

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TÜRKİYE'DEN PHB ÜRETİCİSİ HALOFİLİK BAKTERİLERİN  
İZOLASYONU**

**ÖZGE DİNİGÜZEL**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA**

**2007**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TÜRKİYE'DEN PHB ÜRETİCİSİ HALOFİLİK BAKTERİLERİN İZOLASYONU

Özge DİNİGÜZEL

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Eş Danışman : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

Bu çalışmada Tuz Gölü (Ankara ili tarafı) ve Acıgöl (Denizli)'den toplanan toprak, çamur, su ve tuz örneklerinden halofilik bakteriler izole edilmiş ve PHB üretenler Sudan Black B boyası ile belirlenmiştir. PHB üreten izolatlardan 12'si seçilerek ürettikleri PHB miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. İzolatlardan AG 27 (%29.48)'de en yüksek PHB üretimi gözlenirken, TG 24 (%2.03)'te hücre kuru ağırlığına göre en düşük PHB verimi gözlenmiştir. En yüksek verim elde edilen AG 27 izolatu karbon kaynağı olarak %1 oranında Galaktoz ve %0.3 oranında Yeast ekstrakt içeren besiyerinde geliştirildiğinde ise hücre kuru ağırlığının %59,19'unu PHB olarak biriktirdiği belirlenmiştir.

**2007, 50 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** PHB, Halofilik Bakteri

## **ABSTRACT**

Master Thesis

ISOLATION OF PHB PRODUCER HALOPHILIC BACTERIA IN TURKEY

Özge DİNİGÜZEL

Ankara University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Cumhuri ÇÖKMÜŞ

Co-supervisor: Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

In this study, halophilic bacteria were isolated from salt, water, soil and sludge samples which were taken from Tuz Gölü and Acıgöl (Denizli). In the first step, PHB producer isolates were determined by Sudan Black B staining. Twelve isolates which are produced PHB were selected and PHB amount was measured spectrophotometrically. The highest percent yield of PHB was observed in the isolate AG 27 (29.48%), according to dry cell weight whereas the lowest percent yield of PHB was determined in the isolate TG 24 (2.03%). AG 27 isolate, which have the highest yield, accumulated 59.19% PHB of its dry cell weight when it was grown in the medium containing galactose (1%) and Yeast extract (0.3%) as carbon source.

**2007, 50 pages**

**Key Words: PHB, Halophilic Bacteria**

## TEŞEKKÜR

“Türkiye’den PHB Üreticisi Halofilik Bakterilerin İzolasyonu”adlı yüksek lisans tezimin çalışmaları sırasında ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cumhur ÇÖKMÜŞ (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)’e, eş danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz BEYATLI (Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü)’ya,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında deneyimlerinden yararlandığım Arş. Gör. Dr. Arzu ÇÖLERİ (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) ve Arş. Gör. Dr. Zehra Nur YÜKSEKDAĞ(Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü)’a,

Örneklerin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Selina ÖZEN ve Biyolog Hızlan Hıncal AĞUŞ’a ,

Laboratuvar çalışmalarına katkılarını sunan arkadaşım Arş. Gör. Günce ŞAHİN (Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü)’e ve Biyolog Ramazan YILDIRIM’a,

Her zaman yanımda olarak beni destekleyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özge DİNİGÜZEL

**Ankara, Ekim 2007**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Biyoplastiklerin Tanımı, Formülü ve Genel Özellikleri.....	4
2.2 Tarihçe.....	9
2.3 PHB Sentezi.....	10
2.4 Biyoplastiklerin Kullanım Alanları.....	13
2.5 Bakterilerde PHB Üretimi.....	15
2.5.1 <i>Alcaligenes</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	16
2.5.2 <i>Azotobacter</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	17
2.5.3 <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	17
2.5.4 <i>Pseudomonas</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	18
2.5.5 <i>Rhizobium</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	20
2.5.6 Halofilik bakterilerde PHB üretimi.....	20
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	21
3.1 Materyaller.....	21
3.1.1 Bakteri izolatları.....	21
3.1.2 Kullanılan besiyerleri, solusyonlar ve standart.....	21
3.1.3 Boyalar.....	22
3.1.4 Mikroskopik inceleme.....	22
3.1.5 Spektrofotometrik ölçüm.....	22
3.2 Yöntem.....	22
3.2.1 Halofilik bakterilerin izolasyonu ve kültürü.....	22
3.2.2 PHB Granüllerinin boyanması.....	23
3.3 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler.....	23

3.3.1 Gram boyama ve hareket testi.....	23
3.3.2 Katalaz testi.....	23
3.3.3 Oksidaz testi.....	24
3.3.4 Amilaz testi.....	24
3.3.5 H <sub>2</sub> S üretimi.....	24
3.3.6 Şekerlerden asit üretimi.....	24
3.3.7 Triptofandan indol oluşumu testi.....	25
3.3.8 Sitratın kullanımı testi.....	25
3.3.9 Metil Red ve Voges-Proskauer testi.....	25
3.3.10 Üreaz aktivitesi.....	25
3.4 PHB Miktarının Belirlenmesi.....	26
3.5 NB Besiyerine Eklenen Galaktoz, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve Yeast Ekstraktın PHB Üretimi Üzerine Etkisi .....	27
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	28
4.1 PHB Üretim Miktarı Sonuçları.....	28
4.2 Biyokimyasal Test Sonuçları.....	33
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	37
KAYNAKLAR.....	39
EKLER.....	48
EK 1 Kullanılan Besiyerlerinin İçeriği.....	48
EK 2 Kullanılan Solusyonların İçeriği.....	49
ÖZGEÇMİŞ.....	50

## SİMGELER DİZİNİ

PHA	Polihidroksialkanoat
PHB	Polihidroksibütirat
Da	Dalton
P(HB-co-HV)	Polihidroksibütirat-co-hidroksivalerat
UV	Ultra violet
HV	Hidroksivalerat
NADPH	Nikotin Amid Di Fosfat Hidrojenaz
NaCl	Sodyum Klorür
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
TSI	Triple Sugar Iron Agar
MR-VP Broth	Metil Red-Voges Proskauer Broth
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
µl	Mikrolitre
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
H <sub>2</sub> S	Hidrojen Sülfid
N	Normal
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum Dihidrojen Fosfat
g	Gram
l	Litre
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
AG	Acıgöl
TG	Tuz Gölü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Polihidroksialkanoatların genel yapısı.....	4
Şekil 2.2	<i>Pseudomonas saccharophila</i> 'nın freze-fructered elektron mikrografında görülen PHB granülleri .....	5
Şekil 2.3	<i>R. eutropha</i> 'daki PHB sentez ve yıkım yolu .....	12
Şekil 4.1	Sudan Black B ile boyanmış AG 27 izolatında PHB granülleri .....	28
Şekil 4.2	Halofilik bakteri izolatları'nın PHB verim yüzdeleri .....	30
Şekil 4.3	Halofilik bakteri izolatlarında hücre kuru ağırlığı ve PHB miktarı arasındaki korelasyon .....	31
Şekil 4.4	AG 27 Halofilik bakteri izolatının Galaktoz, Yeast ekstrakt ve $KH_2PO_4$ eklendiğinde NB besiyerinde PHB üretimi .....	33



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Değişik kriterlere göre mikrobiyal biyoplastiklerin sınıflandırılması....	7
Çizelge 2.2 PHB ve kopolimerleri ile petrol kökenli polipropilenin karşılaştırmalı polimer özellikleri.....	9
Çizelge 4.1 Halofilik bakteri izolatlarının PHB üretim miktarları.....	31
Çizelge 4.2 AG 27 Halofilik bakteri izolatının Galaktoz, Yeast ekstrakt ve $KH_2PO_4$ eklendiğinde NB besiyerinde PHB üretimi.....	34
Çizelge 4.3 On iki adet halofilik bakteri izolatının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları .....	36

## 1. GİRİŞ

Yaşamımızın hemen hemen her alanında kullanılan plastik eşyalar günlük hayatımızın vazgeçilmez birer parçalarıdır. Plastikler 1940'lı yıllardan itibaren camın, odunun, diğer inşaat malzemelerinin, metallerin yerini aldıklarından önemli olmaya başlamışlardır (Lee *et al.* 1991, Cain 1992, Poirier *et al.* 1995, Lee 1996). Plastikler, çok kullanışlı olmalarına rağmen, doğaya bırakıldıklarında yüzlerce yıl parçalanmadan kaldıklarından çevre kirliliği sorununu da beraberinde getirmektedir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 50 milyon ton plastik üretilmekte (Atlas 1993) ve Dünya'da biriken yıllık plastik miktarı ise 25 milyon tonu bulmaktadır (Lee 1996). Her yıl denize atılan yüz binlerce ton plastik başka bir ekolojik soruna da neden olmaktadır. Tahminen her yıl 1 milyon deniz canlısı ya yanlışlıkla yiyecek yerine atık plastikleri yerken boğulmakta ya da parçalanmayan plastik yığınları arasında sıkışarak ölmektedir (Fiechter 1990).

Parçalanmayan plastik atıkların yarattığı çevre kirliliği problemine karşı birkaç çözüm yolu bulunmaktadır. Bunlar yakarak yok etme, geri dönüşüm uygulama ya da biyolojik olarak parçalanabilen plastikleri üretip kullanmaktır. Petrol kökenli plastikleri yakarak yok etme iyi bir çözüm gibi görünse de çevre ve insan sağlığını riske atan bir yöntemdir. Çünkü; plastik atıklar yakılırken hidroklorik asit ve hidrojen siyanid gibi zararlı gazlar ortaya çıkmaktadır. Geri dönüşüm uygulama da uygun bir çözüm gibi görünmekte, ancak bu yöntemin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Birincisi pahalı bir yöntemdir, ikincisi plastik atık materyallerin ayıklanması çok zaman alıcı bir işlem olduğundan oldukça yorucudur. Bunun dışında, pigment, kaplama, dolgu maddesi gibi çeşitli katkı maddelerinin varlığı maddelerin yeniden kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır (Khanna and Srivastava 2005).

Ayrıca 1970'li yıllardaki krizden sonra petrol fiyatlarının artması ve diğer nedenlerden dolayı sentetik plastiklerin istenilen fiziksel ve kimyasal özelliklerini taşıyan petrol kökenli plastiklere alternatif, ekolojik yönden yararlı, biyolojik olarak parçalanabilen materyallerin geliştirilmesi ve kullanımı konusunda artan toplumsal ve bilimsel bir ilgi

ortaya çıkmıştır (Bichler *et al.* 1993, Lee 1996, Braunegg *et al.* 1998, Amass *et al.* 1998, Muller *et al.* 2001).

Biyoparçalanır plastikler 3 kategoriye ayrılabilirler:

1) Kimyasal olarak sentezlenen plastikler: Poliglikolik asit, polilaktik asit, poli( $\epsilon$ -caprolactone), polivinil alkol, poli(etilen oksit) bu kategoriye girmektedir. Bunlar enzimatik veya mikrobiyal etkiye duyarlıdır. Plastiklerin bütün özelliklerini taşımadıklarından dolayı ticari açıdan plastiklerin yerini alacak derecede uygun değildirler.

2) Nişasta bazlı biyoparçalanır plastikler: Bu tipte, dolgu maddesi olarak nişasta eklenmekte ve çapraz bağlarla nişasta-plastik karışımı oluşturulmaktadır (örneğin; nişasta-polietilen). Toprak mikroorganizmaları nişastayı kolayca parçalayabildiğinden polimer matriks de parçalanabilmektedir. Bu yüzden parçalanma süresinde önemli bir azalma meydana gelmektedir. Fakat bazı plastikler kısmen parçalanabilmektedir. Nişasta parçalandıktan sonra açığa çıkan plastikler dayanıklı olup çevrede oldukça uzun bir süre kalmaktadırlar.

3) Polihidroksialkanoatlar (PHA): Sadece bu grup %100 biyoparçalanır polimerlerdir. Bunlar çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından, azot ve fosfor gibi temel besinlerin sınırlı konsantrasyonlarında ve karbon kaynağının fazlalığında enerji depo materyali olarak sentezlenen çeşitli hidroksialkanoat polimerleridir. PHA polipropilen gibi çeşitli termoplastiklere benzer özelliklere sahip olduklarından polipropilenin yerine kullanılabilirler. PHA toprak, deniz, göl suları ve atık sulardaki mikroorganizmalar tarafından aerobik şartlarda karbondioksit ve suya kadar, anaerobik koşullar altında metana kadar tamamen parçalanabilmektedirler (Khanna and Srivastava 2005).

Bu nedenlerle, PHB gibi biyolojik olarak tamamen parçalanabilen doğayla dost plastiklerin bakterilerde sentezi ve endüstriyel uygulamaları ile ilgili elde edilen olumlu sonuçlarla biyoplastiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Braunegg *et al.* 1998, Poirier 2002).

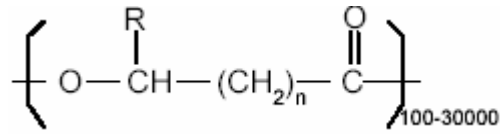
Bu alışmada, Tuz Gölü (Ankara ili tarafı) ve Acıgöl (Denizli)'den toplanan tuz, su, çamur, toprak örneklerinden PHB üreticisi halofilik bakterilerin izolasyonu, PHB üretim kapasitelerinin belirlenmesi ve farklı karbon kaynaklarının PHB üretimi üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Biyoplastiklerin Tanımı, Formülü ve Genel Özellikleri

Biyoplastikler, değişik besin ve çevre koşulları altında gelişen mikroorganizmalar tarafından, stres koşulları altında mikroorganizmanın canlı kalabilmesi için hücre içi depo granülleri halinde biriktirilen polimerlerdir (Barnard and Sander 1989, Madison and Huisman 1999, Sudesh *et al.* 2000). Polihidroksialkanoat (PHA) olarak adlandırılan bu polimer, doğrusal, kısa zincirli  $\beta$ -hidroksi yağ asiti monomerleri içeren, zarla çevrili hücre içi depo materyali olup tekrarlanan hidrofobik birimlerden meydana gelmiş uzun bir polimerdir (Findlay and White 1983, Lafferty *et al.* 1988, Anderson and Dawes 1990, Slater *et al.* 1992, Madison and Huisman 1999, Poirier 2002). Bu hücre içi depo materyalinin bakterilerde, insandaki yağ ve bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bildirilmektedir (Pool 1989).

Hidroksialkanoatların poliesteri olan PHA'nın genel formülü Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



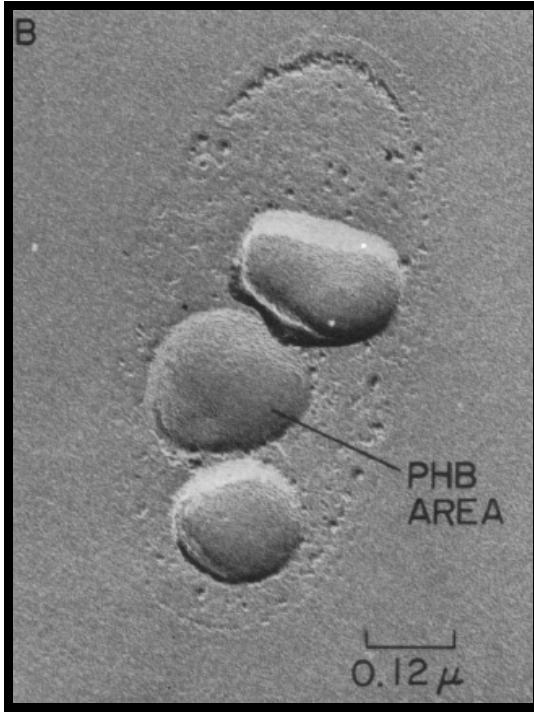
n = 1	R = hidrojen	ise	poli-3-hidroksipropiyonat
	metil	ise	poli-3-hidroksibütirat
	etil	ise	poli-3-hidroksivalerat
	propil	ise	poli-3-hidroksiheksanoat
	pentil	ise	poli-3-hidroksioktanoat
	nonil	ise	poli-3-hidroksidodekanoat

Şekil 2.1 Polihidroksialkanoatların genel yapısı (Steinbüchel 1991, Lee 1996)

Bakterilerde bulunan PHA granülleri genellikle küre şeklinde olup ortalama 100-800 nm çapa sahiptirler. Granülleri çevreleyen zarın kalınlığı ise 2-4 nm civarındadır.

Granüller yaklaşık olarak %98 PHB, %2 protein içerir (Dunlop and Robards 1973, Lafferty *et al.* 1988).

Şekil 2. 2’de hücre sitoplazmasındaki PHB granülleri gösterilmektedir.



Şekil 2.2 *Pseudomonas saccharophila*'nın freze-fructered elektron mikrografında görülen PHB granülleri (Young *et al.* 1972)

Lipit yapılarını belirleyen Sudan Black B (Burdon 1946) ile doğal PHA cisimcikleri boyanabilmektedir (Williamson and Wilkinson 1958, Kallio and Harrington 1960). Bunun yanı sıra Nile Blue A gibi bir floresan boya ile daha spesifik olarak boyanabilmektedir (Ostle and Holt 1982). PHA granülleri yüksek derecede kırıcılıklarından dolayı faz-kontrast mikroskobu veya elektron mikroskobu ile kolaylıkla gözlenebilmektedirler (Dawes and Senior 1973). Bu boyama metodları ile PHA'ların sadece varlığı belirlenebilmekte, bunların monomerik kompozisyonlarını belirlemek için kimyasal analizler gerekmektedir (Khanna and Srivastava 2005).

Granül analizinde atomik kütle mikroskopisi, Raman spektroskopisi gibi teknikler kullanılmaktadır. Santrifüjle ya da kloroform, trifloroetanol, dikloroetan, propilen karbonat, metilen klorid, dikloroasetik asit gibi kimyasallarla izole edilen PHA'ların moleküler ağırlığının hesaplanmasında jel kromatografisi, sedimentasyon analizi ve viskozite ölçüm teknikleriyle; monomer kompozisyonları ise gaz kromatografisi, kütle spektroskopisi ve nükleer manyetik rezonans analizleriyle belirlenebilmektedir (Marchessault *et al.* 1970, Holmes 1988, Garcia *et al.* 1999, Madison and Huisman 1999, Lee and Choi 1999, Di Lorenzo and Silvestre 1999, Kessler *et al.* 2001).

PHA'ların biriktirildiği granüllerin büyüklüğü, sayısı, monomer kompozisyonu, makromoleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri üretici mikroorganizmaya bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ostle and Holt 1982, Anderson and Dawes 1990, Murray *et al.* 1994, Ha and Cho 2002).

Polimerin moleküler ağırlığı bakterinin türüne, büyüme koşullarına, hücrenin yaşam döngüsüne göre değişmekle birlikte, 60.000-2.000.000 Da arasında olduğu bildirilmiştir (Dunlop and Robards 1973, Taidi *et al.* 1994, Braunegg *et al.* 1998). Hücre içinde sıvı, dışında katı olan bu polimerler organik çözücülerle hücreden özütlendiklerinde hemen kristalleşmektedirler (Lafferty *et al.* 1988, Dave *et al.* 1996, Madison and Huisman 1999).

PHA'lar zincirlerindeki karbon atomlarının sayısına bağlı olarak; 3-5 karbonlu kısa zincirli PHA'lar, 6-14 karbonlu orta zincir uzunluğundaki PHA'lar ve 14 karbon atomundan fazla karbon atomu içeren uzun zincirli PHA'lar olmak üzere 3 gruba ayrılabilir. Bu farklılık, belirli sayıda karbon atomu içeren 3-hidroksialkanoatları tanıyan PHA sentazın substrat spesifikliğinden kaynaklanmaktadır (Anderson and Dawes 1990, Luengo *et al.* 2003). Ayrıca PHA'ları değişik kriterlere göre de sınıflandırmak mümkündür.

Çizelge 2.1 Değişik kriterlere göre mikrobiyal biyoplastiklerin sınıflandırılması  
(Luengo *et al.* 2003)

SINIF	ALT SINIF
Biyosentetik köken	Doğal biyoplastikler: Mikroorganizmalar tarafından genel metabolitlerden üretilirler (örneğin; PHB'lar ve alifatik PHA'lar)
	Yarı sentetik biyoplastikler: Mikroorganizma tarafından sentezlenemeyen bazı öncü maddelerin besiyerine eklenmesine gerek vardır (örneğin; aromatik monomerler içeren PHA'lar)
	Sentetik biyoplastikler: Bunlar sadece kimyasal sentezlerle elde edilebilen doğal olanlara benzeyen polyesterlerdir (örneğin; sentetik termoplastik polimerler)
Monomerlerin kimyasal yapısı	Alifatik yağ asiti içeren biyoplastikler: Doymuş veya doymamış (çift ya da üç bağ içeren) monomerler; düz veya dallanmış monomerler
	Aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler
	Hem alifatik hem de aromatik yağ asitlerini içeren biyoplastikler
	Değişik bileşikler içeren biyoplastikler (örneğin; poli- $\gamma$ -glutamik asit, poli- $\beta$ -L-malik asit, poliglolikolik asit)
Monomer Büyüklüğü	Kısa zincirli biyoplastikler (örneğin; 3-5 karbon atomu içeren PHA'lar)
	Orta zincir uzunluğundaki biyoplastikler (örneğin 6-14 karbon atomu içeren PHA'lar)
	Uzun zincirli biyoplastikler (örneğin; 14 karbon atomundan fazla karbon atomu içeren PHA'lar)
Polyesterdeki monomer içeriği	Homopolimerik biyoplastik: Biyoplastikte tek bir monomer vardır.
	Heteropolimerik biyoplastik (kopolimer): Biyoplastikte birden fazla monomer vardır.

PHA'ların çok sayıda değişik tipleri olmasına karşın en yaygın ve en geniş kapsamlı olarak çalışılan tipi PHB'tır (Madison and Huisman 1999). Bu yüzden bakteri



PHA'larının fiziksel özellikleriyle ilgili bir çok bilgi PHB ve P(HB-co-HV) ile ilgili araştırmalardan elde edilmiştir. Petrol kökenli polipropilene benzer fiziksel özellik gösteren PHB molekülü oldukça aktif D-(-)-3-hidroksibütirik asitin bir polimeri olup yan zincirinde bir metil grubu taşımaktadır (Nickerson *et al.* 1981, Lafferty *et al.* 1988, Anderson and Dawes 1990, McCool *et al.* 1996, Dave *et al.* 1996, Madison and Huisman 1999). PHB D-(-) konfigürasyonundaki asimetric karbon atomundan kaynaklı %100 stereospesifiktir ve oldukça kristal yapıdadır (Doi and Abe 1990, Steinbüchel 1991). Katı - kırılğan PHB kopolimerlerinin erime sıcaklığı 157-188 C arasında değişir ve bu sıcaklık polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakındır (Lafferty *et al.* 1988, Dave *et al.* 1996, Madison and Huisman 1999).

Neme dirençli olması, suda znmemesi ve optik saflık gibi bir çok kullanışlı özellikleriyle PHB, suda znen ya da neme duyarlı diğer biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerden farklılık gösterir. Ayrıca PHB oksijene karşı oldukça dayanıklıdır (Holmes 1988, Lindsay 1992). PHB'nin UV ışınlarına dirençli, fakat asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Poirier 2002).

3-hidroksivalerat gibi monomerlerin eklenmesi ya da diğer polimerlerle karıştırılarak yapılan denemelerle PHB'nin kırılğanlığının azaldığı bildirilmektedir (Holmes 1985, Holmes 1988, Kunioka *et al.* 1989, Du *et al.* 2001a). Monomer parça sayısının artmasıyla bozunma sıcaklığında bir değişiklik olmadan erime sıcaklığı düşmektedir. Bu ise termal parçalanma olmadan kopolimerin termal işlenmesine olanak tanımaktadır (Ojumu *et al.* 2004).

PHB ve kopolimerleri ile petrol kökenli polipropilenin karşılaştırılmalı polimer özellikleri izelge 2.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 PHB ve kopolimerleri ile petrol kökenli polipropilenin karşılaştırmalı polimer özellikleri (Poirier *et al.* 1995, Lee 1996'dan değiştirilerek hazırlanmıştır

Özellik	PHB	P(3HB-co-3HV)			Polipropilen
		%3 mol HV	%14 mol HV	%25 mol HV	
Erime sıcaklığı (°C)	175	169	150	137	176
Kristallik oranı (%)	80	-	-	40	70
Gerilme gücü (MPa)	40	38	35	30	34.5
Uzamanın sonlanması(%)	6	-	-	-	400

Biyoplastikler bir çok tür tarafından asimile edilebildiğinden (biyoparçalanabilir) ve konakta toksik etkiye neden olmadığından (biyoyumlu), diğer geleneksel sentetik ürünlere göre daha avantajlıdır (Steinbüchel and Fuchstenbusch 1998, Angelova and Hunkeler 1999, Zinn *et al.* 2001, Williams and Martin 2002).

## 2.2 Tarihçe

Bir çok mikrobiyolog tarafından bakteri hücrelerinde hücre içi granüllerin varlığı çok önceden tanımlanmasına rağmen, PHB granüllerinin kompozisyonu ilk defa 1923'te Lemoigne (1926a) tarafından açıklanmıştır. Araştırmacı yapmış olduğu bir çalışmada *Bacillus subtilis* kültürlerini distile suda otoliz etmiş, bilinmeyen bir asitin oluşması ile pH değerinin düştüğünü gözlemlemiş, oluşan bu asitin diyabetik hastaların idrarlarında bulunan  $\beta$ -hidroksibütirik asite benzer olduğunu bildirmiştir (Lemoigne 1926b).

Bundan sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi artmış ve *Bacillus* sp. hücreleri içinde PHB sentezi ve yıkımını yönlendiren hücre içi şartlar ve mekanizmalar araştırılmıştır (Macrae and Wilkinson, 1958a, 1958b).

Bakteriyel biyokütleden PHB'nın kantitatif analizi için pratik yollardan birinin geliştirilmesi de bu yıllara rastlamaktadır. 1950'lerin sonuna kadar yaygın olarak kullanılan analitik teknikler gravimetrik metottur. Bu metod kloroformla PHB ekstraksiyonundan ve bunu takiben dietil eter veya aseton ile presipitasyondan oluşmaktadır (Lemoigne 1926a). Williamson and Wilkinson (1958), kontrollü zaman ve sıcaklık altında PHB granülleri dışındaki bütün hücre bileşenlerinin alkali sodyum hipoklorit çözeltisinde çözüldüğünü göstermişlerdir.

Biyolojik olarak parçalanabilir PHB polimerinin petrol kökenli plastiklerin yerini alması için ticari üretim çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamış ancak endüstriyel üretimi 1970'li yıllarda gerçekleştirilmiştir (Holmes 1985, Anderson and Dawes 1990, Madison and Huisman 1999). 1982'de Imperial Kimya Endüstrisi (ICI Ltd.) polimeri *Alcaligenes* cinsine ait bakterileri kullanarak endüstriyel olarak üretmiş ve BIOPOL® adıyla patentlemiştir (Holmes 1985, Anderson and Dawes 1990). Ancak, PHB'nın ilk ticari kullanıcısı Almanya'daki Wella kozmetik şirketi olup PHB'ı şampuan şişeleri için kullanmıştır (Lafferty *et al.* 1988).

Daha sonraki yıllarda PHB ile ilgili çalışmalarda *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp., *Hydrogenomonas* sp., *Chromatium* sp., *Bacillus* sp. vb bakteriler kullanılmış, PHB'nın fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metotları, metabolizması, iç ve dış yıkımı gibi çeşitli özellikleri incelenmiştir (Anderson and Dawes 1990, Braunegg *et al.* 1998).

### **2.3 PHB Sentez Yolu**

Biyoplastikler bir çok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulmaktadır (Lafferty *et al.* 1988, Jan *et al.* 1996). Bu hücre içi depo materyalinin birikimi, genellikle fazla karbon kaynağı varlığında, büyüme için gerekli azot kaynağının, oksijenin ve fosfor, kükürt, magnezyum, potasyum, demir gibi temel besin maddelerinin eksikliğinde olmaktadır (Findlay and White 1983, Lafferty *et al.* 1988,

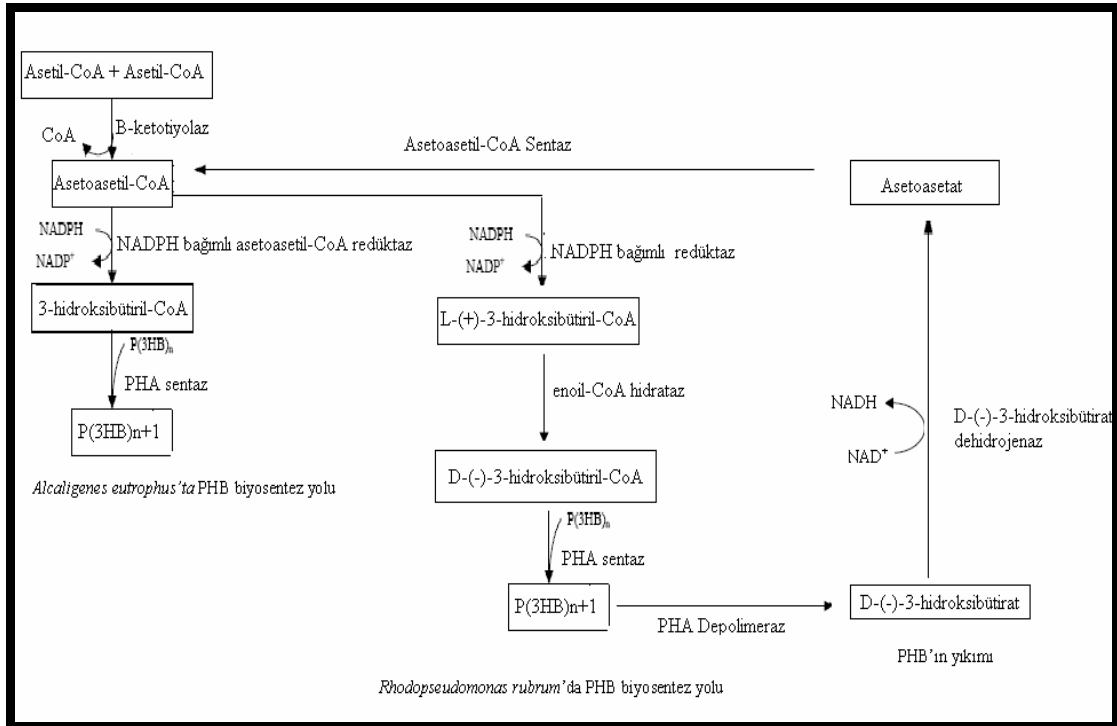
Anderson and Dawes 1990, Brandl *et al.* 1991, Valentin *et al.* 1994, McCool *et al.* 1996, Jan *et al.* 1996).

Yapılan araştırmalar sonucu, büyüme ve PHB birikimi arasında yakın bir ilginin olduğu belirlenmiştir. Bakteri gelişiminin logaritmik üreme fazında PHB birikiminin arttığı, geç logaritmik üreme-erken duraklama döneminde ise maksimum düzeye ulaştığı bildirilmiştir (McCool *et al.* 1996). Büyüme sırasında bölünmeyen hücrelerde de PHB miktarı yüksek oranda artmaktadır (Lee 1996). Araştırmacılar sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğunu ve bu biriken PHB'ın sporulasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığını bildirmektedirler (Nickerson *et al.* 1981, Benoit *et al.* 1990).

Şu ana kadar PHA'ların sentezinde dört değişik yol bulunmuştur. *Alcaligenes eutrophus*'ta PHA sentezi gerçekleşirken birinci basamakta *phbA* geni tarafından kodlanan  **$\beta$ -ketotiyolaz** enzimi iki molekül **asetil-CoA**'yı **asetoasetil-CoA**'ya dönüştürmektedir. Steinbüchel and Schlegel (1991), biyosentez olayında bu basamağın anahtar basamak olduğunu bildirmişlerdir. Bu basamaktaki  **$\beta$ -ketotiyolaz** enzimi yüksek ökaryotlardan mayalara ve prokaryotlara kadar doğal olarak bulunur. Substratların tiyolitik parçalanmasını gerçekleştirerek açıl-CoA + asetil-CoA'yı oluşturan enzim ailesinin bir üyesidir. İkinci basamakta *phbB* geni tarafından kodlanan **NADPH bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz** enzimi **asetoasetil-CoA**'yı **3-hidroksibütiril-CoA**'ya indirgemektedir. Üçüncü ve son basamakta ise *phbC* geni tarafından kodlanan **PHA sentaz**, **3-hidroksibütiril-CoA** monomerlerini polimerleştirmektedir. PHA biyosentezinin son basamağında rol alan PHA sentazların 54 farklı tipi belirlenmiştir. Bu PHA sentazlar, alt ünite kompozisyonu ve substrat spesifikliği göz önünde bulundurularak 3 gruba ayrılmaktadır. I. sınıf PHA sentazlar *Alcaligenes eutrophus*'ta, II. sınıf PHA sentazlar *Allochro-matium vinosum*'da ve III. sınıf PHA sentazlar *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunmaktadır (Masamune *et al.* 1989, Anderson and Dawes 1990, Steinbüchel 1991, Byrom 1994, Rehm *et al.* 2002).

*Rhodopseudomonas rubrum*'da sentez yolu ikinci basamaktan sonra farklılık göstermektedir. Buna göre **asetoasetil-CoA**, **NADPH bağımlı redüktaz** tarafından **L-(+)-3-hidroksibütiril-CoA**'ya indirgenir. Sonra bu molekül iki **enol-CoA hidrataz** tarafından **D-(-)-3-hidroksibütiril-CoA**'ya dönüştürülür. Üçüncü tip PHA biyosentez yolu rRNA homoloji grup I üyesi olan *Pseudomonas* türlerinde bulunmuştur. *P. oleovorans* ve diğer *Pseudomonas* türleri alkan, alkanol veya alkanoik asitte geliştirildiğinde **3-hidroksialkanoik asit** birimlerinden oluşan PHA'ları sentezlemektedir (De Smet *et al.* 1983, Brandl *et al.* 1988, Lagaveen *et al.* 1988). Dördüncü tip PHA biyosentez yolu ise rRNA homoloji grup II üyesi olan hemen hemen tüm *Pseudomonas* türlerinde bulunmaktadır. Bu yol **asetil-CoA**'dan orta uzunluktaki 3HA zincirlerinden meydana gelen kopolyesterlerin sentezini gerçekleştirmektedir. Bu sentez yolu henüz detaylı olarak çalışılmamıştır (Khanna and Srivastava 2005).

Hücresel PHB sentez ve yıkım yolu şekil 2.3'te gösterildiği gibidir.



Şekil 2.3 *Alcaligenes eutrophus* ve *Rhodopseudomonas rubrum*'daki PHB sentez ve yıkım yolu (Lee 1996'dan değiştirilerek hazırlanmıştır)

## 2.4 Biyoplastiklerin Kullanım Alanları

Endüstriyel olarak üretilen biyoplastikler polietilene oranla dört kat daha fazla serttir (20 kg/m). PHB'ın petrol kökenli polipropilene göre daha kristal yapıda olması, özgül ağırlığının daha yüksek oluşu, UV'ye dirençliliği gibi bazı özelliklerinden dolayı üretiminin daha iyi bir seçenek olduğu bildirilmiştir (Barham *et al.* 1984, Beyatlı 1996, Bluhm *et al.* 1998).

PHB'ın doğaya bırakıldığında tamamen parçalanabilmesi, çevre kirliliği yaratmaması gibi özelliklerinden dolayı ve endüstriyel uygulamalar açısından önemleri her geçen gün artmaktadır (Page *et al.* 1995, Lee 1996).

1982'de Imperial Kimya Endüstrisi (ICI Ltd) tarafından BIOPOL®'ün ilk endüstriyel üretiminden bu yana, biyoplastikler ilk olarak şişelerin ve paketleme malzemelerinin imalatında kullanılmaya başlanmıştır (Steinbüchel and Fuchstenbusch 1998, Angelova and Hunkeler 1999). Daha sonraları biyoplastiklerin tıp, tarım, veterinerlik, kimyasalların eldesi gibi alanlarda kullanıldığı bilinmektedir.

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahiptirler. Biyolojik uygunluğundan ve maliyetinden dolayı son zamanlarda tıp ve eczacılık alanında kullanılmaya başlanmıştır. Hayvan dokularına yerleştirilen PHB'ın toksik bir etkiye neden olmamasından dolayı, vücutta absorbe edilebilen protez aletlerinin, yapay kan damarlarının ve cerrahi dikişlerde PHB'ın kullanılması bir çok araştırmacının bu alana yönelmesine neden olmuştur. Sonuçta veterinerlikte ve tıpta ilaçla tedavide teröpatik bileşiklerin kontrollü salınımında PHA'lar kullanılmıştır (Lafferty *et al.* 1988, Chowdhury and John 1998). Ayrıca PHA'lar tıpta; kan damarı, vasküler aşı, kemik kırığını sabitleyen levhaların yapımında da kullanılmaktadır (Holmes 1985).

PHB'lar tarımda; toprakta parçalanma gerektiren uygulamalar ve kaplama işlemlerinde kullanılabilir. Biyoplastikler, ekin sulaması için yapılan olukların üretiminde tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre ve

pestisitlerin kontrollü salınımlarında plastik kılıflar olarak ta kullanılabilir (Holmes 1985).

PHB'lar kimyasalların eldesinde de kullanılmaktadır. Antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve feromonlar gibi kimyasalların sentezinde kiral yapı blokları olarak, kiral bir merkeze ve iki fonksiyonel gruba (-OH, -COOH) sahip olan (R)-(-)-hidroksi asitler kullanılmaktadır (Lee *et al.* 1994).

PHB oldukça aktif bir bileşik olup D-(-) konfigürasyonundadır. PHB solüsyonları ve PHB'tan yapılan filmler içlerinden geçen polarize ışığın konumunu değiştirmektedir. Bu optik izomerler buldukları ortamda kiral merkezlerinden dolayı kuvvetli bağlanma özelliğine sahiptirler ve kromatografide kullanılabilirler. Bu nedenle PHB'ın yağ/su emülsiyonları için emülsifikasyon ajanı olarak kullanılması da mümkün olmaktadır (Holmes 1985).

D-(-)-3-hidroksibütirat monomerlerinden saf kimyasal maddelerin organik sentezinin gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Bunlardan Hindistan mısırında bulunan bir zararlıın eşey hormonu, balarısı hormonu, *Cerambycidae* familyasından bir böceğin koruyucu substratı ve güzel kokulu S-citrenolol gibi kimyasallar sayılabilir (Holmes 1985).

Ayrıca; PHB kolay şekil alabildiğinden ve parçalanabilme özelliğinden dolayı daha çok paketlenme malzemesi olarak kullanılmaktadır (Madison and Huisman 1999). PHB ve kopolimerleri preslenebilmekte, biçimlendirilebilmekte, lif haline dönüştürülebilmekte, filmleri yapılabilmekte ve sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir. Biyolojik olarak parçalanabildiklerinden tek kullanımlık ürünlerin üretimi için biyoplastikler ilgi çekmişlerdir. Tıraş bıçağı, hijyenik kadın ürünleri, çocuk bezleri, tek kullanımlık mutfak malzemeleri, şampuan şişeleri gibi ürünlerin imalatında kullanılmaktadır (Lafferty *et al.* 1988).

Ayrıca, biyoplastikler, özellikle uzun yan zincire sahip olan PHB'lar, basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılabilirler. Lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem

öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların üretiminde de PHB kullanılmaktadır (Madison and Huisman 1999, Weber 2000, Lootz *et al.* 2001).

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 korumada, parlaklık sağlamada, aroma kaybını önlemek amacıyla da PHB'lar kullanılmaktadır (Lee 1996).

## 2.5 Bakterilerde PHB Üretimi

Biyoplastikler, toprak, deniz ve tatlı su ve bunların sedimentleri gibi değişik çevrelerden izole edilen, heterotrofik ve ototrofik aerobik, fotosentetik anaerobik bakteriler, *Actinomyces*'ler, Siyanobakteriler, anaerobik yağ asiti okside eden bakteriler, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler gibi bir çok prokaryotik mikroorganizma tarafından sentezlenmektedirler (Findlay and White 1983, Labuzek and Radecka 2001).

PHA elde edilmesinde kullanılan bakteriler, sentez için gereken kültür şartlarına bağlı olarak 2 gruba ayrılabilir: Birinci grup bakteriler PHA sentezi için karbon kaynağının fazlalığına ve azot, fosfor, magnezyum, kükürt gibi temel besinlerin sınırlandırılmasına ihtiyaç duyarken (örneğin; *Alcaligenes eutrophus*), ikinci grup bakteriler PHA sentezi için besin sınırlandırılmasına ihtiyaç duymamakta ve gelişme boyunca polimer biriktirebilmektedir (örneğin; *Azotobacter vinelandii* mutant suşu) (Khanna and Srivastava 2005).

PHA'nın endüstriyel üretiminde hücrenin ucuz karbon kaynağından yararlanma yeteneği, gelişme oranı, polimer sentezleme oranı, maksimum polimer biriktirme kapasitesi gibi bir çok faktör mikroorganizmanın seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır (Yamane, 1992, Yamane 1993, Yu and Wang 2001).



Biyoplastik üretiminde karbon kaynağı olarak genellikle glukoz, sukroz, yağ asitleri, alkanlar, kloroalkanoik asit, bütirik asit, pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksiheksanoik asit; azot kaynağı olarak amonyum klorür, amonyum asetat, balık peptonu, amonyum sülfat gibi bileşikler kullanılmaktadır (Doi *et al.* 1986, Kato *et al.* 1992, Tanaka *et al.* 1993, Page and Cornish 1993, Jan *et al.* 1996, Braunegg *et al.* 1998).

### **2.5.1 *Alcaligenes* cinsi bakterilerde PHB üretimi**

Endüstriyel biyoplastik üretiminde en fazla çalışılan *Alcaligenes eutrophus* (*Ralstonia eutropha*) bakterisinin karbon kaynağı olarak fruktoz kullanıldığında hücre kuru ağırlığının %80'ine varan verimle PHB biriktirdiği bildirilmiştir (Kim *et al.* 1994). Beaulieu *et al.* (1995), *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 suşunun amonyum sülfat ve şeker kamışı melası içeren besiyerinde geliştirildiğinde PHB veriminin %26 olduğunu hesaplamışlardır. Kim *et al.* (1994), *Alcaligenes eutrophus* NCIMB 11599 suşunun farklı zamanlarda ve amonyumu sınırlı şartlarda PHB üretimini incelerken, en yüksek hücre yoğunluğu sırasında sınırlandırılan amonyumun PHB veriminde %76'lık bir artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Tanaka *et al.* (1993), L-laktat içeren besiyerinde gelişen *Alcaligenes eutrophus*'un %55 verimle PHB biriktirdiğini bildirmişlerdir.

*Alcaligenes latus* bakterisi de bir çok karbon kaynağını kullanarak yüksek PHB verimi sağlamaktadır (Lafferty *et al.* 1988). *Alcaligenes latus* DSM 1123 suşu 35 °C'de hem gelişebilmekte hem de PHB üretebilmektedir. Bu suş hücre kuru ağırlığının %80'i kadar bir verimle PHB üretebilmesi için 5 saate ihtiyaç duyar. Azot sınırlandırmasıyla bu suşun PHB verimi %50'den %87'ye çıkarılabilmektedir (Wang and Lee 1997). *Alcaligenes latus* türleri melas veya şeker şurubundan PHB elde etmede de kullanılmaktadır. *Alcaligenes latus* ATCC 29713 suşu hücre kuru ağırlığının %63'ü kadar verimle PHB biriktirmektedir. Dört farklı azot kaynağı, amonyum klorid, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve üre kullanıldığında sadece ilk ikisinin bakterilerin gelişmesini ve PHB üretimini desteklediği bildirilmiştir (Grothe *et al.* 1999).

### 2.5.2 *Azotobacter* cinsi bakterilerde PHB üretimi

Borman *et al.* (1998), *Azotobacter beijerinckii*'nin azot kaynağı olarak kazein, pepton, maya özütü, kazamino asit ve üre; karbon kaynağı olarak glukoz veya sukroz kullanıldığı besiyerinde geliştirdiklerinde, azot sınırlandırması olmadan %50'ye varan verimle PHB üretebileceğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, oksijeni sınırlandırılmış şartlar altında PHB üretiminin arttığı bildirilmiştir.

*Azotobacter vinelandii* UWD suşu glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz gibi karbon kaynakları ile şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, mısır şurubu, malt ekstraktı gibi kompleks karbon kaynaklarından yüksek oranda PHB biriktirmektedir (Page 1989, Page 1992a). Page and Knosp (1989), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun glukoz ve amonyum asetat veya azot içeren besiyerinde 24 saat boyunca geliştirmişler ve hücre kuru ağırlığının sırasıyla %65 ve %75'i oranında PHB biriktirdiğini bildirmişlerdir. Page *et al.* (1995), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunu glukoz ve balık peptonu içeren besiyerinde geliştirdiklerinde %80 verimle PHB elde etmişlerdir.

Ateş ve Ekmekçi (2001), *Azotobacter chroococcum* (TEM)'un pancar melası içeren besiyerinde %12,1 verimle PHB ürettiğini bildirmişlerdir. *Azotobacter chroococcum*'un PHB üretimi için ucuz karbon kaynağı olarak nişasta kullanıldığında ve oksijen sınırlandırması uygulandığında PHB verimini arttırarak, %20'den %46'ya çıktığı rapor edilmiştir (Kim 2000).

### 2.5.3 *Bacillus* cinsi bakterilerde PHB üretimi

*Bacillus* sp. türlerinde PHB, sporulasyon için hücre içi enerji deposu olarak kullanılmaktadır. *Bacillus cereus*'ta PHB birikimi spor oluşumundan hemen önce maksimum düzeye ulaşır (Nickerson *et al.* 1981). Benoit *et al.* (1990), *Bacillus thuringiensis*'in durgun fazdaki sporulasyon sırasında PHB'ın kullanıldığını bildirmişlerdir. Lach *et al.* (1990)'a göre *Bacillus megaterium* PV 302 suşu hücre kuru ağırlığının %16'sı kadar PHB biriktirmektedir. Kato *et al.* (1992), *Bacillus megaterium*

B-124 suşunun hücre kuru ağırlığının %20'si kadar PHB biriktirdiğini bildirmişlerdir. Gouda *et al.* (2001), %2 melas içeren besiyerinde gelişen *Bacillus megaterium*'dan %46,2 oranında PHB elde etmişlerdir. Bazı araştırmalarda ise, bazı *Bacillus* sp. suşlarının hücre kuru ağırlığının %50'sini PHB şeklinde biriktirdiği ortaya konmuştur (Chen *et al.* 1991, Dave *et al.* 1996, Beyatlı *et al.* 1999). Law *et al.* (2001), aktif çamurdan izole edilen *Bacillus* sp. suşlarının arpa ve soya atık suyunda geliştirilmesiyle HF-1 suşunun %19,22, HF-2 suşunun %10,18 oranında PHB biriktirdiğini rapor etmişlerdir.

Mercan ve Beyatlı (2001), *Bacillus sphaericus* suşlarında PHB üretiminin %5,00-25,88 arasında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu suşların geliştirildiği besiyerine %0,2 oranında beef ekstrakt eklendiğinde bazı suşların %32,50 verimle PHB ürettiği bulunmuştur.

Wu *et al.* (2001), melaslı besiyerinde gelişen *Bacillus* cinsi bakterilere uygulanan oksijen sınırlandırmasının sporulasyona neden olduğunu ve PHB üretiminin düştüğünü, azot ve fosfor oranının karbon kaynağına göre düşük olduğu besiyerinde ise PHB üretiminin arttığını ve *Bacillus* sp. Jma5 suşunun PHB veriminin %25-35 olduğunu bildirmişlerdir.

#### **2.5.4 *Pseudomonas* cinsi bakterilerde PHB üretimi**

Hoffman *et al.* (2000), yaptıkları bir çalışmada, glukonat veya asetatın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerlerinde gelişen *Pseudomonas* sp. bakterilerinin orta uzunlukta PHA zincirleri sentezlediğini bildirmişlerdir. Huisman *et al.* (1989), karbon kaynaklarının varlığında ve sınırlandırılmış şartlar altında PHB üretimi yapmayan *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterilerinin yağ asitlerinde geliştirildiklerinde orta uzunlukta PHA zincirleri sentezlediklerini ortaya çıkarmışlardır.

*Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas testotereni*'nin n-alkoller ve n-alkanoik asitlerin varlığında PHB ürettikleri bildirilmiştir (Holmes 1985, Anderson and Dawes 1990). Karaboz ve Umay (1994), karbon kaynağı olarak metanol içeren besiyerinde geliştirilen *Pseudomonas extorquens* bakterisinin %27 verimle PHB ürettiğini göstermişlerdir. Ateş ve Ekmekçi (2001), pancar melası içeren besiyerinde gelişen *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 suşunun %22,98 verimle PHB ürettiğini bildirmişlerdir.

Fakültatif metilotrof *Pseudomonas* sp. 135 suşu, karbon kaynağı olarak metanol içeren besiyerinde amonyumun sınırlandırıldığı koşullar altında %55, magnezyumun sınırlandırıldığı koşullar altında %42,5 ve fosfatın sınırlandırıldığı koşullar altında %34.5 oranında PHB üretmektedir (Daniel *et al.* 1992).

Xi *et al.* (2000), *Pseudomonas stutzeri* 1317 suşunu glukoz, glukonat, yağ asiti ve alkol içeren besiyerinde geliştirdiklerinde PHA yapısının ortamdaki yağ asiti ve alkollere bağlı olarak değiştiğini ve %50 verimle PHB elde edildiğini bildirmişlerdir.

Durner *et al.* (2000), farklı C/N oranında hazırlanmış oktanoat ve amonyum içeren besiyerinde *Pseudomonas oleovorans* bakterisini geliştirmişler ve C/N oranı arttığında PHA birikiminin arttığını ve bunun azot sınırlandırmasından kaynaklandığını göstermişlerdir.

Besiyerinde karbon kaynağı olarak glukoz ve ksiloz kullanıldığında *Pseudomonas pseudoflava*'nın PHB veriminin %22, arabinoz kullanıldığında %17 olduğu bildirilmiştir. Arabinoz ve ksiloz içeren besiyerinde PHB birikiminin son aşamasında azot sınırlandırıldığında verim düşmektedir (Bertrand *et al.* 1990).

### 2.5.5 *Rhizobium* cinsi bakterilerde PHB üretimi

Bonartseva *et al.* (1994) *Rhizobium leguminosorum*, *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium galega*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli* türleriyle yapılan çalışmalarda, PHB üretiminin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğunu göstermişlerdir.

*Rhizobium phaseoli*'nin sukroz içeren potasyum nitratlı besiyerinde %65 verimle (Bonartseva *et al.* 1994, Beyatlı 1996), *Rhizobium meliloti*'nin fruktozlu ortamda büyük miktarda PHB biriktirdiği (Jan *et al.* 1996) bildirilmiştir.

Oksotrofik *Rhizobium etli* CE3 suşunun biotin ve tiamin yokluğunda yüksek miktarlarda PHB biriktirdiği bildirilmiştir (Encarnación *et al.* 1995).

### 2.5.6 Halofilik bakterilerde PHB üretimi

Lillo and Valera (1990), halofilik bakterilerden *Halobacter mediterranei* bakterisinin glukoz ve nişasta içeren besiyerinde geliştirilip fosfor sınırlandırması uygulandığında %60 verimle PHB ürettiğini bildirmişlerdir.

Castillo *et al.* (1986) yaptıkları bir çalışmada %25 tuz, %1 glukoz ve %0,1 oranında maya özütü içeren besiyerinde gelişen *Haloferax volcanii*, *Haloferax gibbonsii* ve *Haloferax hispanicum* bakterilerinin sırasıyla hücre kuru ağırlıklarının %7, %1,2 ve %2.4'ü oranında PHB biriktirdiklerini bildirmişlerdir.

*Halomonas boliviensis* LC1 suşunun substrat olarak nişasta hidrolizatı kullanıldığında hücre kuru ağırlığının %56'sı oranında PHB biriktirdiğini, *Halomonas boliviensis* hücrelerinin oksijen sınırlandırmasının olmadığı koşullarda bu oranın %35'e düştüğü rapor edilmiştir (Quillaguamán *et al.* 2005).

### **3. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

#### **3.1 Materyaller**

##### **3.1.1 Bakteri izolatları**

Bu çalışmada PHB üreticisi halofilik bakterileri izole etmek amacıyla Tuz Gölü (Ankara ili tarafı) ve Acıgöl (Denizli)'den 2005 Eylül'de toplanan toprak, çamur, tuz ve su örnekleri kullanılmıştır. Örnekler steril cam kavanozlar içerisinde laboratuvara nakledilmiştir.

PHB üreticisi suş olarak Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyal Biyoteknoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan sağlanan *Pseudomonas aeruginosa* NRLL R23 suşu kullanılmıştır.

##### **3.1.2 Besiyerleri ve solusyonlar**

Örneklerden zenginleştirme ve PHB üretimi için %6 NaCl içeren Nutrient Broth (NB) (Merck), bakteri izolasyonu için ise %6 NaCl içeren Nutrient Agar (NA)(Merck) besiyerleri kullanılmıştır (Ek 1).

Yapılan biyokimyasal testlerde Triple Sugar Iron Agar (TSI), MR-VP Broth, Triptonlu su, Simmon's Sitrat Agar, Christensen Üre Agar besiyerleri kullanılmıştır (Ek 1).

PHB miktarı tayin çalışmalarında ise saf kloroform (Merck), saf sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck) ve 2N hidroklorik asit (HCl) (Merck) ve standart olarak *Alcaligenes* sp.'den saflaştırılan Sigma marka Poli-β-Hidroksibütirat kullanılmıştır.

### **3.1.3 Boyalar**

PHB granüllerinin boyanmasında Sudan Black B boyası ve safranin, Gram boyama için kristal viyole ve bazik fuksin boyaları kullanılmıştır (Ek 2).

### **3.1.4 Mikroskopik inceleme**

İzolatlarda PHB granülü olup olmadığını ve hücre morfolojisini belirlemek için Olympus CX21 (USA) marka ışık mikroskobu; hareket yeteneklerinin belirlenmesi için Prior marka faz-kontrast mikroskobu kullanılmıştır.

### **3.1.5 Spektrofotometrik ölçüm**

PHB miktarları Unico UV-VIS 2802 PC marka spektrofotometrede 235 nm de ölçülmüştür.

## **3.2 Yöntem**

### **3.2.1 Halofilik bakterilerin izolasyonu ve kültürü**

Toplanan çamur, tuz ve toprak örnekleri 1:1 oranında (g/ml) steril serum fizyolojikte süspansiyon edilmiştir. Üstte kalan sıvıdan 500 µl alınarak zenginleştirici besiyeri olarak kullanılan %6 NaCl içeren 2,5 ml NB besiyerine inokule edilmiştir. Su örnekleri ise 2,5 ml NB besiyerine direkt 500 µl olacak şekilde inokule edilmiştir. 30 °C'de 120 rpm'de 1 hafta boyunca geliştirilen kültürlerden %6 NaCl içeren NA besiyerlerine ekilerek 7-10 gün sonra gelişen tek kolonilerden yatık NA besiyerlerine seçimler yapılmıştır.

### **3.2.2 PHB granüllerinin boyanması**

İzolatların PHB üretimlerini belirlemek amacıyla Sudan Black B boyası ile boyama yapılmıştır (Burdon 1946). Bir haftalık NB'daki sıvı kültürlerden lam üzerine yayma yapılarak örnek kurutulup birkaç defa alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Lam üzerine birkaç damla Sudan Black B (%0,3 oranında %70'lik etil alkoldeki çözeltisi) boyası damlatılarak 10 dakika bekletildikten sonra ksilenle dekolorizasyon yapılmıştır. Lam üzerine daha sonra safranin (%0,5'lik sulu çözeltisi) boyası ilave edilerek 10 saniye bekledikten sonra preparatlar hafifçe akan suda yıkanmıştır. Preparatlar havada tamamen kuruduktan sonra immersiyon yağı damlatılarak 100X'lük objektifte incelenmiştir

### **3.3 Morfolojik ve Biyokimyasal Testler**

#### **3.3.1 Gram boyama ve hareket testi**

30 °C'de 120 rpm de 48 saat boyunca geliştirilen sıvı NB kültürlerden lam üzerine yayma yapılarak Gram boyama yapılmış, ışık mikroskobunda 100X'lük objektifte incelenmiştir.

Hücrelerin hareket yeteneği yine 48 saat boyunca gelişen kültürlerden hazırlanan preparatların 100X'lük objektifte faz kontrast mikroskobunda incelenerek belirlenmiştir.

#### **3.3.2 Katalaz testi**

İzolatların katalaz aktiviteleri %6 NaCl içeren NA besiyerinde geliştirilen 5 günlük kültürler üzerine %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak yapılmıştır (Atlas *et al.* 1984).



### **3.3.3 Oksidaz testi**

Oksidaz aktivitesi, %6 NaCl içeren NA besiyerinde geliştirilen 5 günlük kültürlerin üzerine %1'lik tetrametil- $\rho$ -fenilendiamin ayırıcı damlatılarak yapılmıştır (Kovac's 1956). Kolonilerin mor renge dönüşmesi pozitif, renk değiştirmemesi negatif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.3.4 Amilaz testi**

Amilaz aktivitesi, %6 NaCl ve %1 çözümlü nişasta içeren NA besiyerinde geliştirilen 5 günlük kültürler üzerine Lugol ayırıcı dökülerek belirlenmiştir (Barrow and Feltham, 1993).

### **3.3.5 H<sub>2</sub>S üretimi**

H<sub>2</sub>S üretimini belirlemek amacıyla %6 NaCl içeren TSI besiyerine ekim yapılmış, 14 günlük inkübasyon süresi sonunda besiyerinde meydana gelen renk değişimine göre H<sub>2</sub>S üretimi belirlenmiştir (Kelley and Post 1982).

### **3.3.6 Şekerlerden asit üretimi**

Şekerlerden asit üretimini belirlemek amacıyla D(+)-glukoz, D(+)-galaktoz, maltoz, laktoz ve sakkaroz olmak üzere 5 tip şeker, filtre edilerek %0,5 oranında fenol red içeren steril besiyerine eklenmiş, 12 günlük inkübasyon süresi sonunda renk değişimi gözlenerek şekerlerden asit üretimi saptanmıştır (Atlas *et al.* 1984).

### **3.3.7 Triptofandan indol oluşumu testi**

Bu test, %1 tripton ve %6 NaCl içeren triptonlu suda geliştirilen 14 günlük sıvı kültürlerin üzerine Kovac's ayracı eklenerek yapılmıştır (Kovacs 1928). Besiyerinin üst kısmında kırmızı halkanın oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

### **3.3.8 Sitratın kullanımı testi**

İzolatlar %6 NaCl içeren Simmon's Sitrat Agar besiyerine ekilmiş ve 14 günlük inkübasyon sonucunda besiyerinde meydana gelen renk değişimi gözlenerek belirlenmiştir. Besiyerinin renginin yeşilden maviye dönmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Atlas *et al.* 1984).

### **3.3.9 Metil Red ve Voges-Proskauer testi**

Bu testler için %6 NaCl içeren MR-VP Broth besiyeri hazırlanmış, 14 günlük inkübasyon sonrasında kültürlerin üzerine organik asitlerin varlığını belirlemek için metil red indikatörü damlatılarak, asetoin oluşumunu belirlemek için Barrit's A ve B ayıraçları damlatılarak belirlenmiştir (Barritt 1936). Metil Red testinde besiyerinin renginin kırmızıya dönmesi pozitif, sarıya dönmesi negatif olarak, Voges-Proskauer testinde besiyerinin üst kısmında pembeden parlak kırmızıya kadar değişen halka oluşumu pozitif, halka oluşmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.3.10 Üreaz aktivitesi**

Bu test için Christensen Agar besiyeri hazırlanmış ve izolatların üreyi kullanıp kullanmadıkları 1 haftalık inkübasyon süresi sonunda besiyerinde meydana gelen renk değişimi gözlenerek belirlenmiştir (Christensen 1946). Rengin sarıdan pembeye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### 3.4 PHB Miktarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan bakterilerin oluşturduğu PHB miktarı Bonartseva and Myshkina'nın (1985) metoduna göre belirlenmiştir. Buna göre;

- 1) İzolatlar %6 oranında NaCl içeren NB besiyerinde hücre yoğunluğu 600 nm'de 0.3-0.5 (OD) olacak şekilde aktifleştirilmiştir.
- 2) Aktifleştirilen kültürler, 250 ml'lik erlenlerde hazırlanan 100 ml %6 oranında NaCl içeren NB besiyerine %2 oranında aşılınmış ve 30 °C'de 120 rpm'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- 3) İnkübasyon sonunda hücre kültürü 8000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.
- 4) Santrifüj sonunda oluşan sıvı kısım atılarak pelet 50 °C'de 1 gece kurutulmuş ve peletlerin hücre kuru ağırlıkları ölçülmüştür.
- 5) Pelet 5 ml steril distile su ile homojenize edilmiş, hücrelerin lize olduğundan emin olmak için 1 gece +4 °C'de bekletilmiştir (Castillo *et al.* 1986).
- 6) 1:1 oranında kültür ve 2N HCl karışımı 100 °C'lik su banyosunda 2 saat tutulduktan sonra karışım 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir.
- 7) Pelet üzerine 5 ml saf kloroform eklenmiş, ağızları iyice kapatılarak 1 gece 30 °C'de 120 rpm'de çalkalamalı etüvde bekletilmiştir.
- 8) Bu süre sonunda örnekler 5000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek PHB çöktürülmüştür. Kloroform fraksiyonundan 0,1 ml alınıp 40 °C'de 15-20 dakika bekletilerek kloroform uçurulmuş, tüplere 5 ml saf H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konularak 100 °C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir.
- 9) Son aşamada örneklerin optik yoğunluk değeri 235 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülmüştür. Örneğin içerdiği PHB miktarı standart PHB değeri ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir.

#### Standartın hazırlanışı:

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 µg/ml<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda değişen miktarlarda *Alcaligenes* sp'den saflaştırılan Sigma marka poli-β-hidroksibütirat kullanılarak PHB standart

solusyonları hazırlanmıştır, izolatların PHB üretimi standart eğri ile karşılaştırılarak g/l olarak hesaplanmıştır.

### **İstatistiksel analiz:**

İzolatların hücre kuru ağırlığı (g/l) ve PHB üretimi (g/l) arasındaki korelasyon, Sperman's  $\rho$  katsayısına göre belirlenmiştir (Conver, 1971).

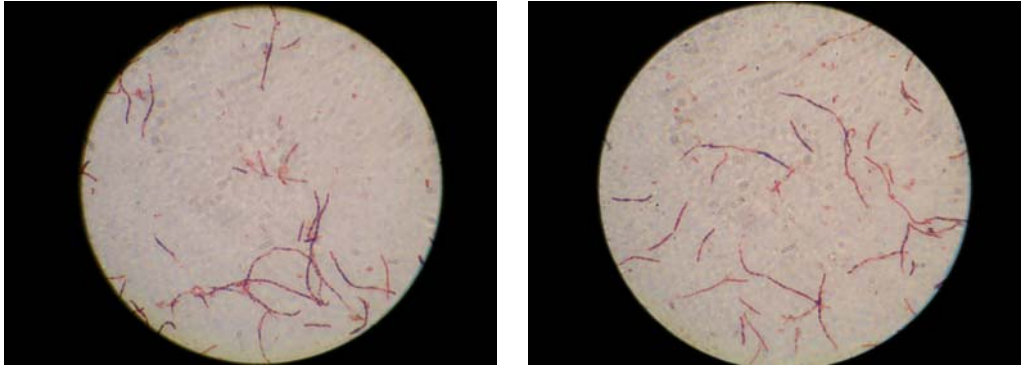
### **3.5 Galaktoz, $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ve Yeast Ekstraktın PHB Üretimi Üzerine Etkisi**

Maksimum PHB üreten izolat %6 NaCl içeren NB besiyerine sırasıyla %1, %2, %5 oranında filtrasyon yöntemiyle sterilize edilmiş D(+)-Galaktoz, %0,3 oranında Yeast ekstrakt ve %0,00375 oranında  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  eklenerek PHB verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Daha sonra, %1 oranında Galaktoz ve % 0,3 oranında Yeast ekstrakt içeren NB besiyerinde gelişen izolatın PHB üretim miktarı belirlenmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 PHB Üretim Miktarı Sonuçları

İzolatlardan PHB üreten ve üretmedikleri ilk aşamada Sudan Black B boyası ile granüller boyanarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). 70 izolatından 28 izolatın PHB ürettiği tespit edilmiş, bunlardan granül yoğunluğu en fazla olan 12 izolatın spektrofotometrik olarak PHB üretim miktarları belirlenmiştir. İzolatların PHB miktarları 0,123 – 0,519 g/l; PHB verim yüzdeleri ise hücre kuru ağırlıklarının %2,03 - %29,48'i arasında değişmiştir. 12 izolatından AG 27 %29.48 verimle en fazla PHB biriktiren izolat olurken, TG 24 %2,03 verimle en az PHB biriktiren izolat olmuştur. İzolatların hücre kuru ağırlıkları, PHB miktarları ve PHB verim yüzdeleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

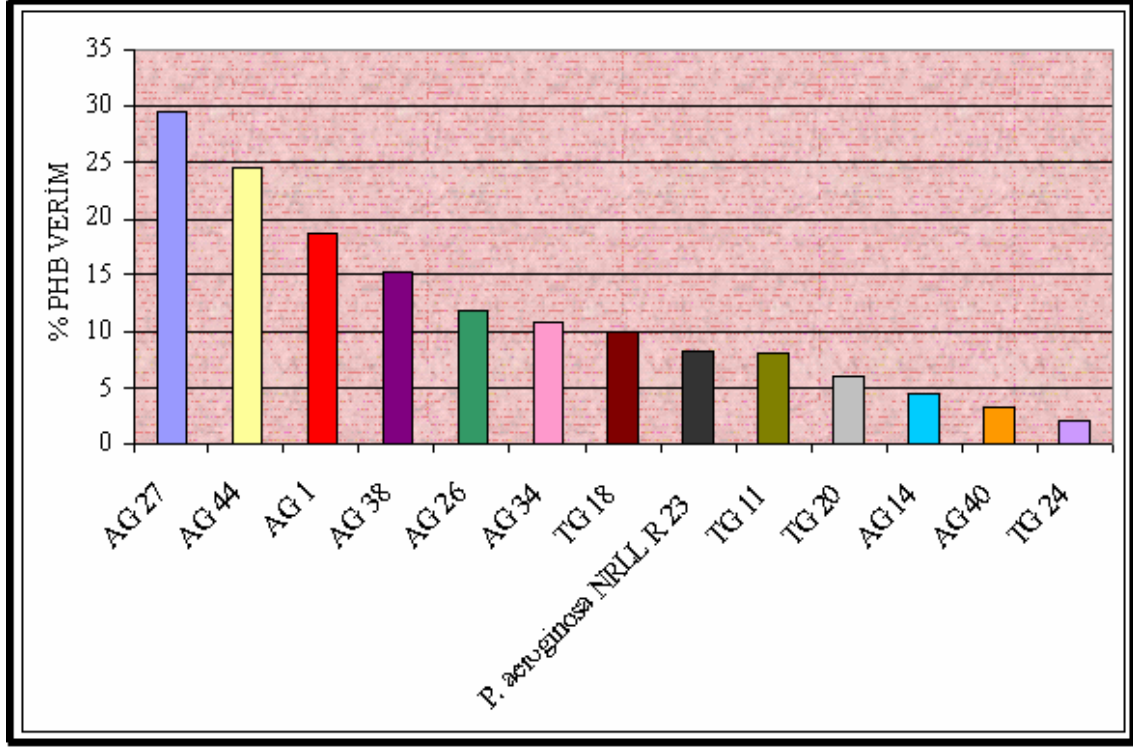


Şekil 4.1 Sudan Black B ile boyanmış AG 27 izolatında PHB granülleri

Çizelge 4.1 Halofilik bakteri izolatlarının PHB üretim miktarları

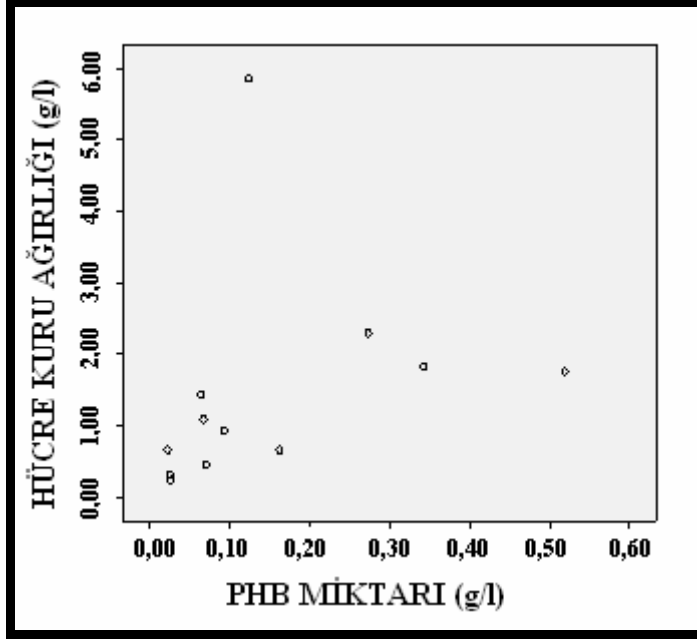
İZOLAT	TEKRAR	HÜCRE KURU AĞIRLIĞI (g/l)		PHB (g/l)		VERİM (%)	
			Ortalama		Ortalama		Ortalama
AG 27	1	1,7	1,76 ± 0,058	0,491	0,519 ± 0,025	28,8	29,48
	2	1,8		0,528		29,3	
	3	1,8		0,539		29,9	
AG 44	1	0,7	0,66 ± 0,058	0,164	0,162 ± 0,006	23,4	24,54
	2	0,7		0,167		23,8	
	3	0,6		0,155		25,8	
AG 1	1	1,8	1,83 ± 0,057	0,334	0,342 ± 0,007	18,5	18,68
	2	1,8		0,345		19,1	
	3	1,9		0,348		18,3	
AG 38	1	0,5	0,46 ± 0,066	0,076	0,070 ± 0,006	15,2	15,21
	2	0,4		0,072		18,0	
	3	0,4		0,064		16,0	
AG 26	1	2,3	2,30 ± 0,100	0,247	0,273 ± 0,025	10,7	11,86
	2	2,2		0,276		12,5	
	3	2,4		0,298		12,4	
AG 34	1	0,23	0,24 ± 0,012	0,021	0,026 ± 0,004	9,1	10,83
	2	0,25		0,027		10,8	
	3	0,25		0,030		12	
TG 18	1	0,9	0,93 ± 0,047	0,085	0,093 ± 0,008	9,4	10,00
	2	0,9		0,094		10,4	
	3	1,0		0,101		10,1	
TG 11	1	0,30	0,31 ± 0,015	0,023	0,025 ± 0,002	7,6	8,06
	2	0,31		0,025		8,0	
	3	0,33		0,028		8,4	
TG 20	1	1,11	1,09 ± 0,021	0,075	0,067 ± 0,007	6,7	6,14
	2	1,07		0,060		5,6	
	3	1,10		0,068		6,1	
AG 14	1	1,5	1,43 ± 0,057	0,070	0,064 ± 0,005	4,6	4,47
	2	1,4		0,063		4,5	
	3	1,4		0,059		4,2	
AG 40	1	0,6	0,66 ± 0,115	0,017	0,022 ± 0,006	2,9	3,33
	2	0,6		0,020		3,3	
	3	0,8		0,029		3,6	
TG 24	1	5,8	5,86 ± 0,115	0,109	0,123 ± 0,016	1,8	2,09
	2	5,8		0,120		2,0	
	3	6,0		0,142		2,3	
<i>P. aeruginosa</i> NRLL R 23	1	0,8	0,8 ± 0,000	0,071	0,066 ± 0,004	8,8	8,25
	2	0,8		0,063		7,8	
	3	0,8		0,066		8,2	

Şekil 4.2’de ise halofilik bakteri izolatlarının PHB verim yüzdeleri grafiksel olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Halofilik bakteri izolatları'nın PHB verim yüzdeleri

İzolatların hücre kuru ağırlıkları (g/l) ile ürettikleri PHB miktarı arasında (g/l) korelasyon olup olmadığı incelenmiş, Spearman's  $\rho$  katsayısı 0.673 olarak bulunmuş ve 0.05 düzeyinde önemli bir korelasyonun olduğu saptanmıştır. İzolatlara ait verilerin korelasyon grafiği Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Halofilik bakteri izolatlarında hücre kuru ağırlığı ve PHB miktarı arasındaki korelasyon

Çalışmanın ikinci bölümünde en yüksek PHB veriminin elde edildiği AG 27 izolatı farklı konsantrasyonlarda Galaktoz, Yeast ekstrakt ve  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün bulunduğu NB besiyerinde geliştirilmiş ve bu maddelerin PHB verimi üzerine etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.2).

AG 27 izolatının PHB veriminin %1 oranında Galaktoz içeren besiyerinde geliştiğinde %43,47'ye; %2 oranında Galaktoz içeren besiyerinde geliştiğinde %42,09'a; %5 oranında Galaktoz içeren besiyerinde geliştiğinde %42,69'a; %0,3 oranında Yeast ekstrakt içeren besiyerinde geliştiğinde %52,20'ye çıktığı; %0,00375 oranında  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren besiyerinde geliştiğinde ise %27,14'e düştüğü belirlenmiştir.

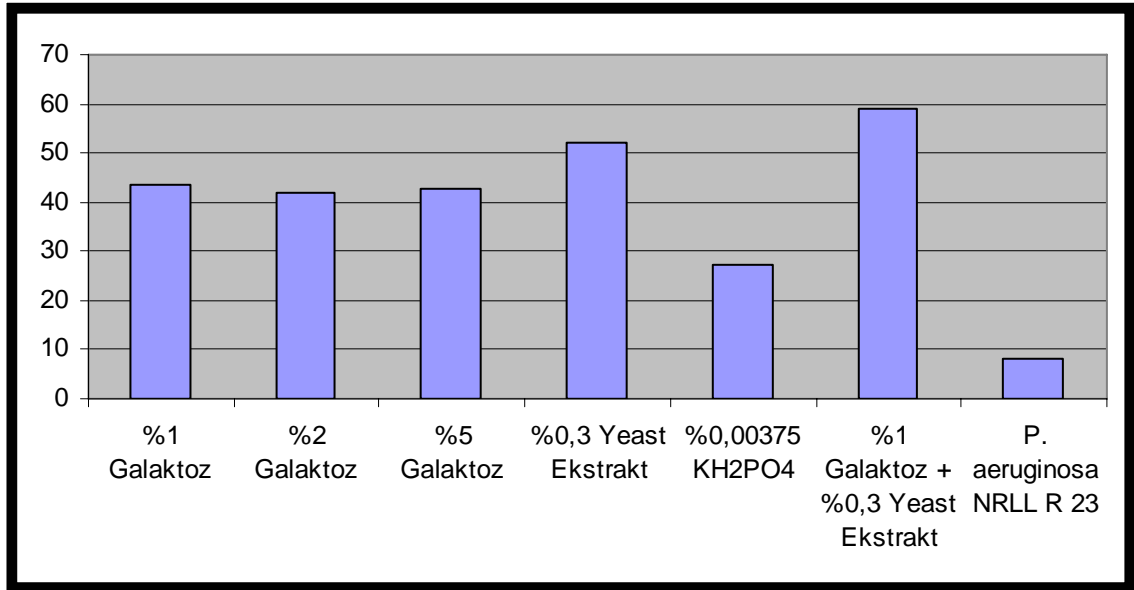
NB besiyerine %1 oranında Galaktoz ve %0,3 oranında Yeast ekstrakt aynı anda eklendiğinde ise AG 27 izolatının PHB veriminin %59,19'a çıktığı belirlenmiştir.



Çizelge 4.2 AG 27 Halofilik bakteri izolatının Galaktoz, Yeast ekstrakt ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eklendiğinde NB besiyerinde PHB üretimi

NB'a Eklenen Bileşen	KONSANTRASYON (%)	TEKRAR	HKA (g/l)		PHB (g/l)		VERİM (%)	
				Ortalama		Ortalama		Ortalama
Galaktoz	1	1	2,6	2,68 ± 0,223	1,068	1,165 ± 0,120	41,07	43,47
		2	2,4		1,044		43,50	
		3	2,5		1,059		42,36	
		4	2,8		1,253		44,75	
		5	2,8		1,261		45,03	
		6	3,0		1,308		43,60	
	2	1	3,2	2,96 ± 0,163	1,476	1,246 ± 0,157	46,12	42,09
		2	3,1		1,345		43,38	
		3	3,0		1,318		43,93	
		4	2,9		1,160		40,00	
		5	2,8		1,078		38,50	
		6	2,8		1,103		39,39	
	5	1	2,7	2,56 ± 0,081	1,181	1,093 ± 0,043	43,74	42,69
		2	2,6		1,084		41,69	
		3	2,5		1,056		42,24	
		4	2,6		1,098		42,23	
		5	2,5		1,074		42,96	
		6	2,5		1,065		42,60	
Yeast ekstrakt	0,3	1	2,4	2,36 ± 0,139	1,193	1,232 ± 0,059	49,70	52,20
		2	2,5		1,338		53,52	
		3	2,4		1,264		52,66	
		4	2,4		1,224		51,00	
		5	2,3		1,196		52,00	
		6	2,2		1,182		53,72	
Fosfat	0,00375	1	2,5	2,28 ± 0,213	0,663	0,619 ± 0,046	26,52	27,14
		2	2,4		0,639		26,62	
		3	2,5		0,654		26,12	
		4	2,1		0,604		28,76	
		5	2,2		0,619		28,13	
		6	2,0		0,536		26,80	
Galaktoz + Yeast ekstrakt	1 + 0,3	1	2,6	2,60 ± 0,089	1,555	1,539 ± 0,085	59,80	59,19
		2	2,7		1,618		59,92	
		3	2,7		1,694		62,74	
		4	2,5		1,438		57,52	
		5	2,6		1,475		56,73	
		6	2,5		1,457		58,28	

Çizelge 4.2'deki veriler kullanılarak elde edilen grafik ise Şekil 4.4'de görülmektedir.



Şekil 4.4 AG 27 Halofilik bakteri izolatının Galaktoz, Yeast ekstrakt ve KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eklendiğinde NB besiyerinde PHB üretimi

#### 4.2 Biyokimyasal Test Sonuçları

PHB üretimleri belirlenen 12 izolatın gram boyama, hareket yeteneklerinin incelenmesi, amilaz, oksidaz, katalaz, şekerlerden asit üretimi, H<sub>2</sub>S üretimi, triptofandan indol oluşumu, sitratın kullanımı, metil red, Voges-Proskauer ve üreaz testlerini içeren morfolojik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 On iki adet halofilik bakteri izolatının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları

İZOLAT TESTLER	AG 27	AG 44	AG 1	AG 38	AG 26	AG 34
Koloni Morfolojileri	basık, ortası merkezli	basık, krem rengi, koyu renk merkezli	basık, krem rengi, merkezsiz	basık, merkezli	basık, merkezli	basık, merkezsiz
Gram Boyama	(-) çubuk	(-) çubuk	(-) çubuk	(-) çubuk	(-) çubuk	(-) çubuk
Hareket	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
Katalaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oksidaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
Amilaz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
H <sub>2</sub> S Üretimi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D(+)-Glukoz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D(+)-Galaktoz	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Maltoz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Laktoz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sakkaroz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Triptofandan İndol Oluşumu	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sitratin Kullanımı Testi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Metil Red Testi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Voges-Proskauer Testi	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
Üreaz Testi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

Çizelge 4.3 On iki adet halofilik bakteri izolatının morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları (devam)

<b>İZOLAT</b> <b>TESTLER</b>	<b>TG 18</b>	<b>TG 11</b>	<b>TG 20</b>	<b>AG 14</b>	<b>AG 40</b>	<b>TG 24</b>
Koloni Morfolojileri	yatık, etrafi pürüzlü	yaygın, merkezli	yaygın, merkezli	basık, merkezsiz	basık, merkezli	basık, merkezsiz, pürüzlü
Gram Boyama	(-), çubuk	(+), sporlu çubuk	(+), sporlu çubuk	(-), çubuk	(-), çubuk	(-), çubuk
Hareket	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
Katalaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Oksidaz	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Amilaz	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
H <sub>2</sub> S Üretimi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D(+)-Glukoz	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
D(+)-Galaktoz	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
Maltoz	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Laktoz	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sakkaroz	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
Triptofandan İndol Oluşumu	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Sitratın Kullanımı Testi	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Metil Red Testi	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Voges-Proskauer Testi	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
Üreaz Testi	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)

On iki halofilik bakteri izolatından 2'si gram (+), 10'u ise gram (-); 7'si hareketli, 5'i hareketsiz, 1'i oksidaz (-), 11'i oksidaz (+), 1'i amilaz (+), 11'i amilaz (-), 1'i glukoz (+), 11'i glukoz (-), 1'i maltoz (+), 11'i maltoz (-), 1'i sakkaroz (+), 11'i sakkaroz (-), 3'ü galaktoz (+), 9'u galaktoz (-), 3'ü üre (+), 9'u (-), 4'ü Voges-Proskauer (-), 8'i (+), 12'si katalaz (+), laktoz (-), sitrat (+), metil red (-), indol (-), H<sub>2</sub>S (-) olarak bulunmuştur.

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda bir çok toprak bakterisinin PHB üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatürlere dayanarak değerlendirildiğinde Tuz Gölü (Ankara ili tarafı) ve Acıgöl (Denizli)'den izole edilen halofilik bakterilerden AG 27 izolatının besiyerine C kaynağı olarak %0,3 oranında Yeast ekstrakt ve %1 oranında D(+)-galaktoz ilavesiyle %59,19'luk bir verimle PHB biriktirdiği belirlenmiştir.

PHB üretiminde bugüne kadar üzerinde en çok çalışılan *Alcaligenes eutrophus*'un C kaynağı olarak fruktozun kullanıldığı besiyerinde geliştirilmesiyle elde edilen %80'e varan PHB verimiyle (Kim *et al.* 1994), ve *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun glukoz ve balık peptonu içeren besiyerinde geliştirildiğinde elde edilen %80'e varan verimle (Page *et al.* 1995) kıyaslandığında, AG 27 izolatından elde edilen PHB verimi (hücre kuru ağırlığının %59,19'u) %25 oranında düşük bulunmuştur. *Alcaligenes latus* DSM 1123 suşuna azot sınırlandırması uygulandığında bu suştan elde edilen %87'lik verimle (Wang and Lee 1997) kıyaslandığında ise, %31 oranında düşük bulunmuştur.

Diğer yandan, bazı *Bacillus* sp. suşlarının hücre kuru ağırlığının %50'ye varan verimle PHB biriktirdiği bildirilmiştir (Chen *et al.* 1991, Dave *et al.* 1996, Beyatlı *et al.* 1999). PHB verimi açısından AG 27 izolatı *Bacillus* sp.'ye benzerlik göstermektedir.

Fakültatif metilotrof *Pseudomonas* sp. 135 suşunun, karbon kaynağı olarak metanol içeren besiyerinde amonyum sınırlandırması altında %55, magnezyum sınırlandırması altında %42,5 ve fosfat sınırlandırması altında %34,5 oranında PHB ürettiği Daniel *et al.* (1992) tarafından bildirilmiştir. AG 27 izolatının PHB verimi *Pseudomonas* cinsi bakterilerinkine benzerlik göstermektedir.

PHB üretiminin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğu gösterilen *Rhizobium* cinsi bakterilerle AG 27 izolatı karşılaştırıldığında, *Rhizobium phaseoli*'nin, sukroz içeren potasyum nitratlı besiyerinde %65 verimle PHB ürettiği (Bonartseva *et al.* 1994, Beyatlı

1996); AG 27 izolatının ise %0,3 oranında Yeast ekstrakt ve %1 oranında D(+)-galaktoz içeren besiyerinde geliştiğinde %59,19'luk bir verime sahip olduğu belirlenmiştir.

AG 27 izolatı PHB verimi açısından; halofilik bakterilerden *Haloferax mediterranei*'ye benzerlik göstermektedir. *H. mediterranei* glukoz ve nişasta içeren besiyerinde geliştirilip fosfor sınırlandırılması uygulandığında %60 verimle PHB üretmektedir (Lillo and Valera, 1990).

Quillaguamán *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada yine halofilik bakterilerden *Halomonas boliviensis* LC1 suşunun substrat olarak nişasta hidrolizatı kullanıldığında hücre kuru ağırlığının %56'sı oranında PHB biriktirdiği rapor edilmiş ve PHB veriminin AG 27 izolatı ile benzer olduğu görülmüştür.

Yapılan bu çalışma Acıgöl (Denizli)'den izole edilen AG 27 izolatı endüstriyel amaçlı PHB üretiminde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmayla, Tuz Gölü ve Acıgölden izole edilen halofilik 12 adet bakterinin PHB üretim kapasiteleri ilk kez belirlenmiş olup AG 27 izolatının potansiyel olabileceği gösterilmiştir. Daha sonra yapılacak çalışmalarla halofilik bakteri/arkelerin daha kapsamlı olarak taranmasının yapılması ve AG 27 izolatının cins/tür düzeyinde tanımlanması gerekir.

## KAYNAKLAR

- Amass, W., Amass, A. and Tighe, B. 1998. A review of biodegradable polymers: use, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradable studies. *Polymer Int.*, 47; 89-144.
- Anderson, A. and Dawes, E. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54, 4, 450-472.
- Angelova, N. and Hunkeler, D. 1999. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.*, 17; 409-421.
- 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.
- Atlas, R. M., Brown, A. E., Dobra, K. W. and Miller, L. 1984. *Experimental Microbiology Fundamentals and Applications*. Macmillan Publishing Company, 78-96, London.
- Atlas, R.M. 1993. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications* 3rd Ed. p. 39-43.
- Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L. and Holmes, P.A. 1984. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate, *Journals of Materials Science*, 19; 2781-2794.
- Barnard, G.N. and Sander, J.K. 1989. The poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granule in vivo. A new insight based on NMR spectroscopy of whole cells. *J. Biol Chem*, 264; 3286-3291.
- Barritt, M. M. 1936. The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of a-naphthol. *J. Pathol. Bacteriol.* 42, 441-445.
- Barrow, G. I. and Feltham R. K. A. 1993 (eds.) *Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria*, 3rd ed., Cambridge, Cambridge University Press.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J. 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1, 165-169.
- Benoit, T.G., Wilson, G.R. and Baugh, C.L. 1990. Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Let. Appl. Microbiol.*, 10; 15-18.
- Bertrand, J.L., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A. and Chavarie, C. 1990. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalanoates from Pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 10, 3133-3138.
- Beyatlı, Y. 1996. Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, *KÜKEM Dergisi*, 19, 2, 23-32.
- Beyatlı, Y., Aslım, B. ve Mumcu, Z.N. 1999. Doğada Parçalanabilen Termobiyoplastiklerin Üretimi. Devlet Planlama Teşkilatı Projesi (DPT : 97K121150), s.21-37, Ankara.
- Bichler, C., Drittler, R., Langowski, H.C., Starnecker, A. and Utz, H. 1993. Biologisch abbaubare Verpackungsmaterialien-Die Losun des Mullproblems ? *Bioengineering*, 19; 9-17.
- Bluhm, T.L., Hamer, G.K. and Sundararajan, P.R. 1998. Isodiorphism in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) copolyesters, *Polymer Prepr.*, 29; 603.



- Bonartseva, G.A. and Myshkina, V.L. 1985. Fluorescence intensity of nodule bacteria (*Rhizobium meliloti*, *R. phaseoli*) differing in activity, grown in the presence of the lipophilic vital stain phosphine 3R. *Microbiology*, 54:4. 535-541.
- Bonartseva, G.A., Myskina, V.L. and Zagreba, E.D. 1994. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate content in cells of various *Rhizobium* species during growth with different carbon and nitrogen sources, *Microbiol.*, 63, 1, 45-48.
- Bormann, E.J., Leissner, M. and Beer, B. 1998. Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 84-88.
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R. C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol.*;54:1977-82.
- 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.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K.L. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65; 127-161.
- Burdon, K.L. 1946. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *J. Bacteriol.*, 52; 665-678.
- Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates. In: Mobley DP, editor. *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Munich: Hanser; p. 5-33.
- Castillo, R.F., Valera, R.F., Ramos, J.G. and Berraquero, F.R. 1986. Accumulation of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) by Halobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51,1, 214-216.
- Cain, R.B. 1992. Microbial degradation of synthetic polymers. In: Frey *et al.* (eds) *Microbial Control of Pollution*. 48th Symposium of the Society for general microbiology at University of Cardiff, pp. 293-338.
- Chen, G.Q., König, K.H. and Lafferty, R.M. 1991. Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Mic. Lett.*, 84, 174-176.
- Christensen, W. B., 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 52, 461-466
- Chowdhury, B. and John, M., 1998. Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate, *Thermochimica Acta.*, 313; 43-53.
- Conver, W.J. 1971., *Practical Nonparametric Statistics*. Pp. 244-248. John Wiley and Sons, New York.
- Daniel, M., Choi, J. H., Kim, J. H. and Lebeault, J.M. 1992. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 702-706.
- Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J.D. 1996. Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403. *Ind. Jour. Exp. Bio.*, 34; 216-219.
- Dawes, E.A. and Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 10; 135-266.

- De Smet, M.J., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J. and Wynberg, H. 1983. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J Bacteriol*;154:870–8.
- Di Lorenzo, M.L. and Silvestre, C. 1999. Non-isothermal crystallization of polymers. *Prog Polym. Sci.*, 24; 917-950.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. and Soga, K. 1986. Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly ( Beta- hydroxybutyrate) and a Copolester of Beta-Hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, *Macromolecules*, 19, 2860-2864.
- Doi, Y. and Abe, C. 1990. Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- $\omega$ -chloroalkanoates. *Macromolecules*, 23; 3705-3707.
- Du, G., Si, Y. and Yu, J. 2001a. Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acid on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acid by *Ralstonia eutrophus* *Biotechnol. Lett.*, 23; 1613-1617.
- Dunlop, W.F. and Robards, A.W. 1973. Ultrastructural Study of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*, *J. of Bacteriol.* 114, 3, 1271-1280.
- Durner, R., Witholt, B. and Egli, T. 2000. Accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 8, 3408-3414.
- Encarnacio'n, S., M. Dunn, K. Willms, and J. Mora. 1995. Fermentative and aerobic metabolism of *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* 177:3058–3066.
- Fiechter, A. 1990. *Plastics from Bacteria and for Bacteria: Poly( $\beta$ -Hydroxy alkanoates) as Natural, Biocompatible and Biodegradable Polyesters.* p. 77-93. Springer-Verlag, New York.
- Findlay, R.H. and White, D.C., 1983, Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1, 71-78.
- García, B., Olivera, E.R., Miñambres, B., Fernández-Valverde, M., Cañedo, L.M., Prieto, M.A., García, J.L., Martínez, M. and Luengo, J.M. 1999. Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. *J. Biol. Chem.*, 274; 29228-29241.
- Gouda, M.K., Swellam A.E. and Omar, S.H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources, *Microbiol. Research*, 156, 3, 201-207.
- Grothe, E., Moo-Young, M. and Chisti, Y. 1999. Fermentation optimization for the production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microb. Technol.*, 25, 132–41.
- Ha, C. S. and Cho, W. J. 2002. Miscibility, properties, and biodegradability of microbial polyester containing blends. *Prog Polym Sci* 27:759-809.
- Hoffmann, N., Steinbüchel, A. and Rehm, B.H.A. 2000. Homologous functional expression of cryptic phaG from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 665-670.
- Holmes, P.A. 1985. Applications of PHB-A Microbially produced biodegradable thermoplastics. *Phys. Technol.*, 16; 32-36.

- Holmes, P.A. 1988. Biologically produced PHA polymer and copolymers. In Developments in Crystalline Polymers, vol 2. Edited by Bassett DC. London Elsevier, 1-65
- Huisman, G.W., Leeuw, O., Eggink, G. and Witholt, B. 1989. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates, is a common feature of fluorescent *Pseudomonads*, Appl. Environ. Microbiol., 55, 8, 1949-1954.
- Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J.N. and Seguin, J.P. 1996. <sup>1</sup>H NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, Enzyme and Microbial Technol., 18; 195-201.
- Karaboz, İ.ve Umay, F.B. 1994. *Pseudomonas extorquens*' den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 6-8 Temmuz 1994 Edirne, 14-17.
- Kallio R.E. and Harrington, A.A. 1960. Sudanophilic granules and lipid of *Pseudomonas methanica*. J. Bacteriol., 80; 321-4.
- Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. and Sakazawa, C. 1992. Production of 3-Hydroxybutyric Acid Trimer by *Bacillus megaterium* B-124. Jour. Ferment. and Bioeng., 73, 3, 246-247.
- Kelley, S. G. and Post, F. 1982. Basic Microbiology Techniques. Second edition Star Publishing Company, 53, USA.
- Kessler, B., Westhuis, R., Witholt, B. and Eggink, G. 2001. Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes. In Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Biopolyesters, vol 71. Edited by Babel, W., Steinbüchel, A. Berlin: Springer, 159-182.
- Khanna, S. and Srivastava, A.K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. Process Biochemistry, 40; 607-619.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K. and Woo, S.I. 1994. Production of poly-(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate feeding using on-line glucose analyser. Enzyme Microbiol. Technol., 16, 556-561.
- Kim, B.S. 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, Enzyme and Microbial Technology, 27, 774-777.
- Kovacs, N. 1928. Eine Vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. Z. Immunforsch. Exp. Ther. 55, 311-314.
- Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 178, 703-704.
- Kunioka, M., Kawaguchi, Y. and Doi, Y. 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30; 569-73.
- Labuzek S. and Radecka, I. 2001. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85, J. Appl. Microbiol., 90, 353-357.
- Lach, D.A., Sharma, V.K., and Vary, P.S. 1990. Isolation and characterization of a unique division mutant of *Bacillus megaterium*, J. Gen. Microbiol., 136, 545-553.
- Lafferty, R.M., Korsatko, B. and Korsatko, W. 1988. Microbial production of poly-β-hydroxybutyric acid. Biotechnology, edited by H.J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Lagaveen, R.G., Huisman, G.W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G. and Witholt, B. 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*; effect of substrates

- on formation and composition of poly-(R)-3- hydroxyalkanoates and poly-(R)-3- hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.*;54:2924–32.
- Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W. and Yu, P.H. 2001. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 91-93, 515-524.
- Lee, B., Pometto, III A.L., Fratzke, A. and Bailey, T.B. 1991. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57; 678-685.
- Lee, S.Y., Yim, K.S., Chang, H.N. and 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*. *J. Biotechnol.* 32; 203–211.
- Lee, S.Y. 1996. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, 49; 1-14.
- Lee, S.Y. and Choi, J. 1999. Polyhydroxyalkanoate: biodegradable polymer. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2nd edn. Edited by Demain, A.L., Davies, J. E. Washington DC, ASM, 616-627.
- Lemoigne, M. 1926a. *C.R. Hebd. Seanes Soc. Biol.*, 94, 1291.
- Lemoigne, M. 1926b. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ - hydroxy butyric acid, *Bull, soc. Cheim. Biol.*, 8; 770-782.
- Lillo, J.G. and Valera, F.R. 1990. Effects of culture conditions on poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 8, 2517-2521.
- Lindsay, K. 1992. 'Truly degradable' resins are now truly commercial. *Modern Plastics*, 2; 62-64.
- Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K.P. and Becher, B., 2001. Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydrxybutyrate, *Biomaterials*, 22; 2447-2452.
- Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval A., Naharro, G. and Olivera E.R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current opinion in Microbiology*, 6; 251-260.
- Macrae, R.M. and Wilkinson, J.F. 1958a. Poly-b-hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.*, 19; 210–222.
- Macrae, R.M. and Wilkinson, J.F. 1958b. The influence of cultural conditions on poly-b-hydroxybutyrate synthesis in *Bacillus megaterium*. *Proc. R. Phys. Soc. Edin.*, 27; 73–78.
- Madison, L.L. and Huisman, G.W. 1999. Metabolic engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to plastics. *Mic. Mol. Bio. Reviews*, 63; 21-53.
- Marchessault, R.H., Okamura, K. and Su, C.J. 1970. Physical properties of poly(b-hydroxybutyrate). II Conformational aspect in solution. *Macromolecules*, 3; 735-740.
- Masamune, S., Walsh, C. T., Sinskey, J. A. and Peoples, O. P. 1989. Poly-(R)-3- hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological claisen condensation catalyzed by  $\beta$ -ketoacyl thiolase. *Pure. Appl. Chem.* 61: 303-312.
- McCool, G.J., Fernandez, T., Li, N. and Cannon, M.C. 1996. Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 138; 41-48.

- Mercan, N. ve Beyatlı, Y. 2001. *Bacillus sphaericus* suşlarının poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretimlerinin incelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25, 2, 1-7.
- Muller, R.J., Kleeberg, I. and Deckwer, W.D. 2001. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. *J. Biotechnol.*, 86; 87-95.
- Murray, R.G.E., Doetsch, R.D. and Robinow, C.F. 1994. Determinative and cytological light microscopy. In *Manual of Methods for General Bacteriology*, vol 10. Edited by Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. Washington DC, ASM, 21-41.
- Nickerson, K.W., Zarnick W.J. and Kramer, V.C. 1981. Poly-B-Hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 12; 327-331.
- Ojumu, T.V., Yu, J. and Solomon, B.O. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (1), pp. 18-24.
- Ostle, A.G. and Holt, J.G. 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for poly-β-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44; 238–241.
- Page, W.J. 1989. Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 329-333.
- Page, W.J. 1992a. Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.*, 14, 5, 385-390.
- Page, W.J., Sherburne, R., D'Elia, L. and Graham, L.L. 1995. Poly(β-hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Can. J. Microbiol.*, 41; 22-31.
- Page, W.J. and Knosp, O. 1989. Hyperproduction of Poly-β-hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 6, 1334-1339
- Page, W.J. and Cornish, A. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly-β-hydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.* 5, 12, 4236-4244.81.
- Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant. *Biotechnol.*, 13; 142-150.
- 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.
- Pool, R. 1989. In search of the plastic potato, *Science*, 245; 1187-1189.
- Quillaguamán, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B. and Hatti-Kaul, R. 2005. Poly(*b*-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate, *J. Appl. Microbiol.*, doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02589.x
- Rehm, B.H. A., Antonio, R.V., Spiekermann, P., Amara, A.A. and Steinbüchel, A. 2002. Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594; 178-190.

- Slater, S., Gallaher, T. and Dennis, D. 1992. Production of polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4, 1089-1094.
- Steinbüchel, A. and Schlegel, G. 1991. Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, *Mol. Microbiol.*, 5, 3, 535-542.
- Steinbüchel, A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom, D. (ed) *Biomaterials: novel materials from biological sources*. Stockton, New York, pp. 124-213.
- Steinbüchel, A. and Fuchtenbusch, B. 1998. Bacterial and other biological systems for polyester production. *TIBTECH*, 16; 419-427.
- Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. 2000 Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.*, 25; 1503-1555.
- Taidi, B., Anderson, A., Dawes, E.A. and Byrom, D. 1994. Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40; 786-790.
- Tanaka, K., Katamune, K. and Ishizaki, A. 1993. Fermentative production of poly-Beta-hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnol. Lett.*, 15, 12, 1217-1222.
- Valentin, H.E., Lee, E.Y., Choi, C.Y. and Steinbüchel, A. 1994. Identifications of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40; 710-716.
- Wang, F. and Lee, S.Y. 1997. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 3703-6.
- Williams, S.F. and Martin, D. 2002. Application of PHAs in medicine and pharmacy. In *Biopolymers*, vol 4, *Polyesters III: Applications and Commercial Products*. Edited by Doi Y and A Steinbüchel. Germany: Wiley-VCH, 91-128.
- Williamson, D.H. and Wilkinson, J.F. 1958. The isolation and estimation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *J Gen Microbiol.*, 19; 198-209.
- Weber, C.J. 2000. *Biobased Packaging Materials for the food Industry*, The EU Directorate 12, Frederiksberg.
- Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K. and Chen, G. 2001. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Jma5 cultivated in molasses media, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 111-118.
- Xi, J., Wu, Q., Yan, Y., Zhang, Z., Yu, P.H.F., Cheung, M. Zhang, R. and Chen, G. 2000. Hyperproduction of polyester consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 43-49.
- Yamane, T. 1992. Cultivation engineering of microbial bioplastics production. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 257-264.
- Yamane, T. 1993. Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 165-170.
- Young, H. L., Chao, F., Turnbill, C. and Philpott, D. E. 1972. Ultrastructure of *Pseudomonas saccharophila* at early and late log phase of growth. *J. Bacteriol.*, 109, No. 2; 862-868.

- Yu, J. and Wang, J. 2001. Metabolic flux modelling of detoxification of acetic acid by *Ralstonia eutrophus* at slightly alkaline pH levels. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 458-464.
- Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug. Rev.* 53; 5-21.

## **EK 1 Kullanılan Besiyerlerinin İçeriği**

### **Nutrient Broth**

Pepton from meat	5.0 g
Meat extract	3.0 g

### **Nutrient Agar**

Pepton from meat	5.0 g
Meat extract	3.0 g
Agar-agar	12.0 g

### **Simmons' Citrate Agar**

Ammonium dihydrogen phosphate	1.0 g
Di potassium hydrogen phosphate	1.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Sodium citrate	2.0 g
Magnesium sulfate	0.2 g
Bromothymol blue	0.08 g
Agar-agar	13.0 g

### **Triple Sugar Iron Agar**

Pepton from casein	15.0 g
Pepton from meat	5.0 g
Meat extract	3.0 g
Yeast extract	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Lactose	10.0 g
Sucrose	10.0 g
D(+)-Glucose	1.0 g
Ammonium iron (III) citrate	0.5 g
Sodium thisulfate	0.5 g
Phenol red	0.024 g
Agar-agar	12 g

### **MR-VP Broth**

Pepton from meat	7 g
D(+)-Glucose	5 g
Buffered phosphate	5 g



**Christensen Urea Agar**

Pepton from meat	1 g
Sodium chloride	5 g
Potassium dihydrogen phosphate	2 g
D(+)-Glucose	1 gr
Urea	20 g
Fenol red	12 mg

## **EK 2 Kullanılan Solusyonların İeriği**

### **Sudan Black B Solusyonu**

%70'lik etanolde %0.3'lük çözeltilisi

### **Safranin Solusyonu**

%0.5'lik sulu çözeltilisi

### **Kovacs Ayıracı**

p-dimetilaminobenzaldehit	5 g
Amil alkol	75 ml
HCl	25 ml

### **Metil Red İndikatörü**

Metil red	0.1 g
%96'lık etil alkol	300 ml
Distile su	200 ml

### **Barritt Ayıracı (A)**

$\alpha$ -naftol	5 g
Etil alkol	100 ml

### **Barritt Ayıracı (B)**

Potasyum hidroksit	40 g
Kreatin	0.3 g
Distile su	100 ml

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Özge DİNİGÜZEL  
Doğum Yeri: Kayseri  
Doğum Tarihi: 10.06.1979  
Medeni Hali: Bekar  
Yabancı Dili: İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise :Adana Mehmet Kemal Tuncel Lisesi (1994-1997)  
Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (1998-2004)  
Yüksek Lisans :Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim  
Dalı (2004-2007)