

173894

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDEN
PHB ÜRETİMİ**

HAKAN BAHAR

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

NİSAN 2003

**Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Hakan Bahar'ın Toprakdan İzole Edilen Bakterilerden PHB Üretimi başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi **30.12.2002** tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof.Dr Merih KIVANÇ	
Üye	: Yrd.Doç.Dr Nalan Yılmaz SARIÖZLÜ	
Üye	: Yrd.Doç.Dr Buket KUNDUHOĞLU	
Üye	:	
Üye	:	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun **08.01.2003** tarih ve **1/3**..... sayılı kararıyla onaylanmıştır

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. İmar ÖZEL
Fen Bilimleri Enstitüsü
M ü d ü r ü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDEN PHB ÜRETİMİ

HAKAN BAHAR

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Merih KIVANÇ
2003, 69 sayfa

Polihidroksialkanoatlar (PHA) ailesinin en iyi bilinen üyesi olan Poly 3-hidroksibütirat (PHB) farklı mikroorganizmalar tarafından intraselular olarak sentez edilerek biriktirilen karbon ve enerji depo materyali olarak kullanılır. Ham materyallerden biyoindirgenebilir ve biyouyumlu plastik materyalin üretilmesi son derece verimli olabilmesi nedeni ile son zamanlarda çok fazla ilgiyi üzerine çekmektedir. PHB yi içeren olası uygulamalar; paketlenme elemanları, biyoindirgenebilir taşıyıcılar (kontrollü ilaç salınımı), tek kullanımlık malzemeler, cerrahi uygulama materyalleri (iplik,iğne), cerrahi tamponlar ve kemik kaplamalar olarak sıralanabilir.

Bu çalışmada farklı bölgelerden alınan toprak örneklerinden izole edilen bakterilerin PHB üretim yetenekleri incelenmiştir. PHB üretimi için melas, peyniraltı suyu, şeftali pulbu gibi farklı substratların kullanılabilirliği araştırılmıştır. Temel mineral ortamda çalkalamalı kültürde %72.2 PHB verimi elde edilirken fermentörde elde edilen verimler çok düşük olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Polihidroksibütirik asit (PHB), Biyoplastik

ABSTRACT**Master of Science Thesis****PHB PRODUCTION BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL****HAKAN BAHAR****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program****Supervisor: Prof. Merih KIVANÇ
2003, 69 pages**

Poly 3-hydroxybutyrate (PHB), the best known member of the Polyhydroxyalkanoates (PHA), is an energy and /or carbon storage material synthesized and intracellularly accumulated by numerous microorganisms.

It has been drawing much attention as a good candidate for biodegradable and biocompatible plastic material which can be produced from renewable raw materials. Possible applications of PHB include the following: packaging films and containers, biodegradable carriers for controlled chemical and drug release, disposable items, surgical pins and sutures, wound dressings and bone replacements.

In this study , production capability of different bacteria which were isolated from various areas in Turkey was examined.

Availability of different substrates (molasses, whey, peach pulp) to produce PHB production were examined. In shaking culture by using basal mineral media, 72.2% yield was obtained. On the other hand, less yield was obtained when the fermentor was used for the production of PHB.

Keywords: Polyhydroxybutyric acid (PHB), Bioplastic

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde her türlü desteğini ve eleştirilerini esirgemeyen değerli tez hocam Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a öncelikle teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya ve bilgilerine danıştığım değerli hocam Sayın Yrd.Doç. Dr. Nalan YILMAZ'a teşekkür ederim.

Deneylerimin yürütülmesinde ve malzeme temin etmemde bana yardımcı olan Uzman. Erdoğan ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her türlü desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Arş. Gör. Burçin MUTLU'ya ve diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bütün çalışmalarımda bana her zaman destek olan ve bu günlere gelmemi sağlayan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi

1.GİRİŞ.....	1
1.1. PHB'nin keşfi.....	3
1.2. PHB sentezleyen mikroorganizmalar.....	4
1.3. Prokaryotik hücre inküübasyonları.....	5
1.4 PHB'nin Genel özellikleri.....	6
1.4.1. PHB granüllerinin morfolojisi.....	7
1.4.2. PHB'nin fiziksel özellikleri.....	9
1.4.3 PHB'nin çözelti özellikleri.....	10
1.4.4 PHB'nin Piezoelektrik özellikleri.....	11
1.4.5 PHB'nin spektroskopik özellikleri.....	12
1.4.6 PHB'nin kristalinitesi ve erime sıcaklığı.....	12
1.5. PHB de Nükleer Manyetik Rezonans(NMR) çalışmaları.....	13
1.6. PHB'nin boyama Reaksiyonu.....	14
1.7. PHB ve PHA nin biyosentezi.....	14
1.8. PHB ve diğer PHA'ların Uygulama alanları ve Endüstriyel kullanımları.....	18
1.8.1. Medikal uygulamalar.....	18
1.8.2. Paketleme ve tek kullanımlık malzemelerde PHB.....	19
1.8.3. Tarımsal uygulamalar.....	21

2. MATERYAL VE METOD.....	22
2.1. MATERYAL.....	22
2.1.1. Bakteri Strainleri.....	22
2.1.2. Besiyerleri, kimyasallar ve tampon çözeltiler.....	22
2.1.2.1. Nutrient agar.....	22
2.1.2.2. Sudan black B boyası.....	23
2.1.2.3. Temel mineral ortam-iz element solüsyonu.....	23
2.1.2.4. Melas içeriği	24
2.1.2.5. Şeftali Pulbu.....	24
2.1.2.6. Peyniraltı suyu.....	25
2.1.2.7. Egg-yolk reaksiyon ortamı	25
2.1.2.8. Egg Yolk emülsiyonu.....	25
2.1.2.9. Hareketlilik test ortamı.....	26
2.1.2.10. Pepton broth.....	26
2.1.2.11. Kazein milk agar	26
2.1.2.12. MR-VP Broth.....	26
2.1.2.13. Nişastalı agar.....	26
2.1.2.14. Nutrient broth.....	26
2.1.2.15. Nutrient jelatin.....	26
2.1.2.16. %3 lük H ₂ O ₂	26
2.1.2.17. İyot solüsyonu.....	28
2.1.2.18. Kristal viyole solüsyonu.....	28
2.1.2.19. Safranin solüsyonu.....	28
2.1.2.20. α – naftol solüsyonu.....	28
2.1.2.21. 1 N H ₂ SO ₄	28
2.1.2.22. 0.4 N KOH.....	29
2.2. METOD.....	30
2.2.1. Topraktan mikroorganizma izolasyonu.....	30
2.2.2. Sudan Black B boyama.....	30
2.2.3. İdentifikasyon Testleri.....	31

2.2.3.1. Gram boyama	31
2.2.3.2. Hareketlilik testi.....	31
2.2.3.3. Jelatin hidrolizi.....	32
2.2.3.4. Karbonhidratların fermentasyonu.....	32
2.2.3.5. Katalaz testi	32
2.2.3.6. Kazein hidrolizi.....	32
2.2.3.7 Metil Red testi.....	32
2.2.3.8 Nişasta hidrolizi.....	33
2.2.3.9 Tuzda gelişme.....	33
2.2.3.10 Üreaz testi.....	33
2.2.3.11 Voges Proskeuer (VP) testi.....	34
2.2.3.12 Egg yolk emülsiyonu.....	34
2.2.3.13 Egg yolk reaksiyon ortamı.....	34
2.2.4. PHB'nin çalkalamalı kültürle üretimi.....	34
2.2.4.1. İnokulum Hazırlanması.....	34
2.2.4.2. Mineral besi ortamında PHB üretimi	35
2.2.4.3. İşlenmiş.melasdan.PHB üretimi.....	35
2.2.4.4 Şeftali pulbundan PHB üretimi.....	35
2.2.4.5 Peyniraltı suyundan PHB üretimi	36
2.2.5.Fermentörde PHB üretimi.....	36
2.2.5.1 Fermentörde Temel mineral ortamda PHB üretimi....	36
2.2.5.2 Fermentörle Melas dan PHB üretimi.....	37
2.2.6. PHB' de standart grafiğin hazırlanması.....	39
2.2.6.1.Standart PHB' nin ultraviyole spektrumu ile maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun belirlenmesi belirlenmesi.....	39
2.2.6.2.Ultraviyole spektrumu ile standart grafiğin elde edilmesi.....	39
2.2.6.3. Analitik ölçüm için PHB metodu.....	40
2.2.7 PHB ekstraksiyonu.....	41
2.2.7.1 PHB nin kloroformla ekstraksiyonu.....	41
3.BULGULAR.....	43

3.1 PHB üreten suşların saptanması	43
3.1.1. İzolatların tanımlanması.....	44
3.1.1.1. Gram boyama.....	44
3.1.1.2. Hareketlilik testi.....	44
3.1.1.3. Jelatin hidrolizi.....	45
3.1.1.4 Karbonhidratların fermantasyonu	45
3.1.1.7. Metil Red (MR) testi.....	45
3.1.1.8. Nişasta hidrolizi.....	45
3.1.1.9. Tuzda gelişme	46
3.1.1.11 Voges-Proskeuer (VP) testi.....	46
3.1.1.13 Egg yolk reaksiyon testi.....	46
3.1.1.14. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme.....	46
3.1.1.15.Farklı pH Derecelerinde Gelişme.....	47
3.2. Çalkalamalı etüvde elde edilen PHB verimleri.....	48
3.3. Fermentörde elde edilen PHB verimleri.....	54
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
5. KAYNAKLAR.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1	Anormal büyüme koşulları ve PHA (Poly- β -hydroxyalkonate), PHB (Poly β -hydroxybutyrate), PHV (Poly- β -hydroxyvalerate) gibi depo materyallerinin mikrobiyal sentezi.....	6
1.2	PHA'ların temel yapısı.....	7
2.1	5 μ g/ml PHB içeren çözeltinin 201 nm de absorbansı.....	40
3.1	Sudan Siyahı B kullanılarak PHB içeriği saptanmış hücreler (İzolat 3)....	43
3.2	Sudan Siyahı B kullanılarak PHB içeriği saptanmış hücreler (İzolat 4)...	44

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1	PHB üreten mikroorganizmalar	5
1.2	PHB ve diğer polimerlerin fiziksel değerlerinin karşılaştırılması.....	9
1.3	PHB'nin çeşitli çözücülerde çözünürlük özellikleri.....	10
1.4	Tıpta ve eczacılıkta potansiyel PHB uygulamaları.....	19
1.5	Biyolojik kökenli polimerlerle poliatilen, poliestrenin karşılaştırılması....	20
2.1	Çizelge 2.1. İzole edilen mikroorganizmalar ve alındıkları yerler.....	22
2.2	Deneylerde kullanılan melasın bazı özellikleri.....	24
2.3	Temel mineral ortam içeren fermentörde test bakterileri ve fermantasyon koşulları.....	37
2.4	Melas içeren ortamda PHB üretiminde fermantasyon koşulları.....	39
3.1	Bacillus strainleri identifikasyon test sonuçları.....	47
3.2	Çalkalamalı etüvde temel mineral ortam kullanılarak elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.....	48
3.3	Çalkalamalı etüvde fermantasyon ortamına % 20 oranında melas ilave edildiğinde Bacillus strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.....	49
3.4	Çalkalamalı etüvde fermantasyon ortamına % 40 oranında melas ilave edildiğinde Bacillus strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.....	50
3.5	Çalkalamalı etüvde fermantasyon ortamına % 20 oranında şeftali pulbu ilave edildiğinde Bacillus strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.....	51
3.6	Çalkalamalı etüvde fermantasyon ortamına % 8 oranında peyniraltısuyu ilave edildiğinde Bacillus strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.....	52
3.7	Çalkalamalı etüvde fermantasyon ortamına % 16 oranında peyniraltısuyu ilave edildiğinde Bacillus strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.....	53
3.8	Melas içeren fermantasyon ortamında Bacillus sp ₂ , <i>Bacillus mycoides</i> PHB verimleri ve miktarları.....	54

3.9	Temel mineral ortam içeren fermantasyon ortamında geliştirilen <i>Bacillus</i> sp ₂ ve <i>Bacillus mycoides</i> PHB verimleri ve miktarları.....	55
-----	---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

PHA	: Poli- β -hidroksialkonat (Poli- β -hidroksialkonoik asit)
PHB	: Poli- β -hidroksibütirik asit (Poli- β -hidroksibütirat)
PHV	: Poli- β -hidroksivalerat
C	: Karbon
N	: Azot
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
μ m	: Mikrometre
β	: Beta
EPS	: Ekzopolisakkarit
ATP	: Adenozin tri fosfat
gr	: Gram
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCl	: Hidroklorik asit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinikleotid fosfat
NADH₂	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NaOH	: Sodyum hidroksit
$^{\circ}$ C	: Santrigrat
lt	: Litre
cm	: Santimetre
KHA	: Kuru hücre ağırlığı
YEM	: Yeast Ekstrakt Mannitol Besiyeri
O₂	: Oksijen
N	: Azot

PO⁻³₄	: Fosfat
SO⁻²₄	: Sülfat
H	: Hidrojen
P	: Fosfor
Mg	: Magnezyum
nm	: Nanometre
kg	: Kilogram
m³	: Metre küp
+	: Pozitif
-	: Negatif
ark.	: Arkadaşları
CoA	: Koenzim A
pH	: Hidrojen iyonu kons.
ha	: Hektar
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü
RNA	: Ribonükleik asit
M	: Hareketlilik
T_B	: Gerilmeye dayanıklılık
B	: Kırılganlık
PC	: Pikoküri
λ	: Lamda
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
rpm	: Devir

1. Giriş:

Son 50 yıl içerisinde petrol kökenli plastikler en çok kullanılan materyaller haline gelmişlerdir. Plastiklerin çok yönlü olarak neredeyse her alanda kullanılabilmesi, mükemmel sayılabilecek teknik özellikleri ve nispeten düşük olan değerleri (1 kg propilenin piyasa değeri 0.70 \$) bu noktaya gelmelerindeki en önemli nedenlerdir. Günümüzde plastikler otomobillerdeki parçalarda, ev alet ve gereçlerinde, bilgisayar ekipmanlarında, yapı endüstrisinde, spor ve eğlence ekipmanlarında, paketlenen elemanları ve medikal uygulamalarda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar ki bu yüzden de neredeyse vazgeçilemez bir konuma gelmişlerdir. Ancak bu plastiklerin parçalanmaları zor olduğundan çevrede birikmekte ve çevre kirliliğine neden olmaktadır [1].

Plastik üretiminin ve tüketiminin hızlı bir artış göstermesinden dolayı ciddi bir plastik kirliliği (White pollution) ve arazi israfı gerçekleşmektedir [2].

Plastikler doğal olarak doğanın hücumuna karşı oldukça dirençlidir. Hem karada hem de denizde yabancı yaşam tarafından plastiklerin yutulması bazen ölümle sonuçlanmaktadır (3).

Bu plastikler doğada indirgenmeye karşı dirençli oldukları için çevrede yüksek miktarlarda birikmektedir. Plastik filmlerin toprakta birikmesi ürün miktarında önemli derecede bir düşüşe sebep olmaktadır. Nehirlerde ve göllerde yüzen plastik atıklar; balıkçılıkta, denizcilikte hidroelektrik santrallerinde, sulamada ve diğer kamu işlerinde artan bir tehdit haline gelmeye başlamıştır [2].

1970'lerin ortalarından itibaren ham petrol fiyatları; petrol rezervlerinin sonlarına gelindiğinin sanılması ve petrol üreten ülkelerin yapay bir kıtlık oluşturmaları nedeniyle artmıştır. Bu nedenlerden dolayı petrol kökenli plastiklere alternatif materyaller aranmış ve çoğu polimer endüstriyel uygulamalar ve biyoparçalanabilirlik dereceleri bakımından denenmiştir. Bunlar selüloz, nişasta, bunların sentetik polimerlerle karışımları, polilaktat, polyester-amid ve polihidroksialkanoat (PHA) gibi polimerlerden oluşmaktadır [1].

Bunlar arasında PHA biyoparçalanabilirlik ve biyoyuymululuk göstermesi nedeniyle diğerlerinden farklı olarak oldukça dikkat çekmiş ve üzerinde

durulmaya başlanmıştır. PHB (poli- β -hidroksibütirat) ise en yaygın olan ve en iyi bilinen PHA dır [1,4,5].

Ancak PHA'ların biyoundirgenebilir plastiklerin üretim maliyeti petrokimyasal kökenli plastiklere oranla oldukça yüksektir (1 kg polihidroksibütirat 15-30\$), bu yüzden bu yüksek kaliteli materyallerin petrokimyasal kökenli plastikler kadar geniş alanda kullanımı yakın gelecekte pek beklenmese de zorunlu hale geldiği su götürmez bir gerçektir [1].

Zeneca Bio Products Şirketi (Billingham, UK) yılda 1000 ton kadar PHB/V kopolimeri üretmekte ve BİOPOL ticari adı altında kilosunu 16 \$ gibi bir fiyata satışa sunmaktadır. Oysaki polietilen yada polipropilen gibi petrokimyasal kökenli plastiklerin kg fiyatı daha önce bahsedildiği gibi 1 \$' ın bile altındadır ancak biyoundirgenebilir değildirler. Bu yüzden fiyat bakımından herhangi bir kıyaslama diğer biyoundirgenebilir plastiklerle yapılmalıdır. Örneğin polylaktid, diol-diasit temelli alifatik polyesterler, nişasta temelli polimerler kg başına 5-12 \$ civarı bir değerdedir [6].

Polihidroksialkanoatlar (PHA), hidroksialkanoat polimerleri karbon ve enerji depo materyali olarak çeşitli mikroorganizmalarda genellikle N, P, S, O yada Mg gibi besinsel elementlerin limitasyonu ve karbon kaynağının ortamda aşırı derecede bulunmasıyla biriktirilmektedirler [7-11].

1926 yılında *Bacillus megaterium* da Poly(3-hidroksibütirat) (P(3HB)) keşfedilmesinden sonra PHA gruplarının farklı tipleri ve değişik sayılardaki ana zincir karbon atomlarına sahip olan geniş varyeteleri bildirilmiştir [7].

Biyopolimerlerin petrol kökenli polimerlerle rekabet edebilmeleri hatta onların yerlerini alabilmeleri için endüstriyel çapta üretimini sınırlayan faktörlerin ortadan kalkması gerekmektedir ki burada en büyük faktör biyopolimer saflaştırma işlemlerinin yüksek maliyetidir. Bu maliyet ucuz ham materyallerle ve uygun yöntemlerle indirgenebilir [12,13].

Her alanda olduğu gibi bu alanda da bilim adamları bu yüksek maliyeti ortadan kaldırmak için çeşitli yollara başvurmuşlardır. Örneğin karbon kaynaklarını değiştirmişler ve bunları biyopolimer üretim proseslerinde kullanmışlardır. Bizde çalışmamızda melas, şeftali pulbu, peyniraltı suyu gibi

ucuz maliyetli farklı karbon kaynaklarını kullanarak topraktan izole ettiğimiz bakteriler ile PHB üretmeyi amaçladık.

1.1. PHB'nin Keşfi

Poly(3-hidroksibütirat) (poly(3HB)) ilk olarak 1926'da Lemoigne tarafından Paris'teki Pasteur enstitüsünde izole ve karakterize edilmiştir. O zamandan beri (poly(3HB)) ve diğer PHA' lar bilim adamları tarafından geniş ölçüde çalışılmış ve sonuç olarak (poly(3HB))'nin bakterilerde enerji depo materyali olarak saklandığı aynı yolla memelilerde de yağ olarak depolandığı ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte (poly(3HB)) PHA'nın en yaygın olarak görülenidir ve bu sınıftaki çok çeşitli polimerler ve kopolimerler çeşitli organizmalar tarafından üretilmiştir [14].

Biyolojik olarak merak uyandırmaları ve dikkat çekmelerinin ötesinde çoğu PHA'lar fonksiyonel özelliklere sahiptir ve ticari uygulamalar için oldukça kullanışlıdır. Oysa (poly(3HB)) biraz kırılmalı bir yapıya sahiptir bu yüzden ticari kapsamı sınırlıdır. Onunla yakından ilişkili kopolimer, poly (3 hidroksibütirat-co-3 hidroksi valerat) poly (3HB-co-3HV) daha esnek bir yapıya sahiptir. Çünkü kristalinitesi indirgenmiştir ve ticari uygulamalar için daha uygundur [14].

PHB, Mikrobiyoloji alanında mikroskopların kullanılmasından itibaren çoğu bakteriyel hücrelerde düzenli olarak gözlenebilen küçük yağ damlacıkları olarak tanımlanmıştır. Lemoigne (1927) PHB'yi kimyasal olarak nitelendirmiş ve *Bacillus spp.*'nin sporulasyonunda bulunduğunu belirlemiştir [15].

Lemoigne *Bacillus subtilis* kültürlerini distile suda otoliz ettiğinde bilinmeyen bir asidin oluşması ile pH'ın azaldığını gözlemiştir. β - hidroksibütirik asidin diabetli hastalar tarafından salgılanan ve idrardan izole edilen keton bileşiklerinden biri olduğu önceden bilinmesine rağmen aynı olduğu sonradan bulunmuştur [16].

Forsythe ve ardından gelen araştırmacılar (1958) çoğu gram negatif bakterinin PHB yi sentezleme yeteneğine sahip olduğu ve yeteneğin varlığı ya da yokluğunun taksonomik bir belirleyici olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Aynı yıllarda, Williamson ve Wilkinson (1958) bakteriyal biyomasın PHB içeriğinin kantitatif olarak belirlenmesi için ilk pratik metotlardan birini geliştirmiştir. Öncelikle bu metotta hücreler, PHB dışındaki hücresel bileşikleri çözen optimum koşullar altında alkali bir hipoklorit çözeltisi ile muamele edilmiş, bu şekilde elde edilen granüllerin yoğunluğu hücre içi PHB miktarına karşılık gelen bulanıklık şeklinde kantitatif olarak belirlenmiştir [16].

1960'ların başında ise PHB 'nin bakteriler tarafından sentezlenmesi ve bu sentezin fizyolojik önemine dair deneysel sonuçların yayınlanmasında büyük artış görülmüştür. Mulder ve ark. (1962) kanalizasyon çamurundan izole ettikleri *Sphaerotilis natans* ve *Sphaerotilis leptothrix* grubunun diğer kılıf içeren bölümünün büyük miktarlarda PHB depolama yeteneğinde olduğunu kesin olarak göstermişlerdir. Buna ek olarak yüksek C:N oranı gibi dengesiz büyüme koşulları altında bu gruptaki mikroorganizmalar tarafından PHB sentezinin desteklendiğini ortaya koymuşlardır [16].

PHB'yi sentezleme yeteneğine sahip olan birçok bakteri genusu vardır ve çeşitli bakteri genuslarındaki PHB infrared absorpsiyon ve X-ışını difraksiyonu gibi fiziksel özellikler bakımından benzerliklere sahiptir. Buradan yola çıkarak, nispeten kısa bir çalışma süresi içinde, prokaryotik organizmalarda PHB'nin ozmotik inert bir depo materyali olarak sentezlenebilme kapasitesinin çok yaygın olduğu bulunmuştur [16].

1.2. PHB Sentezleyen Mikroorganizmalar:

Organizmaların yaygın bir sınıfının PHB veya PHB benzeri materyalleri depo ettikleri saptanmıştır. Bu organizmalar çok çeşitli olabilmektedirler, bakteriler arasında gram-pozitif ve gram-negatif türler ve ayrıca Cyanobacteria'nında arasında bulunduğu bir grup PHB ve PHB benzeri materyalleri sentezleyebilme kabiliyetine sahiptir. PHB ve PHB benzeri maddeler genellikle bir enerji ve depo materyali olarak kullanılır. PHB sentezleyebilme yeteneğine sahip prokaryotik organizmalar bir liste halinde Çizelge 1.1'de gösterilmiştir [17].

Çizelge 1.1 PHB üreten mikroorganizmalar [17].

<i>Alcaligenes</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Chrobacterium</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Derxia</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Ferrobacillus</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Lampropaedia</i>	<i>Zoogloe</i>

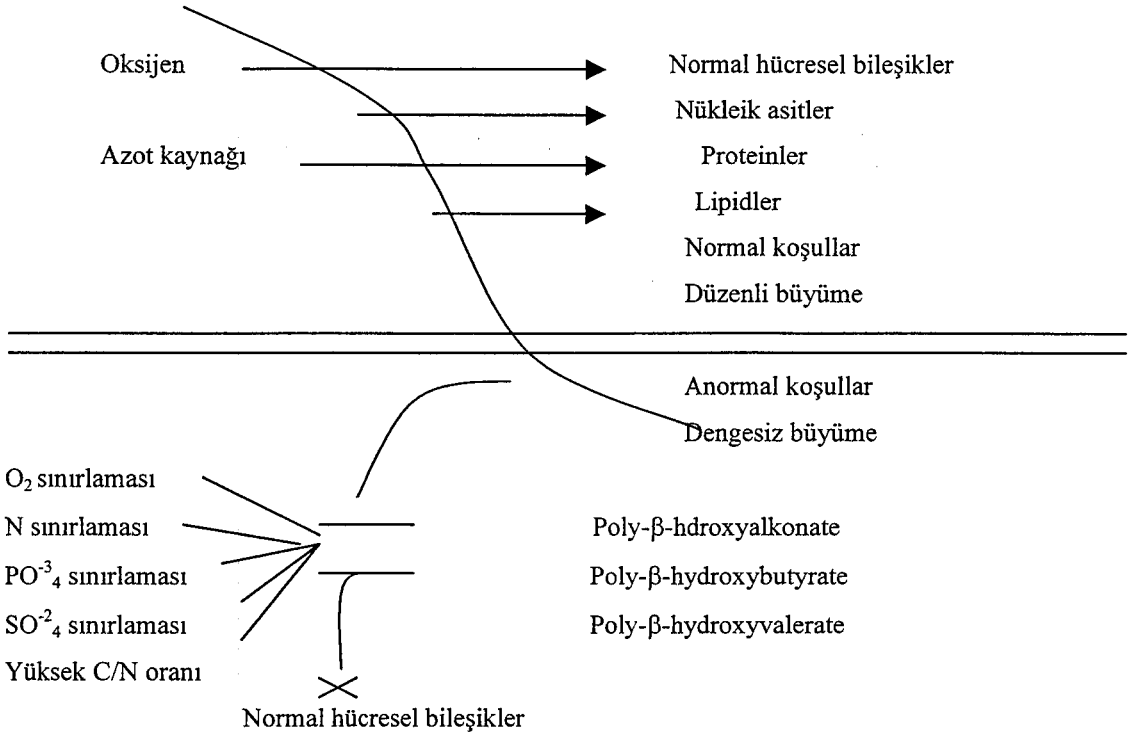
1.3. Prokaryotik Hücre İnküzyonları

Prokaryotları ve ökaryotları kapsayan çok sayıda mikroorganizma karbon içeren intraselular depo materyallerini sentezlemek için enzimatik yapıya sahiptir. Bu depo materyalleri, dengesiz büyüme şartları gibi özel durumlarda organizma tarafından sentezlenen maddeler olarak bilinmektedirler. Dengesiz büyüme koşulları özel bir makro elementin (C, H, N, O) ya da bir mikro elementin (P, Mg, vs.) bulunmadığı veya sadece optimumun altındaki seviyelerde bulunması halinde oluşmaktadır (Şekil 1.1) [16].

İntraselular depo materyallerinin sentezi ayrıca karbon gibi özel bir elementin son derece yüksek yoğunlukta bulunduğu dengesiz büyüme koşulları ile desteklenebilmektedir. Ortamdaki yüksek bir C/N oranı, karbon içeren intraselular

depo materyallerinin sentezlenme oranını geniş ölçüde arttırmaktadır [16].

Glikoz (C ve enerji kaynağı)

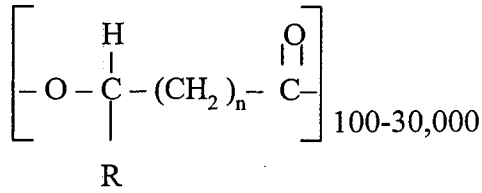


Şekil 1.1 Anormal büyüme koşulları ve PHA (Poly-β-hidroxyalkonate), PHB (Poly-β-hidroxybutyrate), PHV (Poly-β-hidroxyvalerate) gibi depo materyallerinin mikrobiyal sentezi. [16].

Prokaryotik hücrelerde bir çeşit hücre içi inklüzyonu olan depo materyallerinin meydana gelmesi ökaryotik hücrelerden oldukça farklıdır. Prokaryotik hücre içi depo materyalleri diğer besinlerin yokluğunda organizma tarafından bir çeşit karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. PHB'nin ayrıca, hücrelerin oksijenin düşük basıncına maruz kaldığı zamanlarda aşırı redüksiyonu eşitlemek için bir elektron eksiltici görevi gördüğü saptanmıştır [16].

1.4. PHB'nin Genel Özellikleri

PHB birçok bakteriden ekstre edilebilen biyoparçalanabilir bir termoplastiktir. Bakterilerde PHB karbon ve enerji kaynağıdır. Ortamda fazla karbon bulunduğunda yada C, H, N, O gibi bazı elementler sınırlandığı zaman intrasellüler granül olarak biriktirilirler [11-16].



n=1	R=hidrojen	Poli(3-hidroksipropiyonat)
	R=metil	Poli(3-hidroksibütirat)
	R=propil	Poli(3-hidroksivalerat)
	R=pentil	Poli(3-hidroksioktanat)
	R=nonil	Poli(3-hidroksidodekanat)
n=2	R=hidrojen	Poli(4-hidroksibütirat)
	R=metil	Poli(4-hidroksivalerat)
n=3	R=hidrojen	Poli(5-hidroksivalerat)
	R=metil	Poli(5-hidroksiheksanat)
n=4	R=heksil	Poli(6-hidroksidodekanat)

Şekil 1.2 PHA'ların temel yapısı [6].

Saf PHB' nin su ve neme karşı %100 dirençli olması nedeniyle propilen gibi büyük hacimli plastıklere benzerlik göstermektedir. PHB; termoplastik işlenebilirliği, suya %100 dirençliliği, %100 biyoparçalanabilirliği gibi 3 önemli özelliği birleştiren doğal bir polimerdir. Bu özellikleri nedeniyle eşsiz bir materyal olup, yaygın olarak kullanılan plastıklere benzer uygulamalarda kullanılabilir [17].

Depo materyali olarak PHB biriktiren bakterilerin çoğu toprakta, deniz suyunda, sulu çamur (lağım pislği) veya kompostta bulunabilir. Bu nedenle PHB genellikle bir çok ortamda bulunan bir maddedir ve kolayca doğada parçalanabilir. Mikroorganizmalar PHB yi şeker gibi bir karbon kaynağı olarak kullanabilir. PHB hücrelerden ekstre edilebilir ve polipropilen gibi işlenebilir [18].

1.4.1 PHB Granüllerinin Morfolojisi

PHA' lar morfolojik olarak 2 grup altında sınıflandırılmaktadırlar. Kısa zincirli (SCL) PHA lar 3-5 karbon atomu içermektedir, orta zincirli (MCL) PHA

lar ise 6-14 karbon atomu içermektedirler. Ayrıca (SCL) ve (MCL) monomer ünitelerinin ikisini birden içeren çeşitli bakteriler de tanımlanmıştır [19].

P(3HB) ve diğer PHA' lar birbirinden ayrı küresel granüller olarak hücre sitoplazması içinde birikmektedir. Granüllerin büyüklüğü çap olarak 100 nm'den 800 nm'ye kadar değişmekte ve 2-4 nm' lik kalınlıkta bir membranla kaplı haldedir. Granüllerin içeriği % 98 oranında polimer, % 2 oranında ise protein ve fosfolipittir. Canlı hücreler üzerindeki ¹³C_NMR çalışmaları P(3HB)' nin predominant olarak granüllerin içinde hareketli durumda olduğunu fakat çözelti içinde durumun tersi olduğunu göstermiştir [14].

Dunlop ve Robards (1973) *Bacillus cereus*'tan izole ettikleri PHB granüllerinin ultrayapısını araştırmışlardır. Freeze-etching (dondurup kalıp şeklinde çıkarma) metodunu kullanarak her bir PHB granülünün, granül hacminin yaklaşık %50'sini oluşturan bir merkezi çekirdeğe sahip olduğunu saptamışlardır. Bu çekirdek, en dışta PHB tarafından bir membranla tekrar çevrelenmiştir. Freeze-etching işlemi sırasında çekirdeğin gerilebildiği ortaya çıkmıştır [16].

PHB granüllerinin preparasyonları freeze-etching tekniği kullanılarak iki ayrı bölgenin yani merkezi çekirdek ve dış çeperin değişik yoğunluklarda olduğu kesin olarak gösterilmiştir. Başka bir çalışmada Ellar ve ark. (1968) önceki araştırmalarında her bir granülün fibriler yapıya sahip olduğunu ve bunların 10-15 nm uzunluktaki, uzamış polimerik PHB zincirlerinden oluştuğunu saptamışlardır [16].

PHB, optik olarak aktif D(-)-3-hidroksibütirik asitin makromoleküler bir polimeridir ve primer yapıya sahiptir [16].

PHB lineer bir polimerdir ve polimer zincirinin uzunluğu boyunca değişken karbonil ve metil gruplarıyla alifatik bir polyesterdir. PHB normal koşullarda reaktif olmayan bir bileşiktir. Kimyasal reaksiyonlara girme olasılığı sınırlıdır. Bununla birlikte çeşitli metotlarla indirgenerek elde edilen ürün çeşitliliğiyle birlikte saf bileşiklerin elde edilmesi için uygundur [16].

Yapılan çalışmalarda PHB'nin yoğunluğunun 1,171 - 1,260 gcm⁻³ arasında değiştiği ortaya konmuştur. Şekilsiz yoğunluğu düşük olmasına karşın kristal yoğunluğu yüksektir. PHB'nin erime noktası 157°C'den 188°C' ye kadar değişmektedir. PHB termoplastik özelliğe sahiptir ve preslenerek şekil verilebilir.

Bununla birlikte, 283°C'den yüksek sıcaklıklarda havada hızlı bir bozulma (parçalanma) göstermektedir [16].

1.4.2 PHB'nin Fiziksel Özellikleri

PHB, gerilme direnci ve kırılma direnci karşı polietilen ve polistiren gibi bazı ticari plastiklere benzerlikler gösterir (Çizelge 1.2). PHB'nin fiziksel özellikleri moleküler ağırlığına ve test edilen numunenin saflığına bağlıdır. PHB'nin bütünüyle şekilsiz örneği, eritilmiş örneklerin hızla oda sıcaklığına düşürülmesiyle elde edilir. Kesin bir kantitatif bilgi olmamasına rağmen, ultraviyole ışıkta PHB'nin kararlılığının iyi olduğu saptanmıştır [16].

Çizelge 1.2 PHB ve diğer polimerlerin fiziksel değerlerinin karşılaştırılması. [16].

Materyal	Gerilmeye dayanıklılığı T_B (N cm ⁻²)	Kırılma direnci B (%)	Modulus (hareketlilik) M (N cm ⁻² x 10 ³)
Poli-HB	1500-2500	8	800-1000
Polietilen	800-3500	400-800	200-1400
Polipropilen	2100-3700	150-400	1100-1300
Polistiren	4000-6500	3-5	3300
Polivinilklorit	4000-6000	10-50	2000-3000
Plexiglass	7000-7600	4	3000
Poliamid	5000-9000	50-200	1300-3000

PHB soğutulduğu zaman ağır bir şekilde kristalize olur. Maksimum kristalizasyon hızı 110-120°C arasındadır. PHB'nin kesinlikle saf olmaması durumunda nükleasyon (çekirdekleşme) bölgelerinin eksikliği mekanik özellikler üzerinde negatif etkilere sahiptir [16].

PHB'nin fiziksel özellikleri, kullanılan özel bakteri strainine bağlı olarak moleküler ağırlıktan etkilenir. Ek olarak mikroorganizma içinde moleküler ağırlık dağılımı daima sınırlıdır [16].

Mikrobiyal biyomasın ekstraksiyonu sırasında moleküler ağırlıkta bir miktar azalma meydana gelebilir. Bununla birlikte, genellikle moleküler ağırlık substrattan ve diğer fermentasyon koşullarından büyük oranda etkilenmez [16].

Şu ana kadar in-vivo koşullarda PHB'nin moleküler ağırlığı ölçülemese de fermentasyonun uzatılmasıyla elde edilen polimerin molekül ağırlığında genellikle önemli bir azalma olmuştur [16].

1.4.3 PHB'nin Çözelti Özellikleri

Cornibert ve Yokouchi (1972-1973) yaptıkları araştırmalar sonucunda PHB moleküllerinin kristal durumdayken soldan sağa kıvrılan 2_1 spiral formunda olduğunu tahmin etmişlerdir [16].

Çizelge 1.3. PHB'nin çeşitli çözücülerde çözünürlük özellikleri [16].

YÜKSEK ÇÖZÜNÜRLÜK		
Kloroform	Etilen karbonat	Dimetil formamid
Diklorometan	Propilen karbonat	Etilasetoasetat
Di-, tri-, tetra-kloroetan	Trifloroetanol	Triolein
Dikloroasetat	Asetik anhidrat 1 N sodyum hidroksit	Asetik asit Alkoller(3 C atomundan fazla)
YETERLİ ÇÖZÜNÜRLÜK		
Dioksan	Toluen	
ÇÖZÜNMEZ		
H ₂ O	Dilute mineral asitler	Etilasetat
Metanol	Alkalin hipoklorit	Etilmetil keton
Etanol	Dietileter	Tetrahidrofuran
1-Propanol	Hekzan	Etilformiat
2-Propanol	Benzen	Bütilasetat
Sikloheksanol	Sikloheksanon	Valerik asit
Karbontetraklorid		Tribütil sitrat

Akita ve ark. (1976, 1977) PHB'nin akışkanlığı, ozmotik basıncı, ışık saçılması ve optik çevirme dağılımı gibi çözelti özelliklerini detaylı bir şekilde incelemişler ve PHB'nin kloroform, trifloroetanol, dikloroasetik asit, etilen diklorit ve dimetilformamid gibi birçok çözücü içinde fiziksel özellikleri arasında benzerlikler saptamışlardır. Çizelge 1.3 'de çeşitli çözücülerde PHB'nin çözünürlük özellikleri verilmiştir [16].

Solventlerle yapılan çalışmalarla PHB' nin düzensiz halka biçimindeki yapısı geniş hacimlerdeki transplantasyonlarla genişletilmiştir. Organik solventler içinde PHB' nin çözünürlüğü, deneysel ölçülerde kuru yada ıslak biyomastan polimeri ekstre etmek için kullanılmıştır. Bugüne kadar PHB nin çözünürlüğü için etilen karbonat ve propilen karbonat gibi halkasal karbonatlar, kloroform, pridin, metilen klorid, etilen karışımları ve 1-2 dikloroetan gibi temel solventler denenmiştir [16].

Sıcaklığın PHB nin çözünürlüğü üzerindeki etkisini belirlemek için, PHB yi jel formunda çöktürmek amacıyla düşük sıcaklıklarda solventler sıkça kullanılmıştır. Bununla birlikte yüksek sıcaklıklarda moleküler ağırlığın düşmesinde mümkün olduğu bildirilmiştir [16].

PHB'nin termal parçalanması geniş ölçüde detaylı olarak araştırılmıştır. Vakum altında ve 338°C ye kadar temel parçalanma ürünleri dimerler, trimerler, tetramerler, izokrotonik asit ve krotonik asit olduğu belirlenmiştir.. En sonuncusu esas reaksiyon ürünü olup başlangıçta kullanılan PHB'nin kuru kütlelerinin %35'ini geçmektedir [16].

1.4.4 PHB'nin Piezoelektrik Özellikleri

Optik olarak aktivite gösteren doğal materyallerin çoğu kesikli piezoelektrik özelliğe sahiptir. Sentetik polipeptidlerde olduğu gibi polisakkaridler ve proteinler gibi biyopolimerler de "piezoelektrik polimer" olarak bilinen biyomateryal grubuna aittir. PHB den yapılmış bir filme dış basınç uygulandığında ölçülebilir bir piezoelektrik etki oluşur, bu türdeki biyopolimerlerin piezoelektrik sabiti yaklaşık 0.1 PC/N (Picocurie/Newton) dur. Film formundaki PHB' nin 165 °C de tavlandıktan sonra piezoelektrik özellikleri

kristallenme derecesine bağlıdır [16].

1.4.5 PHB' nin Spektroskopik Özellikleri

PHB kloroform gibi bir çözügede çözüldüğünde $5.75 \mu\text{m}$ ' de $\nu\text{-c} = 0$ olarak ifade edilen bir absorpsiyon gösterir. Bu yüzden Juttner kloroform çözeltilisindeki PHB' yi kantitatif olarak belirleyebilmek için direkt olarak infrared (IR)-fotometrik absorpsiyonu ölçülmüştür. Nichols PHB içeren örneklerde IR-analizinin kullanılmasının dezavantajlarını Fourier transform-infrared spektroskopunun kullanılmasıyla giderdiklerini belirtmiştir [16].

1.4.6 PHB' nin Kristalinitesi ve Erime Sıcaklığı

PHA' nın kristal yapısı diferansiyel (ayırıcı), scanning (tarama) kalorimetrisi ile X ray (X ışını) kırınımı yada termal analizle çalışılmıştır. X ray ayırıcı çalışmaları P(3HB_co_3HV) için Philips PW 1050/81 le çalışılmış, güç difraktomeri; PW 1710 ünitesiyle kontrol edilmiştir, Cu K α radyasyonu için nikel filtre kullanılmıştır ($\lambda=0.1542 \text{ nm}$;40 KV30 mA). Lattice sabitleri en yoğun yansımaların yada ışımaların görüldüğü 8-10 pozisyonlarında least-square saflaştırması ile hesaplanmıştır. Kristal boyutu 020 yansımısından Scherrer denklemi ile saptanmıştır [7].

Kristalinite' tepe noktasının altındaki relatif bölgeyle, şekilsiz saçılmaların karşılaştırılması yardımıyla ışınları saptırma ve kırma yoğunluğundan yararlanılarak yapılmıştır. *In vivo* P(3HB) granüllerinin morfolojik durumunun belirlenmesi için liyolifize hücre tozu içeren P(3HB) nin entalpisi ve erime noktası diferansiyel tarama kalorimetresi ile ölçülebilir. Örnekler oda sıcaklığında $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ye kadar yükseltilebilen bir ortamda tutulmuştur. Erime noktası erime endotermisi ile saptanmıştır, 1 dk sonra örnekler hızlı bir şekilde likid (sıvı) nitrojenle muamele edilmiş ve ısı $200 \text{ }^\circ\text{C}$ ye tekrar yükseltilmiştir. Cam geçirgenliği sıcaklığı 2. taramadan sonra belirlenmiştir. Son olarak P(3HB) kristalinitesi füzyon entalpisi ile belirlenmiştir [7].

Başka bir çalışmada Fengyusu ve ark. eşkenar dörtgen şeklindeki poly (4 hidrosibütirat) tekli kristallerinin sulandırılmış etanol solüsyonuyla sarmal bir gelişme gösterdiklerini gözlemlemişlerdir. Bu kristaller en iyi çözgen elektron difraksiyon örneklerini resiprokal lattice parametrelerinde $a^* = 1.305 \text{ nm}^{-1}$, $b^* = 2.085 \text{ nm}^{-1}$, $\gamma^* = 90^\circ$ vermiştir. Öte yandan P(4HB) elektron difraksiyon örnekleri 2 boyutlu P2gg simetriyle uyum göstermektedir [20].

1.4.7. PHB Üzerinde Nükleer Manyetik Rezonans Çalışmaları (NMR)

İn vivo P(3HB)' nin fiziksel durumunu göstermek için canlı hücrelerin yüksek çözünürlükte ^{13}C NMR spektrometresi kullanılmıştır. Hücrelerin pelet hale geçmesi 15 dk 4000 g de 4°C santrifüj işlemiyle gerçekleştirilmiş ve NMR için (% 20 D_2O) isotonik tuzda bekletilmiş daha sonra 10 mm çapında örnek tüpe aktarılmış ve NMR spektrumu Bruker 400 Mhz spektrometrisi üzerinde 100.6 Mhz de elde edilmiştir [7].

Waltz ayırıcı örnek üzerindeki buharlaşmış likid nitrojenin akışıyla korunan sıcaklık derecelerinde kullanılmıştır. *P.oleovorans* tarafından üretilmiş olan MCL_PHA karakterizasyonu için sonuçlar HNMR spektrumu Varian VXR 300 NMR spektrofotometrisinde 300 Mhz de kaydedilmiştir. Örnek 30 mg/ml de 20 ml kloroform olacak şekilde hazırlanmıştır. Spektrum 20°C de 240 μs sinyal genişliğinde ve 2.0_s relaksasyon(dinlenme) periyodunda kaydedilmektedir. 75 Mhz ^{13}C NMR spektrumu 20°C de 20-30 mg/ml CDCl_3 solüsyonunda kaydedilmiştir. ^{13}C NMR çalışmaları ayrıca PHA biyosentezindeki metabolik yolların araştırılması için de kullanılabileceği bildirilmiştir [7].

NMR çalışmalarından ayrıca PHB macromerinin bakteriyal orjininin karakterizasyonunda faydalanılmıştır. Bakteriyal poly (3 hidrosibütirat) ın prepolimer içine alkolizisi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş bunu sonlandırıcı zincirin seçiciliği izlemiştir. Böylece çift bağdan oluşmuş bir makromer elde edilmiş ek olarak hidroksil grubuna eklenmesiyle zincir son bulmuştur. Böylece PHB segmentleriyle biyomedikal uygulamaların birleşmesinden temel alan kullanışlı yeni yapısal moleküllerin oluşumu mümkün olmuştur [21].

1.5. PHB'nin Boyanma Reaksiyonu

PHB'nin bazı özellikleri lipidlerle ilgilidir. Bu onun hidrofobisitesi ile ifade edilmektedir. Etanol ile defalarca yıkandıktan sonra bile PHB içeren hücrelerden çıkmayan Sudan Siyahı B gibi lipofilik boyalarla kolayca boyanabilir. Büyük miktarda PHB içeren hücreler koyu mavi-siyah ile boyanır ve tekrarlanan etanol yıkamasından sonra bile bu boya kalıcıdır [16].

Az miktarda PHB içeren hücreler ise ya renksizdir ya da belirsiz gri olarak görülür. Sonuç olarak, Sudan Siyahı B kullanılması, PHB açısından zengin ya da fakir olan bakteri kolonilerinin agar plakları üzerinde ayırt edilmesi için basit bir yöntem olarak önerilmektedir [16].

Bakteriyal hücrelerin Sudan Siyahı B ile boyanması PHB granüllerinin varlığını geleneksel olarak ortaya koymasına karşılık, Ostle ve Holt, PHB için Sudan Siyahından daha büyük bir affinite ve daha büyük bir spesifiteye sahip olan suda eriyen esas oxazin boya olan Nile Blue A'nın kullanımını tavsiye etmişlerdir. Bu boya 460 nm. dalga boyunda parlak turuncu florasan vermektedir [22].

1.6. PHB ve PHA' nın Biyosentezi

Ara bileşiklerin varlığı ilk defa 1950 yılında Lemoigne tarafından tanımlanmıştır, Lemoigne *Bacillus megaterium*'u kullanarak PHB nin intraselular sentezinde oluşan ara ürünleri ve basamakları belirlemiştir [16].

Deneylein sonucunda başlangıçta substrat olarak glikoz ve son ürün olarak PHB arasındaki ara basamaklarda prüvat, asetat, asetoasetat ve β -hidroksibütirat olduğu saptanmıştır. Diğer deneysel çalışmaların sonunda da mikroorganizmalar tarafından sentezlenen PHB' nin ara basamaklarında asetatın, meydana gelen ara ürünler arasında olduğu vurgulanmıştır [16].

Rhodospirillum rubrum ve *Bacillus megaterium* da PHB sentezinde asetatın önemli bir ara basamak olduğu ^{14}C - β -hidroksibütiril-koenzim A kullanılarak gösterilmiştir. Ayrıca *Alcagines eutrophus*' ta PHB sentezinin kesinlikle asetil-CoA içerdiği 1964 de Gottschalk tarafından da ispatlanmıştır. Başka bir çalışmada asetil-CoA' nın 2 mol'ünün asetoasetil-CoA ya

konsendasyonu ve β -hidroksibutiril-Co'nun oluşumununun *Alcagines eutrophus*'ta PHB sentezi için kilit rol oynadığı gösterilmiştir [16].

Prokaryotik hücrelerde PHB nin intrasellüler sentezi için başlangıç bileşiği asetil-CoA dır. Substrat ve asetil-CoA'nın intraselular konsantrasyonunun artışıyla oluşan koşullar PHB sentezinde pozitif rol oynamaktadır ki bu aynı zamanda PHB sentezini de basitleştirmektedir , bu enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonun düzenleyici mekanizmanın etkisi altında olduğu için gerçekleşmektedir [16].

Kemoorganotrofik olarak çoğalan mikroorganizmalarda asetil-CoA nın hücre içindeki konsantrasyonunu etkileyen tüm ara metabolik yol izleri PHB sentez oranını etkilemektedir. Bunun sebebi glikoliziz, pentoz ve Entner-Doudoroff yolları gibi heksoz parçalama basamaklarından dolayı gerçekleşmektedir. TCA (sitrik asit döngüsü) özellikle asetil-CoA nın intraselular konsantrasyonuyla yakından ilgilidir ve bundan dolayı TCA döngüsünü etkileyen tüm koşullar PHB sentezini de etkilemektedir. Örnek olarak yüksek NADH_2 düzeyi TCA döngüsünün ilk enzimi olan sitrat sentetazı engellemeye meyillidir ayrıca bu düzeyde NADH_2 izositrat dehidrogenaz enziminin aktivitesini de engellemektedir. NADH_2 'nin yüksek düzeyde olması hücrelere yetersiz O_2 gelmesiyle meydana gelebilir. Böylelikle bu 2 enzim aktivitesi engellendiği için asetil-CoA düzeyi artar bu da PHB sentezini arttırmaktadır [16].

İntrasellüler NAD/ NADH_2 oranı ve ardından PHB sentezlenme oranına etki eden faktör ekstraselular oksijenin kısmi basıncıdır. Oksijenin bu etkisi *Alcagines eutrophus* H16 da, *Azotobacter beijerinckii* de en son olarak da *Azospirillum* türlerinde saptanmıştır. Bu 3 mikroorganizmada da oksijen sınırlandırılması PHB sentezini stimüle etmiştir [16].

PHB sentetaz ve D(-)3 hidroksi -butiril-CoA polimeraz enzimi PHB granülünü çevreleyen tek tabakalı membranda saptanmıştır. *Bacillus megaterium* protein fraksiyonundan izole edilen PHB ile birlikte protein fraksiyonunun in vitro koşullar altında PHB sentezini katalizlediği saptanmıştır. Bununla beraber PHB sentetazın *Zooglea ramigera*'da hem partikulat hem de çözünebilir formda olduğu bulunmuştur [16].

Ayrıca bu enzimlerin optimum pH ve substrat spesifiteleri aynıdır. Enzimin hücre içinde bulunma biçimi organizmanın büyüme koşullarına bağlıdır.

Ortamda glikozun fazla olduğu durumlarda PHB sentetaz aktivitesi PHB granülleriyle bağlantılı olarak partikül fraksiyonlarda bulunur, ancak glikozun kısıtlı olduğu durumlarda PHB sentetaz aktivitesinin yarısından fazla bir kısmı çözünür fraksiyondadır. PHB sentezi arttığıında ise bu polimeraz aktivitesi PHB granülleri içinde artarak lokalize olur [16].

Poli- β -hidroksibütirik asit, mikroorganizmaların sentezleyebildiği poli- β -hidroksi-alkanoatların yalnızca bir tanesidir. Atık işletmelerinden elde edilen aktif çamur bir çok araştırmacı tarafından gaz kromatografisi, kimyasal ve fiziksel analiz, IR analizi NMR (Nükleer Manyetik Rezonans), kütle spektrometrisi gibi analitik işlemlerle incelendiğinde PHA' ların PHB ve PHV (poli- β -hidroksivalerik asit) yi 1/5 oranında içerdiği bulunmuştur. Ayrıca C₄ ve C₅ tipi PHA ların az miktarda görülen C₆ ve C₇ tipi PHA' larla birlikte bulunduğu belirlenmiştir [16].

PHA lara olan ticari ilgi Holmes et al (1981) tarafından yayınlanan patentlere dayanarak daha da artmıştır. Bu ilgi PHB/PHV kopolimerlerinin PHB ye nazaran daha üstün fiziksel özelliklerinin olmasındandır. Ayrıca kimyasal olarak sentezlenen klorosülfanat, polietilen, polivinilklorit ve butilakrilat gibi polimerlerin PHB ile karışımları ilginç fiziksel özellikler göstermiştir [16].

Basit bir mikrobiyolojik işleme Poli- β -hidroksialkanoat kopolimeri elde etmek mümkündür. Farklı prekürsörlerin kullanılmasıyla bunların biyoproses sırasında ortama ilave edilmesiyle PHB içeren bir kopolimer elde edilebilmiştir [16].

Alcaligenes eutrophus ve mutant strainleri ile termoplastiklerin mikrobiyal senteziyle ilgili olarak yapılan bir araştırmada PHA ların çoğunun başlangıç anahtar enzimi olan β -ketotiolazın spesifitesinin eksikliğinden dolayı bir çok prekürsörün yardımıyla mikroorganizmalardan enzimatik olarak meydana getirilmiştir. Bu şekilde polimer oluşumu hücrelerde var olan açil-koenzim A nın derivatlarıyla ilişkilidir [16].

Alcaligenes eutrophus yalnızca karbon kaynağı olarak propiyonat ile PHB ve PHV sentezlemektedir. ¹³C işaretli asetat kullanarak PHB ve PHV oluşum mekanizması sadece propiyonatın varlığında belirlenmiştir. Burada NMR sonuçları dikkate alınmıştır. Karbon kaynağı olarak sadece propiyonat olduğu zaman 2 propiyonat molekülünün her birinin ¹³CO₂ molekül kaybıyla oluşan 2

asetatın kondensasyonu ile d(-)-3- hidroksi bütirat oluşur. Ayrıca C₂(asetat) in propiyonat parçasıyla birleşmesiyle hidroksivalerat oluşmaktadır [16].

Bu çalışmalar enzimatik olmayan türde olsa da C-atomlarının konumundan yada biçiminden ulaşılan sonuçlara göre β-ketotiolazın spesifik olmadığı saptanmıştır. Bu yüzden PHB/PHV tesadüf olarak oluşan bir polimerdir denilebilir [16].

Kessler ve ark. yaptıkları çalışmada PHA metabolizmasının düzenlenmesinde etkin olan faktörleri tespit etmeye çalışmışlardır. Çalışmalarının sonucunda regülasyonunun transkripsiyon seviyesinde, enzimatik düzeyde yada her ikisinin kombinasyonu şeklinde meydana gelebileceğini belirtmişlerdir [23].

Timm ve ark. *Pseudomonas* türlerini kullanarak yaptıkları çalışmada *P. facilis* ve *P. fluorescens* dışında diğer tüm strainlerin P (3HB) yada oktanat varlığında 3 hidroksi oktonat temelli polimerleri biriktirdiklerini ancak karbon kaynağı olarak glukonat kullanıldığında polyester birikimi yapmadıklarını göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmaların sonucu olarak PHA formasyonunun (oluşumunun) bilinen diğer bütün PHA biyosentetik yollarından farklı bir yola bağlı olduğunu göstermektedir [24].

Findlay ve White (1983) deniz sedimentlerinde mikrobiyal biyomastan 11 farklı PHA elde etmişlerdir. Ayrıca *Bacillus megaterium*'un 4-8 karbon atomlu monomerlerinin bulunduğu PHA' ların kompleks karışımını sentezlediğini belirlemişlerdir. De Smet et al (1983) *Pseudomonas oleovorans*'ın karbon kaynağı olarak oktan kullanıldığında morfolojik olarak PHB ye benzeyen bir PHA olan C8 polyesterini sentezlediğini saptamıştır. Buradan yola çıkarak PHA gibi polyesterlerin sentezlenme yeteneğinin sadece *Alcagines* sp ile sınırlı olmadığı bir çok bakterinin de bu özelliğe sahip olduğu anlaşılmıştır [16].

1.7. PHB ve Diğer PHA'ların Uygulama Alanları ile Endüstriyel Kullanımları

1.7.1 Medikal Uygulamalar:

PHB ve diğer PHA' lar günümüzde tıp ve eczacılık uygulamalarında

kullanımı maliyeti ve biyolojik uygunluk göstermesinden dolayı ilgi çekmektedir. PHB' nin hayvan dokularına girişi herhangi bir toksik etkiye neden olmamaktadır. Bunun ışığında absorbe edilebilen protez aletleri ve cerrahi dikişlerin insanlarda kullanılması gerçekleşmiştir [9-25].

PHB iki önemli özelliğinden dolayı tıbbi uygulamalar bakımından önemlidir. Bunlardan biri PHB' nin biyoyumlu olması diğeri de vücut içinde biyolojik parçalanmasının yavaş olmasıdır. PHB monomerleri insan vücudunda bulunan doğal bir metabolit olmasından dolayı vücutta sadece çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur ve bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü salınımı için kullanılmıştır. Örneğın, ilaç PHB ile mikroenkapsüle edilmiş ve deri altına enjekte edilmiştir yada ilaç PHB den yapılmış bir hap içine sıkıştırılmış ve ağız yoluyla hastalara verilmiştir. PHB' nin vücut içersinde biyolojik parçalanması yavaştır çünkü insan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez bu yüzden PHB cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmaktadır [26-28].

Çizelge 1.4 : Tıpta ve eczacılıkta potansiyel PHB uygulamaları [28].

UYGULAMA TİPİ	ÜRÜNLER
Yara Yönetimi	Cerrahi dikişler, cilt bileşenleri, sinir kolları, cerrahi ağılar, lifler, pansuman bezleri
Vasküler sistem	Kalp kapakçıkları, kardiovaskular dokular, perikardial yamalar, vascular dokular
Ortopedi	Kıkırdak mühendisliğı uygulamaları için yapı iskelesi, spinal kafesler, kemik yerini alan yapılar, menisküs rejenerasyonları, internal yerleştirme cihazları
İlaç iletimi	Antikanser tedavisi için mikro ve nanoküreler
Üroloji	Ürolojik materyaller
Diş	Periodontitis teki doku rejenerasyonu için bariyer materyaller
Bilgisayar destekli tomografi ve ultrason	Kontrast ajanları

PHB ve kopolimerleri ayrıca polipeptidler polisakkaritler yada proteinler gibi piezoelektrik polimer özelliği gösterir. Kesikli piezoelektrisite özelliklerinden dolayı Poliviniliden florit polimer filmleri, kemiği elektriksel stimülasyon ile kuvvetlendirmektedir. PHB' de bu durumda bir kemik kırığını sabitleyen levhalar görevi görebilir ve böylece stimüle edilen kemik büyüyerek gelişebilir. Bu şekilde bir kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından bulunduğu yerde yavaş yavaş resorbe edilebilir. Bu esnada kemik kaynar ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir cerrahi müdahale kalmaz [26].

1.7.2 Paketleme ve Tek Kullanımlık Malzemelerde PHB

Plastik film ve plastik paketleme elemanlarının paketleme materyali olarak kullanımının artması ve atık yığınlarının çoğalmasından dolayı biyoundirgenebilir plastik poşetlerin kullanımı artmıştır. Polietilen-nişasta karışımı paketler marketlerde başarıyla kullanılmıştır. Diğer değeri düşük bol miktarda bulunan polipropilen ve poli (etilen tereplat) ise biyoundirgenebilir değildir. Bu gibi materyalleri biyoundirgenebilir dolgu elemanlarıyla yada diğer ilavelerle karıştırmak yeterli derecede sonuç vermemiştir [3].

PHB kopolimerleri iyi bir şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, ayrıca filmleri yapılabilir ve klorine edilmiş polietilen gibi diğer sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir. PHA'nın akrilonitril gibi bazı ticari polimerlere ilavesiyle erime vizkozitesi azaltılabilir [16].

PHB biyolojik olarak parçalanabilme özelliğinden dolayı tek kullanımlık ürünlerin üretiminde kullanılabilir. İngiltere'de bulunan ICI ve Marlborough Biopolimers gibi şirketlerin bu alanda çalışmaları bulunmaktadır [16].

Biyolojik kökenli paketlemede en önemli parametreler su aktivitesi, pH, oksijenin depolanma zamanı, besinler ve sıcaklıktır. Kuru ürünler uzun süre güvenli olarak depolanabilse de diğer ürünler yada nem kapabilen ürünlerin depolanma süresi kısıtlıdır. Bu yüzden öncelikli olarak biyolojik kökenli paketleme elemanlarının paketlemede kullanılabilmesi için besin kalitesi ve güvenliği üzerine etkilerinin gözden geçirilmesi gerekmektedir [28].

Çizelge 1.5 : Biyolojik kökenli polimerlerle poliatilen, poliestrenin karşılaştırılması [28].

	Nem geçirgenliği	Oksijen geçirgenliği	Mekanik özellikleri	Önerilen Fiyat(ECU/ Kg)
Polyhidroksialkanoatlar (polyhidroksibütirat/valerat)	Düşük	Düşük	İyi	Geçerli 10-12 Planlanan 3-5
Selüloz	Yüksek-Orta (tabakalıysa düşük)	Yüksek	İyi	1.5-3
Selüloz asetat	Orta	Yüksek	Orta	3-5
Nişasta/polivinil alkol	Yüksek	Düşük	İyi	2-4
Proteinler	Yüksek-orta	Düşük	Orta	1-8
Polilaktat	Orta	Yüksek-orta	İyi	Planlanan 2-4
Düşük yoğunlukta polietilen	Düşük	Yüksek	Orta-İyi	0.7-2
Poliestren	Yüksek	Yüksek	Zayıf-Orta	1-2

1.7.3 Tarımsal Uygulamalar

PHB ve kopolimerleri bakteriler funguslar ve algler tarafından belirli çevre koşullarında oldukça kısa bir periyot içerisinde tamamen CO₂ ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilir. Tam bir parçalanma için gereken zaman yüzey ve kalınlık özelliklerine bağlıdır [16].

Biyoparçalanabilir konteynirlerin yada muhafaza elemanlarının, ağaç fidelerinin, yıllık çiçeklerin, süs çalılarının, sebzelerin başka bir yere nakli için çok geniş bir potansiyele sahip olduğuna inanılmaktadır. Bu yolla ürün yetiştiricilerinin otomasyon ve nakliyat maliyetlerinin düşeceği ve daha yüksek oranda bir verimin ve kazanımın olacağı düşünülmektedir. Eğer bu tip

konteynırlar biyoparçalanabilir olmasaydı, bu muhafaza elemanlarının köklerin gelişmesi için ortadan kaldırılması gerekirdi, oysa biyoparçalanabilir konteynırlar için bu şekilde ekstra bir işleme gerek yoktur [3].

Bununla birlikte çıplak kökler oldukça kırılğan ve nazik bir yapıya sahiptir ve bu gibi kökleri makineyle dikmek oldukça zordur; biyoparçalanabilir konteynırlar yada muhafaza elemanları köklerin makineyle dikilmesi sırasında kökleri dikim esnasındaki şoktan korur böylece kök kazanımı artar [3].

Burada biyoparçalanma yada indirgenme oranı çevresel şartlara ve sera gelişim fazı periyoduna göre ayarlanmalıdır [3].

Biyoparçalanabilir polimerler ayrıca pestisidlerin ve gübrelerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar gibi kullanılabilirler [3].

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Bakteri Strainleri

Çalışmamızda, Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden alınan toprak örneklerinden izole edilen bakteriler kullanılmıştır . PHB üretimi için seçilen bakterilerin izole edildiği yer, derinlik, toprağın tipi ve Çizelge 2.1 de verilmiştir.

Çizelge 2.1. İzole edilen mikroorganizmalar ve alındıkları yerler

İzole Edilen Bakteriler	Alınan yer	Toprak tipi	Toprak derinliği
İzolat 1	Emirdağ dağlık kesimi Afyon	Dağlık kesim toprağı	20-30 cm
İzolat 2	Hasan Polatkan semti Eskişehir	Lahana ekili tarla toprağı	0-15 cm
İzolat 3	Kızıldağ geçidi Erzincan	Şeker pancarı ekili tarla toprağı	0-10 cm
İzolat 4	Hasan Polatkan semti Eskişehir	Reyhan ekili tarla toprağı	0-10 cm

2.1.2. Besiyerleri , Kimyasallar ve Tampon Çözeltiler

2.1.2.1. Nutrient Agar

Yeast agar	3 g
Pepton	5 g
Sodyum klorid	8 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile suda çözdürülerek tüplere dağıtılmış ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

2.1.2.2. Sudan Black B Boyası

Sudan siyahı boyası	0.3 g
%95 lik etanol	75 ml
Distile su	25 ml

0.3 g sudan siyahı boyası 75 ml (%95 lik) etanolde çözünerek üzerine 25 ml distile su ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanır [7].

2.1.2.3. Temel Mineral Ortam

Sakkaroz	20.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.5 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
Fe(III)-NH ₃ –Sitat	0.05 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g
İz element solüsyonu	1.0 ml.
Distile Su	1000 ml [26].

İz Element Solüsyonu (10 ml'de)

ZnSO ₄ ·7H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	70 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	20 mg

NaMoO ₄ 2H ₂ O	30 mg
Distile su	1000 ml

Ortam içerikleri distile suda çözüldükten sonra PH 7 ye ayarlanarak 121°C' de 1.5 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [26].

2.1.2.4. Melas İçeriği

Çalışmamızda kullanılan melas Eskişehir şeker fabrikasından temin edilmiş ve içeriği Bilecik Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nde, tespit edilmiştir.

Çizelge 2.2 Deneylerde kullanılan melasın bazı özellikleri

Kuru madde (%)	78.4
Polarizasyon (%)	45.5
Şeker (%)	58.0
Rutubet düzeyi (%)	21.07
Kül miktarı (%)	8.58
Refraktometre indisi:	1.4875
Kırılma indisi:(Brix)	78.85

2.1.2.5. Şeftali Pulbu

Çalışmamızda kullanılan şeftali pulbu Tamek Meyve Suyu ve Konsantre Fabrikası'ndan temin edilmiştir. Şeker içeriği, Bilecik Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nde, % 32 olarak tespit edilmiş ve bu substrat çalışmamızda PHB üretimi için denenmiştir.

2.2.2.6. Peynir Altı Suyu

Çalışmamızda kullanılan peynir altı suyu, Bilecik'te bulunan bir mandıradan temin edilmiştir. Peynir altı suyunun laktoz içeriği Bilecik Meslek Yüksek Okulu, Gıda Teknolojisi Bölümü'nde tespit edilmiş ve yaklaşık %5 oranında laktoz içerdiği saptanmıştır.

2.1.2.7. Egg Yolk Reaksiyon Ortamı

Triptoz	10 g
Na ₂ HPO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
Glukoz	2 g
Sodyum klorid	2 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile suda çözündürülerek test tüplerine aktarılmış 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [30].

2.1.2.8. Egg Yolk Emülsiyonu

Aseptik şartlarda yumurtanın sarısı beyazından ayrılarak 1:1 oranında %85 lik NaCl ile karıştırılmış ve yüksek devirli parçalayıcıda homojen hale getirilerek kullanılmıştır [29].

2.1.2. 9. Hareketlilik Test Ortamı

Beef extract	3 g
Pepton	5 g
Sodyum nitrat	1 g
Gliserol	5 ml

Galaktoz	5 g
Agar	8 g
Distile su	995 ml

Maddeler distile suda çözdürüldükten sonra pH 7.0' a ayarlanmış, 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

2.1.2.10. Pepton Broth

Pepton	10.0 g
Sodyum klorid	5.0 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile suda çözdürülerek tüplere dağıtılmış ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

2.1.2.11. Kazein Milk Agar

Skim milk powder	5.0 g
Agar	1.0 g
Distile su	50 ml

Maddeler distile suda çözdürülerek tüplere dağıtılmış ve 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

2.1.2. 12. MR-VP Broth

Pepton	7.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
Glukoz	5.0 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile suda çözdürülerek, 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

2.1.2. 13. Nişastalı Agar

Patates nişastası	1.0 g
Nutrient agar	100 ml

1 gr patates nişastası 10 ml distile suda eritilmiş toplam 100 ml olacak şekilde nutrient agar ilave edilerek 121 °C de 15 dk otoklavlanmıştır [29].

2.1.2.14. Nutrient Broth

Yeast agar	3.0 g
Pepton	5.0 g
Sodyum klorid	8.0 g
Distile su	1000 ml

Maddeler distile suda çözdürülerek, 121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

2.1.2.15. Nutrient Jelatin

Jelatin	120 g
Distile Su	1000 ml

121°C' de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir [29].

2.1.2.16. %' 3 lük H₂O₂

3 ml H₂O₂ solüsyonu 97 ml distile su ile tamamlanmış ve iyice karıştırılarak kullanılmıştır [29].

2.1.2.17. İyot Solüsyonu

İyot	1.0 g
Potasyum iyodür	2.0 g
Distile su	300 ml

Maddeler distile su içinde çözündürülerek kullanılmıştır [29].

2.1.2.18. Kristal Viyole Solüsyonu

Kristal viyole	2.0 g
Etil alkol	20 ml
Amonyum oksalat	0.8 g
Distile su	80 ml

Maddeler distile su içinde çözülerek kullanılmıştır [29].

2.1.2.19. Safranin Solüsyonu

Safranin	0.25 g
Etanol	10 ml
Distile su	100 ml

Maddeler distile su içinde çözündürülerek kullanılmıştır [29].

2.1.2.20. α – Naftol Solüsyonu

Naftol	5.0 g
%95 lik etil alkol	100 ml (29).

2.1.2.21. 1 N H₂SO₄

2.7 ml H₂SO₄ 100 ml distile su içinde karıştırılmıştır [29].

2.1.2.22. 0.4 N KOH

2.24 gr KOH 100 ml distile su içinde çözdürülerek karıştırılmıştır [31].

2.2. METOD

2.2.1. Toprakta Mikroorganizma İzolasyonu:

Toprakta mikroorganizma izolasyonu amacıyla içerinde 9.0 ml steril distile su bulunan 5 adet steril tp hazırlanmıştır. Toprak rneklerinin her birinden 1 g alınarak 9 ml steril distile su içeren 1. tüpe aktarılmış ve tp 3-5 sn vortekste karıştırılmıştır. 10 kez seyrelmiş olan bu tüpten steril bir pipet ucu ile 1 ml alınarak 2. tüpe aktarılmış ve tekrar vorteksle karıştırılmıştır. Bu işlemler 5. tüpe kadar tekrarlanarak 10^5 kez seyreltme işlemi yapılmıştır. Tüplerin her birinden steril bir pipet ucu ile 0.1 ml alınarak nutrient agar içeren petri yüzeyine pipetlenmiş ve steril bir dragalski spatülü ile tam olarak yzeeye yayılmıştır.

30 °C de 1-2 gün inkübasyon süresi sonunda farklı tipte koloniler seçilmiş ve bu koloniler saflaştırılma amacıyla tekrar nutrient agar içeren petrilere ekilerek 30 °C de 1-2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Saflaştırılmış olan izolatlar daha sonra PHB retim yetenekleri incelenmek üzere – 80 °C de % 15 gliserol de uzun süreli, + 4 °C de kısa süreli olarak saklanmıştır.

2.2.2. Sudan Black B boyama

İzole edilen stoklanmış olan mikroorganizmalar Nutrient agar besiyerine ekilmiş 30 °C de 24 saat aktifleştirilmiştir. İzolatlardan bir preparat hazırlanarak % 0.3 (wt/vol) sudan black B nin (etilen glikol de) filtre edilmiş solüsyonuna daldırılmış ve 5-15 dk boyanmıştır. Sonra preparat havada kurutulduktan sonra bir süre ksilene daldırılıp, çıkarılarak kurutma kağıdı ile suyu alınmıştır. Preparat %0.5 (wt/vol) sulu safranin ile 5-10 sn boyanmış, kurutulmuş ve musluk suyu ile yıkanmıştır Preparat immersiyon objektifinde incelenmiş, mikroorganizmanın stoplazmik kısımları pembe görünürken PHA inklzyonları mavi siyah damlacıklar halinde grlmştir ve sonuç pozitif olarak kaydedilmiştir. Pozitif zellik gösteren izolatlar identifikasyon testlerine alınmıştır [7].

2.2.3. İdentifikasyon Testleri

2.2.3.1. Gram boyama

Nutrient agara çizgi ekim yapılarak saflaştırılmış olan kolonilerden, 24 saatlik aktif kültür hazırlamak amacıyla, taze Nutrient agar içeren petrilere çizgi ekim yapılarak 30 °C de inkübe edilmiştir. Gram boyama işlemi, bu aktif kültürlerden yararlanılarak yapılmıştır [29].

Katı besiyerindeki kültürden öze ile yaklaşık bir toplu iğne başı büyüklüğünde bir kısım alınarak, lam üzerine konulmuş bir damla su içerisinde emülsifiye edilip yüzeye öze ile yayılmıştır. Lam ilk olarak havada kurutulmuş, sonra bek alevinden 3 kez geçirilmiş fiksasyon yapılmış ve soğutulmuştur. Preparat ilk önce kristal violet ile 1 dk boyanmış ve sonra fazla boya akıtılmış, sonra gram iyodür (lugol) çözeltisiyle 1 dk muamele edilmiştir. Fazla lugol akıtılarak alkol ile 6 sn muamele edilmiştir. Distile suyla alkol yıkanarak uzaklaştırılmış ve son olarak preparat safranin ile 30 sn boyanmıştır [29].

Preparattaki fazla boya akıtılarak suyla yıkanmış ve havada iyice kuruduktan sonra immersiyon objektifinden yararlanılarak incelenmiştir. Koyu mor (menekşe) renkli olan mikroorganizmalar Gram (+), açık pembe renkli olanlar ise Gram (-) olarak değerlendirilmiştir [29].

2.2.3.2. Hareketlilik Testi

Hareketlilik testi için hazırlanan besiyerine aktifleştirilmiş kolonilerden saplama ekim yapılarak 30 °C de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Saplama ekim yapılan bölgeler boyunca yanlara doğru yayılma gösterenler hareketli olarak değerlendirilmiştir [29].

2.2.3.3. Jelatin Hidrolizi

Nutrient jelatine taze bakteri kolonilerinden saplama ekim yapılarak 30 °C de 10-20 gün inkübasyona bırakılmıştır. Her gün düzenli olarak kontrol edilen tüplerde inokülasyon hattı boyunca sıvılaşmanın olup olmadığı gözlenmiştir [29].

2.2.3.4. Karbonhidratların Fermantasyonu

Karbon kaynakları (Çizelge 3.7) Pepton broth besi ortamına ayrı ayrı son konsantrasyonları % 1 olacak şekilde tüplere aktarılmış, aktifleştirilmiş kültürlerin bu tüplere inokülasyonu yapılmış, tüpler 30 °C de 24-48 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda tüplerdeki asit ve gaz oluşumları gözlenmiştir. Besiyerindeki indikatörün renginin kırmızıdan sarıya dönüşmesi asit oluşumu, durham tüplerindeki kabarcık görülmesi ise gaz oluşumunu göstermiştir [29].

2.2.3.5. Katalaz Testi

Nutrient agar besi ortamına bakterilerden 30 °C de 24 saat geliştirilen kültürler üzerine H₂O₂ damlatılarak gaz kabarcıkları oluşumu gözlenmiştir. Bu işlem sonucunda kabarcık oluşumu katalaz enziminin H₂O₂ yi parçaladığının göstergesi olduğundan pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [29].

2.2.3.6. Kazein Hidrolizi

Kazein Milk agar'a aktifleştirilmiş kültürlerden çizgi ekimi yapılarak 30 °C de 2-14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda koloni etrafındaki şeffaf bölgeler pozitif sonuç olarak kaydedilmiştir [29].

2.2.3.7. Metil Red (MR) Testi

MR-VP broth içeren tüplere bakteriler inoküle edilmiş, 30 °C de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış bu süre sonundaki tüplere metil red solüsyonu damlatılmış, kırmızı renk oluşumu pozitif olarak kaydedilmiştir. Metil kırmızısı reaksiyonu, sakkarozun fermentatif metabolize olması sonucu oluşan organik asitlerin ortamın pH' ını düşürdüğünü göstermektedir [29].

2.2.3.8. Nişasta Hidrolizi

Nişastalı Agar'a aktiveleştirilmiş kültürlerden tek çizgi ekimi yapılarak 30 °C de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında besi ortamı üzerine iyodür çözeltisi damlatılmıştır. Kolonilerin çevresinde besi ortamının diğer bölgelerinde görülen koyu mavi rengin görülmemesi besi ortamındaki nişastanın bakteriler tarafından hidroliz edildiğini göstermiş ve sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir [29].

2.2.3.9. Tuzda Gelişme

Son konsantrasyonu % 2, 5, 7, 10 NaCl içerecek şekilde hazırlanan Nutrient broth'lu tüplere aktiveleştirilmiş kültürler bakteriler inoküle edilmiş 30 °C de 24-48 saat inkübasyondan sonra bulanıklık görülen tüplerde sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir [29].

2.2.3.10. Üreaz Testi

Maya ekstrakt (1 gr) oratamına %0.0016 (w/v) cresol red eklenerek 121°C' de 15 dakika otoklavlandıktan sonra filtre ile steril edilmiş üre solusyonundan son konsantrasyon %2 olacak şekilde eklenmiş ve steril tüplere paylaştırılmıştır. 24 saat lik aktif kültürden öze dolusu kültür aşılansarak 27°C de çalkalamalı etüvde 14 gün inkübe edilmiştir. Üresiz kontrol tüpleri dahil edilmiştir. Kırmızı renk oluşumu ile beliren alkalitedeki artış (yaklaşık pH 9.0) üreaz aktivitesinin kanıtıdır

ve bu sonucu veren mikroorganizmalar üreaz pozitif olarak değerlendirilmiştir [29].

2.2.3.11. Voges-Proskauer (VP) Testi

MR-VP broth içeren tüplere, bakteriler inoküle edilmiş 30 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda temiz bir tüpe aktarılan 3 ml kültür üzerine 1.8 ml – α Naftol solüsyonu ve 0.6 ml % 40 lık KOH çözeltisi damlatılmış pembe renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bu reaksiyon mikroorganizmaların sakkarozu ayrıştırdıkları zaman nötral ürünler oluşturduğunu ortaya koymaktadır [29].

2.2.3.12. Egg Yolk Emülsiyonu

Aseptik şartlarda yumurtanın sarısı beyazından ayrılarak 1:1 oranında %85 lik NaCl ile karıştırılmış ve yüksek devirli parçalayıcıda homojen hale getirilerek kullanılmıştır [29].

2.2.3.13. Egg Yolk Reaksiyon Ortamı

Hazırlanan egg-yolk reaksiyon ortamından steril tüplere 2.5 ml konmuş ve her bir steril tüpe (2.2.3.13) hazırlanmış olan egg yolk emülsiyonu aseptik olarak aktarılmıştır. Kontrol tüpüne egg yolk emülsiyonu konulmamıştır. Tüplerde görülen beyaz parçacıklar yada ortam yüzeyindeki bulanıklık pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir [30].

2.2.4. PHB' nin Çalkalamalı Kültür ile Üretimi

2.2.4.1. İnokulum Hazırlanması

PHB boyama yöntemiyle PHB ürettiği saptanan saf izolatları aktif hale getirmek için içinde 10 ml temel mineral ortam bulunan tüplere 1'er öze inokulum

yapılmıştır. Bu tüpler 30 °C de 150 rpm de 1 gece inkübe edilmiştir. Aktif hale getirilen kültürler steril pipetle içinde 40 ml temel mineral ortam bulunan 250 ml lik erlenlere 1ml olacak şekilde inokulum edilmiştir ve 30 °C de 150 rpm de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır [26].

2.2.4.2 Mineral Besi Ortamında PHB Üretimi

PHB üretimi için kullanılan temel mineral ortam ve iz element solüsyonu 500 ml lik hacimlerde hazırlanmış ve 250 ml lik erlenlere 100 ml olacak şekilde eşit hacimlerde dağıtılmıştır. Aktifleştirilmiş olan kültürlerden bu ortama 2ml inokülasyon yapılmış ve 30 °C de 18, 24, 48, ve 72 saat inkübasyondan sonra kültür ekstraksiyon ve analitik ölçüm işlemlerine hazır hale gelmiştir. Çalışmalar 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir [26].

2.2.4.3 İşlenmiş Melasdan PHB Üretimi

Melas, içerdiği bazı kolloidal bileşikler ve ağır metalleri (Cu, Fe, Pb, v.b.) uzaklaştırmak amacıyla ön işlemden geçirilmiştir. Bunun için, 170 g melas 300 ml distile su içinde karıştırılıp çözündürülerek, üzerine 50 ml distile suda çözünen 0.30 gr potasyum ferrisiyonat çözeltisi konulmuştur. Tüm çözelti distile su ile 500 ml'ye tamamlanıp 5 g diatome toprağı ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Bir gece +4°C'de tutulan melas çözeltisi, bu süre sonunda filtre kağıdından geçirilerek süzölmüştür. Böylece istenmeyen bazı bileşiklerden arındırılmış ve oldukça berrak bir melas çözeltisi elde edilmiştir [26].

İşlenmiş melasdan erlende PHB üretimi için temel mineral ortamdaki sakkaroz yerine %2 ve % 4 sakkaroz oranını verecek şekilde melas çözeltisi eklenmiştir. 30 °C de 18-24-48-72 saat inkübasyondan sonra kültür analitik ölçüm işlemlerine hazır hale gelmiştir. Çalışmalar 3 paralel olarak yürütölmüştür.

2.2.4.4 Şeftali Pulb'undan PHB Üretimi

PHB üretimi için temel mineral ortamdaki sakkaroz yerine %2 ve % 4 sakkaroz oranını verecek şekilde şeftali pulbu eklenmiştir. 30 °C de 18-24-48-72 saat inkubasyondan sonra kültür analitik ölçüm işlemlerine hazır hale gelmiştir. Çalışmalar 3 paralel olarak yürütülmüştür.

2.2.4.5. Peynir Altı Suyundan PHB Üretimi

Peynir altı suyu içerdiği proteinlerden arındırılmak amacıyla bir ön işleminden geçirilmiştir. Bunun için, peynir altı suyu 121°C de 15 dk otoklavlanmış daha sonra filtre kağıdı ile süzülerek berraklaştırılmıştır. Yaklaşık %5 laktoz içerdiği tespit edilmiş olan bu berrak çözeltinin %2 sakkarozu verecek olan miktarı, standart üretim ortamındaki sakkaroz yerine karbon kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan ortam (2.2.4.2) de belirtildiği şekilde dağıtılmış . 30°C, 150 rpm de 18-24-48-72 saat'lik inkübasyondan sonra PHB miktarları ölçülmüştür, Çalışmalar 3 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Fermentörde PHB Üretimi

Fermantasyon için çalkalamalı kültürlerde yüksek sonuçlar aldığımız izolat 2 ve izolat 3 kullanılmıştır. Fermantasyonlar 2.5 lt hacimli fermentörde (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC marka, BIOFLO 3000 model) gerçekleştirilmiş ve aynı koşullar altında, belirlenen farklı substratların her biri için tekrarlanmıştır. Fermentördeki üretimler için kullanılan hacimler 2 lt'ye göre ayarlanmıştır. Fermantasyonlar 30°C, 250 rpm ve 24-48 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. (KH₂PO₄) ve (NH₄)₂SO₄) miktarları yarıya indirilerek besin sınırlandırılması yapılmıştır. Ayrıca havalandırmada yarı yarıya azaltılmıştır.

2.2.5.1. Fermentörde Temel Mineral Ortamda PHB Üretimi

Aktifleştirme amacıyla 10 ml lik temel mineral ortam içeren tüplere inoküle edilen izolatlar daha sonra temel mineral ortam içeren 40 ml lik erlene % 10 oranında inoküle edilmiş, 30 °C de 24 saat inkübasyondan sonra, 2 lt lik (temel mineral ortam) fermantasyon ortamına inokülasyon oranı % 2 olacak şekilde aseptik koşullar altında aşılama yapılmıştır. Çalışmalar 2 li paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Fermentörde temel mineral ortam kullanılarak yapılan PHB üretiminde çalkalamalı kültürde yüksek sonuç aldığımız ve identifikasyon çalışmaları sonucunda izolat 2 ve izolat 3 olarak isimlendirdiğimiz 2 bakteri kültürü kullanılmıştır.

Birinci uygulamada fermantasyonda limitasyon yapılmamış, diğerinde ise KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarları % 50 oranında düşürülerek limitasyona gidilmiştir.

Havalandırma oranları ise 12 saat sonunda % 50 ye düşürülmüş 30°C, 250 rpm de 24 saat'lik fermantasyondan sonra fermantasyona son verilerek diğer işlemlere geçilmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3 Temel mineral ortam içeren fermentörde Test bakterileri ve fermantasyon koşulları.

Temel mineral ortam	Aerasyon ilk 12 saat	Aerasyon 12 saat sonunda	Besin maddeleri limitastonu KH_2PO_4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	pH
İzolat 2	% 50	% 25	-	7
İzolat 2	% 50	% 25	% 50	7
İzolat 3	%100	% 50	-	7
İzolat 3	%100	% 50	% 50	7

2.2.5.2. Fermentörle Melas' dan PHB Üretimi

Hazırlanan melas çözeltisinden %2 ve %4 şekeri verecek şekilde hesaplanarak alınan miktarlar, PHB üretmek amacıyla, standart üretim ortamındaki sakkaroz yerine kullanılmıştır. Aktifleştirme amacıyla 10 ml lik tüplere inoküle edilen izolatlar daha sonra 40 ml lik erlene % 10 oranında inoküle edilmiş fermantasyon için hazırlanan 2 lt lik ortamlara, aseptik koşullar altında aşılanmıştır. Fermantasyon ortamı 2 lt olarak hazırlanmış ve %2 olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Fermantasyonlar 30°C, 150 rpm de 24 ve 48 saat süreyle yapılmıştır.

Öncelikle izolat 2 ile yapılan 2 fermantasyondan birincisinde %40 oranında % 4 şeker içeren melas çözeltisi standart besiyerinde sakkaroz yerine kullanılmış havalandırma oranı (aerasyon oranı) 24 saat sonunda % 100 den %50 ye yarı yarıya düşürülmüş fermantasyon 48. saat sonunda durdurulmuştur. İzolat 2 ile yapılan 2. fermantasyonda ise ilk 24 saatte %20 oranındaki melas oranı 24 saat sonunda % 40 seviyesine çıkarılmıştır (Çizelge 2.4)

Çizelge 2.4 Melas içeren ortamda PHB üretiminde fermantasyon koşulları.

	Aerasyon ilk 24 saat	Aerasyon 24 saat sonunda	Melas ilk 24 saat	Melas 48 saat sonunda	pH
İzolat 2	%100	% 50	% 40	% 40	7
İzolat 2	%100	% 50	% 20	% 40	7
İzolat 3	%100	% 50	% 40	% 40	7
İzolat 3	%100	% 50	% 20	% 40	7

Yine aynı şekilde öncelikle izolat 3 ile yapılan 2 fermantasyondan birincisinde %40 lik melas çözeltisi standart besiyerinde sakkaroz yerine kullanılmış havalandırma oranı (aerasyon oranı) 24 saat sonunda % 100 den %50 ye yarı yarıya düşürülmüş, 48 saat sonunda fermantasyon sonlandırılmıştır (Çizelge 2.4)

İzolat 3 le yapılan 2. fermantasyonda ise ilk 24 saatte %20 oranındaki melas oranı 24 saat sonunda % 40 seviyesine çıkarılmıştır.

2.2.6. PHB' de Standart Grafiğin Hazırlanması

2.2.6.1. Standart PHB' nin Ultraviyole Spektrumu ile Maksimum Absorbans Gösterdiği Dalga Boyunun Belirlenmesi

Bu amaçla Sigma chemical Co (USA)' dan temin edilen *Alcagines* sp den elde edilmiş saflaştırılmış ve toz haline getirilmiş standart PHB kullanılmıştır. Standart PHB nin moleküler ağırlığı 535.000 dir. Ortam şartlarından kapmış olabileceği nemi gidermek amacıyla toz halindeki PHB'nin liyofilizatör (Christ Alpha 1-4 Loc-1-M) içersinde 3.75 µg/ml'lik solüsyonu hazırlanmıştır [26].

Solüsyon ölçümler için 100 °C de 10 dk ısıtılmış böylece solüsyondaki PHB krotonik aside dönüştürülmüştür. Referans olarak sülfürik asit kullanılmıştır. Spektrometrede (SHIMADZU UV 2101 P.C) absorbans taraması yapılmış ve krotonik aside dönüşen standart PHB nin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu olan 201 nm değeri elde edilmiştir [26].

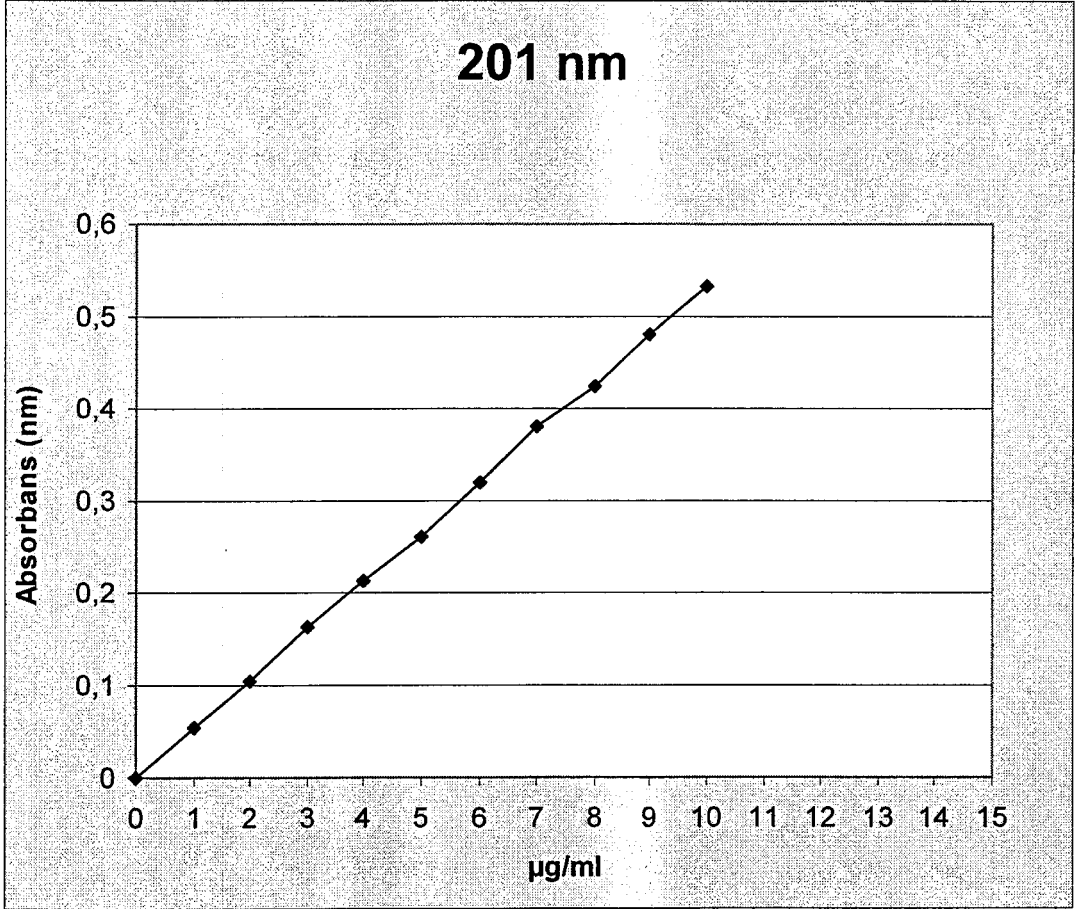
2.2.6.2. Ultraviyole Spektrumu ile Standart Grafiğin Elde Edilmesi

1. İyi temizlenmiş asitten geçirilmiş, % 96 lık etanolde kaynatılmış ve distile suyla yıkanmış temiz bir erlene 100 ml kloroform konulmuş ve üzerine de liyofilizatörde tamamen kurutulmuş 0.05 g standart PHB (Sigma) ilave edilmiştir. PHB' nin tamamen çözünmesi sağlanarak manyetik karıştırıcıda iyice karıştırılmıştır. Bu çözelti tekrar kloroformla 1/100 oranında seyreltilmiş böylece 5µg/ml PHB içeren kloroform çözeltisi elde edilmiştir.

2. Elde edilen çözeltiden ayrı ayrı her bir erlene sırasıyla 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 ml alınmıştır. Sonraki işlemde ise bu erlenlerdeki kloroform kaynayan su banyosunda (100 °C) tamamen buharlaşmıştır.

3. Sonraki basamakta erlenlerin her birine 10'ar ml sülfürik asit ilave edilmiş böylece sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 $\mu\text{g/ml}$ PHB içeren solüsyonlar elde edilmiştir. Sonra erlenler kaynayan su banyosunda 10 dk tutularak solüsyondaki PHB ler krotonik aside dönüştürülmüştür.

Şekil 2.1 5 $\mu\text{g/ml}$ PHB içeren çözeltinin 201 nm de absorbanısı



4. Son olarak ise maksimum absorbanın 201 nm olarak belirlendiği spektrometrede kuvartz küvetler ve sülfürik asit kullanılarak her bir erlendeki örneğin absorbanısı alınmış bu absorbanısa karşılık gelen PHB miktarına bağlı olarak standart bir grafik elde edilmiştir. Elde edilen grafik yardımıyla PHB miktarı ve KHA ya göre verimi hesaplanmıştır [26].

2.2.6.3. Analitik Ölçüm İçin PHB Metodu

Bu metod PHB içeren biyomasın PHB içeriğini saptamak için kullanılmıştır.

Bu amaçla inkübasyondan sonra öncelikle darası alınmış santrifüj tüplerinin içerisine erlendeki kültür aktarılmış ve 10.000 rpm de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra santrifüj tüpleri 37-40 °C de etüvde 24 saat süre ile kurutulmuştur. Daha sonra tüpler tartılarak 100 ml deki kuru hücre ağırlığı hesaplanmıştır. Sonra santrifüj tüplerine 5 ml distile su konulmuş karışım karıştırılmış ve küçük kahverengi şişelere (ultrasonikatör tüpleri) boşaltılmıştır. Ultrasonikatörde (Sonics and materials inc Vibra Cell) 1 dk muamele edilmiş olan tüplerden ince santrifüj tüplerine 2 ml örnek konulmuş üzerine 2ml 2 N HCl konulmuş, üzeri tıpayla kapatılmış ve beher içine konulmuştur [7].

Beher içine biraz su eklenmiş ve su banyosuna konulmuştur 95 °C de 2 saat su banyosunda bekletilmiş tıparları çıkartılıp 6000 g de 20 dk santrifüj edilerek (PHB granülleri çöktürülür) süpernatant (sıvı kısım) atılmış, geride kalan pellet (katı kısım) üzerine 5 ml kloroform konulmuş, sonra bu tüpler vortekslenmiş tüplerin ağzı lastik tıpayla kapatılmış bantla sarılmış, 30-35 °C de çalkalamalı etüvde 1 gece bekletilmiştir [7].

Tüpler tıparları çıkartılarak 6000 rpm de 30 dk santrifüj edildikten sonra pipetle santrifüj tüplerinin kenarına yapışanlarına dokunulmadan 0.1 ml alınmış etüvde 100 °C de kloroform uçuncaya kadar bekletilmiştir. Aynı bir tüpe sadece kloroform konarak uçurulmuştur. Kloroform tamamen uçuktan sonra her iki tüp üzerine 5 ml sülfürik asit ilave edilmiş, bu tüpler 100 °C de 10-20 dk bekletilmiş ve daha sonra 201 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur (kör olarak saf sülfürik asit) [7].

2.2.7. PHB Ekstraksiyonu

PHB ekstraksiyonu PHB'yi biyomastan kazanmak için çok sık olarak kullanılmaktadır, çeşitli tip biomastan direkt olarak ekstraksiyon metodudur,

ekstraksiyonda klorlu hidrokarbonlar, (kloroform ve 1,2-dichloroethane), azeotropik karışımlar (1,1,2-trichloroethane sulu;kloroform la methanolden etanol, aseton yada hekzan'dan herhangi biri) yada döngüsel karbonatlardır (etilen karbonat ve 1,2 propilen karbonat) kullanılmaktadır [7].

2.2.7.1. PHB' nin Kloroformla Ekstraksiyonu

İnkübasyon süresi sonunda kültürler 6000 devirde 20 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant ve pelet kısım birbirinden ayrılmış, pelet kısım alınmış, hücreler kurutulurken kuru hücre ağırlığı bulunmuştur. Sonraki işlemde Metanol kuru hücre üzerine (metanolün hacmi toplam hücrelerin 40 katı kadar olacak şekilde) eklenmiş Böylece ortamdaki lipitler uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. 95°C de 1 saat inkübe edilmiştir. Methanolü tamamen uzaklaştırmak için Vakum filtrasyonu yapılmış böylece metanol hücrelerden ayrılmıştır daha sonra hücreler kuru fırında birkaç dakika tutulmuştur.

Sonraki işlem için kuru hücrenin ağırlığı ölçülmüştür. Bu aşamada elde edilen hücrelerin üzerine kloroform eklenmiş (kloroform ağırlığı kuru hücre ağırlığının 50 katı olmalıdır) ve 95°C de 10 dk tutulduktan sonra çözelti oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve 1 gece boyunca çalkalamalı etüv de tutulmuştur. Sonraki aşamada hücre artıklarının uzaklaştırılması için çözelti filtre edilmiştir.

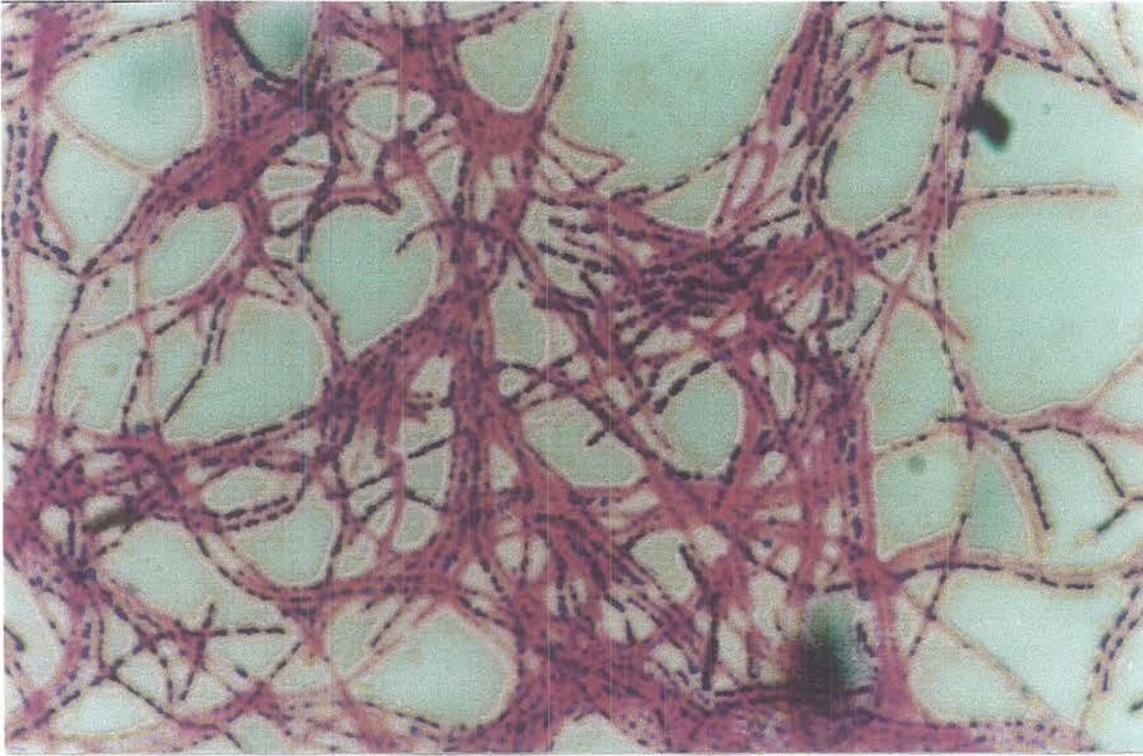
Çözelti filtre işleminden sonra PHB, metanol ve su karışımı eklenerek çökeltilmiş (7:3 oranı) (5 hacim kloroform). Çökeltilen PHB filtre edilmiş, asetonla yıkanmış ve kurutulmuştur [7].

3. BULGULAR

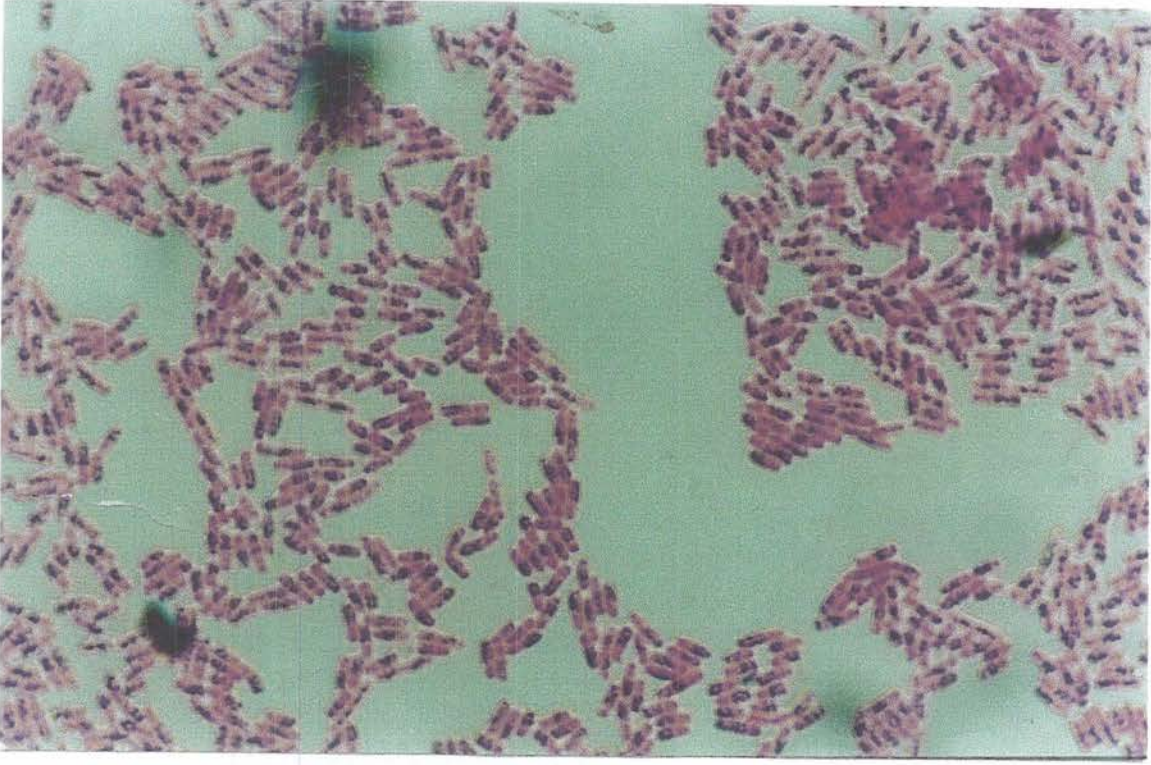
3.1. PHB Üreten Suşların Saptanması

Toprak örneklerinden izole edilen bakteriler Sudan black B boyası ile boyanmıştır. Sudan black B boyası kullanılarak 51 izolattan 4 tanesi PHB üretimi için seçilmiştir. Boyama sonucu pozitif sonuç veren bakteriler PHB üretimi için kullanılmışlardır. Bu bakteriler başta gram pozitif olmaları spor oluşturmaları ve basil bir yapıya sahip olmalarından dolayı *Bacillus* olarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.1 ve 3.4' de PHB içeren Sudan Siyahı B kullanılarak PHB içeriği saptanmış hücreler görünmektedir.

Şekil 3.1 Sudan Siyahı B kullanılarak PHB içeriği saptanmış hücreler (İzolat 3).



ŞEKİL 3.2 Sudan Siyahı B kullanılarak PHB içeriği saptanmış hücreler (izolat 4)



3.1.1. İzolatların Tanımlanması

3.1.1.1. Gram Boyama

PHB ürettiği saptanan 4 bakteri Gram pozitif basil olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1).

3.1.1.2. Hareketlilik Testi

Test bakterilerinden 3 ü hareketli iken bir tanesi hareketsiz olarak bulunmuştur.

3.1.1.3. Jelatin Hidrolizi

Test bakterilerinden 3 ü jelatini hidroliz ederken biri hidroliz edememiştir.

3.1.1.4. Karbonhidratların Fermantasyonu

Test bakterilerinin karbonhidratları fermente etmeleri farklı olmuştur. Test bakterilerinden üçü laktoz ve ksilozu fermente edemezken mannitol, arabinoz, selübioz, dekstroz, trehaloz, melibiozu fermente etmişlerdir. 4 numaralı izolat ise ksiloz hariç diğer şekerleri fermente edebilmiştir.

3.1.1.5. Metil Red (MR) Testi

MR-VP broth içeren tüplere bakteriler inoküle edilmiş, 30 °C de 24-48 saat inkübasyona bırakılmış bu süre sonundaki tüplere metil red solüsyonu damlatılmış, kırmızı renk oluşumu pozitif olarak kaydedilmiştir. 4 test bakterisi de metil red oluşturmuştur (Çizelge 3.1).

3.1.1.6. Nişasta Hidrolizi

Nişastalı agar'a taze bakteri kolonilerinden tek çizgi ekimi yapılarak 30 °C de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında besi ortamı üzerine iyodür çözeltisi damlatılmıştır. Kolonilerin çevresinde besi ortamının diğer bölgelerinde görülen koyu mavi rengin görülmemesi besi ortamındaki nişastanın bakteriler tarafından hidroliz edildiğini göstermektedir ve 4 bakteride nişastayı hidroliz edebilmiştir (Çizelge 3.1).

3.1.1.6. Tuzda Gelişme

Son konsantrasyonu % 2, 5, 7, 10 NaCl içerecek şekilde hazırlanan Nutrient Broth'lu tüplere bakteriler inoküle edilmiş 30 °C de 24-48 saat inkübasyondan sonra tüplerde üreme olup olmadığı belirlenmiş 4 bakteride %2 ve %5 NaCl konsantrasyonunda gelişme göstermişler, % 7 NaCl konsantrasyonunda

sadece izolat 2 gelişme göstermiş % 10 NaCl konsantrasyonunda ise sadece izolat 2 gelişme gösterebilmiştir.

3.1.1.8. Voges-Proskauer (VP) Testi

MR-VP Broth içeren tüplere, bakteriler inoküle edilmiş 30 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda temiz bir tüpe aktarılan 3 ml kültür üzerine 1.8 ml α -Naftol solüsyonu ve 0.6 ml % 40 lık KOH çözeltisi damlatılmış pembe renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiş, izolat 1 pozitif diğer bakteriler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1).

3.1.1.9. Egg Yolk Reaksiyon Testi

Egg yolk reaksiyon ortamı içeren tüplere bakteriler inoküle edilmiş kontrol tüpüne ise herhangi bir ekim yapılmamış, 30 °C de 1-3-5 ve 7 gün inkübasyondan sonra tüplerin içinde yada üst yüzeyinde beyaz parçacıklar görülmesi pozitif sonuç olarak kabul edilmiş, İzolat 4 hariç tüm bakteriler egg yolk lesitinaz aktivitesi göstermişlerdir (Çizelge 3.1).

3.1.1.10 Farklı Sıcaklıklarda Gelişme

Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerin üremelerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar (Çizelge 3.1) de kaydedilmiştir.

3.1.1.11. Farklı pH Derecelerinde Gelişme

MR-VP broth' ta farklı pH' larda inkübe edilen kültürlerin gelişmeleri incelenerek pozitif ve negatif sonuçlar (Çizelge 3.1) gösterilmiştir.

İzolatların tanımlanması için yapılan tüm testler Çizelge 3.1 de gösterilmiştir. Yapılan biyokimyasal testler sonucunda 3 nolu izolatımız

B.mycoides olarak isimlendirilmiştir. Diğer izolatlar ise tam olarak tanımlanamadığından *Bacillus* sp1, sp2 ve sp 4 olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 3.1 *Bacillus* strainleri identifikasyon test sonuçları.

Testler	<i>Bacillus</i> sp1	<i>Bacillus</i> sp2	<i>Bacillus mycoiodes</i>	<i>Bacillus</i> sp4
Gram boyama	+	+	+	+
Spor boyama	+	+	+	+
Hücre şekli	Basil	Basil	Basil	Basil
Hücre çapı >1µm	-	-	-	+
Hareketlilik	+	+	+	-
Katalaz	+	+	+	+
Voges praskeuer	+	-	-	-
Kasein hidrolizi	+	+	+	+
Jelatin hidrolizi	+	+	+	-
Nişasta hidrolizi	+	+	+	+
MR-VP Broth	+	+	+	+
5 °C de gelişme	-	-	-	-
10 °C de gelişme	+	+	-	+
30 °C de gelişme	+	+	+	+
40 °C de gelişme	+	+	-	+
50 °C de gelişme	-	+	-	+
55 °C de gelişme	-	+	-	+
65 °C de gelişme	-	-	-	-
Egg yolk lesitinaz	+	+	-	+
VP broth <6	+	-	+	-
VP broth >7	-	-	-	-
Nutrient broth ph 6.8	+	+	-	-
Nutrient broth ph 5.7	-	-	+	+
NaCl de gelişim %2	+	+	+	+
NaCl de gelişim %5	+	+	+	+
NaCl de gelişim %7	-	+	-	-
NaCl de gelişim %10	-	+	-	-
Esculin hidrolizi	+	+	+	+
Metilen blue reduksiyonu	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	+
Ksiloz	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+
Arabinoz	+	+	+	+
Selübioz	+	+	+	+
Dekstroz	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	+	+
Melibioz	+	+	+	+

3.2. Çalkalamalı Etüvde Elde edilen PHB Verimleri

Temel mineral ortamda test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.2’de verilmiştir

Çizelge 3.2. Çalkalamalı etüvde temel mineral ortam kullanılarak elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.

Mikroorganizma	Fermantasyon süresi (saat)	Kuru hücre ağırlığı KHA mg/100ml	pH1	pH2	OD	PHB mg/100 ml	% VERİM Kuru hücre ağırlığına göre
<i>Bacillus sp1</i>	18	100	7.0	6.1	0.265	5.08	5.08
	24	70	7.0	5.3	0.282	5.37	7.67
	48	110	7.0	5.0	0.828	15.58	14.16
	72	150	7.0	4.9	0.908	17.09	11.39
<i>Bacillus sp2</i>	18	25	7.0	6.0	0.959	18.05	72.2
	24	28	7.2	5.8	1.022	19.24	68.71
	48	30	7.0	5.3	0.971	18.28	60.93
	72	40	7.0	5.1	1.441	27.15	67.87
<i>B.mycooides</i>	18	30	7.0	6.5	0.987	18.58	61.93
	24	30	7.0	6.0	0.811	15.26	50.86
	48	30	7.0	5.8	0.886	16.67	55.56
	72	30	7.0	5.7	0.794	14.94	49.8
<i>Bacillus sp4</i>	18	320	7.0	6.4	1.136	21.39	6.68
	24	480	7.0	6.1	0.712	14.52	3.02
	48	110	7.0	6.0	0.356	6.62	6.01
	72	130	7.0	5.7	0.680	12.79	9.83

Temel mineral ortamda elde edilen PHB miktarları fermantasyon süresine ve izolatlara bağlı olarak değişiklik göstermiştir, bunlar arasında diğer izolatlara göre *Bacillus sp2* ile en yüksek miktar olan 27.15 mg/100ml PHB 72 saatte, en düşük miktar olan 5.08 mg/100ml PHB *Bacillus sp1* ile 18 saatte elde edilmiştir. Diğer izolatlara göre en yüksek kuru hücre ağırlığı 480 mg/100 ml ile *Bacillus sp4* te 24 saatte elde edilmiştir.

Verimler açısından kuru hücre ağırlığına göre en yüksek verim %72.2 ile *Bacillus sp2* de 18 saatte, en düşük verim ise %3.02 ile *Bacillus sp4* te 24 saatte elde edilmiştir.

Fermantasyon ortamına % 20 oranında melas ilave edildiğinde *Bacillus* strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.3'de verilmiştir

Çizelge 3.3. Çalkalamalı etüvde fermantasyon ortamına % 20 oranında melas ilave edildiğinde Test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.

Mikroorganizma	Fermantasyon süresi (saat)	Kuru hücre ağırlığı KHA mg/100ml	pH 1	pH 2	OD	PHB mg/100 ml	% VERİM Kuru hücre ağırlığına göre
<i>Bacillus sp1</i>	18	160	7.0	6.4	0.262	5.03	3.14
	24	440	7.0	6.1	1.354	25.50	5.79
	48	340	7.0	5.9	0.503	9.45	2.77
	72	540	7.0	5.7	0.844	15.88	2.94
<i>Bacillus sp2</i>	18	300	7.0	6.5	0.207	3.86	1.28
	24	480	7.0	6.3	0.140	2.61	0.54
	48	590	7.0	6.0	0.278	5.31	0.9
	72	670	7.0	6.0	0.232	4.40	0.65
<i>B.mycoides</i>	18	270	7.0	6.4	0.901	16.96	6.28
	24	350	7.0	6.1	0.873	16.43	4.69
	48	400	7.0	6.2	0.687	12.92	3.23
	72	480	7.0	6.0	1.054	19.84	4.13
<i>Bacillus sp4</i>	18	310	7.0	6.7	0.528	9.92	3.2
	24	430	7.0	6.5	0.176	3.24	0.75
	48	520	7.0	6.2	0.256	4.89	0.94
	72	620	7.0	5.8	0.109	2.08	0.33

Fermantasyon ortamına % 20 oranında melas ilave edildiğinde test bakterileri ile elde PHB miktarları 2.08-25.50 mg/100 ml arasında değişmiştir. Bu miktarlar izolatlara ve fermantasyon süresine göre değişiklik göstermiştir. *Bacillus sp1* ile en yüksek miktar olan 25.50 mg/100 ml PHB 24 saatte elde edilirken, *Bacillus sp4* ile en düşük miktar olan 2.08 mg/100 ml PHB 18 saatte elde edilmiştir. En yüksek kuru hücre ağırlığı 72 saat sonunda 670 mg /100 ml ile *Bacillus sp2*, en düşük kuru hücre ağırlığı ise 18 saat sonunda 160 mg/100 ml ile *Bacillus sp1* de saptanmıştır.

% 20 oranında melas içeren fermantasyon ortamında kuru hücre ağırlığına göre en yüksek verim *Bacillus mycoides* te % 6.28 ile 18 saatte, en düşük verim ise % 0.33 ile *Bacillus sp4* ile 72 saatte elde edilmiştir.

Fermentasyon ortamına % 40 oranında melas ilave edildiğinde Test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.4'de verilmiştir

Çizelge 3.4. Çalkalamalı etüvde fermentasyon ortamına % 40 oranında melas ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.

Mikroorganizma	Fermentasyon süresi (saat)	Kuru hücre ağırlığı KHA mg/100ml	pH 1	pH 2	OD	PHB mg/100 ml	% VERİM Kuru hücre ağırlığına göre
Bacillus sp1	18	420	7.0	6.2	0.413	7.79	1.85
	24	720	7.0	5.7	1.368	25.77	3.57
	48	750	7.0	5.3	0.796	14.98	1.99
	72	800	7.0	5.0	0.354	6.59	0.82
Bacillus sp2	18	350	7.0	6.3	0.893	16.81	4.8
	24	610	7.2	6.1	1.158	21.81	3.57
	48	710	7.0	5.9	1.390	26.18	0.37
	72	760	7.0	5.7	1.161	21.86	2.87
<i>B. mycooides</i>	18	320	7.0	6.5	1.179	22.20	6.93
	24	330	7.0	6.1	1.388	26.15	7.92
	48	530	7.0	6.1	0.896	16.86	3.18
	72	630	7.0	5.8	0.708	13.32	2.11
Bacillus sp4	18	410	7.0	6.6	0.700	13.16	3.20
	24	580	7.0	6.3	0.844	15.88	2.73
	48	730	7.0	6.0	0.418	7.90	1.08
	72	730	7.0	5.2	0.305	5.77	0.7

Fermentasyon ortamına % 40 oranında melas ilave edildiğinde test bakterileri ile elde PHB miktarları 5.77-26.18 mg/100 ml arasında değişmiştir. Bu miktarlar izolatlarla ve fermentasyon süresine göre değişiklik göstermiştir. Diğer suşlara göre *Bacillus sp2* ve *Bacillus mycooides*'in daha yüksek miktarlarda PHB biriktirdikleri gözlenmiştir. *Bacillus mycooides* ile 26.15 mg/100 ml PHB 24 saatte elde edilirken, *Bacillus sp2* ile 26.18 mg/100 ml PHB 48 saatte elde edilmiştir.

Diğer izolatlarla karşılaştırıldığında elde edilen en düşük PHB miktarı 5.77 mg/100 ml PHB ile 72 saat sonunda *Bacillus sp4* te saptanmıştır.

% 40 oranında melas içeren fermentasyon ortamında kuru hücre ağırlığına göre en yüksek verim %7.92 ile *Bacillus mycooides*' te elde edilmiştir.

Fermantasyon ortamına % 20 oranında şeftali pulbu ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.5’de verilmiştir

Çizelge 3.5. Çalkalamalı etüvde fermantasyon ortamına % 20 oranında şeftali pulbu ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.

Mikroorganizma	Fermantasyon süresi (saat)	Kuru hücre ağırlığı KHA mg/100ml	pH 1	pH 2	OD	PHB mg/100ml	% VERİM Kuru hücre ağırlığına göre
<i>Bacillus sp1</i>	18	850	7.0	6.3	0.863	16.24	1.91
	24	390	7.0	6.2	0.962	18.11	4.64
	48	540	7.0	6.2	0.625	11.75	2.17
	72	410	7.0	6.0	0.564	10.60	2.58
<i>Bacillus sp2</i>	18	860	7.0	6.4	1.338	25.20	2.93
	24	1250	7.0	6.2	0.663	12.47	0.99
	48	280	7.0	6.0	1.157	21.79	7.78
	72	300	7.0	5.3	1.117	21.03	7.01
<i>B.mycoides</i>	18	490	7.0	6.9	1.296	24.41	4.98
	24	710	7.0	6.5	1.516	28.56	4.02
	48	1270	7.0	6.0	1.275	24.00	1.88
	72	780	7.0	5.7	1.901	35.83	4.59
<i>Bacillus sp4</i>	18	1050	7.0	6.7	0.746	14.03	1.33
	24	780	7.0	6.6	2.442	46.09	5.90
	48	820	7.0	6.1	1.887	35.56	4.33
	72	740	7.0	5.8	1.354	25.50	3.44

Fermantasyon ortamına % 20 oranında şeftali pulbu ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları 10.60-46.09 mg/100 ml arasında değişmiştir. Bu miktarlar izolatlarla ve fermantasyon süresine göre değişiklik göstermiştir. Diğer izolatlarla göre *Bacillus sp4* ve *Bacillus mycoides*’in daha yüksek miktarlarda PHB biriktirdikleri gözlenmiştir. *Bacillus sp4* ile 46.09 mg/100 ml PHB 24 saatte elde edilirken, *Bacillus mycoides* ile 35.83 mg/100 ml PHB 72 saatte elde edilmiştir.

Diğer izolatlarla karşılaştırıldığında elde edilen en düşük PHB miktarı 10.60 mg/100 ml PHB ile 72 saat sonunda *Bacillus sp1* de saptanmıştır. Bu ortamda en yüksek verim ise % 7.78 le *Bacillus sp2* nin 48 saat lik kültürüyle

elde edilmiştir. En düşük verim ise olan % 0.99 ile *Bacillus* sp2 in 24 saatlik kültürüyle elde edilmiştir.

Fermentasyon ortamına % 8 oranında peyniraltı suyu ilave edildiğinde *Bacillus* strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.6'de verilmiştir

Çizelge 3.6. Çalkalamalı etüvde fermentasyon ortamına % 8 oranında peyniraltı suyu ilave edildiğinde *Bacillus* strainleri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.

Mikroorganizma	Fermentasyon süresi (saat)	Kuru hücre ağırlığı KHA mg/100ml	pH 1	pH 2	OD	PHB mg/100 ml	% VERİM Kuru hücre ağırlığına göre
<i>Bacillus</i> sp1	18	110	7.0	6.3	0.111	2.11	3.66
	24	120	7.0	6.2	0.195	3.62	3.01
	48	140	7.0	6.2	0.213	3.98	2.84
	72	140	7.0	6.0	0.133	2.49	1.77
<i>Bacillus</i> sp2	18	130	7.0	6.4	0.410	7.72	5.93
	24	150	7.0	6.2	0.529	9.94	6.62
	48	160	7.0	6.0	0.351	6.54	4.08
	72	200	7.0	5.3	0.301	5.70	2.85
<i>B. mycooides</i>	18	100	7.0	6.9	0.306	5.79	5.79
	24	130	7.0	6.5	0.562	10.56	8.12
	48	150	7.0	6.0	0.387	7.18	4.78
	72	170	7.0	5.7	0.206	3.84	2.25
<i>Bacillus</i> sp4	18	150	7.0	6.7	0.610	11.47	7.64
	24	170	7.0	6.6	0.512	9.62	5.65
	48	180	7.0	6.1	0.408	7.67	4.26
	72	190	7.0	5.8	0.303	5.74	3.02

Fermentasyon ortamına % 8 oranında peyniraltı suyu ilave edildiğinde *Bacillus* strainleri ile elde PHB miktarları 2.11-11.47 mg/100 ml arasında değişmiştir. Bu miktarlar izolatlar ve fermentasyon süresine göre değişiklik göstermiştir. *Bacillus* sp4 ve *Bacillus mycooides*'in Diğer suşlara oranla şeftali pulbunda olduğu gibi daha yüksek miktarlarda PHB biriktirdikleri gözlenmiştir. *Bacillus* sp4 suşu ile 11.47 mg/100 ml PHB 18 saatte elde edilirken, *Bacillus mycooides* ile 10.56 mg/100 ml PHB 24 saatte elde edilmiştir.

Diğer izolatlarla karşılaştırıldığında elde edilen en düşük PHB miktarı 2.11 mg/100 ml PHB ile 24 saat sonunda *Bacillus* sp1 de saptanmıştır. Bu ortamda en

yüksek verim ise % 8.12 le *Bacillus mycoides* in 24 saat lik kültürüyle en düşük verim ise % 1.77 *Bacillus sp1* in 72 saatlik kültürüyle elde edilmiştir.

Fermentasyon ortamına % 16 oranında peyniraltı suyu ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 3.7'de verilmiştir

Çizelge 3.7. Çalkalamalı etüvde fermentasyon ortamına % 16 oranında peyniraltı suyu ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları ve yüzde verimleri.

Mikroorga nizma	Fermentasyon süresi (saat)	Kuru hücre ağırlığı KHA mg/100ml	pH 1	pH 2	OD	PHB mg/100 ml	% VERİM Kuru hücre ağırlığına göre
<i>Bacillus sp1</i>	18	340	7.0	6.3	0.21	3.92	1.15
	24	380	7.0	6.2	0.320	6.03	1.58
	48	410	7.0	6.2	0.2	3.72	0.90
	72	420	7.0	6.0	0.195	3.62	0.86
<i>Bacillus sp2</i>	18	280	7.0	6.4	0.603	11.33	4.04
	24	320	7.0	6.2	0.684	12.86	4.01
	48	330	7.0	6.0	0.313	5.91	1.79
	72	340	7.0	5.3	0.290	5.51	0.01
<i>B.mycoides</i>	18	320	7.0	6.9	0.312	5.89	1.84
	24	360	7.0	6.5	0.413	7.79	2.16
	48	360	7.0	6.0	0.209	3.9	0.01
	72	370	7.0	5.7	0.123	2.32	0.62
<i>Bacillus sp4</i>	18	400	7.0	6.7	0.282	5.37	1.34
	24	420	7.0	6.6	0.408	7.67	1.82
	48	430	7.0	6.1	0.590	11.08	2.57
	72	450	7.0	5.8	0.351	6.54	1.45

Fermentasyon ortamına % 16 oranında peyniraltı suyu ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları 2.32-12.86 mg/100 ml arasında değişmiştir. Bu miktarlar izolatlar ve fermentasyon süresine göre değişiklik göstermiştir. *Bacillus sp2* ve *Bacillus sp4* ün diğer izolatlar oranla daha yüksek miktarlarda PHB biriktirdikleri gözlenmiştir. ile *Bacillus sp2* ile 12.86 mg/100 ml PHB 24 saatte elde edilirken, *Bacillus sp4* ile 11.08 mg/100 ml PHB 48 saatte elde edilmiştir.

Diğer izolatlarla karşılaştırıldığında elde edilen en düşük PHB miktarı 2.32 mg/100 ml PHB ile 72 saat sonunda *Bacillus mycoides* de saptanmıştır. Bu ortamda en yüksek verim ise % 4.04 le *Bacillus sp2* nin in 18 saat lik kültürüyle

en düşük verim ise % 0.01 ile *Bacillus mycoides* 48 saatlik ve *Bacillus sp2* in 72 saatlik kültürüyle elde edilmiştir.

3.3. Fermentörde Elde Edilen PHB Verimleri

Erlen kültürlerinde melas kullanılarak elde edilen en yüksek PHB verimi saptanan *Bacillus mycoides* ve *Bacillus sp2* strainlerinin 48 saatlik inkübasyonları göz önüne alınarak fermentasyon işlemleri fermentörde yapılmıştır. Çalışmalar çift paralel olarak uygulanmıştır.

Fermentasyon uygulamalarında ilk aşamada melas miktarı 48 saat boyunca sabit kalırken diğer uygulamada melas oranı ilk 24 saatte %20 iken 24 saat sonunda % 40 a çıkarılmıştır. Böylece şeker içeriği % 2 den % 4 e çıkarılmıştır. melas ilave edildiğinde fermentasyon ortamında geliştirilen *Bacillus sp2* ve *Bacillus mycoides* izolatlarından elde edilen PHB miktarları ve verimleri çizelge 3.8 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8 Melas içeren fermentasyon ortamında *Bacillus sp2*, *Bacillus mycoides* PHB verimleri ve miktarları

m.o	Fermentasyon süresi (saat)	KHA gr/2 lt	Melas içeriği %	pH1	pH2		PHB mg/100 ml	Elde edilen PHB (gr)
<i>Bacillus sp2</i>	48	4.54	40	7	5.9	0.123	2.32	-
<i>Bacillus sp2</i>	48	5.04	20	7	6.1	0.17	3.12	0.05
<i>Bacillus mycoides</i>	48	9.12	40	7	5.8	0.160	1.92	-
<i>Bacillus mycoides</i>	48	2.3	20	7	5.6	0.145	2.69	

Fermentasyon ortamında elde edilen miktarlar melas içeriğine göre çeşitlilik göstermiştir. % 40 oranında melas içeren ortamda elde edilen PHB miktarları 1.92-3.12 mg/100 ml arasında değişmiştir. En yüksek PHB miktarı 48 saatlik fermentasyon sonunda 3.12 mg/100 ml ile *Bacillus sp2* den elde

edilmiştir. Aynı zamanda ekstraksiyon sonucunda 0.05 gr PHB elde edilmiştir. Kuru hücre ağırlığına göre en yüksek verim ise yine 48 saatlik fermantasyon sonucunda *Bacillus* sp2 ile elde edilmiştir.

Temel mineral ortam içeren fermantasyon ortamında geliştirilen *Bacillus* sp2 , ve *Bacillus mycoides* suşlarının PHB verimleri çizelge 3.9 de gösterilmiştir. Çalışmalar çift paralel olarak uygulanmıştır.

Çizelge 3.9 Temel mineral ortam içeren fermantasyon ortamında geliştirilen *Bacillus* sp2 ve *Bacillus mycoides* PHB verimleri ve miktarları

m.o	Fermantasyon süresi (saat)	KHA gr/2 lt	pH1	pH2	OD	PHB mg/100 ml	Elde edilen PHB (gr)
<i>Bacillus</i> sp2	24	4.44	7	6.2	0.356	6.62	
<i>Bacillus</i> sp2	24	5.04	7	5.4	0.059	1.11	
<i>Bacillus mycoides</i>	24	1.26	7	5.9	1.259	23.71	-
<i>Bacillus mycoides</i>	24	4.78	7	5.7	0.250	4.78	0.02

Temel mineral ortamda elde edilen PHB miktarları 1.11-23.71 mg/100 ml arasında değişmiştir. *Bacillus mycoides* ve *Bacillus* sp2'de KH_2PO_4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ miktarları yarı yarıya düşürülerek limitasyon uygulanmıştır. En yüksek PHB miktarı 23.71 mg/100 ml ile *Bacillus mycoides* te saptanmıştır.

Aynı zamanda temel mineral ortamda ekstraksiyon metodu ile sadece *Bacillus mycoides* ten PHB elde edilmiştir. *Bacillus* sp2' de en yüksek kuru hücre ağırlığına ulaşılmasına rağmen ekstraksiyonla PHB üretiminde olumlu sonuç alınamamıştır. *Bacillus* sp2 de *Bacillus mycoides* gibi limitasyon uygulanmasına rağmen ekstraksiyon sonucu PHB elde edilememiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

PHA' ların kullanım alanları oldukça geniştir. Bu bakteriyal materyallerin doğasında varolan biyoyuumluluk özelliği çeşitli tıbbi uygulamalar için yararlar sağlayabilir. Örneğin kontrollü ilaç salınımı, cerrahi dikişler, kemik kaplamalar, yara tedavileri ayrıca kişisel hijyen ürünleri ve paketleme uygulamaları bunlar arasında sayılabilir [11].

Son 5 yıl içinde Biyopolimerlerin PHA ailesinin biyosentezi, fermentasyonu ve saflaştırılması ile ilgili çalışmaların sayısı oldukça artmıştır. Gelecekte bu polimerlerin plastik ürünlerle rekabetinin kaçınılmaz olduğu bir gerçektir [11].

Çalışmamızda topraktan izole ettiğimiz 51 bakteriden 4 ünün sudan siyahı B kullanılarak PHB üretimi için uygun olduğu saptanmıştır. Bu bakterilerden 1'i *Bacillus mycoides* olarak isimlendirilmiştir. Diğer suşlar ise tam olarak tanımlanamamıştır, Bergey's Manual of Determination'(30) da verilen kriterlerden sapmalar göstermişlerdir. Bunların tam olarak tanımlanabilmesi için ilave testlerin yapılması gerekmektedir. Bu izolatlar *Bacillus sp1*, *Bacillus sp2* ve *Bacillus sp4* olarak isimlendirilmiştir. Literatürde PHA ürettiği bilinen 250 den fazla farklı mikroorganizma bulunduğu bildirilmiştir; *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, Metilotroflar, *Pseudomonas oleovorans* ve rekombinant *Escherichia coli'* nin yüksek konsantrasyonda ve verimlilikte PHA üretimi için uygun olduğu saptanmıştır [7,31].

Gram pozitif bakterilerden ise *Bacillus megaterium* üzerinde çalışmalar yapılmıştır. *Bacillus megaterium* un 4-8 karbon atomlu monomerlerinin bulunduğu PHA' ların kompleks bir karışımını sentezlediği bildirilmiştir. Lafferty ve ark (1998) PHB'yi *Bacillus megaterium* ve *Azotobacter chroocum'* dan izole etmişlerdir [13,16].

Aeromonas hydrophila' da PHB üretimi amacıyla kullanılmıştır Yine Rhizobium ve streptomycetes türlerinin de PHB üretim yetenekleri araştırılmıştır [33,35-36].

Topraktaki bir çok bakteri PHB üretme yeteneğine sahiptir. Ancak endüstriyel çapta PHB üretiminde çoğunlukla *Alcagines eutrophus*, *Alcagines*

latus, *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas* türleri tercih edilmektedir. Örneğin ICI (Imperial Chemical Industry-İngiltere) *Alcagines eutrophus* 'tan % 75 verimle endüstriyel çapta PHB üretmektedir [16-26].

Çalışmamızda topraktan izole ettiğimiz test bakterilerinin öncelikle erlen kültürlerinde % 2 sakkaroz içeren temel mineral ortamda, %2-%4 şeker içeriğine sahip, %20-40 melas içeren fermantasyon ortamında, %2 şeker içeriğine sahip % 20 lik şeftali pulbu ve %2-%4 şeker içeriğine sahip % 8-%16 lık peynir altı suyu içeren fermantasyon ortamlarında verimleri incelenmiştir. Gerek temel mineral besi ortamında ve gerekse diğer substratlardan elde edilen PHB miktarları bakterilere ve zamana göre değişiklik göstermiştir (çizelge 3.2-3.7).

En yüksek PHB verimi karbon kaynağı olarak sakkaroz kullanıldığında temel mineral ortamda elde edilmiştir. Temel mineral ortamda kuru hücre ağırlığına göre en yüksek verim %72.2 ile *Bacillus sp2* nin 18 saatlik kültürüyle elde edilmiştir.

Temel mineral ortamda yüksek verim elde edilmesinin nedeni ortamdaki karbon kaynağının mikroorganizmalar tarafından tercih edilmesi olabilir. PHB miktarları açısından en yüksek PHB miktarı şeftali pulbu içeren fermantasyon ortamından elde edilmiştir ancak temel mineral ortamdaki kadar yüksek verim alınamamıştır.

Benzer olarak yapılan çalışmalarda araştırmacılar mikroorganizmaya ve karbon kaynağına bağlı olarak farklı PHB miktarları bildirmişlerdir. Hiramitsu ve ark. (1993) karbon kaynağı olarak sukroz kullandığında *A.latus* ile kuru hücredeki PHB miktarının % 58 olduğunu bildirmişlerdir [36].

Grothe ve ark (1999) ise kültür şartlarının optimizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışma da en iyi kültür şartları altında %2 sukrozlu temel mineral ortamlı erlen kültürlerinde *Alcaligenes latus* tan %63 oranında PHB verimi elde etmişlerdir [37].

Yapılan diğer bir çalışmada ise *Rhizobium* bakterisi ile mannitol içeren bir ortamda %27.8 oranında PHB verimi elde ederken aynı suş için glukoz içeren ortamda %13.5 oranında PHB elde edilmiştir [36].

Mikroorganizmalardan PHB üretiminde kullanılacak olan karbon kaynağı ve konsantrasyonu, kullanılan organizmanın türüne göre değişmektedir. Bakteriler ile PHB üretiminde karbon kaynağının bileşimi büyük önem taşımaktadır.

Laboratuvar çalışmalarında ve endüstriyel PHB üretiminde en çok kullanılan karbon kaynağı glukozdur. Ancak, günümüzde geniş çapta ticari biyoplastik uygulamaları ekonomik kısıtlamalar dolayısıyla sınırlıdır. Petrol kökenli polietilen ve polipropilen polimerleri değeri 50 sent iken PHB maliyeti günümüzde 8-9 paund (£) dır [11].

Bilindiği gibi endüstride hammadde maliyetinin düşük olması oldukça önemlidir. Zeneca (Imperial Chemical Industry İngiltere) endüstriyel çapta PHB üretimi için 1 ton polimer için yaklaşık 3.6 ton glukoz kullanmaktadır. 1 ton glukoz 550 dolar (US) olduğundan 1 ton polimer üretmek için yalnız glukoz için 1980 dolar (US) harcanmaktadır. Glikoz yerine pancar melası kullanılmış olsaydı (1 ton polimer üretmek için 8 ton melas gerekir) 1 ton melas 82 dolar (\$) olduğuna göre 1 ton polimer üretmek için 656 dolar (\$) harcanacağı ve böylece hammadde maliyetinin 1/3 oranında azalacağı bildirilmiştir [26].

Bu nedenle çalışmamızda zirai artık ürünlerden melas, peyniraltı suyu, ve şeftali pulbu kullanılarak PHB üretimi sağlanmaya çalışılmıştır.

Karbon kaynağı olarak ortama ilave edilen melas miktarı arttırıldığı zaman *Bacillus* sp2 de biriken PHB miktarı düşerken diğer test bakterilerinde artış olmuştur. Karbon kaynağı olarak peyniraltı suyunun kullanıldığı fermantasyonlarda ise peyniraltı suyu miktarının artışı PHB veriminin düşmesine neden olmuştur. Zirai artıklar arasında şeftali pulpunun kullanıldığı çalışmalarda en yüksek verim elde edilmiştir (Çizelge 3.3-3.7).

Test bakterilerinden *Bacillus* sp2 ve *B.mycoides* %2 sakkaroz içeren ortamda yüksek oranlarda PHB biriktirmişlerdir (çizelge 3.2). Ancak zirai ürün atıklarının kullanılması durumunda test bakterilerinde aynı oranda PHB birikimi saptanamamıştır Çalışmamızda zirai ürünlerde test bakterileri gayet iyi gelişmiştir. Hücrede PHB birikimi ise beklenenin çok altında olmuştur. Ortamdaki melas miktarının arttırılması da PHB birikimini fazla miktarda etkilememiştir. Ancak ortama ilave edilen peyniraltı suyu iki katına çıkarıldığında kuru hücredeki PHB miktarında önemli ölçüde düşüşler görülmüştür. Melas, peyniraltı suyu ve

şeftali pulpunun kullanıldığı çalışmalarda beklediğimiz PHB miktarlarının altında PHB birikimi gözlenmiştir.

Araştırmacılar rekombinant *E.coli*'nin sukroz, laktoz ve ksiloz gibi karbon kaynaklarını kullanabildiğini, ucuz zirai ürünlerden (melas, peyniraltı suyu, hemiselüloz hidrolizati) PHB birikimini yaptığını bildirmişlerdir [38].

Young ve arkadaşları (1994) karbon kaynağı olarak nişasta kullanılarak *Azotobacter chroococcum* ve *Haloferax mediterranei* de PHB birikimi sağlandığı bildirilmiştir . Ancak *H. Mediterranei* ile PHB üretiminde en önemli faktörün nişastalı ortama ilave edilecek tuzlar olduğu ve bunları da maliyeti artırdığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. *Methylobacterium* sp. ZP24 ve *Pseudomonas cepacia* kullanılarak peynir altı suyunda PHB üretildiği bildirilmiştir.

Araştırmacılar çalışmalarında üretilen PHB miktarının çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer olarak çok düşük miktarda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kim ve Champ (2000) ise *A.chroococcum* ve rekombinant *E.coli* ile nişasta ve peynir altı suyunda yüksek konsantrasyonda PHB elde ettiğini bildirmiştir. Araştırmacılar rekombinant *E.coli* ile peynir altı suyunda oksijen sınırlaması ile %80 oranında PHB elde etmiştir. Oksijen sınırlaması yapılmadığında ise verim % 57 olmuştur [39].

Azotobacter vinelandii UWD ile nişastada 22g/l PHB elde edilmiştir (31).

Mana ve ark (1999) % 2 den daha yüksek glukoz konsantrasyonlarında *Streptomyces*'te PHB miktarında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, besiyerindeki yüksek glukoz konsantrasyonunun ortamın osmotik konsantrasyonunda artışa neden olduğunu ve metabolik aktivitesinin düşmesiyle ilgili olduğunu bildirmişlerdir [4].

Kullanılan test bakterilerindeki PHB birikimi 18-24 saat arasında maksimum seviyeye ulaşmıştır. PHB birikimi hücrenin eksponansiyel büyüme döneminde olmuştur. Bunu takip eden devrede PHB miktarında azalma meydana gelmiştir. Bu muhtemelen hücredeki PHB'nin kullanılması yada PHB'nin depolimerizasyonu nedeniyledir. PHA sentezinde zaman çok önemlidir. Çok erken veya çok geç hasat PHA birikimi üzerine etki yaparak arzu edilen sonucun alınmasını engellemektedir. Ortamdaki karbon kaynağı tüketildikten sonra intrasellüler depolimeraz ile biriken PHA tüketildiği diğer araştırmacılar

tarafından da rapor edilmiştir [41].

Mercan ve ark, *Rhizobium sp.*2426 suşu ile yüksek PHB üretiminin 48 saatte elde edildiğini bu saatten sonra PHB üretiminde düşüş olduğunu bildirmişlerdir [33].

Çalışmamızda fermantasyon ortamında besin maddelerinin limitasyonun PHB üretiminde etkisi farklı olmuştur. Ancak kesin bir sonuca varmak için ilave deneylerin yapılması gerekmektedir. *Bacillus sp* ile ilgili olarak PHB üretiminde besin sınırlandırılması ile ilgili bir literatüre rastlanmamıştır.

Temel mineral ortam içeren fermantasyon ortamında nitrojen ve fosforun sınırlandırılması ile *Bacillus mycooides* ile PHB miktarı 23.71mg/100 ml olmuştur. *Bacillus sp2* de ise nitrojen ve fosfor sınırlanması ile PHB miktarında düşüş olmuştur. Wang ve ark. ise *Alcaligenes latus* u kullanarak fermentörle PHB üretimi üzerine yaptıkları çalışmada azot sınırlaması olan ortamda 5,13gr/l oranında PHB elde etmişlerdir [42].

Chang ve ark. *A.hydrophila* ile sınırlanmış fosfor ile ortama laurik asit ilavesi ile PHA miktarında artış olduğunu bildirmiştir. Ancak araştırmacılar azot sınırlandırılmasının beklenen bir etki göstermediğini bildirmişlerdir. Çeşitli araştırmacılar PHA birikimi ve hücre büyümesi için besin sınırlandırılma uygulaması için optimal noktayı bulmanın önemli olduğunu bildirmişlerdir [43].

Çalışmamızda besin sınırlandırılmasının erken olması sebebiyle PHA üretimi düşük olmuş olabilir. Benzer olarak Chen ve ark (2001) çalışmalarında düşük miktardaki karbon kaynağının ve erken nitrojen fosfor sınırlandırılmasının PHA üretimini etkilediğini bildirmişlerdir [44].

Lee (1996), PHB üretiminde kullanılan bakterileri 2 gruba ayırmıştır. PHB sentezinde ihtiyaç duydukları kültür şartları bakımından *Alcagines eutrophus*, methyloptroplar ve pseudomonaslar PHA'nın biyosentezi için bol karbon kaynağının mevcudiyetinde esas olan besin elementlerinin sınırlandırılmasına ihtiyaç duydukları belirtilmiştir [45,46,47]. Buna karşılık *Alcagines latus*, *Azotobacter vinelandii* ve *E.coli* gibi bakterilerin PHA sentezi için besin maddelerinde sınırlandırmaya ihtiyaç duymadıkları bildirilmiştir [18,40].

Fermentörde, PHB üretimi amacıyla fermantasyon ortamına % 40 oranında melas ilave edildiğinde test bakterileri ile elde edilen PHB miktarları

1.92-3.12 mg/100 ml arasında değişmiştir. En yüksek PHB miktarı 48 saatlik fermantasyon sonunda *Bacillus sp 2* ile elde edilmiştir. Bu miktara ulaşılmasının sebebi karbon kaynağı olan melasın %20 seviyesinde iken % 40 seviyesine çıkarılmasıdır. Burada amaç C/N oranını arttırmaktır ve bu amaç doğrultusunda C/N oranı arttıkça, azalan azot, dengesiz büyüme koşullarını arttıracığı için PHB birikimini arttırmış olabilir.

Kuru hücre ağırlığına göre temel mineral ortamdaki en yüksek verim ise yine 48 saatlik fermantasyon sonunda *Bacillus sp 2* ile elde edilmiştir. % 40 oranında melas içeren fermantasyon ortamında ise sadece *Bacillus sp 2* den kloroform ekstraksiyonu sonucunda 0.05 gr PHB elde edilmiştir. Bu değer bizim beklentimizin altında olmuştur. Bunun nedeni kullanılan ekstraksiyon yöntemi olabilir. Biyomastan PHB granüllerini ekstre etmek için patentli saflaştırma işlemlerinde polimerin çözündüğü klorlu hidrokarbonlar (kloroform 1,2, dikloroetan) azeotropik karışımlar (sulu 1,1,1,2-trikloroetan, metanol, etanol aseton) veya siklik karbonlar (sıcak 120°C-150°C etilen) gibi çözümler kullanılmaktadır [26].

Bu çalışmada ekstraksiyon işlemlerinde kloroformdan kullanılmıştır. Öncelikle inkübasyon süresi sonunda fermantasyondan elde ettiğimiz biyomas santrifüj işleminden sonra kurutulmuş ve sonra metanol eklenerak lipitler uzaklaştırılmıştır. Vakum filtrasyonu sonucunda ise hücrelerin üzerine kloroform eklenmiş filtre işleminden sonra ise metanol su, kloroform karışımıyla muamele sonunda hücreler asetonla yıkanmış ve kurutulmuştur. Verim düşüklüğünün nedeni kullandığımız yöntem nedeniyle olabilir.

Bu konuda bir çok yöntem denenmektedir. Kim ve arkadaşları fruktoz şurubunu karbon kaynağı olarak kullanarak *A. eutrophus* ile fed-batch kültürüyle PHB üretimini gerçekleştirmişlerdir. Kültür otoklavlandıktan sonra hücre çeperlerinde biriktirilen PHB granülleri deterjan/hipoklorit muamelesiyle izole edilmiş sonraki işlemlerde mikroküreler şeklinde PHB elde etme amacıyla spreyle kurutulmuşlardır. Elde edilen mikrokürelerin boyutu 0.6-1.1 µm aralığında ve ortalama molekül ağırlığı ise 50 000 olarak saptamışlardır [25].

Chen ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada *A.eutrophus'tan* PHB eldesi için yeni bir temizleme teknolojisi bildirmişlerdir. Bu teknoloji PHB nin eldesi

için surfektan ve şelatların küçük miktarlarda eklenmesiyle geri dönüşümlü atık suların sürekli olarak kullanılmasını içermektedir. Son atık suyun HCl ve aktive edilmiş karbonla muamelesi elde edilen PHB nin saflığı % 96 dan daha düşük seviyeye ininceye kadar sürdürülmekte ve bu seviye düştüğünde yeniden surfektan ve şelat ilavesiyle yeni bir PHB eldesinin başlatılması sağlanmıştır [44].

Diğer bir çalışmada Ishizaki ve arkadaşları P(3HB) fermantasyonu için H₂, O₂ ve CO₂ nin karışımını substrat olarak kullanmışlar ve bunun için hidrojen oksidasyonu yapabilen *A.eutrophus* tan yararlanmışlardır. Bu gaz karışımının verimli bir şekilde substrat olarak kullanılması için P(3HB)' nin CO₂ kullanılarak üretimi için dönüşümlü kapalı devre bir kültür sistemi tercih etmişlerdir.. Ayrıca O₂ konsatrasyonu gaz karışımının herhangi bir patlamaya imkan vermemesi için hacim olarak % 6.9 seviyesinde yani iz miktarda tutulmuştur. Bununla birlikte CO₂ den P(3HB) üretiminde kemostat kültürde hücredeki P(3HB) içeriği ve produktivitesi fed-batch kültürüne nazaran oldukça düşük gerçekleşmiştir [48].

Test bakterilerinin ucuz karbon kaynaklarında PHB birikimi düşük olmuştur. En iyi kullanabildikleri karbon kaynağının sakkaroz olduğu ve karbon kaynakları (atık maddeler) içinde de şeftali pulbunda PHB birikimi olduğu görülmüştür. Diğer yabancı suşlarla ve genetik olarak düzenlenmiş suşlarla ucuz karbon kaynaklarında yüksek PHB birikimi yapabilen mikroorganizmaların ortaya konması hem PHB üretiminde maliyetin düşmesine hem de gıda sektörü atıklarının ortadan kaldırılmasında büyük öneme sahip olacaktır.

Bizimde çalışmalarımızda pancar melası, peyniraltısuyu ve şeftali pulbu gibi gıda sanayi artıklarını kullanmamızın sebebi öncelikle maliyetinin düşük olması, bol miktarda bulunabilmesi, içinde organizmaların gelişmesi için gerekli olan çok çeşitli besin maddeleri bulundurması son olarak da yüksek oranda fermente edilebilir şeker (sakkaroz) içermesidir. Pancar melası ülkemizde şeker fabrikalarından rahatlıkla temin edilebilir. Pancar melası çalışmamızda temel besi ortamımız olan temel mineral ortamda sakkaroz yerine kullanılmıştır. Ayrıca yine maliyeti düşük olan peyniraltı suyu ve şeftali pulbu da fermentörde fermentasyon öncesi çalışmalarımızda kullanılmıştır.

Melas haricinde ülkemizde ilk defa bizim çalışmamızda gıda sanayi artıkları olarak nitelenen şeftali pulbu ve peyniraltı suyunun substrat olarak kullanıldığı temel mineral ortamlı erlen kültürlerinde PHB verimi incelenmiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda farklı mikroorganizmaların melası substrat olarak kullandığı fermantasyon ortamlarındaki PHB üretim verimleri araştırılmalıdır. Melas ortamında PHB üretimi prosesi için hem standart kültürler hem de çeşitli çevresel örneklerden elde edilen izolatların geniş bir spektrumda analizi, son zamanlarda büyük önem kazanan sanayi atıklarının değerlendirilmesi açısından son derece faydalı bilgilerin kazanılmasına neden olacaktır. PHB üretiminde yer alan ve yüksek verim sağlayan mikroorganizmaların moleküler karakterizasyonlarının yapılması daha sonraki çalışmalarda gerçekleştirilebilecek rekombinant DNA teknolojisinin kullanımıyla farklı substratlardan da yüksek verim alınmasını sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. ZINN..M., WITHOLT, B. ve EGLI,T., *Occurence, Synthesis and Medical Application of Bacterial Polyhydroxyalkanoate*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **53**: 5-21., (2001).
2. REN X., *Biodegradable plastics : A Solution or a Challenge*, *Journal of Cleaner Production* (2002).
3. HUANG, J.C., SHETTY, A.S. ve WANG, M.S., *Biodegradable Plastics: A Review*, *Advances in Polymer Technology*, **10** (1) : 23-30, (1990).
4. MANNA, A., BANERJEE, R. PAUL, A.K., *Accumulation of Poly (3-Hydroxybutyric Acid) by Some Soil Streptomyces*. *Current Microbiology* **39**: 153-158., (1999).
5. PAGE, W.J.ve MANCHAK, J., *The Role of β -oxidation of Short-Chain Alkanoates in Polyhydroxyalkanoate Copolymer Synthesis in Azotobacter vinelandii UWD* *Applied Microbiol Biotechnol*, **58**:231-236, (1992).
6. LEE, S.Y ve CHOI, JONG I.L., *Process Analysis and Economic Evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) Production*, *Fermentation Bioprocesss Engineering* **17**: 335-342. (1997).
7. LEE, S.Y ve CHOI, J.I, *Polyhydroxyalkanoates Biodegradable Polymer*, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Chapter 51:616-627,(1999).
8. RİBERA, R.G., SANCHEZ M.M. ve CORMENZANA, A.R., *Production of Polyhidroxyalkanoates by Pseudomonas putida KT2442 Harboring pSK2665 in Wastewater from Olive Oil Mills (alpechín)* *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, **4** (2):15-24, (2001).

9. USTIAN, T., *Bacterial plastics* Wisc.edu Biojournals **21**:1-4. (2002).
10. CHOI, J. ve LEE S.Y., *Economic Consideration in the Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Bacterial Fermentation*, *Applied Microbial Biotechnology*, **53**: 646-649. (2000).
11. LEE, S.Y., CHOI JONG, I.L., HAN, K ve SONG J.Y., *Removal of Endotoxin during Purification of Poly (3 hydroxybutyrate) from Gram Negative bacteria*, *Applied and Environmental Microbiology* June cilt **65**: 2762-2764. (1999).
12. JOSHI, A.Y., OSWAL, P.K, DANIEL, K.D, ve PANDA, T., *The World Congress on Biotechnology, 11th International Biotechnology Symposium and Exhibition. 3-8 Eylül Berlin (2000).*
13. HORI, K., KANEKO, M., TANJI, Y., XING, X.H ve UNNO. H, *Construction of self-disruptive Bacillus megaterium in Response to substrate Exhaustion for Polyhydroxybutyrate Production*, *Applied Microbiol Biotechnol* **59**:211-216 ,(2002).
14. JAWED, A.ve KENNETH, J.G, Monsanto Company, 800 North Lindbergh Boulevard St Louis, MO 63167, USA 53.(2000).
15. PAGE, W.J., *Bacterial polyhydroxyalkanoates*, *Natural Biodegradable Plastics with a Great Future*, *Can. J Microbiol.* **41**:1-33 (1995).
16. LAFFERTY, R.M., KORSATKO, B. ve KORSATKO, W., *Microbial Production of Poly- β -hydroxybutyric Acid*, in: (eds) Rehm, H.J. and Reed, G., *Biotechnology*, VCH Verlagsgesellschaft, mbH, D-6940 Weinheim, Germany, 6b:135-176 (1988).

17. BYROM, D., *Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics*, TIBTECH, **5**: 246-250, (1987).
18. HRABAK, O., *Industrial Production of Poly- β -hydroxybutyrate*, FEMS Microbiology Reviews, **103**, 251-256, (1992).
19. CHEN, G.Q., ZHANG, G., PARK, S.J ve LEE, S.Y., *Industrial Scale Production of Poly (3 hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate)*. Applied Microbial Biotechnology, **57**:50-55. (2001).
20. SU, F, IWATA, T., SUDESH, K.ve DOI, Y., *Electron and X-ray Diffraction Study on Poly(4-hydroxybutyrate) Polymer*, **42**: 8915-8918. (2001).
21. DENG, X.M., *Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate) Macromer of Bacterial Origin*, European Polymer Journal, **37**:211-214, (2001).
22. ANDERSON, A.J. ve DAWES, E.A., *Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Microbiological Reviews, **54**(4): 450-472 ,(1990).
23. KESSLER, B. ve WITHOLT. B., *Factors Involved in the Regulatory Network of Polyhydroxyalkanoate Metabolism*, Journal of Biotechnology, **86**: 97-104, (2001).
24. TIMM, A ve STEINBUCHER, A., *Formation of polysters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic Acids from Gluconate by Pseudomonas aeruginosa and other Fluorescent Pseudomonas*, Applied and Environmental Microbiology **33**:60-3367 (1990).

25. KIM, G.J , BANG, K.H, KIM,Y.B ve RHEE, Y.H., *Preparation and Characterization of Native poly (3-hydroxybutyrate) Microspheres from Ralstonia eutrophia*, Biotechnology Letters **22**: 1487-1492 (2000).
26. ATEŞ, M., *Batık kültür fermentasyonu yöntemiyle bazı bakterilerden PHB üretimi*, Doktora Tezi, 1997.
27. LOOTZ, D., BEHREND, D., KRAMER, S., FREIER, T., HAUBOLD, A., BENKIEBER, G, SCHMITZ, K.P ve BECHER ,B., *Laser Cutting Influence on Morphological and Physicochemical Properties of Polyhydroxybutyrate*, Biomaterials, **21**: 2447-2452 (2001).
28. PETERSEN, K., NIELSEN, V.P., BERTELSEN , G, LAWTHOR ,M., OLSEN,M., NILSSON, N., H. ve MORTENSEN, G., *Potential of Biobased Materials for Food Packaging*, Trends in Food Science & Technology, **10**: 52-68. (1999).
29. TAMER, A. Ü., UÇAR, F., ÜNVER, E., KARABOZ, İ., BURSALIOĞLU, M. ve OĞULTEKİN, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Anadolu Üniv. Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları, No. 74, Eskişehir, 1989.
30. KRIEG, N.R. ve HOLT, J.G., *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology*, 1, U.S.A., 1984.
31. SKOOG,A.D., WEST,D.M., HOLLER.F.J., *Analitik Kimya Temelleri* (7.Baskı), Özkan Matbaacılık-Ankara.
32. LEE S.Y ve CHANG H.N., *High cell density cultivation of Escherichia coli using sucrose as a carbon source*. Biotechnol Letters,. **15**:971-974, (1993).

33. DOMBAYCI, N., *Rhizobium bakterileri ile PHB üretimi*, Yüksek lisans tezi Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Eskişehir 2001.
34. MERCAN, N., ASLIM, B., YÜKSEKDA N. ve BEYATLI Y, *Production of PHB by some Rhizobium bacteria*, Turk J Biol26 215-219 (2001)
35. HIRAMITSU, M., KOYAMA, N. ve DOI, Y., *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Alcaligenes latus*, Biotechnology Letters,.15 (5) :461-464, (1993).
36. GROTHE. E. ve MOO. YOUNG., M, *Fermentation Optimization for the Production of (PHB) Microbial Thermoplastic*, Enzyme and Microbial Technology, 25 (1999)
37. ZHANG, H, OBIAS, V., GONYER, K. ve DENNIS, D., *Production of PHA in sucrose utilizing recombinant Escherichia coli and Klebsiella strains*, Appl. Environ. Microbiol., 60:1198-1205, (1994).
38. KIM BS, CHANG H.N *Production of PHB from starch by A.chroococcum* Biotechnol Lett 20: 109, 12, (1998).
39. PAGE, W.J. ve CORNISH, A., *Growth of Azotobacter vinelandii UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly-(beta)-Hydroxybutyrate* Appl. Environ. Microbiol., 59:4236-4244 ,(1993).
40. HORI, K., SOGA, K ve DOI,Y., *Effect of culture conditions on molecular weight of PHA's produced by Pseudomonas putida from octanoate*, Biotechnol Lett., 16:709-714, (1994).
41. WANG, F. ve LEE SY. *PHB production with high polymer content by fed-batch culture of Almagines latus under nitrogen limitation*, Appl. Environ. Microbiol, 63:3703-3706.,(1997).

42. RYU, H.W., HAHN, S.K., CHANG, Y.K. ve CHANG H.N, *Production of P(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with phosphate limitation*, Biotechnol, Bioeng.,**55**:28-32, (1997).
43. CHEN, Y., YANG, H., ZHOU, Q., CHEN, J ve GU, G., *Cleaner recovery of poly(3-hydroxybutyric acid) Synthesized in Alcaligenes eutrophus*, Process Biochemistry, **36**: 501-506, (2001).
44. KIM, B.S., LEE, S.C., LEE S.Y, CHANG, H.N, CHANG, Y.K ve WOO, S.I., *Production of poly(3 hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of Alcaligenes eutrophus with glucose concentration control*. Biotechnol Bioeng., **43**:892-898 (1994).
45. KIM, S.W., KIM P., LEE H.S. ve KIM, J.H., *High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from Methylobacterium organophilum under potassium limitation*, Biotechnol Lett **18**:25-30. (1996).
46. PREUÍSTING. H.O, VAN HOUTEN, R.,HOEFS,A., VAN LANGENBERGHE, E.K., FAUREBULLE, O., ve WITHOLT,B., *High cell density cultivation of Pseudomonas oleoverans : growth and production of Poly (3-hydroxyalcanoates) in two liquid phase batch and fed-batch systems*, Biotechnol. Bioeng.,**41**:550-556, (1993).
47. ISHIZAKI, A. TANAKA. ve K, TAGA,N., *Microbial production of poly-D-3 Hydroxybutyrate from CO₂* ,Applied Microbiol Biotechnology, **57**:6-12, (2001).