

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *RHIZOBIUM* BAKTERİLERİNİN MELAS
BESİORTAMINDA POLY- β -HİDROKSİBÜTİRAT (PHB)
ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ**

Züleyha TÜRKOĞLU

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Seher GÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ELAZIĞ- 2009

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *RHIZOBIUM* BAKTERİLERİNİN MELAS
BESİORTAMINDA POLY- β -HİDROKSİBÜTİRAT (PHB)
ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ**

Züleyha TÜRKOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

Danışman:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

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

TEŐEKKÖR

Bu alıŐma sırasında yardımlarımı esirgemeyen bilgi ve görüşlerinden faydalandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Seher GÖR'e, laboratuvar çalıŐmalarımnda her türlü kolaylığı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya, ArŐ. Gör. Venhar ÇELİK ve ArŐ. Gör. Abdullah ASLAN'a teŐekkür ederim.

Züleyha TÖRKOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLolar LİSTESİ	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	5
2.1. Biyoplastiklerin Genel Özellikleri	5
2.2. PHB'nin Keşfi	8
2.3. PHB'nin Biyosentezi	10
2.4. PHB'nin Biyolojik Parçalanabilirliği	11
2.5. PHB'nin Kullanım Alanları	13
2.6. PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar ve PHB'nin Ucuz Üretimi	14
2.7. PHB Üreten Canlılar	16
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Bakteri Kültürleri	20
3.1.2. Besiyerleri	20
3.2. Metot	21
3.2.1. Suşların İzolasyonu, Kültürel ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti	21
3.2.2. Suşların Muhafaza Edilmesi	21
3.2.3. Analitik Ölçüm İçin PHB Metodu	21

3.2.4. PHB'ye Ait Standart Grafiğın Hazırlanması	22
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Suşların Kültürel Özellikleri	23
4.2. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	23
4.3. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi	26
4.4. PHB Verimlerinin Belirlenmesi	29
5. KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ.....	37

TABLolar LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1.1. Değişik kriterlere göre mikrobiyal biyoplastiklerin sınıflandırılması	6
Tablo 4.2.1. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %0,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)	23
Tablo 4.2.2. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %1' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)	24
Tablo 4.2.3. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %1,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)	24
Tablo 4.3.1. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %0,5' lik melas konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)	26
Tablo 4.3.2. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %1' lik melas konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)	27
Tablo 4.3.3. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %1,5' lik melas konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)	27
Tablo 4.4.1. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %0,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	29
Tablo 4.4.2. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %1' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	30
Tablo 4.4.3. <i>R. phaseoli</i> suşlarının %1,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.1. PHA' nın genel yapısı	7
Şekil 2.3.1. <i>Alcaligenes etrophus</i> ve <i>Rhodopseudomonas rubrum</i> 'daki PHB sentez ve yıkım yolu	11
Şekil 2.4.1. PHB'nin parçalanması ve sentezi	12
Şekil 3.2.4.1. Krotonik Asit Formundaki Standart PHB'nin 235 nm. Dalga boyunda miktara bağlı Standart Grafiği	22

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI *RHIZOBIUM* BAKTERİLERİNİN MELAS BESİORTAMINDA POLY- β -HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMLERİNİN İNCELENMESİ

Züleyha TÜRKOĞLU

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2009, Sayfa: 36

Bu araştırmada Elazığ yöresinden alınan toprak örneklerinden izole edilen doğal *Rhizobium* suşlarının, atık bir madde olan melasın farklı konsantrasyonlarında spektrofotometrik metot yardımıyla Poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimleri tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak Ankara Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen *Rhizobium phaseoli* CIAT 899 suşu kullanılmıştır. *Rhizobium* cinsine ait suşlar, melas besi ortamında 28 °C de 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler santrifüjlenmiş, elde edilen biomass kurutulmuştur. Kuru ağırlıkları tespit edildikten sonra sonikasyon işlemleri ile PHB elde edilmiştir. PHB, sülfirik asit ile krotonik asite dönüştürülmüş, son maddenin miktarı 235 nm. UV spektrofotometrede ölçülmüştür.

Rhizobium phaseoli CIAT 899 suşunun hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi % 0,5'lik melas konsantrasyonunda 96 saat lik inkübasyon süresi sonunda % 29,43 olarak tespit edilmiştir. Çalışılan diğer *Rhizobium* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri farklı melas konsantrasyonlarında %5,90-% 60,23 arasında bulunmuştur. Farklı melas konsantrasyonlarındaki hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi 15F kodlu izolat da, % 1,5'lik melas konsantrasyonunda % 60,23 olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Rhizobium phaseoli*, Poly- β -hidroksibütirat, Melas

ABSTRACT

MSc Thesis

STUDY OF POLY-BETA-HYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION IN MOLASSES MEDIUM OF SOME *RHIZOBIUM* BACTERIA

Züleyha TÜRKOĞLU

Firat University
Science Institute
Biology Department
2009, Page: 36

In this research, production of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Rhizobium* strains which are isolated from the soil which is taken from different regions of Elazığ province was studied. *Rhizobium phaseoli* CİAT 899 strains which is taken from Ankara Soil and Fertilizer Research Institute, is control group. *Rhizobium* strains were grown in molasses medium at 28 °C temperature for 96 hours. After incubation period cultures were centrifugated and biomass which are obtained were dried. After dry cell weigh had been measured, PHB were obtained by ultrasonication. PHB is converted to crotonic acid by using sulfuric acid. The amount of the last substance is measured by using UV spectrophotometer at 235 nm. According to *Rhizobium phaseoli* CİAT strain cell's dry weights, maximum PHB yields were obtained %29,43 percent in % 0,5 percent molasses's concentration after in 96 hours incubation time.

According to be worked *Rhizobium phaseoli* CİAT strain cell's dry weights, PHB yields were obtained between %5,90- % 60,23 percent different molasses concentrations. According to cell's dry weights in different maximum PHB yield was obtained, in labelled 15F extract, % 60,23 percent in %1,5 percent molasses concentration.

Key Words: *Rhizobium phaseoli*, Poly- β -hydroxybutyrate, Molasses

1. GİRİŞ

İnsan varoluşundan beri doğadan yararlanmış ancak zamanla bilimin olanaklarıyla kendini yeterince güçlü gören insan, doğayı sınırsızca kullanmaya, hatta sömürmeye başlamış ve uzun süre doğaya verdiği zararlardan habersiz yaşamıştır. Çevreye verilen bu zararlar doğanın kendini yenileyebilme özelliği nedeniyle başlangıçta önemsenmemiş, hatta çevrenin zamanla bu kirliliği yok edeceği düşünülmüştür. Zaman içinde çevreye bırakılan kirliliğin nicel ve nitel olarak artması, çevrenin kendini yenileyebilme özelliğinin çok üstüne çıkmış ve çevre hızla bozulmaya başlamıştır [1].

Dünya nüfusuyla birlikte çoğalan insan faaliyetleri ve teknolojik gelişmelerle gerek endüstride gerekse günlük yaşamımızda yaygın olarak kullanılan organik kirleticilerin miktarı ve çeşitliliği, modern yaşamın gereksinimleri karşısında gün geçtikçe artmaktadır. Endüstrideki ilerlemeler ve gelişen tarım teknolojileri, pestisitler, petrol ve petrol türevleri gibi çeşitli kullanım alanlarına sahip olan bir çok organik kirletici ajanın günlük hayatımıza girmesine neden olmaktadır.

Hızla gelişmekte olan ülkemizde enerji kaynağı olarak petrolün tüketimindeki artış, petrol ürünlerinin üretimi, işlenmesi esnasında oluşan atıklar, taşınması esnasında oluşan kazalar ve sızıntılar nedeni ile hidrokarbonlarla kirletilmiş alanların miktarı da artmaktadır. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de kullanılan bu organik bileşiklerin özellikle petrol ürünleri ve kimyasallar' ın (ilaç maddeleri, deterjanlar, böcek ve bitki ilaçları ve plastikler) kullanımındaki artış canlılar için toksik ve kanserojen olduğu bilinen ciddi sağlık sorunlarıyla birlikte çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir [2, 3].

Bu organik bileşiklerden plastik atıklar günümüzün önemli sorunlarından. Son 50 yıl içerisinde petrol kökenli plastikler çok kullanılan materyaller haline gelmişlerdir. Plastiklerin çok yönlü olarak neredeyse her alanda kullanılabilmeleri, mükemmel sayılabilecek teknik özelliklerin bu noktaya gelmelerindeki en önemli nedenlerdir. Günümüzdeki plastikler; otomobillerdeki parçalarda, ev alet ve gereçlerinde, bilgisayar ekipmanlarında, medikal uygulamalarda ve paketleme elemanlarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ki bu sebeple de neredeyse vazgeçilmez bir konuma gelmişlerdir [4].

Atık plastikler genellikle diğer evsel atıklarla birlikte çöp boşaltma sahalarına atılmakta veya çöp çukurlarına dökülmektedir. Atık boşaltma sahalarının ve çukurlarının giderek dolması, yakma gibi alternatif yöntemlerin giderek artan maliyetleri, çeşitli teknik sorunlar, enerji kaynaklarını koruma ve atıkları çevresel açıdan kabul edilebilir şekilde azaltma isteğiyle birleşince atık plastiklerin yeniden kullanımı konusu gündeme gelmiştir. Fakat atık plastiklerin tekrar kullanıma hazırlanması için toplama, ayıklama, hammadde haline getirme aşamaları

maliyeti arttırmaktadır [5]. Petrol fiyatlarının artması ve diğer nedenlerden dolayı sentetik plastiklerin istenilen fiziksel ve kimyasal özelliklerini taşıyan petrol kökenli plastiklere alternatif, ekolojik yönden yararlı, biyolojik olarak parçalanabilen materyallerin geliştirilmesi ve kullanımı konusunda artan toplumsal ve bilimsel ilgi ortaya çıkmıştır [6].

Küresel endüstrileşme ve teknolojiadaki hızlı gelişmelere bağlı olarak ortaya çıkan atık maddelerin çevreye olan olumsuz etkilerini gidermek veya azaltmak için atık maddelerin giderimi ya da değerlendirilmesinde kullanılan klasik endüstriyel yöntemler yerine biyoteknolojik yöntemler tercih edilmektedir. Bu uygulamalarda atık maddelerin geri kazanımı çevre dostu teknolojilerin temel hedefi durumuna gelmiştir. Böylece hem endüstriyel atık maddelerin biyoteknolojik yöntemle geri kazanılarak tekrar ham madde olarak kullanılması gerçekleştirilecek, hem de tarım, kozmetik, sağlık, petrol endüstrisi ve çevre teknolojisi gibi alanlarda ekonomik olarak değerlendirilmesi sağlanmış olacaktır [2].

Son zamanlarda biyoteknoloji alanındaki araştırmalar mikroorganizmalar yardımı ile atık maddelerin parçalaması ve yeni ürünlerin elde edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylece hem çevre kirliliği azaltılacak hem de insanların yaşamı için yararlı ürünlerin elde edilmesi sağlanmış olacaktır. Söz konusu atık maddelerin ham madde olarak kullanımı sonucu mikrobiyal yolla elde edilen biyoteknolojik ürünlerden birkaçı mikrobiyal polisakkaritler, pigmentler, biyosümfektanlar (biyo-yüzey aktif maddeler) ve mikrobiyal termoplastiklerdir [3,7].

Petrokimyasal kaynaklı plastiklerin doğada uzun süre parçalanmadan kalmalarıyla meydana gelen çevre kirliliğinin önlenmesi amacıyla yapılan araştırmalarda mikroorganizmaların karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere, stres koşullarında depoladıkları lipit granüllerinin plastik özellikte olması ve bu plastik materyalin, doğada mikroorganizmalar tarafından parçalanması, mikroorganizmalar kullanılarak, plastik madde üretimini kapsayan bir sektörün gelişmesine neden olmuştur. Böylece biyolojik yolla parçalanabilen polimerlerin, (mikrobiyal termoplastik) üretimi önem kazanmıştır [8]. Bunlar çeşitli mikroorganizmalar tarafından, azot ve fosfor gibi temel besinlerin sınırlı konsantrasyonlarında ve karbon kaynağının fazlalığında enerji depo materyali olarak sentezlenen çeşitli hidroksialkanoat polimerleridir. Polihidroksialkanatların (PHA) polipropilen gibi çeşitli termoplastiklere benzer özelliklere sahip olduklarından polipropilenin yerine kullanılabilirler. PHA toprak, deniz, göl suları ve atık sulardaki mikroorganizmalar tarafından aerobik şartlarda karbondioksit ve suya kadar, anaerobik koşullar altında metana kadar tamamen parçalanabilmektedirler [9].

PHA biyoparçalanabilirlik ve biyoyumluluk göstermesi nedeniyle oldukça dikkat çekmiş ve üzerinde durulmaya başlanmıştır. Poli- β -hidroksibütirat (PHB) ise en yaygın olan ve en iyi bilinen PHA'dır [4].

1920'li yıllarda, bazı bilim adamlarının, bakteri hücresinde yedek enerji kaynağı olarak PHA sınıfının bir üyesi olan PHB'nin biriktirildiğini saptamaları, o zamanlar henüz farkına varılmayan günümüzde yoğun ilgi odağı olan yeni bir plastik malzeme sınıfının keşfinin başlangıcı olmuştur [10]. Biyolojik olarak parçalanabilen poli- β -hidroksibütirik asit (PHB)'in özellikleri yıllardan beri bilinmesine ve alınan patentlerin 1962'de J.N. Baptist tarafından Amerika'da orijinal olarak dosyalanmasına rağmen 1982'de Imperial Chemistry Industries Plastic (ICI plc.) tarafından bu polimerin Biopol ticari adıyla pazarlanmasına kadar, PHA ve PHB'nin endüstriyel üretimi üzerinde yeterince durulmamıştır [11]. Biopol, *Alcaligenes* cinsine ait bakteriler kullanılarak endüstriyel olarak üretilmiş ilk biyodönüştürülebilir plastiktir. Bu materyal, doğal ve sentetik polimerlerin tüm avantajlarını taşımaktadır. Güçlü kristal yapıda olup polimer ya da monomer birimlerine bağlı olan, elastik kauçuklara benzeyen çeşitli özelliklere sahiptir [12].

Birçok mikroorganizma tarafından doğal olarak sentezlenen PHB'nin, yüksek miktarlarda üretilen ve çoğunlukla ambalaj malzemesi olarak kullanılan polipropilenin özelliklerine benzerlik göstermesi, bu termoplastiğin Avrupa, Amerika ve Japonya'da endüstriyel çapta üretimine hız kazandırmıştır [13]. PHB özellikle *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* ve çeşitli toprak mikroorganizmaları tarafından oluşturulmaktadır. Bu mikroorganizmalardan bitkide nodül oluşturan toprak bakterileri olan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de hücre içi PHB depo etme yeteneği birçok araştırmaya konu olmuştur. Genel olarak hareketli olan bu bakterilerin en önemli özelliklerinden biri baklagiller ile simbiyotik ilişki sonucunda azotu fiske edebilmeleridir [8]. Son yıllarda çok sayıda *Rhizobium* bakterisine ait türlerin PHB'yi, serbest yaşam ve simbiyotik ilişkide biriktirdikleri gözlenmiştir.

PHB ve çeşitli PHA'ların üretimi için kullanılan substratlar ise özellikle karbon kaynağı açısından bakıldığında, glukoz, sükroz ve yağ asitleri ile alkanlar ve kloroalkanoik asitler gibi kimyasal bileşenlerdir [14, 15]. PHB ve kopolimerlerin kompozisyonu, kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişebildiği, ancak bu dağılımın tesadüfi olabileceği de söylenmiştir [16]. PHB oluşumu için kullanılan şeker substratının fiyatının, PHB üretiminin ticari başarısında sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu ve polimer üretiminin her bir tonu için, 3 ton glukoz kullanılması gerektiği bildirilmektedir [17]. Kullanılan glukozun, maliyeti yükseltmesi sonucunda üretilen PHB'nin kg fiyatı 15-30 Dolar arasında değişmektedir. Bu nedenle polimerin kullanım sınırlarını belirleyecek olan maliyet fiyatını düşürmek için, rekombinant türler

üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda PHB nin genetiği, moleküler biyolojisi ve metabolizmasının anlaşılması ve PHB biyosentez genlerinin klonlanmasıyla çeşitli rekombinant suşlar elde edilmiştir. Bunlar farklı monomer ünitelerinden oluşan polyesterleri sentezleme yeteneğine sahip olup daha fazla polimerin depo edilmesini mümkün kılmaktadır [10]. Bunun yanısıra farklı ve ucuz karbon kaynakları kullanarak yüksek PHB verimi elde etme amacıyla da çalışmalar yapılmaktadır [18]. Ekonomik biyoplastik üretimi için melas [19, 20] ksiloz, arpa ve soya atık suları ve peynir altı suyunun [21] kullanılması araştırılmaktadır. Özellikle melas, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır [10, 22]. Şeker endüstrisinin bir yan ürünü olan melas, kristalize şekerin eldesinden sonra şeker imali ve rafinesinin son ürünü ucuz karbon kaynaklarından biri olarak ta tanımlanabilir [4].

PHB'ın hücrede teşhisi ve konsantrasyonunun belirlenmesinde ¹H NMR ve Gaz Kromatografisi analizi ve FTIR spektroskopisi yöntemi kullanılabilir [23]. Canlı bakteri hücresi içerisindeki PHB depo granüllerinin tespit edilmesi için geniş olarak kullanılan metotlardan biri de lipofilik boyalarla boyamadır. Bu amaçla Nil Blue A, Sudan Black B ve Sudan III gibi bazı floresan boyalar kullanılabilir [24]. UV spektrofotometrik olarak tayini yapılabilen PHB, hücreden ayrıldığında, sülfürik asitle krotonik aside dönüştürülerek, 235 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülebilir.

Bu çalışmada Elazığ yöresinden alınan toprak örneklerinden izole edilen doğal *Rhizobium* suşlarının, atık bir madde olan melasın farklı konsantrasyonlarında spektrofotometrik metot yardımıyla Poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretim verimlerinin tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Biyoplastiklerin Genel Özellikleri

Biyoplastikler, değişik besin ve çevre koşulları altında gelişen mikroorganizmalar tarafından, stres koşulları altında mikroorganizmanın canlı kalabilmesi için hücre içi depo granülleri halinde biriktirilen, petrokimyasal plastiklerin neden olduğu çevresel kirliliğe alternatif olarak ortaya çıkan, geleneksel plastik potansiyeline sahip mikrobiyal olarak üretilen polimerlerdir [8, 25]. Keşfedildiği günden bugüne üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış olan mikrobiyal plastikler; orijinleri, monomer yapıları, monomer sayıları gibi farklı kriterler göz önüne alındığında çeşitli sınıflara ayrılmaktadırlar [26].

Biyosentetik orijinlerine göre biyoplastikler; mikroorganizmalar tarafından sentezlenemeyen bazı öncül maddelerin kültür ortamına eklenmesi ile üretilen aromatik monomerler içeren PHA'ları kapsayan yarı sentetik biyoplastiklerdir ki bu tipte dolgu maddesi olarak nişasta eklenmekte ve çapraz bağlarla nişasta-plastik oluşturulmaktadır. (örneğin; nişasta-poliyeten) Toprak mikroorganizmaları nişastayı kolayca parçalayabildiğinden polimer matriks te parçalanabilmektedir. Bu yüzden parçalanma süresince önemli bir azalma meydana gelmektedir fakat bazı plastikler kısmen parçalanabilmektedir. Nişasta parçalandıktan sonra açığa çıkan plastikler dayanıklı olup çevrede oldukça uzun bir süre kalmaktadır [27]. Doğal olanlarına benzeyen fakat yalnızca kimyasal yolla sentezlenen sentetik termoplastik polimerlerin bulunduğu sentetik biyoplastikler ise poliglikolik asit, polivinil alkol, poli(etilen oksit)'dir. Bunlar enzimatik veya mikrobiyal etkiye duyarlıdır. Plastiklerin bütün özelliklerini taşımadıklarından dolayı ticari açıdan plastiklerin yerini alacak derecede uygun değildirler. Son olarak genel metabolitler kullanılarak mikroorganizmalar tarafından üretilen PHB ve alifatik PHA'ların dahil olduğu doğal biyoplastikler, olarak üçe ayrılmaktadırlar [9].

Monomerlerin kimyasal yapısına göre biyoplastikler kendi içerisinde; alifatik yağ asiti çeşitlerini içeren biyoplastikler (doymuş, doymamış, düz ya da dallanmış monomerlerden oluşanlar) , aromatik yağ asiti çeşitlerini içeren biyoplastikler, hem alifatik hem de aromatik yağ asiti çeşitlerini içeren biyoplastikler ve farklı bileşikleri içeren biyoplastikler (poli- γ -glutamik asit, poli- ϵ -L-lisin, poli- β -L-malik asit, poliglikolik asit, siyanofisin gibi) olarak gruplandırılmaktadırlar [26]. Monomer büyüklüğüne göre biyoplastikler üçe ayrılmaktadırlar. Bunlar 3-5 karbonlu monomer içeren kısa zincir uzunluğuna sahip biyoplastikler, 6-14 karbonlu monomer içeren orta zincir uzunluğuna sahip biyoplastikler ve 14 karbondan daha fazla karbonlu monomer içeren uzun zincirli biyoplastiklerdir [9,28]. Polyesterdeki monomer sayısına göre; tek tip monomer içeren homopolimerik biyoplastikler ve birden fazla tip (kopolimer) monomer içeren heteropolimerik biyoplastikler olmak üzere ayrılırken,

mikroorganizma tarafından polyesterler olarak; tek tip ya da karışık (birden fazla) biyoplastik şeklinde gruplandırılmaktadır [26].

PHA' ları değişik kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür (Tablo 2.1.1).

Tablo 2.1.1. Değişik kriterlere göre mikrobiyal biyoplastiklerin sınıflandırılması [26]

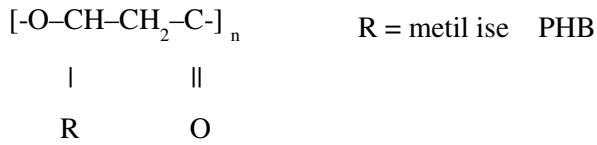
SINIF	ALT SINIF
Biyosentetik Köken	Doğal biyoplastikler: Mikroorganizmalar tarafından genel metabolitlerden üretilirler (örneğin; PHB'lar ve alifatik PHA'lar)
	Yarı sentetik biyoplastikler: Mikroorganizma tarafından sentezlenemeyen bazı öncü maddelerin besiyerine eklenmesine gerek vardır (örneğin; aromatik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

PHA'ların çok sayıda değişik tipleri olmasına karşın en yaygın ve en geniş kapsamlı olarak çalışılan tipi PHB'dir [29]. Bu yüzden bakteri PHA'larının fiziksel özellikleriyle ilgili bir çok bilgi PHB ve P(HB-co-HV) ile ilgili araştırmalardan elde edilmiştir [30, 31]. Mikrobiyal plastiğin hammaddesini poly-β-hydroxybutyrate (PHB) oluşturmaktadır.

Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen PHB, yapısında kısa zincirli β-hidroksi yağ asitleri içeren, prokaryotların membranla çevrili hücre içi depo maddesi olup, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan düz lineer bir polimerdir [31, 32, 33, 34].

Petrol kökenli polipropilene benzer fiziksel özellik gösteren PHB molekülü oldukça aktif D(-)-3-hidroksibütirik asitin bir polimeri olup yan zincirinde bir metil grubu taşımaktadır [30]. PHB D(-) konfigürasyonundaki asimetric karbon atomundan kaynaklı %100 stereospesifiktir ve oldukça kristal yapıdadır. Katı - kırılğan PHB kopolimerlerinin erime sıcaklığı 157-188 °C arasında değişir ve bu sıcaklık polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakındır [29, 31].

Hidroksialkanoatların poliesteri olan PHA'nın genel formülü Şekil 2.1.1' de gösterilmiştir [24].



Şekil 2.1.1. PHA' nın genel yapısı

Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB' nin genel formülü (C₄HO₂)_n şeklindedir. (n) sayısı 35 000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilmiştir [11,35]. Neme dirençli olması, suda çözünmemesi ve optik saflık gibi birçok kullanışlı özellikleriyle PHB, suda çözünen ya da neme duyarlı diğer biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerden farklılık gösterir. Ayrıca PHB oksijene karşı oldukça dayanıklıdır. PHB'nin UV ışınlarına dirençli, fakat asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. 3-hidroksivalerat gibi monomerlerin eklenmesi ya da diğer polimerlerle karıştırılarak yapılan denemelerle PHB'nin kırılğanlığının azaldığı bildirilmektedir. Monomer parça sayısının artmasıyla bozunma sıcaklığında bir değişiklik olmadan erime sıcaklığı düşmektedir. Bu ise termal parçalanma olmadan kopolimerin termal işlenmesine olanak tanımaktadır [36]. Ayrıca, polimerin su ve hava geçirmez oluşu hidrolitik parçalanmaya karşı direnç sağladığından PHB'nin kullanım olanakları genişlemektedir [32].

Bakteri hücrelerinde PHB granülleri faz-kontrast veya elektron mikroskop kullanıldığında kolayca gözlenebilir. Granüller, 100- 800 nm çapında olup genellikle küresel şekildedirler. 2-4 nm kalınlığında ünit olmayan bir membranla çevrilidir. İzole edilen PHB granülleri yaklaşık %98 PHB ve %2 protein içermektedir. *Bacillus cereus*'tan izole edilen PHB granüllerinin %50'si merkezi bir çekirdekten oluşmaktadır. Bu çekirdek en dışta bir membranla tekrar çevrilmiştir. Yapılan araştırmalar sonunda her bir granülün fibriler yapıda olduğu saptanmıştır [11]. Araştırmacılar bu fibrillerin eş zamanlı sentez ve suda çözünmeyen bir polimer yapısında, kristalizasyonun bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar, bakteri hücrelerinden hiç bozulmamış doğal PHB granülleri elde etmedeki zorluklar nedeniyle, PHB sentezinin fiziksel mekanizması konusunda halen bazı belirsizlikler olduğunu açıklamışlardır. Ancak, hücre içindeki PHB'nin yüksek bir kristallenme yüzdesiyle (%80) fibriler bir yapıya sahip olduğu kesin olarak bilinmektedir [5].

Mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan PHB oksijen konsantrasyonunun düzenlenmesinde, sporulasyon için enerji sağlanmasında ve redükleyici eküvalentler için elektron havuzu olarak da görev alır. Aynı zamanda hücrede redoks düzenleyicisidir [8]. Araştırmacılar, PHB'nin birçok mikroorganizma tarafından uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulduğunu ve PHB birikiminin genellikle fazlaca karbon kaynağı varlığında ancak büyüme için gerekli nitrojen kaynağı, oksijen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe, vb.) gibi besleyici maddelerin eksikliğinde gerçekleştiğini bildirmektedirler [24]. Ancak *Rhizobium etli* ve *Azotobacter vinelandii* UWD suşu gibi bazı bakterilerde ekspanansiyel gelişme devresinde de biriktirildiğini rapor etmişlerdir [8]. Yapılan araştırmalarda, büyüme ve PHB birikimi arasında yakın bir ilgi tespit edilmiştir. Buna göre bakteri gelişiminin Ekspanansiyel fazında PHB birikimi artmakta, geç ekspanansiyel-erken durgun dönemde ise maksimum düzeye ulaşmaktadır. Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir. Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir [10].

2.2. PHB 'nin Keşfi

Mikroskobun, mikrobiyoloji alanında kullanılmaya başlamasından bu yana, birçok kez küçük "yağ damlaları"nın bazı bakteri hücrelerinde düzenli bir şekilde gözlendiği belirtilmiştir. *Rhizobium* hücreleri içindeki böyle granüllerin nodüllerden izole edilen bakteroidlerde de bulunduğu gözlenilmiş ve bunlar "ışığı kıran damlacıklar" olarak belirtilmiştir. Birçok mikrobiyolog, bakterilerdeki lipofilik granülleri çok önceden tanımlamış olmasına rağmen, bu partiküllerin yapısı ilk kez Lemoigne tarafından 1923 yılında ortaya konmuştur [10].

Araştırmacı, *Bacillus subtilis* kültürleri distile suda otolize olduğu zaman, bilinmeyen bir asit oluşumu ile pH'nin azaldığını gözlemiştir. Bu bilinmeyen asidin, şeker hastalarında görülen ürindeki β -hidroksibütirik asite benzer olduğu sonradan bulunmuştur [11]. Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içinde PHB sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır [5]. Araştırmacılar, *Bacillus megaterium*'un otolizi esnasında β -hidroksibütirik asit monomerleri oluştuğunu ve bu monomerlerin kaynağının poli- β -hidroksibütirik asit olduğunu kesin olarak ortaya koymuşlardır [10,11].

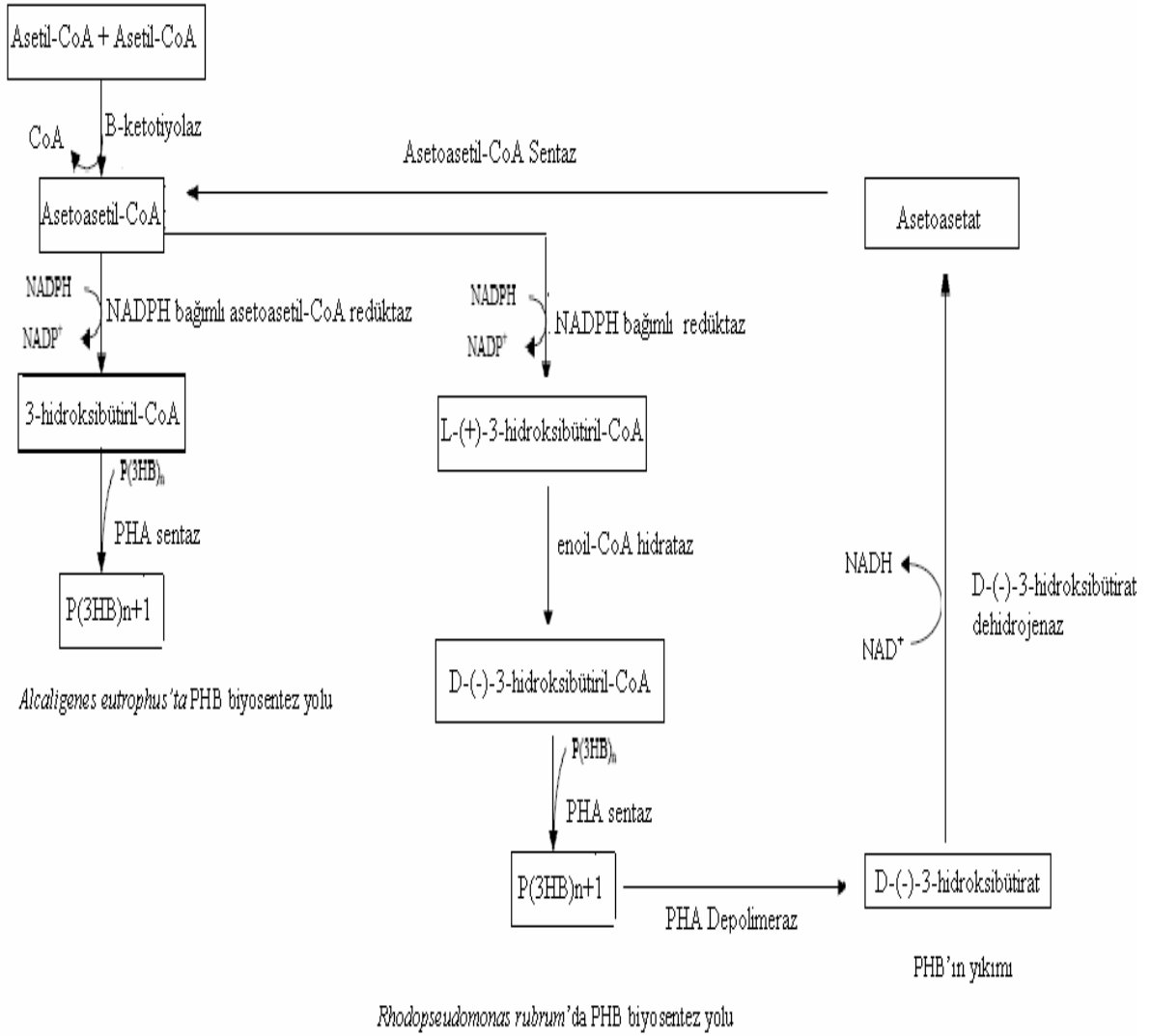
PHB'nin mikrobiyal sentezi uzun yıllar araştırma konusu olmamıştır. Lafferty ve arkadaşlarının bildirdiğine göre, gram negatif bakterilerde PHB sentezini ilk kez gösteren Forsythe ve grubu olmuştur. Buna ilaveten araştırmacılar PHB sentez yeteneğinin varlığının ya da yokluğunun, bir taksonomik kriter olarak kullanılabileceğini de rapor etmişlerdir. Aynı yıllarda bakteriyel biomastan PHB'nin kantitatif belirlenmesi için ilk pratik metotlardan biri geliştirilmiştir. Hücreleri, PHB'nin dışında tüm hücresel bileşiklerin çözünebildiği standart şartlarda alkali hipoklorit solüsyonu ile muamele etmişlerdir. Bu şekilde elde edilen PHB granüllerinin yoğunluğu, hücre içindeki PHB miktarıyla bağlantılı olarak belirlenmiştir. Bu metot geliştirilmeden önce Lemoigne, PHB'yi kuru bakteri külesinden kloroform ile ayırmış ve gravimetrik olarak belirlemiştir [5]. Birçok bakteri cinsinin PHB sentezleme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür ve farklı cinslerde sentezlenen PHB'nin infrared absorpsiyonu ile X-isini differaksiyonu gibi fiziksel özellikleri birbirine benzemektedir. Böylece bir depo materyali olan PHB'yi sentezleme yeteneğinin prokaryotik mikroorganizmalarda çok yaygın olduğu bulunmuştur [13].

PHB ile ilgili araştırmalarla, termoplastik ve elastomerik bir materyal olduğu anlaşılan polimer, patentli ürünlere dönüşmüştür. Biyoparçalanabilir, termoplastik bir materyal olan PHB'nin, petrol türevli plastiklerin yerini almak için ticari olarak üretimi çalışmaları, 1960'lı yıllarda başlamış, ancak ilk endüstriyel üretimi 1970'li yıllarda gerçekleşmiştir [11,12]. Bu yıllarda İngiltere'de Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) birçok bakteriyel türü, potansiyel PHB üretimi açısından incelemiş ve endüstriyel üretimde, hücre kuru ağırlığının %90'ı üzerinde PHB biriktiren *Alcaligenes eutrophus* bakterisini kullanmaya başlamıştır [24]. Daha sonraki yıllarda PHB ile ilgili çalışmalar *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Bacillus* vb. bakteri cinsleriyle devam etmiş; PHB'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metotları, metabolizması, iç-dış parçalanması gibi çok yönlü özellikleri incelenmiştir [11,13].

2.3. PHB' nin Biyosentezi

1987' den beri moleküler genetik çalışmalar sayesinde PHB metabolizması, biyokimyası ve fizyolojisi ile ilgili pek çok bilgi elde edilmiştir. Tüm PHA' lar arasında en ayrıntılı olarak karakterize edilen polimer PHB' dir. PHB' nin intrasellüler sentezinde oluşan ara ürünleri ve basamakları *Bacillus megaterium*'da araştırılmıştır. Başlangıç substratı olarak glukoz ve son ürün olarak PHB arasındaki ara basamaklarda pirüvat, asetat, asetoasetat ve β -hidroksibütirat olduğu bildirilmiştir [37]. PHB biyosentez genlerinin kromozomda ya da plazmid DNA' da lokalize olduğu bildirilmektedir [38] . Yapılan araştırmalara göre *Ralstonia eutropha*'da PHB sentezini gerçekleştiren genler (pha CBA) üç proteini şifrelemektedir. Bunlar PhaA (β -ketotiaz), PhaB (NADPH-oksidoredüktaz) ve PhaC (PHB polimeraz/sentaz) dır [26]. Bu üç enzimle gerçekleştirilen PHB sentezinde asetil CoA'nın TCA döngüsünde ve PHB metabolik yolunda ilerleyişinin büyüme şartlarına bağlı olduğu ve ortama ilave edilen NADPH' in PHB ve kopolimerlerinin üretimini arttırmada anahtar rol oynadığı bilinmektedir [27].

Prokaryotik hücrelerde PHB' nin intrasellüler sentezi için ilk bileşik Asetil CoA'dır. Genel olarak PHB, 3-Ketotiaz, asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sintaz tarafından katalize edilen üç reaksiyon basamağı ile Asetil CoA'dan sentezlenmektedir. Asetil CoA'nın hücrelerarası konsantrasyonunu arttırıcı şartlar, PHB' nin sentezi üzerinde pozitif etki yapmaktadır [10]. Birçok mikroorganizmanın PHB sentezinde ara bileşik olarak asetatı içerdiği bildirilmiştir. ¹⁴C- β -hidroksibütiril-CoA kullanmak suretiyle bu bileşiğin *Rhodospirillum rubrum* ve *B. megaterium*'da PHB sentezinde önemli bir ara ürün olduğu gösterilmiştir [11]. PHB sentez ve yıkım yolu şekil 2.3.1' de gösterilmiştir [10]. Steinbüchel ve Schlegel, PHB sentezinde anahtar reaksiyonun, iki molekül Asetil CoA'nın Asetoasetil CoA'ya dönüştüğü reaksiyonun olduğunu doğrulamışlardır.



Şekil 2.3.1. *Alcaligenes etrophus* ve *Rhodospseudomonas rubrum*'daki PHB sentez ve yıkım yolu

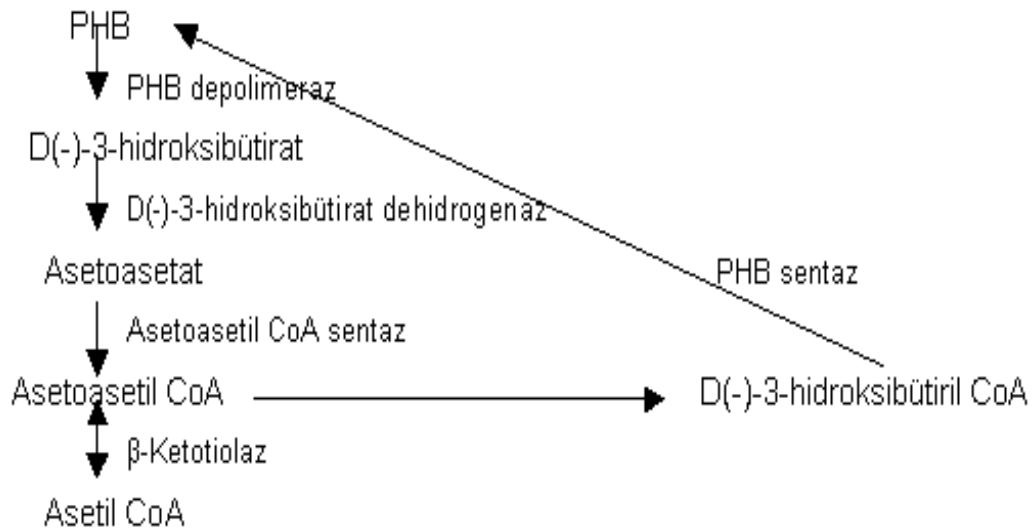
2.4. PHB'nin Biyolojik Parçalanabilirliği

Streptomyces, *Pseudomonas* ve *Bacillus*' a ait ilk PHB parçalayan mikroorganizmalar 1963 yılında Chowdhury tarafından bulunmuştur. O zamandan beri PHB yi parçalayan aerobik ve anaerobik mikroorganizmaların bir grubu farklı ekosistemlerden izole edilmiştir [39]. Toprakta *Acidovorax facilis*, *Aspergillus fumigatus* ve *Pseudomonas lemoignei*; aktiflenmiş çamurdan *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas fluorescens*; deniz suyundan *Comamonas testosteroni*; göl suyundan *Pseudomonas stutzeri* ve anaerobik çamurdan *Hyobacter delafieldii* gibi doğadan PHA'yı parçalayan çok sayıda bakteri ve fungus izole edilmiştir [37].

PHB toprak ve insan vücudu vb. yerlerde, toksik ürünler meydana getirmeksizin tamamen parçalanabilir. PHB'nin parçalanması şekil 2.4.1' de gösterilmiştir. PHB'nin aerobik

ortamdaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su; anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise metandır [13, 19]. PHB'in parçalanma süresi bir kaç aydan (anaerobik), bir kaç yıla (deniz suyu) kadar, katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanmada nitrojen oksidi oluşmaması, çevre korunmasında önemlidir. Parçalanmış biyoplastik bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir. Polimerin parçalanmasında, bakteri, mantar, ve yüksek organizmalar biyolojik faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon kimyasal faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir [24, 35].

PHB'nin depolimerizasyonu için kullanılan enzimler intraselüler veya ekstraselüler enzimler olabilir. PHB'in hücre içi parçalanması, PHA depolimeraz enziminin PHB'ı hidrolize etmesi ile başlar [13]. PHB'yi parçalayan intraselüler enzimler *Bacillus megaterium*'da ve *Alcaligenes eutrophus*'da saptanmıştır [31]. PHB'in, hücre dışı parçalanması depolimeraz tarafından katalizlenir [29]. Ekstraselüler PHA depolimeraz *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas lemoignei* ve *Penicillium pinophilum*'den izole ve karakterize edilmiştir [10]. PHB, hücre dışı enzimlerle depolimerize edildiğinde oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır [31].



Şekil 2.4.1. PHB'in parçalanması ve sentezi [10]

2.5. PHB'nin Kullanım Alanları

Biyoplastiklerle petrolden üretilen polipropilen sentetik plastiklerin maliyetini karşılaştıracak olursak, PHB'nin plastik materyal olarak kullanılması çok yüksek sermaye gerektirmektedir. Ancak gün geçtikçe çevre kirliliğinin arttığı ve sağlığı tehdit edici boyutlarda atık madde birikiminin olduğu günümüzde biyoplastik kullanımı kaçınılmaz hale gelmektedir [29].

Endüstriyel olarak üretilen biyoplastikler polietilene oranla dört kat daha fazla serttir (20 kg/m). 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 bildirilmektedir.

Kolay şekil alma ve parçalanabilme özellikleri nedeniyle PHB, daha çok paketleme malzemesi olarak kullanılmaktadır [29]. Taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı koruma veya parlaklık sağlama amacıyla kullanılmaktadır [10]. PHB poşet, torba, tek kullanımlık çocuk bezi, jilet, çatal, bıçak, tabak, mutfak kapları, şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamalarının yapımında da kullanılmaktadır [40]. PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte, son zamanlardaki en ilginç uygulamalar biyolojik uygunluğundan dolayı tıp ve eczacılık alanlarındadır. Bu alanlardaki gelişmeler de oldukça ilerlemiş safhadadır [31].

Biyouyumlu olan PHB monomerleri insan vücudunda bulunan doğal metabolit olması nedeniyle, polimer vücutta çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur. Bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü salınımı için test edilmiştir. Böyle çalışmalarda ilaç, PHB'den yapılmış bir hap içine sıkıştırılmış ve ağız yoluyla hastalara verilmiştir. PHB'nin vücut içerisinde biyolojik parçalanması yavaştır. İnsan vücudu PHB depolimeraz içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB pansuman sargısı, cerrahi dikişler eldiven, önlük, maske, yapay kan damarları, protezler, ortopedik plaka, çubuk, vida ve iğne gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır [12].

Polimerin uygulama alanları onun özelliklerine bağlı olarak, doğrudan kullanılmasının yanında depolimerizasyon ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da oldukça ilginç ve yaygındır. Özellikle PHB'nin parçalanma ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit bu alanda çok önemlidir. Çünkü bu tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşiğidir; lipit metabolizmasının ürünü olarak bulunur. İnsan kanının normal bir ögesi olan 3-hidroksibütirik asit, belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağı olarak hizmet eder ve bunun beyin gelişiminde rol alan aminoasitlerin prekürsörü olarak fizyolojik bir role sahip olduğu saptanmıştır [24].

Veteriner hekimliğinde, kullanılan ilaçların kontrollü salınımını sağlamak için PHB kullanılmaktadır. Bu polimer özellikle sığır rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir. Bu özelliğinden yola çıkılarak sığırlar üzerinde yapılan bir çalışmada hayvanların kurtlanmasını önlemek için bir yıl süreyle antihelmitik ilaç içeren PHB kapsülleri kullanılmıştır. Hayvan dokularında toksik etki yapmadığından, vücutta absorbe edilen protez aletlerin ve cerrahi dikişlerin yapımında PHB'nin kullanılması birçok bilim adamının bu alanda çalışmalara ağırlık vermesine neden olmuştur [5, 27]. PHB ve kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında tamamen karbondioksit ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir. Parçalanma için geçen süre kalınlık ve yüzey özelliklerine bağlı olarak düzenlenmektedir [5].

PHB, özellikle toprakta biyoparçalanma gerektiren uygulamalar için çok uygundur. Örneğin, film şeklinde kaplamada alüminyum folyo gibi kullanılmaktadır. Ayrıca bunlar tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre ya da pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak kullanılabilir. Kış mevsiminde buğdayı topraktaki bir zararlıdan korumak gerektiğinde, uygun bir insektisit PHB granülü içine alınabilir ve sonbaharda buğdayla birlikte toprağa ekilir [12].

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

2.6. PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar ve PHB'nin Ucuz Üretimi

PHB üretiminin ticari üretimini ve pazarlanmasını sınırlandıran başlıca faktörlerden biri üretimde kullanılan karbon substratının özellikle de şeker substratının fiyatıdır. Maliyet fiyatını düşürmek amacıyla rekombinant türler üzerinde çalışılmasının yanı sıra, farklı ve ucuz karbon kaynakları kullanarak yüksek PHB üreten suşların tespiti üzerinde de çalışılmaktadır [18].

Çalışılan ucuz karbon kaynaklarından biri de melastır. Şeker endüstrisinin bir yan ürünü olan melas, kristalize şekerin eldesinden sonra şeker imali ve rafinesinin son ürünü olarak da tanımlanabilir. Dünyadaki melas üretiminin % 75 i şeker kamışından (*Saccharum officinarum*), geri kalanının en büyük kısmı ise şeker pancarından (*Beta vulgaris*) elde edilmektedir. Dünyadaki melas üretimi 1990 lı yılların sonunda 46 milyon ton olduğu bildirilmektedir. Şeker teknolojisinde işlenen pancara göre yaklaşık % 4-5 oranında melas elde edilir. Melasın bileşimi

bitki türüne, mevsim ve toprak şartlarına, hasata, şeker rafinasyon işlemlerine ve melas depolama koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Dünya melas üretiminin yaklaşık üçte biri şeker üretiminden gelmektedir. 100 ton şeker kamışının işlenmesi sonucu 3-4 ton; 100 ton şeker pancarının işlenmesinden ise 4-6 ton melas elde edilmektedir [4].

Melasın esas içeriği, glukoz ve fruktoz monosakkaritlerinin bir araya gelmesiyle oluşan sükroz disakkaritidir. Burrows (1970), şeker pancarı melasının yoğun miktarda sükrozun yanı sıra, rafinoz şekeri de bulundurduğunu, bunların yanı sıra birçok mineral ve vitamin içerdiğini de bildirmiştir. İndirgen şeker olarak kamış melasında %12-35 oranında glukoz ve fruktoz vardır. Trisakkarit olan rafinoz, pancar melasında %2 konsantrasyona kadar bulunabilir.

Melasta bulunan şeker dışındaki organik maddelerin başlıcaları; azotlu maddeler, organik asitler, nişasta ve pentozanlar gibi kompleks karbohidratlardır. Ayrıca mumsu maddeler, steroller ve pigmentler de az miktarda bulunur. Melasta bulunan azotlu maddeler aminoasitler, amidler ve diğer basit azotlu maddelerdir. Şeker pancarı melasında baskın halde bulunan azotlu maddeler betain ve glutamik asittir ve bu bileşikler melasın karakteristik koku ve lezzetinin büyük bir kısmını oluştururlar. Melasta bulunan azotun ancak %40-60 kadarı mikroorganizmalar tarafından kullanılır, bu nedenle amonyum tuzları, sıvı amonyak veya üre ortama katılarak azot zenginleştirilmesi yapılır [5]. Pancar melasında genellikle potasyum oranı yüksektir. Melasta biyotin, pantotenik asit, inositol, tiyamin, riboflavin, nikotinik asit, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler vardır. Melasın endüstriyel fermantasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır ancak kompleks bir substrat olduğu için bazı toksik maddeler ve mineral maddeler de içerir. Pancar melasın bileşimi; kuru madde- %78-85; Toplam Şeker-%48-58; Sakaroz- %51; Glukoz--; Fruktoz--; Rafinoz-%>1; Toplam Azot-%0-2,8; α -Amino azot-%0,36; Fosfor, P_2O_5 -%0,02-0,07; Kalsiyum, CaO- %0,15-0,7; Magnezyum, MgO- %0,01-0,1; Potasyum, K_2O - %2,2-5,0; Çinko, Zn-30-50 $\mu\text{g/g}$; Toplam Karbon, C-%28-34; Toplam inorganik madde-%4-11; Kükürt, SO_3 -%0,3-0,4; Biyotin-0,01-0,13 $\mu\text{g/g}$; Kalsiyum pantotenat-40-100 $\mu\text{g/g}$; İnositol-5000-8000 $\mu\text{g/g}$; Tiamin-1-4 $\mu\text{g/g}$; Pridoksin-2,3-5,6 $\mu\text{g/g}$; Riboflavin-0-0,75 $\mu\text{g/g}$; Nikotinamid-37-51 $\mu\text{g/g}$; Folik asit-0,21 $\mu\text{g/g}$ [4].

2.7. PHB Üreten Canlılar

Biyoplastikler, toprak, deniz ve tatlı su ve bunların sedimentleri gibi değişik çevrelerden izole edilen, heterotrofik ve ototrofik aerobik, fotosentetik anaerobik bakteriler, Actinomycetes'ler, Siyanobakteriler, anaerobik yağ asiti okside eden bakteriler, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler gibi birçok prokaryotik mikroorganizma tarafından sentezlenmektedirler [33].

Ticari olarak biyoplastik üretiminde İmperial Kimya Şirketi öncelikle metilotrofik bakterileri ve Azotobacterleri kullanmış, ancak daha sonra PHB üretim seviyesi daha yüksek olan *Alcaligenes eutrophus* bakterisi ile devam etmiştir. PHB, özellikle *Alcaligenes* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. ve çeşitli toprak mikroorganizmaları gibi bir çok mikroorganizma tarafından oluşturulur [14, 31].

Yapılan araştırmalar, bitkide nodül oluşturan toprak mikroorganizmalarından olan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de PHB sentezleyebildiklerini göstermektedir. *Rhizobium* cinsi bakteriler 0,5-0,9 µm çapında 1,2-3,0 µm uzunluğunda ve morfolojik olarak çubuk şeklindedirler. Spor oluşturmayan, gram negatif, hücre duvarına sahip, aerobik mikroorganizmalardır. Genel olarak hareketli olan bu bakteriler, bir veya birden fazla flagella ihtiva etmektedirler. Kemoorganotroftir, karbon kaynağı olarak yüksek oranda karbohidrat ve organik asit tuzları kullanır. Selüloz ve nişastayı kullanamaz. Karbohidrat içeren besi ortamlarında gelişme sırasında akışkan, zamlı maddeler salgılamaktadırlar. Koloniler yuvarlak ve opakdır. Optimum üreme sıcaklığı 25-30 °C ve pH 6-7 arasındadır. *Rhizobium* bakterileri serbest yaşam şekilleri ve leguminous bitki köklerinde simbiyosis olarak bakteroid halinde olmak üzere iki şekilde bulunurlar. Hızlı gelişen *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* dışında günümüzde *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Photorhizobium*, *Mesorhizobium* olmak üzere dört cins daha tanımlanmıştır. Bu bakterilerin en önemli özelliklerinden biri baklagil bitkileri ile simbiyotik ilişki sonucunda azotu fiske edebilmeleridir. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* cinslerine ait birçok tür, serbest hücrede ve simbiyosiste PHB depolamaktadırlar. PHB'nin bu bakterilerde nitrojen fiksasyonunda enerji kaynağı olduğu düşünülmektedir.

Bonartseva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PHB içeriğinin nitrojenaz enzimi aktivitesi ile ters, hidrogenaz enzimi aktivitesi ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. Yine *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium galega*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli* türlerinin PHB üretimlerinin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğunu tespit edilmiştir. Sükroz içeren besiyerinde, farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada en yüksek PHB veriminin KNO₃'lü besiyerinde %65 ile *Rhizobium phaseoli*'den elde edildiği bildirilmiştir [41].

Jan ve arkadaşları, *Rhizobium meliloti*'de ortamda karbon kaynağı olduğunda ve gelişme için gerekli nitrojen gibi elementler sınırlı tutulduğunda PHB'nin depo edildiğini bildirmişlerdir. Karbon kaynağı tümüyle kullanıldığında ise PHB metabolize edilmektedir. *R. meliloti* fruktozlu ortamda üretildiğinde büyük miktarda PHB depo etmektedir [14].

Tavernier ve arkadaşları, farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının *Rhizobium meliloti*'deki PHB üretimine olan etkilerini araştırmışlardır. Glukoz ve fruktoz içeren besi ortamında bakterilerin farklı geliştiklerini tespit etmişlerdir. Yeast extract içeren fruktozlu ortamda hücre kuru ağırlığının %85'nin PHB olduğunu bildirmişlerdir [42].

Mercan ve Beyatlı yaptıkları çalışmada 10 adet *Bacillus sphaericus* suşunun PHB üretimlerini araştırmışlardır. *Bacillus sphaericus* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretim miktarlarını %5,0- %25,88 arasında bulmuşlardır. PHB üretimi yüksek olan *Bacillus sphaericus* ATCC 12300, ATCC 7055, 34-2 ve 1404 nolu suşlarının farklı beef extract ve sodyum asetat konsantrasyonlarında PHB üretimleri incelenmiş; %2 beef extract konsantrasyonunda ATCC 7055, ATCC 12300 ve 34-2 suşlarının hücre kuru ağırlıklarının sırasıyla %32,50, %31,64, %30,63' ünün PHB olduğu bulunmuştur [43].

Mona ve arkadaşları, *Bacillus megaterium*'da PHB üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemişlerdir. Karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında PHB üretiminin en yüksek seviyede olduğunu tespit etmişlerdir. PHB'nin maksimum verimine (%46,2), %2 melas ortamında ulaşılmışken en iyi gelişme %3 melasta elde edilmiştir [44].

Ateş ve Ekmekçi, substrat olarak pancar melası kullanılan ortamlarda batık kültür fermantasyonu yöntemiyle, *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'in PHB üretimlerini incelemişlerdir. Optimum koşullarda hem sakarozlu mineral ortam hem de melaslı mineral ortamda PHB üretim verimi karşılaştırılmıştır. Optimum koşullarda PHB üretim verimi pancar melaslı mineral ortamda *Pseudomonas extorquens* DSM 1337'de %22,98 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'de %12,10 olarak bulunmuştur. Bununla beraber en iyi PHB üretimi, sakarozlu mineral ortamda saptanmıştır [45].

Ali, yaptığı çalışmada melas besi ortamında iki adet *Rhizobium japonicum*, bir adet *Bradyrhizobium japonicum* ile iki adet *Rhizobium sp.* suşunun PHB üretimlerini araştırmıştır. Bakterilerin hücre PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre % 2,2- %51,1 arasında değiştiğini tespit etmiştir. Suşlar arasında yüksek PHB verimine sahip *Rhizobium sp.* 3172 suşu ile orta derece PHB verimi gösteren *Rhizobium sp.* MR90 suşunun farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretim yetenekleri incelenmiştir. Farklı karbon kaynakları olarak da asparajın, glisin, KNO₃ ve proteaz pepton kullanılmıştır. *Rhizobium sp.* MR90 suşunun karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında PHB veriminin en yüksek ve %10,7 olduğunu, azot kaynağı olarak ise en yüksek verimin asparajın kullanıldığında %41,1 olduğu tespit etmiştir. *Rhizobium sp.* 3172

suşunun karbon kaynağı olan sukrozda en yüksek %23,8 olduğunu azot kaynağı olarak proteaz peptonda ise %21,6 olduğunu tespit etmiştir [37].

Mercan ve arkadaşları yaptıkları araştırmada bir adet *Rhizobium japonicum*, altı adet *Rhizobium cicer*, sekiz adet *Rhizobium spp.* ve *Bradyrhizobium japonicum* USDA C110 suşunda PHB üretimini incelemişlerdir. Suşların PHB içeriklerini, 0,01- 0,5 g/l ve PHB verimlerini hücre kuru ağırlıklarına göre %1,36- %40,0 arasında bulmuşlardır. Suşlar arasında en yüksek verime sahip olan *Rhizobium spp.* 2426 ile orta verimliliğe sahip olan *Rhizobium spp.* 640 suşlarını seçip, farklı karbon ve azot kaynaklarının PHB üretimine etkisini test etmişlerdir. Suşlar farklı karbon ve azot kaynağı içeren Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyerinde düşük miktarda PHB üretirken, yüksek PHB üretimi L-sistein ve Glisin içeren besi ortamında elde edilmiştir. Bu besi ortamında (L-sistein ve Glisin) *Rhizobium spp.* 640 suşunun PHB verimi sırasıyla %13,40 ve %56,67 olarak, aynı azot kaynaklarında bu oranları *Rhizobium spp.* 2426 suşunda sırasıyla %70,0 ve %61,43 olarak tespit etmişlerdir [46].

Ediz, Nutrient Broth besiyerinde yüksek miktarda PHB üreten *Bacillus subtilis* F1 ve *Bacillus megaterium* P1 suşlarını farklı melas konsantrasyonlarında ve farklı inkübasyon sürelerinde geliştirmiştir. *Bacillus subtilis* F1 suşunun PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre %15,80- %84,71 arasında olduğunu, *Bacillus megaterium* P1 suşunun PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre %12,00- %85,00 arasında olduğunu tespit etmiştir. *Bacillus subtilis* F1 suşunun ürettiği en yüksek PHB verimi (%84,71)'ne inkübasyonun 36. saatinde %0,5 melas konsantrasyonunda, *Bacillus megaterium* P1 suşunun en yüksek PHB verimine (%85,00), %2 melas konsantrasyonunda inkübasyonun 24. saatinde vardığı tespit edilmiştir [4].

Uruç, çalışmasında *Rhizobium phaseoli* CİAT 899 ve *Rhizobium leguminosarum* Le 735 suşlarının Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyerinde PHB üretimlerini incelemiştir. *Rhizobium phaseoli* suşlarının PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre %17,23- %26,04, *Rhizobium leguminosarum* suşlarının PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre %8,69- %18,91 arasında değiştiğini tespit etmiştir [27].

Dinigüzel, çalışmasında toprak, çamur, su ve tuz örneklerinden halofilik bakteriler izole etmiş, bu bakterin PHB üretenlerini Sudan Black B boyası ile granülleri boyayarak tespit etmiştir. İzolatların PHB miktarları 0,123-0,519 g/l; PHB verim yüzdeleri ise hücre kuru ağırlıklarının %2,03- %29,48'i arasında değişmiştir. AG 27 kodlu izolat %29,48 verimle en fazla PHB biriktiren izolat olurken, TG 24 kodlu izolat %2,03 verimle en az PHB biriktiren izolat olmuştur. En yüksek PHB veriminin elde edildiği AG 27 izolatı farklı konsantrasyonlarda Galaktoz, Yeast ekstrakt ve KH₂PO₄'ün bulunduğu NB besiyerinde geliştirilmiş ve bu maddelerin PHB verimi üzerine etkisi incelenmiştir. AG 27 izolatının PHB veriminin %1 oranında Galaktoz içeren besiyerinde geliştiğinde %43,47'ye; %2 oranında Galaktoz içeren

besiyerinde geliştiğinde %42,09'a; %5 oranında Galaktoz içeren besiyerinde geliştiğinde %42,69'a; %0,3 oranında Yeast ekstrakt içeren besiyerinde geliştiğinde %52,20'ye çıktığı; %0,00375 oranında KH₂PO₄ içeren besiyerinde geliştiğinde ise %27,14'e dřtđđ belirlenmiştir. NB besiyerine %1 oranında Galaktoz ve %0,3 oranında Yeast ekstrakt aynı anda eklendiğinde ise AG 27 izolatının PHB veriminin %59,19'a çıktığı belirlenmiştir [36].

Baysak, yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium phaseoli* bakterilerinin Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyerinde PHB üretimlerini incelemiştir. Her bir suş için farklı şeker konsantrasyonları, çalkalama hızları ve inkübasyon sürelerinin PHB üretimine etkilerini araştırmıştır. *R.phaseoli* suşlarının farklı şeker konsantrasyonlarında PHB retimlerinin kuru ağırlıklarına göre %16,08- %26,84 arasında olduğunu, farklı çalkalama hızlarında %16,88- %26,38, farklı inkübasyon sürelerinde ise bu değerlerin %2,5- %31,16 arasında değiştiğini tespit etmiştir [8].

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Bakteri Kùltürleri

Araştırmada kontrol suş olarak kullanılan *R.phaseoli* CIAT 899 bakteri kùltürü Ankara toprak ve gübre araştırma enstitüsü'nden sağlanmıştır.

Araştırmada kullanılan *R.phaseoli* türlerine ait suşlar, Dr. Seher Gür'den temin edilmiştir.

Bu suşlar, Elazığ yöresi topraklarından 1996 yılı ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir [27].

3.1.2. Besiyerleri

Araştırmada *Rhizobium* cinsi bakterilerin geliştirilmesinde Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyeri, Poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretim miktarlarının incelenmesinde melas besiortamı kullanılmıştır.

Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyeri

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

Maddeler 1 litre destile su içerisinde çözündürölmüştür. 0.01N HCl ve 0.01N NaOH kullanılarak besiyerinin PH değeri 7'ye ayarlanarak 121 °C de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir [45].

Melasın bileşimi genel bilgi kısmında verilmiştir. Malatya şeker Fabrikasından temin edilen melas, saf su ile %0,5, %1, %1,5'lik konsantrasyonlara ayarlanarak 121 °C de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Suşların İzolasyonu, Kültürel ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti

Araştırmada kullanılan suşların izolasyonu için Elazığ yöresinden alınan toprak örnekleri kullanılmıştır

Rhizobium phaseoli suşlarının sabit ve değişken özelliklerini saptamak amacıyla kültürel testler (kolonilerin şekillerinin, renklerinin, büyüklüklerinin tespiti, hareket muayenesi, Kongo kırmızısı absorpsiyonu, Bromtimol mavili YEM' de asit oluşturma, ketolaktöz testi, pepton glukoz agarda üreme durumunun tespiti) ve biyokimyasal testler (litmuslu sütte üreme durumu, katalaz aktivitesi, metilen mavisi redüksiyonu, jelatini eritme) uygulanmıştır [27].

3.2.2. Suşların Muhafaza Edilmesi

YEM agar içeren yatık tüplere üçer paralelli olarak inoküle edilen izolatlar 28 °C de beş gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [45].

3.2.3. Analitik Ölçüm için PHB Metodu

Rhizobium phaseoli suşlarının üretmiş oldukları PHB miktarı, Bonartseva ve Myshkina'nın metoduna göre belirlenmiştir [46].

YEM agarlı stok kültürden öze ile alınan inokulum içerisinde 50 ml YEM sıvı besiyeri bulunan bir erlene aktararak ön zenginleştirme yapılmıştır. Zenginleştirmenin yapıldığı erlenden, içerisinde 100'er ml %0,5, %1, %1,5 oranlarında seyreltilmiş melas bulunan dört ayrı erlene % 4 oranında kültür aşılınmıştır. Erlenler 28 °C de 96 saat kalmak koşuluyla çalkalamalı etüve (Gerhardt Laboshake) kaldırılmıştır.

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

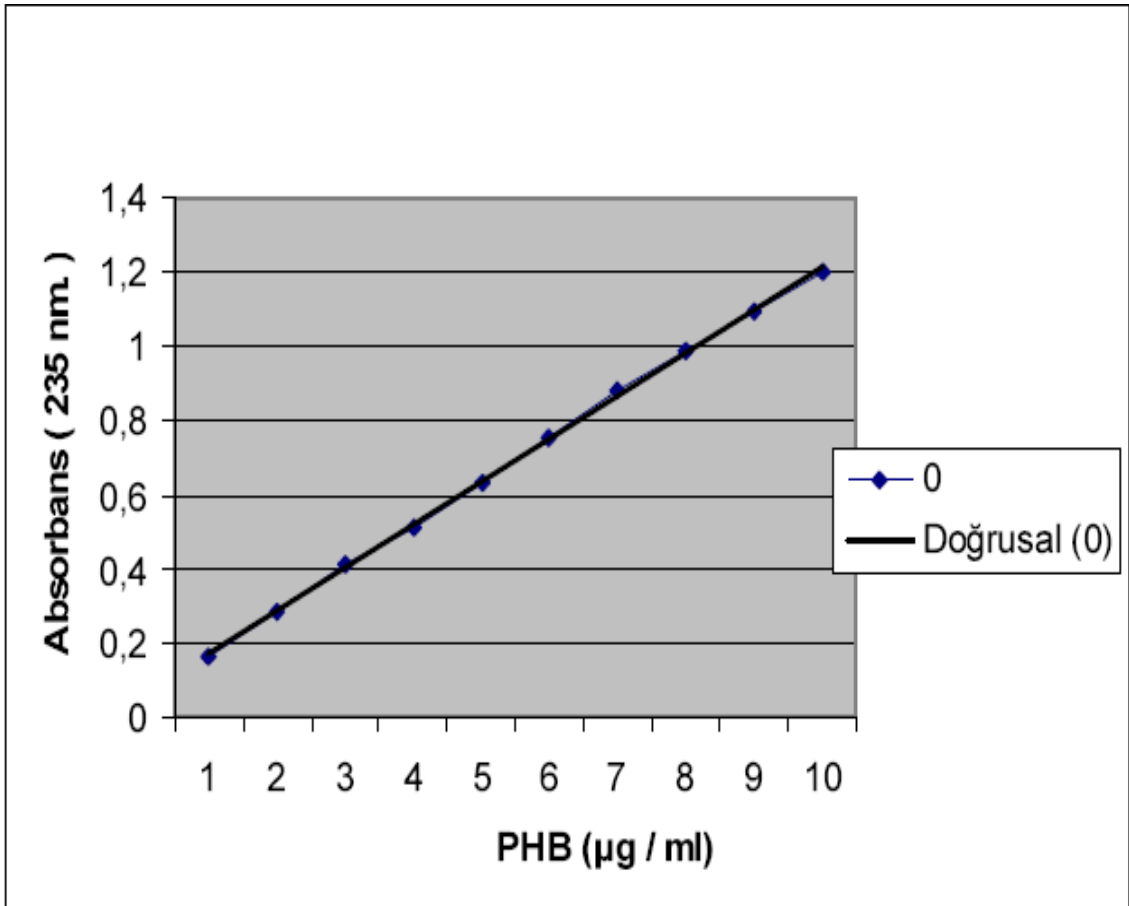
Tartım işleminden sonra örnekler, 5 ml destile suyla hemojenize edilmiştir. Hemojenize örnekler, 2 dakika süreyle ultrasonikasyona (Bandelin UW 2070) tabi tutulmuştur. Bu tüplerdeki örneklerden 2'şer ml alınarak yeni santifüj tüplerine aktarılmıştır. 2 ml örneklerin üzerine 2 ml 2 N HCl ilave edilip 2 saat süreyle 100 °C de su banyosuna (Clifton) alınmıştır. Su banyosunda çıkarılan örnekler, 6000 rpm de 20 dakika santifüj edilmiş, sıvı kısım atıldıktan sonra geri kalan pelet üzerine 5 ml kloroform eklenip tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra bir gece boyunca 28 °C de çalkalamalı etüvde bekletilmiştir. Tüpler, ağızları açıldıktan sonra 6000 rpm de 30 dakika santifüj edildikten sonra kloroform kısmından 0,1 ml alınmış ve 40 °C de 15

dakika tutularak kloroform uçurulmuştur. Örneklerin üzerine 5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilmiş, 100 °C de su banyosunda 20 dk bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler soğuduktan sonra 235 nm. dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur.

3.2.4. PHB'ye ait Standart Grafiğın Hazırlanması

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

Standart grafik için PHB'nin; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/ ml'lik (sülfirik asit içinde) solüsyonları hazırlanmıştır. Bunlar 100 °C de 10 dakika ısıtılarak krotonik asite dönüştürülmüştür. Maksimum absorbens gösterdiği dalga boyunda absorbens ölçülerek PHB'nin µg/ ml'ye karşılık gelen standart grafiği elde edilmiştir [27].



Şekil 3.2.4.1. Krotonik Asit Formundaki Standart PHB'nin 235 nm. Dalga boyunda miktara bağlı Standart Grafiği

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Suşların Kültürel Özellikleri

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

4.2. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmada Elazığ yöresi topraklarından izole edilen bazı *Rhizobium phaseoli* suşlarının farklı melas konsantrasyonlarında kuru ağırlıkları ve PHB üretim yetenekleri belirlenmiştir. Araştırmada 1 adet kontrol, 5 adet örnek olmak üzere 6 adet *Rhizobium phaseoli* suşu kullanılmıştır.

100'er ml'lik melasın 28⁰C'de %0,5, %1, %1,5'lik konsantrasyonlarında 96 saat inkübasyon süresinde elde edilen kültürler santrifüjlendikten sonra sıvı kısım atılmış ve pelet kurutulmuştur. Çalışma üç paralel olarak düzenlenmiş her birinin tek tek kuru ağırlıkları tartılarak ortalamaları alınmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Tablo 4.2.1. *R.phaseoli* suşlarının %0,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1.paralel	2.paralel	3.paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CIAT 899	1,2231	1,4240	1,1414	1,2628	± 0,1413
23F	1,4012	1,1343	1,3780	1,3045	± 0,1334
32F	0,7842	0,9718	0,8223	0,8594	± 0,0938
35F	1,8754	1,9312	2,0382	1,9482	± 0,0814
38F	0,8716	1,0245	0,8991	0,9317	± 0,0764
15F	1,3534	1,3897	1,4662	1,4031	± 0,0564

R.phaseoli CIAT 899 suşunun %0,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığı 1,2628 g/l olarak bulunmuştur. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıkları 0,8594- 1,9482 g/l olarak

tespit edilmiştir. 32F kodlu izolat en düşük hücre kuru ağırlığına (0,8594 g/l) sahipken, en yüksek hücre kuru ağırlığı (1,9482 g/l) ile 35F kodlu izolata aittir.

Tablo 4.2.2. *R.phaseoli* suşlarının %1' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1.paralel	2.paralel	3.paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	5,3713	3,7909	4,1513	4,4378	± 0,7902
23F	2,6543	3,2427	2,9563	2,9511	± 2,2942
32F	1,5657	0,9328	1,2110	1,2365	± 0,3164
35F	0,5248	0,4590	0,6012	0,5283	± 0,0711
38F	0,8346	0,5472	0,7908	0,7242	± 0,1437
15F	0,8992	0,9117	0,9321	0,9143	± 0,0164

R.phaseoli CİAT 899 suşunun %1' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığı 4,4378 g/l olarak belirlenmiştir. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıkları 0,5283- 2,9511 g/l arasında bulunmuştur.35F kodlu izolat en düşük hücre kuru ağırlığına (0,5283 g/l) sahipken, en yüksek hücre kuru ağırlığı (2,9511 g/l) ile 23F kodlu izolata aittir.

Tablo 4.2.3. *R.phaseoli* suşlarının %1,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1.paralel	2.paralel	3.paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	1,5418	1,7683	1,1702	1,4934	± 0,2990
23F	1,2896	1,7818	1,2344	1,4352	± 0,2737
32F	1,4086	1,2608	1,7852	1,4848	± 0,2622
35F	2,6801	3,1823	3,4874	3,1166	± 0,4036
38F	2,4336	2,4008	2,4013	2,4119	± 0,0164
15F	0,7018	1,0137	0,9567	0,8907	± 0,1559

R.phaseoli CİAT 899 suşunun %1,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığı 1,4934 g/l olarak tespit edilmiştir. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıkları 0,8907-3,1166 g/l arasında bulunmuştur.15F kodlu izolat en düşük hücre kuru ağırlığına (0,8907 g/l) sahipken, en yüksek hücre kuru ağırlığı (3,1166 g/l) ile 35F kodlu izolata aittir.

R.phaseoli CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığı %0,5' lik melas konsantrasyonunda en düşük (1,2628 g/l), %1' lik melas konsantrasyonunda en yüksek (4,4934 g/l) olarak belirlenmiştir. *R.phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıkları; %0,5' lik melas konsantrasyonunda 0,8594-1,9482 g/l, %1' lik melas konsantrasyonunda 0,5283-2,9511 g/l, %1,5' lik melas konsantrasyonunda 0,8907-3,1166 g/l arasında değişiklik göstermiştir.

Uruç [27], yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium* cinsi bakterileri kullanmıştır. *R.phaseoli* suşlarında 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını 0,0982-0,2424 g/l arasında tespit etmiştir. Araştırmacı çalışmamızda kullandığımız 23F kodlu izolatta ortalama kuru ağırlık değerini 0,0982 g/l, 32F kodlu izolatta bu değeri 0,2180 g/l olarak belirlemiştir. Çalışmamızda farklı melas konsantrasyonlarına bağlı olarak bu değer 23F kodlu izolatta 0,3045-2,9511 g/l, 32F kodlu izolatta ise 0,8594-1,4848 g/l arasında bulunmuştur. Hücre kuru ağırlıklarının tespiti için kullandığımız melas sonuçların değişmesine neden olmuştur.

Baysak [8], *Rhizobium* cinsi bakterilerle yapmış olduğu çalışmasında 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda *R.phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarını %0,5' lik şeker konsantrasyonunda 0,0745-0,2267 g/l, %1'lik şeker konsantrasyonunda 0,0978-0,2430 g/l, %1.5'lik şeker konsantrasyonunda 0,1129-0,2546 g/l arasında bulmuştur. Bu değerlerin çalışmamızaki değerlere oranla düşük olmasında, kullanılan melasın ve düşük inkübasyon süresinin etkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmasında Baysak, *R.phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresindeki kuru ağırlık değerlerini de araştırmış ve bu değerleri 1,6002-4,0128 g/l arasında bulmuştur. Araştırmamızda bulduğumuz hücre kuru ağırlık değerleri bu çalışmadaki değerlerle benzerlik göstermektedir.

Ali [37], yapmış olduğu yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium* cinsi bakterilerin melas besiyortamında PHB üretimlerini incelemiş ve her bir organizma için farklı melas konsantrasyonlarının etkisini araştırmıştır. *R.japonicum* 379 suşunda hücre kuru ağırlıklarını %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,025-0,125 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,015-0,165 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,005-0,075 g/l arasında, *Bradyrhizobium japonicum* 1809 nolu suşun hücre kuru ağırlıklarını %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,010-0,100 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,095-0,295 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,040-0,320 g/l arasında bulmuştur. *R.japonicum* 377 suşunda hücre kuru ağırlıklarını %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,000-0,490 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,030-0,500 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,055-0,0765 g/l arasında, *Rhizobium* sp.MR90 nolu suşda hücre kuru ağırlıklarını %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,140-0,250 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,005-0,415 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,280-0,530 g/l arasında tespit etmiştir. *Rhizobium* sp. 3172 suşunda hücre kuru ağırlıklarını %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,010-0,150 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,435-0,585 g/l, %1,5'lik

melas konsantrasyonunda 0,010-0,150 g/l arasında belirlemiştir. Ali'nin yapmış olduğu çalışmada 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda genellikle %1- %1,5'lik melas konsantrasyonlarında yüksek hücre kuru ağırlığı tespit edilmiştir. Ancak tespit ettiğimiz yüksek kuru ağırlık değerleri bu çalışmadaki değerlerden düşük olarak bulunmuştur. Çalışmamızda minimum hücre kuru ağırlığı 0,5283 g/l olarak bulunmuştur. Bu değer Ali'nin bulduğu değerlerin yüksek hücre kuru ağırlığı değerlerine yakındır.

Ediz [4], çalışmasında *Bacillus* cinsi bakterileri kullanmıştır. *Bacillus subtilis* F1 suşunda hücre kuru ağırlıklarını 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,01-0,19g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,01-0,22 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,01-0,35 g/l arasında bulmuştur. *Bacillus megaterium* P1 suşunda hücre kuru ağırlıklarını 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,00-0,10g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,01-0,09 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,02-0,22 g/l arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar araştırmamızdaki değerlere göre düşük olup farklı bakteri kullanımından kaynaklandığı düşünülmüştür.

4.3. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi

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

Tablo 4.3.1. *R.phaseoli* suşlarının %0,5' lik melas konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1.paralel	2.paralel	3.paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	0,4831	0,4506	0,3488	0,4275	± 0,0671
23F	0,1234	0,1826	0,2002	0,1687	± 0,0384
32F	0,0702	0,0467	0,0585	0,0584	± 0,0117
35F	0,3942	0,3067	0,3831	0,3613	± 0,0437
38F	0,1524	0,1985	0,1952	0,1820	± 0,0230
15F	0,5603	0,4904	0,7858	0,6121	± 0,1477

R.phaseoli CİAT 899 suşunun %0,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0,4275 g/l olarak bulunmuştur. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0,0584-0,6121 g/l olarak tespit edilmiştir. En düşük PHB

üretimine (0,0584 g/l) 32F kodlu izolatta, en yüksek PHB üretimine (0,6121 g/l) 15F kodlu izolatta rastlanmıştır.

Tablo 4.3.2. *R.phaseoli* suşlarının %1' lik melas konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1.paralel	2.paralel	3.paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	0,8452	0,9371	0,8325	0,8716	± 0,0523
23F	0,2634	0,2821	0,3200	0,2885	± 0,0566
32F	0,3608	0,4202	0,3406	0,3738	± 0,0398
35F	0,2541	0,2357	0,2406	0,2434	± 0,0092
38F	0,3687	0,4103	0,3756	0,3848	± 0,0208
15F	0,5400	0,6101	0,5107	0,5536	± 0,0497

R.phaseoli CİAT 899 suşunun %1' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0,8716 g/l olarak bulunmuştur. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0,2434- 0,5536 g/l olarak tespit edilmiştir. En düşük PHB üretimine (0,2434 g/l) 35F kodlu izolatta, en yüksek PHB üretimine (0,5536 g/l) 15F kodlu izolatta rastlanmıştır

Tablo 4.3.3. *R.phaseoli* suşlarının %1,5' lik melas konsantrasyonundaki PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1.paralel	2.paralel	3.paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	0,4602	0,4032	0,4209	0,4281	± 0,0285
23F	0,3154	0,3205	0,2956	0,3105	± 0,0124
32F	0,6001	0,4809	0,5602	0,5470	± 0,0596
35F	0,6900	0,5401	0,4807	0,5702	± 0,1046
38F	0,2109	0,2707	0,3101	0,2639	± 0,0496
15F	0,5302	0,6404	0,6806	0,6170	± 0,0752

R.phaseoli CİAT 899 suşunun %1,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0,4281 g/l olarak belirlenmiştir. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0,2639-0,6170 g/l olarak tespit edilmiştir. En düşük PHB

üretimine (0,2639 g/l) 38F kodlu izolatta, en yüksek PHB üretimine (0,6170 g/l) 15F kodlu izolatta rastlanmıştır.

R.phaseoli CIAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi %0,5' lik melas konsantrasyonunda en düşük (0,4275 g/l), % 1' lik melas konsantrasyonunda en yüksek (0,8716 g/l) olarak belirlenmiştir. *R.phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimi; %0,5' lik melas konsantrasyonunda 0,0584-0,6121 g/l, %1' lik melas konsantrasyonunda 0,2434- 0,5536, %1,5' lik melas konsantrasyonunda 0,2639-0,6170 arasında değişiklik göstermiştir.

Uruç [27], yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium phaseoli* cinsi bakterilerin hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0,0248-0,553 g/l arasında bulmuştur. Çalışılan 23F kodlu izolatta ortalama hücre kuru ağırlık değerine göre PHB üretimini 0,0248 g/l, 32F kodlu izolatta bu değeri 0,0412 g/l olarak bildirmiştir. Çalışmamızda farklı melas konsantrasyonlarına bağlı olarak bu değer 23F kodlu izolatta 0,1687- 0,3105 g/l, 32F kodlu izolatta ise 0,0584-0,5470 g/l arasında tespit edilmiştir. Hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretiminin tespiti için kullandığımız melas sonuçların değişmesine neden olmuştur.

Baysak [8], *Rhizobium phaseoli* cinsi bakterilerle yaptığı çalışmasında 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda bakterilerin hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini %0,5'lik şeker konsantrasyonunda 0,0199-0,0518 g/l, %1'lik şeker konsantrasyonunda 0,0246-0,0554 g/l, %1,5'lik şeker konsantrasyonunda 0,0271-0,0562 g/l arasında bulmuştur. İnkübasyon süresini 96 saate çıkardığında bu değerler 0,4858-1,1280 g/l arasında olmuştur. Çalışmamızda olduğu gibi inkübasyon süresinin arttırılması değerleri oldukça yükseltmiştir. Yüksek inkübasyon süresi sonunda bulunduğu PHB üretim değerleri çalışmamızdaki hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretim değerleriyle benzerlik göstermiştir.

Ali [37], yapmış olduğu yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium* cinsi bakterileri kullanmıştır. *R.japonicum* 379 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,013-0,057 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,025-0,055 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,001-0,035 g/l arasında, *Bradyrhizobium japonicum* 1809 nolu suşun hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,010-0,017 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,030-0,076 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,042-0,102 g/l arasında bulmuştur. *R. japonicum* 377 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini, %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,027-0,097 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,008-0,045 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,009-0,033 g/l arasında, *Rhizobium* sp. MR90 nolu suşta hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,005-0,045 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,010-0,070 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,032-0,062 g/l arasında

tespit etmiştir. *Rhizobium* sp. 3172 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,010-0,053 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,052-0,179 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,005-0,015 g/l arasında olduğu belirtilmiştir. Ali'nin yapmış olduğu çalışmada tespit ettiğimiz PHB üretimi değerlerinin bu çalışmadaki PHB üretimi değerlerinden düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda minimum PHB üretimi 0,0584 g/lolarak bulunmuştur. Bu değer Ali'nin bulduğu PHB üretimi değerlerine yakındır.

Ediz [4], çalışmasında *Bacillus* cinsi bakterileri kullanmıştır. *Bacillus subtilis* F1 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,03- 0,06 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,00-0,04 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,01-0,25 g/l arasında bulmuştur. *Bacillus megaterium* P1 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda %0,5'lik melas konsantrasyonunda 0,00-0,03 g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0,02-0,05 g/l, %1,5'lik melas konsantrasyonunda 0,03-0,08 g/l arasında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar araştırmamızdaki değerlere göre oldukça düşüktür.

4.4. PHB Verimlerinin Belirlenmesi

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

Tablo 4.4.1. *R.phaseoli* suşlarının %0,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	1,2628	0,4275	29,43
23F	1,3045	0,1687	11,24
32F	0,8594	0,0584	5,90
35F	1,9482	0,3613	16,12
38F	0,9317	0,1820	16,98
15F	1,4031	0,6121	37,93

R.phaseoli CİAT 899 suşunun %0,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi % 29,43 olarak hesaplanmıştır. *R.phaseoli* izolatlarının kuru

ağırlıklarına göre PHB verimleri %5,90- %37,93 arasında bulunmuştur. 32F kodlu izolat %5,90 verimle en düşük değeri verirken, % 37,93 ile 15F kodlu izolat en yüksek PHB verimine sahiptir.

Tablo 4.4.2. *R.phaseoli* suşlarının %1' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R.phaseoli</i> CIAT 899	4,4378	0,8716	17,07
23F	2,9511	0,2885	8,50
32F	1,2365	0,3738	26,28
35F	0,5283	0,2434	40,06
38F	0,7242	0,3848	46,20
15F	0,9143	0,5536	52,65

R.phaseoli CIAT 899 suşunun %1' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi % 17,07 olarak hesaplanmıştır. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri %8,50- %52,65 arasındadır. 23F kodlu izolat %8,50 verimle en düşük değeri verirken, % 52,65 ile 15F kodlu izolat en yüksek PHB verimine sahiptir.

Tablo 4.4.3. *R.phaseoli* suşlarının %1,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R.phaseoli</i> CIAT 899	1,4934	0,4281	24,92
23F	1,4352	0,3105	18,81
32F	1,4848	0,5470	32,03
35F	3,1166	0,5702	15,90
38F	2,4119	0,2639	9,51
15F	0,8907	0,6170	60,23

R.phaseoli CIAT 899 suşunun %1,5' lik melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi %24,92 olarak hesaplanmıştır. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri %9,51- %60,23 arasında belirlenmiştir. 38F kodlu izolat %9,51 verimle en düşük değeri verirken, % 60,23 ile 15F kodlu izolat en yüksek PHB verimine sahiptir.

R.phaseoli CIAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi; %1' lik melas konsantrasyonunda en düşük (%17,07), %0,5' lik melas konsantrasyonunda en yüksek (%29,43) olarak bulunmuştur. *R.phaseoli* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimi, %0,5' lik melas konsantrasyonunda %5,90- %37,93, %1' lik melas konsantrasyonunda %8,50- %52,65, %1,5' lik melas konsantrasyonunda %9,51- %60,23 arasında değişiklik göstermiştir.

Uruç [27], yüksek lisans tezi çalışmasında *Rhizobium phaseoli* cinsi bakterilerin hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini % 17,23- %26,04 arasında belirlemiştir. Çalışılan 23F kodlu izolatta ortalama kuru ağırlık değerine göre PHB verimini %25,29, 32F kodlu izolatta bu değeri %18,94 olarak bulmuştur. Çalışmamızda farklı melas konsantrasyonlarına bağlı olarak bu değer 23F kodlu izolatta %8,50-%18,81, 32F kodlu izolatta ise %5,90-%32,03 arasında bulunmuştur.

Baysak [8], *Rhizobium phaseoli* cinsi bakterilerle yaptığı çalışmasında bakterilerin hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini 48 saatlik inkübasyonda, %0,5'lik şeker konsantrasyonunda %16,08-%26,84, %1'lik şeker konsantrasyonunda %17,15-%26,00, %1,5'lik şeker konsantrasyonunda %19,28-%25,01 arasında bulmuştur. 96 saatlik inkübasyonda ise bu değerler %25,80-%31,16 arasındadır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz PHB verimleri bu

çalışmadaki PHB verimlerine uygunluk göstermektedir. Ancak çalışmamızda oldukça yüksek PHB verimlerine de rastlanılmaktadır.

Ali [37], yapmış olduğu yüksek lisans tezi çalışmasında *R.japonicum* 379 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda %45,5, %1'lik melas konsantrasyonunda %33,3, %1,5'lik melas konsantrasyonunda %46,7 olarak, *Bradyrhizobium japonicum* 1809 nolu suşun hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda %17,0, %1'lik melas konsantrasyonunda %25,9, %1,5'lik melas konsantrasyonunda %31,9 olarak bulmuştur. *R.japonicum* 377 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, %0,5'lik melas konsantrasyonunda %19,8, %1'lik melas konsantrasyonunda %9,0, %1,5'lik melas konsantrasyonunda %4,3 olarak, *Rhizobium* sp. MR90 nolu suşta hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda %18,0, %1'lik melas konsantrasyonunda %16,9, %1,5'lik melas konsantrasyonunda %11,7 olarak tespit etmiştir. *Rhizobium* sp. 3172 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini %0,5'lik melas konsantrasyonunda %35,3, %1'lik melas konsantrasyonunda %30,6, %1,5'lik melas konsantrasyonunda %10,0 olarak belirlemiştir. Ali'nin yapmış olduğu çalışmada tespit ettiğimiz PHB verimi değerleri bu çalışmadaki değerlere yakın olduğu görülmüştür. Çalışmamızda minimum PHB verimi %5,90, maksimum PHB verimi ise %60,23 olarak bulunmuştur.

Ediz [4], yapmış olduğu çalışmada *Bacillus subtilis* F1 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini farklı inkübasyon süreleri sonunda %0,5'lik melas konsantrasyonunda %29,47-%84,71, %1'lik melas konsantrasyonunda %15,91-%81,33, %1,5'lik melas konsantrasyonunda %52,00-%82,00 arasında bulmuştur. *Bacillus megaterium* P1 suşunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini farklı inkübasyon süreleri sonunda %0,5'lik melas konsantrasyonunda %30,00-%42,50, %1'lik melas konsantrasyonunda %45,26-%82,50, %1,5'lik melas konsantrasyonunda %35,00-%72,00 arasında belirlenmiştir. Çalışmamızda hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verim değerleri bu çalışmadaki değerlere yakındır.

5. KAYNAKLAR

1. Olhan, E., "Tarımsal Çevre Politikası", A.Ü.Z.F. Tarım Ekonomisi Bölümü Ders Notları, Yayınlanmamış, 2004, Ankara
2. Tefloncu A., "Biyoteknoloji", Ege Üniversitesi Yayınlar, Bornova, İzmir, (1995)
3. Onbaşı, D., 2006, Çevredeki Organik Kirleticilerden Biyoteknolojik Olarak Bazı İkincil Metabolitlerin Üretimi, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
4. Ediz, N., 2004, Bazı Bacillus Cinsi Bakterilerin Melas Besiortamında PHB Üretimleri, Toplam Protein Profilleri ve Plazmid DNA' larının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
5. Mercan, N. ve Beyatlı, Y., 2004, Bakteriyal Biyoplastikler ve Kullanım Potansiyelleri, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 02,04,2-18
6. Bichler et al. 1993, Lee 1996, Braunegg et al. 1998, Amass et al. 1998, Muller et al. 2001
7. Sutherland, I.W., "Polysaccharases For Microbial Exopolysaccharides", Carbonhydrate Polymers, 38, 319-328 (1999)
8. Baysak, İ.M., 2007, Bazı Rhizobium Türlerinin Polihidroksibütirat (PHB) Verimleri Üzerine Farklı Ortam Şartlarının Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
9. Khanna, S. and Srivastava, K.A., 2005, Statistical Media Optimisation Studies For Growth and PHB Production By *Ralstonia eutropha*, Process Biochemistry, 40, 6, 2173-2182.
10. Lee, S.Y., 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49, 1-14
11. Anderson, A.J. and Dawes, E.A., 1990, Occurrence, Metabolizm, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Microbiol. Reviews, 54, 4, 450-472
12. Holmes, P.A., 1985, Applications of PHB-A Microbially Produced Biodegradable Thermoplastic, Phys. Technol., 16, 32-36
13. Braunegg, G., Lefebeure, G. and Genser, K.F., 1998, Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters From Renewable Resources: Physiological and Engineering Aspects, Journal of Biotechnology, 65, 127-161.
14. Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N. and Seguin, J. P., 1996, ¹NMR Spectroscopic Determinatin of Poly 3-hydroxybutyrate Extracted From Microbial Biomass, Enzyme and Microbial Technol., 18, 195-201.

15. Tanaka, K., Katamune, K., Ishizaki, A., 1993, Fermentative Production of Poly-Beta-hydroxybutyric Acid From Xylose by a Two-stage Culture Method Employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnology Letters.*, 15, 12, 1217-1222.
16. Bloembergen, S., Holden, D., Hamer, G., Bluhm, T., Marchessault, R., 1986, Studies of Composition and Crystallinity of Bacterial Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate), *Macromolecules*, 19, 2865-2871.
17. Page, W. J., 1992a, Suitability of Commercial Beet Molasses Fractions as Substrates for Polyhydroxyalkanoate Production by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.*, 14, 5, 385-390.
18. Witholt, B., Kessler, B., (1999) "Perspectives of Medium Chain Length Poly(hydroxyalkanoates), a Versatile set of Bacterial Bioplastics", *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 279-285.
19. Page, W. J., (1992b) "Production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in Beet Molasses Culture", *FEMS Microbiology Reviews*, 103: 149-158.
20. Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K., Chen, G., (2001) "Production of Poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Jma5 Cultivated in Molasses Media", *Antonie Van Leeuwenhoek*, 80: 111-118.
21. Ahn, W. S., Park, S. J. and Lee, S. Y., (2000) "Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by Fed-batch Culture of Rekombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution", *Appl. and Environ. Microbiol.*, 66 (8): 3324-3627.
22. Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., Goulet, J., (1995) "Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate", *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (1): 165-169.
23. Yan, Y., Wu, Q., Zhang, R., 2000, Dynamic Accumulation and Degradation of Poly(3-hydroxyalkanoate)s in Living Cells of *Azotobacter vinelandii* UWD Characterized by ¹³C NMR, *FEMS Microbiology Letters*, 193, 269-273.
24. Yılmaz, M., Beyatlı, Y., 2003, Biyoplastik Poli- β -Hidroksibütirat, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1, 9, 1-33.
25. Barnard and Sander 1989, Madison and Huisman 1999, Sudesh et al. 2000.
26. Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, R.E., 2003, Bioplastics From Microorganisms, *Current Opinion in Microbiology*, 6, 251-260.
27. Uruç, A., 2006, Bazı Rhizobium Cinsi Bakterilerin Poli- β -hidroksibütirat Üretimleri Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

28. Khanna, S. and Srivastava, K.A., 2005, Recent Advances In Microbial Polyhydroxyalkanoates, *Process Biochemistry*, 40, 2, 607-619.
29. Madison, L. L., Huisman, G. W., 1999 Metabolic Engineering of Poly-3-Hydroxyalkanoates From DNA to Plastic, *Mic. Mol. Bio. Reviews*, 63:21-53.
30. Nickerson, K.W., Zarnick W.J. and Kramer, V.C. 1981. Poly-k-Hydroxybutyrate Parasporal Bodies in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 12; 327-331.
31. Lafferty, R.M., Korsatko, B. and Korsatko, W. 1988. Microbial Production of Polyhydroxybutyric acid. *Biotechnology*, edited by H.J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
32. 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.
33. Findlay, R. H. and White, D. C., 1983, Polymeric Beta-hydroxyalkanoates From Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1, 71-78.
34. Slater, S. Gallaher, T., Dennis, D., 1992, Production of Polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate in a Recombinant *Escherichia coli* Strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4, 1089-1094.
35. Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J. D., 1996, Production of polyhydroxybutyrate by Petrochemical Activated Sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403. *Ind. Jour. Exp. Bio.*, 34: 216-219.
36. Dinigüzel, Ö., 2007, Türkiye’den PHB Üreticisi Halofilik Bakterilerin İzolasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
37. Ali, E., 2002, Bazı Rhizobium Bakterilerinin Melas Besiortamında Poli- β -hidroksibütirat (PHB) Üretimi İle Protein Profil ve Plazmid DNA’ larının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
38. Yılmaz, M. Ve Beyatlı, Y., 2003, Topraktan Elde Edilen Bacillus Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi; Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 9, 1-33.
39. Tokiwa, Y. And Calabia, P.B., 2004, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan
40. Hajikhani, R., 2003, Poli- β -Hidroksibütirat Üretimi, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1,10-18, Ankara.

41. Bonartseva, G.A., Myskina, V.L. and Zagreba, E.D. 1994. Poly-C-hydroxybutyrate Content in Cells of Various *Rhizobium* Species During Growth with Different Carbon and Nitrogen Sources, *Microbiol.*, 63, 1, 45-48.
42. Tavernier, P., Portais, J.C., Saucedo, J.E.N., Courtuis, J., Courtios, B. And Barbotin, J.N., 1997, Exopolysaccharide and poly- β -hydroxybutyrate Coproduction in *Rhizobium meliloti* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1, 21-26].
43. Mercan, N., Beyatlı y., 2001, *Bacillus sphaericus* Suşlarının Poli- β -Hidroksibütirat Üretimlerinin İncelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25,2,1-7.
44. Mona, K.G., Azza, E.S., Sanaa, H.O., 2001, Production of PHB by a *Bacillus megaterium* Strain Using Sugarcane Molasses and Corn Steep Liquor as Sole Carbon and Nitrogen Sources, *Microbiol. Res.*,156, 201–207].
45. 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.
46. Mercan, N., Aslım, B., Yüksekdağ, Z. N. ve Beyatlı, Y., 2002 Production of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) by Some *Rhizobium* Bacteria, *Turk J. Biol.*, 26, 215-219.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzincan-Kemaliye’de doğdum. 1999’da Malatya Lisesi’ ni bitirdim. Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2007 yılında mezun oldum. Yüksek Lisansımı Fırat Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yaptım. Şuan Muş Alparslan Üniversitesi’ de araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.