

Hidrokarbonla Kirli Topraklardan İzole Edilmiş Mikroorganizmaların Biyoplastik
Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Biyoplastiğın Karakterizasyonu

Gökhan Güngörmedi

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos, 2012

Determination of Bioplastic Production Capabilities of the Microorganisms Isolated
from Hydrocarbon Contaminated Soils and Chracterization of Bioplastic

Gökhan Güngörmedi

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

August, 2012

Hidrokarbonla Kirli Topraklardan İzole Edilmiş Mikroorganizmaların Biyoplastik
Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Biyoplastiğin Karakterizasyonu

Gökhan Güngörmedi

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç.Dr. Ahmet Çabuk

Agustos, 2012

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Gökhan Güngörmedi'nin Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı "Hidrokarbonla Kirli Topraklardan İzole Edilmiş Mikroorganizmaların Biyoplastik Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Biyoplastiğin Karakterizasyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet Çabuk

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Semra İlhan

Üye: Prof. Dr. Tamer Akar

Üye: Doç. Dr. Ahmet Çabuk

Üye: Yrd. Doç. Dr. Figen Çalışkan

Üye: Yrd. Doç. Dr. Mesut Şam

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nimetullah BURNAK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, biyoplastik üreticisi olan alternatif bir mikrobiyal kaynağın bulunması hedeflenmiştir. Eskişehir Organize Sanayi bölgesinde hidrokarbonla kirlenmiş topraklardan izolasyon yapılmış ve bu izolatların Poli- β -hidroksibütirikasit (PHB) üretim yetenekleri araştırılmıştır. Bu çalışmada A1 izolatının hücre kuru ağırlığına oranla % 44,30 – 81,46 PHB ürettiği tespit edilmiştir. En yüksek PHB verimine sahip A1 izolatının *Bacillus megaterium* XyC6 türüne benzediği belirlenmiştir.

PHB üretim miktarını artırmak amacıyla, en uygun üretim koşullarını belirlemek için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, endüstriyel ve sentetik karbon kaynaklarının biyoplastik üretimine etkileri araştırılmış ve % 48,7 PHB verim ile en iyi karbon kaynağı melas olarak belirlenmiştir. Karbon kaynağı miktarının PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için % 1 – 30 aralığında karbon miktarı denenmiştir. Bu çalışmada % 52,13 PHB verim ile optimum karbon kaynağı miktarı % 5 melas olarak tespit edilmiştir. Belirlenen optimum koşullar korunarak pH 4 – 9 aralığında ortam pH'ı çalışılmış ve % 75,62 PHB verimi ile ortam pH'ı optimum pH 6 olarak belirlenmiştir. Ortam sıcaklığının PHB üretimindeki etkisini belirlemek amacıyla 25 – 40 °C aralığında sıcaklıklar denenmiş ve % 72,52 PHB verimi ile en iyi ortam sıcaklığı 35°C olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon süresinin PHB üretimindeki etkisini belirlemek amacıyla 12 – 72 saat aralığında 12 saatte bir örnek alınarak inkübasyon süresinin PHB üretimi üzerine etkisi araştırılmış ve % 78,63 PHB verimi ile en iyi sonucun 60. saatte olduğu belirlenmiştir.

Bacillus megaterium XyC6'nın, sükroz ve melası karbon kaynağı olarak kullanmasıyla sentezlediği PHB'lerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, Sigma Aldrich Cheme'den temin edilen PHB ve ticari suş olan *Alcaligenes eutrophus*'un sentezlediği PHB ile kıyaslanmıştır. Karakterizasyonu için Fourier Transform İnfrared Spektroskopi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) kullanılmıştır. Ayrıca, mol ağırlığını belirlemek için Viskozimetrik yöntem ve termal davranışlarını takip etmek için Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) kullanılmıştır.

Anahtar Kelime: Biyoplastik, Polihidroksibütirat. *Bacillus megaterium* XyC6

SUMMARY

In this study it is targeted to find an alternative microbial resource of bioplastic manufacturer. The isolations were carried out from hydrocarbon polluted soils obtained in Eskisehir Organized Industrial Zone and the PHB production capabilities of these isolates were determined. It was detected that isolate A1 produces % 44,30 – 81,46 PHB in proportion to its dry cell weight and the isolate A1 with the highest PHB yield is similar with the *Bacillus megaterium* XyC6 strain.

Optimization studies were carried out to increase the amount of PHB production and to determine the optimum conditions. To this end, the effects of industrial and synthetic carbon sources on bioplastic production were investigated and molasses was determined as the best carbon source with 48,7% PHB yield. Carbon contents within the range of 1 – 30% were tested to determine the effect of carbon source amount on PHB production. The optimum carbon source amount was determined as 5% molasses as 52,13% PHB yield. The medium pH was studied within the range of pH 4 – 9 by preserving the determined optimum conditions and the medium pH was determined as pH 6 for optimum with 75,62% PHB yield. Temperatures between 25 – 40°C were tested to determine the effect of the medium temperature on the PHB production and the best yield was obtained at 35 °C with 72,52% PHB yield. The effect of incubation period on the amount of PHB production was examined by taking a sample every 12 hours in the range of 12 – 72 and the best result was obtained at 60th hour with 78,63% PHB.

The physical and chemical properties of PHBs, synthesized by *Bacillus megaterium* XyC6 using sucrose and molasses as carbon sources, were compared with PHB obtained from Sigma Aldrich Cheme and PHB synthesized by a commercial strain *Alcaligenes eutrophus*. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) were used for the characterization. The viscometric method was used to determine the molar weight, and the Differential Scanning Calorimeter (DSC) was used to follow the thermal behaviours.

Keywords: Bioplastic, Polyhydroxybutyrate. *Bacillus megaterium* XyC6

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana yol göstererek her türlü imkanı sağlayan, ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Ahmet ÇABUK'a

Çalışmalarımıza bilgi ve deneyimleri ile büyük katkılar sağlayan Prof. Dr. İsmail KARABOZ'a

Çalışmalarım esnasında bilgi ve deneyimleri ile laboratuvar imkanlarını paylaşan Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubundan hocalarım Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM ve Dr. Murat DEMİRBİLEK'e

Tez çalışmamda izolatların tanımlanmasında laboratuvar imkanlarını paylaşan hocam Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU'ya

Daima maddi ve manevi desteğini hissettiğim hocam, Dr. Tuğrul ÖNTÜRK'e,

Tezimin her aşamasında yanımda olup, destek ve yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Serap GEDİKLİ, Pınar AYTAR, Meltem ÇELİKDEMİR ve Hakan ÇAKMAK'a

Hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans ve tez çalışması dönemimde de bana sabırla cesaret ve güven veren Sibel KUŞCA ve aileme en içten dileklerle teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Gökhan GÜNGÖRMEDİ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
SUMMARY	VI
TEŞEKKÜR	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Biyoplastiğin Tarihçesi.....	4
2.2 PHB'nin Genel Özellikleri.....	5
2.2.1 PHB'nin fiziksel yapısı.....	6
2.2.2 PHB'nin kimyasal yapısı.....	9
2.3 PHB'nin Sınıflandırılması.....	10
2.4 PHB'nin Oluşum Şartları ve Biyosentezi.....	12
2.5 PHB'nin Biyolojik Parçalanabilirliği.....	16
2.6 PHB'nin Yenilenebilme Özelliği.....	19
2.7 PHB Belirleme Yöntemleri.....	20
2.8 PHB Sentezleyen Organizmalar.....	21
2.8.1 <i>Alcaligenes</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	21
2.8.2 <i>Azotobacter</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	22
2.8.3 <i>Bacillus</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	23
2.8.4 <i>Pseudomonas</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	24
2.8.5 <i>Rhizobium</i> cinsi bakterilerde PHB üretimi.....	26
2.8.6 Diğer bakterilerden PHB üretimi.....	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.9 PHB'yi Yıkıma Uğratabilen Organizmalar.....	27
2.10 PHB'nin Üretiminde Kullanılan Substratlar.....	28
2.11 PHB'nin Kullanım Alanları.....	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	35
3.1 Materyal.....	35
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	35
3.1.2 Kullanılan besi ortamları.....	35
3.1.3 Kullanılan çözeltiler.....	37
3.2 Yöntem.....	39
3.2.1 İzolasyon çalışmaları ve mikroskopik incelemeler.....	39
3.2.2 İzolatların PHB üretim yeteneklerinin belirlenmesi.....	39
3.2.3 PHB ekstraksiyonu, presipitasyonu ve ölçümü.....	40
3.2.4 PHB standart grafiğinin hazırlanması.....	41
3.2.5 PHB üretimi açısından en etkin izolat(lar)ın seçilmesi.....	41
3.2.6 Kültürlerin moleküler yöntemler ile tanımlanması.....	42
3.2.6.1 DNA ekstraksiyonu.....	42
3.2.6.2 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu.....	42
3.2.6.3 PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	43
3.2.6.4 PCR ürünlerinden dizi analizi.....	44
3.2.7 PHB üretim veriminin artırılması için optimizasyon çalışmaları.....	45
3.2.8 Sükroz ve melastan üretilen PHB'nin karakterizasyonu.....	46
4. BULGULAR.....	49
4.1 İzolasyon Çalışmaları.....	49
4.2 PHB Standart Grafiği.....	49
4.3 İzolatların Polimer Ortamında Büyütülmesi.....	50

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4 PHB Üretimi Açısından En Etkin İzolatın Tanımlanması.....	52
4.5 PHB Üretiminin Artırılmasında Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	53
4.5.1 Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisi.....	53
4.5.2 Karbon kaynağı miktarının PHB üretimi üzerine etkisi.....	55
4.5.3 Ortam pH değerinin PHB üretimi üzerine etkisi.....	57
4.5.4 İnkübasyon sıcaklığının PHB üretimi üzerine etkisi.....	59
4.5.5 İnkübasyon süresinin PHB üretimi üzerine etkisi.....	61
4.6 Sükroz ve melastan üretilen PHB'nin karakterizasyonu.....	63
4.6.1 PHB'nin kimyasal yapısı.....	63
4.6.2 PHB'nin moleküler yapısı.....	67
4.6.3 PHB'nin moleküler ağırlığı.....	71
4.6.4 PHB'nin termal davranışı.....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	74
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 <i>Pseudomonas saccharophila</i> 'nın Freze-fructered Elektron Mikrografında görülen PHB granülleri.....	7
2.2 D(-)-3-hidroksibütirik asit polimerinin kimyasal yapısı.....	9
2.3 <i>Rhizobium eutropha</i> 'da PHB ve P(HB-HV) biyosentetik yol izi.....	14
2.4 PHB'nin parçalanması ve sentezi.....	18
2.5 PHB'nin karbon döngüsü.....	19
4.1 Krotonik asit formundaki standart PHB'nin 235 nm dalga boyunda miktara bağlı ($\mu\text{g/ml}$) standart grafiği.....	50
4.2 Sentetik ve endüstriyel atık karbon kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada, hücre kuru ağırlığına oranla ortalama % PHB verimleri.....	55
4.3 Karbon kaynağı miktarının PHB üretimine etkisi.....	57
4.4 pH'ın PHB üretimine etkisi.....	59
4.5 İnkübasyon sıcaklığının PHB üretimine etkisi.....	61
4.6 İnkübasyon süresinin PHB üretimine etkisi.....	63
4.7 Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen saf ticari PHB'in FTIR spektrumu.....	64
4.8 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 'dan sentezlenen PHB'nin FTIR spektrumu.....	65
4.9 Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanılması ile sentezlenen PHB'in FTIR spektrumu.....	66
4.10 Karbon kaynağı olarak endüstriyel atık olan melasın kullanılması ile sentezlenen PHBV'in FTIR spektrumu.....	67
4.11 Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen saf ticari PHB'in proton NMR spektrumu.....	68
4.12 <i>Alcaligenes eutrophus</i> 'dan sentezlenen PHB'nin proton NMR spektrumu.....	69
4.13 Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanılması ile sentezlenen PHB'in proton NMR spektrumu.....	70
4.14 Karbon kaynağı olarak endüstriyel atık olan melasın kullanılması ile sentezlenen PHB'in proton NMR spektrumu.....	71
4.15 Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanılması ile sentezlenen PHB'in DSC eğrisi.....	73
4.16 Karbon kaynağı olarak melasın kullanılması ile sentezlenen PHB'in DSC eğrisi.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 PHB ve PP'in bazı özelliklerinin karşılaştırılması.....	8
2.2 Biyoplastiklerin genel formülündeki alkali grupları (R) değişmesi ile oluşan biyoplastik türleri.....	10
2.3 Mikrobiyal biyoplastiklerin sınıflandırılması.....	11
4.1 İzolatların Morfoloji ve Gram özellikleri, hücre kuru ağırlığına oranla PHB miktarları.....	51
4.2 Sentetik ve endüstriyel atık karbon kaynaklarının PHB üretimi üzerine etkisi.....	53
4.3 Karbon kaynağı miktarının PHB üretimine etkisi.....	56
4.4 pH'ın PHB üretimine etkisi.....	58
4.5 İnkübasyon sıcaklığının PHB üretimine etkisi.....	60
4.6 İnkübasyon süresinin PHB üretimine etkisi.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge

°C	Santigrat derece
C	Karbon
S	Kükürt
P	Fosfat
N	Azot
Mg	Magnezyum

Acıklama

Kısaltma

PHA	Polihidroksialkonat
PHB	Polihidroksibütirat
PHV	Polihidroksivalerat
P(HB-co-HV)	Polihidroksibütirat-co-hidroksivalerat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
DSC	Differential Scanning Calorimetry
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NB	Nutrient Broth
Mpa	Gerilme gücü
Da	Dalton
kDa	Kilo dalton
G	Gram
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
Nm	Nanometre

Dk	Dakika
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
Tm	Erime sıcaklığı
Tc	Kristallik noktası

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin en büyük değişim süreçleri arasında yer alan Endüstri Devrimi, 18. yüzyıl sonlarında emeğin verimliliğini artırıp, kitlesel üretime geçişi sağlamıştır. Toplumsal hayatın bütün dinamikleri üzerinde etken olan bu değişimin temelinde bilimin uzun ve birikimsel geçmişi yatmaktadır. Varoluşundan bugüne doğa üzerinde hakimiyet kurma arzusunda olan insan, sanayinin sunduğu olanaklarla hızla gelişen bir teknolojiye sahip olmuştur.

Hayatı kolaylaştıran teknolojik uygulamalardan birisi de petrokimya endüstrisinin bir ürünü olan plastiklerdir. İlk polimer malzemesi 1868'de J. Hyatt tarafından selüloit olarak keşfedilmiştir. Yarı sentetik bir polimer olan selüloit, pamuk selülozundan elde edilmiştir. Ancak modern plastik endüstrisi 1909'da, L. Baekeland tarafından bakalitin endüstriyel ölçekte üretilmesiyle başlamaktadır. Plastik endüstrisince günümüze kadar, kimyasal bakımdan birbirinden tamamen farklı olan 40 polimer ailesi, yüzlerce bileşik ve binlerce ürün geliştirilmiştir (Akkurt, 2007). Plastiklerin, ekonomik oluşları, uygulama kolaylıkları ve özelliklerinin her geçen gün gelişmesiyle kullanım alanları ve miktarları giderek artmaktadır.

Plastik endüstrisi ve diğer endüstriyel alanlarındaki gelişmeler insanların yaşam standartlarını yükseltirken beraberinde çevresel sorunları da oluşturmaya başlamıştır. Aslında, ortaya çıkmaya başlayan ve çevresel etkileri az da olsa görülmeye başlanılan bu olumsuz gelişmeler 19. yy sonlarında ve 20. yy başlarında sorun olarak kabul edilmemiştir. Doğanın bu tür çevresel sorunların üstesinde gelebileceğine inanılmıştır. Fakat hızla gelişen endüstrileşme ile birlikte artan atık ve artık miktarı doğanın mücadele edebileceği sınırı aşmıştır. Bunun sonucunda insanoğlu bu sorunun çözümü için yeni yollar aramaya başlamıştır.

Plastik endüstrisinin birçok avantajının yanı sıra plastiğin kullanılıp-atılabilme özelliği, günümüzde çevre kirliliği açısından önemli sorunlardan biri haline gelmiştir (Page, 1992a). Plastikler doğaya bırakıldıklarında yüzlerce yıl parçalanmadan kaldıklarından çevre kirliliği sorununu da beraberinde getirmektedir. Dünyada yıllık plastik tüketimi yaklaşık 70 milyon ton olarak tahmin edilmektedir. Kullanılan plastiğin %20'si bir yıldan daha az ömürlü, %35'i 1-10 yıl, %45'i ise 10 yıldan fazla ömürlü malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır (Boşgelmez, ve ark., 2000). Bu plastik malzemelerin kullanıldıktan sonra doğaya atılması sonucu, her yıl 25 milyon ton plastik birikmektedir (Lee, 1996).

Khanna ve Srivastava'ya (2005) göre parçalanmayan plastik atıkların yarattığı çevre kirliliği problemine karşı bir kaç çözüm yolu bulunmaktadır. Bunlar yakarak yok etme, geri dönüşüm uygulamaları ya da biyolojik olarak parçalanabilen plastikleri üretip kullanmaktır. Petrol kökenli plastikleri yakarak yok etme iyi bir çözüm gibi görünse de işlem sırasında hidroklorik asit ve hidrojen siyanid gibi zararlı gazların ortaya çıkması nedeni ile çevre ve insan sağlığını riske atan bir yöntemdir. Geri dönüşüm uygulaması da uygun bir çözüm gibi görünse de bu yöntemin de ekonomik olmayışı ve insan gücüne olan gereksinimleri nedeni ile dezavantajları vardır. Ayrıca, pigment, kaplama, dolgu maddesi gibi çeşitli katkı maddelerinin varlığı atık plastiklerin yeniden kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır (Dinigüzel, 2007).

Petrol kökenli plastiklerin çevreye vermiş olduğu zararı önlemek için günümüzde biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin üretimi büyük önem kazanmıştır. Polibetahidroksibütirat (PHB) doğada en yaygın olarak bulunan Polibetahidroksialkanoat (PHA) çeşididir. Pek çok bakteri tarafından hücre sel büyüme sınırlandıran oksijen, fosfor, azot, kükürt gibi temel besin maddelerinin yokluğunda ve aşırı karbon kaynağının varlığında karbon ve enerji kaynağı olarak üretilmekte ve depo edilmektedir (Anderson and Dawes, 1990). PHB gibi biyolojik olarak tamamen parçalanabilen doğayla dost plastiklerin bakterilerde sentezi ve endüstriyel uygulamaları ile ilgili elde edilen olumlu sonuçlarla biyoplastiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Braunegg, et al., 1998; Poirier, 2002).

Bu çalışmada, Eskişehir Organize Sanayi Bölgesinde, hidrokarbonla kirlı topraklardan bakteri izolasyonu yapılmış ve izole edilen mikroorganizmaların PHB üretim yetenekleri araştırılmıştır. PHB üretimi açısından en etkin izolatın, türünü belirlemek için moleküler teknikler kullanılmıştır. Ayrıca PHB üretiminin artırılması ve en iyi üretim koşullarının belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Üretilen PHB'nin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

BÖLÜM 2

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biyoplastiğin Tarihçesi

Mikroskobun keşfinden günümüze bilim ve teknoloji hızla gelişmektedir. Bilime ivme kazandıran mikroskopun keşfi, yeni bilim dalları ve yeni buluşlara olanak sağlamıştır. Bilimin uzun ve birikimsel geçmişinde, biyoplastiğin bilim tarihindeki yerine baktığımızda, biyoplastiğin de birçok buluş gibi uzun yıllar öneminin farkına varılmadığını görmekteyiz.

Birçok araştırmacı, bakteri hücrelerinde lipofilik granülleri çok önceden tanımlanmıştır. Ancak ilk kez 1920'li yıllarda Lemoigne tarafından bu granüller teşhis edilmiştir. Lemoigne, *Bacillus megaterium* kültürlerini distile suda otoliz etmiş, bilinmeyen bir asidin oluşması ile pH değerinin düştüğünü gözlemlemiş, oluşan bu asidin diyabetik hastaların idrarlarında bulunan β -hidroksibütirik asite benzer olduğunu bildirmiştir (Lemoigne, 1926; Lee, 1996). 1950'li yılların sonlarında *Bacillus* cinsi bakterilerle yapılan çalışmalarda, poli β -hidroksibütirikasitin söz konusu bakteriler tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı açıklanmıştır. 1974 yılında Wallen ve Rohwedder, 3-hidroksibütirikasit (3HB) dışındaki hidroksialkanoatları (HA) tanımlamışlardır (Sudesh, et al., 2000).

Biyoplastiğin ilk ticari olarak üretimine ve patent alma sürecine kadar birçok araştırmacı tarafından bu polimere olan ilgi artmıştır. Ayrıca bu polimerin biyolojik olarak kısa sürede parçalanabilme özelliğinden dolayı petrokimyasal ürünlerin yerine alabilme potansiyelinin farkına varılmıştır. Bu sürecin başlarında *Bacillus sp.* hücreleri içinde PHB sentezini, yıkımını yönlendiren hücre içi şartlar ve mekanizmalar

araştırılmıştır (Macrae and Wilkinson, 1958). 1960'lı yıllarda ticari olarak PHB'nin üretimine yönelik çalışmalar başlamıştır. Ancak ilk ticari biyoplastik üretimi, 1970'li yıllarda İngiltere'deki Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) tarafından, birçok bakteri türü, PHB üretim potansiyeli açısından incelenmiş ve endüstriyel üretimde hücre kuru ağırlığının % 90'ı üzerinde PHB biriktiren *Alcaligenes eutrophus* bakterisini kullanmaya başlamıştır. *Alcaligenes eutrophus* kullanılarak üretilen biyoplastik Biopol adıyla patentlemiştir (Anderson and Dawes, 1990; Madison and Huisman, 1999; Yılmaz ve Beyatlı, 2003). PHB'nin ilk ticari kullanıcısı ise Almanya'daki Wella kozmetik şirketi olup PHB'i şampuan şişeleri için kullanmıştır (Lafferty, et al., 1988).

Günümüzde biyoplastik üzerine yapılan araştırmalarla, yeni biyoplastik üreticisi türler belirlenmekte ve *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter sp.*, *Hydrogenomonas sp.*, *Chromatium sp.*, *Bacillus sp.*, gibi bakterilerin biyoplastik üretim yetenekleri araştırılmaktadır. Ayrıca, biyoplastiğin fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon yöntemleri, metabolizması, iç ve dış yıkımı gibi çeşitli özellikleri incelenmiştir (Anderson and Dawes, 1990; Braunegg, et al., 1998).

2.2 PHB'nin Genel Özellikleri

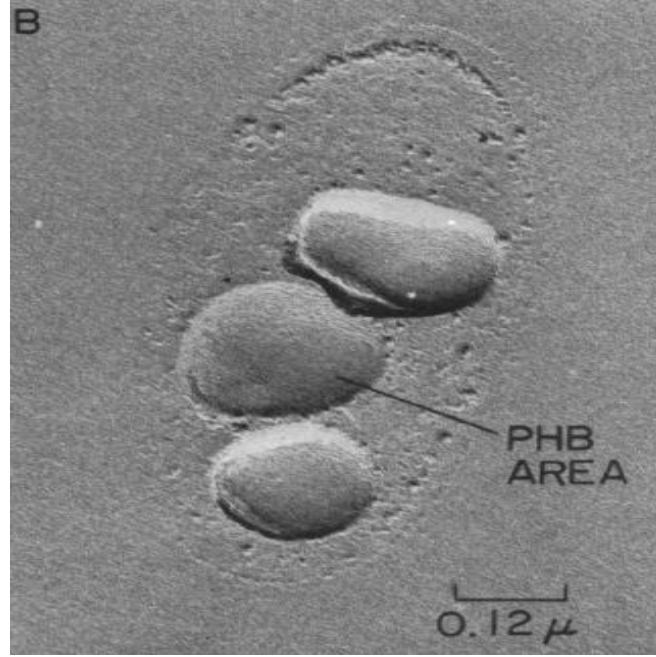
Biyomateryaller, mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve katabolize edilen ürünlerdir. Birçok mikroorganizma tarafından enzim, vitamin, antibiyotik, selüloz, yüzey aktif madde ve biyoplastik gibi biyomateryaller üretilmektedir. Bunlardan, biyoplastikler, biyolojik yolla parçalanabilen ve biyoyumlu biyomateryallerdir. Biyoplastikler, farklı besin ve çevre şartlarında altında birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Aerobik ve anaerobik bakteriler, fotosentetik bakteriler, arkeler ve düşük organizasyonlu ökaryotları da içine alan doksan cinsten daha fazla organizma bu polyesteri biriktirebilme ve parçalayabilme yeteneğine sahiptirler (Luengo, et al., 2003).

Endüstriyel öneme sahip olan biyomateryallerin, araştırmacılar tarafından fiziksel, kimyasal özelliklerinin araştırılması, sentez ve parçalanma mekanizmalarının ortaya çıkarılması ve üretim maliyetinin düşürülmesi için gerekli koşullarının belirlenmesi, bu biyomateryallerin kullanım alanlarının genişlemesine ve üretim maliyetlerinin düşmesine neden olacaktır.

2.2.1 PHB'nin fiziksel yapısı

PHA'ların biriktirildiği granüllerin büyüklüğü, sayısı, monomer kompozisyonu, makromoleküler yapısı ve fizikokimyasal özellikleri üretici mikroorganizmaya bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ostle and Holt, 1982; Anderson and Dawes, 1990; Murray, et al., 1994; Dinigüzel, 2007). PHA'ların çok sayıda değişik tipleri olmasına karşın en yaygın ve en geniş kapsamlı olarak çalışılan tipi PHB'dir (Madison and Huisman, 1999). PHB'lerin fiziksel özellikleri ile ilgili birçok bilgi bulunmaktadır ve günümüzde de araştırmalar devam etmektedir. Fiziksel özelliklerinin belirlenmesi bu polimerlerin uygulama alanlarının belirlenmesinde çok önemli bir faktördür.

Bakteriyel hücrelerde PHB granülleri Faz kontrast ve Elektron Mikroskobu ile kolayca gözlenebilir. PHB'ler, genellikle küre şeklinde olup her granül çap olarak 100-800 nm arasındadır. Bunlar 2-4 nm kalınlığında üniter olmayan bir membranla çevrilidir. Granüllerin yaklaşık % 98'i PHB, % 2'si ise protein içermektedir (Lafferty, et al., 1988; Dunlop and Robards, 1973; Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Hücre içerisindeki PHB granüllerinin yapısı ile ilgili yapılan diğer bir çalışmada ise granülün içte yer alan bir merkezi kısım ve birkaç tabakalı membranla çevrilmiş kabuktan olduğu bildirilmiştir (Şekil 2.1) (Dunlop and Robards, 1973).



Şekil 2.1. *Pseudomonas saccharophila*'nın Freze-fructered Elektron Mikrografında görülen PHB granülleri (Young, et al., 1972).

PHB'ler, polipropilen (PP) gibi petrol türevli yaygın plastiklere benzer özellikler gösterirler (Madison and Huisman, 1999). Ancak bir termoplastik olan PHB'nin sertliği, polietilene kıyasla dört kat fazladır. Ayrıca PHB'nin kırılma için genişleme özelliği % 6 iken polipropileninki % 400'dür. PHB'lerin bu fiziksel özelliğinden dolayı kullanım alanları sınırlanmaktadır. Fiziksel özelliklerinin belirlenmesi ve geliştirilmesi, kullanım alanlarının belirlenmesinde önemli bir faktördür. Bu nedenle bu dezavantajın ortadan kaldırılması ve kullanım potansiyelinin artırılması için 3-Hidroksivalerat birimi içeren PHB kopolimerleri P(3HB-co-3HV) geliştirilmiştir. Böylece polimerler daha sağlam ve esnek olmuştur. 3-Hidroksivalerat birimleri artıça esnekliğinde artığı bildirilmiştir (Lee, 1996).

Çizelge 2.1 PHB ve PP'in bazı özelliklerinin karşılaştırılması (Poirier et al., 1995; Lee, 1996; Tamdoğan, 2008).

Fiziksel Özellikler	PHB	PP
Kristalin kaynama noktası (°C)	175	176
Camsı geçiş sıcaklığı (°C)	15	-10
Kristallik oranı (%)	80	70
Gerilme gücü (Mpa)	40	34,5
Yoğunluk (g/cm ³)	1,250	0,905
Kırılma uzaması (%)	6	400
UV'ye dayanıklılık	Dayanıklı	Dayanıksız
Organik çözücüye dayanıklılık	Dayanıklı	Dayanıksız

Polimerin moleküler ağırlığı bakterinin türüne, büyüme koşullarına, hücrenin yaşam döngüsüne göre değişmekle birlikte, 60.000 - 2.000.000 Da arasında olduğu bildirilmiştir (Dunlop and Robards, 1973; Braunegg et al., 1998).

Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden özütlendiğinde kristalize olur (Dave et al., 1996; Madison and Huisman, 1999; Lafferty et al., 1988).

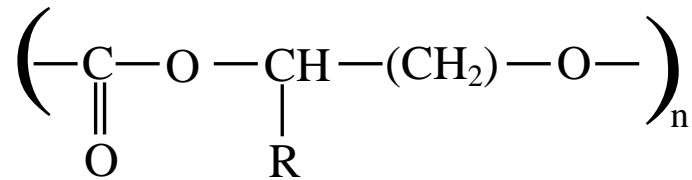
Katı ama kırılğan bir materyal olan PHB'nin erime sıcaklığı, 157 - 188 °C olup, sentetik polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakındır. PHB, termoplastik olduğundan preslenerek şekil verilebilir bir polimerdir (Dave et al., 1996; Madison and Huisman, 1999; Lafferty et al., 1988).

PHB'nin, UV ışınlarına dirençli olduğu ancak asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf dirence sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, polimerin su ve hava geçirmez oluşu hidrolitik parçalanmaya karşı direnç sağladığından PHB'nin kullanım olanakları genişlemektedir (Poirier, 2002).

2.2.2 PHB'nin kimyasal yapısı

PHB'nin, sağ el heliks yapısında ve iki katlı kıvrılmış bir eksene sahip olduğu, her ipliğin 0,596 nm'de bir tekrarlandığı, moleküler yapısının kıvrımlar halinde olduğu ve hücre içinde geniş hacim tuttuğu rapor edilmiştir (Anderson and Dawes, 1990).

PHB'nin yapısı, linear baş-kuyruk, 3-hidroksi yağ asit monomerlerinden oluşan bir poliesterdir. Bu monomerler birbirleriyle, karboksil (-COOH) ile hidroksil (-OH) grubları arasında ester bağı kurarak uzun zincirler oluştururlar (Tamdoğan, 2008). Yan zincirinde bir R (metil vs.) grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB'nin genel formülü $(C_4H_6O_2)_n$ şeklindedir (Şekil 2.2). (n) sayısı 35.000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilir (Madison and Huisman, 1999; McCool, et al., 1996; Yılmaz ve Beyatlı, 2003).



Şekil 2.2. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı

Biyoplastiklerin genel formülündeki alkil grubuna doymuş, doymamış, halojen ve aromatik monomerler bağlanarak farklı fiziksel özelliklere sahip biyoplastik türleri elde edilir (Baysak, 2008). Biyoplastiklerin uygulama alanlarının artırılması için geniş fiziksel özelliklere sahip biyoplastiklerin geliştirilmesi günümüzde büyük önem kazanmıştır. Bu amaçla R (Alkil grup) gruba çeşitli monomerler ekleyerek farklı

fiziksel özellikte biyoplastikler üretilmektedir. Çizelge 2.2’de R grubuna çeşitli monomerler eklenerek farklı fiziksel özelliklere sahip biyoplastik türleri verilmiştir.

Çizelge 2.2. Biyoplastiklerin genel formülündeki alkil gruplarının (R) değişmesiyle oluşan biyoplastik türleri (Steinbüchel, 1991; Lee, 1996).

R: (Alkil Grup)	Biyoplastik Türleri
Hidrojen	Poli-3-hidroksipropiyonat
Metil	Poli-3-hidroksibütirat
Etil	Poli-3-hidroksivalerat
Propil	Poli-3-hidroksiheksanoat
Pentil	Poli-3-hidroksioktanoat
Nonil	Poli-3-hidroksidodekanoat

2.3 PHB’nin sınıflandırılması

Biyoplastikler, biyosentetik köken, monomerlerin kimyasal yapısı, monomer büyüklüğü ve polyesterdeki monomer içeriğine göre sınıflandırılır. Çizelge 2.3’de sınıf ve alt sınıflar ayrıntılı bir şekilde verilmiştir.

Çizelge 2.3. Mikrobiyal biyoplastiklerin sınıflandırılması (Luengo, et al., 2003).

SINIF	ALT SINIF
Biyosentetik Köken	Doğal biyoplastikler: Mikroorganizmalar tarafından genel metabolitlerden üretilir. (Örneğin: PHB).
	Yarı Sentetik biyoplastikler: Mikroorganizma tarafından sentezlenemeyen bazı öncü maddelerin besiyerine eklenmesine gerek vardır. (Örneğin: Aromatik monomerler içeren PHA'lar).
	Sentetik biyoplastikler: Bunlar sadece kimyasal sentezlerle elde edilebilen doğal olanlara benzeyen polyesterlerdir. (Örneğin: Sentetik termoplastik polimerler).
Monomerlerin Kimyasal Yapısı	Alifatik yağ asiti içeren biyoplastikler: Doymuş veya doymamış monomerler, düz veya dallanmış monomerler içeren biyoplastikler.
	Aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler
	Hem alifatik hem de aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler
	Değişik bileşikler içeren biyoplastikler. (Örneğin: poli- γ -glutamik asit, poli- β -L-malik asit vs.).
Monomer Büyüklüğü	Kısa zincirli biyoplastikler. (Örneğin: 3-5 karbon atomu içeren PHA'lar).
	Orta zincirli biyoplastikler. (Örneğin: 6-14 karbon atomu içeren PHA'lar).
	Uzun zincirli biyoplastikler. (Örneğin: 14 karbon atomundan fazla karbon atomu içeren PHA'lar).
Polyesterdeki Monomer İçeriği	Homopolimerik biyoplastikler: Biyoplastikte tek bir monomer vardır.
	Heteropolimerik biyoplastik (Kopolimer): Biyoplastikte birden fazla monomer vardır.

2.4 PHB'nin Oluşum Şartları ve Biyosentezi

Biyoplastikler birçok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan büyüme koşullarında oluşturulmaktadır (Lafferty et al., 1988; Jan et al., 1996). Biyoplastik birikimi genellikle, aşırı karbon kaynağı varlığında, ancak azot, oksijen, fosfor, kükürt, magnezyum, potasyum ve demir gibi büyüme için gerekli temel besin maddelerinin eksikliğinde sentezlenmektedir (Findlay and White, 1983; Lafferty et al., 1988; Anderson and Dawes, 1990; Brandl et al., 1991; Valentin et al., 1994, McCool et al., 1996; Jan et al., 1996).

Mikroorganizmaların büyümesi ve biyoplastik birikimi arasında yakın bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Bakteri gelişiminin logaritmik üreme fazında biyoplastik birikiminin arttığı, geç logaritmik üreme - erken duraklama döneminde ise en yüksek düzeye ulaştığı bildirilmiştir (McCool et al., 1996). Büyüme sırasında bölünmeyen hücrelerde biyoplastik miktarı yüksek oranda artmaktadır (Lee, 1996). Sporlu bakterilerde ise, biyoplastik birikimi spor oluşumundan hemen önce olmakta ve bu biriken biyoplastik sporulasyonda enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Nickerson, et al., 1981; Benoit, et al., 1990).

Polimerin biyosentezi, monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi, iki enzimatik aşama gerektirir. Üretim seviyesi, zincir uzunluğu ve oluşan kopolimerin kompozisyonu, bu enzimlerin performansına bağlıdır (Taguchi, et al., 2001). Hücre içinde PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek Asetil-CoA ve düşük serbest CoA düzeyinin olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu, mikroorganizmalara göre değişmekle beraber genelde azot, potasyum, sülfür veya oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır (Braunegg, et al., 1998).

En kapsamlı karakterize edilen polimer olan PHB'nin biyosentezi, üç enzim ve bunları kodlayan genlerden oluşmaktadır (Şekil 2.3).

İlk basamakta, phaA geni β -ketotiyolazı kodlar, bu enzim Asetoasetil-CoA oluşturmak için 2 Asetil-CoA molekülünün kondensasyonu için gerekli olan ilk

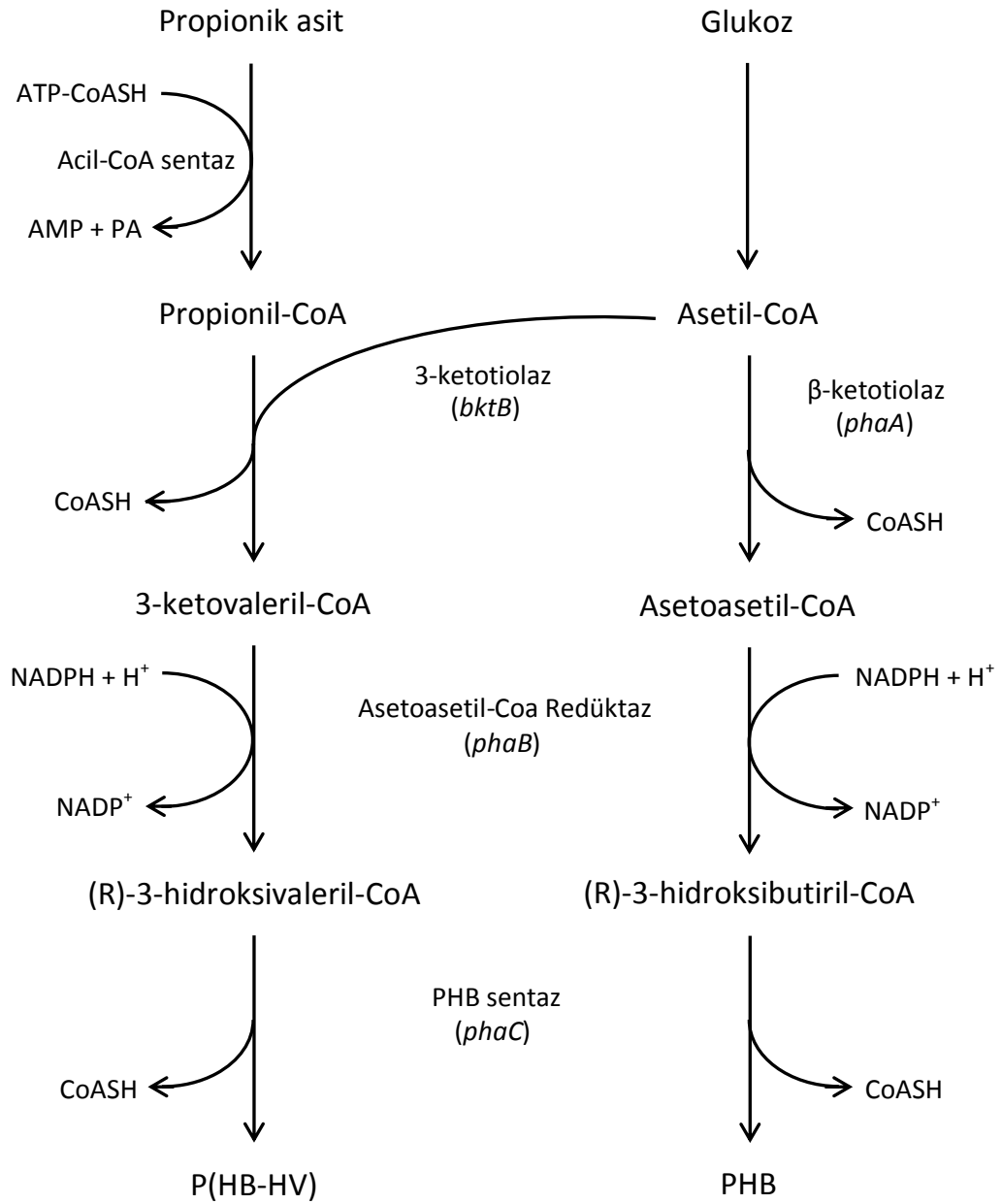
enzimdir. PHB oluşumunun ilk basamağını katalizleyen, β -ketoasil-CoA tiolaz, Acil-CoA+Asetil-CoA'daki substratların tiolitik ayrılmasını içeren enzim ailesinin bir üyesidir. Bu enzim ökaryotik ve prokaryotik organizmalarda doğal olarak bulunur (Madison and Huisman, 1999).

İkinci basamakta, Asetoasetil-CoA redüktazın katalizlediği bir reaksiyon olan Asetoasetil-CoA'nın (R)-3-hidroksibütiril-CoA'ya indirgenmesidir. Asetoasetil-CoA enzimi phaB geni tarafından kodlanır ve NADPH bağımlıdır (Steinbüchel and Schlegel, 1991). PHB biyosentez yolunda, tiolaz ve dehidrogenaz enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar, polimerizasyon için monomer sağlar (Madison and Huisman, 1999).

Üçüncü basamakta ise, phaC geninin kodladığı PHA sentazın katalizlediği (R)-3-hidroksibütiril-CoA monomerinin polimerizasyonudur (Rehm, 2003; Stubbe and Tian, 2003). PHB sentezinden sorumlu bu 3 enzim de hücrede PHB birikiminin yapıldığı sitozolde yer almaktadır (Anderson and Dawes, 1990).

Prokaryot hücrelerde PHB'nin hücre içi sentezi için başlangıç bileşiği, Asetil-CoA'dır. Substrat ve Asetil-CoA'nın hücre içi konsantrasyonunun artmasıyla oluşan koşullar, sentezde pozitif bir etkiye sahiptir. Bu aynı zamanda PHB sentezini basitleştirmektedir. Enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonun düzenleyici mekanizmanın kontrolü altında olması bunun nedeni olarak gösterilmektedir (Lafferty et al., 1988).

PHA sentezinin anahtar enzimleri olan ve polimerizasyonu sağlayan PHA sentazların (PHA polimeraz) 54 farklı çeşidi tayin edilmiş ve klonlanmıştır. PHA sentazlar üç çeşit olarak ele alınmaktadırlar. I. sınıf PHA sentazlar *Alcaligenes eutrophus*'dan, II. sınıf PHA sentazlar *Allochromatium virosum* ve III. sınıf PHA sentazlar *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan enzimlerdir (Rehm, et al., 2002). *Caulobacter crescentus*'dan izole edilen 2019 nükleotid içeren ve 673 aminoasidi kodlayan PHB sentaz geni, phaC, yaklaşık 73 kDa olan moleküler ağırlığı ile bugüne kadar tanımlanan en büyük PHA sentaz enzimidir (Qi and Rehm, 2001).



Şekil 2.3. *Rhizobium eutropha*'da PHB ve P(HB-HV) biyosentetik yol izi (Poirier, 2002).

Farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip PHB üretimi için, biyosentez aşamasındaki karbon kaynağını değiştirerek yeni özelliklere sahip PHB üretmek mümkündür. PHB üreticisi mikroorganizmalar tarafından farklı karbon kaynakları kullanılarak yeni yapı ve özelliklere sahip polimerler sentezlenir (Kim and Lenz, 2001; Luengo et al., 2003). Büyüme ortamındaki karbon kaynağının tipi ve miktarındaki değişikliklerle farklı monomerlere sahip çok sayıda PHA üretilmektedir (Steinbüchel and Schlegel, 1991; Dias et al., 2006). Örneğin glukoz ortamına valerik asit ya da propiyonik asidin eklenmesi HB ve HV [P(HB-HV)]'den oluşan bir polimer sentezlenmektedir.

PHB kopolimerlerinin üretimi uygulama alanlarının gereksinimleri düşünüldüğünde son derece önemlidir. PHB polimeri sert ve kırılğan bir yapıya sahiptir. Bu özelliğinden dolayı kullanım alanı sınırlıdır. Bu durumun aşılabilmesi için kopolimerlerinin ya da başka bir ifade ile özelliği PHB üretimi önem kazanmıştır. Polimer üretim ortamına asetik asit, valerik asit, propiyonik asit gibi karbon kaynakları katılarak kopolimerler elde edilebilir. 3-hidroksivalerat gibi monomerlerin eklenmesi ya da diğer polimerlerle karıştırılarak yapılan denemelerde PHB'nin kırılğanlığının azaldığı bildirilmektedir (Holmes, 1985; Holmes, 1988; Kunioka, et al., 1989; Du et al., 2001). PHB ve kopolimerlerin kompozisyonu, kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişebildiği, ancak bu dağılımın tesadüfi olabileceği de söylenmiştir (Doi, et al., 1986; Bloembergen, et al., 1986).

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

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

2.5 PHB'm Biyolojik Parçalanabilirliği

Petrol kökenli plastiklerin yerini gelecekte biyoplastiklerin almasının en önemli nedenleri arasında biyoplastiklerin kısa sürede doğada parçalanabiliyor olmasıdır. Ayrıca biyoplastiklerin parçalanması sonucunda ortaya çıkan parçalanma ürünlerinin toksik olmayışı biyoplastiklere olan ilgiyi her geçen gün artırmaktadır.

PHB'nin günümüzde ön plana çıkmasının nedenlerinden birisi, toprak ve insan vücudu gibi yerlerde toksik ürünler meydana getirmeksizin tamamen parçalanmasıdır. PHB'nin aerobik ortamlardaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su; anaerobik ortamlarda parçalanma ürünü ise metandır (Page, 1992; Lee, 1996; Braunegg et al., 1998).

PHB'nin parçalanma süresinin petrol türevi plastiklere göre kısa olması önemli avantajlarından birisidir. PHB'lerin parçalanma süresi anaerobik ortamlarda birkaç aydan, denizsuyu ortamında ise birkaç yıla kadar, katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanmada nitrojen oksidi oluşmaması, çevre korunmasında önemlidir. PHB'nin parçalanma ürünleri bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir (Chen et al., 1991; Dave et al., 1996; Madison and Huisman, 1999).

Polimerin parçalanmasında üç faktör rol oynar. Bunlar, biyolojik faktörler; bakteri, mantar ve yüksek yapılı organizmalar, kimyasal faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon, fiziksel faktörler ise; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınmadır (Madison and Huisman, 1999).

PHB'lerin tamamen parçalanması için gereken zaman ve biyoparçalanma oranının, kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal nüfus gibi etkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Lee, 1996; Lafferty, et al., 1988).

Nguyen, et al., (2002), PHB, PHV ve P(HB-co-HV) kopolimerlerinde, ısıya bağlı (170-200 °C) parçalanmayı araştırdıkları çalışmalarında, reaksiyonun ilk birkaç saatindeki tabakalaşmayı, ısı etkisiyle erimemin takip ettiğini bildirmişleridir. Araştırmacılar, ısı etkisiyle PHB parçalanmasının hızlandığını belirterek, bunun

polimerin oligomer formlarının krotonat son grupları il ilgili olduğunu bildirmişlerdir (Tamdoğan, 2008).

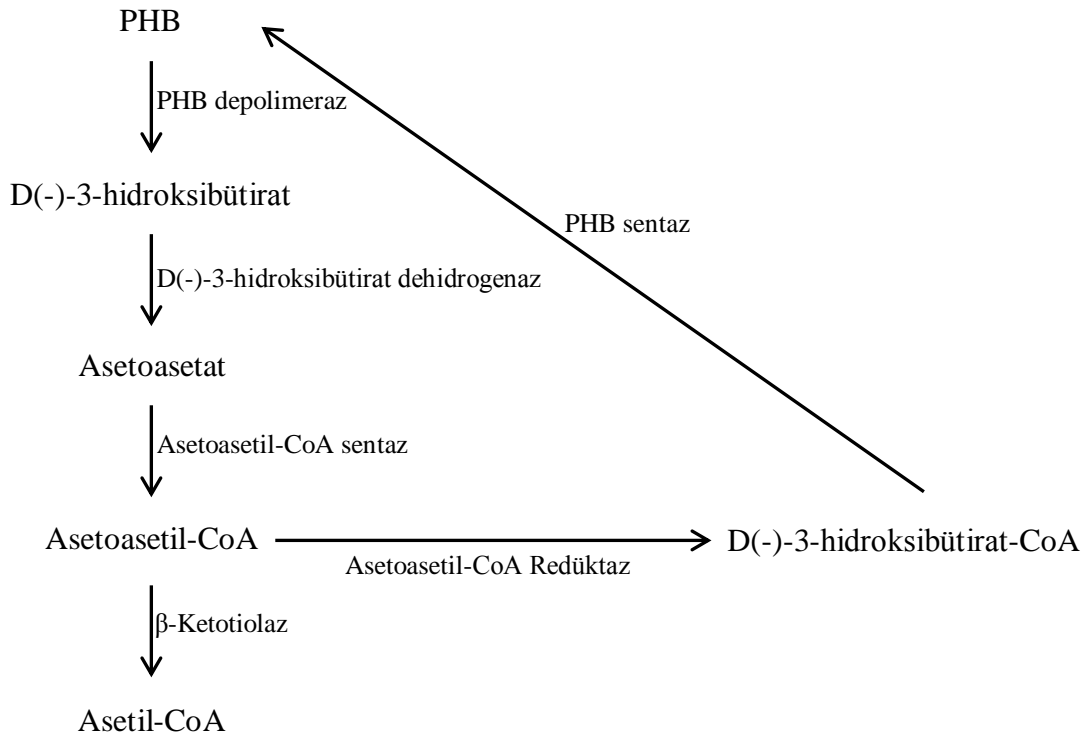
Mergaert, et al., (1993), PHB'nin toprakta ve steril tampon çözeltide parçalanmasını araştırdıkları çalışmada, her iki ortamda da molekül ağırlığının düştüğünü, ancak kütle miktarındaki azalmanın sadece toprakta görüldüğünü ve bunun toprak çeşidine bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Buna göre, kütle azalmasındaki en yüksek düzeye killi toprakta ulaşılmıştır (Tamdoğan, 2008).

PHB'nin parçalanma mekanizması baktığımızda, PHB'nin parçalanması hem hücre içinde hem de hücre dışında gerçekleşebilmektedir. PHB'nin parçalanmasından sorumlu enzim PHB depolimerazdır. PHB'yi parçalayan hücre içi enzimler *Bacillus megaterium* ve *Alcaligenes eutrophus*'da saplanmış (Lafferty, et al., 1988). Hücre içi depolimerazın, hücre dışı depolimerazdan farklı fonksiyonları vardır. Hücre içi depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, doğal PHB elastomerlerini parçalarlar. Ekstraksiyon sonrasında kristalize olan, PHB ise hücre dışı depolimerazlar tarafından hidrolize edilir (Lee, 1996). Bununla beraber, hücre dışı depolimerazlarla hücre içi depolimerazlar arasındaki yapısal farklılık nedeniyle, hücre içi PHB granülleri hücre dışı PHB depolimerazlarla parçalanamadığı bildirilmektedir (Braunegg, et al., 1998).

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

PHB'in hücre içi parçalanması, PHB depolimeraz enziminin PHB'yi hidrolize etmesi ile başlar. R-3-hidroksibütirat dehidrogenaz ve Asetoasetil-CoA sentaz, R-3-hidroksibütirat monomer ve dimerlerinin oluşumuna neden olur (Braunegg, et al., 1998). PHB depolimeraz PHB'yi hidroliz ederek D(-)-3-hidroksibütirat monomerlerine dönüştürür. D(-)-3-hidroksibütirat monomerleri D(-)-3-hidroksibütirat dehidrogenaz enzimlerinin katalizlemesi ile asetoasetat oluşur. Asetoasetil-CoA sentaz enzimi

asetoasetatdan Asetoasetil-CoA sentezlenir. β ketotiaz enzimi ise Asetoasetil-CoA'yı Asetil-CoA'ya dönüştürür. PHB'nin sentezi için gerekli olan Asetil-CoA molekülü oluşur. Bu aşamadan sonra PHB sentezinde rol alan enzimler tekrardan PHB'e sentezleyebilir.



Şekil 2.4. PHB'nin parçalanması ve sentezi (Lafferty, et al., 1988).

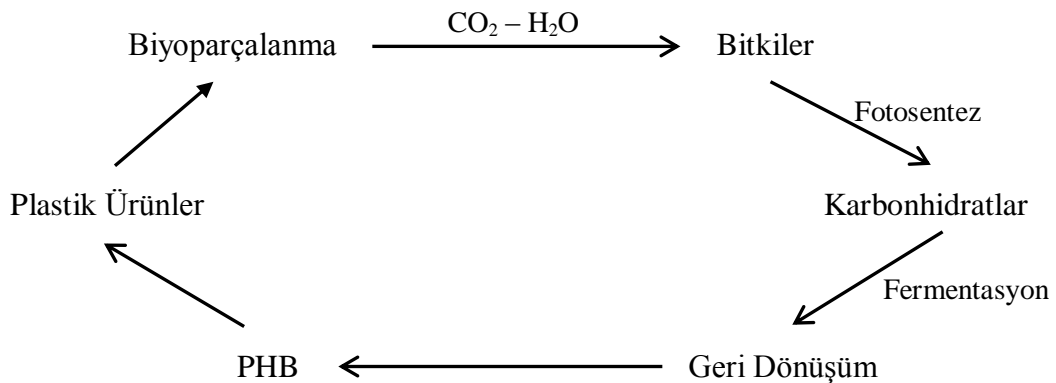
PHB'in, karbon ve enerji kaynağı olarak bakteriler tarafından kullanılabilmesi için depolimerize olması gerekmektedir. Depolimerizasyon sonucu oluşan monomerik 3-hidroksibütiril asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır (Lafferty, et al., 1988).

2.6 PHB'nin Yenilenebilir Özeği

PHB'nin biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması kadar yenilenebilir olması da önemlidir. Günümüzde yenilenebilir kaynaklara dayalı üretimin artması PHB'ye olan ilgiyi de artırmıştır. PHB bakteri orijinli polimerdir ve birçok bakteri tarafından sentezlenmekte ve parçalanmaktadır (Madison and Huisman, 1999).

Petrol kökenli plastikler doğada yüzyıllar boyunca parçalanmadan kalabilmektedir. Bu durumun aksine PHB'ler kısa sürede birçok bakteri ve fungus tarafından parçalanarak karbondioksit ve suya dönüştürülmektedir.

PHB'nin fermentatif üretimi, şekerler ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır. Bu tarımsal karbon kaynakları karbondioksit ve sudan meydana gelmektedir ve bunların biyoparçalanabilir PHB'ye sentezinden sonra, yıkım ürünleri yine karbondioksit ve sudur (Lee, 1996; Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Dolayısıyla, bazı uygulamalar için biyoparçalanma önemli iken, PHB'ler, azalmakta olan fosil yakıtların yerine geçebilecek yenilenebilir bileşikler olarak dikkat çekmektedirler (Madison and Huisman, 1999; Yılmaz ve Beyatlı, 2003)..



Şekil 2.5. PHB'nin karbon döngüsü (Dave, et al., 1996)

2.7 PHB Belirleme Yöntemleri

PHB granülleri Sudan Black B gibi lipofilik boyalar ile kolayca boyanarak mikroskopta gözlemlenebilir (Williamson and Wilkinson, 1958; Kallio and Harrington, 1960). Ayrıca Nile Blue A gibi floresan boya ile daha spesifik olarak boyanabilmektedir (Ostle and Holt, 1982).

PHB granülleri yüksek derecede ışığı kıldıklarından dolayı faz-kontrast mikroskobu ve elektron mikroskobu ile kolaylıkla gözlenebilmektedir (Dawes and Senior, 1973).

Bakteriyel hücrelerden ekstrakte edilmiş olan PHB'nin sülfirik asitle krotonik asite dönüştürülmesi ile spektrofotometrede 235 nm absorbansta sülfirik asit körüne karşın krotonik asit okunarak miktarı belirlenebilir (Tekin, 2008).

PHB'nin granül analizi için atomik kütle mikroskopisi ve Raman spektroskopisi kullanılmaktadır. Santrifüjle ya da kloroform, trifloroetanol, dikloroetan, propilen karbonat, metilen klorid, dikloroasetik asit gibi kimyasallarla ekstrakte edilen PHB'lerin moleküler ağırlığın belirlenmesinde geçirimli jel kromatografisi (GPC), zeta sizer, sedimentasyon analizi ve viskozite ölçüm teknikleri kullanılmaktadır. PHB'nin monomer kompozisyonları ise gaz kromatografisi (GC), kütle spektroskopisi (MS), nükleer manyetik rezonans (NMR) analizleriyle belirlenmektedir. PHB'nin ticari PHB ile benzer yapıda olup olmadığını doğrulamak ve saflık derecesini belirlemek için fourier transform infrared spektroskopisi (FTIR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) analizleri ile belirlenmektedir. PHB'nin kristal fazlarını belirlemek için X ışını difraksiyonu (XRD) analizi ile belirlenmektedir. PHB'nin termal davranışlarını belirlemek için diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) analizi yapılmaktadır (Marchessault, et al., 1970; Holmes, 1988; Garcia, et al., 1999; Madison and Huisman, 1999; Lee and Choi, 1999; Di Lorenzo and Silvestre, 1999; Kessler, et al., 2001; Dinigüzel, 2007).

2.8 PHB Sentezleyen Organizmalar

Bakterilerin büyük bir kısmı tarafından sentezlenen biyoplastikler, toprak, deniz ve tatlısu, bunların sedimentleri gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, çok sayıda heterotrofik ve ototrofik aerobik, fotosentetik anaerobik bakteriler, *Actinomycetesler*, *Cyanobakterler*, anaerobik yağ okside eden bakteriler, Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenir (Labuzek and Radecka, 2001; Findlay and White, 1983).

Biyoplastik sentezleyen bakteriler, sentez için gereken kültür şartlarına bağlı olarak ikiye ayrılırlar. Birinci grup bakteriler, biyoplastik sentezi için karbon (C) kaynağı fazlalığına ve azot (N), fosfor (P), magnezyum (Mg), kükürt (S) gibi temel besinlerin sınırlandırılması gerekirken (örneğin; *Alcaligenes eutrophus*), ikinci grup bakteriler biyoplastik sentezi için besin sınırlandırılmasına gerek yoktur ve gelişme boyunca polimer sentezleyebilmektedirler (örneğin; *Azotobacter vinelandii* mutant suşu) (Khanna and Srivastava, 2005).

Biyoplastik sentezleyen bakterilerin başında *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* türleri gelmektedir. Ayrıca toprak bakterilerin bir çoğu biyoplastik sentezleyebilmektedir (Lafferty, et al., 1988; Anderson and Dawes, 1990; Jan, et al., 1996; Braunegg, et al., 1998; Rosovitz, et al., 1998).

2.8.1 *Alcaligenes* cinsi bakterilerde PHB üretimi

İlk ticari biyoplastik üretme fikrinden günümüze kadar üzerinde en çok çalışılan bakteri *Alcaligenes eutrophus*'tur. Fruktuzu karbon kaynağı olarak kullandığında hücre kuru ağırlığının % 80'inden fazlasını PHB olarak biriktirmektedir (Madison and Huisman, 1999).

Alcaligenes cinsi bakterilerin diğerk türleri de birçok karbon kaynağını kullanarak yüksek verimle PHB sentezlemektedirler. Bunlardan *Alcaligenes latus* türü de birçok karbon kaynağını kullanarak PHB sentezlemektedir (Lafferty, et al., 1988). *Alcaligenes latus* ATCC 29713 suşu, endüstriyel atık olan melas ve şeker şurubundan kuru biyokütlesinin % 63'ü kadar PHB biriktirebilmektedir (Grothe, et al., 1999). *Alcaligenes* cinsi bakteriler, kültür şartlarına göre sınıflandırmada birinci grup mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Ortamdaki C/N oranının artışının polimer sentezini kolaylaştırması nedeniyle, *Alcaligenes* türlerinde PHB üretiminin kinetiğinde büyüme fazını takiben, azot kaynağının sınırlandırılması ile PHB sentezlendiği bildirilmiştir (Lafferty, et al., 1988).

Alcaligenes eutrophus NCIMB 11599 suşunun farklı inkübasyon sürelerinde ve amonyumun sınırlandırıldığı durumlarda PHB üretim verimliliğini inceleyen araştırmacılar, en yüksek hücre yoğunluğu sırasında sınırlandırılan amonyumun PHB veriminde %76'lık bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Kim, et al., 1994).

2.8.2 *Azotobacter* cinsi bakterilerde PHB üretimi

Azotobacter cinsi bakterilerde PHB sentezi için besin sınırlandırılmasına gerek yoktur ve hücre gelişimi boyunca polimer sentezleyebilirler (Khanna and Srivastava, 2005). Bu bakteriler üzerinde yapılan PHB araştırmalarına bakıldığında, *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz gibi karbon kaynakları ile şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, mısır şurubu, malt ekstraktı gibi endüstriyel atık olan karbon kaynaklarında yüksek miktarda PHB verimi elde edildiği rapor edilmiştir (Page, 1989; Page, 1992). *Azotobacter vinelandii* UWD suşunu glukoz ve balık peptonu içeren besi ortamında geliştirdiklerinde hücre kuru ağırlığının %80 oranında PHB sentezlediği bildirilmiştir (Page, et al., 1995).

Azotobacter chroococcum türünde yapılan araştırmalarda pancar melası içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığına oranla %12,1 PHB sentezlediğı rapor edilmiştir (Ateş ve Emekçi, 2001). Oksijen miktarının PHB retimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *Azotobacter chroococcum*'un PHB sentezlemesi için hazırlanan besi ortamına ucuz karbon kaynağı olarak nişasta eklenmiş ve oksijen miktarı sınırlandırılarak yapılan araştırmada PHB veriminin %20'den %46'ya çıktığı bildirilmiştir (Kim, 2000).

Azotobacter beijerinckii bakterisinin kazein pepton, maya özütü, kazamino asit ve üre gibi organik azot kaynaklarının glukoz veya sükroz gibi karbon kaynaklarıyla kombine edildiğinde, azot sınırlamasına gerek kalmadan %50'den fazla PHB üretebileceğini bildirilmiştir. PHB'nin büyüme ile ilgili şartlardan etkilendiğini ve özellikle kazein pepton içeren besi ortamında büyümenin durgun fazında en yüksek PHB retim değerine ulaştığı rapor edilmiştir. Çalışmada, oksijeni sınırlandırılmış şartlarda PHB üretiminin arttığı da vurgulanmıştır (Borman, et al., 1998).

2.8.3 *Bacillus* cinsi bakterilerde PHB retimi

Bacillus cinsi bakterilerin üretmiş olduğu biyoplastiklerin gelecekte büyük bir potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir (Dave, et al., 1996; Labuzek and Radecka, 2001). *Bacillus sp.* türlerinin endüstriyel atık olan melas gibi karbon kaynaklarını substrat olarak kullanmaları, yüksek sıcaklık ve yüksek ozmatik basına dayanıklı olmaları potansiyel üretici mikroorganizmalar olarak dikkatleri üzerine çekmektedir. Ancak hücre duvarı yapılarının kalın oluşu sebebiyle PHB ekstraksiyon aşamasında zorluklarla karşılaşılmaktadır. Buna rağmen avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB retimi yapmak için uygun suşlarının izole edilip PHB retim yeteneklerinin araştırılması gerekmektedir (Wu, et al., 2001).

Bacillus sp. türlerinin PHB sentezleme nedeni, sporulasyon aşamasında hücre içi enerji rezervi olarak kullanmaktır. *Bacillus cereus*'da spor oluşumundan hemen önce PHB birikimin en yüksek seviyede olduğu ve bakterinin sporulasyon döneminde PHB'yi enerji kaynağı olarak kullandığı bildirilmektedir (Nickerson, et al., 1981). *Bacillus megaterium*'da 3-Hidroksibütirik asit trimer yapılarının geç ekspanansiyel fazda biriktirildiği, durgunlaşma ve ölüm fazında ise parçalanma sonucunda en yüksek düzeye ulaştıkları rapor edilmiştir (Kato, et al., 1992).

Bacillus cinsi bakterilerin PHB üretim yetenekleri üzerine yapılan bir kaç araştırmaya baktığımızda; *Bacillus megaterium* PV 302 suşu hücre kuru ağırlığının %16'sı kadar PHB biriktirmektedir (Lach, et al., 1990). *Bacillus megaterium* B-124 suşunun hücre kuru ağırlığının %20'si kadar PHB biriktirdiği rapor edilmiştir (Kato, et al., 1992). %2 Melas içeren besi ortamının PHB üretimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, *Bacillus megaterium* hücre kuru ağırlığının %46,2 oranında PHB sentezlediği bildirilmiştir (Gouda, et al., 2001). Bazı araştırmalarda ise, *Bacillus sp.* suşlarının hücre kuru ağırlığının %50'sini PHB şeklinde biriktirdiği ortaya konmuştur (Chen, et al., 1991; Dave, et al., 1996; Beyatlı, vd., 1999).

Bacillus sphaericus suşlarında PHB üretiminin %5,00 - 25,88 arasında gerçekleştiği rapor edilmiştir. Bu suşların geliştirildiği besi ortamlarına %0,2 oranında beef ekstrakt eklendiğinde bazı suşların %32,50 verimle PHB ürettiği belirlenmiştir (Mercan ve Beyatlı, 2001).

2.8.4 *Pseudomonas* cinsi bakterilerde PHB üretimi

Pseudomonas cinsi bakterilerde yapılan araştırmalar da, glukonat veya asetat gibi basit karbon kaynakları içeren besi ortamlarında, çeşitli *Pseudomonas* suşlarının, orta zincir uzunluğunda, 3-hidroksi yağ asitlerinden şekillenen (C6-C14) PHA biriktirme yeteneğinde olduğunu belirtmişlerdir (Hoffmann et al., 2000).

Pseudomonas aeruginosa, *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi bakteriler de, karakteristik bir özellik olarak karbon kaynakları varlığında ve sınırlayıcı şartlar altında PHB üretimi yapmazlar. Ancak, yağ asitlerinde üretilirlerse, orta zincir uzunluğunda PHA üretebildikleri rapor edilmiştir (Huisman, et al., 1989).

Metilotrofik organizmalardan olan bazı *Pseudomonas*'ların da PHB üretimi araştırılmış ve yüksek verim görülmüştür. *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas testotereni*, n-alkoller ve n-alkanoik asitler kullanılarak PHB üretimi gözlenmiştir (Holmes, 1985; Anderson and Dawes, 1990). *Pseudomonas extorquens* bakterisi, besi ortamına karbon kaynağı olarak metanol eklendiğinde, % 27 PHB üretimi saptamışlardır (Karaboz ve Umay, 1994).

Fakültatif metilotrof *Pseudomonas sp.*135 suşu üzerinde yapılan bir çalışmada metanol varlığında amonyumun (NH_4) sınırlı tutulduğu ortamda %55, magnezyumun (Mg^{+2}) eksikliğinde %42,5 ve fosfat (PO^{-3}) eksikliğinde ise %34,5 PHB verimi sağlandığı bildirilmiştir (Daniel, et al., 1992).

Pseudomonas stutzeri 1317 suşunu glukoz, glukonat, yağ asidi ve alkol içeren besi ortamında yetiştirmişler ve PHA yapısının ortamdaki yağ asidi ve alkollere bağlı olarak değiştiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, glukoz içeren besi ortamında 20. saatte başlayan nitrojen eksikliğinin hem hücre sayısı hem de polimer miktarında artmaya neden olduğunu ve %50 PHB verimine ulaştıklarını bildirmişlerdir (Xi, et al., 2000).

Besi ortamında karbon kaynağı olarak glukoz ve ksiloz kullanıldığında *Pseudomonas pseudoflava*'nın PHB verimi %22, arabinoz kullanıldığında %17 olduğu rapor edilmiştir. Arabinoz ve ksiloz içeren besi ortamlarında PHB birikiminin son aşamasında azot sınırlandırıldığında verim düşmektedir (Bertrand, et al., 1990).

2.8.5 *Rhizobium* cinsi bakterilerde PHB üretimi

Bitkilerde nodül oluşturan toprak bakterilerinden olan *Rhizobium* cinsi bakteriler de hücre içi PHB depo etme yeteneğine sahiptir. *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium galega*, *Rhizobium meliloti* ve *Rhizobium phaseoli* gibi farklı türlerle yapılan çalışmalarda da, PHB üretimlerinin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğu bildirilmiştir. Sükroz içeren besiyerinde, farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada, en yüksek PHB veriminin KNO₃'lü besiyerinde %65 ile *R. phaseoli* 'den elde edildiği bildirilmiştir (Beyatlı, 1985; Bonartseva, et al., 1994).

Rhizobium meliloti fruktozun karbon kaynağı olduğu besi ortamında yüksek oranda PHB sentezlediği bildirilmiştir (Jan, et al., 1996). *Rhizobium etli* CE3 suşu biotin ve tiamin vitaminlerinin eksikliğinde PHB depolama miktarının yükseldiği rapor edilmiştir (Encarnacio'n, et al., 1995).

2.8.6 Diğer bakterilerden PHB üretimi

Yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan halofilik bakterilerden olan *Halobacter mediterranei* 'nin, karbon kaynağı olarak glukoz ve nişasta kullanıldığında, fosfatı sınırlandırılmış şartlar altında %60 PHB sentezlediği bildirilmiştir (Lillo and Valera, 1990).

Fotosentetik bakteriler olan *Rhodospirillum* ve *Rhodobacter* cinsleri üzerinde yapılan araştırmalarda, bu cins bakterilerin n-alkanoik asitlerden polimer depo ettiğini, ayrıca nitrojenin sınırlandırılması durumunda % PHB veriminin hücre kuru ağırlığının %60 - %70'i kadar olabildiğini bildirilmiştir (Brandl, et al., 1991).

En büyük PHB sentaz genine sahip olan *Caulobacter crescentus* bakterisinin, glukoz varlığında % 18 PHB ürettiğini tespit etmişlerdir. Bu bakteri özellikle içerdiği

PHB sentaz enzimi nedeniyle dikkat çekmiş ve genetik uygulamaya tabii tutulmuştur (Qi and Rehm, 2001).

Laktik asit bakterilerinin de PHB üretimi için kullanılabileceği bildirilmiştir. *Lactobacil* cinsi bakteriler sürekli fermentasyon şartlarında geliştirilirse, daha fazla PHB biriktirdikleri ve bunun ticari termoplastik üretiminde de kullanılabileceği rapor edilmiştir (Beyatlı, 1996).

Azospirillum brasiliense Cd süşunun, ekşponansiyel fazın son aşamasında, yüksek C/N oranında, oksijen sınırlandırıldığında %5 olan PHB veriminin, %40'a ulaştığını bildirilmiştir (Tal and Okon, 1985).

2.9 PHB'yi Yıkıma Uğratabilen Organizmalar

Biyoplastiklere olan ilginin en önemli nedenlerinden biri, doğaya atıldığında petro kimyasal türevli plastiklere oranla çok kısa sürede toksik madde oluşturmaksızın parçalanabilmesidir. Bu parçalanma sürecinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler görev almaktadır (Madison and Huisman, 1999).

PHB'nin sentez mekanizması ve PHB'yi sentezleyen mikroorganizmaların araştırılması kadar biyolojik olarak parçalayabilme yeteneğine sahip mikroorganizmaların belirlenmesi de biyoparçalanabilir ürünlerin daha yaygın bir şekilde kullanılmasını artıracaktır.

PHB'nin parçalanmasında, topraktaki bir çok mikroorganizma görev alır (Lafferty, et al., 1988). PHB'leri parçalayan bakteriler dışında topraktaki funguslar da bu görevde yer almaktadırlar. PHB sentezleyen organizmalar toprak, kompostlar, aerobik ve anaerobik ortamlardan, göl-deniz suları ve hava gibi ekosistemlerden izole edildiklerinden, bu ekosistemlerden izole edilen bakterilerin üretmiş olduğu

biyoplastiklerin izole edildiği ekosistemlerde rahatlıkla biyolojik olarak parçalanabileceği rapor edilmiştir (Budwill, et al., 1996; Molitoris, et al., 1996).

PHB parçalayan organizmaların PHB depolimeraz enzimine sahip olması gerekmektedir. Bu enzimi üretebilen bakteri ve mantarlar, PHB'leri suda çözülebilen oligomer ve monomerlere hidrolize ederler (Abe, et al., 2000).

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

Comomonas sp., *Pseudomonas lemoignei* ve *Pseudomonas fluorescens* bakterilerinin PHB'lerin yüzey tabakasından itibaren biyolojik olarak parçaladıkları bildirilmiştir. Bakteriyel hidroliz sırasında polimerdeki morfolojik değişiklikler Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir (Molitoris, et al., 1996).

Aktif çamurdan izole edilen yeni bir denitrifikant kemoorganotrof bakteri PHB ve kopolimeri P(HB-HV)'ı aerobik ve anaerobik şartlarda parçalayabilmektedir (Khan and Hiraishi, 2001). Denizin anoksik kısmından izole edilen zorunlu anaerobik ve Gram negatif bir bakteri olan *Ilyobacter polytropus*'un 3-hidroksibütiratı, bütirata fermente ettiği belirlenmiştir (Stieb and Schink, 1984).

2.10 PHB'nin Üretiminde Kullanılan Substratlar

PHB üretiminde kullanılan susbtratlari, sentetik karbon kaynaklari ve endüstriyel atıklar olarak ikiye ayırmak mümkündür.

Sentetik karbon kaynaklari; glukoz, sükröz, yağ asitleri, alkanlar ve kloroalkanoik asitler, bütirik ve pentatonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit ve L-laktat gibi kaynaklar kullanarak mikroorganizmalar PHB sentezlenmektedir (Doi, et al., 1986;

Kato, et al., 1992; Tanaka, et al., 1993; Jan, et al., 1996). PHB ve kopolimerlerin kompozisyonu, kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak tesadüfi şekilde sentezlendiği bildirilmiştir (Doi, et al., 1986; Bloembergen, et al., 1986).

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

Azotobacter vinelandii UWD suşunu, glukoz ve balık peptonu içeren besi ortamında geliştirdiklerinde %80 PHB verimine ulaşmışlardır (Page, et al., 1995). *Rhizobium meliloti*'nin fruktozlu ortamda üretildiğinde yüksek miktarda PHB depo ettiği bildirilmiştir (Jan, et al., 1996). Karbon kaynağı olarak, L-Laktat eklenen besi ortamında geliştirilen *Alcaligenes eutrophus*'da %55 PHB birikimi tespit etmişlerdir (Tanaka, et al., 1993).

PHB üretiminde kullanılan sentetik karbon kaynakları fiyatının, PHB üretiminin ticari başarısında sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu ve polimer üretiminin her bir tonu için, 3 ton glukoz gerektiği bildirilmektedir (Page, 1992a). Kullanılan glukozun, PHB üretim maliyetini yükseltmesi sonucunda PHB'nin kg fiyatı 15-30 dolar arasında değişmektedir (Witholt and Kessler, 1999).

Glukozun PHB üretiminde maliyeti arttırdığı ve maliyet artışının istenmeyen bir durum olduğu, bunun için daha ekonomik karbon kaynakları kullanımının tercih edilmesi gerektiği rapor edilmiştir (King, 1982).

PHB üretim maliyetlerini düşürmek için, rekombinant türler üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca endüstriyel atık karbon kaynakları kullanılarak yüksek PHB verimi elde eden suşlar üzerinde araştırmalar da yapılmaktadır (Witholt and Kessler, 1999).

Endüstriyel atık karbon kaynakları, melas, ksiloz, arpa ve soya atık suları, peynir altı suyu gibi kaynaklar kullanılarak yüksek verimli ama düşük maliyetli PHB üretimi üzerine birçok çalışma yapılmaktadır (Ahn, et al., 2000; Gouda, et al., 2001; Law, et al.,

2001; Wu, et al., 2001). PHB üretim maliyetlerinin düşürülmesi için kullanılan melas, bakteriler için karbon kaynağı olmanın yanı sıra içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Beaulieu, et al., 1995).

Azotobacter vinelandii UWD suşunun şeker pancarı melası gibi kompleks karbon kaynaklarında da yüksek PHB verimine sahip olduğunu saptamıştır (Page, 1992a). İyi bir polimer üreticisi olan *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun, ekonomik karbon kaynağı olan şeker pancarı melasında üretildiğinde, glukozun üçte biri maliyete mal olduğunu ve eğer ortama valerat ilave edilirse P(HB-co-HV) kopolimerinin oluştuğunu bildirmiştir (Page, 1992b).

Rekombinant *Escherichia coli* peynir altı suyu içeren besi oratmında geliştirilmiş ve hücre kuru ağırlığının %20'si kadar PHB verimi elde edilmiştir (Kim, 2000).

2.11 PHB'nin Kullanım Alanları

Endüstriyel olarak üretilen biyoplastikler polietilene oranla dört kat daha fazla serttir. PHB'nin petrol kökenli polipropilene göre daha kristal yapıda olması, özgül ağırlığının daha yüksek oluşu, UV'ye dirençliliği gibi bazı özelliklerinden dolayı üretiminin daha iyi bir seçenek olduğu bildirilmiştir (Barham, et al., 1984; Beyatlı, 1996). PHB'nin doğaya bırakıldığında tamamen parçalanabilmesi, çevre kirliliği yaratmaması gibi özelliklerinden dolayı endüstriyel uygulamalar açısından önemi her geçen gün artmaktadır (Page, et al., 1995; Lee, 1996).

Biyoplastikler ilk olarak şişelerin ve paketleme malzemelerinin imalatında kullanılmaya başlanmıştır (Steinbüchel and Fuchstenbusch, 1998; Angelova and Hunkeler, 1999). Daha sonraları biyoplastiklerin tıp, tarım, veterinerlik ve kimyasalların eldesi gibi alanlarda kullanıldığı bilinmektedir (Holmes, 1985).

PHB'nin medikal alanda kullanımı: Biyoplastikler biyoyumlu olmaları ve hayvan dokularında toksik etkiye neden olmamalarından dolayı medikal ürünlerin üretiminde kullanılabilir. Ayrıca biyoplastik maliyetinin yüksek oluşu nedeniyle diğer sektörlerden daha çok tıp ve eczacılık alanında kullanılabilir.

PHB monomerleri insan vücudunda çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur. Bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü salınımı için test edilmiştir. Bu tür çalışmalarda ilaç, PHB'den yapılmış bir hap içine sıkıştırılmış ve ağız yoluyla hastalara verilmiştir. PHB depolimeraz enzimine insanlar sahip olmadığı için PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. PHB'nin bu özelliğinden dolayı, pansuman sargısı, cerrahi dikişler, yapay kan damarları, protezler, ortopedik plaka, çubuk, vida ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında ham madde olarak kullanılmaktadır (Holmes, 1985).

PHB ve kopolimerlerinin önemli bir özelliği de polipeptitler, polinükleotitler, polisakkaritler ve proteinler gibi piezoelektrik polimer olmasıdır. PHB ve kopolimerleri polivinilidon, florit polimerleri gibi kesikli piezoelektrisite göstermektedir. Poliviniliden florit polimerinin flimleri kemiği elektriksel stimülasyonla kuvvetlendirebildiği ve kemiğin onarıldığı bilinmektedir. Bu durumda bir kemik kırığını sabitleyen levhalar benzer mekanik özelliklere sahip takviyeli bir PHB karışımından yapılırsa, uyarılan kemik büyür ve gelişir. Böyle bir kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından bulunduğu yerde yavaşça emilebilir. Bu süreçte kemik kaynar ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir operasyona gerek kalmaz (Holmes, 1985; Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Kronik osteomyelitis hastalarının tedavisinde biyoyumlu, biyoparçalanabilir ve kemik geçirgenliğini sağlayan piezoelektrik özellikleri bulunan P(HB-co-HV) kopolimerinden hazırlanan kapsüllere antibiyotik yüklenerek kullanılmıştır. Ayrıca ilaç salınım etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, tavşanın tibia kemiği içine yerleştirilecek kapsül, PHB'den üretilmiş ve antibiyotik yüklenerek yapılan denemelerde kopolimerin antibiyotik taşıyıcı bir sistem olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (Yağmurlu vd., 1999).

Hastanelerde kullanılan cerrahi sargı ve eldivenler için PHB yağlayıcı madde olarak veya toz formunda kullanılabilir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

PHB'nin medikal alanındaki çalışmalarından en ilginç ise, uygun ölçülerde su geçirmez bir tüp formunda düzenlenen çok ince fibrillerden meydana gelen kan damarı veya vasküler aşı gibi kullanılmasına yönelik araştırmalardır. PHB'den üretilecek vasküler aşılar vücut içinde gelişen yeni dokular için geçici yapı iskelesi görevi görür ve sonuçta doğal dokular tarafından tamamen eski haline gelebilir. PHB'den üretilen kan damarında ise vücudun doğrudan tepkisini alan sentetik damarlardaki engelleme ve pıhtı oluşum problemi gözlenmez (Holmes, 1985; Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Yapılan bir çalışmada, bakteriyel poliester, P(HB-co-HV)'dan elektrospin tekniği ile yönlendirilmiş nanofibriler doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen doku iskeleleri sıçan periferik sinir doku onarımında kullanılmıştır (Demirbilek, 2011).

PHB'nin doğrudan kullanılması ile ilgili birçok ürün geliştirilmiştir. Ancak PHB depolimerizasyon ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da çok yaygındır. Çünkü bu monomer tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşiğidir; lipit metabolizmasının ürünü olarak bulunur ve insan kanının normal bir ögesi (Holmes, 1985). D(-)-3-hidroksibütirik asit beyin ve kalp dokusu için enerji kaynağı olarak rol oynar ve beyin gelişiminde rol alan aminoasitlerin prekürsörü olarak fizyolojik bir role sahip olduğu saptanmıştır. D(-)-3-hidroksibütirik asidin damar içi veya ağızdan karbon ihtiyacının sağlanması için kullanılabileceğini ve daha yaygın olarak kullanılan glikoz yerine bazı klinik avantajlara da sahip olduğunu gösterilmiştir. İlginç olan bir diğer çalışmada da, çok şişman hastalar, 14 gün boyunca terapötik açlık altında tutulduklarında hiç açlıktan şikayet etmemişlerdir (Holmes, 1985).

PHB'nin veterinerlik alanında kullanımı: Veteriner hekimliğinde ilaçların salınımı için biyolojik parçalanabilen bir matriks olarak PHB'nin birçok kullanım alanı vardır. Polimer özellikle sığırların rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir. Bu konuda çok tipik bir örnek olarak bir yıl boyunca hayvanların kurtlanmasını önlemek için antihelmitik ilaç içeren PHB'nin büyük kapsülleri yapılmıştır. Çiftçiler, ilacı, yönetmelikte önerilen dozda iki ayda bir sığırların etrafına bırakarak onların parazitlenmesini engellemişlerdir (Holmes, 1995).

PHB'nin ziraat alanında kullanımı: Toprakta parçalanma gerektiren uygulamalar ve kaplama işlemlerinde kullanılabilir. PHB'ler, ekin sulaması için yapılan olukların üretiminde, tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre ve pestisitlerin kontrollü salınımında plastik kılıflar olarak da kullanılabilir (Holmes, 1985).

PHB'nin kimyasalların eldesinde kullanımı: Antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve feromonlar gibi kimyasalların sentezinde kiral yapı blokları olarak, kiral bir merkeze ve iki fonksiyonel gruba (-OH, -COOH) sahip olan (R)-(-)-hidroksi asitler kullanılmaktadır (Lee, et al., 1994). PHB oldukça aktif bir bileşik olup D-(-) konfigürasyonundadır. PHB solüsyonları ve PHB'den yapılan filmler içlerinden geçen polarize ışığın konumunu değiştirmektedir. Bu optik izomerler buldukları ortamda kiral merkezlerinden dolayı kuvvetli bağlanma özelliğine sahiptirler ve kromatografide kullanılabilirler. Bu nedenle PHB'nin yağ/su emülsiyonları için emülsifikasyon ajanı olarak kullanılması da mümkün olmaktadır (Holmes, 1985).

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

PHB'nin paketlenme filmleri ve tek kullanımlık malzemelerin yapımında kullanımı: PHB ve kopolimerlerinin mekanik özellikleri polietilen, polipropilen vs. gibi bazı ticari plastiklere benzediğinden termoplastik poliesterlerdir. PHB daha kırılabilir olması ve zayıf çözgen dayanıklılığı dışında, polipropilenle benzer özelliklere sahiptir (Lafferty, et al., 1988). Düşük su buharı geçirgenliği gibi besin paketlenme endüstrisi açısından önemli olan bir özelliği ile de, düşük yoğunluklu polietilene benzemektedir (Weber, 2000). Kopolimerler ise daha esnektir ve daha düşük erime sıcaklığına sahip olduğundan, preslenmiş ürünlerin imalatı için daha kullanışlıdır. Diğer taraftan sadece belirli bakteriler tarafından üretilen uzun yan zincirli (C₄-C₁₂) polimerler, daha düşük erime noktaları ve cam geçirgenlik sıcaklığına sahiptir. Bu materyaller lastik benzeridir ve gerçekte bir termo-elastomerdir (Lafferty, et al., 1988).

PHB kolay şekil alabildiğinden ve parçalanabilme özelliğinden dolayı daha çok paketlenme malzemesi olarak kullanılmaktadır (Madison ve Huisman, 1999). PHB ve kopolimerleri preslenebilmekte, biçimlendirilebilmekte, lif haline dönüştürülebilmekte, filmleri yapılabilme ve sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir. Biyolojik olarak parçalanabildiklerinden tek kullanımlık ürünlerin üretimin de biyoplastiklerin kullanımı artmıştır. Tıraş bıçağı, hijyenik kadın ürünleri, çocuk bezleri, tek kullanımlık mutfak malzemeleri, şampuan şişeleri gibi ürünlerin imalatında kullanılmaktadır (Lafferty, et al., 1988).

Ayrıca, biyoplastikler, özellikle uzun yan zincire sahip olan PHB'ler, basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılabilirler. Lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların üretiminde de PHB kullanılmaktadır (Madison and Huisman, 1999; Weber, 2000; Lootz, et al., 2001). Taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı korumada, parlaklık sağlamada, aroma kaybını önlemek amacıyla da PHB kullanılmaktadır (Lee, 1996).

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

İzolatların üretiminde, PHB üretimi için polimer ortamında, PHB ekstraksiyonunda ve PHB üretim miktarının belirlenmesinde kullanılan bütün kimyasallar analitik saflıkta olup Merck ve Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan besi ortamları

Minimal Salt Medium Agar:

K_2HPO_4	: 5,6 g
KH_2PO_4	: 2,1 g
NH_4Cl	: 2,7 g
$MnSO_4.H_2O$: 0,05 g
$MgSO_4.7H_2O$: 0,19 g
$FeSO_4.7H_2O$: 0,001 g
$CaCl_2.2H_2O$: 0,003 g
Maya özütü	: 0,05 g
$C_2H_3KO_2$: 1 g

Glikoz : 20 g
Agar : 15 g
Distile Su : 1000 ml

121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Nutrient Agar:

Nutrient agar : 20 g
Distile Su : 1000 ml

121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Nutrient Broth:

Nutrient broth : 8 g
Distile Su : 1000 ml

121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

***Alcaligenes eutrophus* için Besi Ortamı:**

Glukoz : 10 g
Yeast ekstrakt : 2 g
Bacteri pepton : 2 g
K₂HPO₄ : 1 g
KH₂PO₄ : 1 g
(NH₄)SO₄ : 1 g
MgSO₄.7H₂O : 0,05 g
Distile H₂O : 1000 ml

HCl asit ile pH 7.0 ayarlanmıştır. 110 °C’de 25 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Polimer ortamı:

Sükroz	: 20 g
K ₂ HPO ₄	: 1,5 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	: 4,7 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	: 0,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	: 0,01 g
Citric Acid	: 0,1 g
İz Element Çözeltisi	: 1 ml
Distile H ₂ O	: 1000 ml

Polimer ortamı HCl asit ile pH 7.0 ayarlanmıştır. 110 °C’de 25 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

İz element:

FeSO ₄ .7H ₂ O	: 0,02 g
H ₃ BO	: 0,3 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	: 0,2 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	: 0,03 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	: 0,03 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	: 0,03 g
NiSO ₄ .7H ₂ O	: 0,03 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	: 0,01 g
Distile H ₂ O	: 1000 ml

3.1.3. Kullanılan çözeltiler**Kristal Violet**

Kristal violet	: 2 g
Etil Alkol %95	: 20 ml

Amonyum oksalat : 0,8 g

Distile Su : 80 ml

Bu iki çözelti ayrı ayrı hazırlandıktan sonra karıştırılmıştır.

Lugol

Potasyum iyodür : 2 g

Distile Su : 100 ml

İyot : 1 g

Potasyum iyodür ve distile suda iyice çözüldükten sonra, iyot eklenmiştir. Karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

Safranin

Safranin : 0,25 g

Distile Su : 90 ml

Safranin, distile su içinde iyice çözülmüştür.

TAE 50X

Tris base : 242 g

Asetik asit : 57,1 ml

EDTA (0.5 M pH8) : 100 ml

Distile su : 1000 ml

pH 8'e ayarlanarak oda sıcaklığında saklanır (Sambrook, et al., 1989).

3.2 Yöntem

3.2.1. İzolasyon çalışmaları ve Mikroskopik incelemeler

Eskişehir Organize Sanayi Bölgesinde belirlenen ve uzun süre hidrokarbon türevleri için alıcı ortam olarak kullanılmış alanlar izolasyon çalışmaları için seçilmiştir.

Hidrokarbonla kirlenmiş farklı istasyonlardan aseptik şartlarda alınan toprak örnekleri +4°C'de muhafaza edilerek, laboratuara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen toprak örnekleri izolasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Toprak örneğinden 10 g alınarak 90 ml steril serum fizyolojik çözeltilinde (%0.9) süspanse edilmiş ve bu çözeltiden 10^{-5} 'e kadar seri seyreltmeler yapılmıştır. Her seyreltmeden 100 µl alınarak yayma plaka yöntemi ile minimal salt medium agar besi ortamına ekim yapılmıştır. 35°C'de 48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında besi ortamında tek düşmüş farklı morfolojik görünüme sahip koloniler seçilerek ayrı petrilere ekimler yapılmış ve izolatların saf kültürleri elde edilmeye çalışılmıştır. Bu koloniler daha sonraki çalışmalar için Nutrient Agarda, +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Saf kültürler elde edildikten sonra hücre morfolojileri, basit boyama teknikleri ile ışık mikroskopunda incelenmiştir. Gram reaksiyonları da Gram boyama tekniği ile belirlenmiştir.

3.2.2 İzolatların PHB üretim yeteneklerinin belirlenmesi

Hidrokarbonla kirlenmiş topraklardan izole edilen mikroorganizmaların PHB üretim yeteneklerinin taranması için öncelikle, +4°C'de muhafaza edilen saf stok kültürlerden 50 ml hacimde nutrient broth (NB)'a ekim yapılarak, 35°C, 150 r.p.m.

çalkalama hızında, 48 saat süreyle inkübasyona bırakılarak kültürler aktifleştirilmiştir. Aktifleştirilen kültürlerden aşı kültürü hazırlanarak 250 ml'lik erlenlerde 100 ml hacimde hazırlanan NB besiyerlerine %2 v/v oranında ekim yapıp, 35°C, 150 r.p.m. ayarlanmış olan çalkalamalı etüvde 48 saat inkübe edilmiştir.

İzolatlar NB besi ortamında geliştirildikten sonra, izolatların PHB üretebilmesi için yüksek karbon kaynağı içeren ancak büyüme için gerekli temel besin maddelerin sınırlı olduğu polimer ortamı hazırlanmıştır. N.B'da gelişen izolatlar, polimer ortamına aktarılması için steril santrifüj tüplerinde 6000 r.p.m.'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılıp, hücrelerin pelletleri polimer ortamına aktarılmıştır.

Polimer ortamına aktırılan izolatlar, 35°C, 150 r.p.m. ayarlanmış olan çalkalamalı etüvde 48 saat inkübe edilmiştir. Polimer ortamındaki inkübasyon süresi sonrasında intraselüler olarak biriktirilen biyoplastik ekstrakte edilmiştir.

3.2.3 PHB ekstraksiyonu, presipitasyonu ve ölçümü

Polimer ortamı steril santrifüj tüplerinde 6000 r.p.m.'de 20 dk. santrifüj edilmiştir ve süpernatant kısmı ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Santrifüjden sonra elde edilen pelletler -80°C'de 1 gece bekletilmiştir. Pelletler çözündükten sonra üzerlerine 5 ml sodyumhipoklorid eklenerek vortekste karıştırılmıştır. Daha sonra 37 °C'deki çalkalamalı su banyosunda 1 gece bekletilmiştir. Pellet-Sodyumhipoklorid karışımı 6000 r.p.m.'de 20 dk. santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Lipid ve diğer molekülleri ekstrakte edebilmek için, pelletlerin üzerine 5 ml etanol eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra 6000 r.p.m.'de 20 dk santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan pelletlerin üzerine 5 ml kloroform eklenmiştir ve tüpler vortekslelendikten sonra 60 °C'lik çalkalamalı su banyosunda PHB çözünene kadar bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra PHB ekstraksiyonun tamamlandığı

her tüpten 0,1'er ml alınarak, 60 °C'lik etüvde kloroform tamamen uçurulana kadar bekletilmiştir. Kloroformun uçurulmasıyla ekstrakte olan PHB sıvı fazdan kristal faza geçmiştir. Kristalleşen PHB'nin üzerine 5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilerek 100°C'deki su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler soğuduktan sonra 235 nm dalga boyundaki spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen değerler Sigma-Aldrich Cheme' den temin edilen standart PHB için çizilen standart grafiklerle karşılaştırılmıştır.

3.2.4 PHB standart grafiğinin hazırlanması

Standart grafiğin hazırlanması amacıyla Sigma-Aldrich Cheme den temin edilen saflaştırılmış ve toz haline getirilmiş standart PHB kullanılmıştır.

Standart grafik için PHB'nin 2,5 – 100 µg/ml'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Bunlar 100 °C'de 10 dakika ısıtılarak krotonik asite dönüştürülmüştür. 235 nm dalga boyunda absorbans ölçülerek PHB'nin µg/ml'ye karşılık gelen standart grafiği elde edilmiştir (Ömeroglu ve Karaboz, 2010).

3.2.5 PHB üretimi açısından en etkin izolat(lar)ın seçilmesi

Hidrokarbonla kirli topraklardan izole edilmiş 42 izolatın PHB üretim yetenekleri taranmıştır. Bu çalışmada hücre kuru ağırlığına oranla en yüksek PHB üretme yeteneğine sahip izolatın seçilmesi amaçlanmıştır. Tarama çalışması sonucunda en yüksek PHB verime sahip olan izolat seçilmiştir.

3.2.6 Kùltürlerin molekùler yöntemler ile tanımlanması

PHB üretimi açısından en etkin izolatın türünün belirlenmesinde, molekùler teknikler kullanılmıştır.

3.2.6.1 DNA ekstraksiyonu

Çalışmada biyoplastik üretimi açısından etkin izolatın 16S rRNA geni amplifikasyonları için agar ortamı üzerinde geliştirilmiş olan kùltürden tek koloni alınarak 200 µl steril distile su içinde resüspanse edilerek 95 °C'de 15 dakika bekletilmiştir. 13.000 r.p.m'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatant kısmı yeni bir steril tüpe aktararak, PCR için buradan 1 µl kalıp olarak kullanılmak üzere, -20°C'de muhafaza edilmiştir (Anton, et al., 1999; Dyall-Smith 2004).

3.2.6.2 16S rRNA geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifikasyonu

Elde edilen izolat için 341 ileri ve 907 geri primerleri kullanılmıştır. Bu primerler AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG ve GGT TAC CTT GTT ACG ACT T dizilimindeki primer kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jellerde gözlenmiştir.

Reaksiyon için uygulanan reaksiyon şartları aşağıdaki gibi olmuştur;

94 °C 3 dakika (Denatürasyon),

94 °C 30 saniye }
 50 °C 1 dakika } 30 döngü
 72 °C 1 dakika
 72 °C 10 dakika
 4 °C Süresiz

3.2.6.3 PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR ürünlerinin saflaştırılması amacıyla özel saflaştırma kiti (Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System) kullanılmıştır. Buna göre %1 lik jelde yürütülen PCR ürünleri UV transilluminator üzerinde gözlenerek, steril bisturi ucu ile istenilen bantlar agaroz jelden kesilmiştir. DNA içeren agaroz parçaları tartılarak, bunların üzerine her 10 mg için 10 µl olmak üzere membran bağlama çözeltisi eklenmiştir. Tüp hafifçe vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 60°C’de 5-15 dakika (agaroz tamamen eriyinceye kadar) su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda GFX kolonu “toplama tüpü” içine yerleştirilmiş ve su banyosundan çıkarılan örnek kolona konarak 13000 r.p.m de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpünde toplanan sıvı atılıp filtre yeniden tüpe yerleştirilerek üzerine 700 µl yıkama tamponu eklenip tekrar 13000 r.p.m de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atılarak kolona yeni bir toplama tüpü yerleştirilerek üzerine 50 µl elusyon buffer (otoklavlanmış distile su) eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyondan sonra 13000 r.p.m de 1 dakika santrifüjlenerek saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

3.2.6.4 PCR ürünlerinden dizi analizi

Topraktan izole edilen PHB üreticisi organizmanın, DNA ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen DNA'nın 16S rRNA geni PCR ile çoğaltılarak direkt olarak dizi analizlerinin eldesi yoluna gidilmiştir. Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı ile bu elde edilen PCR ürünlerinin baz dizilerinin belirlenmesi amacıyla Beckman dizi analiz kitinde önerilen şartlar ile sonuçlar alınmıştır.

Dizileme işlem için Beckman Coulter GenomaLab™ DTCS Quick Start Kiti kullanılmıştır.

Kit in önerdiği şartlar doğrultusunda reaksiyona 0.65 µl primer (341F ve 907R), 1.35 µl DEPC'li su, 2 µl kalıp ve 6 µl Beckman dizi analiz karışımı eklenmiştir. Dizi analizi PCR koşulları aşağıda verilmiştir:

30 döngü

96 °C 20 saniye

50 °C 20 saniye

60 °C 4 dakika

Dizi analizi PCR sonrasında bağlanmamış primer ve dNTP'lerin reaksiyondan uzaklaştırılması için 4 µl stop solusyonu (3 M NaOAc pH:5.2, 100 mM EDTA pH:8, glikojen, DNaz-RNaz içermeyen su) reaksiyona eklenmiştir. Karışım üzerine PCR reaksiyonu kadar manyetik boncuk (Beckman Coulter Agencourt Clean SEQ) eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. 55 µl %73'lük isoproponal tüplere eklenmiş ve 10-15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu esnada boncukların çökmemesi için karışım karıştırılmıştır. Süre bitiminde tüpler magnete yerleştirilmiş ve 3-5 dk bekleme süresi ardından, supernatant kısmı dikkatlice alınmış ve atılmıştır. Magnetteki tüplere 200 µl %73'lük isoproponaldan eklenmiş ve 3 dk beklenmiştir. Süre bitiminde supernatant alınmış ve yine 200 µl %73'lük isoproponal magnetteki boncuk içeren tüplere ilave edilmiştir. 3 dk beklendikten sonra tüpler alınmış ve 10-20 dk oda sıcaklığında

boncukların kuruması sağlanmıştır. Kuruyan boncuklara 40 µl Sample Loading Solution (SLS) eklenmiş ve boncukların tamamen çözünmesi sağlanmıştır. SLS ile çözünen örnekler tekrar magnete alınarak 5 dk beklenmiş ve 35 µl supernatant dizi analizi plağına koyulmuştur. Örneklerin cihazda analizi boyunca uçmaması için örneklerin üzerine mineral yağı damlatılmıştır. Ayrımın gerçekleştirilmesi için başka bir plağına seperasyon çözeltisi (GenomaLab™ Separation Çözelti 4x30 ml), sistemim çalışması için gerekli olan seperasyon jeli (GenomaLab Separation Gel LPAI) ve hazırlanan örnekler Beckman CEQ 8000 DNA dizi analiz cihazı kapiller sistemine verilmiştir. İzolatın dizi analizi sonrası gen analizi; NCBI ‘National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) veritabanındaki nükleotid BLAST (Altschul, et al., 1997) programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 PHB üretim veriminin artırılması için optimizasyon çalışmaları

PHB üretim verimini artırmak amacıyla, farklı karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisi araştırılmış ve karbon kaynağı miktarı, ortam pH’ı, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi gibi parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır.

PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisini belirlemek amacıyla; sentetik ve endüstriyel atık karbon kaynaklarının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla sentetik karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisini belirlemek için polimer ortamı modifiye edilmiştir. Glukoz, fruktoz, mannitol, gliserol, nişasta ve maltoz 20 g/l oranında polimer ortamına eklenerek elde edilen PHB ile sükroz içeren polimer ortamında üretilen PHB verim açısından karşılaştırılmıştır.

Endüstriyel atıkların PHB üretimi üzerine etkisini belirlemek için yapılan çalışmada; Eskişehir Şeker Fabrikasından melas, vinas, Balıkesir Edremit ilçesinde 3 fazlı zeytinyağı fabrikasından zeytin kara suyu, Balıkesir civarındaki mandıradan peynir

altı suyu temin edilmiştir. Bu endüstriyel atık karbon kaynakları %3 oranında hazırlanmış ve pH'ı 7 ye ayarlanarak PHB üretim verimleri değerlendirilmiştir.

PHB üretim veriminin artırılması amacıyla karbon kaynağı miktarının belirlenmesi çalışmalarında karbon kaynağı miktarı %1-3-5-10-15-20-30 değiştirilerek kuru biyokütle başına PHB üretim verimleri değerlendirilerek uygun karbon kaynağı miktarı belirlenmiştir.

Uygun karbon kaynağı miktarı belirlendikten sonra polimer ortamının pH'ı 4-5-6-7-8-9'a ayarlanarak pH değerinin PHB üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

PHB üretim verimi açısından uygun inkübasyon sıcaklığı değerinin belirlenmesi amacıyla 25-30-35-40°C sıcaklıklar çalışılmış ve PHB miktarları belirlenmiştir.

Son olarak uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi amacıyla 12-24-36-48-60-72 saatlik inkübasyon periyotları denenmiştir. Tüm parametreler için denemeler en az 3 tekrarlı ve bir birinden bağımsız olarak yapılmıştır. PHB üretim verimleri kuru biyokütle başına üretilen PHB miktarı açısından değerlendirilmiştir. PHB ekstraksiyonu ve ölçümleri 3.2.3 ve 3.2.4'te verilen yöntemler izlenerek yapılmıştır.

3.2.8 Sükroz ve melastan üretilen PHB'nin karakterizasyonu

PHB üretimi için sükrozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı polimer ortamında ve melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamında üretilen PHB'nin karakterizasyonu yapılmıştır. Sentezlenen PHB'nin kimyasal ve moleküler yapısı Sigma-Aldrich Cheme den temin edilen saflaştırılmış PHB ve ticari suş olan *Alcaligenes eutrophus* DSM 545'in sentezlediği PHB ile karşılaştırma yapılmıştır. *A. eutrophus* DSM 545 suşu Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji Nanotıp Anabilim dalından temin edilmiştir. Ayrıca sentezlenen PHB'lerin moleküler ağırlığı ve termal davranışları da belirlenmiştir.

Üretilen PHB'nin kimyasal yapılarını belirlemek üzere fourier transform infrared spektroskopi (FTIR) çalışması yapılmıştır. Bu amaçla; ticari suş olan *A. eutrophus*'dan sentezlenen ve tez çalışması kapsamında izole edilen *Bacillus megaterium* türünün sentezlemiş olduğu PHB potasyum bromür (KBr) ile %1 olacak şekilde karıştırılarak pres yardımıyla incelemeye hazır diskler haline getirilmiştir. Hazırlanan örneklerin FTIR (Nicolet iS10, ABD) spektrumları alınmıştır. Bu analizler Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Ayrıca Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen ve *Bacillus megaterium*'un karbon kaynağı olarak melası kullanması sonucu sentezlemiş olduğu PHB'nin kimyasal yapısını belirlemek için PHB'lerden 50 mg örnekler hazırlanarak Perkin Elmer 100 FT-IR cihazında spektrumları alınmıştır. Bu analiz Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fizik Bölümü Laboratuvarı'nda yapılmıştır. FTIR analizi sonucunda elde edilen karakteristik bantlar, yapısal kompozisyonun değerlendirilmesinde kullanılmıştır.

PHB'in moleküler yapısını belirlemek amacıyla proton Nükleer Manyetik Rezonans NMR (Bruker 400 MHz AV) çalışmaları yapılmıştır. Biyolojik moleküllerin çözelti içinde üç boyutlu yapıları hakkında ayrıntılı bilgi veren bir yöntemdir. Proton NMR çalışma ilkesi; çekirdeklerin 4-900 MHz (75m-0,33m) Radyo frekansı aralığındaki elektromanyetik ışınların absorpsiyonuyla dönme enerj seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanır. Proton NMR spektroskopisi kovalent bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılır. Bu analizler Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Üretilen biyoplastiğin moleküler ağırlığını (viskozite-ortalama molekül ağırlığı (M_v)) Ubbelohde Kapiler Vizkozimetre kullanılarak belirlenmiştir. Kloroformda, 0,1 g/10 ml (v/w), polimer çözeltisi hazırlanmıştır. Polimerin viskozite (akışmazlık) ölçümleri, 25°C'de yapılmıştır. Polimerin akış süresi, seri dilüsyon tekniği ile ölçülmüştür. Akış süresi ölçümlerine göre, belirli viskozite relative viskozite (nr), sonrasında spesifik viskozite (nsp) ve inherent viskozite ($Ln(nr)$) hesaplanmıştır. Daha sonra nsp/c ve $Ln(nr)/c$ grafikleri çizilerek $[\eta]$ değeri belirlenmiştir ve Mark-Houwink-Sakurada denklemi ($[\eta]=K \times M_w^a$) ile PHB'nin M_v değeri hesaplanmıştır. Hesaplamalarda PHB için "K sabiti" değeri 0.019, PHBV için ise "K sabiti" değeri 0,0118 alınmıştır (Fiorese, et al., 2009). Her iki polimer için " α sabiti" değeri 0,78

alınmıştır. Bu analiz ve hesaplamalar. Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Üretilen biyoplastiğin termal davranışlarını belirlemek için diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanılmıştır. PHB'lerin erime sıcaklığı (T_m), kristallenme sıcaklığı (T_c) ve camsı geçiş sıcaklığı (T_g) değerleri DSC (DSC-60 Shimadzu) analizi ile belirlenmiştir. DSC kararlı çevre şartlarında tutulan bir çift mikro kalorimetreden ibarettir. Bunlarda biri incelenen örneğe, diğeri referans maddeye aittir. Örnek ve referans kalorimetrelerin ısıtıcıları elektrikli güç ilavesi ile yaklaşık aynı programlanmış sıcaklıkta sabit tutulur ki kalorimetreye bağlanmış güçler arasındaki fark, örnekteki enerji değişim hızını ölçer ve zamanın bir fonksiyonu olarak kaydeder. DSC çalışmaları için 0,6-1,2 mg polimerler -20° den 300° C'ye kadar ısıtılmıştır. Polimere uygulanan ısı ve polimerin faz değişimi DSC diagramının çiziminde kullanılmıştır (Buzarovska and Grozdanov, 2009). Analizler Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

BÖLÜM 4

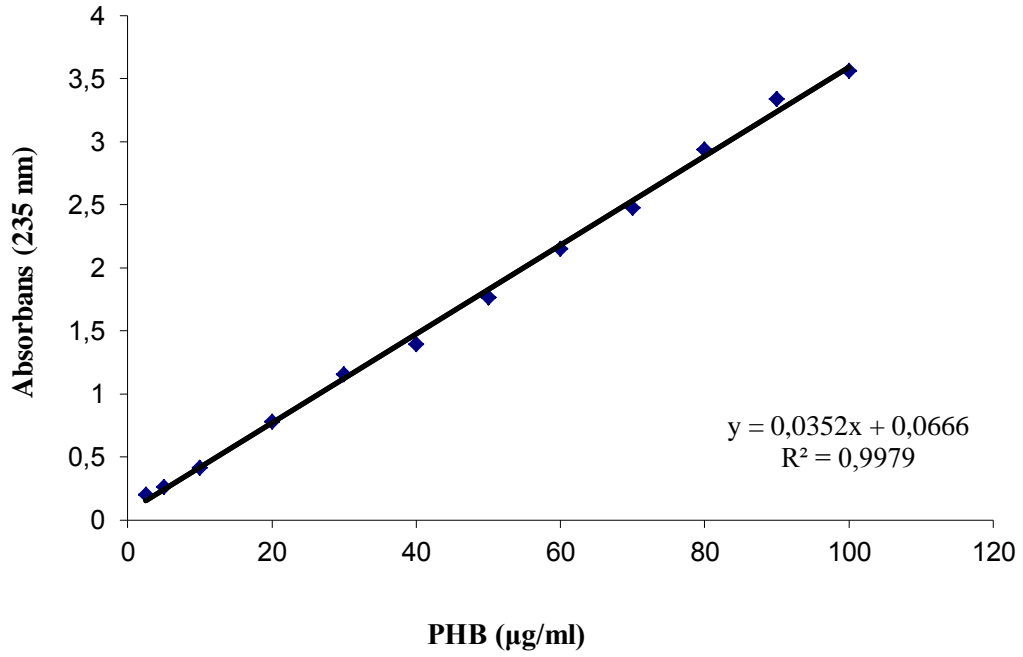
4. BULGULAR

4.1 İzolasyon Çalışmaları

Eskişehir Organize Sanayi bölgesinde hidrokarbonla kirlenmiş topraklardan bakteri izolasyonu için toprak örnekleri alınmıştır. İzolasyon çalışmasında 42 farklı izolat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan izolatların hücre morfolojileri basit boyama teknikleri ile belirlenmiştir. Gram özellikleri ise Gram boyama tekniği kullanılarak belirlenmiştir. İzolatların morfolojik özellikleri ve gram özellikleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

4.2 PHB Standart Grafiği

PHB standart grafiği 3.2.4 deki yöntem kullanılarak çizilmiştir.



Şekil 4.1 Krotonik asit formundaki standart PHB'nin 235 nm dalga boyunda miktara bağlı (µg/ml) standart grafiği

4.3 İzolatların Polimer Ortamında Büyütülmesi

İzolasyon çalışması sonucunda elde edilen 42 izolatın PHB üretme yetenekleri taranmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, 42 izolattan, 36 izolatın eser miktarda, 6 izolatın ise %1 den fazla miktarda PHB üretme yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmada, A1 %44.30 – 81,46, B1 %4.58, B2 %1.49, B5 %8.70, B10 %3.82 ve B27 %3.31 PHB verimi gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında sonraki aşamalarda en yüksek PHB verimine sahip olan A1 izolatı kullanılmıştır.

Çizelge 4.1 İzolatların Morfoloji ve Gram özellikleri, hücre kuru ağırlığına oranla PHB miktarları

No	İzolat	Hücre Morfolojisi	Gram reaksiyon	Konsantrasyon (g/l)	Kuru Biyokütle (g/l)	% PHB
1	A1	Basil	-	0,2077	0,255	81,46
	A1	Basil	-	0,2370	0,535	44,30
	A1	Basil	-	0,3266	0,681	47,96
2	A2	Basil	-	0,0047	1,478	0,32
3	A3	Stafilokok	+	0,0014	1,345	0,10
4	A5	Kok	+	0,0017	2,692	0,06
5	A7	Basil	-	0,0077	2,560	0,30
6	A8	Basil	-	0,0014	1,518	0,09
7	A9	Kok	-	0,0010	1,950	0,05
8	A10	Kokobasil	-	0,0011	0,969	0,12
9	A11	Kok	+	0,0019	2,311	0,08
10	A12	Stafilokok	+	0,0007	1,638	0,04
11	A14	Basil	+	0,0018	2,662	0,06
12	A15	Basil	-	0,0016	1,693	0,09
13	A17	Kokobasil	-	0,0041	0,716	0,58
14	A18	Kok	-	0,0015	0,681	0,22
15	A19	Kokobasil	-	0,0009	1,345	0,07
16	B1	Basil	-	0,0298	0,652	4,58
17	B2	Kokobasil	-	0,0020	0,139	1,49
18	B3	Kokobasil	-	0,0051	1,601	0,32
19	B4	Basil	-	0,0013	0,307	0,45
20	B5	Basil	-	0,1412	1,622	8,70
21	B6	Basil	-	0,0119	2,703	0,44
22	B7	Basil	-	0,0031	2,101	0,15
23	B8	Basil	-	0,0112	1,727	0,65
24	B10	Basil	-	0,0776	2,028	3,82

25	B13	Basil	-	0,02078	2,442	0,85
26	B19	Basil	+	0,0032	2,038	0,15
27	B27	Basil	-	0,0184	0,556	3,31
28	C1	Basil	-	0,0024	1,179	0,20
29	C2	Basil	-	0,0068	1,236	0,55
30	C3	Kokobasil	-	0,0007	0,455	0,17
31	C4	Basil	+	0,0011	0,264	0,44
32	C6	Basil	-	0,0012	0,340	0,36
33	C8	Basil	-	0,0035	0,831	0,42
34	D1	Kok	-	0,0012	0,267	0,45
35	D2	Basil	-	0,0009	0,474	0,20
36	D6	Basil	-	0,0010	0,328	0,32
37	D7	Basil	-	0,0025	0,329	0,76
38	D8	Basil	-	0,0014	0,252	0,57
39	D10	Basil	-	0,0010	0,414	0,25
40	E2	Basil	-	0,0012	0,320	0,39
41	E4	Basil	-	0,0014	0,236	0,59
42	E6	Kokobasil	-	0,0021	1,616	0,13

4.4 PHB Üretimi Açısından En Etkin İzolatın Tanımlanması

PHB üretimi açısından 42 izolat değerlendirilmiştir. İzolatlar arasında A1 izolatının hücre kuru ağırlığına oranla PHB üretme yeteneği açısından en etkin izolat olduğu belirlendikten sonra izolatın tür tayini 3.2.6 da belirtildiği gibi yapılmıştır.

Biyoplastik üretimi açısından etkin izolatın 16S rRNA gen bölgesinin dizi analizi ve BLAST sonucunda %100 oranında *Bacillus megaterium* XyC6'ya benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Grothe ve Chisti tarafından 2012'de, *Bacillus megaterium* XyC6 suşu tanımlanmıştır (Ncbi, 2012).

4.5 PHB Üretiminin Artırılmasında Optimum Koşulların Belirlenmesi

PHB veriminin artırılması ve üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla, Farklı karbon kaynağı, karbon kaynağı miktarı, pH, sıcaklık ve inkübasyon süresinin PHB üretimine etkisi araştırılmıştır.

4.5.1 Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisi

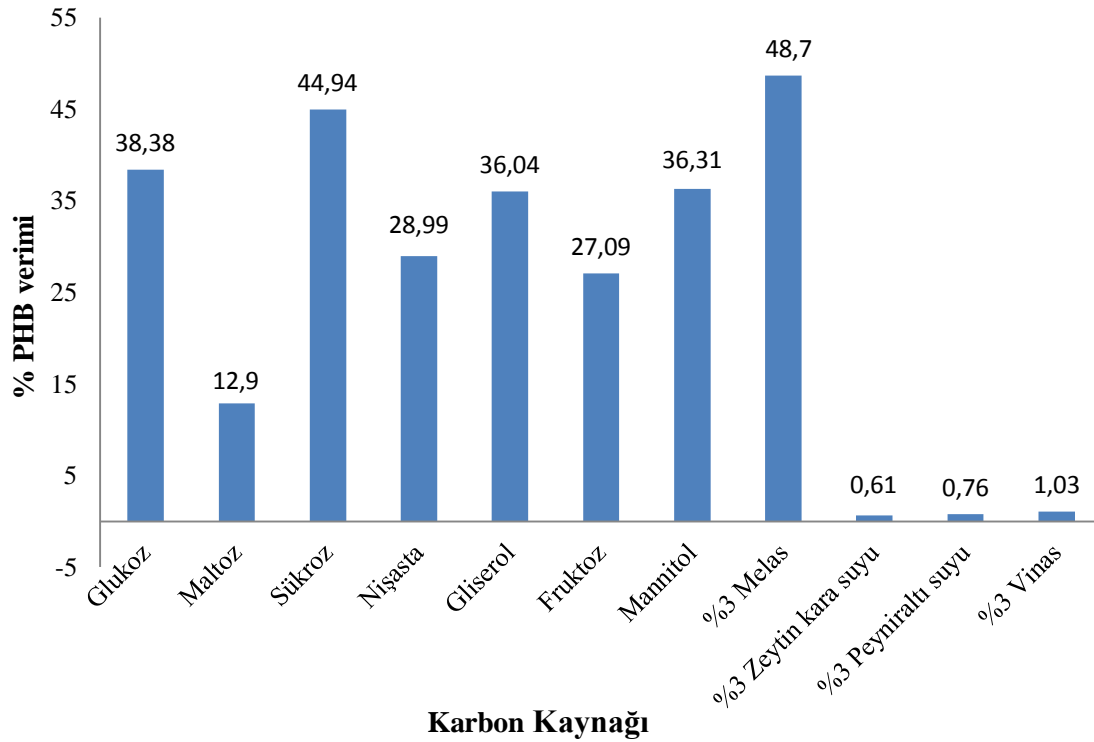
Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimi üzerinde etkisini araştırmak için, sentetik (Glukoz, Fruktoz, Mannitol, Gliserol, Nişasta, Maltoz) ve endüstriyel atıklar (Melas, Zeytin kara suyu, Peyniraltı suyu, Vinas) karbon kaynağı olarak denenmiştir. Çalışma sonuçları Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2 de verilmiştir.

Bu çalışmada, 7 sentetik ve 4 endüstriyel atık karbon kaynağı denenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, hücre kuru ağırlığına oranla % PHB verimi, ortalama olarak en yüksek %3 melas içeren besi ortamında % 48,7 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 Sentetik ve endüstriyel atık karbon kaynaklarının PHB üretimi üzerine etkisi (Çalışma koşulları; pH 7.0, 35°C, 150 r.p.m ve 48 saat).

Karbon Kaynağı	PHB Konst. (g/l)	Kuru Biyokütle (g/l)	% PHB
Glukoz	0,1736	0,485	35,79
	0,2499	0,610	40,97
	0,2012	0,524	38,39

Maltoz	0,0731	0,516	14,18
	0,0621	0,547	11,36
	0,0664	0,504	13,18
Sükroz	0,4199	0,930	45,15
	0,4811	1,08	44,54
	0,4422	0,98	45,13
Nişasta	0,3351	1,117	30,00
	0,3297	1,202	27,43
	0,3311	1,120	29,56
Gliserol	0,4838	1,381	35,03
	0,3781	1,086	34,82
	0,4425	1,156	38,28
Fruktoz	0,2080	0,869	23,94
	0,2668	0,885	30,14
	0,2344	0,862	27,09
Mannitol	0,4426	1,075	41,16
	0,3362	1,066	31,53
	0,3672	1,013	36,25
%3 Melas	0,7370	1,316	56,00
	0,3857	0,957	40,30
	0,6455	1,296	49,80
%3 Zeytin kara suyu	0,00127	0,368	0,34
	0,00105	0,106	0,99
	0,00119	0,238	0,50
%3 Peyniraltı suyu	0,00264	0,383	0,69
	0,00233	0,281	0,82
	0,00248	0,314	0,79
%3 Vinas	0,00169	0,132	1,28
	0,00176	0,214	0,82
	0,00161	0,159	1,01



Şekil 4.2 Sentetik ve endüstriyel atık karbon kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada, hücre kuru ağırlığına oranla ortalama % PHB verimleri (Çalışma koşulları; pH 7.0, 35°C, 150 r.p.m ve 48 saat).

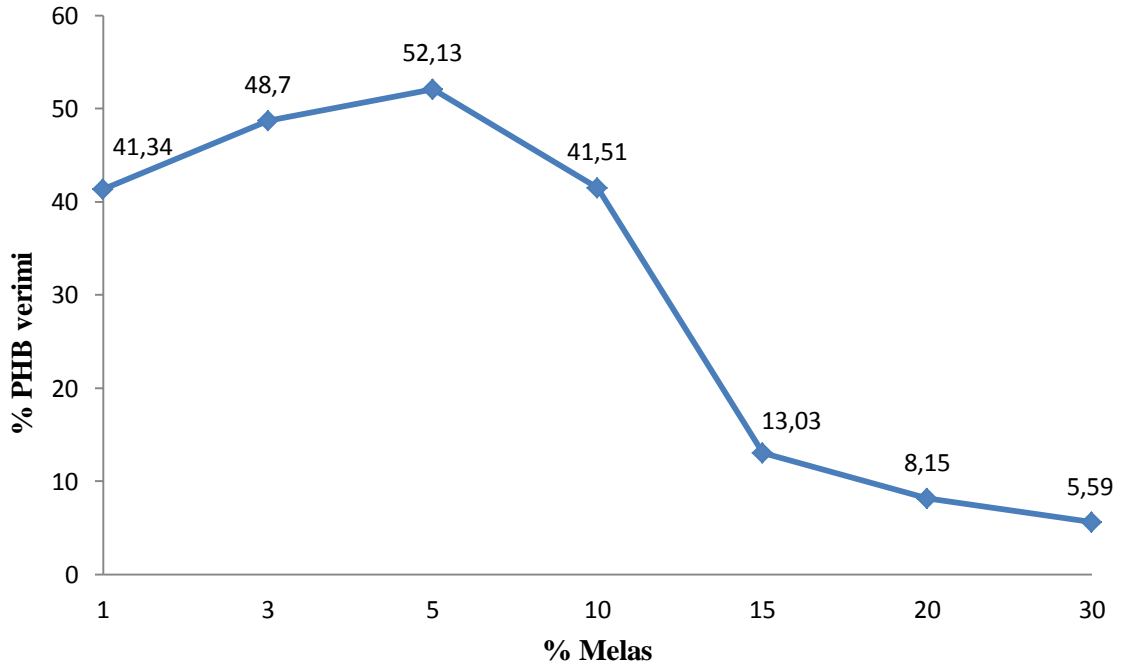
4.5.2 Karbon kaynağı miktarının PHB üretimi üzerine etkisi

Karbon kaynağı miktarının PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, %1-3-5-10-15-20-30 melas içeren besi ortamlarında PHB üretim miktarları takip edilmiştir. Çalışma sonuçları Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3’de verilmiştir.

Bu çalışmada, %5 melas içeren besi ortamında %52,13 verimle en yüksek PHB miktarı elde edilmiştir.

Çizelge 4.3 Karbon kaynağı miktarının PHB üretimine etkisi (Çalışma koşulları; pH 7.0, 35°C, 150 r.p.m ve 48 saat).

Karbon Miktarı	PHB Konst. (g/l)	Kuru Biyokütle (g/l)	% PHB
% 1 Melas	0,2099	0,517	40,60
	0,2456	0,581	42,27
	0,2272	0,552	41,17
% 3 Melas	0,7370	1,316	56,00
	0,3857	0,957	40,30
	0,6455	1,296	49,80
% 5 Melas	0,8133	1,460	55,71
	0,9253	1,751	52,84
	0,8360	1,747	47,85
% 10 Melas	0,6077	1,736	35,00
	0,7231	1,774	40,76
	0,9378	1,922	48,79
% 15 Melas	0,2577	1,849	13,93
	0,2053	1,799	11,41
	0,2694	1,956	13,77
% 20 Melas	0,2188	2,710	8,07
	0,2226	2,800	7,95
	0,2045	2,420	8,45
% 30 Melas	0,2152	3,610	5,96
	0,1811	3,357	5,39
	0,1733	3,185	5,44



Şekil 4.3 Karbon kaynağı miktarının PHB üretimine etkisi. Grafikte, hücre kuru ağırlığına oranla ortalama % PHB verimleri verilmiştir (Çalışma koşulları; pH 7.0, 35°C, 150 r.p.m ve 48 saat).

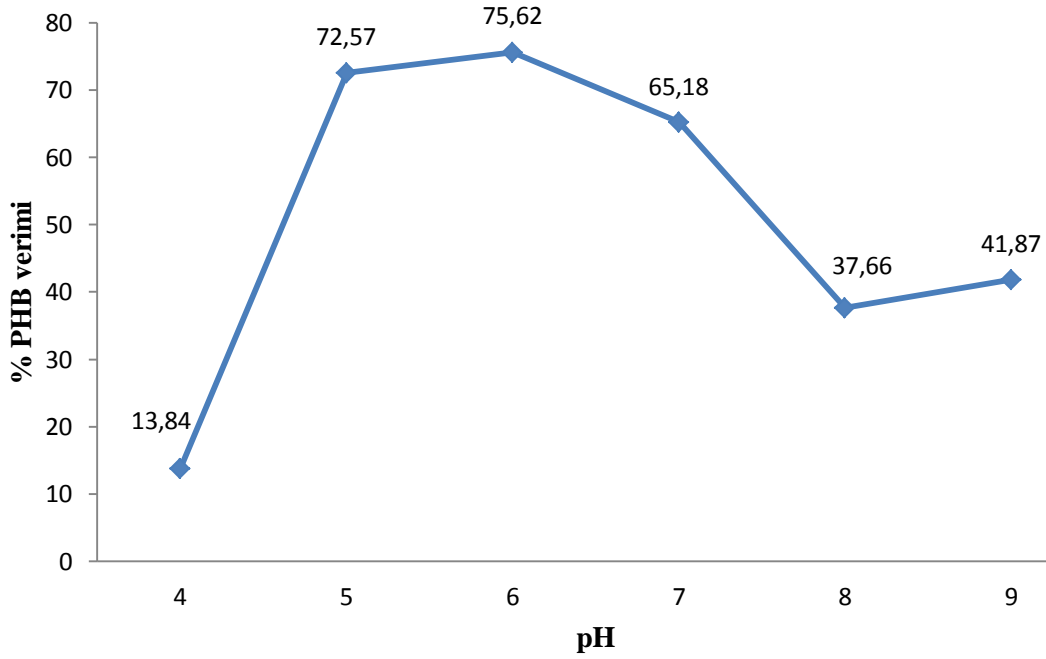
4.5.3 Ortam pH değerinin PHB üretimi üzerine etkisi

pH değerinin PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, pH'ı 4-5-6-7-8-9 ayarlanmış % 5 melas içeren besi ortamları hazırlanmıştır. Çalışma sonuçları Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4'de verilmiştir.

pH'ın etkisinin incelendiği çalışmada en yüksek PHB verimi pH 6'da %75,62 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4 pH'ın PHB üretimine etkisi (Çalışma koşulları; % 5 Melas, 35°C, 150 r.p.m ve 48 saat)

pH	PHB Konst. (g/l)	Kuru Biyokütle (g/l)	% PHB
4	0,0811	0,565	14,36
	0,0791	0,545	14,51
	0,0676	0,534	12,66
5	1,0896	1,525	71,44
	1,0097	1,400	72,00
	1,0586	1,425	74,28
6	1,0985	1,488	73,82
	0,8369	1,117	74,92
	0,8821	1,129	78,13
7	0,7449	1,170	63,67
	0,9945	1,494	66,57
	0,8523	1,305	65,31
8	0,4641	1,209	38,38
	0,4493	1,158	38,80
	0,6436	1,797	35,81
9	0,4458	1,129	39,49
	0,5535	1,357	40,78
	0,5302	1,169	45,36



Şekil 4.4 pH'nin PHB üretimine etkisi. Grafikte, hücre kuru ağırlığına oranla ortalama % PHB verimleri verilmiştir. (Çalışma koşulları; %5 Melas, 35°C, 150 r.p.m ve 48 saat)

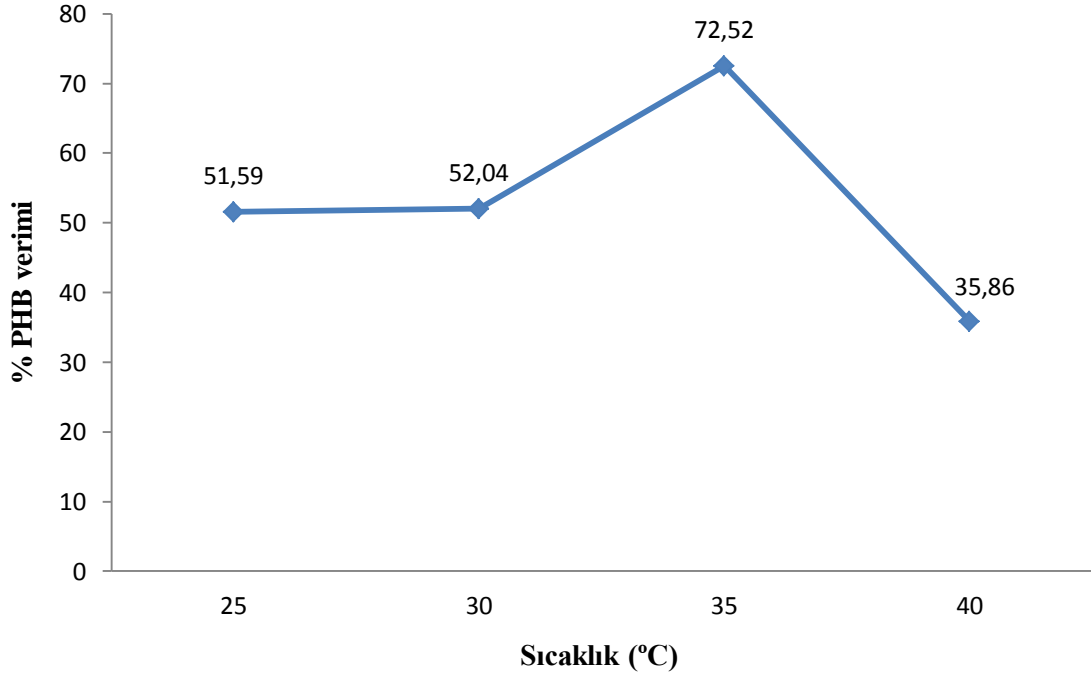
4.5.4 İnkübasyon sıcaklığının PHB üretimi üzerine etkisi

Sıcaklığın PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, 25-30-35-40°C ortam sıcaklıklarında % 5 melas içeren ve pH 6 olan besi ortamlarında 48 saat süreyle sıcaklığın PHB verimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçları Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.

Bu çalışmada, en iyi PHB üretme veriminin 35°C'de, hücre kuru ağırlığına oranla %72,52 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 İnkübasyon sıcaklığının PHB üretimine etkisi (Çalışma koşulları; % 5 Melas, pH 6, 150 r.p.m ve 48 saat)

Sıcaklık (°C)	PHB Konst. (g/l)	Kuru Biyokütle (g/l)	% PHB
25	1,170	2,124	54,66
	0,9199	1,896	48,51
	0,9871	1,912	51,62
30	2,0358	3,863	52,70
	0,9418	1,864	50,52
	1,1922	2,253	52,91
35	1,0126	1,431	70,76
	0,7746	1,089	71,13
	1,2467	1,647	75,69
40	0,4090	1,079	37,91
	0,3169	0,897	35,32
	0,4337	1,262	34,37



Şekil 4.5 İnkübasyon sıcaklığının PHB üretimine etkisi. Grafikte, hücre kuru ağırlığına oranla ortalama % PHB verimleri verilmiştir. (Çalışma koşulları; %5 Melas, pH 6, 150 r.p.m ve 48 saat)

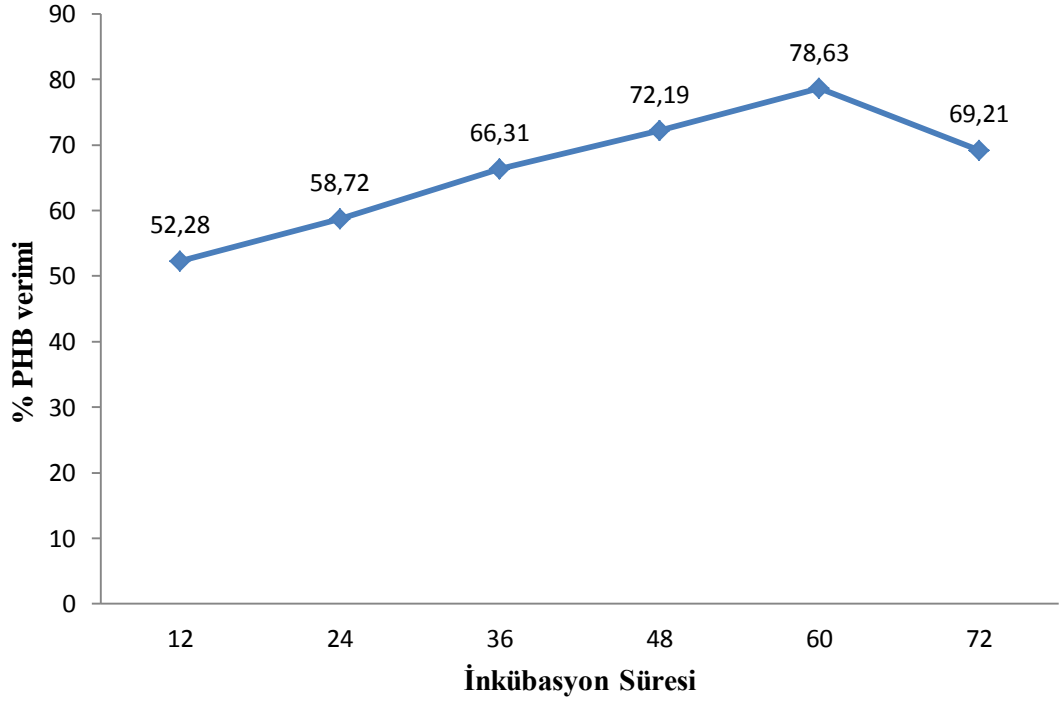
4.5.5 İnkübasyon süresinin PHB üretimi üzerine etkisi

İnkübasyon süresinin PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, 12-24-36-48-60-72 saat süre ile inkübasyon süresinin PHB üretimine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada %5 melas içeren, pH'ı 6 olan besi ortamı 35°C'de belirlenen inkübasyon sürelerinde çalışılmıştır. Çalışma sonuçları Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'de verilmiştir.

Bu çalışmada, en iyi PHB üretim veriminin 60. saatte, hücre kuru ağırlığına oranla % 78,63 olduğu belirlenmiştir. Ancak 48. saatteki PHB verimi ile 60. saatteki PHB verimi arasında % 5 fark olduğu tespit edilmiştir. Bundan dolayı inkübasyonun süresi optimum 48 saat olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 İnkübasyon süresinin PHB üretimine etkisi (Çalışma koşulları; %5 Melas, pH 6, 35°C ve 150 r.p.m)

İnkübasyon Süresi (Saat)	PHB Konst. (g/l)	Kuru Biyokütle (g/l)	% PHB
12	0,5670	1,076	52,70
	0,5919	1,043	56,25
	0,4846	1,012	47,89
24	0,6470	1,183	54,69
	0,6816	1,086	62,76
	0,6657	1,134	58,71
36	0,7330	1,050	69,81
	0,6779	1,053	64,38
	0,6338	0,979	64,74
48	0,7990	1,126	70,96
	0,9392	1,277	73,55
	0,8547	1,186	72,06
60	0,7930	0,985	80,50
	0,8244	1,078	76,47
	0,8390	1,063	78,93
72	0,8151	1,114	71,25
	0,8332	1,202	69,31
	0,7887	1,176	67,07

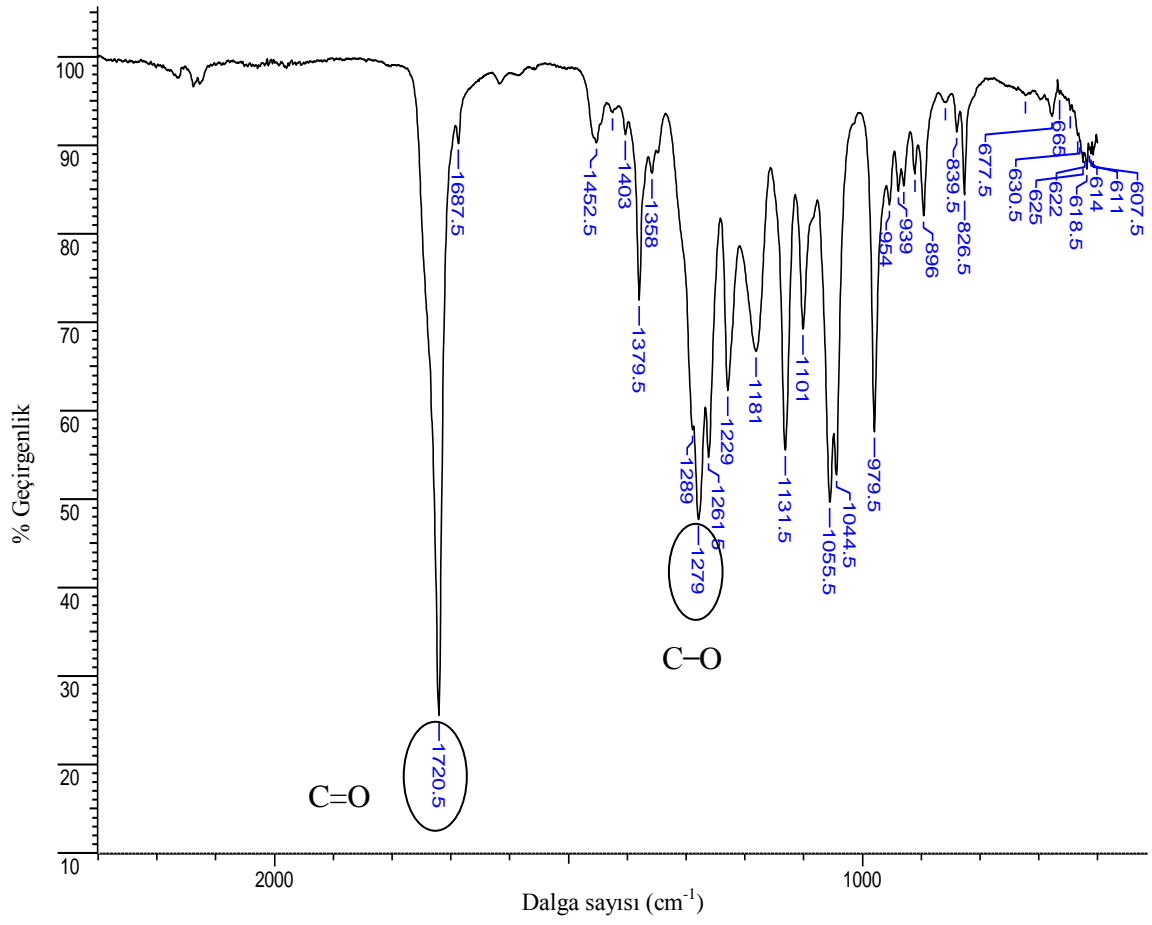


Şekil 4.6 İnkübasyon süresinin PHB üretimine etkisi. Grafikte, hücre kuru ağırlığına oranla ortalama % PHB verimleri verilmiştir. (Çalışma koşulları; %5 Melas, pH 6, 35°C ve 150 r.p.m)

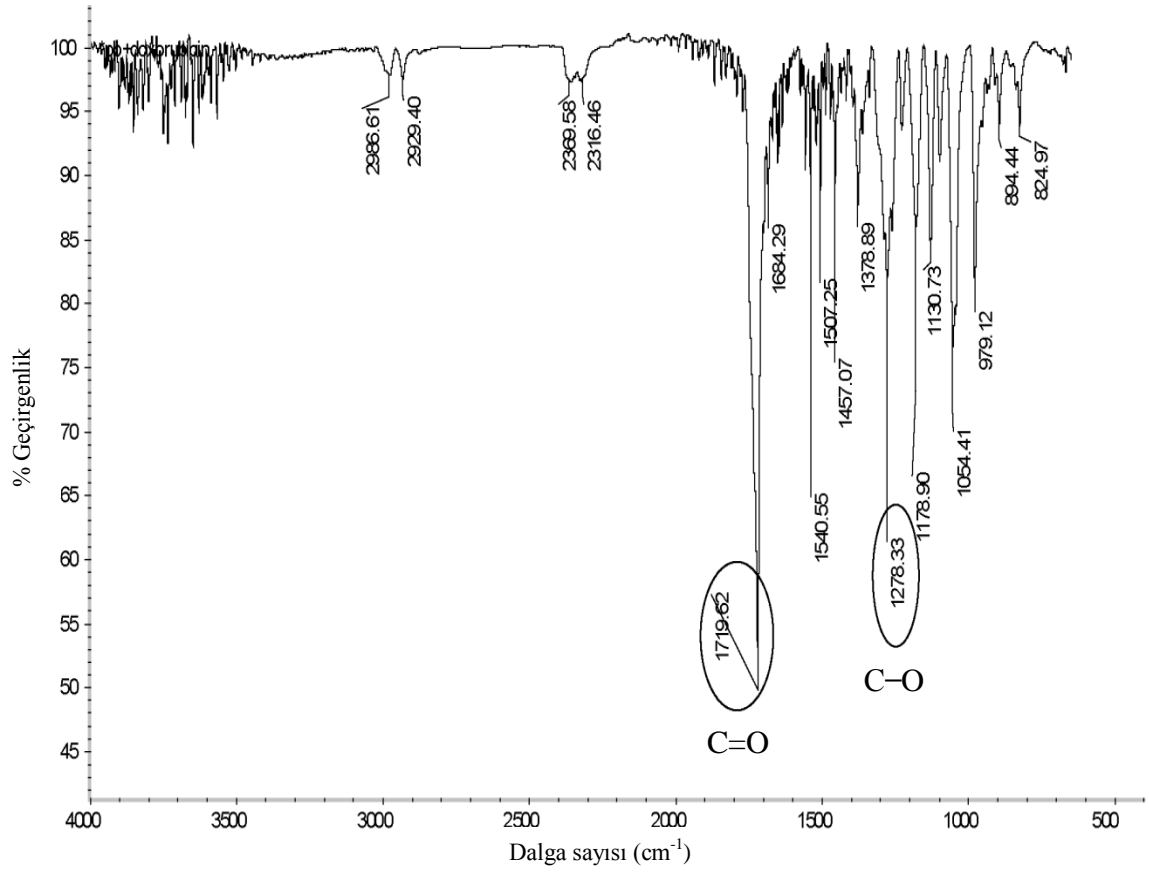
4.6 Sükroz ve melastan üretilen PHB'nin karakterizasyonu

4.6.1 PHB'in kimyasal yapısı

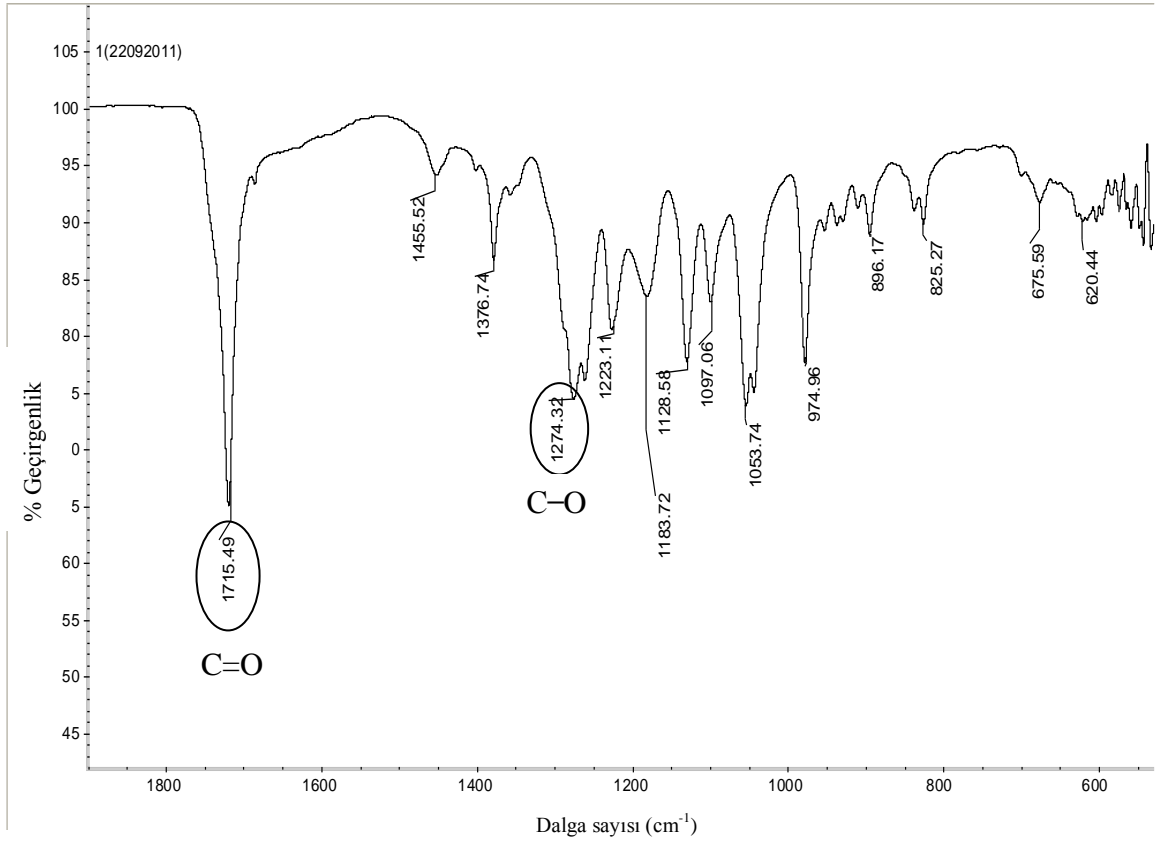
Üretilen PHB'in kimyasal yapısını belirlemek için, FTIR spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Sükroz ve melasın karbon kaynağı olarak kullanılması ile üretilen PHB'lerin kimyasal yapısı, Sigma-Aldrich Chemie'den temin edilen saf ticari PHB ve ticari suş olan *Alcaligenes eutrophus*'un sentezlediği PHB ile kıyaslanmıştır.



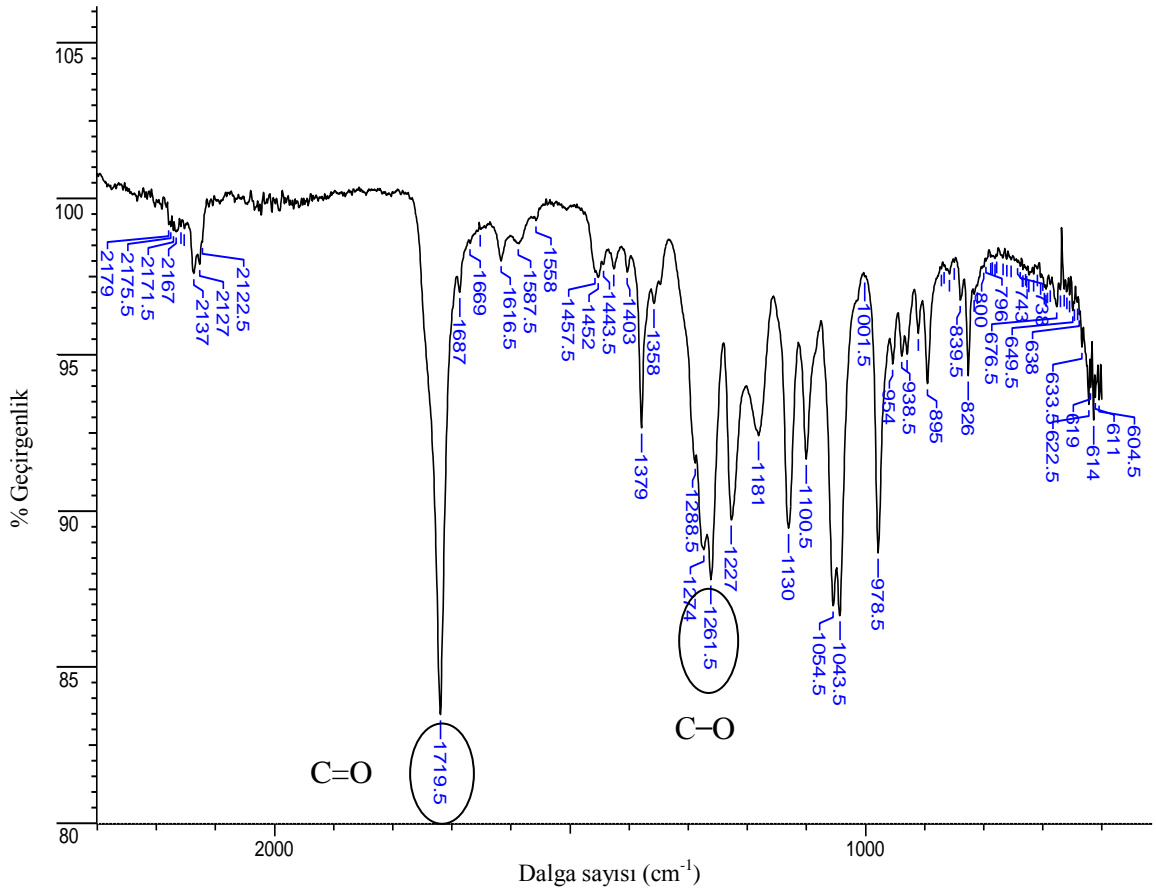
Şekil 4.7 Sigma-Aldrich Cheme' den temin edilen saf ticari PHB'in FTIR spektrumu



Şekil 4.8 *Alcaligenes eutrophus*'dan sentezlenen PHB'in FTIR spektrumu



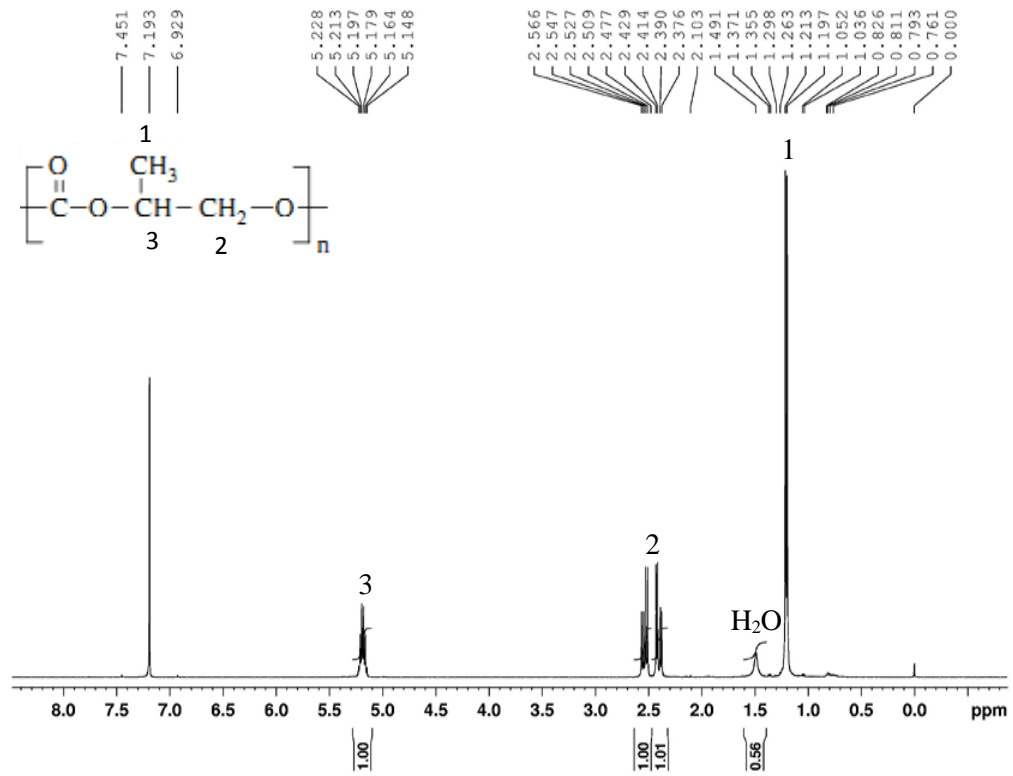
Şekil 4.9 Karbon kaynağı olarak sükrözün kullanılması ile sentezlenen PHB'in FTIR spektrumu



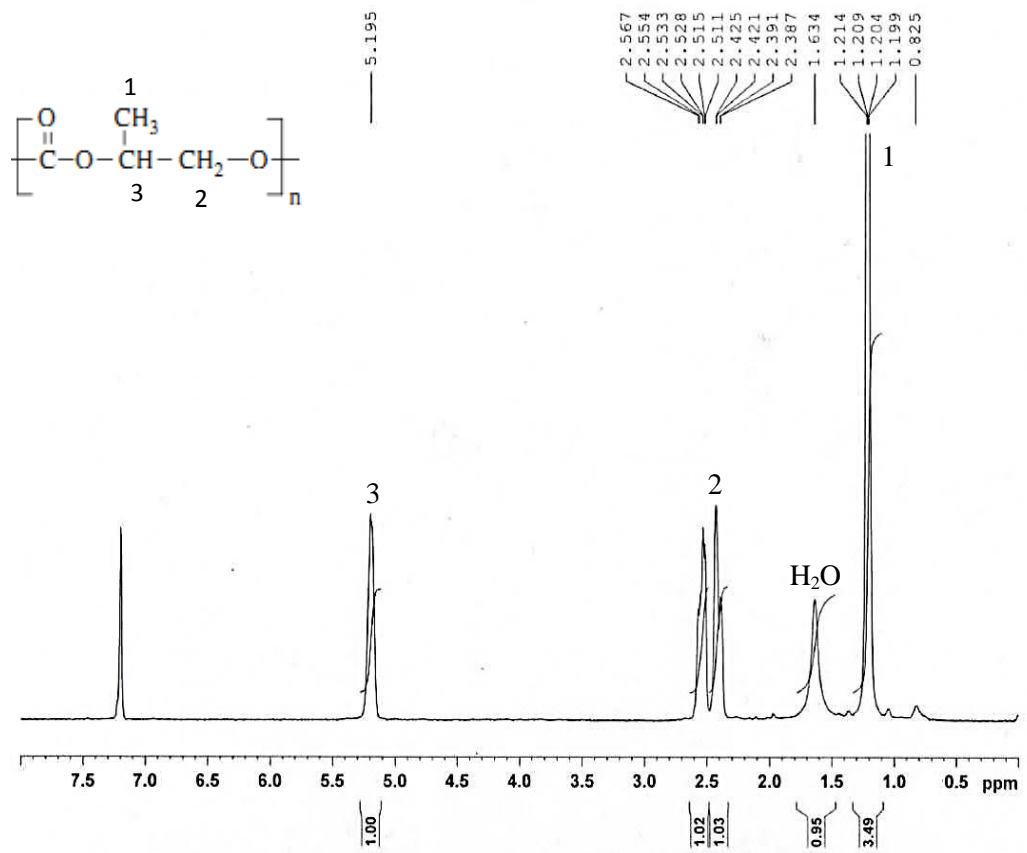
Şekil 4.10 Karbon kaynağı olarak endüstriyel atık olan melasın kullanılması ile sentezlenen PHBV'in FTIR spektrumu

4.6.2 PHB'in moleküler yapısı

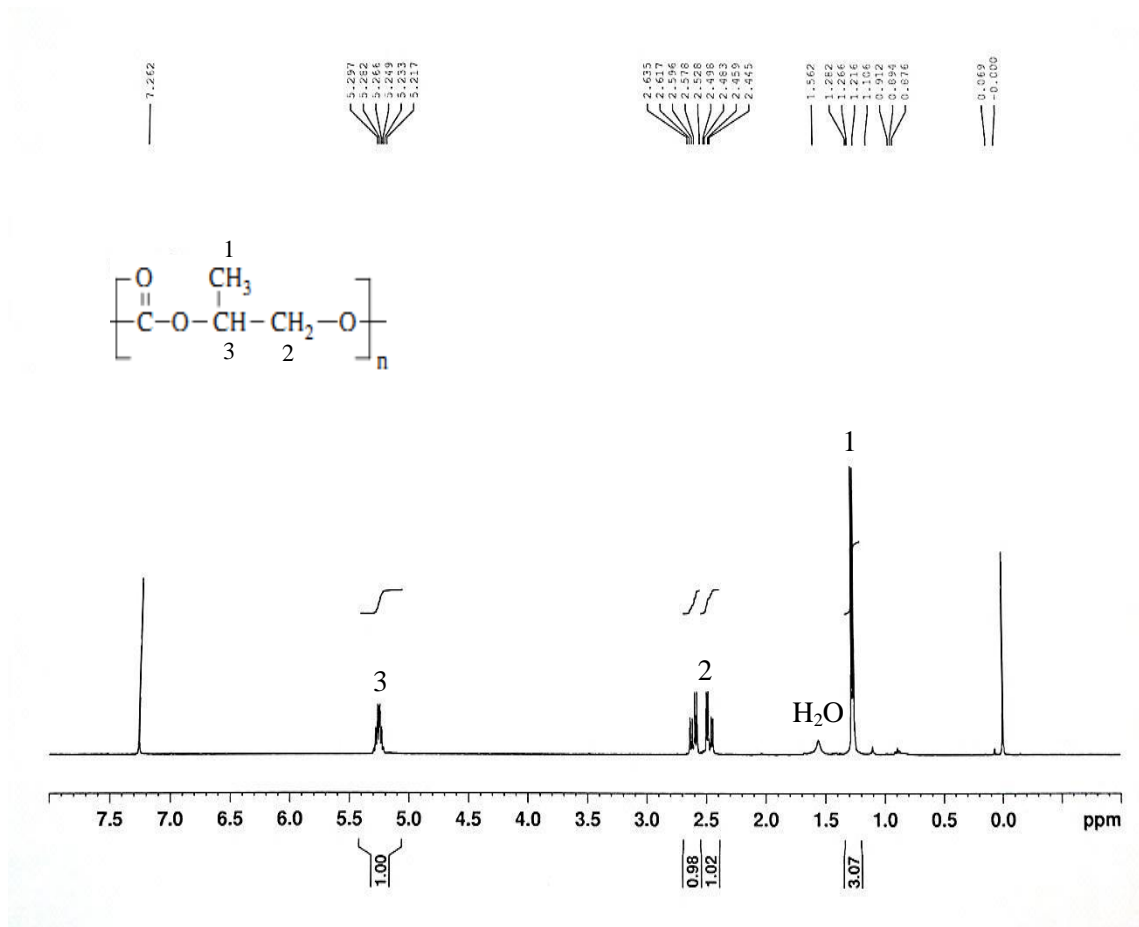
Üretilen PHB ve PHBV'nin moleküler yapısını belirlemek için, proton NMR spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Sükroz ve melasın karbon kaynağı olarak kullanılması ile üretilen polimerlerin moleküler yapısı, Sigma-Aldrich Cheme den temin edilen saf ticari PHB, PHBV (%7 3HV içeren) ve ticari suş olan *Alcaligenes eutrophus*'un sentezlediği PHB ile kıyaslanmıştır. NMR spektrumları Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 verilmiştir.



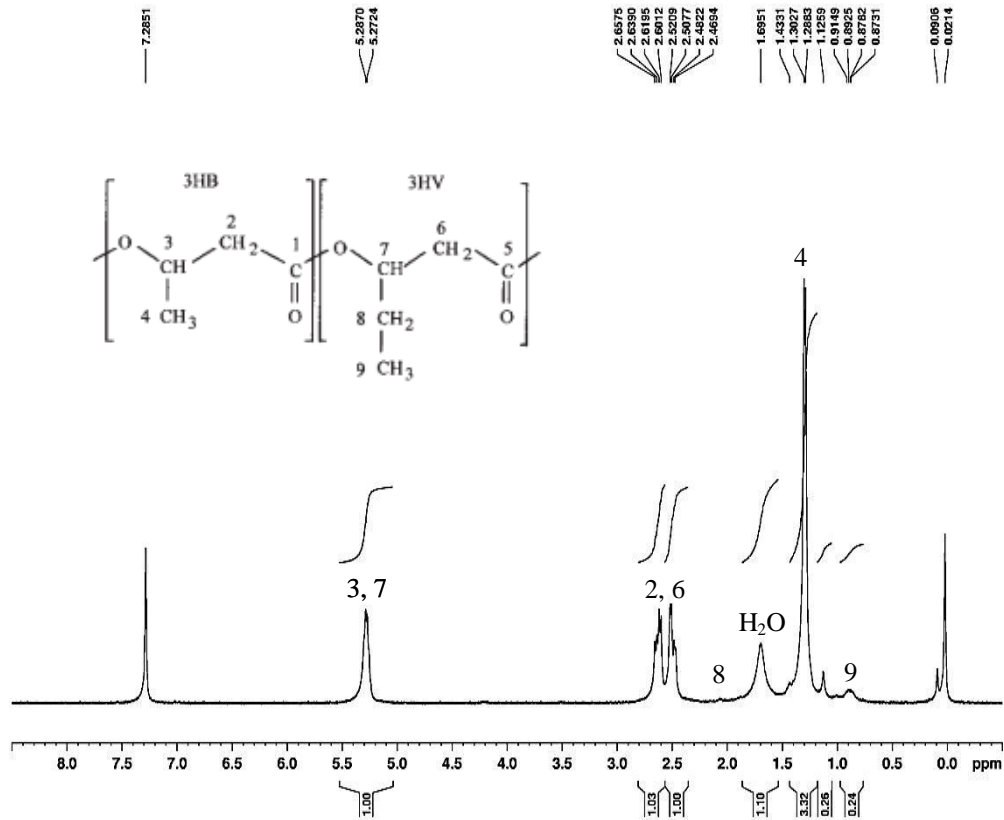
Şekil 4.11 Sigma-Aldrich Cheme den temin edilen saf ticari PHB'in proton NMR spektrumu



Şekil 4.12 *Alcaligenes eutrophus*'dan sentezlenen PHB'in proton NMR spektrumu



Şekil 4.13 Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanılması ile sentezlenen PHB'in proton NMR spektrumu



Şekil 4.14 Karbon kaynağı olarak endüstriyel atık olan melasın kullanılması ile sentezlenen PHB'in proton NMR spektrumu

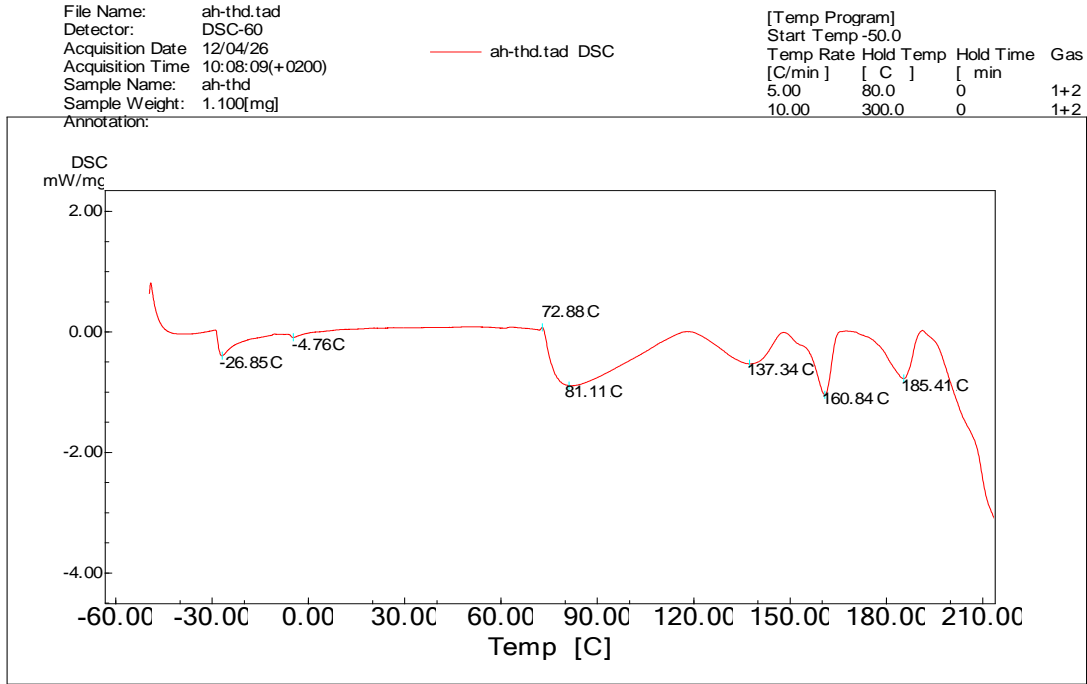
4.6.3 PHB'in moleküler ağırlığı

Bacillus megaterium suşu, sükröz içeren polimer ortamını kullanarak sentezlemiş olduğu PHB'nin moleküler ağırlığı Ubbelohde Kapiler Viskozimetre yöntemine göre belirlenmiştir. Hesaplamaların sonucunda, polimerin viskometrik moleküler ağırlığı 428000 g/mol olarak bulunmuştur.

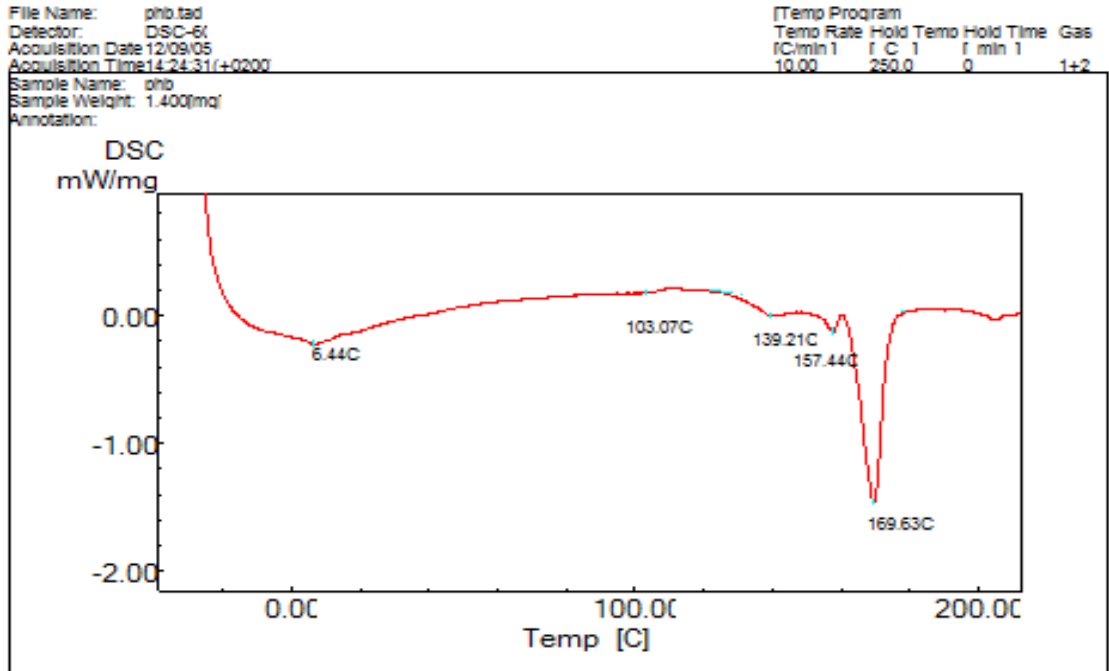
Bacillus megaterium suşu, melas içeren besi ortamını kullanarak sentezlemiş olduğu PHB'nin moleküler ağırlığı 491000 g/mol olarak bulunmuştur.

4.6.4 PHB'in termal davranışı

PHB'nin termal özellikleri, Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi (DSC-60 Shimadzu, USA) ile belirlenmiştir. Sükrozun karbon kaynağı olarak kullanılması ile sentezlenen PHB'nin DSC eğrisi (Şekil 4.15), 137.34, 160.84 ve 185.41 °C'de olmak üzere birden fazla erime noktası (T_m), -26.85 °C'de camlaşma sıcaklığı (T_g) noktası ve 72.88 °C da kristallik noktası (T_c) göstermektedir. Melasın karbon kaynağı olarak kullanılması ile sentezlenen PHBV'nin DSC eğrisi (Şekil 4.16), 139.21, 157.44 ve 169.63 °C olmak üzere birden fazla erime noktası (T_m), , 6.44°C'de camlaşma sıcaklığı (T_g) noktası göstermektedir. Her iki biyopolimerde de birden fazla erime noktası olması, PHB ve PHBV'nin birkaç farklı moleküler ağırlık kesiti içerdiğini düşündürmektedir.



Şekil 4.15 Karbon kaynağı olarak sükrozun kullanılması ile sentezlenen PHB'in DSC eğrisi



Şekil 4.16 Karbon kaynağı olarak melasın kullanılması ile sentezlenen PHB'in DSC eğrisi

BÖLÜM 5

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde en önemli endüstriyel ürünler arasında yer alan plastik, ürün çeşitliliği ve talebin her geçen gün artış göstermesi nedeniyle bu konuda yapılan araştırmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Sunulan tez çalışmasında bakteriyal bir polimer olarak dikkat çeken PHB'nin üretiminde alternatif bir üretici organizmanın eldesi, dolayısı ile ilerleyen yıllarda ülkemizde PHB üretimi için kullanılabilir yerel bir üretici organizmanın geliştirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca üretimi yapılan PHB'nin yapısal özellikleri de belirlenerek ticari olarak satılan PHB ile kıyaslanarak, üretilen PHB nin muadilleri ile karşılaştırılması yapılmıştır.

Tez çalışması kapsamında PHB üreticisi organizmanın kaynağı olarak hidrokarbon kirliliği olan yerler tercih edilmiştir. PHB metabolik yol izinin aktif olabilmesi için besiyerinde karbon kaynağının yeterince bulunduğu, ancak azot sınırlamasının olduğu durumlara gereksinim vardır. Bu durumda hidrokarbon ile kirlenmiş alanlar karbon kaynağı bakımından zengin olmakla birlikte azot ve fosfor miktarı düşük olan alanlar olarak bilinmektedir. Dolayısı ile PHB üreticisi bir organizmanın yaşayabileceği bir habitat olabileceği fikri ile, tez çalışması kapsamındaki izolasyon çalışmaları için hidrokarbonla kirlenmiş bir alan olarak Eskişehir organize sanayi bölgesinde, hidrokarbonla kirlenmiş topraklar belirlenmiştir. Bu alanlardan alınan toprak örnekleri laboratuvara getirilerek izolasyon çalışmalarında kullanılmışlardır. Elde edilen izolatlar PHB üretim yetenekleri açısından bir tarama çalışmasına tabi tutulmuş ve üretilen PHB lerin varlığı nicel olarak ölçülmüştür. Tarama çalışmasında elde edilen izolatların PHB üretim yetenekleri araştırılırken, bilinen en iyi PHB üreticilerinden birisi olan *Alcaligenes eutrophus* pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. İzolasyon çalışmalarında toplam 42 adet makroskobik morfolojilerine göre farklı ve saf izolatlar elde edilmiştir. Bu izolatların morfolojileri ve gram özellikleri belirlenmiştir ve Çizelge 4.1'de sonuçları verilmiştir. İzolatların PHB

üretim yeteneklerini belirlemek için yapılan tarama çalışması sonucunda, 36 izolatın eser miktarda PHB sentezlediği, geriye kalan 6 izolatın ise %1 den daha fazla PHB sentezleme yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek PHB üretim yeteneğini hücre kuru ağırlığına oranla %44,30 - 81,46 aralığında A1 izolatı göstermiştir.

Thirumala, ve ark., (2010) yaptıkları çalışmada, Hindistanın Haydarabad bölgesinde, aktif çamur ve toprak örneklerinden 240 bakteri izole etmiştir. Bu izolatlardan yüksek PHB üretme yeteneğine sahip 25 izolat elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu izolatlardan, 871 suşu hücre kuru ağırlığına oranla en az %20 PHB ve 112A suşu hücre kuru ağırlığına oranla en az %24,2 PHB ürettiğini belirlemişlerdir (Thirumala, et al., 2010). *Alcaligenes eutrophus*'un yüksek glukozun bulunduğu ama fosfatın sınırlandırıldığı besi ortamlarında PHB üretim yeteneği araştırılmış ve hücre kuru ağırlığına oranla %80 PHB sentezlediği rapor edilmiştir (Ryu, et al., 1996).

Literatürden de görüldüğü gibi, sunulan tez çalışmasından elde edilen A1 kodlu izolatın PHB üretim yeteneği gerek pozitif kontrol olarak kullanılan *A. eutrophus* ve gerekse diğer çalışmalarda PHB üreticisi olarak seçilen türlerin üretim yetenekleri ile kıyaslandığında önemli bir alternatif oluşturabileceği görülmüştür. Elde edilen izolatın tanımlanması ve PHB üretimine etki edebilecek parametrelerin optimizasyonu ile çalışmaya devam edilmiştir.

A1 izolatının tanımlanmasında 16 SrRNA gen bölgesinin dizi analizi ve BLAST sonucunda %100 oranında *Bacillus megaterium* strain XyC6'ya benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Literatürde, *B. megaterium*'un türlerinin PHB üretme yeteneklerinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. *Bacillus megaterium* SW1-2 türü hücre kuru ağırlığına oranla %36 PHB sentezlediği rapor edilmiştir (Berekaa and Al Thawadi, 2012). *Bacillus megaterium* SRKP-3 türünün PHB üretim yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Pandian, et al., 2010). *Bacillus megaterium* BA-019 türünün kullanıldığı çalışmada, optimum koşullar altında hücre kuru ağırlığına oranla %42 PHB sentezlediği rapor edilmiştir (Kulpreecha, et al., 2009). Ancak, *Bacillus megaterium* strain XyC6'nın PHB üretebildiğine dair bir bilgiye rastlanmamıştır.

Tarama çalışması sonucunda alternatif üretici potansiyeli taşıyan ve karakterize edilen suş ile optimizasyon çalışmalarına geçilmiştir. En yüksek PHB üretim koşullarını belirleyebilmek için, sentetik ve endüstriyel atık olan farklı karbon kaynakları, karbon kaynağı miktarı, ortam pH değeri, sıcaklık ve inkübasyon süresinin PHB üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Farklı karbon kaynaklarının PHB sentezindeki etkisini belirlemek amacıyla, glukoz, fruktoz, mannitol, gliserol, nişasta, maltoz gibi sentetik ve melas, zeytin kara suyu, peyniraltı suyu, vinas gibi endüstriyel atıklar denenmiştir. PHB üretimi için önemli bir öncelik, karbon kaynaklarının maliyetinin yüksek olması nedeni ile ortaya çıkan olumsuz durumu ortadan kaldırmaktır. PHB'den 1 ton üretebilmek için 3 ton glukoz gereksinim olduğu bilinmektedir (Gouda et al., 2001). PHB'nin maliyetinin doğrudan karbon kaynağına bağlı olması ile glukoz gibi yüksek maliyetli bir karbon kaynağı kullanılarak üretilen biyoyıkıma uygun PHB nin kimya endüstrisinin ürünü olan polimerler ile rekabet etmesi zordur. Bu amaçla literatürde de yaygın olarak endüstriyel atıklara yönelimin olduğu görülmektedir (Beaulieu, et al., 1995; Gouda, et al., 2001; Wu, et al., 2001). Sentetik karbon kaynaklarından elde edilen PHB'ye dayalı polimerlerin maliyetinin yüksek olması nedeni ile sağlık sektörü başta olmak üzere, daha çok maliyetinin bertaraf edilebileceği ürünlerde kullanıldığı görülmektedir. Ancak günümüzde plastik sektörünün gerek kimyasal süreçlerdeki üretim stratejilerinin ve gerekse ürünlerin kullanım süresi sonundaki istenmeyen kirletici ve/veya kalıcı olmaları çevre kirliliği ve canlı sağlığını tehdit eder boyutlara ulaşılması nedeni ile biyoyıkıma uygun polimerler pek çok alanda tercih edilmeye başlanmıştır.

Bu gelişmelerle, sunulan tez çalışmasında sentetik karbon kaynaklarının yanı sıra, özellikle ülkemizde bol bulunan endüstriyel atıkların PHB üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır. Denenen karbon kaynaklarına göre üretilen PHB miktarları açısından bir karşılaştırma yaparsak; Glukoz % 38,38, Maltoz % 12,9, Sükroz % 44,94, Nişasta % 28,99, Gliserol % 36,04, Fruktoz % 27,09, Mannitol % 36,31, Melas % 48,70, Zeytin kara suyu % 0,61, Peyniraltı suyu % 0,76 ve Vinas % 1,03 sonuçlarına ulaşılmıştır (Şekil 4.2).

Elde edilen veriler incelendiğinde en fazla PHB üretiminin sentetik karbon kaynakları için Sükroz ile % 44,94 ve endüstriyel atıklardan ise melas kullanıldığında %48,70 oranında PHB üretilbildiği görülmüştür. Verilerden de anlaşılacağı üzere farklı endüstriler için hammadde olarak kullanılabilen melas aynı zamanda PHB üretimi içinde önemli bir alternatif oluşturmaktadır.

Literatürdeki benzer çalışmalarda, karbon kaynağı olarak glukozun kullanıldığı besi ortamında gelişen *Bacillus megaterium* 12 (%19,51), *Bacillus subtilis* 25 (%19,49) PHB biriktirdiği rapor edilmiştir (Yüksekdağ ve ark., 2004). Besi ortamında sükroz ve melasın olduğu ortamda geliştirilen *Bacillus sp.* JMa5 hücre kuru ağırlığına oranla % 25 – 35 PHB sentezlediği belirtilmiştir (Wu, et al., 2001). Yapılan bir araştırmada, farklı karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada, Fruktoz, Glukoz, Ksiloz, Laktoz, Sükroz, Maltoz, Na-glükanot ve şeker kamışı melasından % 2 oranında eklenerek hazırlanan besi ortamında *Bacillus megaterium*'un PHB üretme yeteneği incelenmiştir. En iyi PHB miktarı hücre kuru ağırlığına oranla % 45,6 Glukozda ve % 44,6 Melaslı besi ortamında belirlenmiştir (Gouda, et al., 2001).

Karbon kaynağı miktarının PHB üretimi üzerine etkisini incelemek amacıyla, %1-30 oranında melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamları hazırlanarak PHB üretimleri takip edilmiştir. Tez çalışması sonucunda, % 1 melas % 41,34, % 3 melas % 48,7, % 5 melas % 52,13, % 10 melas % 41,51, % 15 melas % 13,03, % 20 melas % 8,15 ve % 30 melas içeren besi ortamında % 5,59 PHB üretimi tespit edilmiştir (Şekil 4.3). En yüksek verimin % 5 melas içeren ortamda olduğu belirlenmiştir. % 10 ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise *Bacillus megaterium* kuru biyokütle miktarını artırmış ancak PHB üretimi düşmüştür. PHB üretiminin düşmesinin nedeni ortamda PHB üretimini teşvik edecek sınırlayıcı faktörlerin olmamasıdır. Yüksek melas konsantrasyonlarında karbon kaynağı kadar büyümeyi etkileyen maddelerinde fazlalığı PHB üretimini olumsuz etkilediği düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, % 1 – 5 oranında melasın olduğu besi ortamlarının PHA ve PHB üretimi üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada en iyi PHA - PHB veriminin % 2 melas içeren besi ortamında % 46,5 – 46,3 elde edildiği ancak melas konsantrasyonunun artması ile PHA ve PHB veriminin düştüğü rapor edilmiştir (Gouda, et

al., 2001). Diğ er bir ç alışmada ise, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan melaslı besi ortamında PHB üretimi 0,1 – 0,3 g/l olarak belirlenmiştir. Bu sonuçta PHB birikimin % 1'den daha yüksek olduğunu göstermektedir (Beaulieu, et al., 1995). % 5 melas kullanıldığı besi ortamında *Azotobacter vinelandii* UWD'nin hücre kuru ağırlığına oranla % 59 PHB ürettiği rapor edilmiştir (Page, 1992 b).

Ortam pH değerinin PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, pH 4 – 9 aralığında % 5 melas içeren besi ortamları hazırlanmıştır. Bu çalışmada, pH 4 % 13,84, pH 5 % 72,57, pH 6 % 75,62, pH 7 % 65,18, pH 8 % 37,66 ve pH 9 % 41, 87 PHB üretimi olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4). Çalışmada pH 5 ve 6 da PHB verimlerinin birbirlerine yakın olması *Bacillus megaterium*'un bu pH aralıklarında iyi geliştiğini ve PHB sentez mekanizmasının en aktif olduğunu göstermektedir. PHB üretiminin en yüksek olduğu pH 6 bundan sonraki aşamalarda kullanılacak değer olarak belirlenmiştir.

Bacillus subtilis kültüründe, PHB üretiminde pH'ın etkisinin araştırıldığı çalışmada pH 6 – 8 aralığında PHB üretim miktarları belirlemişler ve PHB veriminin en iyi pH 7' de olduğunu rapor etmişlerdir (Tamdoğan, 2008). Yapılan başka bir çalışmada ise, PHB üretimindeki ortam pH değeri optimum 6,5 olarak bulunmuştur (Grothea, et al., 1999). Literatürdeki çalışma sonuçları ile yaptığımız çalışma pH değeri açısından uygunluk göstermektedir.

Elde edilen optimum pH değerinin nötr sayılabilir bir değer olması endüstriyel üretim açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Asidik ya da bazik ortamlar oluşturmak her zaman için ilave kimyasalların kullanımı ile maliyete katkılar getirecektir. Ancak pH değerinin 6-8 aralığında olması önemli bir üstünlük sağlayacaktır.

Sıcaklığın PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek için, karbon kaynağı miktarı % 5 melas ve pH 6 olan besi ortamları 25 - 40 °C aralığında farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiştir. Bu sıcaklıklarda *Bacillus megaterium*'un sentezlediği PHB miktarı belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, 25 °C'de % 51,59, 30 °C'de %52,04, 35 °C'de % 72,52 ve 40 °C'de % 35,86 PHB üretimi tespit edilmiştir (şekil 4.5). Optimum sıcaklık 35 °C olarak belirlenmiştir. Elde edilen optimum PHB üretim sıcaklığının üretici olarak

seçilen mikroorganizmanın büyüme sıcaklığı ile uygun olması, PHB'nin ileri aşamalarda daha fazla miktarlarda üretimi açısından ilave bir uygulama gerektirmeyecek olması nedeni ile önemli bir üstünlük olarak düşünülmektedir.

Tamdoğanın (2008) çalışmasında, PHB veriminin en iyi olduğu sıcaklık 30 °C olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu sıcaklıkta hem PHB üretimi hem de hücre sayısı en yüksek değerlerde tespit edilmiştir (Tamdoğan, 2008). *Alcaligenes latus* türünün kullanıldığı çalışmada optimum sıcaklık hem PHB sentezinde hemde hücre gelişimi için 33 °C olarak belirlenmiştir (Grothe, et al., 1999). *Bacillus sp.* 871 ve *Bacillus sp.* 112A suşlarının PHB üretimi üzerine sıcaklığın etkisini belirlemek için çalışılmıştır. Bu amaçla PHB üretimi açısından kıyaslama yapabilmek için en yaygın PHB üreticisi olan *Bacillus megaterium* MTCC 453 ve *Ralstonia eutropha* MTCC 1472 suşları da kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda, pozitif kontrol olarak kullanılan türler ve izole edilen türlerin optimum PHB sentezleme sıcaklığının 30 °C olduğu bildirilmiştir (Thirumala, et al., 2010). Literatürde ve sunulan tez çalışmasında genellikle PHB üretiminin mesofilik koşullarda olması da endüstriyel uygulamalar için önemlidir. İlave bir ısıtma-soğutma sistemine gereksinim duyulmadan sabit koşullarda hem üretici mikroorganizma ve hem de mikroorganizma sayısına koşut olarak PHB üretimi yapılabilecektir.

İnkübasyon süresinin PHB üretimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, daha önceki çalışmalarda belirlenen optimum koşullar korunarak 12-72 saat aralığında PHB verimleri belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda, 12. saat % 52,28, 24. saat % 58,72, 36. saat % 66,31, 48. saat % 72,19, 60. saat % 78,63 ve 72. saat % 69,21 PHB üretimi tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Bu çalışma sonucunda optimum inkübasyon süresi 60 saat olarak belirlenmiştir. Ancak dikkat edilirse aslında sürenin PHB üretimi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı da kabul edilebilir. Özellikle 48. saatten sonra elde edilen değerler kıyaslanırsa PHB üretimindeki artış %5 civarındadır ve 12 saat gibi bir zaman kaybı söz konusudur. Dolayısı ile her ne kadar inkübasyonun 60. saatinde en yüksek PHB üretimi elde edilmiş olsa bile en uygun sürenin 48. saat olduğunu söyleyebiliriz.

Tamdoğan, (2008) yaptığı çalışmada, PHB üretiminin en iyi olduğu sürenin 24. saat olduğunu bildirmişlerdir (Tamdoğan, 2008). *Bacillus sp.* 871 ve *Bacillus sp.* 112A

suşlarının PHB üretimi üzerine inkübasyon süresinin etkisinin belirlendiği çalışmada sırasıyla 32 ve 36. saatlerde PHB üretiminin en yüksek seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir (Thirumala, et al., 2010). Başka bir çalışmada ise, *Bacillus megaterium* SRKP-3 ile yapılan çalışmada optimum inkübasyon süresi 36. saat oldu bildirilmiştir (Pandian, et al., 2010). PHB üretiminde uygun inkübasyon süresinin 45 saat olduğunu bildiren çalışmaların yanısıra 24, 48, 72 ve 120 saatlere rastlandığı bildiren araştırmalar da vardır (Nam and Ryu, 1985; Benoit, 1990; Klüttermann, et al., 2002; Yüksekdağ, ve ark., 2004).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen en uygun koşullar % 5 melas, pH 6, inkübasyon sıcaklığı 35 °C ve inkübasyon süresi 48 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda üretilen PHB'nin yapısal özelliklerini belirlemek için bir dizi analizler yapılmıştır.

Bacillus megaterium türünden sentezlenen PHB'nin kimyasal yapısı, moleküler yapısı, moleküler ağırlığı ve termal davranışını belirlemek amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar'da pozitif kontrol olarak Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen PHB ve ticari suş olan *Alcaligenes eutrophus* bakterisinden üretilen PHB'ler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca optimizasyon çalışmalarında karbon kaynaklarının etkisi incelenirken, sentetik ve endüstriyel karbon kaynakları arasında en fazla PHB üretiminin olduğu karbon kaynakları sükröz ve melas olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Dolayısı ile her iki karbon kaynağının kullanıldığı ortamlarda üretilen PHB'lerinde analizleri yapılarak karşılaştırılmıştır.

PHB'nin kimyasal yapısını belirlemek amacıyla, FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Sükröz ve melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamlarında *B. megaterium* bakterisinin sentezlemiş olduğu PHB'nin FTIR spektrumları Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen PHB ve *A. eutrophus* ticari suşunun sentezlemiş olduğu PHB ile kıyaslanmıştır. Bu çalışma sonucunda, 1850 – 1600 cm⁻¹ dalga sayısı PHB moleküllerinin C=O gerilmeleri olduğu belirlenmiş ve 1300 – 950 cm⁻¹ dalga sayılarındaki piklerde ise C–O gerilmelerinde ester bağları tespit edilmiştir. Ürettiğimiz PHB'lerden ve ticari PHB ile *A. eutrophus*'dan elde edilen PHB örneklerinden çekilen FTIR spektrumlarındaki karakteristik piklerin aynı olduğu belirlenmiştir. Bu piklerin

benzerliği PHB'lerin kimyasal olarak birbirlerinin muadili olabileceği ve sentezlenen PHB'lerin saflık oranlarının ticari olan ve standart üreticiden elde edilen PHB ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır (Şekil 4.7 / 4.8 / 4.9 / 4.10).

Yapılan çalışmalar sonucunda, *Bacillus sp.* 971 ve *Bacillus sp.* 112A sentezlemiş olduğu PHB'lerin kimyasal yapısını belirlemek amacıyla FTIR spektroskopisi çekilmiş ve *Bacillus sp.* 871 sentezlemiş olduğu PHB FTIR spektroskopisinde 1,714 cm^{-1} pik görülmüş ve C=O gerilmeleri olduğu tespit etmişlerdir. Aynı zamanda 1,190 cm^{-1} pikte ise C-O gerilmelerinde ester bağları tespit edilmiştir. *Bacillus sp.* 112A ise 1,722.43 cm^{-1} ve 1,276.88 cm^{-1} piklerin görüldüğü bildirilmiştir (Thirumala, et al., 2010). FTIR spektroskopisinde 1,730 cm^{-1} 'deki titreşimlerin karbonil gruplara ait olduğu ve 1,280 – 1,053 piklerindeki titreşimlerin ise karboksil gruplarına ait pikler olduğu rapor edilmiştir (Rohini, et al., 2006). Tez çalışması kapsamında üretilen PHB'lerin Şekil 4.7 / 4.8 / 4.9 ve 4.10'daki FTIR analizleri incelendiğinde literatürde yapılan çalışmalardaki FTIR analizleri ile paralellik göstermektedir.

PHB'nin moleküler yapısını belirlemek amacıyla, proton NMR spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Sükroz ve melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamlarında *B. megaterium* bakterisinin sentezlemiş olduğu polimerin proton NMR spektrumları Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen PHB ve *A. eutrophus* ticari suşunun sentezlemiş olduğu PHB ile kıyaslanmıştır. Ticari PHB'nin proton NMR spektrumunda 1.2 ppm'de CH_3 'e ait, 2.5 ppm'de CH_2 'ye ait ve 5.2 ppm'de CH grubuna ait protonların pikleri görülmüştür (Şekil 4.11). *Alcaligenes eutrophus*'dan sentezlenen PHB'nin proton NMR spektrumunda 1.2 ppm'de CH_3 'e ait, 2.5 ppm'de CH_2 'ye ait ve 5.2 ppm'de CH grubuna ait protonların pikleri görülmüştür. Bu pikler ve buldukları yerler ticari PHB ile birebir örtüşmektedir (Şekil 4.12). Karbon kaynağı olarak sükroz kullanılarak sentezlenen PHB'nin proton NMR spektrumunda 1.3 ppm'de CH_3 'e ait, 2.5 ppm'de CH_2 'ye ait ve 5.2 ppm'de CH grubuna ait protonların pikleri görülmüştür. Bu pikler ticari PHB ve *A. eutrophus*'un sentezlemiş olduğu PHB ile birebir örtüşmektedir (Şekil 4.13). Karbon kaynağı olarak melas kullanılarak üretilen PHBV'nin proton NMR spektrumu incelendiğinde 0.8 ppm'de 3HV'ye CH_3 , 1.3 ppm'de 3HB'e ait CH_3 'lerin, 2.2 ppm'de 3HV'ye ait CH_2 'lerin, 2.6 ppm'de 3HB ve 3HV'ye ait CH_2 'lere, 5.3 ppm'de 3HB ve 3HV'ye ait CH'lara ait proton pikleri görülmüştür. Üretilen

PHBV'nin 3HV içeriği proton NMR'ı kullanılarak hesaplanmış ve kütlece % 6.8 3HV monomeri içerdiği hesaplanmıştır. Bu bilgiler ışığında, sentezlenen PHB'lerin Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen ve ticari suş *A. eutrophus*'dan sentezlenen PHB ile aynı moleküler yapıya sahip oldukları tespit edilmiştir. Sükrozun karbon kaynağı olarak kullanılması ile sentezlenen polimerin PHB olduğu, melasın karbon kaynağı olarak kullanılması sonucu sentezlenen polimerin ise P(HB-co-HV) olduğu belirlenmiştir.

PHB'nin moleküler yapısını belirlemek için yapılan NMR spektroskopisindeki taramalarda, 0,8 – 0,95 civarı piklerde 3HV ait – CH₃, 1,2 – 1,35 arası piklerde ise 3HB ait – CH₃ pikleri, 2,45 – 2,65 arası piklerde 3HB ve 3HV ait – CH₂ pikleri ve 5,2 – 5,3 arasındaki piklerde ise 3HB ve 3HV ait – CH pikleri görüldüğü rapor edilmiştir (Jian Tao, et al., 2009). *Bacillus sp.* 871 ve *Bacillus sp.* 112A suşlarının üretmiş olduğu PHB'lerin NMR spektroskopiler taranmış ve her iki türünde 5.27 ppm'de (-CH-) pikleri ve 2,57 ppm'de ise (-CH₂-) pikleri rastlandığı rapor edilmiş. Ayrıca 1.30 ppm'de (-CH₃-) pikleri gözlemlenmiştir. Metil ester bağları 3.50 ppm'de keskin pikler şeklinde görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında sentezlenen polimerin poly-3-hidroksibütirat (PHB) olduğu rapor edilmiştir (Thirumala, et al., 2010). Yapılan başka bir araştırmada, dört farklı karakteristik NMR piki görülmüştür. Bu çalışmada sentezlenen PHB 19,75 ppm (-CH₃-), 40,79 ppm (-CH-), 67,61 ppm (-CH₂-). 169,3 ppm (-C=O-)'nin pikleri belirlenerek moleküler yapısı ortaya çıkartılmıştır. Bu pikerlin oluşurduğu molekül 3-hidroksibütirat olduğu bildirilmiştir (Doi, et al.,1986; Khardenavis, et al., 2009).

Literatürde yapılan çalışmalar ile tez çalışmamızı kıyasladığımızda Şekil 4.11 – 4.12 – 4.13 ve 4.14'deki proton NMR spektrumları ile literatürde bildirilen NMR spektrumları ile benzerlik gösterdiği ve sükroz temelli polimerin PHB, melas temelli polimerin ise P(HB-co-HV) olduğu belirlenmiştir.

Sükroz ve melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamları kullanılarak *B.megaterium*'un sentezlemiş olduğu PHB'nin moleküler ağırlığını belirlemek için viskozimetrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntem ile sükrozun karbon kaynağı olarak kullanılması sonucu sentezlenen PHB'nin moleküler ağırlığı 428000 g/mol olarak

bulunmuştur. Melasın karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve optimum koşullarda sentezlenen PHB'nin moleküler ağırlığı 491000 g/mol olarak bulunmuştur.

Bacillus sp. 871 suşunun sentezlemiş olduğu PHB'nin moleküler ağırlığı 513 kDa, *Bacillus sp.* 112A suşunun ise sentezlemiş olduğu PHB'nin moleküler ağırlığı 521 kDa olarak tespit edildiği rapor edilmiştir (Thirumala, et al., 2010). PHB'nin moleküler ağırlığı 2×10^5 ile 3×10^6 arasında değiştiği ve bu moleküler ağırlıklarda kullanılan uzun zincirli hidrokarbonların ve PHB moleküllerinin kristalite özelliğinin etkisinin de olduğu rapor edilmiştir (Steinbüchel, et al., 1992).

Sükrozun karbon kaynağı olarak kullanıldığı besi ortamları kullanılarak *B.megaterium*'un sentezlemiş olduğu PHB'nin termal davranışını belirlemek için Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizi ile belirlenmiştir. Sükroz temelli PHB'nin 137.34, 160.84 ve 185.41°C'de olmak üzere birden fazla erime noktası (Tm), -26.85°C'de camlaşma sıcaklığı (Tg) noktası ve 72.88°C kristallik noktası (Tc) sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15). Melasın karbon kaynağı olarak kullanılması ile sentezlenen PHBV'nin DSC eğrisi (Şekil 4.16), 139.21, 157.44 ve 169.63 °C olmak üzere birden fazla erime noktası (Tm), 6.44°C'de camlaşma sıcaklığı (Tg) noktası göstermektedir. Her iki biyopolimerde de birden fazla erime noktası olması, PHB ve PHBV'nin birkaç farklı moleküler ağırlık kesiti içerdiğini düşündürmektedir.

Bacillus sp. 871 ve *Bacillus sp.* 112A türlerinin karbon kaynağı olarak glukozu kullanmaları sonucu sentezlemiş oldukları PHB'lerin sırasıyla erime sıcaklıkları (Tm) 152,9 – 147,7 °C'e ve camlaşma sıcaklıklarının (Tg) ise 0,8 – 1,8 °C olduğu rapor edilmiştir (Thirumala, et al., 2010). *Bacillus megaterium* BA-019 türünün sentezlediği PHB'nin Tm 174 °C ve Tg 3,9 °C olduğu bildirilmiştir (Kulprecha, et al., 2009). Yapılan bir çalışmada 680000 g/mol molekül ağırlığında ve % 6 oranında 3-hidroksivalerat içeren PHBV kullanmışlardır. Çalışmalarında PHBV'nin Tg değerini -6,6°C; Tc değerini 28,5°C; Tm değerini ise 161°C olarak bulmuşlardır (Choi and Park, 2004).

Bacillus megaterium XyC6 türünün PHB üreticisi olarak kullanıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Bundan dolayı *B. megaterium* XyC6 ile yapmış olduğumuz PHB çalışmaları literatüre önemli katkılar sağlayacaktır. Ayrıca ülkemizde

biyoplastik üretimine olan ilginin artması, ülkemizdeki biyoplastik üreticilerinin dışa bağımlı hale geleceğini göstermektedir. *B. megaterium* XyC6 türünden PHB üretilmesi ve geliştirilmesi, biyoplastik üreticilerinin yerel bir suşdan PHB üretebilmesine olanak sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abe, H., Kikkawa, Y., Iwata, T., Aoki, H., Akehata, T., and Doi, Y., 2000, Microscopic visualization on crystalline morphologies of thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymer, *Polymer*, 41, 867-874.
- Ahn, W.S., Park, S.J., and Lee, S.Y., 2000, Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, 3624-3627.
- Akkurt, S., 2007, Plastik malzeme bilimi teknolojisi ve kalıp tasarımı, Birsen Yayınevi, 552 s.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- Anderson, A.J., and Dawes, E.A., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54, 450-472.
- Angelova, N., and Hunkeler, D., 1999, Rationalizing the design of polymeric biomaterials, *Trends in Biotechnology*, 17; 409-421.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Anton, J., Llobet-Brossa, E., Rodriguez-Valera, F. and Amann, R., 1999, Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystallizer ponds. *Environmental Microbiology*, 1: 517-523.

Ateş, M., ve Ekmekçi, S., 2001, Pancar melası kültüründe *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'dan PHB üretimi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25, 3, 61-70.

Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L., and Holmes, P.A., 1984, Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate. *Journals of Materials Science*, 19, 2781-2794.

Baysak, M.İ., 2008, Bazı Rhizobium türlerinin Polihidroksibütirat (PHB) verimleri üzerine farklı ortam şartlarının etkileri, Yüksek Lisans Tezi, F.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 55 s. (yayınlanmamış).

Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., and Goulet, J., 1995, Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1, 165-169.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berekaa, M.M., Al Thawadi, A.M, 2012, Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer by *Bacillus megaterium* SW1-2: Application of Box-Behnken design for optimization of process parameters, *African Journal of Microbiology Research*, 6, 9, 2101-2108.
- Bertrand, J.L., Ramsay, B.A., Ramsay, J.A., and Chavarie, C., 1990, Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 10, 3133-3138.
- Benoit, T.G., Wilson, G.R., and Baugh, C.L., 1990, Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1, *Letters in Applied Microbiology*, 10, 15-18.
- Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, *KÜKEM Dergisi*, 19, 2, 23-32.
- Beyatlı, Y., Aslım, B., ve Mumcu, Z.N., 1999, Doğada parçalanabilen termobiyoplastiklerin üretimi, Devlet Planlama Teşkilatı Projesi (DPT: 97K121150), s 21-37.
- Bloembergen, S., Holden, D., Hamer, G., Bluhm, T., and Marchessault, R., 1986, Studies of composition and crystallinity of bacterial poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate), *Macromolecules*, 19, 2865-2871.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bormann, E.J., Leissner, M., and Beer, B., 1998, Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 84-88.
- Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ., Savaşçı, S., Paslı, N., ve Kaynaş, S., 2000, Ekoloji I-II, İspartalılar Eğitim Kültür Sağlık Yardımlaşma ve Dayanışma Vakfı Yayınları No:6, Ankara, 884 s.
- Bonartseva, G.A., Myskina, V.L., and Zagreba, E.D., 1994, Poly- β -hydroxybutyrate content in cells of various *Rhizobium species* during growth with different carbon and nitrogen sources, *Microbiology*, 63, 1, 45-48.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Lloyd, R., and Fuller, R.C., 1991, The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*, *Archives of Microbiology*, 155, 337-340.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., and Geneser, K.L., 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, *Journal of Biotechnology*, 65, 127-161.
- Budwill, K., Fedorak, P.M., and Page, W.J., 1996, Anaerobic microbial degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) with various terminal electron acceptors, *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 4, 2, 91-102.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Buzarovska, A., Grozdanov, A., 2009, Crystallization kinetics of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (dicyclohexylitaconate) PHBV/PDCHI blends: thermal properties and hydrolytic degradation, *Jornal of Materials Science*, 44:1844–1850]
- Chen, G.Q., König, K.H., and Lafferty, R.M., 1991, Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*, *FEMS Microbiology Letters*, 84, 174-176.
- Choi, S.J., Park, H.W., 2004, Effect of biodegradable plasticizers on thermal and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate). *Polymer Testing* 23, 455–460.
- Daniel, M., Choi, J.H., Kim, J.H., and Lebeault, J.M., 1992, Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- β -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 702-706.
- Dave, H., Ramakrishna, C., and Desai, J.D., 1996, Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus sp.*IPC-403, *Indian Journal of Experimental Biology*, 34, 216-219.
- Dawes, E.A., and Senior, P.J., 1973, The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms, *Advances in Microbial Physiology*, 10, 135-266.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Demirbilek, M., 2011, Sinir doku onarımı için polimerik nanofiber doku iskeleleri, Doktora Tezi, Hacettepe Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, 100 s. (yayınlanmamış).
- Di Lorenzo, M.L., and Silvestre, C., 1999, Non-isothermal crystallization of polymers, Progress in Polymer Science, 24, 917-950.
- Dias, J.M., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., and Albuquerque, M.G., 2006, Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures from the substrate to the final product, Macromolecular Bioscience, 6, 885-906.
- Dinigüzel, Ö., 2007, Türkiye'den PHB üreticisi Halofilik Bakterilerin izolasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, 50 s. (yayınlanmamış).
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., and Soga, K., 1986, Nuclear Magnetic Resonance studies on Poly(Beta-hydroxybutyrate) and a copolyester of Beta-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 macromolecules, 19, 2860-2864.
- Du, G., Si, Y., and Yu, J., 2001, Inhibitory effect of medium chain length fatty acid on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acid by *Ralsonia eutrophus*. Biotechnology Letters, 23, 1613-1617.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dunlop, W.F., and Robards, A.W., 1973, Ultrastructural study of Poly- β -Hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*, *Journal of Bacteriology*, 114, 2, 131-155.
- Dyall-Smith, M. (2004), *HaloHandbook*, [www. microbiol.unimelb.edu.au / staff/mds/ HaloHandbook](http://www.microbiol.unimelb.edu.au/staff/mds/HaloHandbook).
- Encarnacio'n, S., Dunn, M., Willms, K., and Mora, J., 1995, Fermentative and aerobic metabolism of *Rhizobium etli*, *Journal of Bacteriology*, 177, 3058-3066.
- Fiorese, M.L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, M.A., de Aragao, G.M.F., and Reis, M.A.M., 2009, Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate, *Engineering in Life Sciences*, 9, 454 – 461.
- Findlay, R.H., and White, D.C., 1983, Polymeric β -hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*, *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1, 71-78.
- Garcia, B., Olivera, E.R., Minambres, B., Fernandez-Valverde, M., Canedo, L.M., Prieto, M.A., Garcia, J.L., Martinez, M., and Luengo, J.M., 1999, Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 29228-29241.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gouda, M.K., Swellam, A.E., and Omar, S.H., 2001, Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources, *Microbiology Research*, 156, 3, 201-207.
- Grothe, E., Moo-Young, M., and Chisti, Y., 1999, Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 132-41.
- Hoffmann, N., Steinbüchel, A., and Rehm, B.H.A., 2000, Homologous functional expression of cryptic phaG from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54, 665-670.
- Huisman, G.W., Leeuw, O., Eggink, G., and Witholt, B., 1989, Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates, is a common feature of fluorescent *Pseudomonads*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 8, 1949-1954.
- Holmes, P.A., 1985, A microbially produced biodegradable thermoplastic, *Physics in Technology*, 16, 32-36.
- Holmes, P.A., 1988, Biologically produced PHA polymer and copolymers. In *Developments in Crystalline Polymers*, vol 2. Edited by Bassett DC. London Elsevier, 1-65.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J.N., and Seguin, J.P., 1996, ¹H NMR spectroscopic determination of poly-3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 195-201.
- Jian, T., Cunjiang, S., Mingfeng, C., Dan, H., Li, L., Na, L., and Shufang W., 2009, Thermal properties and degradability of poly(propylene carbonate) / poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PPC/PHBV) blends, *Polymer Degradation and Stability*, 94, 575–583.
- Kallio, R.E., and Harrington, A.A., 1960, Sudanophilic granules and lipid of *Pseudomonas methanica*, *Journal of Bacteriology*, 80, 321-4.
- Karaboz, İ., ve Umay, F.B., 1994, *Pseudomonas extorquens* den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 6-8 Temmuz 1994 Edirne, s14-17.
- Kato, N., Konishi, H., Shima, M., and Sakazawa, C., 1992, Production of 3-hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73, 3: 246-247.
- Kessler, B., Westhuis, R., Witholt, B., and Eggink, G., 2001, Production of microbial polyesters: fermentation and downstream processes, In *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology: Biopolyester*, vol 71. Edited by Babel, W., Steinbüchel, A., Berlin: Springer, 159-182.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Khan, S.T., and Hiraishi, A., 2001, Isolation and characterization of a new poly(3hydroxybutyrate)-degrading, denitrifying bacterium from activated sludge, FEMS Microbiology Letters, 205, 253-257.
- Khanna, S., and Srivastava, A.K., 2005, Recent advances in microbial Polyhydroxyalkanoates, Process Biochemistry, 40, 607-619.
- Khardenavis, A.A., Vaidya, N.A., Kumar, S.M., and Chakrabarti, T., 2009, Utilization of molasses spentwash for production of bioplastics by waste activated sludge, Waste Management, 29, 2558 – 2565.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K., and Woo, S.I., 1994, Production of poly-(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate feeding using on-line glucose analyser, Enzyme and Microbial Technology, 16, 556-561.
- Kim, B.S., 2000, Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, Enzyme and Microbial Technology, 27, 774-777.
- Kim, Y.B., and Lenz, R.W., 2001, Polyesters from microorganisms, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 71, 51-79.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- King, P.P., 1982, Biotechnology. An industrial view, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 1, 2-8.
- Klüttermann, K., Tauchert, H., Kleber, H.P., 2002, Synthesis of poly- β -hydroxybutyrate by *Agrobacterium radiobacter* after growth on D-Carnitine. *Acta Biotechnologica*, 22, 261-269.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., and Thongchul, N., 2009, Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 3, 240-245.
- Kunioka, M., Kawaguchi, Y., and Doi Y., 1989, Production of biodegradable copolyester of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30, 569-7.
- Labuzek, S., and Radecka, I., 2001, Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85, *Journal of Applied Microbiology*, 90, 353-357.
- Lach, D.A., Sharma, V.K., and Vary, P.S., 1990, Isolation and characterization of a unique division mutant of *Bacillus megaterium*, *Journal of General Microbiology*, 136, 545-553.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lafferty, R.M., Korsatko, B., and Korsatko, W., 1988, Microbial production of Poly- β -Hydroxybutiric acid, In: Rehm, H.J., and Reed, G.,(eds), Biotechnology, vol. 6b, VHC, Weinhein, pp 135-176.
- Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W., and Yu, P.H., 2001, Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus species* isolated from municipal activated sludge, Applied Biochemistry and Biotechnology, 91-93, 515-524.
- Lee, S.Y., Yim, K.S., Chang, H.N., and Chang, Y.K., 1994, Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3- hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 32, 203-211.
- Lee, S.Y., 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49, 1-14.
- Lee, S.Y., and Choi, J., 1999, Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymer, In Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 'nd edn. Edited by Demain, A.L., Davies, J.E., Washington DC, ASM, 616-627.
- Lemoigne, M., 1926, Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutric acid. Bull. Soc. Chem. Biol. 8, 770-782.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lillo, J.G., and Valera, F.R., 1990, Effects of culture conditions on poly(β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*, Applied and Environmental Microbiology, 56, 8, 2517-2521.
- Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K.P., and Becher, B., 2001, Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate. Biomaterials, 22, 2447-2452.
- Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., and Olivera, R.E., 2003, Bioplastics from Microorganisms, Current Opinion in Microbiology, 6, 251-260.
- Macrae, R.M., and Wilkinson, J.F., 1958, Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*, Journal of General Microbiology, 19, 210-222.
- Madison, L.L., and Huisman, G.W., 1999, Metabolic engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to plastics, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63, 21-53.
- Marchessault, R.H., Okamura, K., and Su, C.J., 1970, Physical properties of poly(β -hydroxybutyrate). II Conformational aspect in solution, Macromolecules, 3, 735-740.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McCool, G.J., Fernandez, T., Li, N., and Cannon, M.C., 1996, Polyhydroxyalkanoate inclusion body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, FEMS Microbiology Letters, 138, 41-48.
- Mercan, N., and Beyatlı, Y., 2001, *Bacillus sphaericus* suşlarının poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimlerinin incelenmesi, Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25, 2, 1-7.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., and Swings, J., 1993, Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils, Applied and Environmental Microbiology, 59, 10, 3233-3238.
- Molitoris, H.P., Moss, S.T., and de Koning, G.J.M., 1996, Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria, Applied Microbiology and Biotechnology, 46, 570-579.
- Murray, R.G.E., Doetsch, R.D., and Robinow, C.F., 1994, Determinative and cytological light microscopy, In manual of Methods for General Bacteriology, vol 10. edited by Gerhardt, p., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R., Washington DC, ASM, 21-41.
- Nam D.H., and Ryu, D.D.Y., 1985, Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *Bacillus circulans*. Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 27, 789 – 801.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

NCBI, 2012, National Center for Biotechnology Information ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/379070234?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=2&RID=2CXFW25K01S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/379070234?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=2&RID=2CXFW25K01S))

Nguyen, S., Yu Ge, G.E., and Marchessault, R.H., 2002, Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates): Preparation of well defined oligomers, *Biomacromolecules*, 3, 1, 219-224.

Nickerson, K.W., Zarnick, W.J., and Kramer, V.C., 1981, Poly- β -hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 12, 327-331.

Ostle, A.G., and Holt, J.G., 1982, Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 238-241.

Ömeroglu, E.E., ve Karaboz, İ., 2010, İzmir Orta Körfez'inden izole edilen biyoluminesen *Vibrio* izolatının poli- β -hidroksibütirat(PHB) üretim verimliliğinin belirlenmesi, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3(2) 21-26.

Page, W.J., 1989, Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31, 329-333.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Page, W. J., 1992a, Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnology Letters*, 14, 5, 385-390.
- Page, W.J., 1992b, Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, *FEMS Microbiology Reviews*, 103, 149-158.
- Page, W.J., Sherburne, R., D'Elia, L., and Graham, L.L., 1995, Poly(β -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 22-31.
- Pandian, R.K.S., Deepak, V., Kalishwaralal, K., Rameshkumar, N., Jeyaraj, M ., and Gurunathan, S., 2010, Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient source by *Bacillus megaterium* SRKP-3, *Bioresource Technology*, 101, 705 – 711.
- Poirier, Y., Nawrath, C., and Somerville, C., 1995, Production of polyhydroxyalkanoates, a family of Biodegradable plastics and elastomers, in bacterial and plant, *Biotechnology*, 13, 142-150.
- Poirier, Y., 2002, Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41, 2, 131-155.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qi, R., and Rehm, B.H., 2001, Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate syntase, *Microbiology*, 147, 12, 3353-3358.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., and Ramsay, J.A., 1990, Production of poly(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 7, 2093-2098.
- Rehm, B.H.A., Antonio, R.V., Spiekermann, P., Amara, A.A., and Steinbüchel, A., 2002, Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) PHB synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594, 178-190.
- Rehm, B.H., 2003, Polyester synthases natural catalysts for plastics, *Biochemical Journal*, 376, 15-33.
- Rohini, D., Phadnis, S., and Rawal, S.K., 2006, Synthesis and characterization of poly- β -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1, *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 276–283.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rosovitz, M.J., Voskuil, M.I., and Chambliss, G.H., 1998, Bacillus, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, by edited Collier, L., Balows, A., and Sussman, M., Oxford University Press, 9 Edition, Volume 2, New York.
- Ryu, W.H., Hahn, K.S., Chang, K.Y., Chang, N.H., 1996, Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation, Biotechnology and Bioengineering, 55, 28-32.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: A laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I., and Kalnin, M., 2000, Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films, Process Biochemistry, 35, 573-579.
- Steinbüchel, A., 1991, Polyhydroxyalkanoic acids, In: Byrom, D., (ed) Biomaterials: novel materials from biologicalmsources, Stockton, New York, 124-213 p.
- Steinbüchel, A., and Schlegel, H.G., 1991, Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, Molecular Microbiology, 5, 535-542.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., and Valentin, H., 1992, Molecular basis for biosynthesis of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria, FEMS Microbiology Reviews, 103, 217 – 230.

Steinbüchel, A., and Fuchtenbusch, B., 1998, Bacterial and other biological systems for polyester production. TIBTECH, 16, 419-427.

Stieb, M., and Schink, B., 1984, A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytrophus*, ge. Nov. sp. nov., possessing various fermentation pathways, Archives of Microbiology, 140, 139-146.

Stubble, J., and Tian, J., 2003, Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis the role of PHA synthase, Natural Product Reports, 20, 445-457.

Sudesh, K., Abe, H., and Doi, Y., 2000, Synthesis, structure and properties of Polyhydroxyalkanoates, Biological Polyesters, Progress in Polymer Science, 25, 10, 1503-1555.

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

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tal, S., and Okon, Y., 1985, Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd, Canadian. Journal of Microbiology, 31, 608-613.
- Tamdoğan, N., 2008, *Bacillus subtilis* kltrlerinden PHB (Poli- β -Hidroksibütirat) retimi, Yüksek Lisans Tezi, C.B., Fen Bilimleri Enstitüsü, 61 s. (yayınlanmamış).
- Tanaka, K., Katamune, K., and Ishizaki, A., 1993, Fermentative production of poly-Beta- hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*, Biotechnology Letters., 15, 12, 1217-1222.
- Tekin, E., 2008, İzmir amaltı Tuzlası'dan Polibetahidroksibtirat (PHB) reticisi halofilik mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik karakterizasyonu ve PHB retim verimliliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 122 s. (yayınlanmamış).
- Thirumala, M., Reddy, V.S., Mahmood, S.K., 2010, Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus spp.* İsolated from soil and activared sludge, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 37, 271-278.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Valentin, H.E., Lee, E.Y., Choi, C.Y., and Steinbüchel, A., 1994, Identifications of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 710-716.
- Weber, C.J., 2000, Biobased packaging materials for the food Industry, The EU Directorate 12, Frederiksberg.
- Williamson, D.H., and Wilkinson, J.F., 1958, The isolation and estimation of the poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus species*, *Journal of General Microbiology*, 19, 198-209.
- Witholt, B., and Kessler, B., 1999, Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 279-285.
- Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K., and Chen, G., 2001, Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus sp.* JMa5 cultivated in molasses media, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 111-118.
- Xi, J., Wu, Q., Yan, Y., Zhang, Z., Yu, P.H.F., Cheung, M., Zhang, R., and Chen, G., 2000, Hyperproduction of polyester consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 43-49.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yağmurlu, M.F., Korkusuz, F., Gürsel, I., Korkusuz, P., Örs, Ü., ve Hasırcı, V.J., 1999, Sulbactam-Cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate local antibiotic delivery system; in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis, *Jornal of Biomedical Materials Research*, 46, 494-503.

Yılmaz, M., Beyatlı, Y., 2003, Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat, *Orlab Online Mikrobiyoloji Dergisi*, 1, 9, 1-33.

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

Young, H.L., Chao, F., Turnbull, C., and Philpott, D.E., 1972, Ultrastructure of *Pseudomonas saccharophila* at early and late log phase of growth, *Journal of Bacteriology*, 109, 2, 862-868.