miktarda ve ucuz PHB üretimi için potansiyel organizmalar olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda bunlardan, kuru ağırlıklarının %20-40 arasında PHB elde edilebilmiştir [35].

*Alcaligenes eutrophus*'tan alınan PHB genleri, mısır, patates gibi birkaç farklı bitkiye aktararak, onların polimer üretmesi sağlanabildiği ve Imperial Kimya Şirketi'nin pilot uygulamalarında yılda 50 ton PHB-HV kopolimerinin elde edilebildiği bildirilmiştir [48].

Prokaryotik mikroorganizmaların geniş bir kısmı tarafından sentez edilebilen PHB, toprak, deniz ve tatlısu, bunların sedimentleri gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, çok sayıda heterotrofik ve ototrofik aerobik, fotosentetik anaerobik bakteriler, Actinomycetesler, Cyanobakteriler, anaerobik, yağ asidi okside eden bakteriler, gram negatif ve gram pozitif bakteriler tarafından depolanabilmektedir. PHB, özellikle *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* ve çeşitli toprak mikroorganizmaları gibi bir çok mikroorganizma tarafından oluşturulur[16].

Yapılan çalışmalarda, endüstriyel PHB üretiminde en fazla kullanılan bakteri olan *Alcaligenes eutrophus*'un, fruktozu karbon kaynağı olarak kullanarak hücre kuru ağırlığının % 80'inden fazlasını PHB olarak biriktirebildiği [27] ve *Alcaligenes eutrophus*'un glukozu kullanabilen mutantlarının da PHB üretiminde kullanılabileceği bildirilmektedir. *Alcaligenes latus* gibi bu cinse ait diğer türler de birçok karbon kaynağını kullanarak yüksek PHB verimi sağlarlar. Ortamdaki C/N oranının artışının polimer sentezini kolaylaştırması nedeniyle, *Alcaligenes* türlerinde PHB üretiminin kinetiğinde büyüme fazını takiben, azot kaynağının sınırlı hale getirilmesinin oldukça belirgin bir depo fazı oluşturduğu rapor edilmiştir [45].

Borman ve arkadaşları, *Azotobacter beyerinckii* bakterisinin kazein pepton, maya özütü, kasamino asit ve üre gibi organik azot kaynaklarının glukoz veya sükröz gibi karbon kaynaklarıyla kombine edildiğinde, azot sınırlamasına gerek kalmadan %50'den fazla PHB üretebileceğini bildirmişlerdir. PHB'nin büyüme ilişkili şartlardan etkilendiğini ve özellikle

kazein pepton içeren besiyerinde büyümenin durgun fazında en yüksek PHB üretim değerine ulaştığını söylemişlerdir. Çalışmada, oksijeni sınırlandırılmış şartlarda PHB üretiminin arttığı da vurgulanmıştır [49].

Farklı *Azotobacter* türlerinin PHB verimi üzerine yapılan çalışmalardan birinde, *A. vinelandii* UWD suşunun glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz gibi rafine karbon kaynakları ile şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, mısır şurubu, malt ekstraktı gibi kompleks karbon kaynaklarında yüksek PHB verimi elde edildiği bildirilmiştir [50].

Çeşitli araştırmacılar, biyoplastik üretiminde *Bacillus* biyopolimerlerinin potansiyel gelecek uygulamalar için kullanılabilceğini bildirmektedirler. Ayrıca, *Bacillus*'ların melas gibi ucuz substratlarda hızlı bir şekilde büyüdükleri; yüksek sıcaklık ve yüksek osmotik basınca dayanıklı oldukları ancak, hücre duvarı yapılarının kalın oluşu nedeniyle PHB ekstraksiyonu zor olduğu bildirilmiştir. Yine de avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB üretimi yapmak için uygun suşların tespiti araştırmaları devam etmektedir [16].

Yapılan araştırmalarda bazı *Bacillus* suşlarının hücre kuru ağırlığının %50 den fazlasını PHB şeklinde biriktirebildiği bildirilmektedir [16].

Mercan ve Beyatlı, yaptıkları çalışmada 10 adet *Bacillus sphaericus* suşunun PHB üretimlerini araştırmışlardır. *Bacillus sphaericus* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretim miktarlarını % 5,0- % 25,88 arasında bulmuşlardır. PHB üretimi yüksek olan *Bacillus sphaericus* ATCC 12300, ATCC 7055, 34-2 VE 1404 nolu suşlarının farklı beef extract ve sodyum asetat konsantrasyonlarında PHB üretimleri incelenmiş; % 2 beef extract konsantrasyonunda ATCC 7055, ATCC 12300 VE 34-2 suşlarının hücre kuru ağırlıklarının sırasıyla % 32,50, % 31,64, % 30,63'ünün PHB olduğu bulunmuştur [51].

Metilotrofik organizmalardan olan bazı *Pseudomas*'ların da PHB üretimi araştırılmış ve yüksek verim görülmüştür. *Ps. oleovorans*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* ve *Ps. testotereni*, n-alkoller ve n-alkanoik asitler kullanılarak PHB üretimi gözlenmiştir. Karaboz ve Umay, *Ps. extorquens* bakterisini metanol içeren karbon kaynağında ürettiklerinde % 27 PHB üretimi saptamışlardır [52].

Ateş ve Ekmekçi, substrat olarak pancar melası kullanılan ortamlarda batık kültür fermentasyonu yöntemiyle, *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'in PHB üretimlerini incelemişlerdir. Her bir organizma için farklı şeker konsantrasyonları, çalkalama hızları (havalandırma) ve inkübasyon sürelerinin PHB üretimine etkileri araştırılmıştır. Optimum koşullarda hem sakarozlu, mineral ortam hem de melaslı mineral ortamda PHB üretim verimi karşılaştırılmıştır. Optimum koşullarda PHB üretim verimi

pancar melaslı mineral ortamda *Pseudomonas extorquens* DSM 1337'de %22,98 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'de % 12,10 olarak bulunmuştur. Bununla beraber en iyi PHB üretimi, sakarozlu mineral ortamda saptanmıştır [53].

Gomez ve arkadaşları, toprak gram negatif bakterilerinin şeker kamışı türevli şekerler olan sükroz, fruktoz ve glukoz ile propiyonik asitten PHB üretimini incelemişler ve %50-80 arasında verime ulaşmışlardır [54].

Tal ve Okon, *Azospirillum brasiliense* Cd suşunun, eksponansiyel fazın son aşamasında, yüksek C/N oranında, oksijen sınırlandırıldığında %5 olan PHB veriminin, %40'a ulaştığını bildirmişlerdir [55].

Brandl ve arkadaşları, fotosentetik bakteriler olan *Rhodospirillum* ve *Rhodobacter* cinsleri üzerinde yaptıkları araştırmalarda bunların da n-alkanoik asitlerden polimer depo ettiğini, ayrıca nitrojenin sınırlandırılması durumunda %PHB veriminin hücre kuru ağırlığının %60-%70'i kadar olabildiğini bildirmişlerdir [56].

Lillo ve Rodriguez-Valera, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan halofilik bakterilerden olan *Halobacter mediterranei*'nin, karbon kaynağı olarak glukoz ve nişasta kullanıldığında, fosfatı sınırlandırılmış şartlar altında %60 PHB verimi elde edildiğini bildirmişlerdir[57].

Uğur ve arkadaşları, 27 adet *Streptomyces* izolatının % 80'inin PHB'yi % 0,3-7,6 oranında sentezlediğini tespit etmişlerdir [58].

Lee ve arkadaşları, *E.coli*'de PHB üretimi için, *A. eutrophus* PHB sentez genleri taşıyan plazmidler kullanmışlar ve plazmid stabilitesinin yüksek olduğunu belirttikleri çalışmalarında, PHB veriminin %80'e ulaştığını bildirmişlerdir [44].

Bitkide nodül oluşturan toprak bakterilerinden olan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de hücre içi PHB depo etme yeteneği birçok araştırmaya konu olmuştur. *Rhizobium* cinsi bakterilerin, gram negatif, spor oluşturmayan, çubuk formunda, pleomorfik yapıda hücreler olduğu bilinmektedir. Genel olarak hareketli olan bu bakteriler, bir veya birden fazla flagella ihtiva etmektedirler. Karbonhidrat içeren besi ortamlarında gelişme sırasında akışkan, zamlı maddeler salgılamaktadırlar. Koloniler yuvarlak ve opak. Hızlı gelişen *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* dışında günümüzde *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Photorhizobium*, *Mesorhizobium* olmak üzere dört cins daha tanımlanmıştır. Bu bakterilerin en önemli özelliklerinden biri baklagil bitkileri ile simbiyotik ilişki sonucunda azotu fiske edebilmeleridir. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* cinslerine ait birçok tür, serbest hücrede ve

simbiyosiste PHB depolamaktadırlar. PHB'nin bu bakterilerde nitrojen fiksasyonunda enerji kaynağı olduğu düşünülmektedir [59].

Mercan, yapmış olduğu doktora çalışmasında, *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium viciae* ve *Rhizobium sp.* türlerine ait toplam 31 adet suş kullanmıştır. Bakterilerin PHB üretimlerinin hücre kuru ağırlıklarına göre % 5,37-% 57, 09 arasında değiştiğini tespit etmiştir. Maksimum PHB üretimi gösteren *Rhizobium viciae* F111 (% 57, 09), *Rhizobium meliloti* Y11 (% 39,25) ve *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab (% 34,43) suşlarının farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretimleri araştırılmıştır. *Rhizobium meliloti* Y11 ve *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab suşları karbon kaynağı olarak glukoz besi ortamında maksimum PHB verimi gösterirken (sırasıyla % 87, 75 ve % 34,31), *Rhizobium viciae* F111 suşu mannitol içeren besiyerlerinde yüksek oranda (% 41,22) PHB üretmiştir. Suşların azot kaynaklarında (F111 dışında) PHB verimlerinin yüksek olmadığı gözlenmiştir. Azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besi ortamında *Rhizobium meliloti* Y11 suşu maksimum % 26,23 ve *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab suşu % 26,78 PHB üretirken *Rhizobium viciae* F111 suşu asparajın azot kaynağında maksimum % 48, 13 oranında PHB üretmiştir [59].

Mercan ve arkadaşları yaptıkları araştırmada bir adet *Rhizobium japonicum*, altı adet *Rhizobium cicer*, sekiz adet *Rhizobium spp.* ve *Bradyrhizobium japonicum* USDA C110 suşunda PHB üretimini incelemişlerdir. Suşların PHB içeriklerini, 0,01- 0,5 g/l ve PHB verimlerini hücre kuru ağırlıklarına göre % 1,36- % 40,0 arasında bulmuşlardır. Şuşlar arasında en yüksek verime sahip olan *Rhizobium spp.* 2426 ile orta verimliliğe sahip olan *Rhizobium spp* 640 suşlarını seçip, farklı karbon ve azot kaynaklarının PHB üretimine etkisini test etmişlerdir. Şuşlar farklı karbon ve azot kaynağı içeren Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyerinde düşük miktarda PHB üretirken, yüksek PHB üretimi L-sistein ve Glisin içeren besi ortamında elde edilmiştir. Bu besi ortamında (L-sistein ve Glisin) *Rhizobium spp.* 640 suşunun % PHB verimi sırasıyla % 13, 40 ve % 56, 67 olarak, aynı azot kaynaklarında bu oranları *Rhizobium spp.* 2426 suşunda sırasıyla % 70, 0 ve % 61,43 olarak tespit etmişlerdir [60].

Bonartseva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, PHB içeriği, nitrogenaz enzimi aktivitesi ile ters, hidrogenaz enzimi aktivitesi ile doğru orantılıdır. Yine, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium galega*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli* gibi farklı türlerle yapılan çalışmalarda da, PHB üretimlerinin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğu bildirilmiştir. Sükroz içeren besiyerinde, farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada, en yüksek PHB veriminin KNO<sub>3</sub>'lü besiyerinde %65 ile *Rhizobium phaseoli*'den elde edildiği bildirilmiştir [61].

Jan ve arkadaşları, *Rhizobium meliloti*'de ortamda karbon kaynağı olduğunda ve gelişme için gerekli nitrojen gibi elementler sınırlı tutulduğunda PHB'in depo edildiğini bildirmişlerdir. Karbon kaynağı tümüyle kullanıldığında ise PHB metabolize edilmektedir. *R. meliloti* fruktozlu ortamda üretildiğinde büyük miktarda PHB depo etmektedir [62].

Bu çalışmada Elazığ ili merkez ve Elazığ ili ilçelerine bağlı köylerden alınan toprak örneklerinden “Bitki İnfeksiyon Metodu” kullanılarak izole edilen doğal *Rhizobium* suşlarının Poli- $\beta$ -hidroksibütirat (PHB) üretim verimleri üzerine farklı çalkalama hızları, farklı şeker konsantrasyonları ve farklı inkübasyon süreleri gibi ortam koşullarının etkileri incelenmiştir.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Materyal

#### 2.1.1. Bakteri Kùltürleri

Araştırmada kontrol suş olarak kullanılan *Rhizobium phaseoli* CIAT 899 bakteri kùltürleri Ankara Toprak ve Gùbre Araştırma Enstitüsü'nden, *Rhizobium phaseoli* türlerine ait suşlar, Yrd Doç. Dr. Seher Gür'den temin edilmiştir. Bu suşlar, Elazığ ili merkez ve Elazığ ili ilçelerine bağlı köylerden 1996 yılında alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir [63].

#### 2.1.2. Besiyerleri

Araştırmada kullanılan *Rhizobium* cinsi bakterilerin Poli-β-hidroksibütirat üretim miktarlarının incelenmesinde, Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) Sıvı Besiyeri kullanılmıştır.

Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) Sıvı Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g/lt</u>
Mannitol	10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
Tripton	2.5
Pepton	2.5
Yeast Ekstrakt	2.5

Maddeler, 1 litre distile su içerisinde çözümlenerek, 0.01 N HCl ve 0.01 N NaOH kullanılarak besiyerinin pH değeri 7'ye ayarlanarak 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir [60].

Katı besiyerinin hazırlanmasında (Yeast Ekstrakt Mannitol Agar) ortama % 2 oranında agar ilave edilmiştir [59].

## 2.2. Metot

### 2.2.1. Suşların İzolasyonu

Araştırmada kullanılan suşların izolasyonu için Elazığ İli Merkez ve Elazığ İli ilçelerine bağlı köylerden alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. Toprak örnekleri, fasülye bitkisinin ekildiği tarlalardan 1996 yılı ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde olmak üzere yılda iki kez alınmıştır. Doğal *Rhizobium phaseoli* populasyonunun belirlenmesinde Strike 308 fasülye tohumları kullanılmıştır. Fasülye tohumları steril pamuk üzerinde çimlendirilmiştir. Çimlendirilen fideler, içerisinde 1/5 oranında sulandırılmış jensen besi solüsyonu ve 1 litersinde 1 ml olacak şekilde iz element çözeltisi içeren kavanozlara yerleştirilmiştir. Araziden getirilmiş olan toprak örnekleri ile  $10^{-6}$ 'ya kadar dilüsyonlar hazırlanıp, bunlardan 10'ar ml kavanozlardaki fideler inoküle edilmiştir. Bitkiler 4 haftalık bir gelişim periyodunun sonunda hasat edilmiştir. Sökülen bitkilerin kökleri sıvı içerisinde olduğundan herhangi bir işlem yapılmadan üzerindeki nodozitelerin sayısı, büyüklüğü, rengi ve dağılımı tespit edilmiştir. Toprak örneklerindeki doğal populasyonun belirlenmesi amacıyla "Bitki İnfeksiyon Metodu" kullanılmıştır. Nodül oluşturan toplam bitki sayısı ile her bir toprak örneğinin 1 gramındaki *Rhizobium* sayısı EMS tablolarından faydalanılarak belirlenmiştir. *Rhizobium* suşlarının izolasyonu için, toprak örnekleriyle aşılama bitkilerinin ana kökleri üzerinde bulunan pembe renkli, sağlıklı nodüller tercih edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılan nodüller küt uçlu bir pens yardımıyla petri kutusunda ezilmiş, elde edilen *Rhizobium* süspansiyonundan YEM besiyeri ihtiva eden iki ayrı petri kutusuna sürme suretiyle aşılama yapılmıştır. 28 °C'de 4-5 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu işlem, saf kültür elde edinceye kadar birkaç kere tekrarlanmıştır [63].

### 2.2.2. Suşların Kültürel Özelliklerinin Tespiti

*Rhizobium phaseoli* suşlarının sabit ve değişken özelliklerini saptamak amacıyla kültürel testler (kolonilerin şekillerinin, renklerinin, büyüklüklerinin tespiti, hareket muayenesi, Bromtimol mavili YEM'de asit oluşturma, katalaz testi, pepton glukoz agarda üreme durumunun tespiti) uygulanmıştır [63].

### 2.2.3. Suşların Muhafaza Edilmesi

YEM agar içeren yatık tüplere, üçer paralelli olarak inoküle edilen izolatlar, 28 °C'de 5 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir [63].

#### **2.2.4. Analitik Ölçüm İçin PHB Metodu**

*Rhizobium phaseoli* suşlarının ürettiği PHB miktarı, Bonartseva ve Myshkina'nın metoduna göre belirlenmiştir [60].

YEM stok kültürden öze ile alınan inokulum içerisinde 50 ml YEM sıvı besiyeri bulunan bir erlene aktararak ön zenginleştirme yapılmıştır. Zenginleştirmenin yapıldığı erlenden, içerisinde 100'er ml YEM sıvı besiyeri bulunan 4 ayrı erlene % 4 oranında kültür aşılantısı yapılmıştır. Erlenler 28 °C'de 48 saat kalmak koşuluyla çalkalamalı etüve (Gerhardt-Laboshake) kaldırılmıştır.

İnkübasyon sonrasında, erlenlerdeki kültürler, darası alınmış olan santrifüj tüplerinin içerisine aktarılmış ve 10.000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj (Sigma 3K 18) edilmiştir. Sıvı kısım (süpernatant) atıldıktan sonra tüplerde kalan pelet, 35 °C'de 24 saat süreyle kurutulmuştur. Daha sonra tüpler tartılarak 100 ml'lik kültürdeki hücre kuru ağırlığı hesaplanmıştır.

Tartım işleminden sonra örnekler, 5 ml distile suyla homojenize edilmiştir. Homojenize örnekler, 2 dakika süreyle ultrasonikasyona (Bandelin UW 2070) tabi tutulmuştur. Bu tüplerdeki örneklerden 2'şer ml alınarak yeni santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 2 ml örneklerin üzerine 2 ml 2N HCl ilave edilip 2 saat süreyle 100 °C'de su banyosuna (Clifton) alınmıştır. Su banyosundan çıkarılan örnekler, 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş, sıvı kısım atıldıktan sonra geriye kalan pelet üzerine 5 ml kloroform eklenip tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra bir gece boyunca 28 °C'de çalkalamalı etüvde bekletilmiştir. Tüpler, ağzıları açıldıktan sonra 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra kloroform kısmından 0,1 ml alınmış ve 40 °'de 15 dakika tutularak kloroform uçurulmuştur. Örneklerin üzerine 5 ml konsantre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilmiş, 100 °C'de su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler, soğuduktan sonra 235 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur.

##### **2.2.4.1. Farklı Çalkalama Hızlarında PHB Verimlerinin Tespiti**

*Rhizobium phaseoli* suşlarının farklı çalkalama hızlarında PHB üretim miktarları tespit edilirken, 50, 100, 150, 200 rpm (devir/dakika)'lık çalkalama hızları kullanılmıştır.

##### **2.2.4.2. Farklı Şeker Konsantrasyonlarında PHB Verimlerinin Tespiti**

*Rhizobium phaseoli* suşlarının farklı şeker konsantrasyonlarında PHB üretim miktarları tespit edilirken; % 0,5, % 1, % 1,5, % 2'lik şeker konsantrasyonları kullanılmıştır.



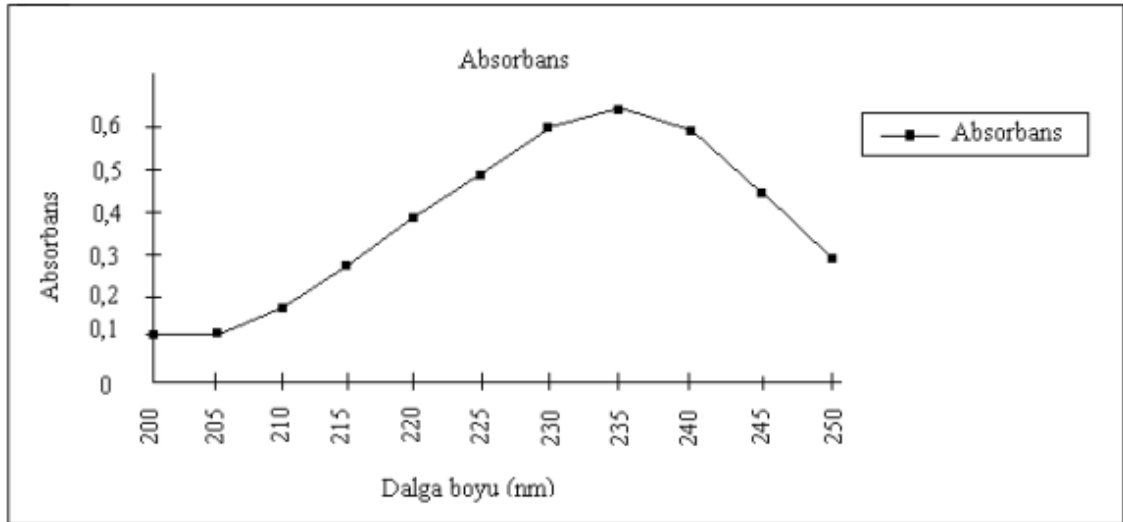
### 2.2.4.3. Farklı İnkübasyon Sürelerinde PHB Verimlerinin Tespiti

*Rhizobium phaseoli* suşlarının farklı inkübasyon sürelerinde PHB üretim miktarları tespit edilirken; 24, 48, 72, 96 saatlik inkübasyon süreleri kullanılmıştır.

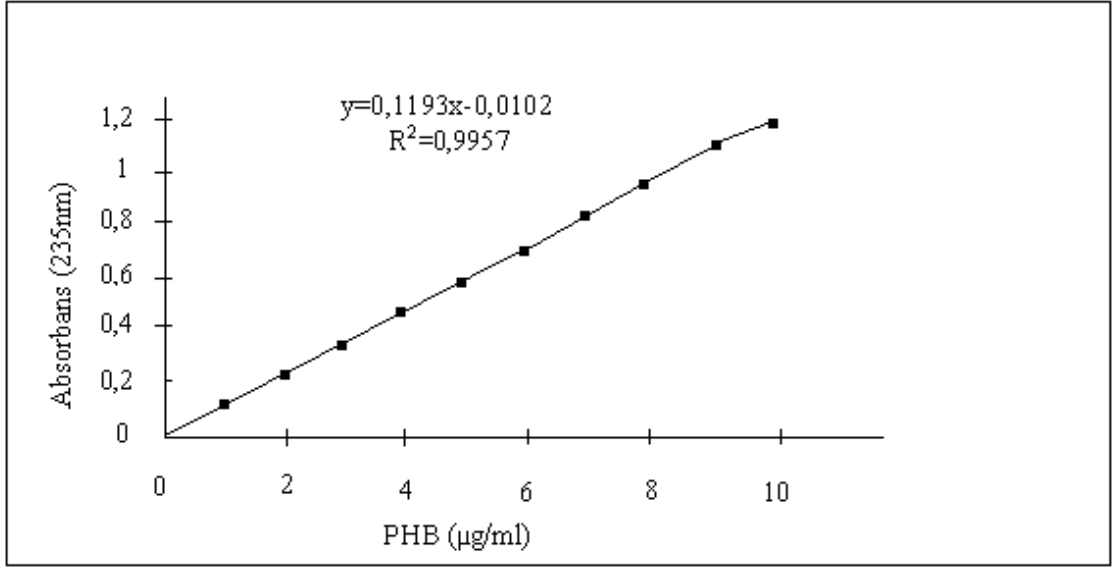
### 2.2.5. PHB'ye Ait Standart Grafiğin Hazırlanması

Standart grafiğin hazırlanması amacıyla Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen saflaştırılmış ve toz haline getirilmiş standart PHB kullanılmıştır. PHB, krotonik asite dönüştürülerek spektrofotometrede absorbens taraması yapılmış ve maksimum absorbens gösterdiği dalga boyunun 235 nm olduğu saptanmıştır.

Standart grafik için PHB'nin; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/ml'lik (sülfirik asit içinde) solüsyonları hazırlanmıştır. Bunlar 100 °C'de 10 dakika ısıtılarak krotonik asite dönüştürülmüştür. Maksimum absorbens gösterdiği dalga boyunda absorbens ölçülerek PHB'nin µg/ml'ye karşılık gelen standart grafiği elde edilmiştir [53].



Şekil 8: Standart PHB'nin krotonik asit formundaki absorbens taraması [53]



Şekil 9: Krotonik asit formundaki standart PHB'nin 235 nm dalga boyunda miktara bağlı (µg/ml) standart grafiği [53]

### 3. SONUÇ VE TARTIŞMA

#### 3.1. Suşların Kültürel Özellikleri

İzole edilen *Rhizobium phaseoli* suşları besiyerinde yuvarlak, kenarları muntazam ve şeffaf koloniler oluşturmuşlardır. Yapılan mikroskopik incelemede suşların gram negatif olduğu görülmüştür. Şuşların hepsi YEM besiyerinde mukoz oluşturmuşlardır. Araştırmada elde edilen tüm *Rhizobium phaseoli* suşlarının hareketli olduğu belirlenmiştir. Brom timol mavili YEM içeren ortamda doğal *Rhizobium phaseoli* suşlarının tümü 36 saat ve 120 saat sonra üreme göstermişler ve asit oluşturmuşlardır. Pepton glukoz agarda da tüm suşların ürediği görülmüştür [63]

#### 3.2. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmada Elazığ yöresi topraklarından izole edilen bazı *Rhizobium phaseoli* suşlarının farklı çalkalama hızlarında, farklı şeker konsantrasyonlarında ve farklı inkübasyon sürelerinde kuru ağırlıkları ve PHB üretim yetenekleri belirlenmiştir. Araştırmada 1 adet kontrol, 4 adet örnek olmak üzere 5 adet *Rhizobium phaseoli* suşu kullanılmıştır.

100'er ml'lik YEM sıvı besiyerinde, 28 °C'de 50, 100, 150, 200 rpm (devir/dakika)'lık çalkalama hızlarında 48 saat; 28 °C'de % 0,5, % 1, % 1,5, % 2'lik şeker konsantrasyonlarında 48 saat; 28 °C 'de 24, 48, 72, 96 saatlik inkübasyon sürelerinde elde edilen kültürler santrifüjlendikten sonra sıvı kısım atılmış ve pelet kurutulmuştur. Daha sonra ise her birinin tek tek kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

**Tablo 3.2.1.** *R phaseoli* suşlarının 50 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,1959	0,1997	0,1981	0,1979	± 0,0019
12F	0,2300	0,2427	0,2413	0,2380	± 0,0063
22F	0,1895	0,1945	0,1911	0,1917	± 0,0025
23F	0,0930	0,0966	0,0981	0,0959	± 0,0025
24F	0,2065	0,2021	0,2090	0,2092	± 0,0034

**Tablo 3.2.2.** *R phaseoli* suşlarının 100 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2004	0,2040	0,2014	0,2019	± 0,0018
12F	0,2456	0,2419	0,2415	0,2430	± 0,0020
22F	0,1923	0,1978	0,1970	0,1957	± 0,0027
23F	0,1008	0,0994	0,0922	0,0978	± 0,0048
24F	0,2114	0,2149	0,2136	0,2133	± 0,0017

**Tablo 3.2.3.** *R phaseoli* suşlarının 150 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,2162	0,2123	0,2246	0,2177	± 0,0061
12F	0,2601	0,2612	0,2656	0,2623	± 0,0027
22F	0,2103	0,2086	0,2159	0,2116	± 0,0036
23F	0,0972	0,1096	0,1091	0,1053	± 0,0062
24F	0,2255	0,2276	0,2372	0,2301	± 0,0060

**Tablo 3.2.4.** *R phaseoli* suşlarının 200 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,2290	0,2320	0,2395	0,2335	± 0,0052
12F	0,2826	0,2792	0,2806	0,2808	± 0,0017
22F	0,2198	0,2287	0,2295	0,2260	± 0,0048
23F	0,1085	0,1157	0,1163	0,1135	± 0,0039
24F	0,2450	0,2472	0,2485	0,2469	± 0,0017

*R. phaseoli* CIAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığı 50 rpm çalkalama hızında en düşük (0,1979 g/l), 200 rpm çalkalama hızında en yüksek (0,2335 g/l) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıkları; 50 rpm çalkalama hızında 0,0959-0,2380 g/l, 100 rpm çalkalama hızında 0,0978-0,2430 g/l, 150 rpm çalkalama hızında 0,1053-0,2623 g/l, 200 rpm çalkalama hızında 0,1135-0,2808 g/l arasında değişiklik göstermiştir.

Çalışılan tüm çalkalama hızlarında 23F kodlu izolatın en düşük hücre kuru ağırlığına, 12F kodlu izolatın ise en yüksek hücre kuru ağırlığına sahip olduğu görülmüştür. Bütün suşların, çalkalama hızlarındaki artışa paralel olarak hücre kuru ağırlıklarında artış görülmüştür.

**Tablo 3.2.5.** *R. phaseoli* suşlarının % 0,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,1688	0,1794	0,1759	0,1747	± 0,0053
12F	0,2203	0,2329	0,2265	0,2267	± 0,0063
22F	0,1816	0,1885	0,1879	0,1879	± 0,0060
23F	0,0701	0,0783	0,0751	0,0745	± 0,0041
24F	0,1957	0,2070	0,1976	0,2001	± 0,0056

**Tablo 3.2.6.** *R. phaseoli* suşlarının % 1'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2004	0,2040	0,2014	0,2019	± 0,0018
12F	0,2456	0,2419	0,2415	0,2430	± 0,0020
22F	0,1923	0,1978	0,1970	0,1957	± 0,0027
23F	0,1008	0,0994	0,0922	0,0978	± 0,0048
24F	0,2114	0,2149	0,2136	0,2133	± 0,0017

**Tablo 3.2.7.** *R phaseoli* suşlarının % 1,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2074	0,2191	0,2143	0,2136	± 0,0058
12F	0,2490	0,2583	0,2565	0,2546	± 0,0046
22F	0,2104	0,2006	0,2019	0,2043	± 0,0049
23F	0,1093	0,1132	0,1162	0,1129	± 0,0034
24F	0,2192	0,2257	0,2295	0,2248	± 0,0051

**Tablo 3.2.8.** *R phaseoli* suşlarının % 2'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2245	0,2178	0,2216	0,2213	± 0,0033
12F	0,2637	0,2593	0,2576	0,2602	± 0,0030
22F	0,2130	0,2038	0,2069	0,2079	± 0,0046
23F	0,1293	0,1220	0,1162	0,1225	± 0,0065
24F	0,2303	0,2398	0,2310	0,2337	± 0,0047

*R.phaseoli* CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığı % 0,5'lik şeker konsantrasyonunda en düşük ( 0,1747 g/l), % 2'lik şeker konsantrasyonunda en yüksek (0,2213 g/l) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıkları; % 0,5'lik şeker konsantrasyonunda 0,0745-0,2267 g/l, % 1'lik şeker konsantrasyonunda 0,0978-0,2430 g/l, % 1,5'lik şeker konsantrasyonunda 0,1129-0,2546 g/l, % 2'lik şeker konsantrasyonunda 0,1225-0,2602 g/l arasında değişiklik göstermektedir.

Çalışılan tüm şeker konsantrasyonlarında 23F kodlu izolatin en düşük hücre kuru ağırlığına, 12F kodlu izolatin ise en yüksek hücre kuru ağırlığına sahip olduğu görülmüştür. % 0,5'lik şeker konsantrasyonlarında hücre kuru ağırlıklarındaki düşüşün nisbeten fazla olduğu görülmüştür. Bütün suşların, şeker konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak hücre kuru ağırlıklarında artış görülmüştür.

**Tablo 3.2.9.** *R. phaseoli* suşlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,00622	0,00637	0,00628	0,00630	± 0,00006
12F	0,00682	0,00693	0,00692	0,00689	± 0,00005
22F	0,00604	0,00616	0,00610	0,00610	± 0,00006
23F	0,00339	0,00335	0,00340	0,00338	± 0,00002
24F	0,00598	0,00608	0,00609	0,00605	± 0,00005

**Tablo 3.2.10.** *R. phaseoli* suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,2004	0,2040	0,2014	0,2019	± 0,0018
12F	0,2456	0,2419	0,2415	0,2430	± 0,0020
22F	0,1923	0,1978	0,1970	0,1957	± 0,0027
23F	0,1008	0,0994	0,0922	0,0978	± 0,0048
24F	0,2114	0,2149	0,2136	0,2133	± 0,0017



**Tablo 3.2.11.** *R phaseoli* suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	3,2698	3,2712	3,2645	3,2685	± 0,0033
12F	3, 9736	3,9716	3,9794	3,9782	± 0,0039
22F	3,1377	3,1445	3,1462	3, 1428	± 0,0042
23F	1,5525	1,5502	1,5531	1,5486	± 0,0022
24F	3,5201	3,5277	3,5269	3,5249	± 0,0038

**Tablo 3.2.12.** *R phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	3,2927	3,2995	3,2988	3,2790	± 0,0034
12F	4,0101	4,0137	4,0146	4,0128	± 0,0022
22F	3,1678	3,1745	3,1713	3, 1712	± 0,0033
23F	1,6009	16017	1,5986	1,6002	± 0,0015
24F	3,6201	3,6255	3,6161	3,6201	± 0,0047

*R.phaseoli* CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığı 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda en düşük (0,00630 g/l), 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek (3,2790 g/l) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıkları; 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0,00338-0,00689 g/l, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0,0978-0,2430 g/l, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1,5486-3,9782 g/l, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1,6002-4,0128 g/l arasında değişiklik göstermiştir.

Çalışılan tüm inkübasyon sürelerinde 23F kodlu izolatın en düşük hücre kuru ağırlığına, 12F kodlu izolatın ise en yüksek hücre kuru ağırlığına sahip olduğu görülmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıkları oldukça düşük olarak bulunurken, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre kuru ağırlıklarında belirgin bir artış görülmüştür. 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen hücre kuru ağırlıklarına yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklı inkübasyon sürelerinin hücre kuru ağırlıklarının artışında büyük bir etkisinin olduğu görülmüştür.

Mercan [59], yapmış olduğu doktora çalışmasında, *Rhizobium* cinsi bakterileri kullanmıştır. *R. phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarını 0,095-0,260 g/l, *R. leguminosarum* suşlarında ise 0,155-0,470 g/l olarak bulmuştur. *R. phaseoli* suşlarında bulunduğu maksimum ve minimum hücre kuru ağırlıkları, çalışmamız ile uygunluk göstermektedir.

Mercan ve arkadaşları [60], *Rhizobium* cinsi bakterilerle yaptıkları çalışmalarında hücre kuru ağırlıklarını 0,11-4,35 g/l arasında bulmuşlardır. *Rhizobium* spp.2426 kodlu bakteri 0,20 g/l, *Rhizobium* spp.G49 kodlu bakteri 0,36 g/l, *Rhizobium* spp.2357 kodlu bakteri, 0,58 g/l hücre kuru ağırlığına sahip olarak bulunmuştur.

Uruç [64], yapmış olduğu yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium* cinsi bakterileri kullanmıştır. *R. phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarını 0,0982-0,2424 g/l olarak bulmuştur. *R. leguminosarum* suşlarında ise hücre kuru ağırlıklarını 0,2544-0,4424g/l arasında bulmuştur. *R. phaseoli* suşlarında bulunduğu maksimum ve minimum hücre kuru ağırlıkları, çalışmamız ile uygunluk göstermektedir.

Ateş ve Ekmekçi [53] yapmış oldukları çalışmada, *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'in PHB üretimlerini incelemişler ve her bir organizma için farklı çalkalama hızlarının, farklı şeker konsantrasyonlarının ve farklı inkübasyon sürelerinin etkilerini araştırmışlardır. Farklı çalkalama hızlarının PHB üretiminde etkisi araştırılırken, her iki bakteri türünün hücre kuru ağırlıklarında belirgin bir değişim görülmemiştir. Farklı şeker konsantrasyonlarının PHB üretiminde etkisi çalışılırken, *P. extorquens* DSM 1337'de en yüksek hücre kuru ağırlığı % 2'lik şeker konsantrasyonunda 22,24 mg, *A. chroococcum* (TEM)'de en yüksek hücre kuru ağırlığı % 3,5'lik şeker konsantrasyonunda 67,11 mg olarak bulunmuştur. Farklı inkübasyon sürelerinin PHB üretiminde etkisi çalışılırken, *P. extorquens* DSM 1337'de 32. saatin sonunda en yüksek değer olan 27,92 mg'a, *A. chroococcum* (TEM)'de 28. saatin sonunda en yüksek değer olan 58, 13 mg'a ulaşılmıştır. Ateş ve Ekmekçi'nin yapmış oldukları çalışmada farklı çalkalama hızlarıyla farklı şeker konsantrasyonlarının, hücre kuru ağırlığının değişiminde büyük bir etkisinin olmadığı görülürken, farklı inkübasyon sürelerinin, hücre kuru

ağırlığının değişiminde, belirgin bir etkisinin olduğu görülmüştür. Bu durum çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Beyatlı ve Mercan [51] 10 adet *Bacillus sphaericus* suşunun PHB üretimlerini tespit etmişlerdir. . Suşların PHB üretimleri tespit edildikten sonra, en yüksek verimi gösteren 4 suşun farklı karbon kaynaklarında bakterilerin PHB üretimleri incelenmiştir. *Bacillus sphaericus* ATCC 12300 suşunun % 0,2, % 0,5, % 1'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında 0,335 g/l, *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 suşunun % 1'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında 0,560 g/l, *Bacillus sphaericus* 34-2 suşunun, % 0,2'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında 0,480 g/l, *Bacillus sphaericus* 1404 suşunun % 1'lik beef ekstrakt içern besi ortamında 0,605 g/l maksimum hücre kuru ağırlığına ulaştığı görülmüştür. *Bacillus sphaericus* ATCC 12300 suşunun % 0,2, % 0,5, % 1'lik sodyum asetat içeren besi ortamında 0,290 g/l, *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 suşunun % 2'lik sodyum asetat içeren besi ortamında 0,365 g/l, *Bacillus sphaericus* 34-2 suşunun, % 0,2'lik sodyum asetat içeren besi ortamında 0,740 g/l, *Bacillus sphaericus* 1404 suşunun % 0,2'lik sodyum asetat içern besi ortamında 0,455 g/l maksimum hücre kuru ağırlığına ulaştığı görülmüştür.

Saadettin ve arkadaşları [65], yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus* cinsine ait *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *Bacillus* spp. bakterilerinin PHB üretimlerini tespit etmişlerdir. Çalışılan 23 adet *Bacillus* suşunun hücre kuru ağırlıkları 0,15-2,67 g/l olarak bulunmuştur. Daha sonra en yüksek verimi gösteren 3 *Bacillus* suşunun Farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretimleri incelenmiştir. *B. sphaericus* NRS 592 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı 0,22 g/l, *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği sakkaroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı 0,61 g/l, *B. licheniformis* ATCC 10716 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği proteaz pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı 0,16 g/l olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar daha sonra bu 3 *Bacillus* suşunun, UV ve akriflavin ile elde edilen mutant suşlarında PHB üretimini incelemişlerdir. *B.sphaericus* NRS 592 suşundan 80 µg akriflavin ile elde edilen mutant Y7 suşunun hücre kuru ağırlığını 0,14 g/l, *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan 100 µg akriflavin ile elde edilen mutant Z4 suşunun hücre kuru ağırlığını 0,36 g/l, *B. licheniformis* ATCC 10716 suşundan 8 dakika UV ile elde edilen mutant M6 suşunun hücre kuru ağırlığını 0,50 g/l olarak bulunmuştur.

### 3.3. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi

Hücre kuru ağırlıkları tespit edildikten sonra ultrasonikasyon işlemleri ile PHB elde edilmiştir. PHB, sülfirik asit ile krotonik asite dönüştürülmüş, son maddenin miktarı, 235 nm. UV spektrofotometrede ölçülmüştür.

**Tablo 3.3.13.** *R phaseoli* suşlarının 50 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,0449	0,0452	0,0461	0,0454	± 0,0006
12F	0,0401	0,0399	0,0412	0,0404	± 0,0006
22F	0,0382	0,0384	0,0389	0,0385	± 0,0003
23F	0,0236	0,0244	0,0246	0,0242	± 0,0005
24F	0,0529	0,0536	0,0528	0,0531	± 0,0004

**Tablo 3.3.14.** *R phaseoli* suşlarının 100 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,0470	0,0458	0,0468	0,0464	± 0,0006
12F	0,0409	0,0420	0,0419	0,0416	± 0,0005
22F	0,0396	0,0394	0,0398	0,0396	± 0,0002
23F	0,0242	0,0252	0,0246	0,0246	± 0,0005
24F	0,0550	0,0554	0,0558	0,0554	± 0,0004

**Tablo 3.3.15.** *R phaseoli* suşlarının 150 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,0491	0,0492	0,0490	0,0491	± 0,0001
12F	0,0449	0,0438	0,0439	0,0442	± 0,0005
22F	0,0431	0,0429	0,0427	0,0429	± 0,0002
23F	0,0259	0,0266	0,0264	0,0263	± 0,0003
24F	0,0594	0,0598	0,0593	0,0595	± 0,0002

**Tablo 3.3.16.** *R phaseoli* suşlarının 200 rpm çalkalama hızındaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,0546	0,0537	0,0534	0,0539	± 0,0006
12F	0,0472	0,0472	0,0478	0,0474	± 0,0003
22F	0,0462	0,0452	0,0463	0,0459	± 0,0005
23F	0,0332	0,0330	0,0337	0,0333	± 0,0003
24F	0,0654	0,0659	0,0650	0,0651	± 0,0004

*R.phaseoli* CIAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 50 rpm çalkalama hızında en düşük (0,0454 g/l), 200 rpm çalkalama hızında en yüksek (0,0539 g/l) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimi; 50 rpm çalkalama hızında 0,0242-0,0531 g/l, 100 rpm çalkalama hızında 0,0246-0,0554 g/l, 150 rpm çalkalama hızında 0,0263-0,0595 g/l, 200 rpm çalkalama hızında 0,0333-0,0651 g/l arasında değişiklik göstermiştir.

Çalışılan tüm çalkalama hızlarında 23F kodlu izolatin en düşük PHB üretimine, 24F kodlu izolatin ise en yüksek PHB üretimine sahip olduğu görülmüştür.

**Tablo 3.3.17.** *R. phaseoli* suşlarının % 0,5'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,0418	0,0429	0,0422	0,0423	± 0,0005
12F	0,0359	0,0368	0,0365	0,0364	± 0,0004
22F	0,0377	0,0375	0,0373	0,0375	± 0,0002
23F	0,0199	0,0198	0,0201	0,0199	± 0,0001
24F	0,0512	0,0525	0,0517	0,0518	± 0,0006

**Tablo 3.3.18.** *R. phaseoli* suşlarının % 1'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,0470	0,0458	0,0468	0,0464	± 0,0006
12F	0,0409	0,0420	0,0419	0,0416	± 0,0005
22F	0,0396	0,0394	0,0398	0,0396	± 0,0002
23F	0,0242	0,0252	0,0246	0,0246	± 0,0005
24F	0,0550	0,0554	0,0558	0,0554	± 0,0004

**Tablo 3.3.19.** *R. phaseoli* suşlarının % 1,5'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,0467	0,0480	0,0469	0,0472	± 0,0006
12F	0,0483	0,0496	0,0491	0,0490	± 0,0006
22F	0,0415	0,0422	0,0423	0,0420	± 0,0004
23F	0,0272	0,0267	0,0274	0,0271	± 0,0003
24F	0,0562	0,0568	0,0557	0,0562	± 0,0005

**Tablo 3.3.20.** *R. phaseoli* suşlarının % 2'lik şeker konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,0512	0,0505	0,0507	0,0508	± 0,0003
12F	0,0502	0,0511	0,0505	0,0506	± 0,0004
22F	0,0413	0,0422	0,0425	0,0420	± 0,0006
23F	0,0286	0,0294	0,0293	0,0291	± 0,0004
24F	0,0579	0,0570	0,0573	0,0574	± 0,0004

*R. phaseoli* CIAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi % 0,5'lik şeker konsantrasyonunda en düşük (0,0423 g/l), % 2'lik şeker konsantrasyonunda en yüksek (0,0508 g/l) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimi; % 0,5'lik şeker konsantrasyonunda 0,0199-0,0518 g/l, % 1'lik şeker konsantrasyonunda 0,0246-0,0554 g/l, % 1,5'lik şeker konsantrasyonunda 0,0271-0,0562 g/l, % 2'lik şeker konsantrasyonunda 0,0291-0,0574 g/l arasında değişiklik göstermiştir.

Çalışılan tüm şeker konsantrasyonlarında 23F kodlu izolatın en düşük PHB üretimine, 24F kodlu izolatın ise en yüksek PHB üretimine sahip olduğu görülmüştür. 22F kodlu izolatta %1,5'lik ve %2'lik şeker konsantrasyonlarında PHB üretimi aynı bulunmuştur.

**Tablo 3.3.21.** *R phaseoli* suşlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,00029	0,00024	0,00025	0,00026	± 0,00002
12F	0,00018	0,00014	0,00019	0,00017	± 0,00002
22F	0,00021	0,00021	0,00024	0,00021	± 0,00003
23F	0,00017	0,00016	0,00018	0,00017	± 0,00001
24F	0,00037	0,00036	0,00026	0,00033	± 0,00005

**Tablo 3.3.22.** *R phaseoli* suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,0470	0,0458	0,0468	0,0464	± 0,0006
12F	0,0409	0,0420	0,0419	0,0416	± 0,0005
22F	0,0396	0,0394	0,0398	0,0396	± 0,0002
23F	0,0242	0,0252	0,0246	0,0246	± 0,0005
24F	0,0550	0,0554	0,0558	0,0554	± 0,0004



**Tablo 3.3.23.** *R. phaseoli* suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,9535	0,9538	0,9547	0,9540	± 0,0006
12F	0,9633	0,9641	0,9643	0,9639	± 0,0005
22F	0,8394	0,8399	0,8398	0,8397	± 0,0002
23F	0,4642	0,4653	0,4655	0,4650	± 0,0006
24F	1,0291	1,0293	1,0283	1,0289	± 0,0005

**Tablo 3.3.24.** *R. phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,9691	0,9704	0,9702	0,9699	± 0,0006
12F	1,0358	1,0350	1,0351	1,0353	± 0,0004
22F	0,8653	0,8657	0,8652	0,8654	± 0,0002
23F	0,4851	0,4863	0,4860	0,4858	± 0,0006
24F	1,1274	1,1282	1,1284	1,1280	± 0,0005

*R. phaseoli* CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda en düşük (0,00026 g/l), 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek (0,9699 g/l) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimi; 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0,00017-0,00033 g/l, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0,0246-0,0554 g/l, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0,4650-1,0289 g/l, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda 0,4858-1,1280 g/l arasında değişiklik göstermiştir.

Çalışılan tüm inkübasyon sürelerinde 23F kodlu izolatın en düşük PHB üretimine, 24F kodlu izolatın ise en yüksek PHB üretimine sahip olduğu görülmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda PHB üretimleri oldukça düşük olarak bulunurken, 48 ve 72 saatlik inkübasyon

süreleri sonunda PHB üretimlerinde belirgin bir artış görülmüştür. 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen PHB üretimlerine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu farklı inkübasyon sürelerinin PHB üretimlerinin artışında büyük bir etkisinin olduğu görülmüştür.

Mercan [59], yapmış olduğu doktora çalışmasında, *R. phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0,024-0,060 g/l, *R. leguminosarum* suşlarında ise 0,024-0,106 g/l olarak bulmuştur. *R. phaseoli* suşlarında bulduğu maksimum ve minimum PHB üretimleri, çalışmamız ile uygunluk göstermektedir.

Mercan ve arkadaşları [60], *Rhizobium* cinsi bakterilerle yaptıkları çalışmalarında hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0,01-0,5 g/l arasında bulmuşlardır.

Uruç [64], yapmış olduğu yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium* cinsi bakterileri kullanmıştır. *R. phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0,0248-0,553 g/l olarak bulmuştur. *R. leguminosarum* suşlarında ise hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0,0271-0,0601 g/l arasında bulmuştur. *R. phaseoli* suşlarında bulduğu maksimum ve minimum PHB üretimleri, çalışmamız ile uygunluk göstermektedir.

Ateş ve Ekmekçi [53] yapmış oldukları çalışmada, *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'in PHB üretimlerini incelemişler ve her bir organizma için farklı çalkalama hızlarının, farklı şeker konsantrasyonlarının ve farklı inkübasyon sürelerinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, farklı çalkalama hızlarının PHB üretiminde etkisi araştırılırken, her iki bakteri türünün PHB üretimlerinde belirgin bir değişim görülmemiştir. Farklı şeker konsantrasyonlarının PHB üretiminde etkisi çalışılırken, *P. extorquens* DSM 1337'de en yüksek PHB üretimi % 1,5'lik şeker konsantrasyonunda, *A. chroococcum* (TEM)'de en yüksek PHB üretimi % 1'lik şeker konsantrasyonunda bulunmuştur. Farklı inkübasyon sürelerinin PHB üretiminde etkisi çalışılırken, PHB üretimleri *P. extorquens* DSM 1337'de 32. saatin sonunda, *A. chroococcum* (TEM)'de 28. saatin sonunda en yüksek değere ulaşmıştır. Ateş ve Ekmekçi'nin yapmış oldukları çalışmada farklı çalkalama hızlarıyla farklı şeker konsantrasyonlarının, PHB üretimlerinin değişiminde büyük bir etkisinin olmadığı görülürken, farklı inkübasyon sürelerinin, PHB üretimlerinin değişiminde, belirgin bir etkisinin olduğu görülmüştür. Bu durum çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Beyatlı ve Mercan [51] 10 adet *Bacillus sphaericus* suşunun PHB üretimlerini tespit etmişlerdir. . Suşların PHB üretimleri tespit edildikten sonra, en yüksek verimi gösteren 4 suşun farklı karbon kaynaklarında bakterilerin PHB üretimleri incelenmiştir. *Bacillus sphaericus* ATCC 12300 suşunun % 0,2'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında 0,106 g/l, *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 suşunun % 2'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında 0,143 g/l, *Bacillus*

*sphaericus* 34-2 suşunun, % 0,2'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında 0,147 g/l, *Bacillus sphaericus* 1404 suşunun % 0,2'lik beef ekstrakt içern besi ortamında 0,089 g/l maksimum PHB üretimine ulaştığı görülmüştür. *Bacillus sphaericus* ATCC 12300 suşunun % 0,2'lik sodyum asetat içeren besi ortamında 0,062 g/l, *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 suşunun % 0,5'lik sodyum asetat içeren besi ortamında 0,062 g/l, *Bacillus sphaericus* 34-2 suşunun, % 1'lik sodyum asetat içeren besi ortamında 0,089 g/l, *Bacillus sphaericus* 1404 suşunun % 0,2'lik sodyum asetat içern besi ortamında 0,089 g/l maksimum PHB üretimine ulaştığı görülmüştür.

Saadettin ve arkadaşları [65], yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus* cinsine ait *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *Bacillus* spp. bakterilerinin PHB üretimlerini tespit etmişlerdir. Çalışılan 23 adet *Bacillus* suşunun PHB üretimleri 0,03- 0,31 olarak bulunmuştur. Daha sonra en yüksek verimi gösteren 3 *Bacillus* suşunun farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretimleri incelenmiştir. *B. sphaericus* NRS 592 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği glisin içeren besi ortamında PHB üretimi 0,08 g/l, *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği sakkaroz içeren besi ortamında PHB üretimi 0,33 g/l, *B. licheniformis* ATCC 10716 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği proteaz pepton içeren besi ortamında PHB üretimi 0,06 g/l olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar daha sonra bu 3 *Bacillus* suşunun, UV ve akriflavin ile elde edilen mutant suşlarında PHB üretimini incelemişlerdir. *B.sphaericus* NRS 592 suşundan 80 µg akriflavin ile elde edilen mutant Y7 suşunun PHB üretimi 0,09 g/l, *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan 100 µg akriflavin ile elde edilen mutant Z4 suşunun PHB üretimi 0,16 g/l, *B. licheniformis* ATCC 10716 suşundan 8 dakika UV ile elde edilen mutant M6 suşunun PHB üretimi 0,18 g/l olarak bulunmuştur.

### **3.4. PHB Verimlerinin Belirlenmesi**

Suşların PHB üretimleri tespit edildikten sonra elde edilen değerler kullanılarak PHB verimleri hesaplanmıştır.

**Tablo 3.4.25.** *R phaseoli* suşlarının 50 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

<b>Suş kodu</b>	<b>Kuru ağırlık (g/l)</b>	<b>PHB üretimi (g/l)</b>	<b>% PHB</b>
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,1979	0,0454	22,96
12F	0,2380	0,0404	17,00
22F	0,1917	0,0385	20,12
23F	0,0959	0,0242	25,33
24F	0,2092	0,0531	25,42

**Tablo 3.4.26.** *R phaseoli* suşlarının 100 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

<b>Suş kodu</b>	<b>Kuru ağırlık (g/l)</b>	<b>PHB üretimi (g/l)</b>	<b>% PHB</b>
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,2019	0,0464	23,00
12F	0,2340	0,0416	17,15
22F	0,1957	0,0396	20,28
23F	0,0978	0,0246	25,18
24F	0,2133	0,0554	26,00

**Tablo 3.4.27.** *R. phaseoli* suşlarının 150 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2177	0,0491	22,58
12F	0,2623	0,0442	16,88
22F	0,2116	0,0429	20,29
23F	0,1053	0,0263	25,03
24F	0,2301	0,0595	25,90

**Tablo 3.4.28.** *R. phaseoli* suşlarının 200 rpm çalkalama hızındaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2335	0,0539	23,10
12F	0,2808	0,0474	16,90
22F	0,2260	0,0459	20,33
23F	0,1335	0,0333	24,96
24F	0,2469	0,0651	26,38

*R. phaseoli* CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi 150 rpm çalkalama hızında en düşük (% 22,58), 200 rpm çalkalama hızında en yüksek (% 23,10) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri; 50 rpm çalkalama hızında % 17,00-% 25,42, 100 rpm çalkalama hızında % 17,15-% 26,00, 150 rpm çalkalama hızında % 16,88-% 25,90, 200 rpm çalkalama hızında % 16,90-% 26,38 arasında değişiklik göstermiştir.

Çalışılan tüm çalkalama hızlarında 12F kodlu izolatin en düşük PHB verimine, 24 F kodlu izolatin ise en yüksek PHB verimine sahip olduğu görülmüştür. 12F kodlu izolat için 100 rpm, 22F kodlu izolat için 200 rpm, 23 F kodlu izolat için 50 rpm, 24F kodlu izolat için 200 rpm PHB verimi için en uygun çalkalama hızları olarak bulunmuştur. Ancak bu farklı çalkalama hızları, PHB verimlerinde çok küçük değişimler yapmışlardır.

**Tablo 3.3.29.** *R phaseoli* suşlarının % 0,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,1747	0,0423	24,22
12F	0,2267	0,0364	16,08
22F	0,1879	0,0375	20,01
23F	0,0745	0,0199	26,84
24F	0,2001	0,0518	25,92

**Tablo 3.3.30.** *R phaseoli* suşlarının % 1'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CIAT 899	0,2019	0,0464	23,00
12F	0,2340	0,0416	17,15
22F	0,1957	0,0396	20,28
23F	0,0978	0,0246	25,18
24F	0,2133	0,0554	26,00

**Tablo 3.3.31.** *R. phaseoli* suşlarının % 1,5'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2136	0,0472	22,13
12F	0,2546	0,0490	19,28
22F	0,2043	0,0420	20,59
23F	0,1129	0,0271	24,02
24F	0,2248	0,0562	25,01

**Tablo 3.3.32.** *R. phaseoli* suşlarının % 2'lik şeker konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2213	0,0508	22,96
12F	0,2602	0,0506	19,45
22F	0,2079	0,0420	20,23
23F	0,1225	0,0291	23,77
24F	0,2337	0,0574	24,58

*R. phaseoli* CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi % 1,5'lik şeker konsantrasyonunda en düşük (% 22,13), % 0,5'lik şeker konsantrasyonunda yüksek (% 24,22) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimi; % 0,5'lik şeker konsantrasyonunda % 16,08-% 26,84, % 1'lik şeker konsantrasyonunda % 17,15-% 26,00, % 1,5'lik şeker konsantrasyonunda %19,28-% 25,01, % 2'lik şeker konsantrasyonunda % 19,45-% 24,58 arasında değişiklik göstermiştir.

% 0,5'lik şeker konsantrasyonunda 12F kodlu izolatin en düşük PHB verimine, 23F kodlu izolatin en yüksek PHB verimine sahip olduğu görülmüştür. Çalışılan diğer tüm şeker konsantrasyonlarında ise 12F kodlu izolatin en düşük PHB verimine, 24 F kodlu izolatin ise en yüksek PHB verimine sahip olduğu görülmüştür. 12F kodlu izolat için % 2'lik, 22F kodlu izolat için % 1,5'lik , 23 F kodlu izolat için % 0,5'lik, 24F kodlu izolat için % 1'lik şeker konsantrasyonu, PHB verimi için en uygun şeker konsantrasyonları olarak bulunmuştur. Ancak bu farklı şeker konsantrasyonları, PHB verimlerinde çok küçük değişimler yapmışlardır.

**Tablo 3.4.33.** *R. phaseoli* suşlarının 24 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,00630	0,00026	4,17
12F	0,00689	0,00017	2,53
22F	0,00610	0,00021	3,60
23F	0,00338	0,00017	5,29
24F	0,00605	0,00033	5,58

**Tablo 3.4.34.** *R. phaseoli* suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	0,2019	0,0464	23,00
12F	0,2340	0,0416	17,15
22F	0,1957	0,0396	20,28
23F	0,0978	0,0246	25,18
24F	0,2133	0,0554	26,00



**Tablo 3.4.35.** *R. phaseoli* suşlarının 72 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	3,2685	0,9540	29,19
12F	3,9782	0,9639	24,23
22F	3,1428	0,8397	26,72
23F	1,5486	0,4650	30,03
24F	3,5249	1,0289	29,19

**Tablo 3.4.36.** *R. phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R. phaseoli</i> CİAT 899	3,2790	0,9699	29,58
12F	4,0128	1,0353	25,80
22F	3,1712	0,8654	27,29
23F	1,6002	0,4858	30,36
24F	3,6201	1,1280	31,16

*R. phaseoli* CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda en düşük (% 4,17), 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek (% 29,58) olarak bulunmuştur.

*R. phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri; 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda % 2,53-% 5,58, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda % 17,15-% 26,00, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda % 24,23-30,03, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda % 25,80-% 31,16 arasında değişiklik göstermiştir.

72 saatlik inkübasyon süresi sonunda 12F kodlu izolatın en düşük PHB verimine, 23 F kodlu izolatın ise en yüksek PHB verimine sahip olduğu görülmüştür. Çalışılan diğer tüm saatlik inkübasyon sürelerinde ise 12F kodlu izolatın en düşük PHB verimine, 24 F kodlu izolatın ise en yüksek PHB verimine sahip olduğu görülmüştür. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda PHB verimleri oldukça düşüktür. 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda PHB verimleri oldukça artmış, 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda elde edilen PHB verimlerine çok yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Mercan [59], yapmış olduğu doktora çalışmasında, *R. phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini % 23,08- % 28,70, *R. leguminosarum* suşlarında ise % 14,22- % 25,85 olarak bulmuştur.

Mercan ve arkadaşları [60], *Rhizobium* cinsi bakterilerle yaptıkları çalışmalarında hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini % 1,38-% 40,0 arasında bulmuşlardır.

Uruç [64], yapmış olduğu yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium* cinsi bakterileri kullanmıştır. *R. phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini % 17,23-% 26,04 olarak bulmuştur. *R. leguminosarum* suşlarında ise hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini % 8,69- % 18,91 arasında bulmuştur. *R. phaseoli* suşlarında bulunduğu maksimum ve minimum PHB üretimleri, çalışmamız ile uygunluk göstermektedir.

Ateş ve Ekmekçi [53] yapmış oldukları çalışmada, *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'in PHB üretimlerini incelemişler ve her bir organizma için farklı çalkalama hızlarının, farklı şeker konsantrasyonlarının ve farklı inkübasyon sürelerinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, farklı çalkalama hızlarının PHB veriminde etkisi araştırılırken, *P. extorquens* DSM 1337'nin % 20,66-% 22,86 arasında, *A. chroococcum* (TEM)'in % 9,53-% 12,17 PHB verimine sahip olduğunu görmüşlerdir. Farklı şeker konsantrasyonlarının PHB üretiminde etkisi çalışılırken, *P. extorquens* DSM 1337'de en yüksek PHB verimi % 1,5'lik şeker konsantrasyonunda % 22,03, *A. chroococcum* (TEM)'de en yüksek PHB verimi % 1'lik şeker konsantrasyonunda % 12,03 olarak bulunmuştur. Farklı inkübasyon sürelerinin PHB üretiminde etkisi çalışılırken, PHB üretimleri *P. extorquens* DSM 1337'de 32. saatin sonunda % 23,35, *A. chroococcum* (TEM)'de 28. saatin sonunda % 11,02'ye ulaşmıştır. Ateş ve Ekmekçi'nin yapmış oldukları çalışmada farklı çalkalama hızlarıyla farklı şeker konsantrasyonlarının, PHB verimlerinin değişiminde büyük bir etkisinin olmadığı görülürken, farklı inkübasyon sürelerinin, PHB verimlerinin değişiminde, belirgin bir etkisinin olduğu görülmüştür. Bu durum çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Beyatlı ve Mercan [51] 10 adet *Bacillus sphaericus* suşunun PHB üretimlerini tespit etmişlerdir. . Suşların PHB üretimleri tespit edildikten sonra, en yüksek verimi gösteren 4 suşun

farklı karbon kaynaklarında bakterilerin PHB üretimleri incelenmiştir. *Bacillus sphaericus* ATCC 12300 suşunun % 0,2'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında % 31,64, *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 suşunun % 2'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında % 32,50, *Bacillus sphaericus* 34-2 suşunun, % 0,2'lik beef ekstrakt içeren besi ortamında % 30,63, *Bacillus sphaericus* 1404 suşunun % 0,2'lik beef ekstrakt içern besi ortamında % 19,78 maksimum PHB verimine ulaştığı görülmüştür. *Bacillus sphaericus* ATCC 12300 suşunun % 0,2'lik sodyum asetat içeren besi ortamında % 21,38, *Bacillus sphaericus* ATCC 7055 suşunun % 0,5'lik sodyum asetat içeren besi ortamında % 24,80, *Bacillus sphaericus* 34-2 suşunun, % 1'lik sodyum asetat içeren besi ortamında % 23,12, *Bacillus sphaericus* 1404 suşunun % 0,2'lik sodyum asetat içern besi ortamında % 19,56 maksimum PHB verimine ulaştığı görülmüştür.

Saadettin ve arkadaşları [65], yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus* cinsine ait *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *Bacillus* spp. bakterilerinin PHB üretimlerini tespit etmişlerdir. Çalışılan 23 adet *Bacillus* suşunun PHB verimleri % 3,14-% 57,40 olarak bulunmuştur. Daha sonra en yüksek verimi gösteren 3 *Bacillus* suşunun farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretimleri incelenmiştir. *B. sphaericus* NRS 592 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği glisin içeren besi ortamında PHB verimi % 36,36, *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği sakkaroz içeren besi ortamında PHB verimi % 54,09, *B. licheniformis* ATCC 10716 suşunun en yüksek PHB verimini gösterdiği proteaz pepton içeren besi ortamında PHB verimi % 37,50 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar daha sonra bu 3 *Bacillus* suşunun, UV ve akriflavin ile elde edilen mutant suşlarında PHB üretimini incelemişlerdir. *B.sphaericus* NRS 592 suşundan 80 µg akriflavin ile elde edilen mutant Y7 suşunun PHB verimi % 64,28, *B. subtilis* ATCC 6633 suşundan 100 µg akriflavin ile elde edilen mutant Z4 suşunun PHB verimi % 44,44, *B. licheniformis* ATCC 10716 suşundan 8 dakika UV ile elde edilen mutant M6 suşunun PHB verimi % 36,00 olarak bulunmuştur.

#### 4. KAYNAKLAR

1. Güney, E., 2003, Çevre ve İnsan, Çankaya Kitapevi, İstanbul, 13.
2. Türk, A., 1998, Çevre Nedir, Anadolu Üniversitesi Yayınları.
3. Kıvanç, M., Yücel, E., 1998, Çevre ve İnsan, Anadolu Üniversitesi Yayınları.
4. Özey, R., 2001, Çevre Sorunları, Aktif Yayınevi, İstanbul, 21.
5. Şama, E., 2003, Öğretmen Adaylarının Çevre Sorunlarına Yönelik Tutumları, Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, Ankara, 23, 2, 107.
6. Tokuşoğlu, B., 1993, Çevre Sorunları ve Kentleşme, Çevre Dergisi.
7. T.C. Sağlık Bakanlığı Dış İlişkiler Dairesi Başkanlığı, Dünya Sağlık Örgütü, 1998, Ankara.
8. Akgün, S., Bakar, C., Budakoğlu, İ., 2004, Trend of Elderly Population in the World and Turkey Problems and Recommendations, Türk Geriatri Dergisi, 7, 2, 105.
9. Kışlaoğlu, M., Berkes, F., 1991, Çevre ve Ekoloji, Remzi Kitapevi, İstanbul.
10. Fischer, G., Heiling, G. K., 1997, Population Momentum and the Demond On Land and Water Resources, London.
11. Tan, S., Köksal, H., 2004, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, 5, 2, ISSN 13003-8346.
12. Pehlivan, M., 1995, Çevre Eğitimi ve Kimyasal Çevre Kirliliği, Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Anabilim Dalı, Ekoloji Çevre Dergisi, Konya.
13. Gökbunar, A., 1995, İşletmelerin Çevrenin Korunmasında Sosyal Sorumluluğu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Mali Hukuk Ana Bilim Dalı, Ekoloji Çevre Dergisi, İzmir.
14. Melih Z., Melih, B., 1998, İşletmecilik ve Çevre Sorunları
15. Ediz, N., Beyatlı, Y., 2005, Bacillus Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3, 5, 1-22.
16. Yılmaz, M., Beyatlı, Y., 2003, Biyoplastik Poli-β-Hidroksibütirat, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1, 9, 1-33.
17. Hajikhani, R., 2003, Poli-β-Hidroksibütirat Üretimi, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1, 10-18, Ankara.

18. Lee, S. Y., 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates Biotechnology and Bioengineering, 49, 1-14.
19. Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, KÜKEM Dergisi, 19, 2, 23-32.
20. Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y., 1998, Toprakta İzole Edilen Bazı *Bacillus* Türlerinin Poly- $\beta$ - Hydroxybutyrate (PHB) Üretim Miktarlarının Belirlenmesi, Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği Sempozyumu, Anadolu Üniversitesi ve Biyoteknoloji Derneği, Eskişehir.
21. Zinn, M., Wiltholt, B. and Egli, T., 2001 Occurrence Synthesis and Medical Application of Bacterial Polyhydroxyalkanoate, Advanced Drug Reviews, 53: 5-21.
22. Anderson, A. J. and Dawes, A. E., 1990 Occurrence Metabolism Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Microbiol. Reviews., 54 (4): 45-472.
23. Lemoigne, M., 1926, C.R. Hebd. Seanes Soc. Biol., 94, 1291.
24. Lemoigne, M., 1926, Products of Dehydration and of Polymerization of  $\beta$ -Hydroxybutyric Acid, Bull Soc. Chem. Biol., 8, 770-782.
25. Lemoigne, M., 1927, And Inst. Pasteur, 41, 148.
26. Ellar, D., Lundgren, D. G., Olumura, K. and Marchessault, R. H., 1968, Morphology of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Granule, J.Mol. Biol., 35, 489.
27. Madison, L. L., Huisman, G. W., 1999 Metabolic Engineering of Poly-3-Hydroxyalkanoates From DNA to Plastic , Mic. Mol. Bio. Reviews, 63: 21-53.
28. Page, W. J., 1992 Suitability of Commercial Beet Molasses Fractions as Substrates for Polyhydroxyalkanoate Production by *Azotobacter vinelandii* UWD , Biotechnol. Lett., 14 (5): 385-390.
29. Matsuo, T., Mino, T., Sato, H., 1992 Metabolism of Organic Substances in Anaerobic Phase of Biological Phosphate Uptake Process, Water Sci. and Technol., 25: 83-92.
30. Kayın, E., 2001 Bazı Atasal ve Muhtemel Mutant Bakterilerin Termobiyoplastik Üretimlerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
31. Encarnacion, S., Dunn, M., Willims, K. and Mora, J., 1995 Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*, Journal of Bacteriology, 177 (11): 3058-3066.

32. Tavernier, P., Portais, J. C., Saucedo, J. E. N., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N., 1997, Exopolysaccharide and Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Coproduction in Two *Rhizobium meliloti* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1, 21-26.
33. Holmes, P. A., 1985, Applications of PHB – A Microbially Produced Biodegradable Thermoplastic, *Phys. Technol.*, 16, 32-36.
34. Dunlop, W. F., Robards, A. W., 1973, Ultrastructural Study of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Granules from *Bacillus cereus*, *J. of Bacteriol.* 114, 3, 1271-1280.
35. Poirier, Y., 2002, Polyhydroxyalkanoate Synthesis in Plants as a Tool for Biotechnology and Basic Studies of Lipid Metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41, 2, 131-155.
36. Annon., 1994, Biodegradable Plastic Using Lactic Acid Bacteria, *Genetic Eng. and Biotech. Monitor.*, 1, 64.
37. Reusch, R. N., Sparrow, A. W. and Gardiner, J., 1992, Transport of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in Human Plasma, *Biochim. Biophys. Acta*, 1123, 33-40.
38. Nguyen, S., Yu Ge, G. E., Marchessault R. H., 2002, Thermal Degradation of Poly-3-Hydroxyalkanoates Preparation of Well Defined Oligomers, *Biomacromolecules*, 3, 1, 219-224.
39. Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J., 1993, Microbial Degradation of Poly-3-Hydroxybutyrate and Poly-3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate in Soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 10, 3233-3238.
40. Savenkova, L., Gerberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I. and Kalnin, M., 2000, Mechanical Properties and Biodegradation Characteristics of PHB-Based Films, *Process Biochem.*, 35, 573-579.
41. Charles, T. C., Cai, G., Aneja, P., 1997, Megaplasmid and Chromosomal Loci for the PHB Degradation Pathway in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, *Genetics*, 146, 1211-1220.
42. Yağmurlu, M. F., Korkusuz, F., Gürsel, I., Korkusuz, P., Örs, Ü., Hasırcı, V., J. 1999, Sulbactam-Cefoperazone Polyhydroxybutyrate-co-Hydroxyvalerate Local Antibiotic Delivery System; In Vivo Effectiveness and Biocompatibility in the Treatment of Implant-Related Experimental Osteomyelitis, *Biomed. Mater. Res.*, 46, 494-503.
43. Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K. P., Becher, B., 2001, Laser Cutting Influence on Morphological and Physicochemical Properties of Polyhydroxybutyrate, *Biomaterials*, 22, 2447-2452.

44. Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N., Chang, Y. K., 1994, Construction of Plasmids, Estimation of Plasmid Stability, and Use of Stable Plasmids for the Production of Poly-3-Hydroxybutyric Acid by Recombinant *Escherichia coli*, Journal of Biotechnology, 32, 203-211.
45. Lafferty, R. M., Korsatko, B., Korsatko, W., 1988, Microbial Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid, Biotechnology, Edited by H. J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
46. Hanzlikova, A., Jandera, A. and Kuş, F., 1985, Formation of Poly-3-Hydroxybutyrate by a Soil Microbial Community in the Soil. Folia Microbiologica, 30, 58-64.
47. King, P. P., 1982, Biotechnology, an Industrial View. J. Chem. Technol. Biotechnol., 32, 2-8.
48. Pool, R., 1989, In Search of the Plastic Potato, Science, 245, 1187-1189.
49. Bormann, E. J., Leissner, M., Beer, B., 1998, Growth-Associated Production of Polyhydroxybutyric Acid by *Azotobacter beyerninckii* from Organic Nitrogen Substrates, Appl. Microbiol. Biotechnol., 49, 84-88.
50. Page, W. J., 1992, Suitability of Commercial Beet Molasses Fractions as Substrates for Polyhydroxyalkanoate Production by *Azotobacter vinelandii* UWD, Biotechnol. Lett., 14, 5, 385-390.
51. Mercan, N., Beyatlı Y., 2001, *Bacillus sphaericus* Suşlarının Poli- $\beta$ -Hidroksibütirat Üretimlerinin İncelenmesi, Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25, 2, 1-7.
52. Karaboz, İ., Umay, F. B., 1994, *Pseudomonas extorquens*'den PHB Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 14-17.
53. Ateş, M. ve Ekmekçi, S., 2001, Pancar Melası Kültüründe *Pseudomonas Extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'dan PHB Üretimi, Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25,3,61,70.
54. Gomez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Bueno Netto, C. L., Oliveira, M. S., da Silva, L. F., 1996, Evaluation of Soil Gram-Negative Bacteria Yielding Polyhydroxyalkanoic acids from Carbohydrates and Propionic Acid, Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 785-791.
55. Tal S. and Okon, Y., 1985, Production of the Reserve Material Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate and its Function in *Azospirillum brasilense* Cd, Can. J. Microbiol., 31, 608-613.
56. Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. and Fuller, R. C., 1991, The Accumulation of Poly-3-Hydroxyalkanoates in *Rhodobacter sphaeroides*, Arch. Microbiol., 155, 337-340.

57. Lillo, J. G., Valera, F. R., 1990, Effects of Culture Conditions on Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid Production by *Haloferax Mediterranei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 8, 2517-2521.
58. Uğur, A., Şahin, N., Beyatlı, Y., 2002, Accumulation of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in *Streptomyces* Species During Growth With Different Nitrogen Sources , *Turk. J. Biol.*, 26: 171-174.
59. Mercan, N., 2002, *Rhizobium* Cinsi Bakterilerin Poli- $\beta$ -hidroksibütirat Üretimlerinin Belirlenmesi, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) İle Elde Edilen Toplam Protein Profillerinin ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
60. Mercan, N., Aslım, B., Yüksekdağ, Z. N. Ve Beyatlı, Y., 2002 Production of Poli- $\beta$ -hidroxybutyrate (PHB) by Some *Rhizobium* Bacteria, *Turk J. Biol.*,26,215-219.
61. Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., Zagreba, E. D., 1989, Relationship Between Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate Content and Nitrogenase and Hydrogenase Activity in Some Strains of *Rhizobium*, *Mikrobiologiya*, 58, 6, 920-922.
62. Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N. and Seguin, J. P., 1996, H NMR Spectroscopic Determinatin of Poly-3-Hydroxybutyrate Extracted from Microbial Biomass, *Enzyme and Microbial Technol.*, 18, 195-201.
63. Gür, S., 1998, Elazığ Yöresi Topraklarındaki Doğal *Rhizobium* Populasyonunun Belirlenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
64. Uruç, A., 2006, Bazı *Rhizobium* Cinsi Bakterilerin Poli- $\beta$ -hidroksibütirat Üretimleri Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
65. Saadetin, S., Mercan, N., Mumcu, Z.N. ve Beyatlı, Y., 2001, *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Poli- $\beta$ -hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin İncelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25 ,2, 67-76.



## ÖZGEÇMİŞ

### **Mehtap İLHAN BAYSAK**

08.12.1983 tarihinde Elazığ'ın Baskil ilçesinde doğdum. İlköğrenimimi, Elazığ Fırat İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi Elazığ Mezre Ortaöğretim Okulu'nda, Lise öğrenimimi Elazığ Atatürk Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladım. Lisans öğrenimimi, Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Bitoloji Bölümü'nde tamamladım. 2005 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.