

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus subtilis* KÜLTÜRLERİNDE PHB (Poli- $\beta$ -Hidroksibütirat)  
ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nazan TAMDOĞAN**

**Anabilim Dalı : BİYOLOJİ**

**Programı : Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji**

**MANİSA 2008**

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ \* FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Bacillus subtilis* KÜLTÜRLERİNDE PHB (Poli- $\beta$ -Hidroksibütirat)  
ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nazan TAMDOĞAN**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18 Haziran 2008**

**Tezin Savunulduğu Tarih : 29 Temmuz 2008**

**Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Uğur SIDAL**

**Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Tamer ŞANLIDAĞ**

**Yrd. Doç. Dr. Özgür KURT**

**MANİSA 2008**

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	vi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Plastikler ve Çevre .....	1
1.2. Bakteriyal Plastikler (Biyoplastik) ve Önemi .....	2
1.3. Poli-β-hidroksialkanat (PHA) ve Poli-β-hidroksibütirat'ın (PHB) Tarihçesi .....	3
1.3.1. PHB'in Özellikleri ve Doğal Yapısı .....	6
1.3.2. PHB'in Oluşum Şartları ve Tayini .....	10
1.3.3. PHB'in Sentezi .....	10
1.3.4. PHB'in Biyolojik Parçalanabilirliği ve Yenilenebilme Özelliği .....	13
1.3.4.1. PHB'ı Parçalayan Mikroorganizmalar .....	17
1.4. PHB Üreten Mikroorganizmalar .....	18
1.4.1. <i>Alcaligenes</i> , <i>Azotobacter</i> ve <i>Pseudomonas</i> Cinslerinde PHB Üretimi .....	18
1.4.2. Genetik Uygulamalarla Biyoplastik Eldesi .....	20
1.4.2.1. Rekombinant Mikroorganizmalardan PHB Üretimi .....	20
1.4.2.2. Transgenik Bitkilerden Biyoplastik Eldesi .....	22
1.4.3. Diğer Bakterilerde PHB Üretimi .....	24
1.4.4. <i>Bacillus</i> Cinsinde PHB Üretimi .....	26
1.5. <i>Bacillus</i> Cinsi Hakkında Genel Bilgiler .....	26
1.5.1. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerde Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Üretimi .....	28
1.6. <i>Bacillus subtilis</i> ve Genel Özellikleri .....	30
1.7. PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar .....	31
1.8. PHB'in Ucuz Üretimi .....	32
1.9. PHB'in Kullanım Alanları .....	33
1.9.1. Ziraatta kullanım alanları .....	33
1.9.2. Veterinerlikte Kullanım Alanları .....	34
1.9.3. Tıpta Kullanım Alanları .....	34
1.9.4. Kimyasalların Eldesinde Kullanılması .....	35

1.9.5. Paketleme Filmleri ve Tek Kullanımlık Malzemelerin Yapımında Kullanılması .....	36
1.9.6. Özel Uygulamalarda Kullanılması .....	37
2. MATERYAL VE METOD .....	38
2.1. Araştırmada Kullanılan Mikroorganizma .....	38
2.2. Mikroorganizmanın Aktifleştirilmesi .....	38
2.3. Kullanılan Mikroorganizmanın Muhafazası .....	38
2.4. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri .....	38
2.5. Ortamlara Ekim ve Kültürasyon.....	38
2.6. Kültürlerde Üremenin Ölçülmesi.....	39
2.7. Kültürlerde PHB Miktarının Ölçülmesi.....	39
2.7.1. PHB Standartının Hazırlanışı .....	40
2.8. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 suşunun Üreme ve PHB Üretimine Etkili Kültürel Parametrelerin Saptanması .....	40
2.8.1. PHB Miktarının Zamana Göre Değişimi ve Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	40
2.8.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması .....	40
2.8.3. Optimum İnkübasyon pH'sının Saptanması .....	40
2.8.4. Çeşitli Karbon Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi .....	41
2.8.5.Çeşitli Azot Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi .....	41
2.8.6. C/N Oranının PHB Sentezine Etkisi .....	41
3. BULGULAR .....	42
3.1. PHB Miktarının Zamana Göre Değişimi ve Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması.....	42
3.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması .....	44
3.3. Optimum İnkübasyon pH'sının Saptanması.....	45
3.4. Çeşitli Karbon Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi.....	46
3.5. Çeşitli Azot Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi .....	47
3.6. C/N Oranının PHB Sentezine Etkisi .....	48
4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	49
5. KAYNAKLAR.....	52
6. ÖZGEÇMİŞ .....	61

## ÖZET

Plastik atıklarla çevrenin kirlenmesi günden güne artmaktadır. Petrol kökenli plastiklerin kullanımından kaynaklanan çevre kirliliği problemlerini çözmek için biyoparçalanabilir ve doğa ile dost plastiklerin üretimine ilgi artmaktadır. Poli-β-hidroksibütirat'ın (PHB) biyoplastik polimeri olarak önemi bilinmektedir. Bu granüller, karbon ve enerji kaynağı olarak, birçok mikroorganizmada olumsuz koşullarda biriktirilir.

Son yıllarda PHB üreten mikroorganizmalar üzerinde çalışan araştırmacıların sayısı artmıştır. PHB'lar petrol kökenli plastiklere göre birçok avantaja sahiptir. Böylece endüstriyel uygulamalarda yeni olanaklar ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun PHB verimliliği araştırıldı. PHB miktarı 235 nm'ye ayarlanan UV spektrofotometre kullanılarak belirlendi. İnkübasyon süresi (2-30 saatler), sıcaklık (20, 25, 30, 35 ve 40 °C), pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0), farklı karbon kaynakları (glukoz, sukroz, D-mannitol ve arabinoz), farklı azot kaynakları (proteaz pepton, L-glisin, L-sistein, amonyum sülfat ve potasyum nitrat) ve karbon/azot (C/N) oranının (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5) PHB sentezine etkisi araştırıldı.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunda en yüksek PHB birikimi, 24 saat inkübasyonda (10,4981 µg/ml), pH 7.0'da (10,4981 µg/ml), karbon kaynağı olarak D-mannitol içeren besiyerinde (23,6623 µg/ml), azot kaynağı olarak L-glisin içeren besiyerinde (14,6217 µg/ml), karbon/azot oranı 2.5 olan besiyerinde (3,2481 µg/ml) ve 30 °C sıcaklıktaki kültür ortamında (10,4981 µg/ml) elde edildi.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu kullanarak PHB üretimi pahalı bir yöntem olmasına rağmen, PHB gibi doğa dostu biyoplastikler, daha verimli suşlar ya da mikroorganizmalar ve/veya ucuz substratlar kullanılması sayesinde popülerlik kazanabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Bacillus subtilis*, karbon ve azot kaynakları, Poly-β-hidroksibütirat (PHB), PHB (biyoplastik) üretimi

## ABSTRACT

Environmental pollution due to plastic wastes is an emerging problem of the world. The use of novel biodegradable plastics is currently seen as a solution to overcome this problem and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) polymer is a well-known bioplastic agent. Many organisms accumulate PHB granules as carbon and energy sources under stress.

There has been an increase in the number of researchers working on PHB-producing microorganisms in recent years. PHB has many advantages compared to petroleum-based plastics, which facilitate its use in many fields of industry.

In the present study, our aim was to assess the PHB productivity of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain under different conditions. The amount of PHB production was measured by UV-VIS spectrophotometer at 235 nm. The effects of incubation time (2-30 hours), temperature (20, 25, 30, 35 and 40 °C), pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0), carbon sources (glucose, sucrose, D-mannitole, arabinose), nitrogen sources (protease peptone, L-glycine, L-cystein, ammonium sulfate and potassium nitrate) and the rate of carbon/nitrogen ratio (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5) on PHB synthesis were all assessed in the study.

According to the results of the study, the highest PHB production was obtained after 24 hours of incubation (10.4981  $\mu\text{g/ml}$ ), at 7.0 of pH (10.4981  $\mu\text{g/ml}$ ), with D-mannitole (23.6623  $\mu\text{g/ml}$ ) as carbon source, L-glycine (14.6217  $\mu\text{g/ml}$ ) as nitrogen source, C/N ratio of 2.5 (3.2481  $\mu\text{g/ml}$ ) and with a temperature of 30 °C in culture media (10.4981  $\mu\text{g/ml}$ ).

Although PHB production is relatively an expensive method with *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain, nature-friendly bioplastics such as PHB will probably gain popularity with more efficient strains or microorganisms and/or cheap substrates.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, carbon and nitrogen sources, Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB), PHB (bioplastic) production

## TEŞEKKÜR

Yükseklisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca beni yönlendiren bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam **Yrd. Doç. Dr. Uğur SIDAL**'a (Celal Bayar Üniversitesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bana destek olan arkadaşım **Ali ÖZDEMİR**'e, laboratuvar çalışmalarımda bölüm imkanlarını açık tutan Bölüm Başkanımız **Prof. Dr. A. Usame TAMER**'e, okulumuzun Kimya Bölümü Öğretim Üyeleri'nden **Prof. Dr. Tülin AYDEMİR**'e, **Doç. Dr. Kenan DOST**'a, **Araş. Gör. Seda BECERİK**'e ve Yüksek lisans öğrencisi **Hafize DİLEK**'e çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca bana her zaman, her şekilde destekleri olan çok sevdiğim annem **Netice TAMDOĞAN**, ablam **Funda TAMDOĞAN**'a ve rahmetle andığım babam **Hüseyin TAMDOĞAN**'a sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Nazan TAMDOĞAN

Manisa, 2008

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1.1. PHB ve Polipropilen'in bazı özelliklerinin karşılaştırılması.....	8
Tablo 3.1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Zamana Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik .....	42
Tablo 3.2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Sıcaklığa Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik .....	44
Tablo 3.3. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de pH'a Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik .....	45
Tablo 3.4. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Farklı Karbon Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik .....	46
Tablo 3.5. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Farklı Azot Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik .....	47
Tablo 3.6. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Farklı Karbon / Azot Oranına Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik .....	48



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 1.1. <i>Rhizobium laguminosarum</i> bakterisi .....	3
Şekil 1.2. <i>Bacillus megaterium</i> bakterisi.....	4
Şekil 1.3. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 'de PHB granülünün elektron mikroskop görüntüsü ve PHA monomerinin genel kimyasal yapısı .....	5
Şekil 1.4. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı .....	6
Şekil 1.5. <i>Alcaligenes latus</i> 'da PHB granülleri .....	7
Şekil 1.6. PHB granüllerinin SEM görüntüsü .....	8
Şekil 1.7. Phb biyosentezi .....	11
Şekil 1.8. <i>Bacillus megaterium</i> ve <i>Alcaligenes eutrophus</i> bakterileri .....	13
Şekil 1.9. PHB'ın parçalanması ve sentezi .....	14
Şekil 1.10. PHB'ın karbon döngüsü .....	16
Şekil 1.11. <i>Azotobacter vinelandii</i> bakterisi.....	19
Şekil 1.12. <i>Caulobacter crescentus</i> bakterisi .....	21
Şekil 1.13. <i>Alcaligenes eutrophus</i> (solda) ve <i>Arabidopsis thaliana</i> (sağda) .....	23
Şekil 1.14. Sağlıklı böcek larvası (solda) ve <i>B. popilliae</i> ile enfekte larva (sağda) .....	27
Şekil 1.15. <i>Bacillus subtilis</i> bakterisi.....	30
Şekil 3.1. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Zamana Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi.....	43
Şekil 3.2. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Sıcaklığa Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi.....	44
Şekil 3.3. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de pH'a Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi.....	45
Şekil 3.4. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Farklı Karbon Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi.....	46
Şekil 3.5. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Farklı Azot Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi.....	47
Şekil 3.6. <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633' de Farklı Karbon / Azot Oranına Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi.....	48

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
µg	: Mikro gram
µm	: Mikro metre
µl	: Mikro litre
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
PHB	: Poli-β-hidroksibütirat
PHA	: Poli-β-hidroksialkanat
ICI	: Imperial Chemistry Industry
EM	: Elektron mikroskobu
PP	: Polipropilen
DNA	: Deoksiribonükleik asit
PHV	: Polihidroksivalerat
P(HB-HV)	: Polihidroksibütirat-co-hidroksivalerat
N	: Azot
P	: Fosfor
S	: Kükürt
Mg	: Magnezyum
K	: Potasyum
Fe	: Demir
UV	: Ultraviyole
NMR	: Nuclear magnetic resonance
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy
CoA	: Koenzim A
kDa	: Kilodalton
°C	: Santigrad derece
SEM	: Scanning Electron Microscope
PCR	: Polymerase Chain Reaction
N	: Normalite
M	: Molarite
KNO <sub>3</sub>	: Potasyum nitrat
C/N	: Karbon/ Azot

PET	: Polyethylene terephthalate
N.B	: Nutrient Broth
N.A	: Nutient Agar
Rpm	: Revolutions per minute
MHz	: MegaHertz
O.D	: Optik dansite

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Plastikler ve Çevre

Plastikler petrol ve doğalgaz gibi doğal kaynaklardan elde edilen hidrokarbonlar kullanılarak üretilirler. Teknik olarak ifade etmek gerekirse plastikler monomerlerin kimyasal bağlarla polimere dönüşmesi ile meydana gelir.

Plastikler toz, granül, "flake" ve çözelti şeklinde olabilir. Katı maddelerin ısı ve basınçla muamelesi sonucu günlük hayatımızda yakından tanıdığımız birçok plastik ürün üretilir. Plastiklerin işlevsel olarak mükemmel olmaları ile çevresel etkileri arasında denge sağlanması gereklidir. Plastikler alternatiflerine göre daha az malzeme kullanımı, üretimde daha az enerji tüketimi, taşımacılıkta daha az yakıt kullanımı ve bunun sonucunda emisyonların azalması, faydalı ömrü dolduğunda daha az miktarda atık oluşumu sağlarlar ([www.genbilim.com/2008](http://www.genbilim.com/2008)).

Ancak, plastiğin "kullanılıp-atılabilme" özelliği, şimdiden çevre kirliliği açısından en büyük sorunlardan biri haline gelmiştir (Page, 1992a). Her yıl birkaç yüzbin ton plastik denize atılır ve okyanusta birikir ([www.bact.wisc.edu/2008](http://www.bact.wisc.edu/2008)). Dünyada biriken yıllık plastik miktarı 25 milyon ton kadardır (Lee, 1996). Bu nedenle, son yıllarda plastikler, ekolojik problemlerin kaynağı olarak artan çevre kirliliğine neden olan başlıca etkenlerden biri şeklinde karşımıza çıkmaktadırlar (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Plastik atıkları yok etmenin bir yolu plastiklerin toplanarak yakılması ise de, bu hem pahalı bir işlemdir, hem de zehirli gazların açığa çıkmasına sebep olmaktadır. Geri dönüşüm projeleri ise, plastiklerin çok fazla çeşidinin olmasından ve dönüştürme işlemi hepsinin tek tek ayırt edilerek kullanılmasını gerektirdiğinden zordur. Ayrıca, plastikler geri kazanılsa bile eski sağlıklarını yitirdiklerinden, geri dönüşüm ürünlerin kullanım alanları sınırlıdır. En ucuz ve basit olan yol ise, plastiklerin diğer çöplerle birlikte belli bir alanda biriktirilmesidir. Ancak, diğer çöpler mikroorganizmalar tarafından parçalanır ve bir şekilde tüketilirken plastikler kimyasal ve fiziksel özellikleri sebebiyle mikroorganizmalar tarafından besin olarak kullanılamazlar. Bu yüzden de, her geçen gün artarak ekolojik dengeyi tahrip etmektedirler. Bunu önlemenin bir yolu, doğada çözülebilen, tüketilebilen plastiklerin üretilmesi ile olur.

Doğada çözünebilir özellikte başlıca üç tür plastik vardır:

- Güneş ışığına hassas plastikler: Bazı plastikler güneş ışığına maruz kaldıklarında molekülleri birbirine bağlayan kimyasal bağlar kopmakta ve küçülen parçalar daha sonra mikroplar tarafından

kullanılabilmektedir. Ancak çöplerin biriktirildiği yerlerde üstüste yığılan plastiklerin hepsine güneş ışığının ulaşması mümkün olmadığından, bu yol her zaman işe yaramamaktadır.

- Nişasta gibi çabuk bozulan polimerlerin eklenmesiyle üretilen plastikler: Bu tür polimerlerde molekül dizileri nişasta kullanılarak birbirine bağlanırlar. Plastik çöpe atıldığında mikropların nişastayı kullanması ile polimer parçalanır. Ancak, yine çöp yığınları altında yeterli güneş ışığı ve oksijen olmaması nişastayı tüketen mikroorganizmaların iş görememesine neden olur. Ayrıca bu şekilde üretilen plastikler diğerlerine göre daha dayanıksızdırlar.
- Üçüncü tip ise, bakteriyel plastikler (biyo-plastikler)'dir ([www.yildizindunyasi.net/2002](http://www.yildizindunyasi.net/2002)).

## 1.2. Bakteriyel Plastikler (Biyoplastik) ve Önemi

Atıkların büyük bir bölümünü plastik materyaller oluşturmaktadır. Atık plastikler genellikle diğer evsel atıklarla birlikte çöp boşaltma sahalarına atılmakta veya çöp çukurlarına dökülmektedir. Atık boşaltma sahalarının ve çukurlarının giderek dolması, yakma gibi alternatif yöntemlerin giderek artan maliyetleri, çeşitli teknik sorunlar, enerji kaynaklarını koruma ve atıkları çevresel açıdan kabul edilebilir şekilde azaltma isteğiyle birleşince atık plastiklerin yeniden kullanımı konusu gündeme gelmiştir (Savaşçı ve diğerleri, 1998 ).

Fakat atık plastiklerin tekrar kullanıma hazırlanması için toplama, ayıklama, hammadde haline getirme aşamaları maliyeti arttırmaktadır. Petrolden elde edilen sentetik polimerler, plastik atık olarak doğaya terk edildiklerinde, toprakta uzun süre parçalanamadığından çevre kirliliğine ve toksik madde birikimine neden olmaktadır (Dave et al, 1996). Bu sorunların çözümüne yönelik polimer biliminde yapılan çalışmalar arasında biyopolimerler (mikrobiyal termoplastikler) önemli bir yer tutmaktadır (Page, 1992b; Beyatlı, 1996 ).

1970'li yıllardaki petrol krizinden sonra petrol fiyatlarının artmasına da bağlı olarak, petrol kökenli polimerlere alternatifler aranmış ve 1976 yılında, İngiltere'deki Imperial Kimya Endüstrisi (ICI), bakteriyel fermentasyonla üretilen Poli-β-hidroksibütirat'la (PHB) ilgili araştırmalara başlamıştır ve petrol kökenli plastiğe alternatif olarak biyoyoumlu, biyoparçalanabilir ve doğayla dost plastikler ortaya çıkmıştır (Braunegg et al, 1998; Poirier, 2002) .

Biyolojik olarak parçalanabilen poli-β-hidroksibütirik asit (PHB)'in özellikleri yıllardan beri bilinmesine ve alınan patentlerin 1962'de J.N. Baptist tarafından Amerika'da orijinal olarak dosyalanmasına rağmen 1982'de Imperial Chemistry Industries Plastic (ICI plc.) tarafından bu polimerin Biopol ticari adıyla pazarlanmasına kadar, polihidroksialkanatların (PHA) ve PHB'nin endüstriyel üretimi üzerinde yeterince durulmamıştır (Anderson and Dawes, 1990).

Birçok mikroorganizma tarafından doğal olarak sentezlenen PHB'nin, yüksek miktarlarda üretilen ve çoğunlukla ambalaj malzemesi olarak kullanılan polipropilenin özelliklerine benzerlik göstermesi, bu termoplastığın Avrupa, Amerika ve Japonya'da endüstriyel çapta üretimine hız kazandırmıştır (Braunegg et al, 1998).

Avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB üretimi yapmak için uygun suşların tespiti araştırmalarında, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve *Bacillus* cinsi gibi bakteri grupları yer almaktadır (Anderson and Dawes, 1990; Wu et al, 2001).

### 1.3. Poli- $\beta$ -hidroksialkanat (PHA) ve Poli- $\beta$ -hidroksibütirat'ın (PHB) Tarihi

Mikroskopun, mikrobiyoloji alanında kullanılmaya başlanmasından bu yana, birçok kez küçük "yağ damlaları"nın bazı bakteri hücrelerinde düzenli bir şekilde gözlemlendiği belirtilmiştir. *Rhizobium* (Şekil 1.1) hücreleri içindeki böyle granüllerin nodüllerden izole edilen bakteroidlerde de bulunduğu gözlemlenmiş ve bunlar "ışığı kıran damlacıklar" olarak belirtilmiştir.



Şekil 1.1. *Rhizobium laguminosarum* bakterisi (<http://www.britannica.com/eb/art-19576/The-soil-bacterium-Rhizobium-leguminosarum/2008>)

Birçok mikrobiyolog, bakterilerdeki lipofilik granülleri çok önceden tanımlamış olmasına rağmen, bu partiküllerin yapısı ilk kez Lemoigne tarafından 1923 yılında ortaya konmuştur. Araştırmacı, *Bacillus subtilis* kültürleri distile suda otolize olduğu zaman, bilinmeyen bir asit oluşumu ile pH'nın azaldığını gözlemiştir. Bu bilinmeyen asidin, şeker hastalarında görülen ürindeki  $\beta$ -hidroksibütirik asite benzer olduğu sonradan bulunmuştur. (Lee, 1996; Anderson and Dawes, 1990).

İlk kez Lemoigne tarafından, 1920'li yıllarda, topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* (Şekil 1.2) bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksibütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopolysteri (PHB) olarak tanımlanmıştır. Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içinde PHB sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır (Braunegg et al, 1998; Anderson and Dawes, 1990; Holmes, 1985).

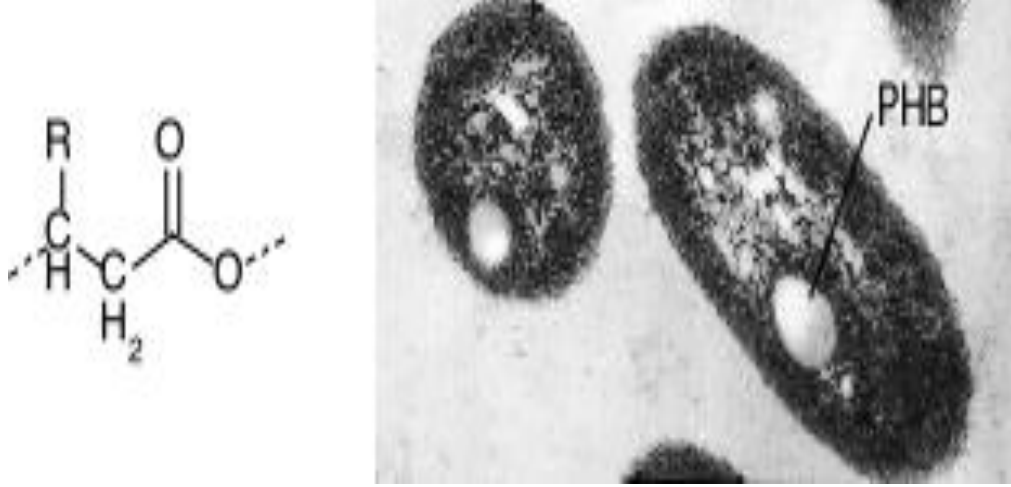


Şekil 1.2. *Bacillus megaterium* bakterisi ([http://www.magma.ca/~scimat/B\\_megate.htm/2001](http://www.magma.ca/~scimat/B_megate.htm/2001))

PHB'nin mikrobiyal sentezi uzun yıllar araştırma konusu olmamıştır. Lafferty ve arkadaşlarının bildirdiğine göre, gram negatif bakterilerde PHB sentezini ilk kez gösteren Forsythe ve grubu olmuştur. Buna ilaveten araştırmacılar PHB sentez yeteneğinin varlığının ya da yokluğunun, bir taksonomik kriter olarak kullanılabileceğini de rapor etmişlerdir. Aynı yıllarda bakteriyal biomasstan PHB'nin kantitatif belirlenmesi için ilk pratik metotlardan biri geliştirilmiştir. Hücreleri, PHB'nin dışında tüm hücresel bileşiklerin çözünebildiği standart şartlarda alkali hipoklorit solusyonu ile muamele etmişlerdir. Bu şekilde elde edilen PHB granüllerinin yoğunluğu, hücre içindeki PHB miktarıyla bağlantılı olarak belirlenmiştir. Bu metot geliştirilmeden önce Lemoigne, PHB'yi kuru bakteri kütlelerinden kloroform ile ayırmış ve gravimetrik olarak belirlemiştir. (Lafferty et al, 1988).

'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 (Anderson and Dawes, 1990; Loosdrecht et al, 1997).

PHA çok rastlanan depo ilavelerinden birisidir. Uzun polimere bağlanmış birçok karbon zincirini içeren, tekrarlayan hidrofobik birimlere sahiptir. Polimerlerin bu sınıfının en çok rastlanılanı Şekil 1.3' te görüldüğü gibi yan zincir olarak metil grubuna sahip olan PHB'dir. PHA bakterilerde karbon ve enerji depo ürünü olarak işlev görmektedir. Nasıl ki bizler yağ depo ediyorsak, bazı bakteriler de PHA depo etmektedir. Bazı PHA polimerleri plastik benzeri özelliklere sahiptirler (www.bact.wisc.edu).



Şekil 1.3. *Rhodobacter sphaeroides* 'de PHB granülünün elektron mikroskop görüntüsü ve PHA monomerinin genel kimyasal yapısı. PHB için R grubu metildir. ([http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book\\_id=4&ig\\_number=33&chap\\_number=2/1999](http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=4&ig_number=33&chap_number=2/1999))

PHA'ların bakterilerde, insandaki yağ veya bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bildirilmektedir (www.bact.wisc.edu). Birçok çeşidi bulunan PHA'lar, linear, uzun, 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden ibaret, aktif mikrobiyal polyesterlerdir (Anderson and Dawes, 1990; Madison and Huisman, 1999).

Bunlar içinde yer alan poli-β-hidroksibütirat (PHB), PHA'ların en yaygın ve geniş kapsamlı olarak çalışılan tipidir ve polimerin bu sınıfına ticari ilginin doğmasına neden olan PHA'dır (Madison and Huisman, 1999; www.clt.astate.edu/2008).



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 (Madison and Huisman, 1999).

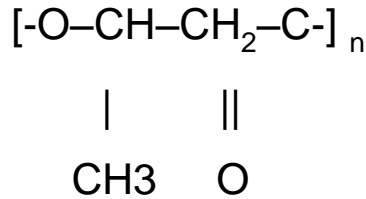
Birçok bakteri cinsinin PHB sentezleme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür ve farklı cinslerde sentezlenen PHB'nin infrared absorpsiyonu ile X-ışını differaksiyonu gibi fiziksel özellikleri birbirine benzemektedir. Böylece bir depo materyali olan PHB'yi sentezleme yeteneğinin prokaryotik mikroorganizmalarda çok yaygın olduğu bulunmuştur (Braunegg et al, 1998).

### 1.3.1. PHB'in Özellikleri ve Doğal Yapısı

Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen PHB, yapısında kısa zincirli  $\beta$ -hidroksi yağ asitleri içeren, prokaryotların membranla çevrili hücre içi depo maddesi olup, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun bir polimerdir (Poirier, 2002; Slater et al, 1992).

PHB'in sağ el heliks yapısında ve iki katlı kıvrılmış bir eksene sahip olduğu, her bir ipliğin 0,596 nm'de bir tekrarlandığı, moleküler yapısının kıvrılmalar halinde olduğu ve hücre içinde geniş hacim tuttuğu rapor edilmiştir (Anderson and Dawes, 1990). PHB akıcı, sıvı durumda oluşur ve hücreden organik çözücülerle ekstrakte edildikten sonra yüksek kristalin halinde olup katı fakat basınca dayanıklı olmayan kırılğan bir materyaldir (Madison and Huisman, 1999).

Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB'in genel formülü  $(C_4H_6O_2)_n$  şeklindedir (Şekil 1.4). (n) sayısı 35 000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilir. Polimer boyunca karbonil oksijen ile metil grupları bulunmaktadır. Polimerin molekül ağırlığı, izolasyon metodundan ve çevresel şartlardan da etkilenmektedir (Madison and Huisman, 1999; Nickerson et al, 1981; McCool et al, 1996).

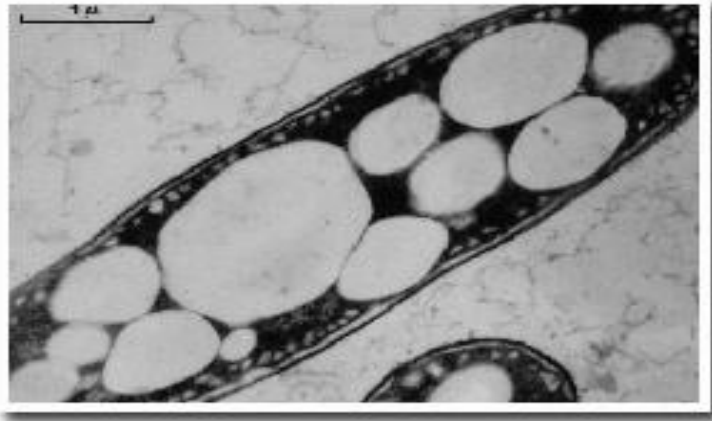


Şekil 1.4. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı (Dave et al, 1996; Anderson and Dawes, 1990).

Hücrede bir redoks düzenleyicisidir (Anderson and Dawes, 1990; Madison and Huisman, 1999; Valentin et al, 1994).

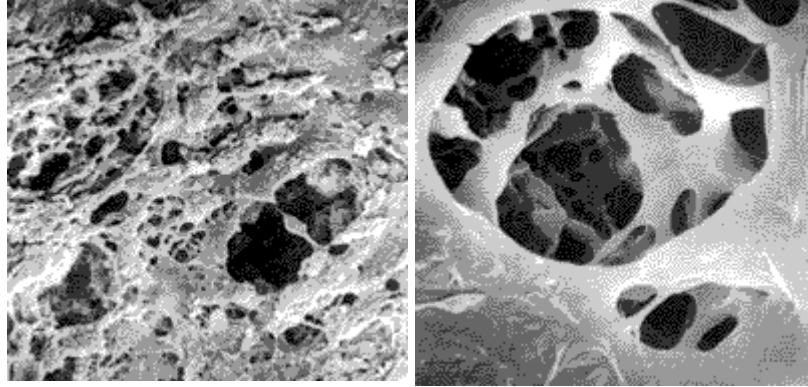
Faz kontrast veya elektron mikroskobu (EM) kullanıldığında, bakteriyel hücrelerde PHB granülleri kolaylıkla gözlenebilir (Şekil 1.5). PHB, genellikle küre şeklinde olup, her granül çap olarak 100-800 nm arasındadır. Bunlar 2-4 nm kalınlığında üniter olmayan lipid ve proteinden oluşan bir membranla çevrilidir. Granüllerin yaklaşık % 98'i PHB, % 2'si ise protein içermektedir (Lafferty et al, 1988; Madison and Huisman, 1999). Membran lipid ve fosfolipidleri granülün hidrofobik kısmı ile dış ortam arasında bir yüzey stabilitesi oluşturmaktadır. PHB polimeraz ve depolimerazın aktivitesi, membran proteinleri ile ilişkilidir. PHB yavaş kristalize olur, maksimum kristalize hızı 110-120 °C'dir (Anderson and Dawes, 1990).

PHB doğal şeker, etanol, karbondioksit ve hidrojen gazları içeren fermenterlerde, mikroorganizmaların geliştirilmesi ile oluşmaktadır (Holmes, 1985).



Şekil 1.5. *Alcaligenes latus*'da PHB granülleri ([http://www.nrc-cnrc.gc.ca/highlights/2007/0703/maplesap\\_e.html](http://www.nrc-cnrc.gc.ca/highlights/2007/0703/maplesap_e.html))

Yapılan EM çalışmalarında, granülün içte yer alan bir merkezi kısım ve birkaç tabakalı membranla çevrilmiş kabuktan oluştuğu bildirilmiştir (Dunlop and Robards, 1973) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. PHB granüllerinin SEM görüntüsü ([http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0366-16442002000400025&script=sci\\_arttext#img07/2002](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0366-16442002000400025&script=sci_arttext#img07/2002))

Işık-yayıma ölçümlerine göre PHB granüllerinin moleküler ağırlıkları  $5 \times 10^9$  civarındadır ve her bir granül minimum 1000 polimer zincirinden oluşmaktadır. *A. eutrophus*'taki PHB granüllerinin %40 su içerdiği tespit edilmiştir (Anderson and Dawes, 1990).

PHB'lar, polipropilen gibi petrol türevli yaygın plastiklere benzer materyal özellikler gösterirler (Madison and Huisman, 1999). PHB ve polipropilen (PP)'in bazı özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 1.1. 'de verilmiştir.

Tablo 1.1. PHB ve Polipropilen (PP)'in bazı özelliklerinin karşılaştırılması

Fiziksel Özellikler	PHB	PP
Kristalin kaynama noktası ( $^{\circ}\text{C}$ )	175	176
Camsı geçiş sıcaklığı ( $^{\circ}\text{C}$ )	15	-10
Yoğunluk ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	1.250	0.905
Kırılma uzaması	6	400
UV'ye dayanıklılık	Dayanıklı	Dayanıksız
Organik çözücüye dayanıklılık	Dayanıklı	Dayanıksız

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 (Dave et al, 1996; Lafferty et al, 1988; Madison and Huisman, 1999).

PHB'nin 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 (Poirier, 2002).

Polimerin moleköl ağırlığı, özellikle bakterinin türüne bağlı olmakla birlikte, büyüme koŐulları ve hücrenin yaŐam döngüsündeki yerine göre de deđiŐebilir (Dunlop and Robards, 1973; Taidi et al, 1994).

PHB molekölünün ağırlığının 60.000–2.000.000 Dalton arasında değiştiği bildirilmektedir (Braunegg et al, 1998).

PHB biyosentez genlerinin, kromozomda veya Plasmid DNA'da lokalize olduğu bildirilmektedir (Steinbüchel and Schlegel, 1991).

PHB'nin, biyolojik parçalanabilirliği, biyolojik uyum yeteneği ve toksik olmayıŐı sayesinde endüstriyel uygulamalarda kolayca kullanılabileceği bildirilmektedir (Weber, 2000).

Barham ve ark. (Barham et al, 1984), çözelti halindeki PHB'yi çöktürerek tek lamelli kristaller elde etmişler, lameller arasındaki kalınlık ile 25 -125 °C arasındaki kristalleŐme sıcaklığının birbiriyle ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmacılar eritmeyle kristalizasyonda PHB'yi kimyasal olarak saf ve küresel Şeklinde elde edip, bunları kristalizasyon sıcaklığına göre ayırmıŐlardır. Bu yüzden PHB'nin preparasyon yöntemi onun hem morfolojisi hem de fiziksel özelliklerini belirlemektedir. PHB'nin fiziksel özellikleri, kullanılan bakteri suşundan elde edilen polimerin moleköl ağırlığına bağlıdır. Ayrıca PHB'nin mikrobiyal kütleden ekstraksiyonu sırasında moleköl ağırlığında bir azalma olmaktadır (Lafferty et al, 1988).

PHB, kopolimerleri kadar iyi bir Şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve polietilen gibi diğer sentetik polimerlerle heteropolimerler yapımında kullanılabilir. Sentetik polimerlere kıyasla PHA'nın fiziksel özellikleri PHV/PHB moleköl oranının deđiŐtirilmesiyle düzenlenebilir. PHB kopolimerleri diğer kopolimerlerden çok daha kullanışlıdır (Witholt and Kessler, 1999).

Hücre içi depo granölü olarak sentezlenen ve biriktirilen PHB, mikroorganizma için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Buna ilaveten lokal oksijen konsantrasyonlarının düzenlenmesinde, sporulasyon için enerji sağlanmasında ve redükleyici ekvalentler için elektron havuzu olarak da rol oynar (Anderson and Dawes, 1990; Madison and Huisman, 1999).

### 1.3.2. PHB'in Oluşum Şartları ve Tayini

Araştırmacılar, PHB'in birçok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulduğunu (Lafferty et al, 1988; Jan et al, 1996) 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 (McCool et al, 1996; Jan et al, 1996; Brandl et al, 1991).

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 (McCool et al, 1996). Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir (Lee, 1996). Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Nickerson et al, 1981; Benoit et al, 1990).

UV spektrofotometrik olarak tayini yapılabilen PHB, hücreden ayrıldığında, sülfürik asitle krotonik aside dönüştürülerek, 235 nm dalga boyundaki absorbanı ölçülebilir (Bonartseva and Myskina, 1985).

PHB'in hücrede teşhisi ve konsantrasyonunun belirlenmesinde <sup>1</sup>H NMR ve Gaz Kromatografisi analizi ve FTIR spektroskopisi yöntemi kullanılabilir (Jan et al, 2000; Yan et al, 2000).

Canlı bakteri hücresi içerisindeki PHB depo granüllerinin tespit edilmesi için geniş olarak kullanılan metotlardan biri de lipofilik boyalarla boyamadır. Bu amaçla Nil Blue A, Sudan Black B ve Sudan III gibi bazı floresan boyalar kullanılabilir (Ostle and Holt, 1982; Bonartseva, 1985; Pierce and Schroth, 1994).

### 1.3.3. PHB' in Sentezi

Polimerin biyosentezi, monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi, iki enzimatik aşama gerektirir. Üretim seviyesi, zincir uzunluğu ve oluşan kopolimerlerin kompozisyonu, bu enzimlerin performansına bağlıdır (Taguchi et al, 2001).

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

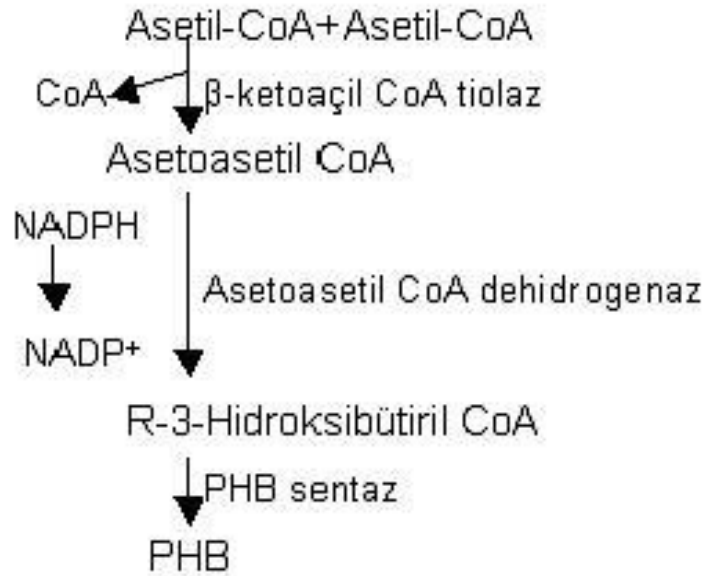
değişmekle beraber genelde nitrojen, potasyum, sülfür veya oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır (Braunegg et al, 1998).

En kapsamlı karakterize edilen polimer olan PHB'nin biyosentezi, üç değişik enzim tarafından katalize edilen, üç enzim reaksiyonundan oluşmaktadır (Şekil 1.7).

İlk reaksiyon, iki Asetil-CoA molekülünün,  $\beta$ -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'a polimerize olmaktadır. Asetil CoA ve 3-Hidroksibütiril CoA, PHB sentezindeki ara araçlardır. Asetat ve PHB, Asetil CoA'nın konsantrasyonunu artırabilir ve hücrede 3-Hidroksibütiril CoA ve 3H'ın sentezini bundan dolayı kolaylaştırır (Madison and Huisman, 1999).



Şekil 1.7. Phb biyosentezi (Madison et al, 1999)

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 olarak gösterilmektedir (Lafferty et al, 1988).

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 (Madison and Huisman, 1999).

Asetoasetil CoA dehidrogenaz (phbB geni ile kodlanan), bir R-3-hidroksiaçil CoA dehidrogenazdır ve 3-hidroksibütiril-CoA'yı asetasetil-CoA'ya çeviren ikinci basamağı katalizler. PHB biyosentez yolunda, tiolaz ve dehidrogenaz enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar, polimerizasyon için monomer sağlar. Oluşan bu R-3 Hidroksibütiril CoA monomerleri ise, PHB sentaz tarafından (phbC ile kodlanan) PHB'a polimerize edilir (Madison and Huisman, 1999).

PHB granülleri ile sentaz enzimi polimerizasyonu arasındaki ilişki yıllardır bilinmektedir. Sınırlı karbonlu ortamda gelişme sırasında, sentaz enzimi çözünmüş formda oluşmaktadır. Nitrojen azlığında ise PHB sentaz oluşmaktadır. Çözünmüş sentazın bu şartlar altında hızla tükenmesi PHB granülleri ile ilişkilidir (Anderson and Dawes, 1990).

PHA sentezinin anahtar enzimleri olan ve 3-hidroksiaçil-CoA substratlarının PHA'lara dönüşümünü katalizleyen PHA sentazların, 54 farklı çeşidi tayin edilmiş ve klonlanmıştır. Alt ünite kompozisyonu ve substrat özgüllüğüne bağlı olarak PHA sentazlar üç çeşit olarak ele alınır. I. Sınıf PHA sentazlar *Alcaligenes eutrophus*'dan, II. Sınıf PHA sentazlar *Allochrochromatium vinosum* ve III. Sınıf PHA sentazlar *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan enzimlerdendir (Rehm et al, 2002).

*Caulobacter crescentus* 'dan izole edilen 2019 Nükleotid içeren ve 673 aminoasidi kodlayan PHB sentaz geni, phaC, yaklaşık 73 kDa olan moleküler ağırlığı ile bugüne kadar tanımlanan en büyük PHA sentaz enzimidir (Qi and Rehm, 2001).

Miyake ve arkadaşları (Miyake et al, 2000), asetil-CoA'nın asetilfosfata dönüşümünü sağlayan fosfotransasetilaz enzimi ile ilgili yaptıkları çalışmada, bu enzimin açığa çıkardığı asetil fosfatın PHB sentaz aktivatörü gibi rol oynadığını ve PHB sentezini aktive ettiğini bildirmişlerdir. Ancak, bu enzimdeki azalmanın da PHB sentezi izyolundaki asetil-CoA substratını arttırabileceğini ve sonuç olarak PHB birikiminin yükselebileceğini rapor etmişlerdir.

PHB sentezinde iş gören enzimlerin farklı hücre içi şartlara uyum sağlayabilmeleri, PHB üreten mikroorganizmaların geniş bir çeşitliliğe sahip olmalarına neden olmaktadır. Ancak, her ne kadar PHB biriktirimi bir çok prokaryotik mikroorganizmada görülür ise de,  $\beta$ -keto açil CoA Thiolaz, Asetasetil CoA Dehidrogenaz ve PHB Sentazın enzimatik mekanizmaları ile ilgili biyokimyasal araştırmalar sadece bunların iki doğal yapımcısı olan *Zooglea ramigera* ve *Alcaligenes eutrophus*'da (Şekil 1.8) yapılmıştır. Örneğin, *Bacillus megaterium* (Şekil 1.8) PHB'in ilk olarak izole

edildiği ve tanımlandığı bakteri olmasına karşın, henüz biyosentez mekanizması tam olarak karakterize edilememiştir (Madison and Huisman, 1999).



Şekil 1.8. *Bacillus megaterium* (solda) ve *Alcaligenes eutrophus* (sağda) bakterileri (<http://db2.photoresearchers.com/feature/infocus255?action=store&iid=10074202&infocus=255&pf=1/2008>; [http://chem.kcn.ru/science/Katz2/microb\\_mediators.htm/2008](http://chem.kcn.ru/science/Katz2/microb_mediators.htm/2008))

#### 1.3.4. PHB'in Biyolojik Parçalanabilirliği ve Yenilenebilme Özelliği

PHB, biyolojik parçalanabilirliği nedeniyle, bir kez kullanılıp atılan eşyaların üretiminde büyük avantajlar sağlar (Lafferty et al, 1988).

PHB'in en önemli özelliklerinden biri, toprak ve insan vücudu vb. yerlerde, toksik ürünler meydana getirmeksizin tamamen parçalanabiliyor olmasıdır. PHB'in aerobik ortamdaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su; anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise metandır (Page, 1992; Lee, 1996; Braunegg et al, 1998).

PHB'in parçalanma süresi bir kaç aydan (anaerobik), bir kaç yıla (denizsu) kadar, katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanmada nitrojen oksidi oluşmaması, çevre korunmasında önemlidir. Parçalanmış biyoplastik bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir (Dave et al, 1996; Madison and Huisman, 1999; Chen et al, 1991).

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 (Madison and Huisman, 1999).



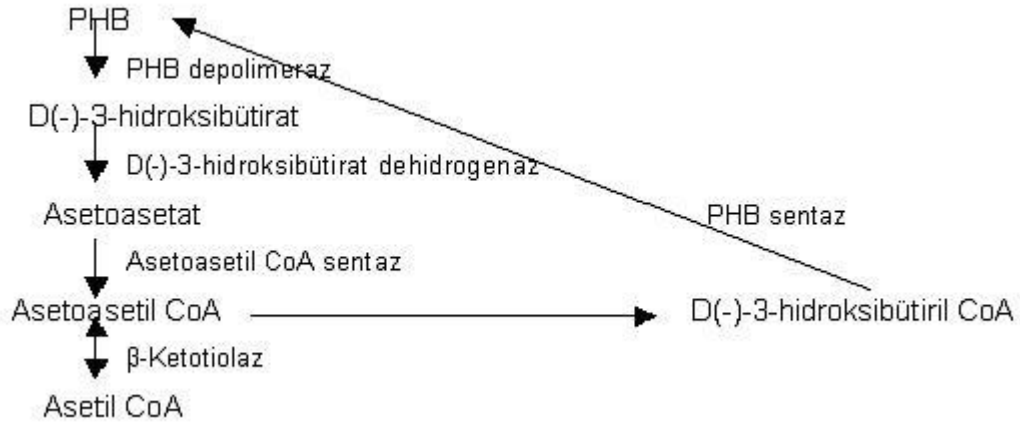
PHB ve onun kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında, nispeten kısa bir periyot içerisinde tamamen karbondioksit ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir (Lafferty et al, 1998). Tamamen parçalanma için gereken zaman ve biyoparçalanma oranının, kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal nüfus gibi etkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Lee, 1996; Lafferty et al, 1998).

Nguyen ve arkadaşları (Nguyen et al. 2002), 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.

Mergaert ve arkadaşları (Mergaert et al, 1993) ise, PHB'ın toprakta ve steril tampon çözeltide parçalanmasını araştırdıkları çalışmada, her iki ortamda da molekül 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) biyoparçalanabilirlik yüzdesinin toprağın çeşidi ve içerdiği su miktarına bağlı olarak değiştiği bildirmektedirler (Yakabe et al, 1992).

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 (Şekil 1.9) (Lafferty et al, 1988).



Şekil 1.9. PHB'ın parçalanması ve sentezi (Lafferty et al, 1988).

PHB'in depolimerizasyonu için kullanılan enzimler hücre içi veya hücre dışı enzimler olabilir. PHB'ı parçalayan hücre içi enzimler *Bacillus megaterium* ve *Alcaligenes eutrophus*'da saptanmıştır (Lafferty et al, 1988). Hücre içi depolimerazların, hücre dışı depolimerazlardan farklı fonksiyonları vardır. Hücre içi depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, doğal PHB elastomerlerini parçalarlar. Dönüşüm sonrasında kristalize olan, denature edilmiş PHB ise hücre dışı depolimerazlar tarafından hidrolize edilir (Lee, 1996). Bununla beraber, hücre dışı PHA depolimerazlarla hücre içi depolimerazlar arasındaki yapısal farklılık nedeniyle, bozulmamış, doğal PHA granüllerinin hücre dışı PHA depolimerazlarla direkt olarak parçalanamadığı bildirilmektedir (Braunegg et al, 1998).

PHA sentaz ve PHA depolimeraz aktivitelerinin, granüllerin membran protein tabakası ile yakın ilişkili olduğu ve membranı parçalayıcı veya tahrip edici metodlar olan PHB ekstraksiyon metodlarının, sentaz aktivitesinin kaybına ve depolimerizasyona hassasiyetin artmasına yol açtığı bildirilmektedir (Braunegg et al, 1998).

PHB'in hücre içi parçalanması, PHA depolimeraz enziminin PHB'ı hidrolize etmesi ile başlar. R-3-hidroksibütirat dehidrogenaz ve asetoasetil-CoA sentaz, R-3-hidroksi bütirat monomer ve dimerlerinin oluşumuna neden olur (Braunegg et al, 1998).

A. *eutrophus*'da PHB'in in vivo depolimerizasyonu sonucu oluşan 3-hidroksi bütirik asit monomerlerinin, hücredeki düşük -R(-)-3-hidroksi bütirik asit dehidrogenaz ve yüksek PHA depolimeraz aktivitesi ile oluşturulduğu bildirilmiştir (Lee, 1996). Ancak, Gribel'in (1968) *B. megaterium* 'la yaptığı çalışmada PHA sentaz ve PHA depolimeraz enzimlerinin granüle bağlı olmayıp, çözülmüş halde olduğu bildirilmiştir. Burada, granül dış membranının bir proteini, depolimeraz aktivitesini engeller. Buna göre, çözücü ile granül yapısının tahrip olması üzerine polimer hidrolizindeki artış açıklanabilir (Braunegg et al, 1998).

PHB'in, hücre dışı parçalanması depolimeraz tarafından katalizlenir. Bu enzimlerin aktiviteleri polimerin kompozisyonuna, amorf veya kristalin olmasına, yani fizik formuna, örneğin bölümlerine ve en önemlisi çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (Madison and Huisman, 1999). *Alcaligenes faecalis* 'de PHB depolimeraz enziminin etkinliğinin kristal yapının kalınlaşması ile azaldığı bildirilmiştir (Abe et al, 2000).

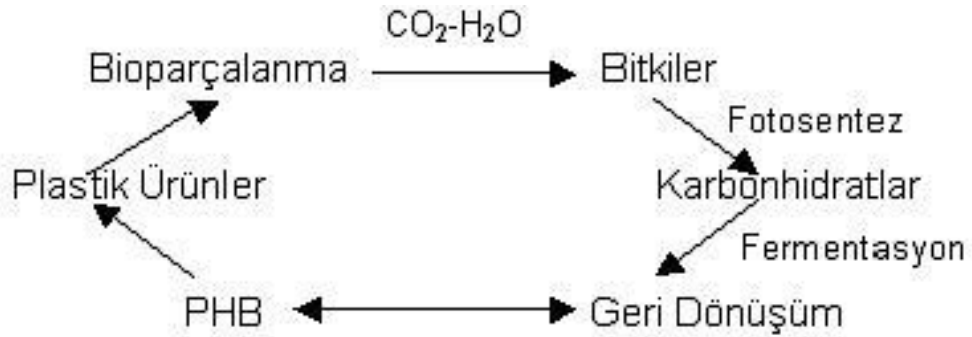
Abe ve Doi (Abe and Doi, 2002), (R)-3-hidroksialkanoik asitlerle kopolyester oluşturan (R)-3-hidroksibütirik asitlerin enzimatik parçalanması üzerine yaptıkları çalışmada, *Alcaligenes faecalis* T1 PHB depolimeraz enzimi varlığında, kopolyesterin erozyon oranının hem kristaliniteye hem de örneğin tabaka kalınlığına bağlı olduğunu ve enzimatik parçalanmanın monomer birimlerin karbon sayısındaki artışla arttığını bildirmişlerdir.

Hidroliz reaksiyonunun ürünü iz halindeki D(-)-3-hidroksibütirat monomeriyle esasen bir dimerdir. Dimer ve monomerler hücrelerce içeriye alınır. Hücre içinde bir hücre içi Beta-hidroksibütirat dimer hidrolaz tarafından dimer katalizlenir ve daha sonra oluşan monomer ara metabolik yol izlerine dahil edilir (Lafferty et al, 1988). Örneğin, *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas lemoignei* 'den elde edilen hücre dışı PHB depolimeraz enzimi, PHB'dan 3-Hidroksibütirik asit dimer ve trimer yapılarını serbestleştirmiştir. Yine *Bacillus megaterium* ile yapılan çalışmalarda da PHB'ın parçalanması sonucu 3-Hidroksibütirik asit trimer yapılarının hücrede biriktirildiği görülmüştür (Kato et al, 1992).

PHB'ın biyolojik yapısı ve biyolojik yıkıma uğraması kadar önemli olan, onun yenilenebilen kaynaklara dayalı üretilebilmesi gerçeğidir. 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 (Madison and Huisman, 1999).

PHB'ın fermentatif üretimi, şekerler ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır. Bu, tarımsal kaynaklı karbondioksit ve sudan meydana gelmektedir ve bunların biyoparçalanabilir PHB'a çevriminden sonra, yıkım ürünleri yine karbondioksit ve sudur (Lee, 1996). Dolayısıyla, bazı uygulamalar için biyoparçalanma kritik iken, PHB'lar, azalmakta olan fosil yakıtların yerine yenilenebilen bileşikler olarak dikkat çekmektedirler (Madison and Huisman, 1999).

Biyoplastiklerin yeniden oluşum devresi, sentez-parçalanma-sentez olarak gösterilmiştir (Şekil 1.10). Bu devre tabiatta kendiliğinden gerçekleşebileceğinden, çevre korunması açısından da önemlidir (Dave et al, 1996).



Şekil 1.10. PHB'ın karbon döngüsü (Dave et al, 1996).

### 1.3.4.1. PHB'ı Parçalayan Mikroorganizmalar

PHB 'ın parçalanmasında, topraktaki birçok mikroorganizma görev alır (Lafferty et al, 1988). Aerobik ve anaerobik PHB parçalayan bakteriler dışında funguslar da, bu yıkıma katılmaktadır. Bunlar toprak, kompostlar, aerobik ortamlar, anaerobik bataklıklar, göl-deniz suları ve hava gibi çeşitli ekosistemlerden izole edildiklerinden PHB'ın bu ortamlarda parçalanabildiği bildirilmiştir (Budwill et al, 1996; Molitoris et al, 1996). Topraklarda yer alan parçalayıcı organizmaların bazı Gram negatif mikroorganizmalar, Gram pozitif basiller, streptomycetler ve küf mantarları olduğu bildirilmiştir (Mergaert et al, 1993).

PHB depolimeraz enzimi salgılayan bakteri ve mantarlar, PHA'ları suda çözünebilen oligomer ve monomerlere hidrolize ederler. Aerobik ve anaerobik PHA parçalayan mikroorganizmaların bu yetenekleri PHA kristalleri veya filmleri üzerinde yapılan çalışmalarla gerçekleştirilir (Abe et al, 2000).

Molitoris ve arkadaşları (Molitoris et al, 1996), bir çalışmalarında, *Comomonas* sp., *Pseudomonas lemoignei* ve *P. fluorescens* tarafından polihidroksialkonatların yüzey tabakasının bakteriyel olarak parçalandığını bildirmişlerdir. Bakteriyel hidroliz sırasında polimerdeki morfolojik değişikliklerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile araştırıldığı çalışmada, parçalanmış örnekler bakıldığında hidrolizin yüzeyden başladığı görülmüştür.

Denitrifikasyon yapan bazı bakteriler, PHB'ı anaerobik olarak parçalayabilmektedirler. Khan ve Hiraishi (Khan and Hiraishi, 2001), aktif çamurdan izole ettikleri yeni bir denitrifikant kemoorganotrof bakterinin PHB ve kopolimeri P(HB-HV)'ı aerobik ve anaerobik şartlarda parçalayabildiğini bildirmişlerdir. Denitrifikasyon bakterilerinin PHB ve P(HB-HV)'ı parçalamaları onları elektron vericisi olarak kullanmaları ile mümkün olmaktadır.

Stieb ve Schink (Stieb and Schink, 1984), denizin anoksoik kısmından izole ettikleri, zorunlu anaerobik, Gram negatif bir bakteri olan *Ilyobacter polytropus*'un 3-hidroksibütiratu, bütirata fermente ettiğini tespit etmişlerdir.

Çevreyle dost, biyoparçalanabilir plastiklerin kullanım ve tüketimlerinin artması doğal çevredeki birikim ve biyoparçalanabilir potansiyellerinin iyice bilinmesi gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla, polimerleri parçalayıcı mikroorganizmalar ve mekanizmalar üzerinde yapılan çalışmalar da her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, Sei ve arkadaşları (Sei et al, 2001), PHB parçalayan mikroorganizmaların hızlı ve duyarlı bir şekilde tespitine yarayan, bir PCR primer seti ve gen probu dizayn etmişler ve bunun çalışmalarında kullandıkları 57 PHB parçalayan mikroorganizmadan 47'si üzerinde olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

#### 1.4. PHB Üreten Mikroorganizmalar

Polihidroksialkanatlar, hidroksialkanatların poliesterleridir. Bu poliesterlerin en iyi bilineni üzerinde en çok çalışılmasından dolayı PHB'dir. Birçok bakteri PHB ve diğer kopolimerleri, fazla karbon kaynağı altında azot, fosfor, magnezyum veya oksijenin sınırlandırıldığı dengesiz gelişme şartlarında sentezler ve intrasellüler olarak depo eder.

Günümüzde PHB depo eden 300'den fazla Gram negatif ve Gram pozitif bakteri tespit edilmiştir. Bu nedenle polimerin etkili üretimi için teşvik edilebilecek kültür stratejilerinin geliştirilmesi önemlidir. *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* 'nin mutant suşları ve diğer birçok bakterinin PHB'yi depoladığı bilinmektedir. Polimerin endüstriyel üretimi, uygun mikroorganizmanın seçimi, seçilen bakterinin gelişim oranı, polimer sentezi, depolamadaki maksimum oran ve ucuz karbon kaynaklarının seçimi gibi birçok faktöre bağlıdır. PHA'ların üyesi olan üzerinde en sıklıkla durulan P(3HB), P(3HB-co-3HV) ve P(3-hidroksikekzanat-co-3-hidroksioktanat) kopolimerleri bakterilerde yüksek verimlilikte üretilmeye başlanmıştır (Lee, 1996).

##### 1.4.1. *Alcaligenes*, *Azotobacter* ve *Pseudomonas* Cinslerinde PHB Üretimi

*Alcaligenes eutrophus*, endüstriyel PHB üretiminde en fazla kullanılan bakteri olup, hücre içinde yüksek miktarda PHB depoladığı (hücre kuru ağırlığının % 80'i) tespit edilmiştir. İngiltere'de (ICI), *A. eutrophus* 'un endüstriyel biyoplastik üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (Holmes, 1985).

*A. eutrophus* suşunun PHB biyosentez geninin *E. coli*'ye klonlandığı ve alıcı bakteride gen ekspresyonunun gerçekleştiği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Madison and Huisman, 1999; Liu et al, 1998). Bakteri tarafından üretilen termobiyoplastığın, toprakta fungus ve bakteriler tarafından bir kaç haftada parçalanabileceği bildirilmiştir (Anderson and Dawes, 1990).

Avustralya'da Biyoteknoloji Araştırma Ünitesi'nde parçalanabilen biyoplastik üretimi ile ilgili teknik yöntemler geliştirilmiştir. Üretimde, *A. latus*'un mutant tipleri kullanılmıştır. Bu bakterinin normal koşullarda üretildiğinde hücre içi PHB depoladığı bildirilirken (Şekil 1.5), bakteri pancar şekeri besi ortamında üretildiğinde, PHB miktarının hücre kuru ağırlığının %80'den fazla olduğu ve PHB ekstraksiyonundan sonra uygulanan çökertmede PHB'nin saflığının %99'dan fazla olduğu açıklanmıştır (Beyatlı, 1996).

*A. latus* bakterisinin kopolimer (R)-3-hidroksibütirat ve 4-hidroksibütirat üretimleri de incelenmiştir. Bakteri %1 sakkaroz ve %0.02 gammabutirolakton besi ortamında 30 °C'de 2 gün üretilmiştir. Sakkarozun 3HB'ye dönüştüğünü ve bu maddenin bakteri kuru ağırlığının %58'i kadar olduğunu ve (4HB) kopolimerin gamma-butirolaktondan meydana geldiğini, bu madde ile toplam

polimerin %60'a yükseldiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bakteri yalnız gamma bütirolakton substratlarda üretildiğinde, bakterinin ümediği ve polimerin oluşmadığını bildirirken, iki maddeyi içeren besi ortamına fruktoz şekeri ilave edildiğinde, bakteri ümesini sitümüle ettiği tespit edilmiştir (Hiramitsu et al, 1993).

*Azotobacter vinelandii* UWD mutant suşunun (Şekil 1.11), eksponansiyel gelişme fazında hücre kuru ağırlığının %75'i PHB'dir (Page and Knosp, 1989).

Şeker pancarı melasında, yüksek miktarda PHB depo edildiği de gösterilmiştir. Ayrıca farklı kompleks azot kaynakları ilavesinin PHB sentezine etkisi incelenmiş, %0,2 balık pepton ilavesiyle bakterideki PHB konsantrasyonun 7,5 g/l'ye ulaştığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, hücrelerin bu besi ortamında kolay kırılabilir olduklarını, 45 °C'de 10 dakika 1N amonyaklı suda muamele ederek, polimerlerin saflaştırılabildiğini de rapor etmişlerdir (Page, 1992; Page and Cornish, 1993).



Şekil 1.11. *Azotobacter vinelandii* bakterisi ([genome.jgi.psf.org/.../azovi/azovi.home.html/2001](http://genome.jgi.psf.org/.../azovi/azovi.home.html/2001))

Brandl ve ark. (Brandl et al, 1988), *Pseudomonas oleovorans* 'ı, n-alkanoik asitlerin karbon kaynağı olarak kullanıldığı homojen bir sucul sistemde geliştirmişlerdir. Bu ortamda 24 saatten sonra bakteri hücre ürününün 1,5 g/l'yi geçtiği ve hücre kuru ağırlığının %49'unun polimer olduğunu rapor etmişlerdir. *P. oleovorans* alkan hidrolaz enzim kompleksini kodlayan OCT plazmidi ile yağ asitlerini oksitlemekte,  $\beta$ -oksidasyon yolu ile katabolize ederek polimeri oluşturmaktadır.

Metilotrofik bir bakteri olan *Pseudomonas extorquens*'in PHB üretim yeteneği değişik karbon kaynakları içeren substratlarda araştırılmıştır. Bakterinin en yüksek PHB üretimi %0,5 metanol içeren substratta, hücre kuru ağırlığında %27 olarak saptanmıştır (Karaboz ve Umay, 1994).

### 1.4.2. Genetik Uygulamalarla Biyoplastik Eldesi

1920'li yıllardan bu yana hakkında birçok bilgi edinilmiş olmasına rağmen, ticari PHB üretiminin hala çok yüksek maliyete neden olması, sentetik polimerlerin yerini alabilecek kapasiteye sahip olan bu biyoplastığın en önemli dezavantajıdır. Son yıllarda, moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, daha fazla ve ucuz PHB üreten rekombinant bakteriyel suşların ve transgenik bitkilerin geliştirilmesi çalışmaları hız kazanmıştır (Ahn et al, 2000; Poirier, 2002).

#### 1.4.2.1. Rekombinant Mikroorganizmalardan PHB Üretimi

PHB'nin rekombinant mikroorganizmalardan yüksek oranda üretimi, vektör veya promotor aktivitesindeki zenginleşmeye bağlı olarak artmaktadır (Taguchi et al, 2001). Bu amaçla *Alcaligenes eutrophus* ve *Alcaligenes latus* bakterilerinin PHB biyosentez genlerinin başarıyla aktarıldığı rekombinant *Escherichia coli* suşları kullanılmaktadır (Ahn et al, 2000). Nitekim, 1987 yılında *A. eutrophus* genleri, *E. coli* bakterisine başarıyla klonlanmış ve normalde PHB üretmeyen bakterinin, modifiye edildikten sonra PHB ürettiği gösterilmiştir (Pool, 1989).

PHB biyosentetik genlerinin (*phbA*, *phbB* ve *phbC*) *Alcaligenes eutrophus*'da kromozom ve megaplasmid pHG1'de yerleştiği bildirilmiştir (Steinbüchel and Schlegel, 1991). Gelişen Hibridizasyon teknikleri ve heterolog tamamlayıcılar, bu ve diğer bakterilerin PHB biyosentez genlerinin izolasyonunu ve klonlanmasını mümkün kılmaktadırlar (Steinbüchel, 1991).

*E. coli*, PHB üretimi çalışmaları için etkin olarak kullanılabilen bir konakçı suş olup; sadece çok düşük molekül ağırlığa sahip granül halde olmayan PHB biriktirdiği bildirilmiştir (Sim et al, 1997). Rekombinant *E. coli*'nin PHB üretimi için geliştirilmesinin hızlı üreyerek, gerekli hücre yoğunluğuna ulaşması; polimerin yüksek miktarda biriktirilebilmesi; ucuz karbon kaynağı kullanabilmesi, üretilen PHB'nin kolay saflaştırılabilmesi ve sentezlenen polimerin depolimerizasyonuna neden olan enzimlerin eksikliği gibi önemli bazı avantajları vardır. Bu nedenle, rekombinant *E. coli* bakterilerinden %80-90 oranında PHB verimi elde etmek mümkün olduğu bildirilmektedir (Lee, 1996).

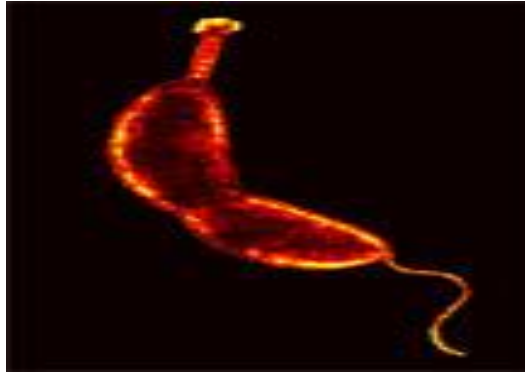
Lee ve arkadaşları (Lee et al, 1994), *E. coli*'de PHB üretimi için, *A. eutrophus* PHB sentez genleri taşıyan plazmidler kullanmışlar ve plazmid stabilitesinin yüksek olduğunu belirttikleri çalışmalarında, PHB veriminin %80,1'e ulaştığını bildirmişlerdir.

Peynir altı suyu gibi ucuz substratlardan PHB üretiminin, bir rekombinant *E. coli* suşu kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, farklı oksijen konsantrasyonları altındaki PHB verimleri araştırılmıştır. Oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığı tespit edilen çalışmada, yüzde PHB

verimi %80'e ulaşmıştır. Araştırmacılar, rekombinant *E. coli* 'de PHB biyosentez zamanı ve oksijen sınırlandırılması zamanının PHB verimi için önemli olduğunu belirtmişlerdir (Kim, 2000).

Klinke ve arkadaşları da (Klinke et al, 1999), şeker veya melas gibi ucuz karbonhidrat kaynaklarından, rekombinant *E. coli* yardımıyla PHA üretimi için alternatif stratejiler yapılabileceğini ve *E. coli*'nin kısa sürede üreme, PHA'ın kolayca saflaştırılabilmesi, polimeri parçalayıcı enzim sisteminin yokluğu nedeniyle dikkat çektiğini söylemişlerdir. Araştırmacılar,  $\beta$ -oksidasyon döngüsünü işletemeyen bir *E. coli* suşuna, glukonattan PHA sentezleyemeyen *Pseudomonas* bakterisinden orta zincir uzunluğunda PHA polimeraz enzimini kodlayan geni aktararak, onun glukonattan orta zincir uzunluğunda PHA üretmesini sağlamışlardır. Rekombinant *E. coli* 'deki PHA verimi %2,3 olarak tespit etmişlerdir.

Qi ve Rehm (Qi and Rehm, 2001 ), bilinen en büyük PHB sentaz genine sahip olduğunu bildirdikleri, glukoz varlığında %18 PHB üreten, *Caulobacter crescentus* (Şekil 1.12) bakterisini genetik uygulamaya tabii tutmuşlardır. Bakterideki PHB sentaz enzimi genini, phaC, kodlayan bölgeyi mutant *A. eutrophus* PHB(-)4 ve recombinant *E. coli* JM 109'a aktarmışlardır. Sonuçta yüzde PHB verimi sırasıyla %62 ve %6 olarak tespit edilmiş, özellikle *A. eutrophus* PHB(-)4'den alınan verim dikkate değer görülmüştür.



Şekil 1.12. *Caulobacter crescentus* bakterisi (<http://thefutureofthings.com/articles/31/natures-super-glue.html/2006>)

Ahn ve arkadaşlarının (Ahn et al, 2000), *Alcaligenes latus* PHA biyosentez genlerini kopyaladıkları *E. coli* CGSC 4401 suşunun, peynir altı suyundan ürettiği PHB miktarını tespit ettikleri çalışmalarında, yüzde PHB veriminin yaklaşık %60 civarında olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, farklı oranlardaki çözülmüş oksijen konsantrasyonunun etkisini de inceledikleri



araştırmalarının sonucunda, mikroorganizmanın aktif PHB sentez fazını geçirdiği sırada çözünmüş oksijen konsantrasyonunun düşürölmesinin PHB sentezini hızla arttırdığını bildirmişlerdir.

Slater ve arkadaşları (Slater et al, 1992), yaptıkları çalışmada, *A. eutrophus* 'dan alınan PHB biyosentez genlerini *E. coli* fadR atoC mutant bakterisine aktararak, glukoz ve propiyonat içeren ortamda P(HB-co-HV) kopolimerinin üretilmesini sağlamışlar ve özellikle ortamdaki propiyonat miktarının HV şekillenmesinin oranını değiştirdiğini tespit etmişlerdir.

Föllner ve arkadaşları (Föllner et al, 1995), metanol içeren ve nitrojen ve fosforu sınırlandırılmış ortamda, çok az miktarda PHB biriktiren *Mycoplasma rubra* B346 suşuna PHA sentez enimi genlerini aktarmışlar ve PHB birikimini %9,6'den %25'e yükseldiğini bildirmişlerdir.

Hori ve arkadaşları (Hori et al, 2002), *Bacillus megaterium* 'un kendini yıkan bir suşu üzerinde yaptıkları çalışmalarla elde ettikleri transformantın PHB üretimini incelemişler ve ortamda glukoz tükenince hücrelerin kendiliğinden parçalanıp, PHB'ın serbestleştiğini tespit etmişlerdir.

#### 1.4.2.2. Transgenik Bitkilerden Biyoplastik Eldesi

Bitkiler birer PHB üreticisi olmamalarına karşın, PHB genlerinin taşıyıcısı olabildiklerinden, PHB üretebildikleri (Dunlop and Robards, 1973) ve bu nedenle, transgenik bitkilerin çok miktarda ve ucuz PHB üretimi için potansiyel organizmalar olduğu bildirilmiştir (Poirier, 2002; www.bio.umass.edu; Klinke et al, 1999).

Yapılan çalışmalarda bunlardan, kuru ağırlıklarının %20-40 arasında PHB elde edilebilmiştir (Klinke et al, 1999).

Bitkilerde biyoplastik sentezinin değişik metabolik yollarla, sitoplazma, plastid veya peroksizomda gerçekleşebildiği bildirilmektedir (Poirier, 2002). Araştırmacılar, gen aktarımı yapılmış bitkilerin, PHB üretimine başladıktan sonra nişasta üretimini bıraktıklarını ve tüm enerjilerini polimer yapımı için yönlendirdiklerini söylemektedirler. Bunun, yeni enzimlerin eklenmesi ve varolan enzimlerin çalışmasının engellenmesi ile ortaya çıktığını düşünen bilim adamları, PHB'ı metabolize edemeyen bitkilerin tohumlarının gelişmemesini ise bir problem olarak belirtmektedirler (Pool, 1989).

*Alcaligenes eutrophus* 'dan alınan PHB genleri, mısır, patates gibi birkaç farklı bitkiye aktarılarak, onların polimer üretmesi sağlanabildiği ve Imperial Kimya şirketi'nin pilot uygulamalarında yılda 50 ton PHB-HV kopolimerinin elde edilebildiği bildirilmiştir (Pool, 1989).

Mısır ve arpa yağlı tohumlarında, ayçiçeği ve soya fasulyesinde PHA'ların üretilmesi için büyük şirketler tarafından araştırmalara devam edilmektedir (Braunegg et al, 1998).

Bitkilerden PHB eldesinde tüm fermentasyon işlemlerinin ortadan kalktığını ve plastiğin direkt olarak elde edilebildiğini bildiren araştırmacılar, genetik olarak değiştirilmiş mısır bitkisine sentez ettirilen plastiğin, bitkinin çok fazla büyümeden hasat edilmesi ile elde edildiğini rapor etmişlerdir (www. sciam.com).

Modifiye mısırdan PHA eldesinin ise, oldukça sert ve ağır bir işlem gerektirdiği ancak karbondioksit ve güneş ışığının, karbon ve enerji kaynağı olduğu bu PHA üretiminde yapılması gerekenlerin, fermentasyon işlemlerinden daha fazla olmadığı söylenmektedir (Braunegg et al, 1998).

Bitkilere PHA genlerinin aktarılması ile ilgili ilk araştırmalarda, *A. eutrophus* bitkisinden alınan genlerin aktarıldığı bitki, *Arabidopsis thaliana* olmuştur (Şekil 1.13). Poirier, *A. thaliana* sitoplazmasında, *A. eutrophus*'un PHA sentaz ve asetoasetil-CoA redüktaz genlerinin etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. 3-ketotiaz geni bitki sitoplazmasında mevcuttur. Bu deneyler, tüm bitki dokularının koful, çekirdek ve sitoplazmalarında PHB sentezinin olduğunu fakat, düşük miktarda ve zayıf tohum gelişimine sebep olduğunu göstermiştir (Poirier, 2002).



Şekil 1.13. *Alcaligenes eutrophus* (solda) ve *Arabidopsis thaliana* (sağda) (<http://www.genome.bnl.gov/Sequencing/Rmetallidurans/2002>; <http://www.botanik.uni.karlsruhe.de/garten/fotos-knoch/2005>)

Daha sonraki araştırmalar, asetil-CoA'dan trigliseridlerin oluştuğu yer olan, plastid gibi özel organellerde PHB üretilme yöntemlerinin geliştirilmesine yönlendirilmiştir. Bu çalışmalarla, sitoplazmada depolanan PHB'den 100 kez daha fazla, bitkinin kuru ağırlığının %14'ü kadar homopolimer elde edilmiştir ve PHB granüllerin şekli ve büyüklüğü, bakteriyel granüllere benzemektedir (Braunegg et al, 1998).

*A. eutrophus*'un PHA sentaz ve asetoasetil-CoA redüktaz genlerinin aktarıldığı pamuk bitkisinde de, pamuk liflerinin PHA içerdiği ve bu liflerin yüksek ısıya daha dayanıklı hale geldiği bildirilmiştir (Braunegg et al, 1998).

Şimdiye dek yapılan çalışmalar, PHB üretiminin transgenik bitkiler ile ucuzlatılabileceğini göstermektedir ki bu gelecekte marketlerde “plastik patatesler”le karşılaşabileceğimizi düşündürmektedir (Lee, 1996).

Araştırmalarda elde edilen sonuçlardan, PHB üretiminin mikroorganizmaların türüne, üretim şartlarına ve rekombinasyonların başarısına bağılı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Gelecek yıllarda PHB polimerinin, geniş kullanım alanlarına sunulabilecek düzeyde üretiminin büyük faydalar getireceği açıktır.

#### 1.4.3. Diğer Bakterilerde PHB Üretimi

Biyolojik olarak parçalanabilen plastik olan PHA'ın fotosentetik üretimi için, güneş ışığı yardımıyla, sera etkisi yaratan gaz olan karbondioksitin kullanımı çevresel olarak kabul edilebilir olduğundan, bu iş için siyanobakterlerin seçiminin uygun olduğu belirtilmiştir. Karbondioksitten PHA biriktiren üç grup mikroorganizma vardır ki bunlar, hidrojen okside eden kemoototrofik bakteriler, genetik mühendisliği ile yükseltilmiş bitkiler ve siyanobakterlerdir. Bunlar oksijenik fotosentez ile PHA depo ederler.

Asada ve arkadaşları (Asada et al, 1999), termofilik izolat *Synechococcus* MA19 suşu ile yaptıkları çalışmada, fotoototrofik şartlarda ve nitrojen azlığında PHB biriktirdiğini ve PHB granüllerinin tilakoid membranla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Gomez ve arkadaşları (Gomez et al, 1996), 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.

Bitkide nodül oluşturan toprak bakterilerinden olan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de hücre içi PHB depo etme yeteneği birçok araştırmaya konu olmuştur. Bonartseva ve arkadaşlarının (Bonartseva et al, 1989) yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, PHB içeriği, nitrojenaz enzimi

aktivitesi ile ters, hidrogenaz enzimi aktivitesi ile doğru orantılıdır. Yine, *R. leguminosarum*, *R. trifoli*, *R. galega*, *R. meliloti*, *R. 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  $\text{KNO}_3$ 'lü besiyerinde %65 ile *R. phaseoli* 'den elde edildiği bildirilmiştir (Poirier, 2002; Bonartseva et al, 1994).

Jan ve arkadaşları (Jan et al, 1996), *R. meliloti* 'de ortamda karbon kaynağı olduğunda ve gelişme için gerekli nitrojen gibi elementler sınırlı tutulduğunda PHB'ın depo edildiğini bildirmişlerdir. Karbon kaynağı tümüyle kullanıldığında ise PHB metabolize edilmektedir. *R. meliloti* fruktozlu ortamda üretildiğinde büyük miktarda PHB depo etmektedir.

Tal ve Okon (Tal and Okon, 1985), *Azospirillum brasiliense* Cd suşunun, eksponansiyel fazın son aşamasında, yüksek C/N oranında, oksijen sınırlandırıldığında %5 olan PHB veriminin, %40'a ulaştığını bildirmişlerdir.

Lillo ve Rodriguez-Valera (Lillo and Valera, 1990), ise, 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.

Bunların dışında Laktik asit bakterilerinin de PHB üretimi için kullanılabileceği bildirilmiştir. *Lactobaciller* sürekli fermentasyon şartlarında üretilseler, daha fazla PHB biriktirdikleri ve bunun ticari termoplastik üretiminde de kullanılabileceği söylenmiştir (Beyatlı, 1996).

Manna ve arkadaşları (Manna et al, 1999), topraktan izole ettikleri 55 toprak streptomycet üzerinde yaptıkları çalışmada, *Streptomyces griseorubiginosus* olarak tanımlanan izolatin, %2 glukoz varlığında, durgun fazda, miselial kuru ağırlığının %9,5'u kadar PHB ürettiğini tespit etmişlerdir.

Aktif çamur bakterilerinde de PHB'ın varlığı rapor edilmiş ve PHB gibi bakteriyel depo polimerlerinin önemi, aktif çamur işlemlerinde karbon substrat değişimlerinin anlaşılmasında ayrıntılı olarak çalışılmıştır (Beun et al, 2002).

Mikrobiyal oksidasyon sırasında yapışkan, topaklı ve gri-siyah bir yapı olan aktif çamur, mikrobiyal hücre, heteropolisakkaritler ve polyester içerdiği bildirilmiştir (Wallen and Rohwedder, 1974).

Loosdrecht ve arkadaşları (Loosdrecht et al, 1997), aktif çamur içindeki bakterilerin PHB depo ettiklerini ve hücre dışı maddeler tükendiğinde, depolar aracılığıyla gelişmelerini sürdürdüklerini belirtmişlerdir.

#### 1.4.4. *Bacillus* Cinsinde PHB Üretimi

Doğal PHB granülleri, ilk kez *Bacillus megaterium* ve *Azotobacter beijerinckii*'nin DNaz ile muamele edilen hücrelerinden, gliserol yüzeyinden toplanarak izole edilmiştir (Anderson and Dawes, 1990)

Benoit ve ark. (Benoit et al, 1990), *B. thuringiensis* HD-1 suşunda, sporulasyon ile PHB üretimi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. HD-1 suşunun, glukoz-tripton mineral tuz karışımında geliştirildiğinde laktat, pirüvat, asetat, aseton ve PHB ürettiği bulunmuştur. Bakterinin, asetatı 2-3 bütandiol siklusuna okside ettiği, daha sonra PHB üretimi için kullanıldığı belirlenmiştir. Hücrede biriktirilen PHB'nin, sporulasyon sırasında enerji kaynağı olarak tüketildiği de saptanmıştır.

Aktif çamur biyokütlesinde de biyolojik polimerin varlığı kanıtlanmıştır (Dave et al, 1996). Araştırmacılar, teşhis ettikleri 12 bakteriyal suştan, *Bacillus* cinsine ait 10 bakterinin PHB ürettiğini bulmuşlardır. Suşlar arasında en yüksek PHB üretimini *Bacillus* sp. IPCB-403 göstermiş, optimum kültür şartlarında bakterinin %70'inin PHB olduğu tespit edilmiştir. Aslım vd. (Aslım ve diğerleri, 1998), topraktan izole ettikleri farklı *Bacillus* türlerinde PHB miktarlarının suş ve türlere göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, suşların hücre kuru ağırlıklarına göre %6,53-48,13'ünün PHB olduğunu rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, *B. sphaericus* suşlarının yüzde PHB verimleri %5-25,88 arasında tespit edilmiştir. Suşların, Beef ekstrakt ve Sodyum asetatın farklı konsantrasyonlarındaki PHB üretimleri incelenmiş ve %0,2 Beef ekstrakt konsantrasyonunda *B. sphaericus* ATCC 7055'in maksimum PHB verimine (%32,50) ulaştığı tespit edilmiştir (Mercan ve Beyatlı, 2001).

#### 1.5. *Bacillus* Cinsi Hakkında Genel Bilgiler

*Bacillus* cinsi Bacillaceae familyasına dahil olup, Gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. 20-30 °C'de ürerler, vejetatif şekilleri dayanıksızdır, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de vardır (Ayhan, 2000).

Çoğu *Bacillus* türü, polisakkaritler, nükleikasitler ve lipidler gibi polimerleri parçalamaya yarayan ve hücre dışına salgılanan hidrolitik enzimler üretir. Bu moleküllerin parçalanmasıyla bakteri karbon kaynağı ya da elektron taşıyıcı olarak kullanabileceği ürünler elde eder. Yine çoğu *Bacillus* türü antibiyotik üretebilir. Basitrasin, polimiksin, tirozidin, gramisidin ve sirkülin bu antibiyotiklere örneklerdir. Özellikle *B. popilliae* ve *B. thuringiensis* (Şekil 1.14.) türlerini içeren bir

grup Bacillus, böcek larvalarını öldüren maddeler üretebilir. Günümüzde bu türlerin sporlarından hazırlanan biyolojik böcek ilaçları sentetik böcek ilaçlarına alternatif oluşturmakta ve doğaya verilen zararın azaltılmasında büyük rol oynamaktadır ([www.biltek.tubitak.gov.tr](http://www.biltek.tubitak.gov.tr)).



Şekil 1.14. Sağlıklı böcek larvası (solda) ve *B. popilliae* ile enfekte larva (sağda) (<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/images/2008>)

Endospor oluşturular. Vejetatif hücreler  $0,5 \times 1,2 \mu\text{m}$  ile  $2,5 \times 10 \mu\text{m}$  çapındadır. Bacillus cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah pigmentli kolonilere de rastlanır (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Elliye yakın türü ihtiva eden Bacilluslarda endosporun hücre içinde yeri farklı olabilir. Spor hücre merkezinde veya uçta olabilir. Vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Şekeri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşumu altında parçalarlar ve kokuşmaya neden olurlar (Çon ve Gökalp, 1997).

Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren: nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Altun ve diğerleri, 2002).

Birkaç Bacillus türü polipeptit sınıfı antibiyotik üretir. Antibiyotikler, kültürlerde spor oluşturma aşaması başladığında gözlenmiştir (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Bacillus türlerinin tanımlanmasında ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için spor ve sporangium morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre Bacillus türleri 3 grupta toplanmıştır.

Birinci grup Bacillus türleri kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grupta sporangia şişmemiştir. Sporlar elips veya silindirik şekilli, santral veya terminal konumludur. A ve B

grubu arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1 µm'den küçük, B alt grubunda ise 1µm'den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. megaterium* ve *B. cereus*; B alt grubuna örnek olarak *B. licheniformis*, *B. subtilis* ve *B. coagulans* verilebilir.

İkinci grup Bacillus türlerinde sporangia şişmiştir. Sporları elips, santral veya terminaldir. Örnek olarak *B. macerans*, *B. berevis* verilebilir.

Üçüncü grupta yer alan Bacillus türlerinde de sporangia şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal ve terminal konumludur. *B. sphaericus* bu gruba örnektir (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Birçok türü bulunan Bacilluslar toprak, su ve çeşitli gıdalarda bulunurlar. İnsanlarda gıda zehirlenmelerine, konserve gıdalarda ise bozulmalara neden olurlar. *Bacillus subtilis*, subtilin adlı bir bakteriyosin üretmektedir. *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens* ve *B. stearothermophilus* bakteriyel alfa-amilaz enzim üretiminde kullanılmakta olup, amilaz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalar.

*B. subtilis*, *B. mesentericus* ve *B. stearothermophilus* ise bakteriyel proteinaz enzimi üretiminde kullanılmaktadır. Bu enzim ise et ve balık etlerinin tenderize edilmesinde (yumuşatılması), şarap ve bira endüstrisinde protein bulanıklığının alınmasında stabilize edici olarak kullanılmakta olup, miso ve soysos üretiminde starter kültür olarak da yararlanılmakta olduğu bildirilmektedir (Ayhan, 2000).

### 1.5.1. *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Üretimi

Çeşitli araştırmacılar, biyoplastik üretiminde *Bacillus* biyopolimerlerinin potansiyel gelecek uygulamalar için kullanılabileceğini bildirmektedirler (Dave et al, 1996; Labuzek and Radecka, 2001). 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 (Wu et al, 2001).

*Bacillus* türlerinde PHB, sporulasyon için hücre içi enerji rezervi olarak işlev görmektedir. Örneğin, *B. cereus*'da spor oluşumundan hemen önce PHB birikiminin maksimum oranda olduğu ve bakterinin sporulasyon döneminde PHB'ın kullanıldığı bildirilmektedir (Nickerson et al, 1981).

Benoit ve arkadaşları (Benoit et al, 1990), *B. thuringiensis* üzerinde yaptıkları çalışmada, durgun fazdaki sporulasyon sırasında PHB'ın tüketilmeye başladığını ve PHB'ın spor şekillenmesi sırasında enerji kaynağı olarak kullanıldığını bildirmişlerdir.

Kato ve arkadaşları (Kato et al, 1992) yaptıkları çalışmada, *B. megaterium* 'da 3-hidroksibütirik asit trimer yapılarının geç ekspanansiyel fazda biriktirildiğini, durgunlaşma ve ölüm fazında ise parçalanma sonucunda en yüksek düzeye ulaştıklarını söylemişlerdir.

Lach ve arkadaşları (Lach et al, 1990), filamentli, küçük sferik hücreler oluşturan *B. megaterium* PV302 mutantında, PHB miktarının hücre kuru ağırlığının %16'sı kadar olduğunu tespit etmişlerdir. Atasal suşla karşılaştırıldığında, mutantta sporulasyon ve gelişmede bozukluklar görüldüğü bildirilmiştir.

Yapılan araştırmalarda bazı *Bacillus* suşlarının hücre kuru ağırlığının %50 den fazlasını PHB şeklinde biriktirebildiği bildirilmektedir (Dave et al, 1996; Chen et al, 1991; Beyatlı ve diğerleri, 1999).

Chen ve arkadaşları (Chen et al, 1991), zenginleştirilmiş besiyerinde büyütülen *Bacillus* bakterilerinde hücre kuru ağırlığına göre %5-20 arasında PHB biriktirildiğini bildirmektedirler.

Kato ve arkadaşları da (Kato et al, 1992) kendi izole ettikleri *B. megaterium* B-124 suşunun hücre kuru ağırlığının %20 sinin PHB olduğunu bildirmişlerdir.

Dave ve arkadaşları (Dave et al, 1996), aktif çamurdan izole edilen 10 *Bacillus* suşundan özellikle birinin %70 PHB verimliliğe sahip olduğunu söylemişlerdir.

Mercan ve Beyatlı (Mercan ve Beyatlı, 2001), 10 adet *B. sphaericus* suşunun PHB üretimlerini tespit ettikleri çalışmalarında, PHB üretiminin %5,00-%25,88 arasında bulmuşlardır. Ancak özellikle üretimi en yüksek olan bazı suşların, %0,2 beef ekstrakt içeren besi ortamında yüzde verimlerinin %32,50'ye kadar çıktığını bildirmişlerdir.

Labuzek ve Radecka (Labuzek and Radecka, 2001), *B. cereus* UW85 suşunu nitrojeni sınırlandırılmış şartlarda geliştirmişler ve PHB verimini %9 olarak tespit etmişlerdir.

Wu ve arkadaşları (Wu et al, 2001), melaslı besiyerindeki oksijen şartlarını değiştirerek yaptıkları çalışmada, oksijen miktarındaki azalmanın sporulasyona neden olduğunu ve PHB üretiminin düştüğünü; nitrojen ve fosforun oranının karbona göre düşük olduğu besiyerlerinde ise PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. Jma5 suşunun, PHB verimini %25-35 olarak tespit etmişlerdir.

*Bacillus*'ların amilaz ve proteinaz enzimlerinin varlığı nedeniyle gıda atık sularından faydalanabileceğini bildiren Law ve arkadaşları (Law et al, 2001), aktif çamurdan izole ettikleri *Bacillus* suşlarını arpa ve soya atık suyunda geliştirerek PHB verimlerini araştırmışlar ve suşlardan HF-1'in atıklardan %19,22 HF-2'nin ise %10,18 PHB verimine ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, düşük maliyetli PHB üretimi için ucuz karbon kaynaklarının kullanılabileceğini bildirmişlerdir.



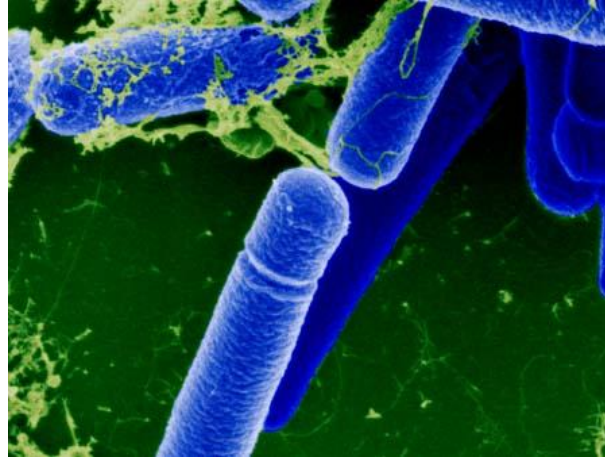
Gouda ve arkadaşları (Gouda et al, 2001), şeker kamışı melası ve mısır suyunu karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanarak *B. megaterium* 'da PHB üretimini incelemişler ve en yüksek PHB miktarının melas ve glukoz içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hücre gelişiminin en iyi olduğu melas yüzdesinin %3 olmasına rağmen, en yüksek PHB verimi olan %46,2'lik oranın %2 melas içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

### 1.6. *Bacillus subtilis* ve Genel Özellikleri

Aerobik, fakültatif anaerobik olan etken 20-30 °C'de ürer ve vejetatif şekilleri dayanıksız olup, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. Toz, toprak, su ve heryerde bulduklarından besin maddelerine kolaylıkla bulaşır. Özellikle sütte çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkarırlar. Diğer besin maddelerinde üredikleri zaman toksin oluştururlar. Kuluçka süresi: 2-18 saattir. (<http://tr.wikipedia.org/2008>)

Kirpikli bir basil olduğu için hareketli, sporları oval ve subterminaldir. Kapsülsüz, gram pozitif, aerop, oda sıcaklığı ve zenginleşmemiş besiyerinde rahatlıkla üreyebilen, R tipi koloniler yapan saprofit yani doğada yaygın olarak bulunan bir basildir.

Saprofit bir bakteri olmakla beraber doku içinde veya göz içine bulaşarak enfeksiyonlara ve bazı besin zehirlenmelerine neden olabilir ([www.mikrobiyoloji.org/2008](http://www.mikrobiyoloji.org/2008)).



Şekil 1.15. *Bacillus subtilis* bakterisi

(<http://www.dailytech.com/Scientists+Use+Bacteria+to+Store+Data/article6262.htm/2007>)

### 1.7. PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar

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 (Jan et al, 1996; Kato et al, 1992; Tanaka et al, 1993). Ayrıca, bütirik ve pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit, L-Laktat gibi karbon kaynakları kullanımı da denenmiştir (Tanaka et al, 1993; Doi et al, 1986).

PHB ve kopolimerlerin kompozisyonu, kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişebildiği, ancak bu dağılımın tesadüfi olabileceği de söylenmiştir (Doi et al, 1986; Bloembergen et al, 1986).

Ramsay ve arkadaşları (Ramsay et al, 1990), *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas cepacia* ve *Micrococcus halodenitrificans* bakterilerini glukoz ve propiyonik asit bulunan ortamda geliştirdiklerinde, nitrojeni sınırlandırılmış şartlar altında P(HB-co-HV) kopolimeri ürettiklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, kopolimer içindeki HV oranının propiyonik asit miktarına bağlı olarak değiştiğini de saptamışlardır.

Chen ve arkadaşları (Chen et al, 1991), hücre kuru ağırlığının %85'i kadar PHB biriktirdiğini bildikleri *A. latus* DSM 1122 suşunun PHV üretimi üzerine yaptıkları çalışmada, ortama Na-valerat eklediklerinde sadece PHV, oysa propiyonat ve asetatı aynı anda ilave ettiklerinde PHB ve PHV elde edildiğini tespit etmişlerdir.

Amonyum klorür (Kato et al, 1992), amonyum asetat, balık peptonu (Page and Cornish, 1993; Asada et al, 1999), amonyum sülfat (Braunegg et al, 1998) vb. azot içeren kaynaklardan da PHB verimini artırıcı çalışmalarda yararlanılmaktadır.

Durner ve arkadaşları (Durner et al, 2000), *Pseudomonas oleovorans* ile yaptıkları çalışmada, oktonat ve amonyum içeren besiyerini farklı C/N oranlarında hazırlamışlar ve C/N oranı arttığında PHA birikimini yükseldiğini ve bunun nitrojenin sınırlandırılmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir

*Pseudomonas pseudoflava* ile yapılan bir çalışmada da, besiyerinde karbon kaynağı olarak glukoz ve ksiloz kullanılırsa %PHB veriminin %22, arabinoz kullanılırsa %17 olabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar, arabinoz ve ksiloz içeren ortamda, PHB biriktirilmesinin son aşamasında nitrojen sınırlandırıldığında, PHB miktarının düştüğünü de bildirmişlerdir (Bertrand et al, 1990).

Page ve arkadaşları (Page et al, 1995), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunu, glukoz ve balık peptonu içeren besi ortamında geliştirdiklerinde %80 PHB verimine ulaşmışlardır.

*Rhizobium meliloti*'nin fruktozlu ortamda üretildiğinde yüksek miktarda PHB depo ettiği bildirilmiştir (Jan et al, 1996).

*Alcaligenes eutrophus*'da Tanaka ve arkadaşları (Tanaka et al, 1993), L-Laktatlı besiyerinde % 55 PHB birikimi tespit etmişlerdir.

Biyoparçalanabilir plastiklerin imali için potansiyel hammadde olan PHB'ın, fermentasyon olayı ile kütle üretiminin geliştirilmesi yoluna gidilmiştir. Fermentasyon olayı, kesikli, yarıkesikli ve sürekli fermentasyon olarak gerçekleştirilebildiği bildirilmiştir (Braunegg et al, 1998).

### 1.8. PHB'ın Ucuz Üretimi

PHB oluşumu için kullanılan şeker substratının fiyatının, PHB üretiminin ticari başarısında sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu ve polimer üretiminin her bir tonu için, 3 ton glukoz kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Page, 1992a).

Kullanılan glukozun, maliyeti yükseltmesi sonucunda üretilen PHB'ın kg fiyatı 15-30 dolar arasında değişmektedir. Polimerin kullanım sınırlarını belirleyecek olan maliyet fiyatını düşürmek için, rekombinant türler üzerinde çalışmalar yapılmasının yanısıra, farklı ve ucuz karbon kaynakları kullanarak yüksek PHB verimi elde eden suşlar üzerinde araştırmalar da yapılmaktadır (Witholt and Kessler, 1999).

Düşük fiyatlı biyoplastik üretimi için melas, (Wu et al, 2001; Gouda et al, 2001), ksiloz, arpa ve soya atık suları (Law et al, 2001) ve peynir altı suyunun (Ahn et al, 2000) kullanılması araştırılmaktadır. Ucuz PHB üretimi için kullanılabilen melas, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile, büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Beaulieu et al. 1995).

Page (Page, 1992a), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun şeker pancarı melası gibi kompleks karbon kaynaklarında da yüksek PHB verimine sahip olduğunu saptamıştır.

Page (Page, 1992b), iyi bir polimer üreticisi olan *A. vinelandii* UWD suşunun, ucuz karbon kaynağı olan şeker pancarı melasında üretildiğinde, glukozun üçte biri maliyete mal olduğunu ve eğer ortama valerat ilave edilirse PHV kopolimerinin oluştuğunu bildirmiştir. Şeker pancarı melasının tanımlanmamış büyümeyi uyarıcı faktörler içerdiğini söyleyen Page, şeker pancarı melasından polimer üretimini arttırmak için ortama azot bileşenleri ilave edilebileceğini de belirtmiştir.

PHB'ın pratik uygulamalarında üretim fiyatlarının indirgenmesi için daha ekonomik kültür ortamları araştırılırken substrat maliyetinin düşürülmesinin yanı sıra, karbondioksidin dönüştürülüp ucuz yoldan PHB üretilmesi için, *Cyanobacter* ile de çalışmalar yürütülmektedir. (Miyake et al, 2000; Asada et al, 1999; Klinke et al, 1999).

Ucuz karbon kaynakları ve hatta peyniraltı suyu gibi atıklardan PHB üretimi yapılarak verimin arttırılması amaçlanmaktadır. Ahn ve arkadaşları (Ahn et al, 2000), rekombinant *E. coli* kullanarak peynir altı suyundan yüksek PHB verimi alındığını bildirmişlerdir.

Kim (Kim, 2000), ise çalışmasında, yine rekombinant *E. coli*'yi peynir altı suyunda geliştirmiş ve %20 PHB verimi; *Azotobacter chroococcum*'u ise nişasta içeren besi ortamında geliştirerek, oksijeni sınırlandırılmış şartlar altında %46 PHB verimi elde etmiştir.

### 1.9. PHB'in Kullanım Alanları

Endüstriyel üretilebilen termobiyoplastiklerin sertlik durumlarının, polietilene oranla dört misli daha fazla olduğu (20 kg/m) tespit edilmiştir. Üretilen biyoplastik maddelerin, çeşitli paketleme materyalleri olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir.

En çok bilinen ve en yaygın kullanılan PHA tipi olan PHB'nin fiziksel özellikleri petrol kökenli polipropilen ile karşılaştırıldığında PHB'nin daha kristal bir yapıda olması, özgül ağırlığının daha yüksek oluşu, UV'ye dirençliliği gibi bazı özellikleri nedeni ile PHB üretiminin iyi bir seçenek olduğu bildirilmiştir (Barham et al, 1984; Beyatlı, 1996; Bluhm et al, 1998).

PHB'nin doğaya atıldığında tamamen yok olması ve çevre kirliliği oluşturmaması nedeniyle, PHB/V tipi polimerlerden veya bunların başka polimerlerle karışımından özellikle gıda ve kozmetik sanayiinde şişeleme malzemesi olarak yararlanılmaya başlanmıştır. PHA'lar çevre dostu fiziksel özelliklere sahip oluşlarından dolayı, endüstriyel uygulamalar açısından çekici olmalarının yanı sıra, özel karakteristik özellikleri sayesinde biyomedikal alanda kullanımı çok fazladır (Lee, 1996; Page, 1995).

#### 1.9.1. Ziraatta kullanım alanları

PHB ve kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında tamamen karbondioksit ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir. Parçalanma için geçen süre kalınlık ve yüzey özelliklerine bağlı olarak düzenlenebilir (Lee, 1996).

PHB ve PHA, özellikle toprakta biyodegradasyon gerektiren uygulamalara çok uygundur. Çoğunlukla bunlar bir alüminyum folyo gibi film şeklinde kaplamada kullanılmaktadır. Tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında muhafaza ve gübre ya da pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak kullanılabilir (Holmes, 1985).

### 1.9.2. Veterinerlikte Kullanım Alanları

Veterinerlik hekimliğinde ilaçların salınımı için biyolojik parçalanabilen bir matris 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 yapılmıştır (Holmes, 1985).

### 1.9.3. Tıpta Kullanım Alanları

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte, biyolojik uygunluğundan dolayı son zamanlarda tıp ve eczacılıkta sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Hayvan dokularında toksik etki yapmadığından, vücutta absorbe edilen protez aletlerin ve cerrahi dikişlerin yapımında PHB'nin kullanılması birçok bilim adamının, bu alanda çalışmalara ağırlık vermesine neden olmuştur.

PHB ve kopolimerleri, hayvan dokularına implante edildiğinde onların biyolojik olarak parçalanabildiği görülmüş ve PHA'ların kullanımına olan ilgi artmıştır. Neticede veterinerlikte ve insanların ilaçla tedavisinde teröpatik bileşiklerin kontrollü olarak salınması için PHA'lar kullanılmıştır (Lafferty et al, 1988).

Polimerin uygulama alanları onun özelliklerine bağlı olarak, doğrudan kullanılmasının yanında depolimerizasyon ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da yaygındır. Özellikle PHB'nin parçalanma ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit bu alanda çok önemlidir. Çünkü bu tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşimidir; lipit metabolizmasının ürünü olarak bulunur ve insan kanının normal bir ögesidir (Holmes, 1985). Belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağı olarak rol oynar. Bu durum ilk olarak Krebs tarafından bulunmuştur ve daha sonra bunun beyin gelişiminde rol alan aminoasitlerin öncüsü olarak fizyolojik bir role sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca D(-)-3-hidroksibütirik asitin diyabetiklerin kan serumunda anormal konsantrasyonlarda var olan keton yapılarından biri olarak rol oynadığına dair birçok bilgiler de vardır.

Middlesex hastanesindeki çalışmalar, D(-)-3-hidroksibütirik asidin damar içi veya ağızdan karbon sağlanması için kullanılabileceğini ve daha yaygın olarak kullanılan glukoz yerine bazı klinik avantajlara sahip olduğunu göstermiştir.

PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. Çünkü insan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB, cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır (Holmes, 1985). PHB'nin hastanelerde cerrahi

swaplar, yara sargıları, cerrahi eldivenler için de bir yağlayıcı madde olarak veya ince toz formunda kullanılması uygun görülmüştür. Ameliyat sonrası hastalarda unutulmuş pamuk swaplar, Amerika Birleşik Devletleri'nde ve diğer ülkelerde birçok hukuk davalarının başında geldiği düşünülürse bu avantaj oldukça önemlidir (Holmes, 1985).

Yüksek teknoloji ile 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 getirilebilir. Bu, vücudun doğrudan tepkisini alan sentetik arterlerdeki blokaj ve pıhtı oluşum problemini tamamen yok edecektir (Holmes, 1985)

PHB'nin bir diğer önemli özelliği de onun piezoelektrik polimer olmasıdır. PHB ve kopolimerleri poliviniliden florit polimeri gibi kesikli piezoelektrisite göstermektedir. Poliviniliden florit polimeri filmleri, kemiği elektriksel stimülasyon ile kuvvetlendirmekte ve kemiği onarmaktadır. Dolayısıyla, bir kemik kırığını sabitleyen levhalar benzer mekanik özelliklere sahip takviyeli bir PHB karışımından yapılırsa, stimüle edilen kemik büyür ve gelişir. Böyle bir kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından resorbe edilebilir. Bu süre içinde de kemik kaynar ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir ameliyata gerek kalmaz (Holmes, 1985).

#### 1.9.4. Kimyasalların Eldesinde Kullanılması

(R)-(-)-hidroksi karboksilik asitler, büyük oranda antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve feromonlar gibi ince kimyasalların sentezi için kiral yapı blokları olarak kullanılabilirler. Yeni bileşenlerin sentezi için, kiral bir merkeze sahip olan bu bileşikler, iki fonksiyonel grup (OH, COOH) içerirler (Lee et al, 1994).

Organik kimyada asimetrik sentez işlemi çok önemlidir ve bu alanda enantiomerik saf bileşikler revaçtadır. D-(-)-3 -hidroksibütirik asit de bu gruba ait olduğundan, saf maddelerin geniş miktarlarda eldesinde PHB'in kullanılması önem kazanmaktadır. Doğada en yaygın form olan D-(-)-konfigürasyonuna sahip olan bu optik izomerler, buldukları ortamda kiral merkezleriyle diğerlerinden daha kuvvetli bağlanma özelliğine sahip olduğundan kromatografide kullanılabilir. Ayrıca bunların yağ/su emülsiyonları için, emülsifikasyon ajanı olarak kullanımı da mümkündür (Holmes, 1985).

Birçok ilaç, sadece bir kiral formda aktiftir ve D-(-)-3-hidroksibütirat böyle bileşiklerin organik sentezinde bir çimento bloğu gibi kullanılır. D-(-)-3 hidroksibütirat monomerinden, Hindistan mısırındaki haşaratin bir seks hormonu, bir balarısı hormonu, *Cerambycidae* familyasından bir

böceğin koruyucu substratı ve güzel koku olarak S-citronellol gibi 6 saf kimyasalın organik olarak sentezlendiği belirtilmiştir (Holmes, 1985).

### 1.9.5. Paketleme Filmleri ve Tek Kullanımlık Malzemelerin Yapımında Kullanılması

PHB ve kopolimerlerinin mekanik özellikleri polietilen, polipropilen vs. gibi bazı ticari plastiklere benzediğinden termoplastik poliesterlerdir. PHB daha kırılğan olması ve zayıf çözgen dayanıklılığı dışında, polipropilenle benzer özelliklere sahiptir (Lafferty et al, 1988).

Düşük su buharı geçirgenliği gibi besin paketleme endüstrisi açısından önemli olan bir özelliği ile de, düşük yoğunluklu polietilene benzemektedir (Weber, 2000). Kopolimerler ise daha esnektir ve daha düşük erime sıcaklığına sahip olduğundan, preslenmiş ürünlerin imalatı için daha kullanışlıdır. Diğer taraftan sadece belirli bakteriler tarafından üretilen uzun yan zincirli ( $C_4-C_{12}$ ) polimerler, daha düşük erime noktaları ve cam geçirgenlik sıcaklığına sahiptir. Bu materyaller lastik benzeridir ve gerçekte bir termo-elastomerdır (Lafferty et al, 1988).

PHB, kopolimerleri kadar iyi bir şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve klorine edilmiş polietilen gibi diğer sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir (Lafferty et al, 1988).

PHB kalıp yapımı, sıkıştırılmış film ve bazı fibrillerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Yapılan paket filmleri mükemmel bir gaz bariyeri özelliğindedir. 25  $\mu\text{m}$  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 (Holmes, 1985)

PHB mükemmel olan 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 (Lafferty et al, 1988).

Biyolojik olarak parçalanabilirliğinden dolayı tek kullanımlık ürünlerin üretimi için PHA'lara yönelinmiştir. Bu alanda Imperial Kimya Şirketi ve bunun yan kuruluşu olan Marlborough Biopolimers gibi şirketler PHA'ların araştırılması ve geliştirilmesinde aktif olarak rol almıştır. PHA

polimerine bu iki şirket ticari isim olarak BIOPOL adını vermiştir ve 1970' li yıllarda ilk ticari prosesleri patentlemişlerdir (Lafferty et al, 1988).

Imperial Kimya Şirketi, kadınlara mahsus hijyenik ürünler, tek kullanımlık çocuk bezleri ve geri dönüşümü güç olan plastik filmler gibi tek kullanımlık mutfak malzemeleri için PHA'nın potansiyel bir pazar olduğunu önceden görmesine rağmen PHA'nın ilk ticari kullanıcısı Almanya'da Wella kozmetik şirkettir. Bu şirket PHA'ı enjeksiyonla şişe şeklinde kalıplamış ve saç şampuanlarını paketlemek için kullanmıştır (Lafferty et al, 1988).

Polipropilene fiziksel özellikleri yüzünden çok benzeyen PHB, polipropilenden yapılan yıkanabilir kaplar, kırıştırılabilen paketler ve ipler gibi pek çok ürünün yapımında da kullanılabilir (Holmes, 1985).

### 1.9.6. Özel Uygulamalarda Kullanılması

PHB, oldukça aktiftir ve polimeri oluşturan her bir hidroksibütirat ve hidroksivalerat monomer ünitesi kiral bir karbon atomuna sahip olup, bunların herbiri D(-) konfigürasyonundadır.

PHB solusyonları ve PHB'den yapılan filmler, kendi içinden geçen polarize ışığın konumunu çevirecektir. Bu optik izomerler buldukları ortamda kiral merkezleriyle diğerlerinden daha kuvvetli bağlanma özelliğine sahip olduğundan kromatografide kullanılabilir. Polimerlerin hidrolizi ile elde edilen birçok ilaç, sadece bir kiral formda aktiftir ve bu materyal böyle bileşiklerin organik sentezinde bir çimento bloku olarak kullanılabilir.

Tokyo Üniversitesinden Prof. Mori, HB monomerinden, Hindistan mısırındaki haşaratın bir seks hormonu, bir balarısı hormonu, long-horned-beetle bir böceğin koruyucu substratı ve güzel koku olarak S-citronellol gibi 6 kimyasal maddenin sentezini rapor etmiştir (Holmes, 1985).

PHB ve kopolimerleri paketleme filmleri ve tek kullanımlık malzemelerin yapımında da kullanılmaktadır. Bu materyallerin özellikleri polietilen, polipropilen gibi bazı ticari plastiklere benzediğinden termoplastik materyallerdir. PHB filmleri, polipropilen filmleri kadar güçlüdür, fakat PET (polyethylene terephthalate) kadar dayanıklı değildir. Cam takviyeli PHB kalıpları ise naylona olan benzerliğine göre daha sert ve dayanıklıdır (Holmes, 1985).



## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Araştırmada Kullanılan Mikroorganizma

Yaptığımız araştırmada kullanılan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (EBİLTEM) temin edildi.

### 2.2. Mikroorganizmanın Aktifleştirilmesi

Çalışmada kullanılan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu Nutrient Broth besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirildi.

### 2.3. Kullanılan Mikroorganizmanın Muhafazası

Yatık Nutrient Agar (Merck) tüplerine steril koşullarda paralel olarak inoküle edilen bakteri, 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda üreyen bakteri kùltürü +4 °C'de buzdolabında (Arçelik 4022-T) muhafaza edildi. Stok kùltürler ayda bir aktifleştirildi.

### 2.4. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada temel besiyeri olarak Nutrient Broth (Merck) ve Nutrient Agar (Merck) kullanıldı. 100 ml distile su içerisine Nutrient Sıvı besiyerinden 0.8.gr ilave edildi ve pH'ları 7'ye ayarlandı. Hazırlanan besiyerleri 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Katı besiyerini Nutrient Agar'ın hazırlanmasında ise %2 oranında agar (Merck) ilave edildi.

### 2.5. Ortamlara Ekim ve Kùltürasyon

Çalışmalarda kullanılan besiyerine *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun ekimi için yatık Nutrient Agar (Merck) tüplerindeki stok kùltürler içerisine McFarland 2 (%1'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltilisinden 9.8 ml + %1'lik BaCl<sub>2</sub> çözeltilisinden 0.2 ml) bulanıklık tüpüne eşdeğer bulanıklığa gelinceye kadar steril serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ilave edildi (Çetin, 1973) ve homojen bir bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan besiyerlerine 1/20 (v/v) oranını sağlayacak şekilde steril koşullarda

ekim yapıldı. Üretim 37 °C'de, 150 r.p.m. döngüsel çalkalama hızına ayarlanmış inkübatörde (UniEquip UniHood 550) gerçekleştirildi.

## 2.6. Kültürlerde Üremenin Ölçülmesi

Kültürlerde üreme, kültür ortamındaki bakteri yoğunluğu McFarland standartındaki değerlerine bakılarak saptandı. Bu amaçla öncelikle 545 nm dalga boyunda, Perkin Elmer UV/VIS spektrofotometrede köre karşı McFarland standardı çıkarıldı. Örneklerdeki üremenin saptanması için santrifüj edilen örnekler önce steril serum fizyolojik ile yıkandı ve sonra üzerine 10 ml serum fizyolojik ilave edilip köre karşı okundu. Bulunan optik yoğunluk değerlerine karşılık gelen bakteri sayısı standart eğriden hesaplandı ve ml'deki bakteri sayısı olarak verildi (Gürgün ve Halkman, 1988).

## 2.7. Kültürlerde PHB Miktarının Ölçülmesi

Çalışmada kullanılan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun sentezlediği PHB miktarı Bonartseva ve Myshkina'nın (1985) metoduna göre belirlendi.

- Nutrient Agar içeren yatık tüplerde inkübe edilen *Bacillus* suşu 100 ml N.B içeren besiyerinde 37±1 °C'de 24 saatte aktifleştirildi.
- İnkübasyon sonunda hücre kültürü 6000 r.p.m.'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra sıvı kısım uzaklaştırılıp pelet elde edildi.
- Pelet üzerine 5 ml distile su ilave edilip homojenize edilmiştir. Ardından 10 dakika 50 MHz'lik ultrasonikasyon (Elma Transsonic Digitals Marka) cihazı ile bakterilerin hücre duvarları parçalandı.
- 1:1 oranında, kültür ve 2N HCL (Merck) karışımı 100 °C'lik su banyosunda 2 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde 6000 r.p.m.'de 20 dakika santrifüj edilerek pelet elde edildi.
- Peletlerin üzerine 5 ml saf kloroform (Carlo Erba) ilave edilerek ağızları hava almayacak şekilde parafilm ile kapatılıp 1 gece 28 °C'de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Bu aşamada PHB kloroform içinde çözünmeye bırakıldı.
- Örnekler 6000 r.p.m.'de 20 dakika santrifüj edilerek PHB granülleri çöktürüldü.

- Kloroform kısmından 0,1 ml alınıp,  $40 \pm 1$  °C'de 15 dakika bekletilip kloroform uçuruldu ve örnek üzerine 5 ml saf H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Carlo Erba) eklendi. Daha sonra örnekler 100 °C'de su banyosunda 20 dakika bekletildi. Bu aşamada PHB'nin krotonik asite dönüşümü sağlandı.
- Örneklerin optik yoğunluk değeri (O.D) 235 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülerek tespit edildi.

### 2.7.1. PHB Standartının Hazırlanışı

1.0-10 µg/ml olacak şekilde değişen miktarlarda Merck marka Poli-β-Hidroksibütirat kullanılarak PHB standartları hazırlandı. Hazırlanan örnekler köre karşı 235 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Perkin Elmer UV/VIS Spectrophotometer) okundu. Bulunan absorbans değerleri standart grafikten µg / ml cinsinden PHB miktarı olarak 3 örneğin ortalaması alınarak hesaplandı.

## 2.8. *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun Üreme ve PHB Üretimine Etkili Kültürel Parametrelerin Saptanması

### 2.8.1. PHB Miktarının Zamana Göre Değişimi ve Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

En yüksek PHB sentezini sağlayan inkübasyon süresini saptamak amacıyla *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun zamana göre (2. - 30. saat) üremesi, PHB üretimi ve verimliliği tayin edildi.

### 2.8.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması

İnkübasyon sıcaklığının PHB sentezine etkisini incelemek amacıyla, mikroorganizma yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan besiyerine 20, 25, 30, 35 ve 40 °C'lerde inkübe edildi.

### 2.8.3. Optimum İnkübasyon pH'sının Saptanması

Temel besiyeri pH: 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olacak şekilde ayarlandı. Ortamlar sterilize edildikten sonra ekim yapıldı. Ekim yapılan besiyerlerinde, inkübasyon sonunda üreme ve PHB verimi ölçüldü.

#### **2.8.4. Çeşitli Karbon Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi**

PHB sentezine etkili olan karbon kaynaklarını incelemek amacıyla Nutrient Broth (Merck) besiyerine glukoz (Carlo Erba), sukroz (Merck), D-mannitol (Cerlo Erba), D-arabinoz (Fluka) milipor filtrasyon (por çapı 0,45m) sonrası %2 (w/v) oranında ilave edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültür ortamlarından alınan örneklerde üreme ve PHB miktarı tayin edildi (Yüksekdağ ve diğerleri, 2004).

#### **2.8.5. Çeşitli Azot Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi**

PHB sentezinde rol oynayan azot kaynağı türü Yüksekdağ ve diğerlerinin (2004) önerdiği şekilde saptandı. Buna göre azot kaynağı olarak Nutrient Broth (Merck) besiyerine sadece L-sistein (Merck), L-glisin (Merck), proteaz pepton (Fluka),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Carlo Erba) ve potasyum nitrat (Merck) %0,2 (w/v) olacak şekilde ilave edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültür ortamlarında üreme ve PHB miktarı tayin edildi.

#### **2.8.6. C/N Oranının PHB Sentezine Etkisi**

PHB sentezinde rol oynayan C/N oranları Ökmen ve Algur'un (2000) önerdiği şekilde saptandı. Buna göre farklı C/N oranlarına (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5) göre kültür ortamına karbon kaynağı olarak glukoz (Carlo Erba), azot kaynağı olarak da L-glisin (Merck) ilave edildi. İnkübasyon süresinin sonunda kültür ortamlarında üreme ve PHB miktarı tayin edildi.

### 3. BULGULAR

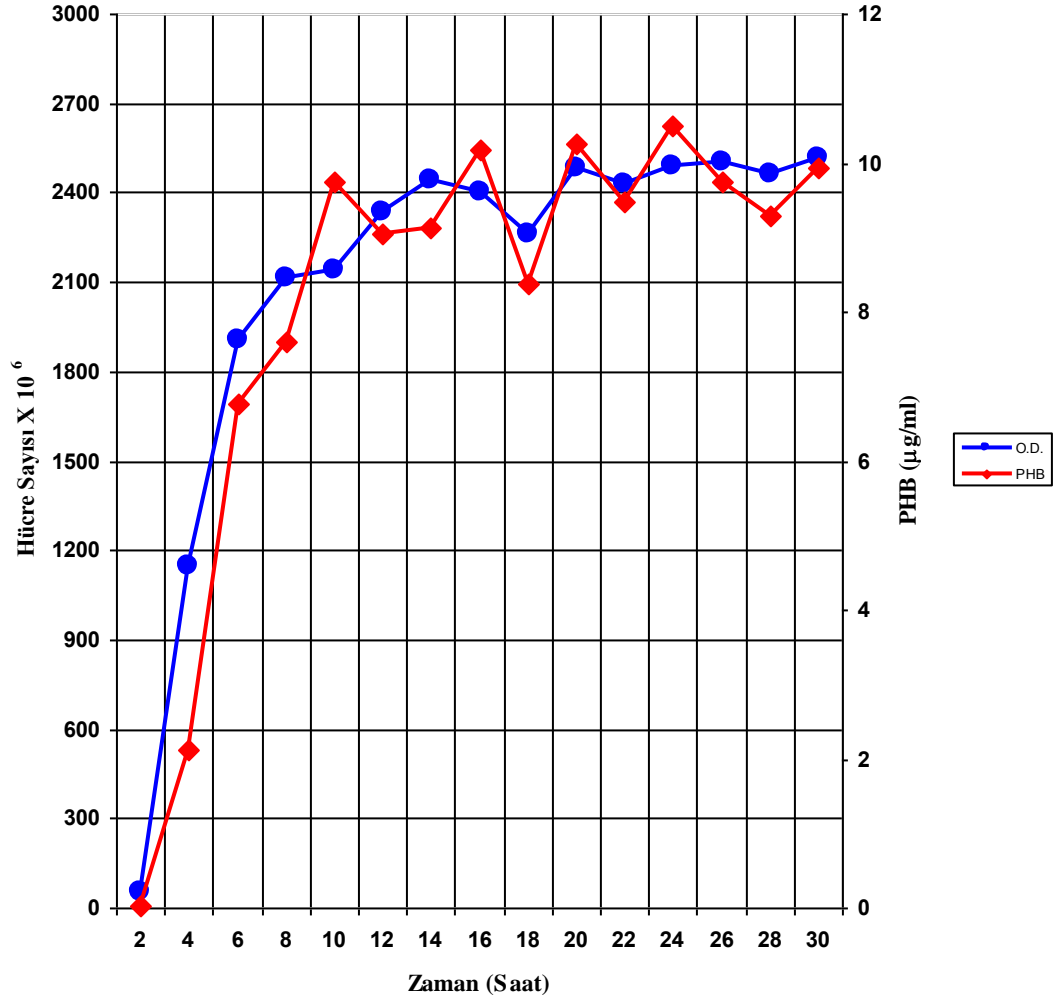
#### 3.1. PHB Miktarının Zamana Göre Değişimi ve Uygun İnkübasyon Süresinin Saptanması

Tablo 3.1' de ve Şekil 3.1'de görüldüğü gibi uygun inkübasyon süresinin 24. saat olduğu, PHB miktarının zamana göre değişiminde de en uygun sürenin 24. saat olduğu bulundu.

Tablo 3.1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Zamana Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik

Zaman (Saat)	PHB miktarı ( µg/ml )	Hücre Sayısı ( X 10 <sup>6</sup> )	Verimlilik (µg PHB /Total Hücre X 10 <sup>-9</sup> )
2	0,0175	55	0,319
4	2,1309	1151	1,851
6	6,7527	1906	3,542
8	7,6014	2115	3,594
10	9,7416	2139	4,554
12	9,059	2333	3,882
14	9,1143	2443	3,730
16	10,1845	2402	4,240
18	8,3671	2262	3,698
20	10,2583	2482	4,133
22	9,4741	2432	3,895
24	10,4981	2489	4,217
26	9,7324	2506	3,883
28	9,2804	2466	3,763
30	9,9446	2517	3,950

### Zamana Bağlı Üreme ve PHB Üretimi



Şekil 3.1. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Zamana Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi

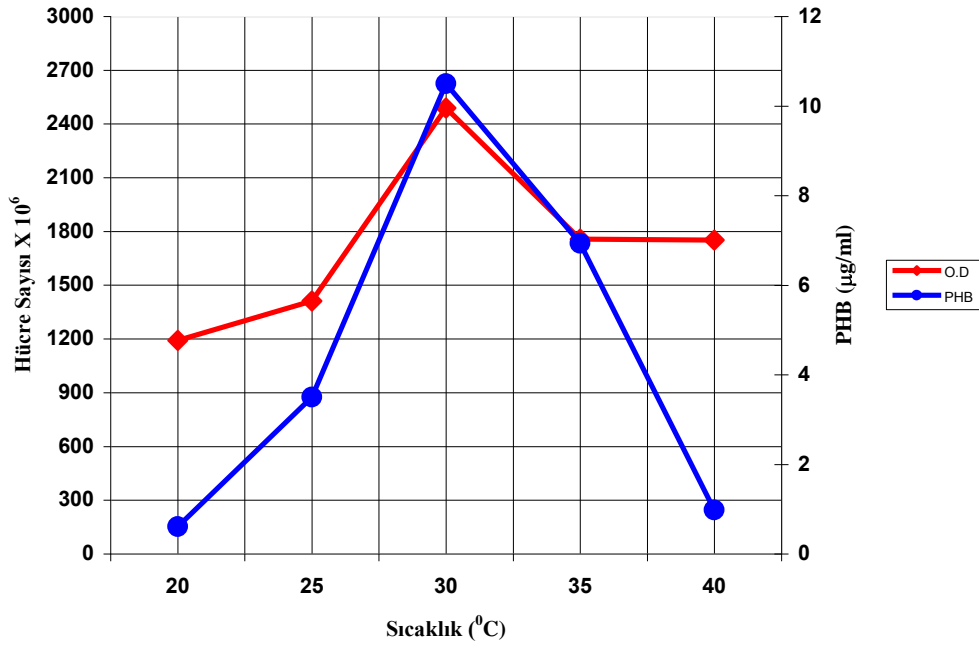
### 3.2. Optimum İnkübasyon Sıcaklığının Saptanması

Tablo 3.2'de ve Şekil 3.2'de görüldüğü gibi en yüksek PHB sentezi sıcaklığın 30 °C olduğu besiyerinde bulundu.

Tablo 3.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Sıcaklığa Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik

Sıcaklık (°C)	PHB miktarı (µg/ml)	Hücre Sayısı (X 10 <sup>6</sup> )	Verimlilik (µg PHB / Total Hücre X 10 <sup>-9</sup> )
20	0,6088	1192	0,510
25	3,4963	1412	2,476
30	10,4981	2489	4,217
35	6,9372	1757	3,948
40	0,9778	1751	0,558

#### Sıcaklığa Bağlı Olarak Hücre Sayısı ve PHB Üretimi



Şekil 3.2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Sıcaklığa Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi

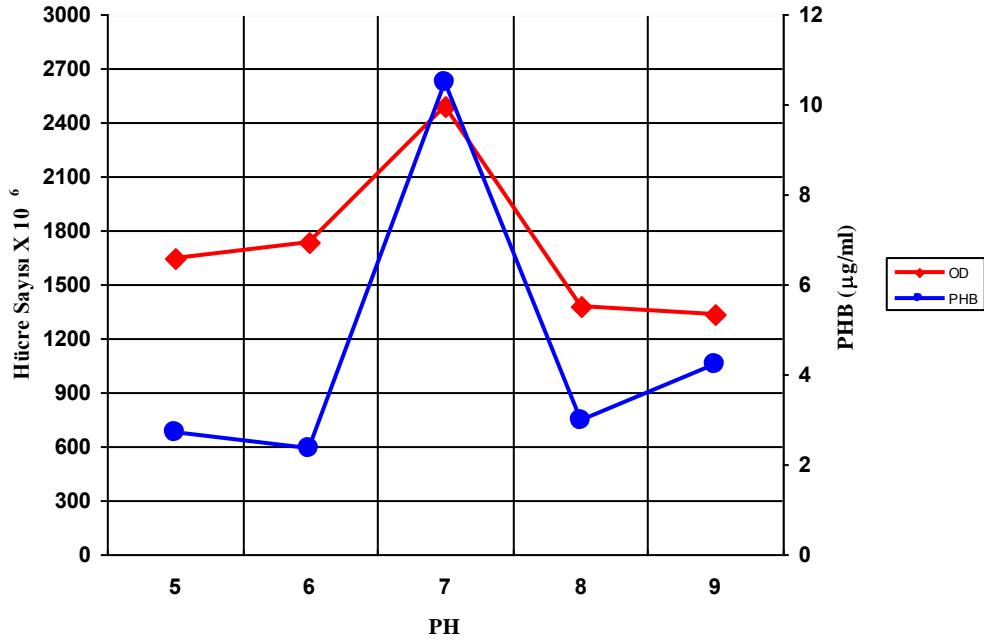
### 3.3. Optimum İnkübasyon pH'sının Saptanması

Tablo 3.3'de ve Şekil 3.3'de görüldüğü gibi en yüksek PHB sentezi besiyeri pH 'ı 7 olduğu koşulda bulundu.

Tablo 3.3. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de pH'a Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik

PH	PHB miktarı ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hücre Sayısı ( $\times 10^6$ )	Verimlilik ( $\mu\text{g PHB} / \text{Total Hücre} \times 10^{-9}$ )
5	2,7306	1648	1,656
6	2,3431	1733	1,352
7	10,4981	2489	4,217
8	2,9704	1374	2,161
9	4,2250	1329	3,179

#### PH'a Bağlı Olarak Hücre Sayısı ve PHB Üretimi



Şekil 3.3. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de pH'a Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi



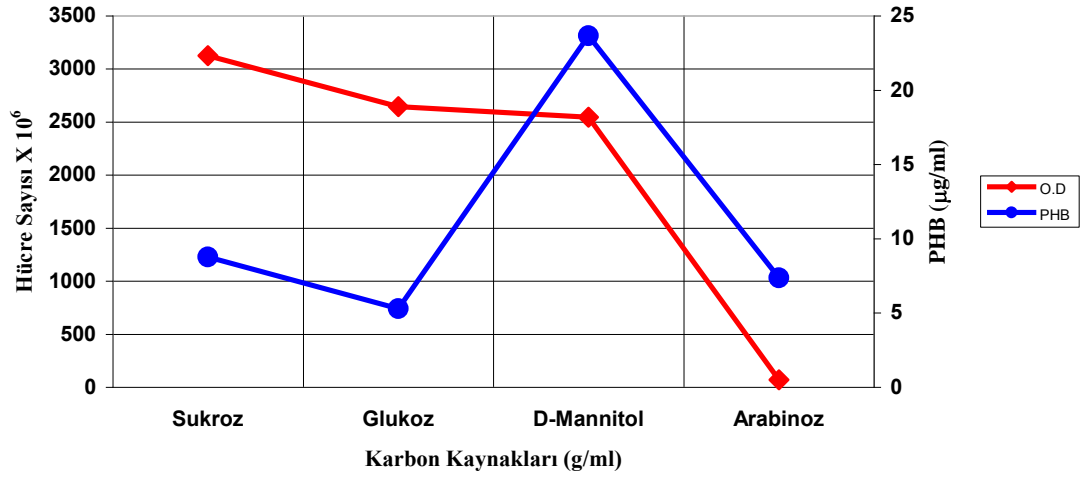
### 3.4. Çeşitli Karbon Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi

Tablo 3.4'de ve Şekil 3.4'de görüldüğü gibi karbon kaynağı olarak D-mannitol kullanıldığında PHB üretimi en yüksek, sukrozda ise üremenin en yüksek olduğu bulundu.

Tablo 3.4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Farklı Karbon Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik

Karbon Kaynakları (g/ml)	PHB miktarı ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hücre Sayısı ( $\times 10^6$ )	Verimlilik ( $\mu\text{g PHB} / \text{Total Hücre} \times 10^{-9}$ )
Sukroz	8,7638	3124	2,805
Glukoz	5,2952	2644	2,002
D-Mannitol	23,6623	2544	9,301
Arabinoz	7,3708	71	0,0001

Farklı Karbon Kaynaklarına Bağlı Olarak Hücre Sayısı ve PHB Üretimi



Şekil 3.4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Farklı Karbon Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi

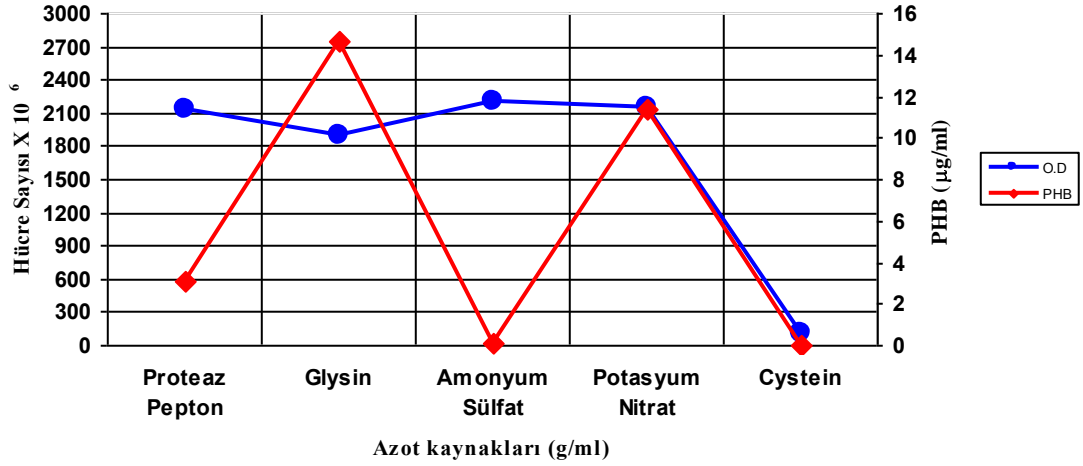
### 3.5. Çeşitli Azot Kaynaklarının PHB Sentezine Etkisi

Tablo 3.5'de ve Şekil 3.5'de görüldüğü gibi azot kaynağı olarak L-glisin kullanıldığında PHB üretimi en yüksek, amonyum sülfat kullanıldığında ise üremenin en yüksek olduğu bulundu.

Tablo 3.5. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Farklı Azot Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik

Azot kaynakları (g/ml)	PHB miktarı ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hücre Sayısı ( $\times 10^6$ )	Verimlilik ( $\mu\text{g PHB} / \text{Total Hücre} \times 10^{-9}$ )
Proteaz Pepton	3,0904	2128	1,452
Glisin	14,6217	1903	7,683
Amonyum Sülfat	0,1014	2196	0,046
Potasyum Nitrat	11,4022	2155	5,291
Sistein	0	114	0

Farklı Azot Kaynaklarına Bağlı Olarak Hücre Sayısı ve PHB Üretimi



Şekil 3.5. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Farklı Azot Kaynaklarının Kullanımına Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi

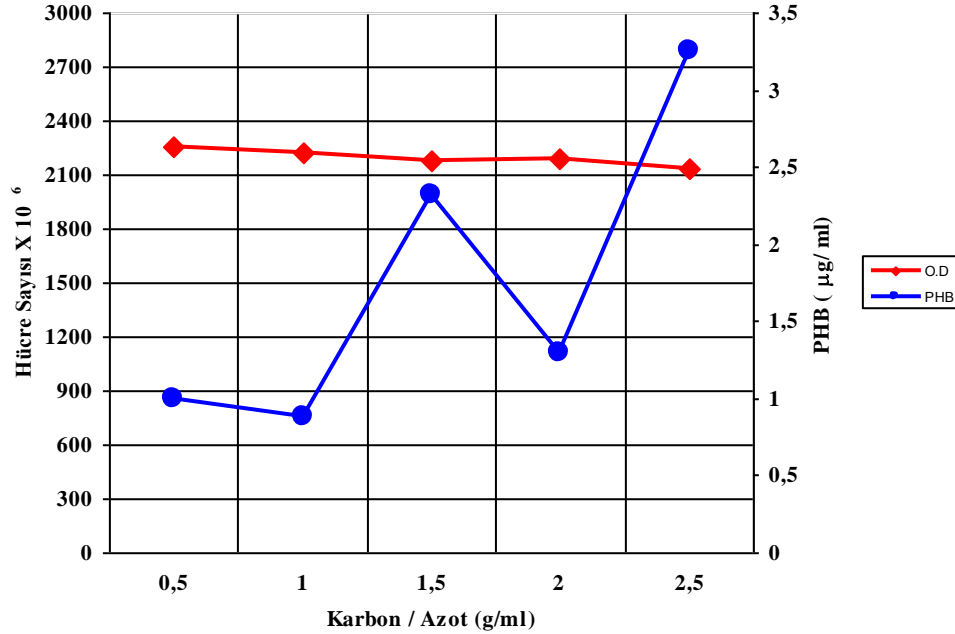
### 3.6. C/N Oranının PHB Sentezine Etkisi

Tablo 3.6'de ve Şekil 3.6'de görüldüğü gibi C/N oranının 2.5 olduğu değerde PHB üretimi en yüksek, C/N oranının 0.5 olduğu durumda ise üremenin en yüksek değerde olduğu bulundu.

Tablo 3.6. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Farklı Karbon / Azot Oranına Bağlı Olarak Üreme, PHB Üretimi ve Verimlilik

Karbon / Azot (g/ml)	PHB miktarı ( $\mu\text{g/ml}$ )	Hücre Sayısı ( $\times 10^6$ )	Verimlilik ( $\mu\text{g PHB} / \text{Total Hücre} \times 10^{-9}$ )
0,5	1,0027	2260	0,4367
1	0,8773	2227	0,3939
1,5	2,3238	2173	1,0693
2	1,2915	2188	0,5902
2,5	3,2481	2132	1,523

Karbon / Azot ' a Bağlı Olarak Hücre Sayısı ve PHB Üretimi



Şekil 3.6. *Bacillus subtilis* ATCC 6633' de Farklı Karbon / Azot Oranına Bağlı Olarak Üreme ve PHB Üretimi

#### 4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Hidroksibutirik asit birçok bakteri tarafından aktif polimer olarak sentezlenmekte ve karbon ve enerji kaynağı olarak sitoplazma içerisinde granül şeklinde depo edilmektedir. Biyolojik işlemler sayesinde üretilen bir termoplastik kristal olan PHB'nin ilk endüstriyel üretimi *Alcaligenes latus* ve *A. eutrophus* kullanılarak başlamıştır (Hiramitsu et al, 1993).

Reusch ve Sadoff (1983), D(-)poli-β-hidroksibutiraların *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis* ve *Haemophilus influenzae* sitoplazma ve hücre membranı içinde önemli moleküller olduğunu bildirmişlerdir (Reusch and Sadoff, 1983).

Toplu kültürlerde glukoz, Embden-Mayerhoff-Parnas (EMP) metabolik yolu vasıtasıyla esas ürün olarak piruvat ve asetata indirilir. Glukoz hemen tüketilir, asitler Trikarboksilik asit döngüsü (TCA) yolu ile oksitlenir. Bu işlem sporulasyonun başlangıcı ile yakından ilişkilendirilmiştir. Asetat kısmen *Bacillus* spp.'de sporulasyon boyunca tüketilen PHB'ye dönüştürülür (Benoit et al, 1990).

Kültürasyon sıcaklığı PHB üretimini önemli ölçüde etkileyen fizyolojik koşullardan birisidir. Çok düşük ve çok yüksek sıcaklıklarda istenilen sonuçlar elde edilememektedir. Çalışmamızda optimum sıcaklık 30 °C olarak bulunmuştur. Bu sıcaklık derecesinde hem PHB üretimi, hem de hücre sayısı en yüksek değerlerde saptanmıştır. Daha yüksek ve düşük sıcaklıklarda PHB üretimi ve hücre sayısı azalmaktadır. Bunun başlıca nedeni de bu sıcaklıklarda enzimlerin optimal ısılarının geçilmesidir. Kültürasyon sıcaklığı ile ilgili literatür sonuçları incelendiğinde benzer bulgulara rastlanmaktadır (Grothea et al, 1999; Yüksekdağ ve diğerleri, 2003).

Bakteriler genel olarak 6-8 pH aralığında optimum üreme göstermektedirler. Çalışmalarımız sonucunda PHB üretimi için en uygun başlangıç pH'sı 7 olarak bulunmuştur. Bu pH'da sıcaklık, karbon ve azot kaynakları da istenilen düzeydedir. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda bazı araştırmacılar PHB üretimi için başlangıç pH değerini 6,5 olarak bulmuşlardır (Grothea et al, 1999).

PHB eldesi için uygun inkübasyon süresinin 45 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra yüksek PHB sentezine üretimin 24.,48., 72. ve 120. saatlerde rastlandığını bildiren araştırmalar da vardır (Yüksekdağ ve diğerleri, 2004; Benoit, 1990; Nam and Ryu, 1985; Klüttermann et al,2002). Çalışmamızda PHB sentezinin zamana bağlı olarak artarak 24. saatte en yüksek değere ulaştığı saptanmıştır. Artan hücre sayısına rağmen PHB seviyesinin belli zamandan sonra düşüşe geçmesinin nedeni olarak; bakterilerin PHB'yi karbon ve azot kaynağı olarak kullanması sonucu ortamdaki yetersiz karbon ve azot sebebiyle olumsuz şartların oluşması olarak gösterebiliriz.

Değişik karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisinin incelendiği çalışmamızda karbon kaynağı olarak Mannitol içeren kültür ortamlarından PHB üretimi diğer karbon kaynaklarını içeren

kültür ortamlarına kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Ancak Mannitol maliyeti çok yüksek olan karbon kaynaklarındandır. Dolayısı ile bu tür endüstriyel uygulamalar için tercih edilmez. Çalışmamızda da bu nedenle karbon kaynağı olarak Mannitol yerine daha ucuz ve kolay bulunan Glukoz içeren kültür ortamında PHB üretimi gerçekleştirilmiştir. Yüksekdağ ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada en yüksek PHB seviyesi *B. subtilis* 25 ve *B. megaterium* 12'de karbon kaynağı olarak glukoz içeren besiyerinde tespit edilmiştir (Yüksekdağ ve diğerleri, 2004). Hori ve arkadaşları, *B. megaterium*'da hücrede max seviyede PHB içeriğine glukozlu ortamda büyümeden sonra ulaşmıştır (Hori et al,2002). Wu ve arkadaşlarının yönettiği bir diğer çalışmada da *Bacillus* sp. JMa5 suşunun sukroz fermentasyonu boyunca 25-35% (w/w) PHB biriktirdiği rapor edilmiştir (Wu et al, 2001).

Azot kaynağının PHB birikimine etkisinin incelendiği çalışmamızda PHB birikimi en fazla Glisin içeren kültür ortamında elde edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda azot kaynağı olarak proteaz peptonlu ortamda *B.subtilis* 25 ve *B.megaterium* 12' de en yüksek PHB birikimi elde etmişlerdir (Yüksekdağ ve diğerleri, 2004). Mercan ve arkadaşları *Rhizobium* sp.'nin 2 suşunda farklı karbon (glukoz, sukroz, arabinoz) ve azot kaynağı (L-sistein, L-glisin, DL-triptofan, proteaz pepton, potasyum nitrat) içeren YEM sıvı besiyerinde düşük miktarda PHB üretirken, yüksek PHB üretimi L-Sistein ve Glisin içeren besi ortamında elde etmişlerdir (Mercan ve diğerleri, 2002). Uğur ve Şahin'in yapmış oldukları çalışmada maximum PHB içeriği *Streptomyces* MU117'de azot kaynağı olarak glisin ve tripton içeren ortamda bulunmuş olmasına rağmen azot kaynağı olarak aspargin ve amonyumsülfat içeren ortamda geliştirildiğinde çok daha düşük PHB içeriği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sınırlı-nitrojen koşullarının miseliyal gelişim için inhibitör olduğu, PHB üretimi açısından ise uyarıcı ortaya koyulmuştur (Uğur and Şahin, 2002).

Çeşitli polimerlerin biyosentezinde kültür ortamındaki karbon/azot (C/N) oranı önemli rol oynamaktadır. Polimer ürünlerin verimliliğini artırmak için uygun karbon/azot oranının gerekliliği ve önemi çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir (Wang et al, 2007; Ökmen G. ve Algur Ö.F., 2000; Grothea et al, 1999). Bu amaçla yapılan çalışmada, değişik miktarlarda karbon ve azot kaynağının *Bacillus subtilis* ATCC 6633 kültürlerindeki PHB sentezine etkisi incelenmiştir. Bulgulara göre değişik miktarlarda karbon ve azot kaynağı içeren kültürlerdeki PHB üretiminin C/N oranının 2,5 olduğu durumda en yüksek olduğu görülmektedir. Karbon miktarının artması hücre sayısı miktarını düşürmekte, buna karşın PHB sentezini artırmaktadır. Azot kaynağı olarak kullandığımız Glisin'in, karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında büyüme-sınırlayıcı faktör olarak rol oynamış olabileceği düşünülmektedir.

Son yıllarda petrol kökenli plastikler çok kullanılan materyaller durumuna gelmiştir. Plastik maddelerin neredeyse her alanda kullanılabilmesi, teknik özellikleri bu noktaya gelmelerinde en

önemli nedenlerdendir. Plastiklerin günlük hayatta oldukça yaygın kullanılmaları onları neredeyse vazgeçilmez konuma getirmiştir. Ancak bu tür plastiklerin parçalanmalarının uzun sürmesi nedeniyle çevre kirliliğine neden olmaları çevre dostu plastiklerin yani biyoplastiklerin denenmesine yol açmıştır. Yapılmış olan çalışmalardan da anlaşıldığı üzere PHB en yaygın olarak bilinen ve çalışılan polimerlerden birisi konumundadır.

Mikrobiyal şekilde üretilen PHB ve onun kopolyesterleri geridönüşüm işlemlerinin fazla zaman alması, zorluğu ve pahalı oluşu nedeniyle plastik materyallerin üretimi için henüz geniş çapta kullanılmamaktadır. PHB ve onun kopolyesterleri ile ilgili bir diğer esas problem işlenmeleri süresince kötü kokmalarıdır. Ayrıca mikrobiyal yollarla elde edilen PHB ve kopolimerlerinden yapılan plastik materyallerde saflığı bozan şeylerin varlığı bazı insanlar için alerjik reaksiyonlara sebep olabilmektedir. Bu nedenle istenilen çekici özelliklere sahip PHB ve onun kopolimerlerinin üretimi için yeni yollar araştırılmalıdır. Bu yollardan biri (R)-3-HB ve başka bileşikler kullanarak polimerizasyon yoluyla PHB ve onun kopolimerlerini üretmektir (Tokiwa and Ugwu, 2007).

Mikrobiyal şekilde PHB üretiminin pahalı olmasından dolayı meydana gelen olumsuzluğu gidermek amacıyla çeşitli araştırmalar yapılmakta olup, ucuz substrat ve polimer üretim yöntemleri aranmaktadır. Literatürde bu konu ile ilgili yapılan araştırmalardan birinde, üretilen PHB miktarı, organizmanın üremesi mümkün olduğunca ekonomik olan sadece flask ve batch kültür teknikleri ile gerçekleştirildiğinde çok düşük gözlemlendiğini, buna karşın yüksek PHB konsantrasyonu ve üretilebilirliği fed-batch kültür tekniklerinden elde edildiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada bakterilerin fed-batch kültürlerinde ucuz olan nişasta ve peynir altı suyu substratlarından PHB üretimi yapılmıştır (Kim, 2000). Ancak yapılan çalışmalar sonucu rekombinant suşlarda PHB miktarının daha fazla olduğu ve ışık miktarı, azot eksikliği ve oksijeni sınırlı ortamlar gibi pek çok faktörün PHB üretim miktarını etkilediği bildirilmiştir (Miyake et al, 1996; Dönmez ve diğerleri, 1999; Takahashi et al, 1998).

Sonuç olarak bütün çalışmalarımızda çok değişik endüstrilerde önemli bir hammadde olan PHB'nin bakteriyel kaynaklardan eldesi araştırılmıştır. Bu amaçla *Bacillus subtilis* ATCC suşu kullanılmış ve bakteri üretimine ve PHB sentezine etkili kültürel parametreler incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun PHB eldesinde kullanılabileceğini göstermektedir. Bu suşun verimliliğini artırma yönündeki çalışmalar bundan sonraki aşamalarda göz önüne alınacaktır. Yaptığımız bu çalışmanın konu ile ilgili bundan sonraki çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

## 5. KAYNAKLAR

Abe, H., Kikkawa, Y., Iwata, T., Aoki, H., Akehata, T., Doi, Y., 2000. Microscopic visualization on crystalline morphologies of thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid ] and its copolymer, *Polymer*, 41, 867-874.

Abe, H., Doi, Y., 2002. Side-chain effect of second monomer units on crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability for random copolyesters of (R)-3-hydroxybutyric acid with (R)-3-hydroxyalkanoic acids, *Biomacromolecules*, 3, 1, 133-138.

Ahn, W. S., Park, S. J., Lee, S. Y., 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, 3624-3627.

Altun, B., Besler; T. ve Ünal, S., 2002. Ankara'da Satılan Sütlerin Değerlendirilmesi. [www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf](http://www.ttb.org/STED/sted0202/sut.pdf) Erişim tarihi:31.12.2002

Anderson, A.J. and Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolizm, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Reviews*, 54, 4, 450-472.

Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R. and Tokiwa, Y., 1999, Photosynthetic accumulation of poly(hydroxybutyrate) by cyanobacteria – the metabolism and potential for CO<sub>2</sub> recycling, *International Journal of Biologicals Macromolecule.*, 25, 37-42.

Aslım, B., Sağlam, N. ve Beyatlı, B., 1998. Topraktan izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) üretim miktarının belirlenmesi, III. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumu-Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği, 67-74.

Ayhan. K. 2000. Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını 43- 44 Sim Matbaacılık Ltd. Ankara.

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.

Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., Goulet, J., 1995. Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 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. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 15-18

Bertrand, J. L., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C, 1990. Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalcanoates from Pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*, Applied and Environmental Microbiology, 56, 10, 3133-3138.

Beun, J. J., Dircks, K., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J., 2002. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures, Water Research, 36, 1167-1180.

Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, KÜKEM Dergisi, 19, 2, 23-32.

Beyatlı, Y., Aslım, B., Mumcu, Z. N., 1999. Doğada Parçalanabilen Termobiyoplastiklerin Üretimi. Devlet Planlama Teşkilatı Projesi (DPT : 97K121150), s.21-37, Ankara.

Bloembergen, S., Holden, D., Hamer, G., Bluhm, T., Marchessault, R., 1986. Studies of Composition and Crystallinity of Bacterial Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate), Macromolecules, 19, 2865-2871.

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., 1985. Testing for activity of nodule bacteria in terms of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation following vital staining of the colonies with phosphine 3R, Microbiology, 54, 3, 371-374.

Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., 1985. Fluorescence intensity of strains of nodule Bacteria (*Rhizobium melliloti*, *R. phaseoli*) differing in activity, Grown in the Presence Lipophilic vital stain phosphine 3R, Microbiol., 54, 4, 535-541.

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.

Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., 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.

Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C., 1988. *Pseudomonas oleovorans* as an source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters, Applied and Environmental Microbiology, 54, 8, 1977-1982.

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., Genser, K. L., 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, Journal of Biotechnology, 65, 127-161.



Budwill, K., Fedorak, P. M., Page, W. J., 1996. Anaerobic microbial degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) with various terminal electron acceptors, *Journal of Environmental Polymer, Degradation*, 4, 2, 91-102.

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.

Çon, A. H. ve Gökalp, H. Y. 1997. Gıda Mikrobiyolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları Yayın No: 007,23. Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi. Denizli.

Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J.D., 1996. Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp., IPCB-403, *Indian Journal of Experimental Biology*, 34, 216-219.

Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K., 1986. Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly ( Beta- hydroxybutyrate) and a Copolyester of Beta- Hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, *Macromolecules*, 19, 2860-2864.

Dönmez, G.Ç., Aslım, B., Beyatlı, Y., 1999. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by photosynthetic bacteria. *G.Ü. Fen Bil. Enst. Dergisi*, 12(3), 338-341.

Dunlop, W. F., Robards, A. W., 1973. Ultrastructural Study of Poly-β-hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*, *J. of Bacteriol.* 114, 3, 1271-1280.

Durner, R., Witholt, B., Egli, T., 2000. Accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, 3408-3414.

Föllner, C. G., Müller, S., Steinbüchel, A., Babel, W., 1995. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyric acid by the facultatively methanol-assimilating bacterium *Mycoplasma rubra* B346 and recombinant strains, *J. Basic Microbiol.*, 35, 3, 179-188.

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

Gouda, M. K., Swellam A. E., 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, *Microbiological Research*, 156, 3, 201-207.

Grothea Enrico, Moo-Younga Murray, Chistib Yusuf, 1999. Fermentation optimization for the production of poly(β-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic, *Enzyme and Microbial Technology* 25: 132–141.

Gürgün, V., Halkman K., 1990. Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri; 2. Baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın no 7. Ankara.

- Hiramitsu, M., Koyaman, N. and Doi, Y., 1993. Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*, *Biotechnology Letters*, 15:461-646.
- Holmes, P. A., 1985. Applications of PHB – A Microbially produced Biodegradable Thermoplastic, *Phys. Technol.*, 16, 32-36.
- Hori, K., Kaneko, M., Tanji, Y., Xing, XH., Unno, H., 2002. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 211-216.
- 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.
- Kalaylı, E. ve Beyatlı, Y. 2003. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Antimikrobiyal Aktiviteleri, PHB Üretimleri ve Plazmid DNA' ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*. 01 (12), 24-35.
- Karaboz, İ. ve Umay, B., 1994, *Pseudomonas extorquens*'den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi,
- 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.
- Khan, S. T., Hiraishi, A., 2001. Isolation and characterization of a new poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, denitrifying bacterium from activated sludge, *FEMS Microbiology Letters*, 205, 253-257.
- Kim, B. S., 2000. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 774-777.
- Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B., Kessler, B., 1999. Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from Gluconate by recombinant *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2, 540-548.
- Klüttermann K, Tauchert H, Kleber HP, 2002. Synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Agrobacterium radiobacter* after growth on D-Carnitine. *Acta Biotechnol.* 22: 261-269.
- Labuzek S., and Radecka, I., 2001. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85, *Journal of Applied Microbiology*, 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- $\beta$ -hydroxybutyric acid, *Biotechnology*, edited by H. J. Rehm and G. Reed. Volume 6b, *Special Microbial Processes*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W., Yu, P. H., 2001. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 515-524.

Lee, S. Y., 1996. Bacterial Polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14.

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.

Lillo, J. G., Valera, F. R., 1990. Effects of culture conditions on poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) production by *Haloflex mediterranei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 8, 2517-2521

Liu, F., Li, W., Ridgway, D. and Gu, T., 1998. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate or molasses by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters*, 20, 4, 345-348.

Loosdrecht, M. C. M., Pot, M. A., Heijnen, J. J., 1997. Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses, *Wat. Sci. Tec.*, 35, 1, 41-47.

Madison, L. L., Huisman, G. W., 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic, *Mic. Mol. Bio. Reviews*, 63, 21-53.

Manna, A., Banerjee, R., Paul, A. K., 1999. Accumulation of poly(3-Hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*, *Current Microbiology*, 39, 153-158.

McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., 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 Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate üretimlerinin incelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25: 2, 1-7.

Mercan N, Aslım B, Yüksekdağ ZN, Beyatlı Y, 2002. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by some *Rhizobium* bacteria. *Turk J. Biol.* 26: 215-219.

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.

Miyake, M., Erata, M. and Asada, Y., 1996. Athermophilic Cyanobacterium *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating PHB. *J. Ferment. And. Biotech.*, 82(5): 512-514.

Miyake, M., Miyamoto, C., Schnackenberg, J., Kuraane, R., Asada, Y., 2000. Phosphotransacetylase as a key factor in biological production of polyhydroxybutyrate, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 1039-1044.

Molitoris, H. P., Moss, S. t., de Koning, G. J. M., 1996. Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 570-579.

- Nam DH, Ryu DDY, 1985. Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *Bacillus circulans*. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*. 27: 789-801.
- 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.
- Nickerson, K. W., Zarnick W. J. and Kramer, V. C., 1981. Poly-B-Hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 12: 327-331.
- Ökmen G. ve Algur Ö.F., 2000. Farklı Karbon Kaynaklarının ve C/N Oranlarının Mikrobiyal Denitrifikasyon Üzerine Etkileri. *Turk J Biol*. 24: 533–542.
- Ostle, A., Holt, J. G., 1982. Nil Blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1, 238-241.
- Page, W.J., and Knosp, O., 1989. Hyperproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Applied and Environmental Microbiology*, 55,1334-1339.
- Page, W.J., 1992. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 117-121.
- 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., 1992b. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, *FEMS Microbiology Reviews*, 103, 149-158.
- Page, W.J., and Cornish, A., 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4236-4244.
- Page, W. J., Sherburne, R., D'Elia, L., Graham, L. L., 1995. Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Can. J. Microbiol.*, 41, 22-31.
- Page, W.J., 1995. Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future, *Can. J. Microbiol.*, 141 (Suppl.1), 1-3.
- Pierce, L., Schroth, M. N., 1994. Detection of *Pseudomonas* colonies that accumulate poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on Nile blue medium, *Plant Disease*, 78,7, 683-685.
- 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.
- Qi, Q., Rehm, B. H., 2001. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase, *Microbiology*, 147, 12, 3353-3358.

Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., Ramsay, J. A., 1990. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 7, 2093-2098.

Rehm, B. H. A., Antonio, R. V., Spiekermann, P., Amara, A. A., 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.

Reusch, R. N. And Sadoff, H.L., 1983. D-(-)Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in membranes of genetically component bacteria. *J.of Bacteriol.*vol.156,pp. 778-788.

Savaşçı, Ö.T., Uyanık, N. ve Akovalı, G., 1998. Plastikler ve plastik teknolojisi, Çantay Kitabevi, 505 s.

Sei, K., Nakao, M., Mori, K., Ike, M., Kohno, T., Fujita, M., 2001. Design of PCR primers and a gene probe for extensive detection of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacteria possessing fibronectin type III linker type-PHB depolymerases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 801-806.

Sim, S. J., Snell, K. D., Hogan, S. A., Stubbe, J., Rha, C., Sinskey, A. J., 1997. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo, *Nature Biotechnology*, 15, 63-67.

Slater, S. Gallaher, T., 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., 1991. Recent advances in the Knowledge of the Metabolism of bacterial polyhydroxyalkanoic acids and potential impacts on the production of biodegradable thermoplastics, *Acta Biotechnol.*, 11, 5, 419-427.

Steinbüchel, A., Schlegel, H. G., 1991. Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, *Molecular Microbiology*, 5, 3, 535-542.

Stieb, M., Schink, B., 1984. A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytropus*, ge. Nov. sp. nov., possessing various fermentation pathways, *Arch. Microbiol.*, 140, 139-146.

Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, H., Doi, Y., 2001. Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system, *FEMS Microbiology Letters*, 198, 65-71.

Taidi, B., Anderson, A., Dawes, E. A., 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.

Takahashi, H., Miyake, M., Tokiwa, Y. and Asada, Y. 1998. Improved accumulations of PHB by recombinant *Cyanobacterium*. Biotech. Letters, 20(2): 182-186.

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.

Tanaka, K., Katamune, K., 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*, Biotechnology Letters., 15, 12, 1217-1222.

Tokiwa Y., Ugwu C.U., 2007. Biotechnological production of (R) -3- hydroxybutyric acid monomer. Journal of Biotechnology. 132: 264-272.

Uğur A. and Şahin N., 2002. Accumulation of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in *Streptomyces* Species During Growth with Different Nitrogen Sources. Turk J. Biol. 26:171-174.

Valentin, H. E., Lee, E. Y., Choi, C. Y., Steinbüchel, A., 1994. Identifications of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 710-716.

Wallen, L. L. and Rohwedder, K. W., 1974. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge, Environmental Science & Technology, 8, 6, 576-579.

Wang Y.J., Hua F.L., Tsang Y.F., Chan S.Y., Sin S.N., Chua H., Yu P.H.F. and Ren N.Q., 2007. Synthesis of PHAs from waste under various C:N ratios. Bioresource Technology. 98 :1690-1693.

Weber, C. J., 2000. Biobased Packaging Materials for the food Industry, The EU Directorate 12, Frederiksberg.

Witholt, B. and Kessler, B., 1999. Perspectives of medium chain length poly-hydroxyalkanoates, a versatile set of bacterial bioplastics, Current Opinion in Biotechnology, 10, 279-285.

Wu Q, Huang HH, Hu GH, Chen JC, Ho KP, Chen GQ, 2001. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses mesai. Antonie Van Leeuwenhoek International J. General and Molecular Microbiol. 80:111-118.

Yakabe, Y. Nohara, K., Hara, T., Fujino, Y., 1992. Factors affecting the biodegradability of biodegradable polyester in soil, Chemosphere, 25, 12, 1879-1888.

Yan, Y., Wu, Q., Zhang, R., 2000. Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by  $^{13}\text{C}$  NMR, FEMS Microbiology Letters, 193, 269-273.

Yılmaz M., Beyatlı Y., 2003. Biyoplastik: Poli- $\beta$ -Hidroksibütirat (PHB). Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 09:1-33.

Yüksekdağ Z.N., Beyatlı Y., Aslım B., 2003. Determination of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) Production by Some Mesophilic and Thermophilic Lactic Acid Bacteria. Turk J Biol. 27 : 37-42.

Yüksekdağ, Z. Nur., Aslım, B., Beyatlı, Y., ve Mercan, N., 2004. Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. African Journal of Biotechnol. Vol. 3 (1), pp. 63-66.

[www.genbilim.com/2008](http://www.genbilim.com/2008)

[www.bact.wisc.edu/2008](http://www.bact.wisc.edu/2008)

[www.yildizindunyasi.net/2002](http://www.yildizindunyasi.net/2002)

<http://www.britannica.com/eb/art-19576/The-soilbacter444iumRhizobiumleguminosarum/2008>

[http://www.magma.ca/~scimat/B\\_megate.htm/2001](http://www.magma.ca/~scimat/B_megate.htm/2001)

[http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book\\_id=4&fig\\_number=33&chap\\_number=2/1999](http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?module=Book&func=displayfigure&book_id=4&fig_number=33&chap_number=2/1999)

<http://www.clt.astate.edu/dgillmore/Research%20students/phas.html/2008>

[http://www.nrc-cnrc.gc.ca/highlights/2007/0703\\_maplesap\\_e.html/2008](http://www.nrc-cnrc.gc.ca/highlights/2007/0703_maplesap_e.html/2008)

[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0366/16442002000400025&script=sci\\_arttext#img07/2002](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0366/16442002000400025&script=sci_arttext#img07/2002)

<http://db2.photoresearchers.com/feature/infocus255?action=store&iid=10074202&infocus=255&pf=1/2008>

[http://chem.kcn.ru/science/Katz2/microb\\_mediators.htm/2008](http://chem.kcn.ru/science/Katz2/microb_mediators.htm/2008)

[genome.jgi-psf.org/.../azovi/azovi.home.html/2001](http://genome.jgi-psf.org/.../azovi/azovi.home.html/2001)

<http://thefutureofthings.com/articles/31/natures-super-glue.html/2006>

<http://www.genome.bnl.gov/Sequencing/Rmetallidurans/2002>

<http://www.botanik.uni-karlsruhe.de/garten /fotos-knoch/2005>

<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/images/2008>

<http://www.dailytech.com/Scientists+Use+Bacteria+to+Store+Data/article6262.htm/2007>

<http://tr.wikipedia.org/2008>

[www.mikrobiyoloji.org/2008](http://www.mikrobiyoloji.org/2008)

## 6. ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 13.12.1982  
 Doğum Yeri : İZMİR  
 Medeni Hali : Bekar  
 E-posta : biyo\_nzn@hotmail.com  
 Adres : Ilıca mah .Karel sok. Örnek 2 sitesi B Blok No:15/4 Narlıdere/ İZMİR

### EĞİTİM

Yüksek Lisans, 2008, Celal Bayar Üniversitesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
 Lisans, 2005, Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü  
 Lise, 2000, Ankara, Batıkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lise (Fen-Matematik)  
 İlköğretim, 1996, İzmir, Cumhuriyet İlköğretim Okulu

### TEKNİK RAPOR VE SUNUMLAR

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı tarafından düzenlenen 'Moleküler Yöntemlerde Son Yenilikler' Kongresin'e katılım, Anemon Otel MANİSA, Nisan 2006  
 Plastik Eldesi ve Kullanım Alanları Tezli Yüksek Lisans Semineri, Celal Bayar Üniversitesi, Yrd.Doç.Dr.Uğur Sıdal,Ocak 2006  
 Denizel Ekosistemin Özellikleri ve Balinalar Bitirme Tezi; Celal Bayar Üniversitesi Hidrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Mehmet Öztürk, Nisan 2005  
 Kuşlar ve Göç Yolları Sunumu; Celal Bayar Üniversitesi, Ekoloji, Prof. Dr. Mehmet Öztürk, 2002  
 Çevre Etki Değerlendirme Raporu ve Sunumu, Celal Bayar Üniversitesi, Yrd.Doç.Dr. Şükran Yıldız, Mayıs 2005  
 Transgenik Bitkiler ve GDO Sunumu, Celal Bayar Üniversitesi, Yrd.Doç.Dr.Levent Şık, Mart 2004  
 Toxoplazma gondii Sunumu, Celal Bayar Üniversitesi, Yrd.Doç.Dr.Selma Katalay, Nisan 2005

### BİLDİĞİ BİLGİSAYAR PROGRAMLARI

09.07.2005-08.10.2005, Bilgisayar Meslek Dalı Eğitim Programları Kurs Sertifikası (160 saat- Windows XP, Microsoft Winword 2003 XP, Microsoft Excel 2003 XP, Microsoft Powerpoint 2003 XP, Microsoft Access 2003 XP, İnternet Explorer)

### BİLDİĞİ YABANCI DİLLER

İngilizce ve başlangıç düzeyinde Almanca