

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

***Alcaligenes latus phbCAB* (poli-3-hidroksibütirikasit
biyosentez) GENLERİ KLONLANMIŞ *Escherichia coli*'de
PHB ÜRETİMİ VE İZOLASYONU**

Yunus ENSARİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 24.05. 2012

Bornova-İZMİR

2012

Yunus ENSARİ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “*Alcaligenes latus phbCAB* (poli-3-hidroksibütirikasit biyosentez) genleri klonlanmış *Escherichia coli*’de PHB üretimi ve izolasyonu ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.05.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :

Raportör Üye:

Üye :

ÖZET

***Alcaligenes latus phbCAB* (poli-3-hidroksibütirikasit biyosentez)
GENLERİ KLONLANMIŞ *Escherichia coli*'de PHB
ÜRETİMİ VE İZOLASYONU**

ENSARİ, Yunus

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

Mayıs 2012, 95 sayfa

Polihidroksialkanoatlar (PHA), sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerin yanı sıra biyoyoumlu ve biyobozunur olmaları sebebiyle petrol bazlı plastiklerin alternatifi olabilecek potansiyele sahiptir. PHA biyopolimerleri besin açısından dengesiz koşullarda birçok gram (+) ve gram (-) bakteri tarafından sentezlenirler ve hücre içerisinde enerji depo materyali olarak biriktirilmektedir. Polihidroksibütirik asit (P3HB) en çok çalışılan ve bilinen PHA çeşididir.

Bu tez çalışmasında endüstriyel PHB üretiminde kullanılan *Alcaligenes latus* DSM 1124 ırkında yer alan PHB biyosentez genlerinin *Escherichia coli*'ye aktarılarak yüksek miktarda PHB üretimi ve üretilen biyopolimerin izolasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla PZR yöntemi ile çoğaltılan *Alcaligenes latus* DSM 1124 ırkında yer alan PHB biyosentez genleri pSP 72, pUC 19 ve pQE 40 plazmitlerine başarılı bir şekilde aktarılmıştır. Elde edilen rekombinant plazmitler 10 farklı *E. coli* ırkına aktarılarak PHB üretimi için en uygun olan ırk ve plazmit olarak pQEAL1124 plazmitini taşıyan *E. coli* Rosetta ırkı belirlenmiştir. Uygun ırk belirlendikten sonra PHB üretiminin arttırılması amacıyla besiyeri, karbon kaynağı, sıcaklık, karıştırma hızı gibi optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilerek %60'ın üzerinde verim elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Polihidroksibütirik asit, biyobozunur polimerler, *Alcaligenes latus*, *E. coli*.

ABSTRACT

**PHB PRODUCTION AND ISOLATION FROM *Escherichia coli*
HARBORING *Alcaligenes latus* PHB BIOSYNTHESIS OPERON**

ENSARİ, Yunus

MSc in Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU

May 2012, 95 pages

Keywords: Polyhydroxybutyrate, biodegradable polymers, *Alcaligenes latus*, *E. coli*.

In addition to their physical and chemical properties, due to they are biodegradable and biocompatible polyhydroxyalkanoates have potential to be alternative to petroleum based plastics. PHAs are synthesized by various gram positive and negative bacteria under unbalanced nutrient conditions and accumulated as an energy storage material in cytoplasm. Polyhydroxybutyrate (PHB) is the most studied and well known type of PHAs.

The aim of this study is production and isolation of PHB from *E.coli* through transferring of PHB operon from *A. latus* DSM 1124. For this purpose, *A. latus* DSM 1124 PHB biosynthesis genes, amplified by using PCR, were ligated to pSP72, pUC19 and pQE40 vectors. After transformation of 10 different *E. coli* strains with obtained plasmids, *E. coli* Rosetta harboring pQEAL1124 plasmid was determined the most effective strain to produce PHB. After determining the most appropriate strain, in order to enhance PHB production medium, carbon source, temperature, shaking rate optimizations were performed. By performing optimizations *E. coli* accumulated PHB more than 60% of cell dry weight.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Nurdan PAZARLIOĞLU'na laboratuvarında çalışma imkanı sağlayıp ufukumun genişlemesine yardımcı olduğu için teşekkür ederim.

Laboratuvara alışmam için geldiğim ilk günden itibaren elinden geleni yaparak alışma sürecimi minimuma indirerek laboratuvar çalışmalarımı kolaylaştıran Emre ERDEN ÇAKMAKLI'ya teşekkür ederim.

Tanıştığımız günden bu yana tüm bilgi ve birikimini benimle paylaşan saygıdeğer hocam Alper AKKAYA'ya teşekkür ederim.

Her türlü yardımlarından ötürü Biyokimya Bölümü Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarını paylaştığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

2005 yılından beri benimle aynı yolda yürüyen ve yürüyeceğini bildiğim en büyük destekçim Gökçe KOBAZI'ye çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim ve öğretim hayatım süresince bana daima inanan ve her türlü desteği sağlayan aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması Ege Üniversitesi 2010/FEN/008 no'lu BAP projesi tarafından desteklenmiştir. Mali desteklerinden dolayı Ege Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Yunus ENSARİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1 Polihidroksialkanoatlar	3
1.2 Polihidroksialkanoatların Özellikleri.....	5
1.2.1 Fiziksel ve kimyasal özellikleri	5
1.2.2 Biyolojik Özellikleri	6
1.3 Polihidroksialkanoatların Biyosentezi	8
1.4 Polihidroksialkanoatların Üretimi	13
1.4.1 Bakterilerde PHA üretimi	15
1.4.2 Ökaryotik organizmalarda PHA üretimi.....	18
1.5 Polihidroksialkanoatların Saflaştırılması	20
1.6 Polihidroksialkanoatların Uygulama Alanları	23

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.7 Polihidroksibütirik Asit (PHB)	24
2. MATERYAL VE YÖNTEM	27
2.1 Materyal	27
2.1.1 Çalışmada Kullanılan Organizmalar ve Plazmit DNA'lar.....	27
2.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler.....	30
2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	34
2.2 Yöntem.....	34
2.2.1 <i>Alcaligenes latus</i> 'tan genomik DNA izolasyonu	34
2.2.2 Gene özgün primerler kullanılarak <i>Alcaligenes latus</i> DSM 1124 phbCAB operonunun genomik kopyasının üretimi	37
2.2.3 PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden izole edilmesi	39
2.2.4 PZR ürünlerinin plazmit DNA'lara ligasyonu	40
2.2.5 <i>E. coli</i> kompetent hücre hazırlığı	41
2.2.6 Plazmit DNA'nın kompetent hücrelere transformasyonu.....	42
2.2.7 Plazmit izolasyonu	43
2.2.8 PHB üretiminin gözlemlenmesi	46
2.2.9 PHB standart grafiğinin çizilmesi	46

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.10 Kuru kütle miktarının belirlenmesi.....	47
2.2.11 PHB miktarının belirlenmesi	48
2.2.12 PHB üreticisi <i>E. coli</i> ırkının belirlenmesi.....	49
2.2.13 Farklı besi yerlerinin PHB üretimine etkisi	49
2.2.14 Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisi	49
2.2.15 Farklı Nutrient Broth konsantrasyonlarının PHB üretimine etkisi	50
2.2.16 Sıcaklığın PHB üretimine etkisi	50
2.2.17 Karıştırma hızının PHB üretimine etkisi	50
2.2.18 Aşı kültür miktarının PHB üretimine etkisi.....	50
2.2.19 İndirgen şeker tayini	51
2.2.20 PHB üretim profilinin oluşturulması	51
2.2.21 Rekombinant <i>E.coli</i> 'den PHB izolasyonu	52
2.2.19 İndirgen şeker tayini	51
3. BULGULAR.....	53
3.1 Biyoinformatik Bulgular.....	53
3.1.1 <i>Alcaligenes latus</i> phbCAB genlerinin nükleotid ve aminoasit dizisi	53
3.1.2 <i>Alcaligenes latus</i> phbCAB operonunun restriksiyon kesim haritası	56

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2 <i>A. latus</i> phbCAB Operonunun PZR İle Üretilmesi.....	56
3.3 PZR Ürünlerinin vektörlere Aktarılması.....	58
3.4 PHB Üreticisi <i>E. coli</i> Irkının Belirlenmesi	61
3.5 Farklı Besi Yerlerinin PHB Üretimine Etkisi	63
3.6 Farklı Karbon Kaynaklarının PHB Üretimine Etkisi.....	65
3.7 Farklı Nutrient Broth Konsantrasyonlarının PHB Üretimine Etkisi.....	68
3.8 Sıcaklığın PHB Üretimine Etkisi	69
3.9 Karıştırma Hızının PHB Üretimine Etkisi	70
3.10 Aşı Kültür Miktarının PHB Üretimine Etkisi	71
3.11 PHB Üretim Profilinin Oluşturulması.....	72
3.12 <i>Alcaligenes latus</i> , <i>E.coli</i> ve Rekombinant <i>E. coli</i> 'de PHB Üretiminin Karşılaştırılması	73
3.13 Rekombinant <i>E.coli</i> 'den PHB İzolasyonu	74
4. TARTIŞMA.....	76
5. SONUÇ	82
KAYNAKLAR DİZİNİ	83
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Polihidroksialkanoatların genel yapısı	4
1.2 Aerobik arıtma çamurunda P(3HB-3HV) ‘nin biyobozunumu	7
1.3 Mikrobiyal PHA üretim yolları	9
1.4 Pha ve phb operonları.....	12
1.5 PHA üretimi gerçekleştiren mikroorganizmaların mikroskopik olarak görüntülenmesi	16
1.6 PHA biyopolimeri kullanılarak üretilen ürünler.....	23
1.7 Bakterilerde PHB biyosentezinin şematik gösterimi.....	24
2.1 pSP72 vektörünün halkasal haritası.....	28
2.2 pQE40 vektörünün halkasal haritası.....	29
2.3 pUC19 vektörünün halkasal haritası	29
2.4 PHB standart grafiği	47
2.5 İndirgen şeker analizi için glukoz standart grafiği	51
3.1 A.latus DSM 1124 PHB biyosentez operonu	54
3.2 A.latus DSM 1124 ırkında kodlanan PHB polimeraz enziminin protein dizilimi	55
3.3 A.latus DSM 1124 ırkında kodlanan ketotiyolaz enzimini protein dizilimi.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4 <i>A.latus</i> DSM 1124 ırkında kodlanan asetoasetil-CoA redüktaz enzimini protein dizilimi.....	55
3.5 <i>A.latus</i> DSM 1124 PHB biyosentez operonuna ait restriksiyon kesim haritası.....	56
3.6 <i>A. latus</i> DSM 1124 genomik DNA izolasyonu.....	57
3.7 <i>A. latus</i> DSM 1124 ırkından phbCAB operonunun çoğaltılması için gerçekleştirilen PZR reaksiyonu sonuçlarına ait agaroz jel görüntüsü	57
3.8 PHB üretimi için oluşturulan rekombinant plazmitler	59
3.9 Farklı rekombinant plazmitleri içeren <i>E. coli</i> hücrelerinin Sudan Black ile görüntülenmesi	60
3.10 Rekombinant <i>E. coli</i> 'de Glukoz içeren katı besiyerinde PHB üretiminin görüntülenmesi.....	61
3.11 <i>E. coli</i> DH5α pSPAL1124 ırkında PHB üretimine besi yerinin etkisi.....	64
3.12 <i>E. coli</i> Rosetta pQEAL1124 ırkında PHB üretimine besi yerinin etkisi..	64
3.13 <i>E. coli</i> JM105 pQEAL1124 ırkında PHB üretimine besi yerinin etkisi...	65
3.14 PHB üretimine glukozun etkisi	66
3.15 PHB üretimine fruktozun etkisi	66
3.16 PHB üretimine sakkarozun etkisi	67
3.17 PHB üretimine laktozun etkisi	67

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.18 Farklı Karbon kaynakların kuru kütle ve PHB üretimine etkisi	68
3.19 Farklı Karbon kaynakların PHB verimine etkisi	68
3.20 PHB üretimine Nutrient Broth konsantrasyonunun etkisi	69
3.21 Sıcaklığın PHB üretimine etkisi	70
3.22 Karıştırma hızının PHB üretimine etkisi	71
3.23 Aşı miktarının PHB üretimine etkisi	72
3.24 Rekombinant <i>E. coli</i> 'de PHB üretim profili	73
3.25 Farklı mikroorganizmalar ile PHB üretimi.....	74
3.26 Saflaştırılan PHB biyopolimeri.....	75
4.1 Dünyada 2010 yılında gerçekleşen biyoplastik üretimi.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Endüstride yaygın kullanılan plastikler ve kullanım alanları.....	1
1.2 Çeşitli plastiklerin fiziksel özellikleri	6
1.3 PHB biyofilminin çeşitli ortamlarda bozunması.....	8
1.4 Mikrobiyal PHA üretim yollarında görev alan enzimler	11
1.5 PHA üretiminde kullanılan farklı kaynaklar	14
1.6 PHA saflaştırması amacıyla kullanılan yöntemler ve bunların avantaj ile dezavantajları.....	22
2.1 PHB üretimi için kullanılan E. coli suşları ve genotipleri	27
2.2 Medium B besi yeri bileşenleri	32
2.3 PHB üretim ortamı bileşenleri	33
2.4 Mineral salt besi yeri (Amonyum sülfat içermeyen) bileşenleri.....	33
2.5 Fermentas Taq DNA polimeraz enzimi için PCR reaksiyon koşulları	38
2.6 Phire Hot Start II DNA polimeraz enzimi için PCR reaksiyon koşulları	38
2.7 Fermentas Taq DNA polimeraz enzimi için termal cyclers koşulları	38
2.8 Phire Hot Start II DNA polimeraz enzimi için termal cyclers koşulları	39
2.9 Restriksiyon kesim reaksiyonu koşulları	40
2.10 Ligasyon reaksiyonu koşulları	41

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.11 DNS yöntemi	51
3.1 24 ve 48 saat sonrasında farklı rekombinant <i>E.coli</i> hücrelerinde PHB üretimi	61
4.1 Farklı rekombinant <i>E. coli</i> ırklarında PHA üretimi	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
€	Avro.
<u>Kısaltmalar</u>	
HCl	Hidroklorik asit.
HCN	Hidrojen siyanür.
DNA	Deoksiribonükleik asit
KDa	Kilo Dalton
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
GC	Gaz Kromatografisi
MS	Kütle Spektroskopisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
lacZ	Beta galaktosidaz geni
distH ₂ O	Saf su
gr	Gram
L	Litre
ml	Mililitre
M	Molar

bç	Baz çifti
kb.	Kilobaz
Tm	Bağlanma Sıcaklığı
µl	mikrolitre
nm	nanometre

1. GİRİŞ

Petrokimya endüstrisinin bir ürünü olan plastikler uzun yıllardan beri evsel, medikal, otomobil, gıda ve elektronik gibi çeşitli alanlarda kullanılan metal ve ahşap gibi çeşitli malzemelerin yerini başarı ile alarak oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Keshavarz and Roy, 2010). Çizelge1.1’de yaygın şekilde kullanılan plastikler ve kullanım alanları verilmiştir. Petrol bazlı plastiklerin yaygın şekilde kullanımının başlıca sebepleri; plastiklerin dayanıklı ve ucuz olmaları, hammadde fiyatlarının düşük olması, kimyasal yollarla farklı şekil ve sertlik gibi istenilen özelliklerin kolayca kazandırılabilmesidir. Dünya plastik pazarına bakıldığında en yaygın kullanılan iki plastik olan polietilentetrafalat (PET) ve polipropilenin fiyatlarının sırasıyla 0,8 €/kg ve 0,6 €/kg olduğu görülmektedir (Plasticker, 2011). Geleneksel petrol türevli plastiklerin bu denli ucuz olmaları plastikleri diğer malzemeler karşısında üstün kılmaktadır. Tüm bu olumlu özelliklerine rağmen petrokimya türevli plastikler ksenobiyotik olmaları ve biyolojik olarak parçalanamamaları sebebiyle hem doğa hem de canlılık için büyük bir tehlike oluşturmaktadır.

Çizelge 1.1. Endüstride yaygın kullanılan plastikler ve kullanım alanları.

Plastik çeşidi	Kullanım alanları
Polietilen (PE)	Savunma sanayi, oyuncak, ev gereçleri, kap, alışveriş torbaları, paketlenme
Polipropilen (PP)	Otomotiv sanayi, paketlenme, döşeme,
Polisitiren (PS)	Paketlenme, şampuan kapları, oyuncak, ev gereçleri, duvar kaplamaları, elektronik, mobilya
Poliamid (PA) Naylon	Diş fırçası kılları, misina, otomotiv, iş makineleri ve havacılık
Polikarbonat (PC)	Su şişesi, elektrik ve elektronik,
Poliüretan	Bina yalıtımı, buzdolabı imalatı, halı, mobilya, otomobil koltuğu üretimi,
Polivinil klorür (PVC)	Duvar kaplamaları, boru, pencere üretimi
Politetrafloroetilen (Teflon)	Isı rezistansı, pişirme tava ları

Günümüzde her yıl 100 milyonlarca ton plastik üretilmektedir. Örneğin 2010 yılında üretilen plastik miktarı bir önceki yıla oranla %6 artarak 265 tona ulaşmıştır ve plastiğe olan talebin artması üretimin 2011 yılı içinde kayda değer oranda artacağını göstermektedir. 2010 yılında üretilen toplam plastiğin 247

milyon tonu atık plastik olarak doğaya bırakılmış ve bu atığın sadece 14,3 milyon tonu geri dönüşüme uğrayarak geri kazanılabilmektedir (Plastics Europe, 2010).

Plastiklerin dayanıklılık gibi çok yönlü özelliklere sahip olmaları nedeniyle, plastikler son dönemlerde su kaynaklarının kirlenmesinin, doğal hayatın tehlike altına girmesinin ve çevre atık sorunlarının başlıca kaynağı haline gelmiştir. Plastiklerin birçoğunun tek kullanımlık olması ve kullanım sonrasında doğaya bilinçsiz bir şekilde atılmaları bunların özellikle toprak ve deniz ekosistemlerinde birikmelerine yol açmaktadır. Örneğin özellikle tropik bölgede oluşan atık plastikler içerisinde su birikimi gerçekleşmesiyle sivrisineklerin üremesi için uygun ortamlar oluşmaktadır (Loo and Sudesh, 2007).

Petrol türevli atık plastiklerin giderimi için çeşitli işlemler uygulanmaktadır. Bu işlemler sırasıyla yakma, toprağa gömme ve geri dönüşümdür (Loo and Sudesh, 2007). Yakma işlemi günümüzde kullanılmasına rağmen çeşitli olumsuzlukları vardır. Yakma işlemi oldukça maliyetli bir yöntemdir ve bu da yakmanın uygulanmasını kısıtlayan faktörlerin başında gelmektedir. Ayrıca yakma işlemi esnasında dioksin, HCl ve HCN gibi plastikten daha zehirli küçük bileşiklerin oluşmasına ve doğaya salınmasına sebep olmaktadır (Loo and Sudesh, 2007; Suriyamongkol et al., 2007). Atık plastiklerin giderimi için kullanılan diğer bir yöntem olan geri dönüşüm süreci zahmetlidir ve plastik birkaç kez geri dönüşüme uğradıktan sonra mekanik özelliklerini kaybetmektedir (Loo and Sudesh, 2007).

Petrokimya ürünü geleneksel plastiklerin birçok avantajına rağmen doğada parçalanmadan uzun bir süre kalmaları plastikleri çevre atık sorunlarının başlıca faktörü haline getirmiştir. İnsanların çevreye karşı olan kaygılarının artması ve ham petrol fiyatlarındaki durdurulamaz yükselişin sonucunda plastiklerin fiyatında gerçekleşmesi beklenen kayda değer artış bilim insanlarını ve resmi kurumları petrol bazlı plastiklere alternatiflerin geliştirilmesine itmiştir (Chanprateep, 2010; Khanna and Srivastava, 2007). Bu bağlamda biyobozunur plastiklerin geliştirilmesine olan ilgi her geçen gün giderek artmaktadır. Ancak biyolojik olarak parçalanabilme özelliğine sahip olan bu biyopolimerlerin plastiklerin sahip olduğu fiziksel ve kimyasal özelliklere de sahip olması gerekmektedir. Biyobozunur plastiklere örnek olarak polihidroksialkanoatlar (PHA), alifatik polyesterler, polisakkaritler ve nişasta bazlı polimerler ile bunların kopolimerleri verilebilir. Ancak biyobozunur polimerlerin geleneksel plastiklerin

yerini alabilmesinin önündeki en büyük engel üretim maliyetlerinin oldukça yüksek olmasıdır (Purwadi, 2006).

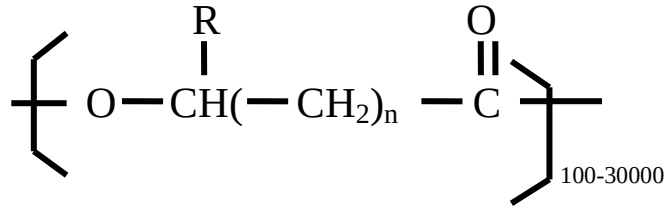
1.1 Polihidroksialkanoatlar

Polihidroksialkanoatlar (PHA) birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteri tarafından sentezlenen ve hücre içerisinde sitoplazmik granüller halinde enerji ya da karbon depo materyali olarak biriktirilen yapısal olarak basit hidroksialkanoat polimerleridir (Keshavarz and Roy, 2010; Choi et al., 1998; Madison and Huisman, 1999). Doğal PHA üreticisi birçok mikroorganizma bu polimerleri azot, oksijen, fosfor gibi besin elementlerinin sınırlı ve karbon kaynağının bol bulunduğu durumlarda sentezleyip sitoplazmalarında kuru ağırlıklarının yaklaşık %90'ına kadar depolamaktadır (Keshavarz and Roy, 2010; Madison and Huisman, 1999). Bu durum mikroorganizmanın yaşadığı ortamda besin dengesi bozulduğunda fazla besinlerin hücre içerisinde saklanması için iyi bir yöntemdir. Ayrıca mikroorganizmalar ortamda karbon ve enerji kaynağı bulunmadığı durumda ise ürettikleri polimerleri parçalamaktadır (Chee et al., 2010).

Polihidroksialkanoatlar ilk olarak 1925 yılında Fransız mikrobiyolog Lemoigne tarafından *Bacillus megaterium*'da tanımlanmıştır (Keshavarz and Roy, 2010). Bu tarihten sonra birçok gram pozitif ve gram negatif bakteri ve fotosentetik bakterinin PHB'yi aerobik ve anaerobik olarak üretebildikleri belirtilmiştir. 1973 yılında PHB'nin nişasta ve glikojene benzer şekilde bakteriyel depo polimeri olarak görev yaptığı kabul edilmiştir (Chee et al., 2010). Ancak yeni PHA üreticisi mikroorganizmaların ve bakterilerin daha sağlıklı olabilmelerinde rollerinin olduğunun anlaşılmasıyla, PHA'ların sadece hücre içerisinde biriktirilen bir karbon deposundan daha fazlası olduğu anlaşılmıştır. PHA'lar bunları sentezleyebilen bakterilere çeşitli ekolojik avantajlar kazandırmaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde PHA'ların; çeşitli ekolojik ortamlarda sınırlı besin şartlarında hayatta kalabilmelerine, hücre hareketleri ve biyolojik azot fiksasyonu için enerji sağlamaya, spor ve kist oluşturmaya, ekzopolisakkarit üretiminin kontrolüne; sıcaklık, soğukluk, ozmotik basınç gibi çeşitli çevresel stres koşullarına dayanabilmelerine yardımcı oldukları belirlenmiştir. Bununla birlikte PHA oligomerlerinin birçok doku ile birlikte insan ve hayvan kanını içeren ökaryotlarda da var olduğu bilinmektedir (Chen, 2010).

Polihidroksialkanoatlar R-hidroksialkanoik asit monomerlerinden oluşan termoplastik ya da elastomerik özellikteki polimerlerdir (Keshavarz and Roy,

2010) ve üretildikleri mikroorganizmaların sitoplazmalarında suda çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri olarak bulunurlar (Purwadi, 2006). Bir PHA polimerinin genel yapısı Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



n=1	R= hidrojen	Poli (-3-hidroksipropiyonat)
	Metil	Poli (-3-hidroksibütirat)
	Etil	Poli (-3- hidroksivalerat)
	Propil	Poli (-3-hidroksihegzanoat)
	Pentil	Poli (-3-hidroksioktanoat)
	Nonil	Poli (-3-hidroksidodekanoat)
n=2	R= hidrojen	Poli (-4-hidroksibütirat)
n=3	R= hidrojen	Poli (-5-hidroksivalerat)

Şekil 1.1. Polihidroksialkanoatların genel yapısı (Ojumu et al (2004)’dan değiştirilerek alınmıştır.)

Polihidroksialkanoatlar çeşitli kriterlere göre bazı sınıflara ayrılmaktadır. Genel olarak bakıldığında PHA’lar monomer büyüklüklerine göre iki büyük gruba ayrılırlar (Purwadi, 2006; Loo and Sudesh, 2007; Philip et al. 2007);

- Kısa yan zincirli PHA’lar (scl); 3-5 karbon atomu içerir.
- Orta yan zincirli PHA’lar (mcl); 6-14 karbon atomu içerir.

Monomer büyüklüklerinde var olan bu farklılık temel olarak belirli aralıkta karbon uzunluğuna sahip 3HA monomerlerini tanıyan PHA sentaz (polimeraz) enzimlerinin substrat spesifisitesi ile ilişkilidir. Buda farklı mikroorganizmaların farklı substrat kombinasyonlarında çeşitli tiplerde polimerler üretebileceğini göstermektedir (Purwadi, 2006).

Yukarıdaki sınıflandırmanın dışında PHA’lar biyosentetik orjinlerine bağlı olarak doğal ve yarı sentetik olarak iki gruba ayrılırlar. Doğal PHA’lar doğada mikroorganizmalar tarafından doğal substratların kullanılmasıyla üretilen Polihidroksibütirik asit (PHB) gibi polimerler iken, yarı sentetik polimerlerin üretilmesi için 3 merkaptopropionik asit gibi olağan olmayan monomerlerin varlığı gereklidir. Ayrıca PHA’lar zincirde bulunan monomer tiplerine göre homopolimer (PHB) ve heteropolimer (P(3HB-co-4HB)) olarak ikiye ve zincirde yer alan monomerlerin kimyasal yapılarına bağlı olarak da alifatik yağ asitleri

içerenler, aromatik yağ asitleri içerenler ve hem alifatik hem de aromatik yağ asitleri içerenler olarak da 3 gruba ayrılırlar (Loo and Sudesh, 2007).

1.2 Polihidroksialkanoatların Özellikleri

1.2.1 Fiziksel ve kimyasal özellikleri

3 hidroksi yağ asidi monomerlerinden oluşan bir PHA zincirinde, bir monomerin karboksil grubu bir sonraki monomerin hidroksil grubu ile ester bağı yaparak molekül ağırlığı 50 KDa ile 1000 KDa arasında değişen zinciri oluşturmaktadır (Madison and Huisman, 1999).

Polihidroksialkanoatlar, polimer yapısında yer alan farklı monomer içerikleri sebebiyle farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptirler. Dört karbon içeren PHA'ların (scl) endüstriyel olarak ilk değerlendirilen ve diğer PHA'lara göre daha iyi özelliklere sahip olduğu belirtilirken son dönemlerde rapor edilen monomerlerin çok daha fazla özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Keshavarz and Roy, 2010).

PHA molekülleri hücre içerisinde 0,2-0,5 µm çapında inklüzyonlar halinde biriken (Suriyamongkol et al. 2007) suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir, ayrıca polimerler izotaktik, optik olarak aktif ve yüksek kristal özelliktedir (Reddy et al., 2003).

Fiziksel özelliklerine bakıldığında kısa yan zincirli PHA moleküllerinin sert, kırılkan ve yüksek kristallenme derecesine sahip olduğu görülürken diğer yandan orta yan zincirli PHA'lar esnektir ve daha düşük kristallenme derecesine, gerilme kuvvetine ve erime noktasına sahiptir (Philip et al. 2007). Bu nedenlerden ötürü kısa yan zincirli (scl) PHA'lar termoplastik, orta yan zincirli (mcl) PHA'lar elastomerler olarak adlandırılırlar (Chen, 2010).

Polihidroksibütirik asit (P(3HB)) oldukça kristal yapıda bir polimerdir ve erime sıcaklığı yaklaşık 180°C civarındadır ayrıca bu polimer oldukça sert ve kırılkan bir yapıya sahiptir. Ancak bu polimere 3- hidroksivalerat komonomerinin eklenmesi polimerin çeşitli özelliklerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Elde edilen P(3HB-3HV) kopolimeri PHB'den saha düşük erime sıcaklığına ve kristallenme derecesine sahiptir. Diğer yandan Poli(4 hidroksibütirat) (P(4HB)) güçlü ve kolay işlenebilen bir termoplastiktir ve gerilme direnci polietilene oldukça yakındır (

Philip et al. 2007). Çeşitli PHA polimerlerine ve diğer bakteriyel plastiklere ait fiziksel özellikler Çizelge 1.2’de yer almaktadır.

Çizelge 1.2. Çeşitli plastiklerin fiziksel özellikleri

Özellik	P(3HB)	P(3HB -3HV)	P(4HB)	PLA	PE	PBS	Polipropilen
Erime sıcaklığı°C	177	150	60	175	136.4	115.8 - 146.5	170
Camlaşma sıcaklığı°C	4	-7.25	-50	60	33.4	-36.6 ile 33	-
Gerilme direnci MPa	40	25	104	49.6-61.6	22-29	24.8	34
Kopma uzaması %	6	20	1000	5.2-2.4	297.7	175.2	400

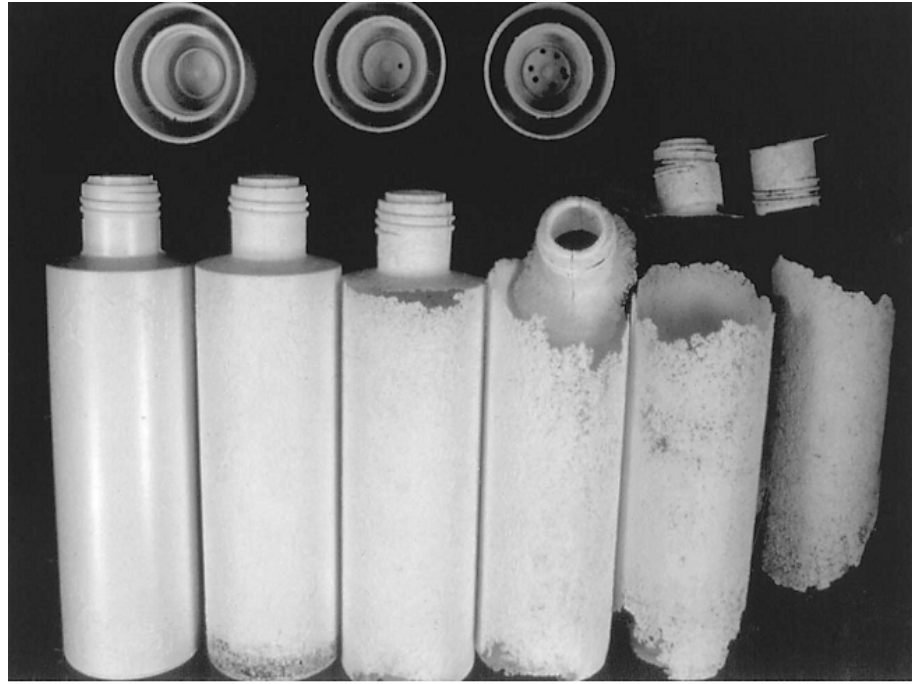
1.2.2 Biyolojik özellikleri

Polihidroksialkanoatların en önemli biyolojik özellikleri biyoyumlu ve biyobozunabilir olmalarıdır. PHA’lar yüksek derecede biyoyumlu olmaları (Chee et al., 2010) ve insanda herhangi bir immün yanıt oluşumuna yol açmamaları nedeniyle medikal sektörde yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Williams et al., 1999).

PHA’ların %100’ü biyolojik olarak su ve karbondioksit parçalanabilmektedir (Santimono et al., 2009). Toprak, çamur ve deniz suyu gibi farklı ekosistemlerde yaşayan bakteri ve fungus gibi birçok mikroorganizma katı halde bulunan PHA moleküllerini salgıladıkları depolimeraz ya da hidrolaz enzimleri aracılığıyla suda çözünebilen oligomer veya monomerlere parçalarlar ve bu parçalanma ürünlerini hücre içersine alarak besin kaynağı olarak kullanırlar (Domb et al., 1998; Madison and Huisman, 1999).

Doğada PHA’ların parçalanması hücre içi ve dışı olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Hücre içi parçalanmada, PHA depolimeraz enzimi tarafından PHA granülünü 3 HA monomerlerine parçalanır, sonrasında bir dehidrojenaz enzimi aracılığıyla bu monomerler asetilasetata oksitlenir ve ardından β -ketotiyolaz enzimi asetilasetatı asetil-CoA’ya parçalar. Oksijenli bir ortamda asetil-CoA sitrik asit döngüsünde CO₂’ye kadar parçalanmaktadır. Hücre dışı parçalanmada ise, doğada var olan PHA molekülleri mikroorganizmalar tarafından salgılanan ekstraselüler PHA depolimerazlarca parçalanmaktadır (Şekil

1.2). Bakteri, fungus ya da algler PHA polimerlerinin yüzeyine saldırılar ve polimeri çözünür hale getiren hücre dışı depolimeraz enzimlerini salgırlar. Çözünür hale gelmiş olan bu ürünler hücre duvarından geçerek hücre içerisine alınır ve burada biyomas üretiminde karbon kaynağı olarak kullanılırlar. Canlı sistemlerde ise PHA'lar kan ve dokularda yer alan enzimler tarafından parçalanmaktadırlar (Keshavarz and Roy, 2007; Ojumu, et al 2004).



Şekil 1.2. Aerobik arıtma çamurunda P(3HB-3HV) 'nin biyobozunumu. P(3HB-3HV) 'den yapılan şişeler yaz süresince (ortalama 20°C) aerobik arıtma çamurunda inkübe edilmişlerdir. Fotoğrafta görülen şişeler 0, 2, 4, 6, 8 ve 10 hafta sonunda çamurdan alınıp fotoğrafları çekilmiştir (Madison and Huisman, 1999'dan alınmıştır.).

PHA biyopolimerlerinin doğada parçalanmasında polimerin kompozisyonuna, fiziksel yapısına (amorf, kristal), boyutuna ve en önemli olarak da çevre koşullarına bağlıdır ve bu nedenlerden dolayı bir PHB filminin doğadaki bozunma hızı birkaç hafta (anaerobik çamur) ile birkaç yıl (denizsel ekosistemler) arasında değişebilmektedir (Madison and Huisman, 1999). Çizelge 1.3'de PHB polimerinden elde edilmiş filmlerin çeşitli ekosistemlerdeki biyobozunurluğu gösterilmiştir (Domb et al., 1998). Çizelgeden de görüldüğü gibi mikroorganizma bulunmadığı durumlarda film kalınlığında herhangi bir değişim gözlenmemektedir.

Çizelge 1.3. PHB biyofilminin çeşitli ortamlarda bozunması

Çevre	Film kalınlığındaki değişim (µm/ hafta)
Deniz suyu (22°C)	5
Aktif çamur (25°C)	7
Toprak (25°C)	5
Steril deniz suyu (25°C) (121°C de 15 dk. otoklavlanmış)	0

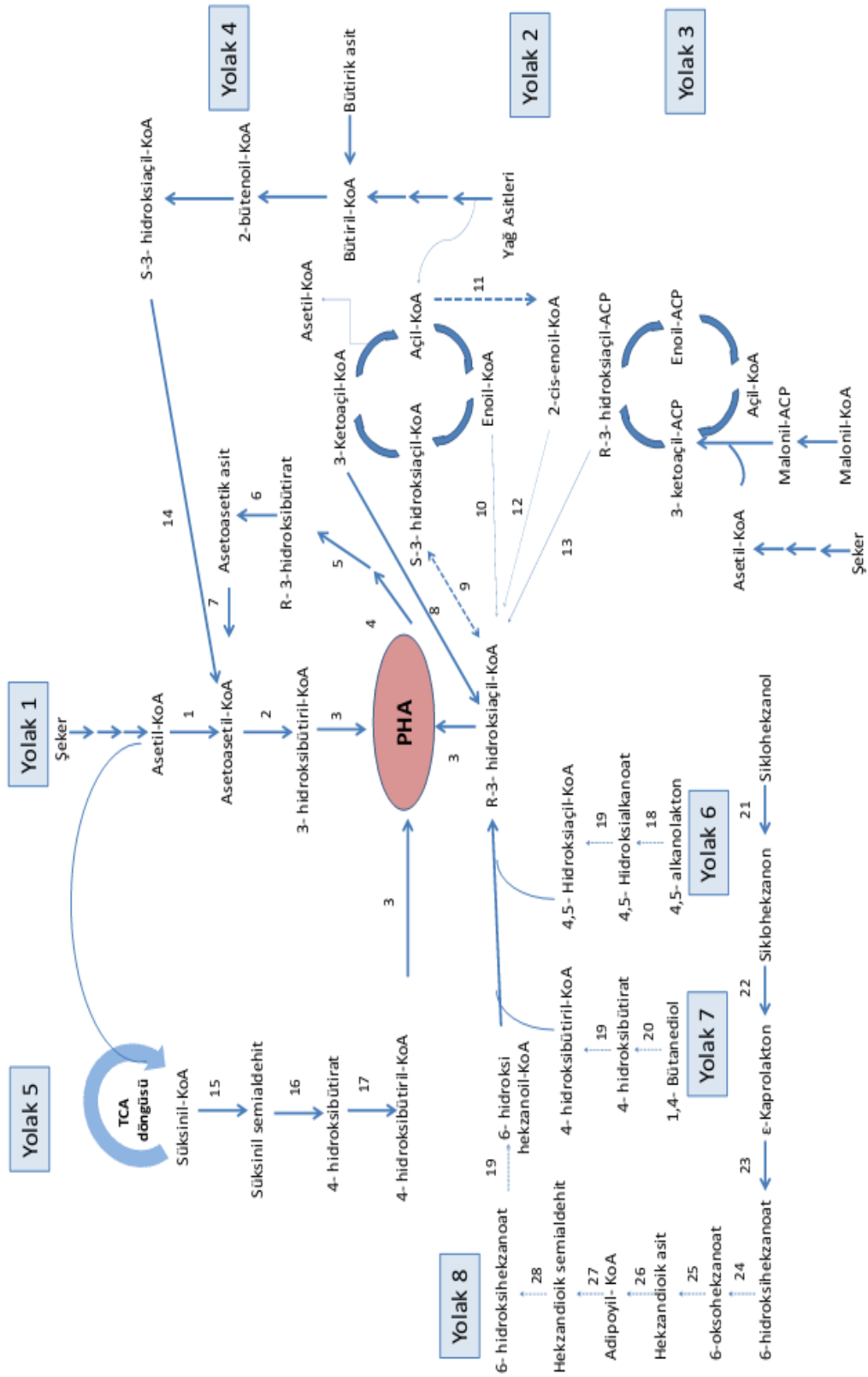
Biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerine ek olarak, PHA'lar ve bunların yıkımı sonucu ortaya çıkan ürünler toksik olmayan bir yapıdadır (Chen, 2010) ve PHA biyopolimerleri yenilenebilir kaynaklardan üretilebilmektedir (Madison and Huisman, 1999).

1.3 Polihidroksialkanoatların Biyosentezi

PHA biyopolimerleri 75'ten fazla genus ait 300'den fazla Gram (+) ve Gram (-) bakteri tarafından besinsel stresin –aşırı karbon ve düşük azot-bulunduğu durumlarda çok çeşitli karbon kaynaklarından sentezlenebilmektedir (Reddy et al., 2003 ; Domb et al., 1998; Keshavarz and Roy, 2010). Üretilen polimerin kompozisyonu bakteride bulunan PHA biyosentez yolağında görevli olan enzimlerin substrat spesifitelerine bağlı olarak değişmektedir (Domb et al., 1998).

Polihidroksialkanoatlar hem mikroorganizmaların biyosentezi ve bitkilerin fotosenteziyle biyolojik olarak hem de uygun enzimlerin kullanılmasıyla kimyasal olarak iki farklı yaklaşım ile sentezlenebilmektedir (Purwadi, 2006; Chen, 2010). Biyolojik yaklaşım ile daha yüksek molekül ağırlıklı PHA elde edilmesine karşın bu yaklaşım polimer kompozisyonundaki monomerlerin yüksek derecede kontrol edilmesine izin vermemektedir (Chen, 2010).

Birçok faktör hücredeki PHA üretimini etkilemektedir, dolayısıyla moleküler ağırlık ve polimerin büyüklüğü gibi son ürün özellikleri de etkilenmektedir. Üretim ortamının pH değeri ve karbon kaynağının konsantrasyonu üretilen biyopolimerin molekül ağırlığını doğrudan etkilemektedir. Polimer miktarı %80'e eriştiğinde, hücrelerin çoğalması yavaşlamaktadır, dolayısıyla bu gibi fiziksel kısıtlamalar da biyopolimerin hücre içerisinde birikimi için sınırlayıcı faktörlerden biri olabilmektedir (Purwadi, 2006).



Şekil 1.3. Mikrobiyal PHA üretim yollarları (Chen, 2010)

PHA biyosentezi oldukça iyi çalışılmış ve anlaşılmış bir konudur. Biyosentez yollarında çeşitli uzunluklardaki 3-hidroksialkanoil-CoA monomerlerinin sağlanmasında ana bileşen Asetil-CoA molekülüdür. Buna ek olarak monomerler farklı zincir uzunluklarına sahip yağ asitlerinin β oksidasyonu ile de elde edilebilmektedir (Şekil 1.3). Farklı canlılarda rol alan PHA biyosentezi sekiz yolakta özetlenebilir. Bu sekiz farklı yolak ve bu yolaklarda rol alan genler sırasıyla Şekil 1.3 ve Çizelge 1.4'te gösterilmiştir.

Birinci yolak sırasıyla *phaA*, *phaB* ve *phaC* genleri tarafından kodlanan beta-ketotiyolaz, NADPH- bağımlı asetoasil-CoA redüktaz ve PHA sentaz (polimeraz) olmak üzere üç ana enzimi içermektedir. *Alcaligenes latus* ve *Ralstonia eutropha* bu yolağı kullanarak PHA sentezini gerçekleştirmektedir (Chen, 2010).

İkinci PHA sentez yolağı (yolak II) mikroorganizma tarafından yağ asidi alımıyla ilişkilidir. Yağ asidinin beta oksidasyonundan sonra açıl-CoA PHA monomerinin sentezlenme sürecine girer. 3-ketoaçıl-CoA redüktaz, epimeraz, (R)-enoil-CoA hidrataz/enoil-CoA hidrataz I, açıl-CoA oksidaz (olası) ve enoil-CoA hidrataz I'i (olası) içeren enzimler biyopolimerin sentezlenmesi için PHA öncülleri olan 3-hidroksiaçıl-CoA'nın sağlanmasında görev almaktadırlar. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *A. hydrophila* orta yan zincirli (mcl) PHA ya da (R)-3-hidroksibütirat ve (R)-3-hidroksihegzanoat kopolimerini sentezlemek için yolak II'yi kullanmaktadırlar.

Yolak III, 3-hidroksiaçıl-ACP-CoA transferaz (PhaG) ve PHA monomeri 3-hidroksiaçıl-CoA'yı oluşturmak için 3-hidroksiaçıl-ACP sağlanmasına yardım eden malonil-CoA-ACP transaçılaz (FabD) enzimlerini içermektedir ve PHA sentaz enziminin etkisi altında PHA oluşumunu sağlamaktadır.

Yolak IV NADH bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz enzimini (S)-(+)-3-hidroksibütiril-CoA'yı okside etmek için kullanmaktadır. NADPH'nin NADP⁺ ya olan oranın yüksek olması *Rhizobium sp.* CC1192'de indirgeyicinin nitrojenaza iletimini hızlandırabilir. Bu ayrıca, poli[(R)-3-hidroksibütirat] (PHB) sentezi için asetoasetil-CoA'nın indirgenmesini de sağlamaktadır.

Yolak V 4-hidroksibütirat içeren PHA oluşturmak için süksiniksemialdehit dehidrogenaz (SucD), 4-hidroksibütirat dehidrogenaz (4hbD) ve 4 -

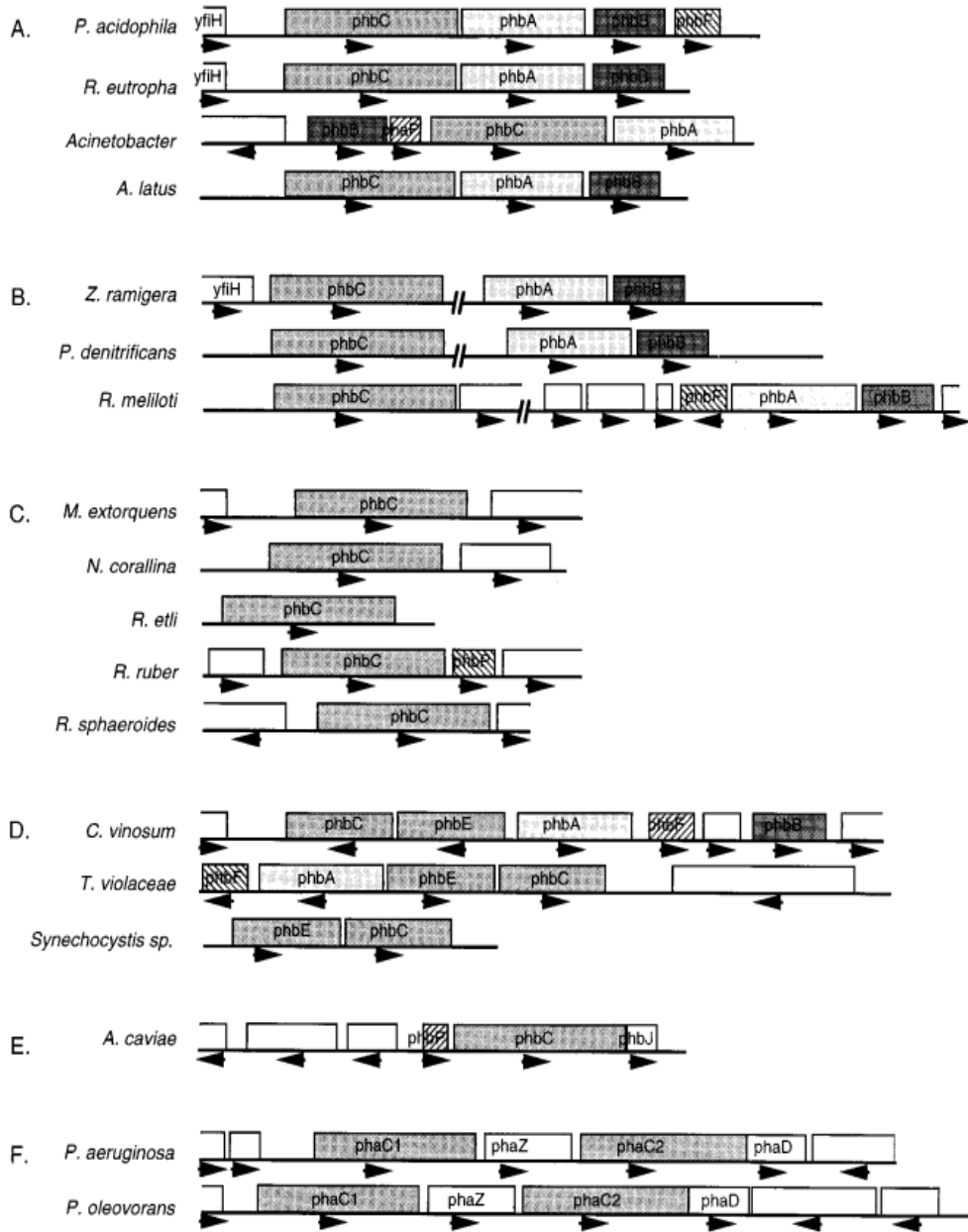
hidroksibütirat-CoA:CoAtransferaz (OrfZ) enzimlerini 4-hidroksibütiril-CoA sentezlemek için kullanmaktadır.

Yolak VI PHA sentezinde olası laktonaz ve hidroksiaçil-CoA sentaz enzimlerini 4,5 alkanolaktonu 4,5-hidroksiaçil-CoA ya dönüştürmek için kullanmaktadır. Yolak VII *A. hydrophila* 4AK4'da bulunan olası alkol dehidrogenaz üzerine kuruludur. Yolak VII de, 4-hidroksibütirat içeren PHA sentezi için 1,4-butanediol 4-hidroksibütirata ve ardından 4-hidroksibütiril-CoA'ya okside edilir. Yolak VIII sekiz enzimin çalıştığı bir reaksiyon zincirinde 6-hidroksihegzanoatı, 6-hidroksihegzanoat içeren PHA ya dönüştürür (Chen, 2010).

Çizelge 1.4. Mikrobiyal PHA üretim yollarında görev alan enzimler (Chen, 2010).

No	Yolak	Kısaltma	Enzim	Türler
1	Yolak I	<i>PhaA</i>	β -ketotiyolaz	<i>Ralstonia eutropha</i>
2		<i>PhaB</i>	NADPH- bağımlı asetoastil-CoA redüktaz	
3		<i>PhaC</i>	PHA sentaz	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4AK4
4	İlişkili	<i>PhaZ</i>	PHA depolimeraz	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317
5	Yol		Dimerhidrolaz	<i>R. eutropha</i>
6			(R)-3-Hidroksibütirat dehidrogenaz	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
7			Asetoastil-CoA sentaz	<i>Pseudomonas putida</i> KT2442, <i>A. hydrophila</i> 4AK4,
8	Yolak II	<i>FabG</i>	3-ketoaçil-CoA redüktaz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9			Epimeraz	
10		<i>PhaJ</i>	enoil-CoA hidrataz/enoil-CoA hidrataz I	
11			açıl-CoA oksidaz (olası)	<i>Pseudomonas mendocina</i> ,
12			enoil-CoA hidrataz I (olası)	<i>Recombinant Escherichia coli</i>
13	Yolak III	<i>PhaG</i> <i>FabD</i>	3-hidroksiaçil-ACP-CoA transferaz malonil-CoA-ACP transaçilaz	
14	Yolak IV		NADPH- bağımlı asetoastil-CoA redüktaz	<i>Rhizobium (Cicer) sp.</i> CC 1192 <i>Clostridium kluyveri</i>
15		<i>SucD</i>	Süksiniksemialdehit dehidrogenaz	
16	Yolak V	<i>4hbD</i>	4-hidroksibütirat dehidrogenaz	
17		<i>OrfZ</i>	4 –hidroksibütirat-CoA:CoA transferaz	Mutant ve rekombinant <i>Alcaligenes eutrophus</i>
18	Yolak VI		Laktonaz (olası)	<i>A. hydrophila</i> 4AK4
19			hidroksiaçil-CoA sentaz (olası)	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19
20	Yolak VII		Alkol dehidrogenaz (olası)	<i>Brevibacterium epidermidis</i> HCU
21	Yolak	<i>ChnA</i>	Siklohegzanol dehidrogenaz	
22	VIII	<i>ChnB</i>	Siklohegzanon monooksijenaz	
23		<i>ChnC</i>	Kaprolakton dehidrogenaz	
24		<i>ChnD</i>	6-Hidroksihegzanoat dehidrogenaz	
25		<i>ChnE</i>	6-Oksohegzanoat dehidrogenaz	
26			Semialdehit dehidrogenaz (olası)	
27			6-Hidroksihegzanoat dehidrogenaz (olası)	
28			hidroksiaçil-CoA sentaz (olası)	

PHA biyosentez yolağında rol alan enzimleri kodlayan genler oldukça çeşitlenmiş bir yapıdadır. Bu çeşitlenme PHA moleküllerinin çeşitlenmesinin de bir sebebidir. Yolakta yer alan genler farklı organizmalarda farklı dizilimler göstermektedir (Şekil 1.4)



Şekil 1.4. Pha ve phb operonları. PHA oluşumu için gerekli genleri kodlayan lokuslar 18 farklı türde karakterize edilmiştir. Ssc-PHA oluşumunda yer alan genler phb olarak, msc-PHA oluşumunda rol alan genler pha olarak adlandırılmıştır. (A) Tam *phbCAB* operonları. (B) Kesintili phb lokusları. (C) Tam olmayan phb lokusları. (D) İki alt birimli PHB polimeraz kodlayan organizmaların phb lokusları. (E) *A. caviae* de P(3HB-3HH) oluşumunda rol alan *phbCJ* lokusu. (F) *Pseudomonas sp.* demsc-PHA oluşumunda rol alan pha lokusları. (Madison and Huisman, 1999'dan alınmıştır.).

Alcaligenes latus ve *Ralstonia eutropha*'da PHB biyosentezinden sorumlu olan *phbCAB* genleri kromozom üzerinde art arda dizili halde bulunmaktadır ve bu genlerin yönlenişinin aynı olması gerekmemektedir. *Rhizobium meliloti* ve *Paracoccus denitrificans*'ta *phbAB* genleri yan yana bulunurken *phbC* geni bunlardan ayrı yer almaktadır. *Chromatium denitrificans*' ta PHA polimeraz enzimi *phbE* ve *phbC* olmak üzere iki alt birim tarafından sentezlenmektedir. Orta yan zincirli PHA sentezi gerçekleştiren *Pseudomonas oleoverans* ve *Pseudomonas aeruginosa* iki adet *phaC* geni ve bınların tam ortasında da *phaZ* genini içermektedir (Madison and Huisman, 1999)

1.4 Polihidroksialkaoatların Üretimi

Daha önceki kısımlarda belirtildiği gibi PHA'lar çeşitli stres koşullarında bakteri ve arkeaları da içerisine alan birçok prokaryotik mikroorganizma tarafından doğal olarak sentezlenmekte ve hücre içerisinde enerji ya da karbon rezervi olarak biriktirilmektedir (Choi, 1999; Chen, 2010).

PHA biyopolimerlerinin üretiminde genelde ana kaynak olarak mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Keshavarz and Roy, 2010), buna karşın son dönemlerde transgenik bitkilerde de bu biyopolimerlerin üretilebildiği çalışmalar mevcuttur (Tilbrook, 2011; Tsuda 2012).

Mikroorganizmalar ana üretici konumunda yer aldıkları için, mikrobiyal PHA üretiminin etkin bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için sadece mikroorganizma değil aynı zamanda kültür koşulları da oldukça önemlidir (Sudesh and Abe, 2010). PHA biyopolimerlerinin üretiminde karbon kaynağı olarak glukoz, nişasta, metan, mineral yağ, peynir altı suyu ve CO₂ gibi çok farklı kaynaklar kullanılabilir (Reddy et al., 2003). Çizelge 1.5'te PHA üretiminde kullanılan farklı karbon kaynakları gösterilmiştir.

Ticari ölçekte PHA üretiminin gerçekleştirilmesi için, mikroorganizmalar sıkı şekilde kontrol edilen koşullarda çok büyük biyoreaktörlerde kültüre edilmektedirler. Endüstriyel PHA üretimi; Fermentasyon, biyomasın besi yerinden ayrılması, biyomasın kurutulması, PHA'nın saflaştırılması, kurutulması ve paketlenmesi adımlarını içermektedir. Kesikli kültürlerde PHA üretiminde tek-basamak ve iki-basamak olmak üzere iki yaklaşım genelde kullanılmakla birlikte üç basamaklı yaklaşımlarda mevcuttur (Beccari et al. 2009), tek basamaklı kültürde biyomas ve PHA eş zamanlı olarak üretilmektedir. İki basamaklı da

ise mikroorganizma besin açısından zengin bir besi yerinde ayrı olarak üretilir ve ardından PHA üretimi için besin sınırlamasının olduğu besi yerine aktarılır. Kesikli üretime ek olarak kesikli beslemeli, pH-stat, kemostat yöntemlerde kullanılmakla birlikte ticari anlamda en verimli sistem toplam üretim maliyetlerini azaltan kesikli beslemeli sistemdir (Sudesh and Abe, 2010).

Çizelge 1.5. PHA üretiminde kullanılan farklı kaynaklar.

Kaynak	PHA çeşidi	Mikroorganizma	Referans
Soya yağı	P(3HB), P(3HB-co-5 mol%3HHx)	<i>Ralstonia eutropha</i> ve rekombinant suşları	Kahar, 2004
Bitkisel yağlar (hint yağı tohumu, Hindistan cevizi yağı, vb.)	mcl-PHA	<i>Comamonas testosteroni</i>	Thakor et al., 2005
Tarım endüstrisi atık suları	PHB	Aktif çamur	Khardenavis et al. 2007
Malt ve soya atığı	PHB	<i>Alcaligenes latus</i>	Yu et al., 1999
Malt, soya, susam, küspe, farmasötik artıklar	PHB	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Arun et al., 2006
Mısır ıslatma suyu	PHB	<i>Bacillus megaterium</i>	Chaijamrus and Udpuay, 2008
Mısır koçanı	PHB	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Gengadharan and Ramadas, 2011
Sagu, mollaz, glukoz	PHB	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Kumar and Prabakaran, 2006
Mollaz	PHB	Rekombinant <i>E. coli</i>	F. Liu et al., 1998
Zeytinyağı fabrikası atık suyu	PHB	Rekombinant <i>Pseudomonas putida</i> KT2442	Garcia-Ribera et al., 2001

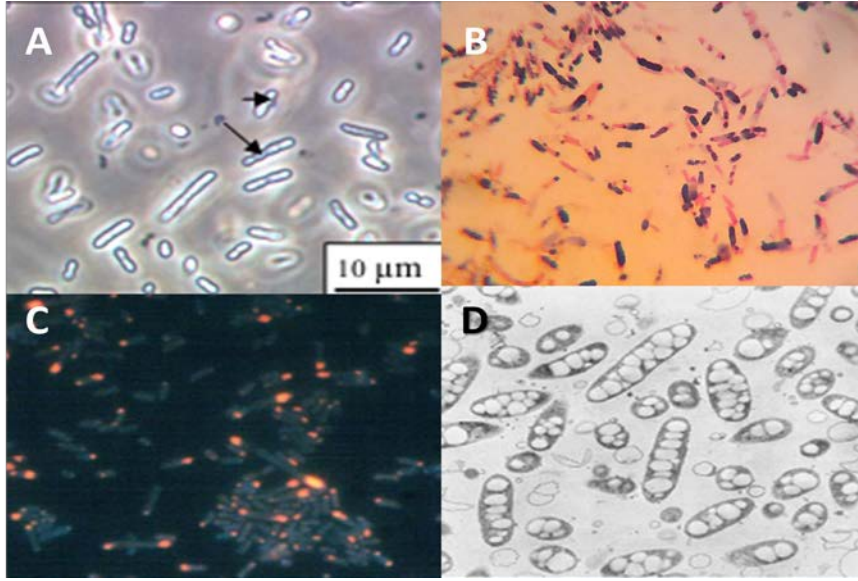
Birçok PHA polimeri tanımlanmış olmasına rağmen, bunlardan sadece dört tanesi endüstriyel ölçekte üretilmektedir; poly[(R)- 3-hydroxybutyrate] (PHB), poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyvalerate] (PHBV), poly[(R)-3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate] (P3HB4HB), ve poli[(R)-3-hydroxybutyrate-co-(R)-3-hydroxyhexanoate] (PHBHHx) (Choi, 2010). Oldukça geniş kullanım alanına sahip olan PHA'ların endüstriyel çapta üretilmesinin ve ticarileşmesinin önündeki en büyük engel yüksek üretim maliyetleridir (Choi; 2010). Bu tip engellerin aşılabilmesi için yeni fermentasyon stratejileri ve yenilenebilir kaynakların kullanımı yönünde araştırmalar gerçekleştirilmektedir.

Proses ekonomisinin bu denli yüksek olması ucuz ve yenilenebilir karbon kaynaklarının kullanımını gerekli kılmaktadır. PHA üretimi maliyetindeki ana pay kullanılan besi yerine aittir (Keshvarz and Roy, 2010), bu nedenle Çizelge 1.5'te de görüldüğü gibi yapılan çalışmalar daha ucuz karbon kaynaklarının bulunması üzerine yoğunlaşmıştır. Tarımsal artıkların ve yan ürünlerin PHA hammaddesi olarak kullanımı sayesinde toplam üretim maliyetlerinde %50'ye kadar bir iyileşme sağlanabilmiştir (Santimono et al., 2009).

1.4.1 Bakterilerde PHA üretimi

Daha önceden de belirtildiği gibi farklı ekosistemlerde yaşayan birçok Gram pozitif ve Gram negatif bakteri polihidroksialkanoatları doğal olarak sentezleyebilme yeteneğindedir (Bkz. Kısım 2). PHA üretiminde kullanılan bakteriler sentez için gerekli kültür koşullarına göre ikiye ayrılmaktadır. Birinci grupta yer alan bakteriler azot, fosfor, magnezyum ya da sülfür gibi temel besin maddelerinin sınırlandırılmasına ve fazla miktarda karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar. Bu grupta yer alan bakterilere *A. eutrophus*, *Protomonas oleovorans* ve *Protomonas extorquens* örnek olarak verilebilir. *Alcaligenes latus*, *Azetobacter vinelandi*'nin mutant suşlarını ve rekombinant *E. coli*'yi içeren ikinci grup bakteriler ise PHA sentezi için besin kısıtlamasına ihtiyaç duymazlar ve bu gruptaki bakteriler biyopolimer sentezini büyüme esnasında gerçekleştirerek sitoplazmada biriktirirler (Khanna and Srivastova, 2007).

Mikroorganizmalarda PHA birikiminin belirlenmesinde hem mikroskopik hem de analitik yöntemler kullanılmaktadır. Mikroskopik gözlemlerde PHA üreticisi mikroorganizmaları çeşitli boyalarla boyanması gerekmektedir. Işık mikroskobu ile yapılan gözlemlerde yaygın olarak Sudan Black B boyası kullanılırken, floresan mikroskopta inceleme için bir floresan boya olan Nile Blue kullanılmaktadır (Loo and Sudesh, 2007). Faz-kontrast mikroskopisi ile yapılan gözlemlerlerde ise hücrelerin boyanmasına gerek kalmadan PHA granülleri direkt olarak görüntülenebilmektedir (Sudesh and Abe, 2010). Yukarıda bahsedilen mikroskopik tekniklere ek olarak PHA granüllerinin daha detaylı yapısal görüntülenmeleri için elektron mikroskopları da kullanılmaktadır. Şekil 1.5'te PHA üreticisi mikroorganizmaların farklı mikroskopik görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 1.5 PHA üretimi gerçekleştiren mikroorganizmaların mikroskopik olarak görüntülenmesi. A; *C.necator*'da; PHB granüllerinin faz-kontrast mikroskopunda görüntülenmesi (Chee et al. 2010). B; Rekombinant *E. coli*'de PHB granüllerinin Sudan Black ile boyanması sonrası ışık mikroskopunda görüntülenmesi. C; Rekombinant *E. coli*'de PHB granüllerinin Nile blue A ile boyanması sonrası floresan mikroskopunda görüntülenmesi (Sato et al. 2007). D; *Pseudomonas resinovorans*'ta PHA granüllerinin TEM görüntüsü (Solaiman et al. 2003).

PHA üretiminin mikroskopik olarak belirlenmesinin yanında analitik yöntemlerde oldukça kullanışlıdır. Bu amaçla en yaygın kullanılan analitik yöntemler GC, MS, NMR, HPLC (de Rijk et al. 2005), FT-IR (Berekaa and Thawadi 2012), olmakla birlikte son dönemde PHA analizlerinin daha hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için termogravimetrik yöntemlerde (Talon and Berezina, 2011) geliştirilmektedir.

1.4.1.1 Doğal PHA üreticisi mikroorganizmalarda PHA üretimi

Endüstriyel PHA üretiminde yaygın şekilde kullanılan doğal PHA üreticisi organizmalar şu şekildedir.

a) *Ralstonia eutropha*; P(3HB-3HV) 'nin ticari üretiminde kullanılmaktadır. Bu mikroorganizma minimal ortamda 30°C'de glukoz dışındaki çeşitli karbon kaynaklarında üreyebilmektedir. Glukoz kullanmadığı için bu organizmanın glukoz kullanabilen mutantları seçilerek yukarıdaki kopolimerin endüstriyel ölçekli üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu organizma PHA'yı durağan faza kadar üretememektedir

hücreler durağan faza girdikten sonra PHA üretimi gerçekleşebilmektedir (Madison and Huisman, 1999; Domb et al., 1997) .

b)Methylobacterium türleri: Metanol ucuz bir karbon kaynağı olduğu için PHA üretiminde substrat olarak kullanımı gerçekleştirilmiştir. Metanol varlığında *Protomonas extorquens* kullanılarak kuru kütlenin %60 ına kadar PHB üretimi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca metanol ortamına valeratın eklenmesi ile P(3HB-3HV) kopolimeri de üretilmiştir (Madison and Huisman, 1999).

c)Pseudomonas türleri: *P. putida* monomer olarak 8 ile 10 arasında karbon içeren HA'ları kullanmaktadır. Bu nedenle Pseudomonas suşları yaygın olarak orta yan zincirli PHA üretimi için kullanılmaktadırlar (Madison and Huisman, 1999). Ayrıca *P. fluorescens* ucuz kaynaklardan PHB üretiminde kullanılmaktadır (Jiang et al. 2008).

d)Alcaligenes latus; PHB homopolimerini glukoz tek başına karbon kaynağı olarak kullanıldığında kuru ağırlığının %60'ına kadar üretebilmektedir. Bunun aksine *A. latus* 3-hidroksipropionik asit tek karbon kaynağı olarak kullanıldığında besiyerinde büyüyememektedir. 3-hidroksipropionik sakkaroz ile birlikte beslendiğinde P(3HB-co-3HP) kopolyesteri hücre içerisinde birirmektedir. Kopolimerin kompozisyonu karbon substratının fraksiyonuna bağlı olarak %0 ile %26 arasında değişmektedir. Ek olarak, P(3HB-co-3HP) kopolimeri 3-hidroksibütirik asit ve 3-hidroksipropionik asidin karışık karbon kaynağı olarak kullanıldığında *A. latus* içeriğinde %0 ile 88 arasında 3HV bulunan kopolimeri üretmiştir (Domb et al., 1997).

e)Diğer mikroorganizmalar; Birçok farklı ekolojik ortamdan PHA üreticisi mikroorganizma başarılı bir şekilde izole edilmiştir. Bu ortamlardan birisi de aktif çamurdur. Aktif çamurdan izole edilen *Sphaerotilus*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter*, *Actinobacillus* ve *Azotobacter* cinsine ait doğal izolatların organik atıkları PHA biyopolimerine dönüştürebilme yetenekleri vardır (Madison and Huisman, 1999).

1.4.1.2 Rekombinant mikroorganizmalarda PHA üretimi

Endüstriyel ölçekte mikrobiyal PHA üretiminde diğer bir yaklaşım rekombinant mikroorganizmaların kullanılmasıdır. Doğal PHA üreticisi bakterilerin uzun jenerasyon zamanına, düşük optimum büyüme sıcaklığına, PHA degradasyon yollarına sahip olmaları ve parçalanmalarının zor olması rekombinant mikroorganizmaları avantajlı hale getirmektedir (Reddy et al., 2003).

Rekombinant mikroorganizmalarda PHA üretiminde yaygın olarak *E.coli* gibi bakteriler kullanılmaktadır. Çünkü bu bakteriler PHA degradasyonunda rol alan PHA depolimeraz enzimine sahip değildirler, ayrıca yüksek sıcaklıklarda hızlı şekilde büyüyüp fazla miktarda polimer biriktirebilirler. Hücre duvarlarının kolayca parçalanması ve glukoz, sakkaroz, laktoz gibi ucuz karbon kaynaklarını kullanabilmeleri toplam üretim maliyetlerinin düşürülmesi açısından önemlidir (Reddy et al., 2003).

PHA üretiminde kullanılmak üzere rekombinant bakteri oluşturulmasında temel olarak üç yaklaşım kullanılmaktadır; i) PHA üreticisi mikroorganizmalara ucuz substratları metabolize etmesini sağlayacak genlerin aktarılması (Reddy et al., 2003). ii) Doğal PHA üreticisi mikroorganizmalarda bulunan depolimeraz mekanizmasının uzaklaştırılması (Cai et al. 2009). iii) PHA biyosentez genlerinin PHA üretemeyen ve ucuz substratları kullanabilen mikroorganizmalara aktarılması (Genser et al. 1998; Nikel et al. 2006; Sato et al. 2007). Bu yöntemlerden en çok kullanılanı ve umut vaat edeni üçüncü yaklaşımdır. Bu yaklaşım kullanılarak Lu ve arkadaşları *Aeromonas hydrophila* PHA biyosentez operonunu *E. coli*'ye aktararak kuru hücre ağırlığının %60'ına kadar PHA üretimi gerçekleştirmişlerdir (Lu et al., 2004). Ayrıca Choi ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmalarında *A. latus* DSM1123 PHA biyosentez yolağını *E. coli*'ye klonlamış ve kuru hücre ağırlığının %73'üne kadar PHB üretimi yapmayı başarmışlardır (Choi et al. 1998). Mahishi ve ekibi gliserolün tek başına karbon kaynağı olarak kullandıkları çalışmalarında *Streptomyces aureofaciens* PHB biyosentez genleri aktarılmış *E.coli*'de hücre kuru ağırlığının %60'ına kadar üretim yapmışlardır (Mahishi et al. 2003).

1.4.2 Ökaryotik organizmalarda PHA üretimi

PHB üretim maliyetlerini düşürebilmek için mikroorganizmalar dışında da çeşitli organizmaların PHB üretim konakçısı olarak kullanımları gündeme gelmiştir. Özellikle ay çiçeği gibi yağ içeriği yüksek bitkiler bu polimerleri yüksek miktarlarda üretebilmeleri için yetiştirilmişlerdir. Bu bitkiler dışında maya, böcek hücreleri ve farklı bitkilerin de PHA üretiminde kullanılabilmeleri için araştırmalar sürmektedir (Madison and Huisman, 1999).

Rekombinant *E. coli*'nin aksine *Saccharomyces cerevisiae*'de PHB üretebilmek için tüm PHB biyosentez operonuna ihtiyaç yoktur. Sadece PHB polimeraz geninin aktarılması PHB üretimi için yeterlidir. Ancak Maya ile

gerçekleştirilen üretim sonucunda bakterilere göre çok düşük miktarlarda üretim yapılabilmektedir (Leaf, 1996). *S. cerevisiae* dışında farklı maya türlerinde de PHA üretimine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Haleem ve arkadaşları *Ralstonia eutropha* PHA biyosentez yolağını *S. cerevisiae* ve *Kloeckera spp.*'ye aktarılmış ve bu iki tür için PHA üretiminin kuru kütleyle oranı sırasıyla %2,68 ve %7,08 olarak elde edilmiştir (Haleem et al., 2007). Abuelhamd ve arkadaşları ise *Schizosaccharomyces pombe*'ye *Ralstonia eutropha* PHA biyosentez genleri aktarmış ve %9'a kadar PHB üretimi başarmıştır (Abuelhamd et al., 2007). Bunların dışında bir başka çalışmada ise Poirier ve ekibi tarafından *P. aeruginosa* PHA sentaz geni *Pichia pastoris*'e transfer edilmiş ve PHA granülleri organizmanın peroksizomunda birikmiş ve kuru hücre ağırlığının yaklaşık %1'ine kadar ulaşmıştır (Poirier et al., 2002).

Böcek hücrelerinde PHB üretimi ilk olarak lahanaya zararlısına *R. eutropha* PHB sentaz geninin baculovirüs ile aktarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Viral enfeksiyondan yaklaşık 60 saat sonra böcekten izole edilen total proteinin yaklaşık %50'lik kısmı PHB'den oluşmaktadır. Bunun dışında tırtıllara hem yağ asidi sentaz hem de PHB polimeraz genlerinin birlikte aktarılmasıyla PHB üretimi gerçekleştirilmiştir. Ancak tırtıl hücrelerinden izole edilen PHB miktarı kuru hücre ağırlığının yaklaşık %0,16'sını oluşturmaktadır ve bu durumda ticari üretim için istenen bir özellik değildir. Bu nedenle PHA üretiminde böcek hücrelerinin kullanımı pek uygulama alanı bulamamıştır (Williams, 1996).

Son dönemlerde araştırmalar bitkilerde PHA üretimi üzerine yoğunlaşmaktadır. Bitkilerde üretilen PHA'lar bakteriyel PHA'lar ile karşılaştırıldığında termal özellikler açısından oldukça benzerdirler. Ancak bitkilerde üretilen PHA'lar bakteri kaynaklı PHA'lara göre daha düşük kalitededir (Molekül büyüklüğü 1000000) ve bu da bitkilerin endüstriyel çapta PHA üretimi için kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bakterilerin aksine ökaryotlar oldukça yüksek derecede kompartmanlaşma gösterdikleri için PHA üretimi için gerekli genlerin Asetil-CoA'nın bol bulunduğu bitki hücrelerine aktarılması gerekmektedir. Bitkiler ile ilk PHB üretimi bitkilerde rekombinant gen ifadesi için en sık kullanılan model organizma *Arabidopsis thaliana*'da gerçekleştirilmiştir. Bu bitkide PHA yolağındaki genlerden tiyolaz (*phbA*) yer aldığı için sadece *phbB* ve *phbC* genleri aktarılmış ve bitki hücrelerinde sitoplazma, vakuol ve nükleusta PHB oluşumu gözlenmiştir. Ancak Asetil-CoA'nın PHB üretimi için kullanılması sebebiyle bitkinin büyümesinde sorunlar yaşanmıştır. Bu sorunlara çözüm olabilmesi açısından daha sonra *A. thaliana* plastidlerine PHB yolağındaki üç gen

birlikte aktarılmış ve yapraklarda kuru ağırlığın %14 ü kadar PHB üretimi sağlanmıştır (Madison and Huisman, 1999).

A. Thaliana ile gerçekleştirilen diğer bir denemede Bohmert ve arkadaşları çoklu-gen ekspresyon kaseti kullanarak kuru ağırlığın %40'ına kadar üretim başarmışlardır (Bohmert et al., 2000).

Arabidopsis dışında başka bitkilerde de PHA üretim çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Menzel ve arkadaşları şeker kamışının saçaklı köklerine *Ralstonia eutropha* PHB biyosentez genlerini aktararak PHB üretimi gerçekleştirmişlerdir (Menzel, 2003). Transgenik patates kullanılarak yapılan PHA üretim denemelerinde ise PHA polimeraz ve açıl-CoA-transaçilaz genleri patatesin plastidine aktarılmış ve orta yan zincir uzunluğuna sahip PHA polimerlerinin üretimi yapılmıştır (Romano et al., 2005). Son olarak bitkilerde mısırdan PHA üretim çalışmaları yapılmış, PHA üretimi gerçekleştirilmiş ancak genlerin stabilitesi sağlanamadığından PHA üretebilme yeteneği zamanla bitkilerde kaybolmuştur (Hahn et al., 1997).

Son dönemlerde PHA üretimi için mikroalglerin kullanımı gündeme gelmiştir. *R. eutropha* H16 suşundan elde edilen PHB yolağı bir diatom olan *Phaeodactylum tricornutum*' a aktarılmış ve kuru ağırlığın yaklaşık %10'u kadar PHB üretimi gerçekleştirilebilmiştir (Hempel et al., 2011).

1.5 Polihidroksialkanoatların saflaştırılması

PHA'nın saflaştırılması üretim maliyetini arttıran diğer önemli bir etkidir. Birçok izolasyon yöntemi olmasına rağmen hem ekonomik hem de güvenli bir saflaştırma süreci henüz geliştirilememiştir (Keshavarz and Roy, 2010).

Polihidroksialkanoatlar hücre içerisinde biriktirilen bir molekül olduğu için bu biyopolimerlerin saflaştırılmasında genel olarak iki yaklaşım kullanılmaktadır; i) PHA moleküllerinin çözünmesi (çözgen ile saflaştırma), ii) PHA dışındaki hücresel materyallerin çözündürülmesi (Hücrenin parçalanması ile saflaştırma) (Sudesh and Abe, 2010).

Çözgen ile ekstraksiyon PHA'nın hücre biyomasından kazanılması için en yaygın şekilde uygulanan yöntemdir. Bu yöntem basit ve hızlı olması nedeniyle laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem iki ana adımdan

oluşmaktadır, birincisi hücre membranının geçirgenliğinin modifikasyonu böylece PHA'nın salımı ve çözünürlüğüne izin verilmiş olur, daha sonrasında bu adımı PHA'ları çözmeyen bir madde ile çöktürme takip eder. Klorlu hidrokarbonlar (örn; kloroform, 1,2 dikloroetan) ya da etilen karbonat ve 1,2-propilen karbonat gibi bazı siklik karbonatlar gibi çözümler ile PHA ekstraksiyonu oldukça yaygındır. Aseton gibi düşük zincirli keton mcl-PHA'ların ekstraksiyonu için kullanılan en önde gelen çözümlerdir. PHA presipitasyonu genel olarak metanol ya da etanol gibi PHA'ları çözmeyen çözümler ile gerçekleştirilir (Ramsay et al., 1994; Kunasundari and Sudesh'ten 2011).

Çözgen ile ekstraksiyonun etkinlik bakımından diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre şüphesiz birçok avantajı vardır. Bu yöntem ayrıca bakteriyel endotoksinleri uzaklaştırabilmekte ve polimerde önemsiz kırılmalara sebep olabilmektedir. Böylece oldukça saf ve yüksek moleküler ağırlıklı PHA elde etmek mümkündür. Ne yazık ki çözgen ekstraksiyonunun büyük ölçekte uygulaması genelde bu yöntemin çevre dostu olmadığı düşünülmektedir. Ayrıca yüksek maliyet gibi bazı faktörler çözgen ekstraksiyonunun kullanımını sınırlandırmaktadır (Kunasundari and Sudesh, 2011).

Çözgen ile ekstraksiyon yöntemleri PHA granüllerinin çözünmesine dayanırken, parçalama yöntemleri PHA granüllerini çevreleyen hücresel bileşenlerin çözündürülmesini içermektedir. Parçalama yöntemleri çözgen ile ekstraksiyona alternatif olarak geliştirilmiştir ve kimyasal ya da enzimatik olarak sınıflandırılabilirler. Özellikleri bilinen birçok kimyasal mevcut olduğu için kimyasal parçalama enzimatik parçalamaya göre daha etkin şekilde kullanılmaktadır (Kunasundari and Sudesh 2011).

PHA haricindeki hücresel biyomasın çözündürülmesi için SDS, Triton-X100, Tween 20, NaOH, KOH, HCl ve CTAB kullanılmış bunlar içerisinde en iyi sonucu NaOH vermiştir (Choi and Lee, 1998). Mohammadi ve arkadaşları çevreye daha duyarlı olmak amacıyla rekombinant *Cupravidus necator*'dan PHA izolasyonu için su ile alkol kullanmışlar ve %96 verimde PHA elde edilmiştir (Mohammadi et al., 2012). Yukarıdaki kimyasallar dışında alkilbenzen sülfonat, sodyumalfaoleidin sülfonat gibi bazı deterjanlarda saflaştırma amacıyla kullanılmıştır (Yang et al., 2011). Hücrelerin parçalanmasında kimyasalların kullanılmasının yanı sıra bu amaçla sonikasyon gibi farklı yaklaşımlarda kullanılmaktadır (Strazzullo et al., 2008).

PHA izolasyonu için şimdiye kadar kullanılmış olan izolasyon yöntemleri ve bu yöntemlerin avantajları ile dezavantajları Çizelge 1.6' da özetlenmiştir.

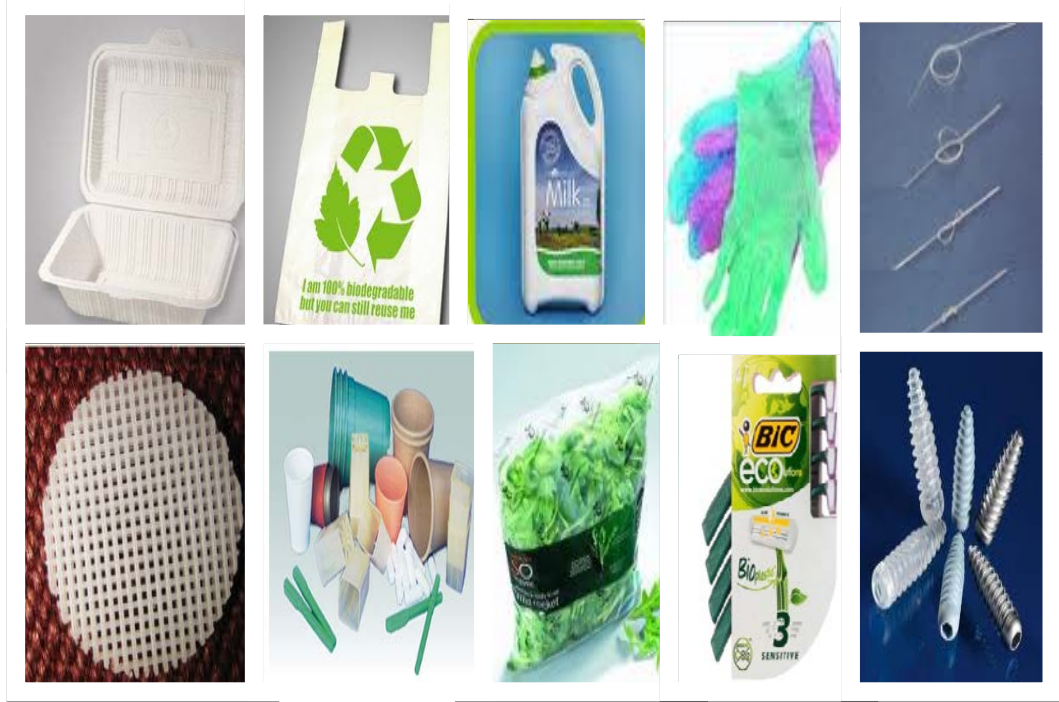
Çizelge 1.6. PHA saflaştırması amacıyla kullanılan yöntemler ve bunların avantaj ile dezavantajları.

İzolasyon yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Solvent ekstraksiyonu	Endotoksinler uzaklaştırılır Medikal uygulamalar için kullanışlıdır Yüksek saflık Polimer degradasyonu azdır Yüksek moleküler ağırlık	Doğa dostu değildir Fazla miktarda toksik ve uçucu çözügen kullanımı Yüksek maliyet Uzun süreç
Sürfektanlar ile kimyasal parçalama	Moleküler ağırlık korunur PHA granülündeki orijinal sıra korunur	Düşük saflık Sürfektanların uzaklaştırılması için fazla su tüketimi
Sodyum hipoklorit	Yüksek saflık	Moleküler büyüklükte azalma
Sürfektan ve hipoklorit	Yüksek kalite Hızlı ve basit proses Düşük maliyet	Hem süfektan hem de hipoklorit maliyeti Artık süfektan ve hipoklorit giderimi için aşırı su tüketimi
Sodyum hipoklorit ve solvent ekstraksiyonu	Yüksek saflık	Doğa dostu değildir Yüksek miktarda toksik ve uçucu çözügen kullanımı Yüksek maliyet
Sürfektan-şelat	Pratik uygulama Yüksek verim	Yüksek atık su
PHA dışındaki hücresel materyalin protonlar ile çözündürülmesi	Düşük maliyet Yüksek verim	Eğer parametreler sıkı şekilde kontrol edilmezse moleküler büyüklükte azalma
Enzimatik parçalama	İlımlı uygulama şartları İyi kalitede ürün	Kompleks proses Yüksek maliyet
Boncuk ile parçalama	Kimyasal kullanılmaz Düşük kontaminasyon PHA boyutu küçülmez	Uzun zaman Birçok parametrenin kontrol edilmesi gereklidir
Yüksek basınçla homojenizasyon	Kimyasal kullanılmaz Düşük kontaminasyon	Proses ve mikroorganizmaya bağımlıdır Termal degradasyon
Süperkritik akışkanlar (SCF)	Basit, Ucuz, Hızlı Çevre dostu	Proses parametrelerine bağımlıdır
Hücre kırılabilirliği	Basit saflaştırma yöntemi İlımlı saflaştırma koşulları	Hücre duvarı bütünlüğünün dengelenmesi gereklidir
Self-flotasyon	Düşük maliyet	Yüksek miktarda toksik ve uçucu çözügen kullanımı
Çözünmüş oksijen ile flotasyon	Kimyasal kullanılmaz Düşük kontaminasyon	Birçok flotasyon basamağı gereklidir
Sıvı iki fazlı sistem	Kısa proses zamanı Düşük maliyet Yüksek verim	Proses parametrelerine bağımlıdır Mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır
Gama ışıması	Kimyasal kullanılmaz Düşük kontaminasyon	İşılama zamanının uzunluğu Yüksek yatırım maliyetleri

1.6 Polihidroksialkanoatların uygulama alanları

Petrol bazlı plastiklere benzer özelliklere sahip olması ve geliştirilen yeni proses stratejileri ile yeni ve istenen özelliklere sahip PHA polimerlerinin elde edilmesi ile PHA'ların uygulama ve kullanım alanları genişlemektedir (Şekil 1.6).

PHA'lar yaygın olarak paketlenme malzemesi olarak alışveriş poşetleri, konteyner ve kağıt kaplaması; jilet, kadın hijyen ürünleri, kozmetik kapları, mutfak gereçleri gibi tek kullanımlık ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır (Chen, 2010).



Şekil 1.6. PHA biyopolimeri kullanılarak üretilen ürünler.

Paketleme dışında PHA'ların en yaygın kullanıldığı diğer bir alan ise tıp ve eczacılıktır. Tıp ve eczacılıkta sadece PHB ve P(3HB-co- 3HV) ticari olarak kullanım alanı bulabilmiştir. PHA'ların en yaygın tıbbi kullanımları kardiyovasküler ürünlerin üretimindedir. PHB kullanılarak üretilen parçalar kalp ameliyatlarından sonra perikardiyumun kapatılması amacıyla kullanılmaktadır. Bunun dışında PHB kardiyovasküler dokularda atardamar büyütme de rejenerasyon malzemesi olarak, atriyal septal hasarların onarımında, kardiyovasküler stent üretiminde, damar naklinde, kalp kapakçığı üretiminde kullanılmaktadır. Diş hekimliği alanında doku rejenerasyonunda kullanıldığı belirtilmektedir. Ayrıca PHA'lar, ilaç salınımında, implant ve tablet üretiminde, mikropartikül taşınımında, sinir onarımında, ilaç öncülü olarak, hayvan ve insan

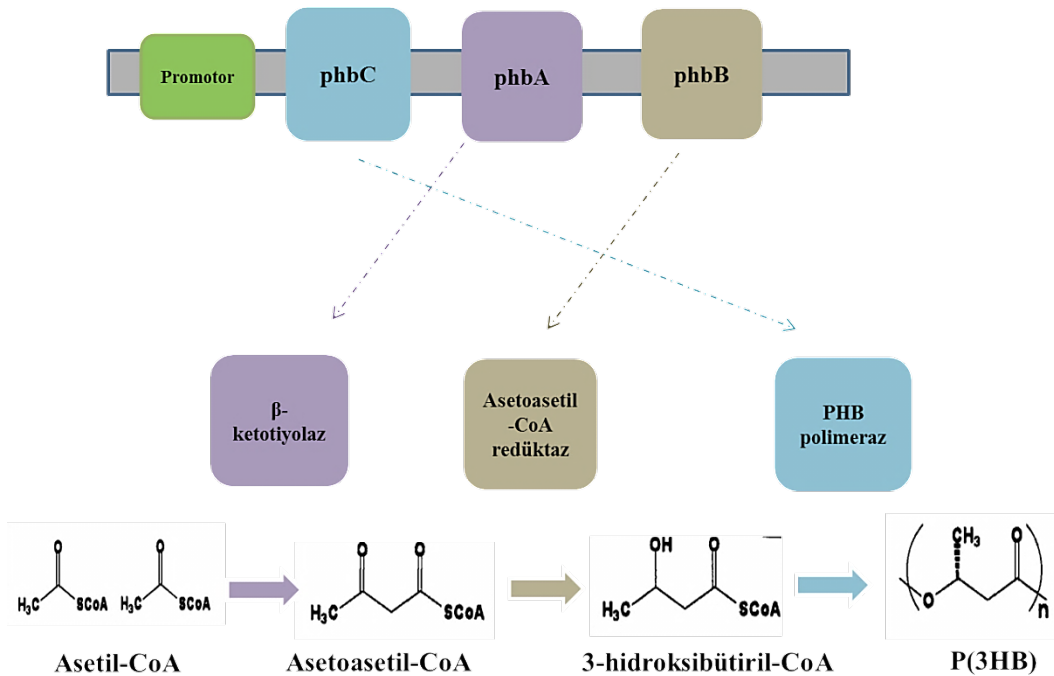
besinlerinin katkısı olarak kullanılmaktadır. Bunların dışında PHA'lar medikal sektörde ortopedi alanında lokal kemik oluşumunun uyarılması için, ürolojide üreter onarımında, yaraların korunmasında dikiş ipliği, eldivenlerin tozlanmasında, yaraların sargısında ve yumuşak doku onarımında kullanılabilmektedir (Williams et al., 1996).

Bunların dışında PHA'lar biyoyakıt olarak ve çeşitli ilaçların ve kimyasalların sentezi için hammadde olarak kullanılabilmektedir (Chen, 2010).

1.7 Polihidroksibütirik Asit (PHB)

Polihidroksibütirik asit (PHB), PHA biyopolimerleri arasında en çok çalışılan ve dolayısıyla ticari olarak ilgi çekenidir (Madison and Huisman, 1999). Poli (3 hidroksibütirat) PHA ailesi içerisinde ilk tanımlanan ve mikroorganizmalar arasında en yaygın olan biyopolimerdir (Keshavarz and Roy, 2010).

PHB üretimi şimdiye kadar en çok *R. eutropha*, *A. latus* ve rekombinant *E.coli*'de çalışılmıştır (Kahar et al., 2004; Azhar et al., 2009; Solaiman et al., 2010). Bu organizmalarda PHB üretim yolağı β -ketotiyolaz, Asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB polimeraz olmak üzere üç enzimden oluşmaktadır (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Bakterilerde PHB biosentezinin şematik gösterimi.

Üç adımlı PHB biyosentez yolağı

B-Ketoail-CoA tiyolaz (Asetil-CoA: Asetil-CoA- asetil transferaz EC 2.3.1.9); Bu enzim PHB oluşumunun ilk adımı katalizler. phbA nın enzimatik mekanizması iki Asetil-CoA molekülünün Asetoasetil-CoA kondensasyonu ile sonuçlanan iki yarı reaksiyon içermektedir. Birinci yarı reaksiyonda; aktif bölgedeki bir sistein Asetil-S-CoA molekülüne Asetil-S-enzim ara ürününü oluşturmak için saldırır. İkinci yarı reaksiyonda ikinci bir sistein diğeri bir Asetil-CoA yı protonlarından arındırır ve asetil-S-enzim ara kompleksine saldırabilecek aktive edilmiş bir Asetil-CoA ile sonuçlanır ve ardından Asetoasetil-CoA oluşur.

Asetoasetil-CoA redüktaz; Asetoasetil-CoA redüktaz bir (R)-3-hidroksiaçil-CoA dehidrogenazdır (EC 1.1.1.36) ve P(3HB) biyosentezik yolağının 2. adımında Asetoasetil-CoA'nın 3-hidroksibütiril-CoA'ya dönüşümünü katalizlemektedir. PHB biyosentez yolağında tiyolaz ve redüktaz enzimleri PHA polimerizasyonu için gereken monomeri sağlamaktadır.

P(3HB) polimeraz; P(3HB) polimeraz PHB üretim yolağında ki son enzimdir. PHB polimeraz bir önceki reaksiyonda oluşturulmuş olan 3-hidroksibütirik asit monomerlerinin polimerizasyonunu sağlamaktadır (Madison and Huisman, 1999).

P(3HB) moleküler ağırlık, kırılgenlik, sertlik, erime noktası ve camlaşma sıcaklığı açısından PHB homopolimeri polipropilen gibi yaygın olan petrokimyasal türevli termoplastiklerin bazıları ile yarışabilmektedir (Çizelge 1.2). Bu sebeple bazı uygulamalarda, PHB geleneksel ve biyolojik olarak bozunmayan polimerlerin yerini direkt olarak alabilir. Öncelikli olarak polimer karışımları olmak üzere PHB'nin daha geniş kullanımı arzu edilmektedir. Bazı karışımlar mevcut fiziksel özellikleri genişleterek olası uygulamaların spektrumunu oldukça arttırmaktadır. Diğeri biyouyumlu ve nontoksik polimerler ile kombine edildiğinde, PHB biyomedikal uygulamalarda artan bir alana sahip olacaktır. Çünkü PHB suya ve UV radyasyona karşı dirençlidir ve oksijene karşı geçirimsizdir, özellikle besinlerin paketlenmesinde kullanımı uygundur. PHB toprakta hızlıca parçalanır (Çizelge 1.3). Dahası; polietilen ve polipropilen bileşenlerin yapımında kullanılan aynı teknoloji ile işlenebilmektedir. Ticari PHB'nin yüksek fiyatı, sentetik plastiklerden 15 kat daha pahalı, sadece özel amaçlı olarak kullanılmasına yol açmaktadır. PHB'nin daha geniş kullanımı daha ucuz

ürün, geliştirilmiş fermentasyon modelleri, düşük maliyetli ortam ve daha kolay saflaştırma yöntemlerine ihtiyaç vardır. (Grothe et al., 1999).

Bu tez çalışmasında PHB biyopolimerinin endüstriyel üretiminde yaygın bir şekilde kullanılan *Alcaligenes latus* DSM1124 ırkına ait PHB biyosentez operonunun *E. coli*'ye aktarılması ve yüksek miktarda PHB birikimi vasıtasıyla toplam üretim maliyetlerinin düşürülmesi amaçlanmaktadır.

2 MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan organizmalar ve plazmit DNA'lar

2.1.1.1 Çalışma organizması: *Alcaligenes latus*

Çalışmada endüstriyel ölçekte PHB üreticisi olarak kullanılan ve Gram negatif bir bakteri olan *Alcaligenes latus* DSM 1124 (ATCC 29713; Palleroni and Palleroni, 1978) PHB biyosentez genlerinin (*phbCAB*) elde edilmesi için kullanılmıştır. Organizma Dr. Helmut Schwab'dan (Institut für Biotechnologie, Technische Universität Graz, Petersgasse 12, A – 8010 Graz, Austria (schwab@biote.tu-graz.ac.at)) temin edilerek kullanılmıştır.

2.1.1.2 PHB üretiminde kullanılan *Escherichia coli* ırkları

Çalışmada rekombinant PHB üreticisi oluşturmak amacıyla kullanılan TCS062 dışındaki tüm *E. coli* ırkları Dr. Muhittin Arslanyolu'dan (Anadolu Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye (marslanyolu@anadolu.edu.tr)), TCS062 ırkı ise Dr. Friedrich Sreenc'ten (Department of Chemical Engineering and Material Science, Institute of Technology, Minneapolis, USA) temin edilerek kullanılmıştır. Kullanılan tüm *E. coli* ırklarının listesi ve genotipleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. PHB üretimi için kullanılan *E. coli* suşları ve genotipleri.

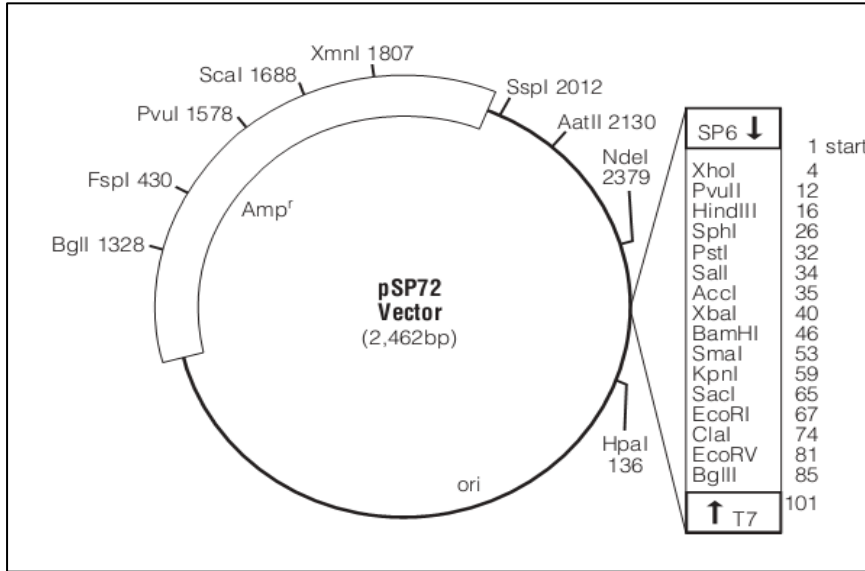
Organizma	Genotip
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	<i>endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB+ lacIq Δ(lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)</i>
<i>E. coli</i> JM-105	<i>endA1 glnV44 sbcB15 rpsL thi-1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR4(rK-mK+)</i>
<i>E. coli</i> DH5- α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ-</i>
<i>E. coli</i> Rosetta	<i>F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm pRARE2 (CamR)</i>
<i>E. coli</i> Rosetta DE3	<i>F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm (DE3) pRARE2 (CamR)</i>
<i>E. coli</i> Rosetta DE3 plyss	<i>F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CamR)</i>
<i>E. coli</i> BL21 DE3 plyss	<i>F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3) pLysS(cmR)</i>
<i>E. coli</i> Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>
<i>E. coli</i> SURE	<i>endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10]</i>
<i>E. coli</i> TCS062	<i>Δzwf ΔfrdA ΔldhA ΔsfcA ΔmaeB Δndh ::kan^r</i>

2.1.1.3 Çalışmada kullanılan plazmit DNA'lar

Operonun klonlanması ve PHB üretimi için üç farklı plazmit DNA kullanılmıştır. Kullanılan plazmit DNA'lardan pSP72 (Promega) ticari olarak satın alınarak, pQE-40 ve pUC19 plazmit DNA'ları ise Dr. Muhittin Arslanyolu'dan temin edilerek çalışmada kullanılmıştır.

pSP72 vektörü

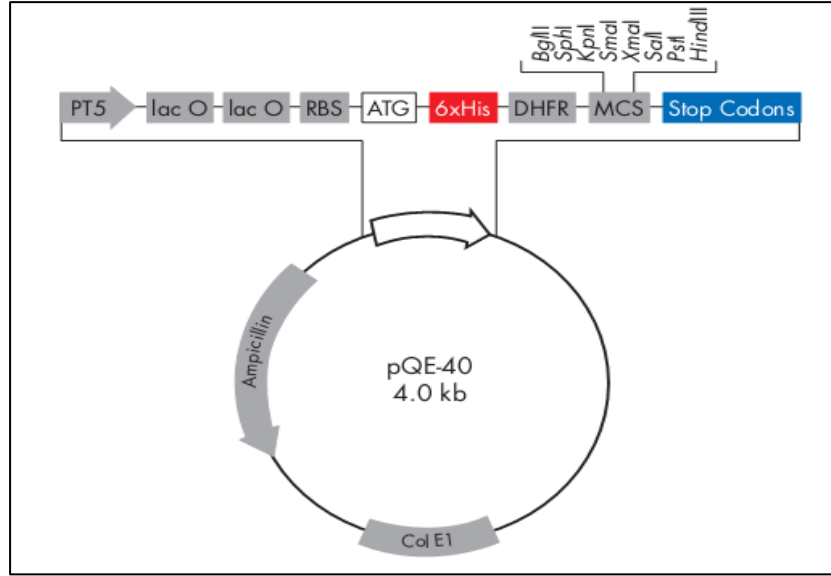
pSP72 vektörü hem standart klonlama vektörü olarak hem de RNA'nın in vitro transkripsiyonu amacıyla kullanılabilir. Vektör aralarında çoklu klonlama bölgesi bulunan SP6 ve T7 RNA polimeraz promotorlarını içermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. pSP72 vektörünün halkasal haritası

pQE-40 vektörü

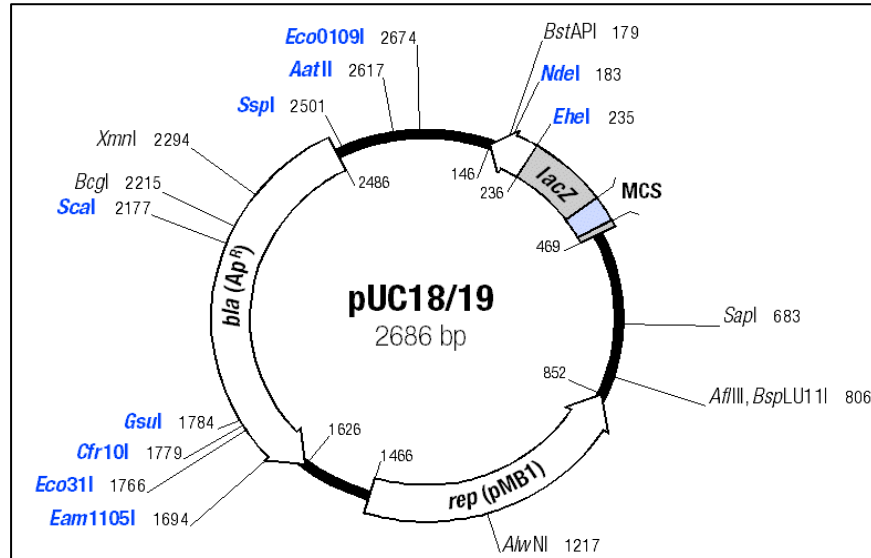
pQE-40 vektörü *E. coli*'de yüksek miktarda protein ifadesi için oluşturulmuş bir vektördür. Vektör yapısında yüksek transkripsiyon için sentetik bir ribozom bağlanma bölgesi yer almaktadır. Ayrıca vektör üretilen rekombinant proteinlerin saflaştırılması amacıyla N terminalde altı adet histidin artığına, birçok restriksiyon enziminin tanıma dizilerinin yer aldığı çoklu klonlama bölgesine ve amfisilin direnç bölgesine sahiptir.



Şekil 2.2. pQE40 vektörünün halkasal haritası

pUC 19 vektörü

pUC19 plazmiti pBR322 ve M13mp19 vektörlerinden türevlenmiş küçük boyutlu ve yüksek kopya numarasına sahip bir klonlama vektördür. Vektör bünyesinde, mavi-beyaz seçilime imkan sağlayan lacZ geni ve bu bölgenin içerisinde yer alan çoklu klonlama bölgesi mevcuttur. Ayrıca vektör amfisilin direnç bölgesine sahiptir.



Şekil 2.3. pUC19 vektörünün halkasal haritası.

2.1.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

- Amfisilin, (Biobasic): 1000X stok solüsyon için 1ml steril distH₂O'da 100 mg amfisilin çözülür, filtre ile steril edilir ve 100 - 500 µl'lik hacimlere bölünerek -20 °C'de saklanır.
- Etidyum bromür, (BioChemica): Son konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde 500 µl'lik hacimlerde distH₂O'da çözülerek stok solüsyon olarak hazırlanır ve 4 °C'de saklanır.

Agaroz jel elektroforezi için son hacimde 0,5 µg/ml olacak şekilde kullanılır.

- X-Gal, (Fermentas): 100mg X-Gal 2 ml N,N'-dimetillformamid'de (Merck) son hacim 50 mg/ml olacak şekilde çözülerek alüminyum folyo ile kaplanmış ependorflarda -20 °C'de saklanır.
- IPTG (BioBasic): 0,1 M'lık stok çözeltisi kullanılmıştır.
- Gliserol (Merck).: %80 oranında steril distH₂O ile seyreltilerek kullanılmıştır.
- Trizma Base (BioBasic).
- Tris HCl (BioBasic).
- EDTA (Fluka,)
- TE Tamponu (Tris-EDTA) :10 mM Tris-HCl pH 7,4 ile 1 mM EDTA, pH 8,0 eşit hacimlerde karıştırılır.
- 10X TBE Tamponu (Tris-Borik Asit-EDTA): 108 gr trizma base ve borik asit 600 ml distH₂O'da çözüldükten sonra 40 ml 0,5 M EDTA eklenir. Toplam hacim 1 L' ye tamamlanır.
- Etanol (Merck); Farklı konsantrasyonlarda etanollar kullanılmıştır (%70, %75, %90 ve %100).

- Kalsiyum Klorür, ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (BioBasic): 7.34 gr CaCl_2 üzerine 1 lt steril su ile hazırlanan çözeltisi kullanılmıştır.
- İzopropanol (Merck).
- Fenol-Kloroform-İzoamilalkol (25:24:1) (Sigma): Birçok amaç için kullanılan bu solüsyon dengeleme tamponu içermektedir. Genomik DNA izolasyonu gibi yüksek pH gerektiren uygulamalarda Equilibration Buffer ile fenolik fazın pH'sı 8 civarına yükseltilmelidir (Fenolik faz sarı ya da kahverengi ise kullanılmamalıdır). Bunun için Fenol-Kloroform-İzoamilalkol solüsyonuna dengeleme tamponunun tümü katılarak yavaşça karıştırılır ve yaklaşık 2-4 saat içinde (tercihen gece boyu) fazlar ayrıldıktan sonra DNA izolasyonunda kullanılabilir. Sonuçta pH, 6.7 ± 0.2 'den 8.0 ± 0.2 ye yükselecektir. Tampon eklendikten sonra ışıktan koruyarak -20°C 'de 1 yıl saklanabilir.
- Kloroform (Sigma, Merck).
- Borik Asit (BioBasic).
- Agaroz A (Biomax).
- Sodyum Klorür (NaCl) (Merck).
- %10 SDS stok solusyonu: Sodium dodesil sülfat %10 (w/v) oranında suda çözülür ve membran kullanılarak (0.2– 0.45 μm) filtre edilir.
- İz element çözeltisi; 5,0 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,0 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,6 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,4 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ içeren çözelti kullanılmıştır.
- Sodyum hipoklorit (Sigma)
- SDS (Sigma)
- Derişik Sülfürik asit (Merck)

2.1.2.1 Çalışmada kullanılan besiyerleri

LB (Luria-Bertani) broth (sıvı) besiyeri

Tripton'dan 10 gr. (Merck), 5 gr. Yeast Extract (Oxoid), 5 gr. NaCl (Merck) erleninde tartılarak 600 ml distH₂O eklenir. Maddeler çözündükten sonra 1 L'ye tamamlanır. İstenilen miktarlarda erlenlere aktararak bölünür. 121°C'de 20 dakika otoklav ile steril edilir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

LB (Luria-Bertani) agar (katı) amfisilin besiyeri

Tripton'dan 10 gr. (Merck), 5 gr. Yeast Extract (Oxoid), 10 gr. NaCl (Merck) erleninde tartılarak 600 ml distH₂O eklenir. Maddeler çözündükten sonra 1 L'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklav ile steril edilir. 50°C'ye soğutulduktan sonra 1000x stok amfisilinden 1 ml. eklenerek son hacimdeki amfisilin miktarı 100 µg/ml olacak şekilde besiyeri hazırlanır. Steril petri tabaklarına uygun miktarlarda (yaklaşık olarak 20-25ml) dökülür ve çeker ocakta kapakları yarı açık bırakılarak nem uzaklaştırıldıktan sonra gece boyu oda sıcaklığında donmaya bırakılır. Donduktan sonra petriler hava almayacak şekilde poşetlenerek 4°C'de 1 ay ya da oda sıcaklığında 1 hafta saklanır.

Nutrient Broth (sıvı) besiyeri

Toz haldeki Nutrient Broth'tan (Oxoid) 13 gr. tartılır ve 600 ml distH₂O eklenip iyice çözündürülür. Maddeler çözündükten sonra 1 L'ye tamamlanır. 121°C'de 20 dakika otoklav ile steril edilir ve oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Medium B

Çizelge 2.2. Medium B besi yeri bileşenleri

Kimyasal	Derişim (g/L)
Na ₂ HPO ₄	3,57
(NH ₄)SO ₂	0,25
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
Glukoz	10
pH 7.5'e ayarlanır. Glukoz filtre ile steril edilip otoklav sonrasında eklenir.	

PHB üretim ortamı

Çizelge 2.3. PHB üretim ortamı bileşenleri

Kimyasal	Derişim (g/L)
Tripton	2
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1
KH ₂ PO ₄	7
Sitrik asit	1
Yeast ekstrakt	2
Glukoz	10
pH 7.0'e ayarlanır. Glukoz filtre ile steril edilip otoklav sonrasında eklenir.	

Mineral Salt besiyeri (Amonyum sülfat içermeyen)

Çizelge 2.4. Mineral salt besi yeri (Amonyum sülfat içermeyen) bileşenleri

Kimyasal	Derişim (g/L)
Na ₂ HPO ₄	4,5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2
KH ₂ PO ₄	1,5
Amonyum demir III sitrat	0,05
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,02
İz element çözeltisi	1 ml
Glukoz	10
pH 7.5'e ayarlanır. Glukoz filtre ile steril edilip otoklav sonrasında eklenir.	

2.1.2.2 Çalışmada kullanılan kitler

INTRON DNA SPIN PLASMID DNA EXT” Kit (Cat. No. 17091),
Fermentas GeneJET™ Gel Extraction Kit,

2.1.2.3 Çalışmada kullanılan enzim setleri

Taq DNA Polimeraz, (Fermentas, EP0401), Phire Hot Start II DNA polimeraz (Finnzymes), *Bgl*III restriksiyon enzimi (Fermentas, ER0088), *Hind*III restriksiyon enzimi (Fermentas ER0501), *Eco*RI restriksiyon enzimi (Fermentas ER0271). T4 DNA Ligaz (Fermentas EL0011).

2.1.3 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan bütün genel laboratuvar cihazları aşağıda listelenmiştir.

UV Kabin (ESCO Class II BSC)

Otoklav (HIYARAMA HVE 50)

Çalkalamalı inkübatör (New Brunswick, Innova 40R)

Spektrofotometre (PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer)

Santrifüj (Hettich Universal 30 RF, Hettich Micro 120)

pH metre (HANNA pH 211)

Isıtmalı karıştırıcı (CHILTERN HS 31)

Etüv (Heraeus)

Analitik terazi (AND GR 200)

Su banyosu (GFL 1083)

Vorteks (WhirliMixer™)

Termal cyclers (Techne TC3000X)

Güç kaynağı (Thermo EC 300XL)

Yatay elektroforez tankı (Thermo OWL EASYCAST™ B2)

UV görüntüleme cihazı (Vilber Lourmat)

2.2 Yöntem

2.2.1 *Alcaligenes latus*'tan genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA (gDNA) izolasyonu *Alcaligenes latus phbCAB* operonunun genomik kopyasının üretilmesi amacıyla ile yapılmıştır. Genomik DNA izolasyonu için “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” kitabı temel alınarak

oluşturulan Dr. Harry van Keulen'nin laboratuvar protokolleri uygulanmıştır [Sambrook and Russell, 2001]. Taze olarak 10 ml steril NB besiyerine ekimi yapılan hücre kültürü gece boyunca çalkalamalı etüvde 165 rpm'de çalkalamayla büyütülmüştür. Ertesi sabah bulanıklık, koku ve mikroskopik gözlem kriterlerine göre kontaminasyon gözlenmeyen kültürlerden genomik DNA izolasyonuna geçilmiş ve bunun için *A. latus* hücreleri öncelikli olarak 13000 rpm'de santrifüjlenerek toplandıktan sonra üst sıvı dökülmüş ve elde edilen hücre çökeltisi kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA %1'lik (w/v) agaroz jeldeki görüntüsü ile RNA kontaminasyonu ve bütünlüğü açısından kontrol edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu protokolü:

- 1) NB besiyerine ekilen *Alcaligenes latus* hücreleri gece boyu 30°C ve 165 rpm'de büyütülür.
- 2) Gelişim istenilen düzeye erişince, 3-5 ml'lik hücre kültürü alınır ve 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
- 3) Hücre peleti 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ile yıkanır.
- 4) Yıkanmış hücre kültürü 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir ve süpernatant dökülür.
- 5) Hücre peletine aşağıdaki bileşenler eklenir ve hücre peleti yavaşça çözülür.
 - 200 µl steril distile su
 - 50 µl 0,5 M EDTA
 - 10 µl Sarkozil (%20'lik)
 - 10 µl Proteinaz K (10 mg/ml)
 - 10 µl Tris-HCl (1M pH: 8)
 - 5 µl NaCl (5M)
- 6) Hücre süspansiyonu 1 saat 65°C de inkübe edilir.

- 7) Hücre süspansiyonuna kendi hacmi kadar fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilir ve 5 dakika süre ile yavaşça ters-düz edilerek karıştırılır.
- 8) Hücre süspansiyonu 2 dk. 13000 rpm'de santrifüj edilir.
- 9) Santrifüj sonrası üstteki sıvı tabaka ağzı jiletle kesilen 1000 µl'lik mikropipetle alınır ve yeni bir tüpe aktarılır.
- 10) Alınan miktarın 0,1'i kadar hacimde 3M sodyum asetat (NaOAc) eklenir ve karıştırılır.
- 11) Karışıma 2 kat hacimde saf etanol eklenir ve karıştırılır.
- 12) Elde edilen karışım alkol çöktürmesi amacıyla -20°C de gece boyu bekletilir.
- 13) Gece boyu -20°C de bekletilen karışım önceden +4°C ye soğutulmuş santrifüjde 13000 rpm de 15 dakika santrifüjlenir.
- 14) Etanol fazı dökülür ve pelet 200 µl steril distile su ile çözülür ve üzerine 0,1 hacimde 0,3 M sodyum asetat eklenir ve karıştırılır.
- 15) Karışıma 440 µl saf etanol eklenir ve karıştırılır.
- 16) Elde edilen karışım -20°C de yaklaşık 2 saat bekletilir.
- 17) Süre sonunda karışım önceden +4°C ye soğutulmuş santrifüjde 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir.
- 18) Etanol fazı dökülür.
- 19) Pelet kuruduktan sonra 50 µl steril saf su ile çözülür.
- 20) Elde edilen genomik DNA agaroz jel elektroforezinde analiz edilerek kalitesi ölçülür.

2.2.2 Gene özgün primerler kullanılarak *Alcaligenes latus* DSM 1124 phbCAB operonunun genomik kopyasının üretimi

Klonlamada kullanılan ileri ve geri gen spesifik primerleri veritabanından *Alcaligenes latus* DSM 1124 ırkına ait dizi bilgisine dayanarak belirlenmiştir. Kalıp DNA dizisine tamamlayıcı olan kısımları ortalama olarak 18-20 bp. arasında olan primerlerin 5' terminal uçlarına yapışkan uç oluşturması amacıyla restriksiyon kesim tanıma bölgeleri eklenmiştir. Buna göre dış primer setini oluşturan F1 Ala 1124 ileri primerine *EcoRI* ve *BglII* bölgesi; RPHB Termination geri primerine ise *XhoI* ve *HindIII* restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri eklenmiştir. GC oranı ortalama olarak %55 olan primerlerin T_m değerleri $[2(A+T)+4(G+C)]-5$ denklemine göre ayrı ayrı hesaplanmıştır. Primerlerin ortalama kullanım T_m'si 57°C olarak belirlenmiştir.

İlgili primerlere ait dizi bilgisi aşağıdaki gibidir:

Gen Spesifik İleri Primer: F1 Ala1124:

5'- GAATTCAGATCTTCAGGAGACGAGTGTGACCC- 3'

T_m: 59°C

Kırmızı ile gösterilen DNA bölgesi EcoRI restriksiyon enziminin, mavi ile gösterilen DNA bölgesi ise BglII restriksiyon enziminin tanıma bölgeleridir.

Gen Spesifik Geri Primer: RPHB TERMINATION

5'- GCACTCGAGAAGCTTCAGCCCATGTGCAGGCC- 3'

T_m: 55°C

Mavi ile gösterilen DNA bölgesi XhoI restriksiyon enziminin, turuncu ile gösterilen DNA bölgesi ise HindIII restriksiyon enziminin tanıma bölgeleridir.

PCR reaksiyonları Fermentas Taq DNA polimeraz ve Phire Hot Start II DNA polimeraz enzimi için aşağıdaki çizelgelerdeki gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.5 Fermentas Taq DNA polimeraz enzimi için PCR reaksiyon koşulları

Bileşen	Miktar (µl)
10X Taq Buffer	2,5
dNTP Mix (2,5mM herbiri)	2
Forward primer (2,5 mM)	3
Reverse primer (2,5 mM)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5
Kalıp DNA	1
Taq DNA polimeraz	0,1
DMSO	0,7
Steril su	10,2 ile son hacim 25 µl'ye tamamlanır

Çizelge 2.6 Phire Hot Start II DNA polimeraz enzimi için PCR reaksiyon koşulları

Bileşen	Miktar (µl)
5X Phire Reaction Buffer	4
dNTP Mix (2,5mM herbiri)	1,6
Forward primer (2,5 mM)	4
Reverse primer (2,5 mM)	4
Kalıp DNA	1
Phire Hot Start II DNA polimeraz	0,4
DMSO	0,6
Steril su	4,4 ile son hacim 2 µl'ye tamamlanır

Çizelge 2.7. Fermentas Taq DNA polimeraz enzimi için termal cyclus koşulları

Adım	Sıcaklık°C	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	35
Bağlanma	53,4	30 sn	
Uzama	72	4 dk	
Son uzama	72	10 dk	1

Çizelge 2.8. Phire Hot Start II DNA polimeraz enzimi için termal cycler koşulları

Adım	Sıcaklık°C	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	98	2 dk	1
Denatürasyon	98	10 sn	35
Bağlanma	53,5	5 sn	
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	1 dk	1

2.2.3 PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ve jelden izole edilmesi

PZR ile elde edilen genomik DNA ve PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek UVP transilluminator cihazında kontrol edilmiş ve UV-Photometer jel dokümantasyon cihazı (Vilber Lourmat) ile veriler kaydedilmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde elde edilen parçalar kesilerek saflaştırılmaya alınmıştır. Saflaştırma için Fermentas GeneJET™ Gel Extraction Kit kullanılmıştır. Protokol adımları aşağıda verilmiştir.

1. DNA fragmentini içeren jel kısmı temiz bir büstri ile kesilerek alınır ve önceden darası belirlenmiş bir 1,5 ml'lik tüpe aktarılır. Jelin ağırlığı belirlenerek kaydedilir.
2. Jel parçasının yer aldığı tüpe jelin ağırlığı ile eşit miktarda Binding Tamponu eklenir. (örn; 100 mg agaroz için 100 µl Binding tamponu).
3. Tüp 50-60 °C'de 10 dakika inkübe edilir. Tüp birkaç dakika arayla vortekslenerek erime süreci hızlandırılır. Bu adımda karışımın rengi sarı olmalıdır. Bu durum optimum pH değerinin sağlandığını belirtmektedir.
4. Çözünmüş jel karışımının 800 µl'si GeneJET™ saflaştırma kolonuna konur ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Altta kalan sıvı kısım uzaklaştırılır ve kolon aynı tüpe konur. (Eğer karışım 800 µl'den fazla ise kalan kısım tekrardan kolona konur ve santrifüj adımı tekrarlanır.)
5. Kolona 700 µl Yıkama Tamponu konur. 1 dk. 13000 rpm'de santrifüjlenir ve sıvı kısım uzaklaştırılır.

6. Kolonda yer alan fazla alkolün uzaklaştırılması için santrifüj adımı tekrarlanır.
7. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne konur ve kolona 50 µl Elüsyon Tamponu eklenir. 1 dk. beklemenin ardından kolon 13000 rpm’de 1 dk. santrifüjlenir.
8. Kolon tüpten uzaklaştırılır ve saflaştırılmış DNA -20°C’de muhafaza edilir.

İzole edilen DNA agaroz jelde ve nanodropta kontrol edilir.

2.2.4 PCR ürünlerinin plazmit DNA’lara ligasyonu

PCR reaksiyonu sonrası jelden saflaştırılarak elde edilen PCR ürünlerinin vektör DNA’sına aktarılması için öncelikle restriksiyon enzimleri yapışkan uç oluşturma işleminin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla PCR ürünü ve plazmit DNA’lar uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek yapışkan uç oluşumu sağlanır. Restriksiyon enzimleri ile kesim için aşağıdaki şartlar uygulanmıştır.

Çizelge 2.9. Restriksiyon kesim reaksiyonu koşulları

Bileşen	Miktarı
10X Tango Tamponu	2µl
Restriksiyon enzimi I	1 µl
Restriksiyon enzimi II	1 µl
DNA molekülü	6 µl

Restriksiyon kesim reaksiyonları 37°C’de en az 5 saat en fazla gece boyu olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kesim süresi sonrasında, reaksiyon ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve ilgili DNA bantları kesilerek jelden saflaştırılmış (Bkz. Kısım 2.2.3) ve ardından saflaştırılan DNA’ların nanogram miktarları Nanodrop cihazı ya da agaroz jelde göz ile belirlenmiştir

Ligasyon reaksiyonunda klonlanacak DNA parçasının nanogram miktarı hesaplanır. Ligasyon reaksiyonlarında plazmit miktarı 100 ng olarak kullanılmıştır. Hesaplama için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$x = \frac{\text{Vektör (ng)}}{\text{Vektör Büyüklüğü (kb)}} \times \frac{\text{Klonlanacak DNA (mol)}}{\text{Vektör (mol)}}$$

Hesaplamaya göre klonlanacak DNA miktarı (x) nanogram olarak bulunur. Kullanılması gereken klonlanacak DNA miktarı yukarıda formülle hesaplandıktan sonra ligasyon reaksiyonu kurulmuştur. Reaksiyon aşağıda verilen şekilde kurulur:

Çizelge 2.10. Ligasyon reaksiyonu koşulları

Bileşen	Miktarı
10 X Ligaz Tamponu	1 µl
T4 DNA Ligaz	1 u
Plazmit DNA	y µl
Klonlanacak DNA	x µl
Steril saf su	10 µl'ye tamamlanır

Reaksiyon sıcaklık gradienti sağlamak amacıyla buzlu su banyosunda gece boyu gerçekleştirilmiştir.

2.2.5 *E. coli* kompetent hücre hazırlığı

Çalışmada kullanılan PHB üretim konakçısı *Escherichia coli* ırklarının klonlama öncesinde dışarıdan DNA alabilecek yapı kazanmaları, yani kompetent hale getirilmeleri gerekmektedir. Hücreler kompetent özellik kazandırmak için aşağıdaki protokol takip edilmiştir (Sambrook and Russell, 2001)

- 1) Kompetent yapılmak istenen hücre tipi LB agar besiyerine ekilir ve yayılır. Oluşan tek kolonilerden LB Broth besiyerine ekilerek gece boyu 37°C'de 120 rpm'de inkübe edilir.
- 2) Ertesi gün canlılığı yüksek olan hücre kültüründen 0,3-0,5 ml alınarak 100 ml'lik taze LB Broth besiyerine ekilir. 120 rpm, 37°C'de inkübasyona devam edilir.

- 3) Erken logaritmik faza erişen kültürün 550 nm'deki OD alınarak hücre yoğunluğu ölçülür. OD 0,4 ila 0,6 arasında olmalıdır. Bu işlem için, inkübasyon başlamasından 70-80 dakika sonra spektrofotometrik ölçümler belirli aralıklarla yapılmaya başlanır. Spektrofotometri ölçümleri için kör olarak distH₂O kullanılmıştır.
- 4) İstenilen OD aralığına ulaştığında, kültürün alınarak 6000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir. Miktar fazla ise peletleme birkaç santrifüj adımı ile yapılır.
- 5) Santrifüj sonunda süpernatant dökülür ve pelet 7,5 ml, 50 mM soğuk CaCl₂ ile çözülür ve 15 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 6) Süre sonunda karışım tekrar 6000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 7) Santrifüj sonunda üst faz dökülür ve hücre peleti 0,25 ml 50 mM soğuk CaCl₂ ile çözülür.
- 8) Eğer hücrelere hemen DNA transformasyonu yapılacaksa hücreler 50 µl hacimlerde bölünerek transformasyona geçilir. Fakat hücreler saklanacaksa 0,6 ml %80'lik gliserol eklenerek karıştırılır ve 30 µl hacimlere bölünerek -86°C'ye kaldırılır.

2.2.6 Plazmit DNA'nın kompetent hücrelere transformasyonu

Ligasyon reaksiyonu ile oluşturulan rekombinant plazmitin çoğaltılması veya protein ifadesinin gerçekleştirilmesi için kompetent hücrelere plazmitin aktarımı gereklidir. Transformasyon protokolünde aşağıdaki adımlar takip edilir (Sambrook and Russell, 2001)

- 1) Kompetent hücreler -80°C'den alınır ve buzda 5 dakika süre ile bekletilir.
- 2) Ligasyon sonunda elde edilen ürün hazırlanan kompetent hücrenin üzerine eklenir ve buzda 30 dakika süre ile bekletilir.
- 3) Süre sonunda örnekler buzdan alınır ve 42°C'ye ayarlanan ısı bloğuna yerleştirilir.

- 4) Hücreler ısı bloğunda 2 dakika süre ile bekletilir ve sonrasında hemen buza alınarak 3 dakika da buzda bekletilir.
- 5) Sürenin bitiminde örneklerin üzerine 500 µl LB Broth eklenir ve 37°C’de 30 dakika süre ile inkübe edilir.
- 6) Bu süre içinde ekim yapılacak 0,1 mg/ml amfisilin içeren LB Agar petrilere 40 µl X-Gal eklenir ve besiyerinin çözeltiyi çekmesi beklenir.
- 7) Hücreler süre bittikten sonra 8,000 rpm de 2 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 8) Tüp içerisindeki yaklaşık 50 µl sıvı kalacak şekilde süpernatant dökülür.
- 9) Pelet kalan sıvı içerisinde çözülür, sonra LB-agar-ampisilin (0,1 mg/ml) - Xgal tabağının yüzeyine yayılır ve bir gece boyu 37°C’de inkübe edilir.

2.2.7 Plazmit izolasyonu

Plazmit izolasyonu, klonlamanın kontrol edilmesi için ya da plazmitin protein ifade konakçısına aktarılması için yapılabilir. Bunun dışında klonlanan parçanın kalıp olarak kullanılarak üzerinde değişiklik yapılması veya tekrar çoğaltılması amacıyla da plazmit izolasyonu yapılabilir. Plazmit izolasyonu klasik yöntem (Sambrook and Russell, 2001; Guerry et al., 1973) ve “INTRON DNA SPIN PLASMID DNA EXT” Kit kullanılarak yapılmıştır ve her iki yöntemin protokol adımları aşağıda verilmiştir.

Klasik Yöntem İle Plazmid DNA izolasyonu

- 1) Pozitif koloni LB Broth amfisilin (0,1mg/ml) besiyerine ekilerek gece boyu 37°C, 120 rpm’de büyütülür.
- 2) Sabah, besiyeri yoğunluğuna göre 1-5 ml hücre alınarak 15.000 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek peletlenir.
- 3) Süpernatant dökülür ve hücre peleti 50 mM Tris-HCl, pH 8,8 ile çözülür. Tekrar 15.000 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüjlenerek peletlenir.
- 4) Üst faz dökülür ve hücre peleti üzerine

- 150 µl Lizozim (10 mg/ml)
- 20 µl EDTA pH:8 (0,5 M)
- 10 µl RNaz A (10 mg/ml)

Eklenerek pipet yardımı ile çözülür.

- 5) Karışım 30 dakika boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılır.
- 6) Süre sonunda “**taze**” hazırlanmış 2 ml, 0,2 M NaOH/200 µl %1’lik SDS karışımı eklenir ve dikkatlice oldukça “**yavaş**” alt/üst edilerek karıştırılır.
 - 0,2 M NaOH ve %1’lik SDS *ayrı ayrı hazırlanır ve kullanımdan hemen önce karıştırılır.*
- 7) 5 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 8) Süre bitiminde hemen 300 µl 7,5 M NH₄Ac eklenir ve dikkatlice alt/üst edilerek karıştırılır. Devamında 10 dakika süre ile buzda inkübasyona bırakılır.
- 9) Süre sonunda 15 dakika süre ile 15.000 rpm’de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda üst faz yeni tüpe aktarılır.
- 10) Alınan üst faz hacmi kadar Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (25:24:1), eklenir ve tüp “**güçlü**” bir şekilde yaklaşık 10 saniye boyunca çalkalanarak karıştırılır. Sonrasında 10 dakika süre ile orbital karıştırıcıda çalkalanır.
- 11) Sonrasında tüp 15.000 rpm’de 2 dakika süre ile santrifüj edilir ve santrifüj sonrası oluşan sıvı üst faz yeni bir tüpe alınır. Burada alınan hacim belirli olmalıdır.
- 12) Alınan hacmin 0,6 katı kadar İzopropanol eklenerek pipet yardımı ile karıştırılır. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- 13) İnkübasyon sonrası tüp 15,000 rpm’de 10 dakika süre ile santrifüj edilir.

- 14) Üst faz atılır ve pelet 200 µl 0,3 M NaAc ile dikkatlice çözülür.
- 15) Gece boyu -20°C'de bekletilir. Ertesi gün tüp 15.000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilir.
- 16) Üst faz atılır ve pelet kurumaya bırakılır. Sonrasında pelet 10 µl distH₂O ile çözülür.

**INTRON DNA-spinTM Plasmid DNA Purification Kit (Cat. No. 17091)
ile plazmit izolasyon prosedürü;**

- 1) Pozitif koloni LB Broth amfisilin (0,1 mg/ml) besiyerine ekilerek gece boyu 37°C, 120 rpm'de büyütülür.
- 2) 3-5 ml bakteri kültürü oda sıcaklığında 13000 rpm'de 30 sn. santrifüjlenerek toplanır ve süpernatant uzaklaştırılır.
- 3) Hücre peleti 250 µl Resuspension Buffer ile vorteks ya da pipet vasıtasıyla tamamen çözülür.
- 4) Hücre süspansiyonuna 250 µl Lizis tamponu eklenir. Tüplerin kapakları kapatılıp nazik bir şekilde birkaç kez ters düz edilir. (Bu adımda vorteks kullanılmaz ve lizis basamağı toplamda 5 dakikayı geçmemelidir.)
- 5) Karışıma 350 µl Nötralizasyon tamponu eklenir ve tüp birkaç kez ters düz edilerek karıştırılır ve 5 dakika +4°C de inkübe edilir.
- 6) 13000 rpm'de +4°C de 10 dakika santrifüj yapılır. Santrifüj esnasında kolon kit içerisinde yer alan toplama tüpüne konur.
- 7) Santrifüj sonrasında, süpernatant kolona aktarılır.
- 8) Kolon 13000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpünde yer alan sıvı uzaklaştırılır ve kolon tekrardan aynı tüpe konur.
- 9) Kolona 700 µl Yıkama Tamponu B konur ve 13000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenir. Tüpte biriken sıvı uzaklaştırılır.

10) Kolon membranının kurutulması amacıyla boş olarak tekrardan 13000 rpm’de 1 dk. santrifüjlenir.

11) Kolon yeni, steril bir santrifüj tüpüne aktarılır ve kolona 50 µl Elüsyon Tamponu konur, 1 dk. beklenir ve ardından 13000 rpm’de 1 dk. santrifüjlenir. Plazmit DNAsını içeren sıvı kısım sonraki işlemler için – 20°C’de saklanır.

Plazmit DNAlarının saflığı, kalitesi ve miktarı restriksiyon kesim analizi, agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik yöntemler ile belirlenebilir.

2.2.8 PHB üretiminin gözlemlenmesi

A. latus PHB biyosentez genlerini içeren rekombinant plazmitler on farklı *E.coli* ırkına transforme edilmiş ve IPTG (0,1mM/), Glukoz (10 g/L) ve amfisilin (0,1 mg/ml) içeren LB Agar ortamında 37°C’de gece boyu inkübe edilmiştir. Hücrelerde PHB üretimi opak renk oluşumuyla belirlenmiştir.

PHA üretiminin mikroskopik olarak gözlenmesi amacıyla hücreler Sudan Black boyası ile boyanmışlardır. Sudan Black boyama prosedürü aşağıdaki gibidir (Jenkins et al., 1986);

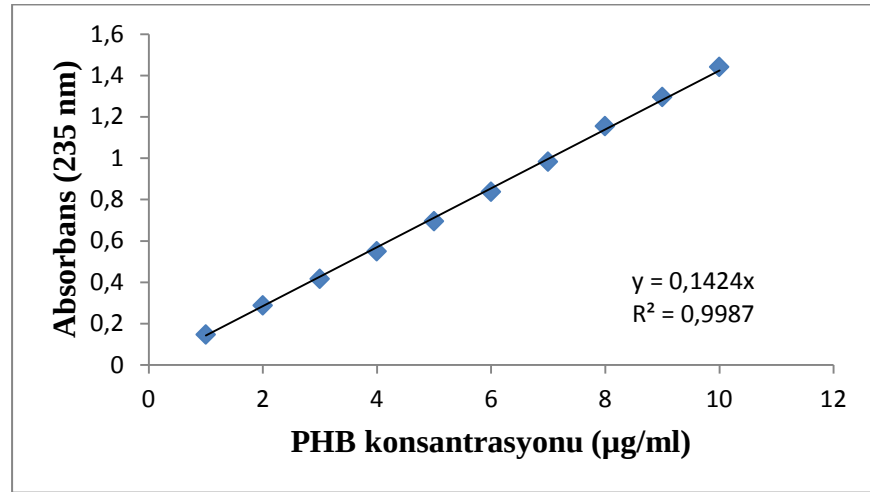
- 1) Bakteri kültüründen bir miktar alınarak lam üzerine ince bir katman halinde yaydırılır havada kurumaya bırakılır.
- 2) Lam Sudan Black B (%60’lık etanolde %0,3 w/v) ile 10 dakika boyanır.
- 3) Su ile kısa süre yıkanır.
- 4) %0,5’lik safranin çözeltisi ile 10 saniye boyanır ve ardından saf su ile iyice yıkanır.

2.2.9 PHB standart grafiğinin çizilmesi

- 1) 0,05 gr ticari PHB tartılır, cam balona konur ve üzerine 100 ml kloroform eklenir. PHB granülünün çözünmesi için geri soğutucuda ısıtılır. PHB

tamamen çözüldükten sonra 1/100 oranında seyreltme yapılarak 5 µg/ml konsantrasyonunda PHB çözeltisi elde edilmiş olur.

- 2) 5 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden cam deney tüplerine sırasıyla 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 ml eklenir (tüm örnekler iki kez tekrarlanmalıdır.). Tüplerdeki kloroform etüvde tamamen uçurulur.
- 3) Kloroform uçtuktan sonra tüplere 5'er ml derişik sülfürik asit eklenir ve böylece 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 µg/ml PHB içeren karışımlar elde edilir.
- 4) Sülfürik asit eklenmiş tüpler 20 dk. kaynar su banyosunda muamele edilir ve böylece PHB molekülleri krotonik aside dönüştürülür.
- 5) İnkübasyon sonrasında tüpler soğutulur ve 235 nm dalga boyunda sülfürik asit kör olarak kullanılarak ölçüm işlemi gerçekleştirilir.



Şekil 2.4. PHB standart grafiği.

2.2.10 Kuru Kütle Miktarının Belirlenmesi

İnkübasyon sonrasında erlenlerdeki kültürlerden 2,5 ml alınarak darası alınmış cam deney tüplerine aktarılıp 4000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenmiş ve süpernatant döküldükten sonra hücre peleti distile su ile yıkanmıştır. Elde edilen örnek ve 80°C de 24 saat etüvde bekletilmiştir. 24 saat sonrasında tüplerin nem almasını engellemek için soğuyuncaya kadar desikatörde bekletilmiş ve ardından tartım işlemi yapılmıştır. Elde edilen tartım sonuçlarından tüplerin daraları çıkarılarak kuru kütle miktarları belirlenmiştir.

2.2.11 PHB miktarının belirlenmesi

Gerçekleştirilen üretim işlemleri sonrasında hücrenin ürettiği PHB miktarını spektrofotometrik olarak tayin edebilmek için Salmiati et al.'dan modifiye edilmiş olan aşağıdaki yöntem kullanılmıştır.

- 1) İnkübasyon sonrasında erlenlerdeki kültürlerden cam deney tüplerine 2,5 ml alınarak 4000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenir ve süpernatant döküldükten sonra hücre peleti 1ml distile su ve 1ml sodyum hipoklorit (%10-15) ile çözülür.
- 2) Karışıma 2 ml kloroform eklenir ve 37°C'de 300 rpm'de 3 saat inkübe edilir.
- 3) İnkübasyon sonrasında tüpler 4000 rpm'de 20 dk. santrifüjlenir.

Santrifüj sonrasında tüpte 3 faz oluşmaktadır. En üstte hipoklorit fazı, hücresel bileşenleri içeren ara faz ve en altta çözünmüş PHB'nin bulunduğu kloroform fazı.

- 4) Hipoklorit fazı uzaklaştırılır ve ara faza çok fazla zarar vermeden kloroform fazı yeni bir tüpe aktarılır.
- 5) Elde edilen kloroform fazından yeni tüplere 100'er µl alınır ve kloroform uçuncaya kadar 80°C'ye ayarlanmış etüvde bekletilir.
- 6) Kloroform uçtuktan sonra tüplere 5'er ml derişik H₂SO₄ eklenir ve 100°C'de kaynar su banyosunda 20 dk. inkübe edilir.

Bu işlem esnasında tüplerde yer alan PHB polimerleri krotonik asite dönüştürülür.

- 7) İnkübasyon sonunda tüpler su banyosundan alınır ve soğutulur, ardından 235 nm'de absorbanslar ölçülümü gerçekleştirilir.

2.2.12 PHB üreticisi *E. coli* ırkının belirlenmesi

Ligasyon reaksiyonu sonrasında transforme edilmiş ve PHB üretiminin gözlemlendiği hücrelerden pozitif plazmitler izole edilmiş ve ardından bu üç pozitif plazmit (pSPAL1124, pUCAL1124 ve pQEAL1124) Çizelge 2.1’de yer alan on farklı *E.coli* ırkına aktarılmıştır. Elde edilen rekombinant hücreler LB+amp ortamında gece boyu inkübe edilmiş (OD_{600} 2-2,2 arasında) ve bu hücrelerden 10 g/L glukoz ve IPTG içeren PHB üretim ortamına %2’lik aşılama yapılarak 37°C’de, 165 rpm’de orbital çalkalayıcıda 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. 24 ve 48. saatlerde kültür ortamından örnek alınarak kuru kütle, PHB miktarı ve % cinsinden PHB/kuru kütle oranı belirlenmiştir.

2.2.13 Farklı Besi yerlerinin PHB üretimine etkisi

Farklı besi yerlerinin PHB üretimi üzerine etkilerini incelemek için dört farklı besi yeri (Nutrient Broth, PHB üretim ortamı (Lo et al., 2005), Medium B (Law et al., 2001), Mineral Salt medium (amonyum sülfat içermeyen)) (Genser et al., 1998) denenmiştir. LB+amp ortamında gece boyu inkübe edilmiş hücrelerden 10 g/L glukoz, IPTG ve amfisilin içeren kültür ortamlarına %2’lik aşılama yapılarak 37°C’de, 165 rpm’de orbital çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonrasında örneklerdeki kuru kütle, PHB miktarı ve % cinsinden PHB/kuru kütle oranı belirlenmiştir.

2.2.14 Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisi

Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimi üzerine etkilerini incelemek için kültür ortamına 10, 15 ve 20 g/L olacak şekilde glukoz, sakkaroz, laktoz ve fruktoz ilave edildi. PHB üretimi için, LB+amp ortamında gece boyu inkübe edilmiş hücrelerden 10 g/L glukoz, IPTG, amfisilin ve farklı oranlarda farklı karbon kaynaklarını içeren ortamlara %2’lik aşılama yapılarak 37°C’de, 165 rpm’de orbital çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kültür ortamından alınan örneklerde kuru kütle, PHB miktarı ve % cinsinden PHB/kuru kütle oranı belirlenmiştir.

2.2.15 Farklı Nutrient Broth konsantrasyonlarının PHB üretimine etkisi

Farklı Nutrient Broth miktarlarının PHB üretimi üzerine etkilerini incelemek için 5-7,5-10-13 ve 15 g/L Nutrient Broth tozu içeren kültür ortamları hazırlanmıştır. PHB üretimi için, LB+amp ortamında gece boyu inkübe edilmiş hücrelerden 10 g/L glukoz, IPTG, amfisilin ve farklı miktarlarda Nutrient Broth içeren kültür ortamlarına %2'lik aşılama yapılmıştır ve 37°C'de, 165 rpm'de orbital çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kültür ortamındaki kuru kütle, PHB miktarı ve % cinsinden PHB/kuru kütle oranı belirlenmiştir.

2.2.16 Sıcaklığın PHB üretimine etkisi

Sıcaklığın PHB üretimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla; LB+amp ortamında gece boyu inkübe edilmiş hücrelerden 10 g/L Nutrient Broth, 10 g/L glukoz, IPTG ve amfisilin içeren kültür ortamlarına %2'lik aşılama yapılmıştır. Kültür ortamları 24°C ve 37°C'de, 165 rpm'de orbital çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kültür ortamından alınan örneklerde kuru kütle, PHB miktarı ve % cinsinden PHB/kuru kütle oranı belirlenmiştir.

2.2.17 Karıştırma hızının PHB üretimine etkisi

Karıştırma hızının PHB üretimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla; LB+amp ortamında gece boyu inkübe edilmiş hücrelerden 10 g/L Nutrient Broth, 10 g/L glukoz, IPTG ve amfisilin içeren kültür ortamlarına %2'lik aşılama yapılmıştır. Kültür ortamları 37°C'de, 125 rpm, 150 rpm, 165 rpm ve 200 rpm'de orbital çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda örneklerde kuru kütle, PHB miktarı ve % cinsinden PHB/kuru kütle oranı belirlenmiştir.

2.2.18 Aşı kültür miktarının PHB üretimine etkisi

Aşı kültür miktarının PHB üretimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla; gece boyu inkübe edilmiş hücreler 10 g/L Nutrient Broth, 10 g/L glukoz, 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin içeren kültür ortamlarına %1, %2, %4, %6, %8 ve %10'luk aşılama yapılmıştır. Kültür ortamları 37°C'de, 165 rpm'de orbital

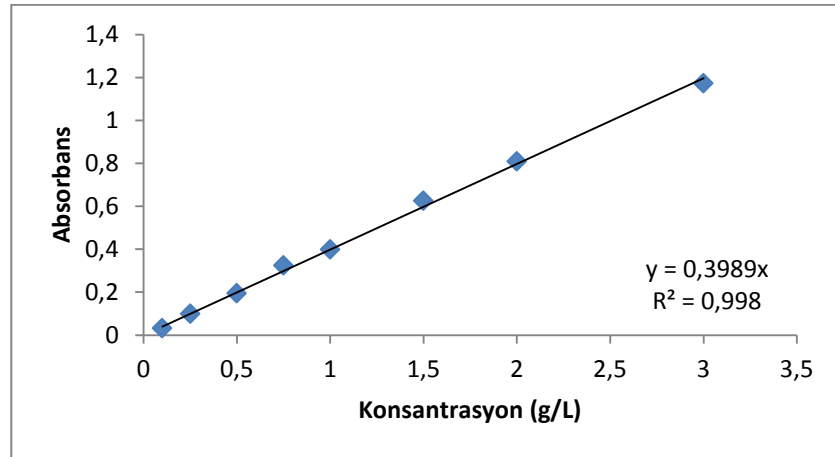
çalkalayıcıda 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda kültür ortamından alınan örneklerde kuru kütle, PHB miktarı ve % cinsinden PHB/kuru kütle oranı belirlenmiştir.

2.2.19 İndirgen şeker tayini

İndirgen şeker tayininde 3,5-Dinitrosalisilik asit (DNS) yöntemi kullanıldı (Çizelge 2.11).

Çizelge 2.11. DNS yöntemi.

Bileşen	Kör (ml)	Örnek(ml)
Distile su	0,5	-
Analizlenecek örnek	-	0,5
DNS	0,5	0,5
Kaynar suda 10 dk bekletme		
Distile su	5,0	5,0
546 nm' de absorbans ölçümü		



Şekil 2.5. İndirgen şeker analizi için glukoz standart grafiği.

2.2.20 PHB üretim profilinin oluşturulması

Rekombinant *E. coli* hücrelerinde PHB oluşumunun profilini belirlemek amacıyla LB+amp (0,1 mg/ml) ortamında gece boyu inkübe edilmiş optimum şartlarda inkübe edilmiştir. Üretim profilinin oluşturulması amacıyla her iki saatte

bir kültür ortamından örnek alınarak kuru kütle ve PHB miktarı ile karbon kaynağının değişimi incelenmiştir.

2.2.21 Rekombinant *E.coli*'den PHB izolasyonu

Rekombinant *E. coli* hücrelerinde üretilmiş olan PHB biyopolimerinin saflaştırılması amacıyla Strazullo ve arkadaşlarından alınan yöntem kullanılmıştır. Kullanılan yöntemin adımları aşağıdaki gibidir (Strazzullo et al., 2008):

- 1) Kültür işlemi sonunda elde edilen hücreler santrifüj ile peletlenir.
- 2) Hücre peleti (1-2 g.) 100 ml saf suda çözündürülür.
- 3) Elde edilen karışım 20 dk. ultrasonik olarak parçalanır.
- 4) Parçama işleminden sonra yaş hücre ağırlığı kadar SDS eklenir ve 50°C'de 1 saat inkübe edilir.
- 5) İnkübasyon işleminin ardından hücre karışımı 121°C'de 20 dk. otoklavlanır.
- 6) Otoklavın ardından hücre lizati soğutulur.
- 7) Santrifüj tüplerine aktarılıp, 10000 rpm, +4°C'de 30 dk. santrifüjlenir.
- 8) Santrifüj işlemi sonucunda oluşan PHB peleti alınır ve gece boyu oda sıcaklığında kurutulur.

3. BULGULAR

3.1 Biyoinformatik Bulgular

3.1.1 *Alcaligenes latus* phbCAB genlerinin nükleotid ve aminoasit dizisi

A.latus DSM 1124 ırkına ait PHB biyosentez operonunun klonlanıp karakterizasyonuna yönelik çalışmada U47026 erişim numarası ile gen bankasına kayıt edilmiş (Genser et al., 1998) dizi bilgisine NCBI veri tabanından ilgili erişim numarası kullanılarak ulaşılmıştır. İlgili gen bankası kaydı *A.latus* DSMM 1124 ırkına ait *phbC*, *phbA* ve *phbB* genlerinin dizileriyle birlikte toplam 4674 bç.'lik bir dizi bilgisini içermektedir (Şekil 3.1).

```

1 gtcgacgccg cattcgccct gcggccacgc gccgacggca gcgcgcgctg gctggcggac
61 ctgccgatgc tcgcgcgcag gcggctcgat ttggcaggtc tgcgtcagat cagaggcgga
121 cagtgggtgca cgggtgcagga tgaatcacgt tttttctcgt tccggcgggga cggggccacg
181 gggcgtcagg ctgccgtcat ctggctgcgc tgaagcctcg gcacgcttgc gtgcccggcg
241 ccgtgccggc gagcccatga gatacaggac gatggacaag ggcagcggcc catacagcac
301 gaaggtgaaa aacgcacca gcaccgtccc gttggggcgcc gtggcctccg ccacggccat
361 catcagcacc acgtacatcc acgccaaggc caccaagtac ataggaaata cccgcgatta
421 cgcagaatga cgtatttctg agaatgaaaa gagttgtcat gatgcggtaa gacacgaagc
481 ctacaacgct gcacgccaac ggttttctgt aaaaagtcct caggagacga gtgtgaccct
541 gcaagccatt cccgcactgc aaacgttcgg tgacaacgcc acggcgctgg gcgcgcgccat
601 ctcggtatgc ttgcgacca tgtccggcct caacctgccc atgcaggcca tggccaagtt
661 gcagggcgag tacctcaacg aagccacggc gctgtggaac aagacgctgg gccgccttca
721 ggccgacggc agcgcggagc cggccaagct gcccgaccgc cgcttctccg ccgccgagtg
781 ggcgcagaac cccgcggccg cctatctggc gcaggtctac ctgctcaacg cccgcacgct
841 gatgcagatg gccgagtcca tcgagggcga cgccaaggcc aaggcgcgca tccgcttcgc
901 cgtgcagcag tggatcgatg ccgctgcgcc cagcaacttc atggcgctca accccgaggc
961 gcagcgcaag gcgctggaga ccaagggcga gagcatcagc cagggcctgc agcagttgtg
1021 gcacgacatc cagcagggcc atgtgtcgca gaccgacgag agcgtgttcg aggtgggcaa
1081 gaacgtcgcc accaccgaag gcagcgtcgt ctacgaaaac gacatgttcc agctgctgga
1141 gtacaagccg ctcacggcca aggtgcacga gaagcccttc ctgttcgtgc ccccgctcat
1201 caacaagtac tacatcctgg acctgcagcc ggacaacagc atcatccgct acaccattgc
1261 gcagggccac cgcgtcttcg tcgtgagctg gcgcaatccg gatgcgtcca cggccgacaa
1321 gacctgggac gactacgtgg agcacggcgt gatccgcgcc atccgcgcca ttcagcagat
1381 caccggtcag gacaagctca acgcgctggg cttctgcgtg ggtggcacca ttctttccac
1441 cgcgctggcc gtgctggccg cccgtggcga gcagcccgtg gccagcctca cgctgctgac
1501 cacgctgctg gacttcagca ataccggcgt gctggacctg ttcatcgacg agacgggcgt
1561 gcggctgcgc gagatgacca tcggcgagaa ggcgcccaac ggcgcgggcc tgctcaacgg
1621 caaggagctg gccacgacgt tcagcttcct gcgtcccaac gatctggtgt ggaactacgt
1681 tgtgggcaac tacctcaagg gcgaggtccc gccggcgctc gacctgctgt actggaactc
1741 ggactcgacc aatctgcccg ggcccatgtt ctgctggtac ttgcgaaca cctacctgga
1801 gaacaagctg cgcgtgcccg gtgccttgac cgtgtgcggc gagaaggtgg acctctcgcg
1861 catcgaggcg ccggtgtacc tgtacggctc gcgcgaggac cacatcgtgc cctgggaatc

```

```

1921 ggcctacacc agcacgcaac tcctctccgg acccaagcgc tacgtgctgg ggcctcggg
1981 ccacatcgcc ggcgtgatca acccgccgca gaagaagaag cgcagctact ggaccaacga
2041 gcagcttggt gccgacgcca accagtggct ggaaacctcc accgagcatc cgggcagctg
2101 gtggacggac tggagcgact ggctcaagca gcacgcgggc aaggaaatcg ctgcgccaa
2161 gacgccgggc aacaagacct acaagccat cgagccgcc cctgggcgt acgtgaagca
2221 gaaggcttga gccgcgggt cacagcttc gttattacc gacctgaca acgaggagat
2281 acacatgacc gacatcgta tcgtcgccgc agcccgacc gccgtgggca agtcggcgg
2341 ctgctggcc aagatcccgg cgctgagct gggcgtgcc gtgatcaagg cctgctgga
2401 aaaaaccggc gtggcgccg accagatcg tgaagtcac atgggccagg tgctggccgc
2461 cggcgccggc cagaaccgg ctgccaggc catgatgaag gcgggcatc ccaaggaaac
2521 gccggcgtg accatcaacg cgtgtgccg ctccggcctg aaggccgtga tgctggcggc
2581 ccaagccatc gcctggggcg acagcgagat cgtatcgcc ggccggcagg aaaacatgtc
2641 cgccagcccg cacgtgtgc aaggcagccg cgacggccag cgcatggcg actggaagat
2701 ggtcgacacc atgatcaacg acggcctgtg ggacgtgtac aacaagtacc acatgggcat
2761 cacggccgag aacgtcgcca aggcgcacga catcacccgt gagcagcagg acgccctggc
2821 cctggccagc cagcaaaagg ccaccgccg ccaggaagcc ggcaagtca aggacgagat
2881 cgttcccgtc gccattccgc agcgcaagg cgatccggtg atgttcgaca ccgacgagtt
2941 catcaacaag aagaccaacg ccgaagcgt ggccggcctg cgtccggcct tcgacaaggc
3001 cggctcggtg accgcgggca acgctccgg catcaacgac ggccggccg ccgtgatggt
3061 catgtcggcc gccaaaggcg agcaactgg cctgaagccg ctggcgcgca tcgccagctt
3121 cggcaccagc ggccctggacc ccgccaccat gggcatgggc ccggtgccgg ccacgcgcaa
3181 ggcgttgag cgccggcgt ggcaagtgc cgacgtggac ctgttcgagc tgaacgaagc
3241 cttcgccgcc caagcctgc cggtgaacaa ggagctgggc gtggaccgg ccaaggtcaa
3301 cgtcaacggt ggccgcatc ccacggcca cccatcggc gcctccggct gccgcgtgct
3361 ggtgacgctg ctgcacgaaa tgcagcgcc cgacgccaag aaggcgctgg ccgcgctgtg
3421 catcggtggc ggcatggcg tgctcgtggc cgtcgagcgc tgcggctg actgaccaag
3481 ggcagccgcc ggagctgccc gggcgccgc cgcgccatg cgcggcgcg gcgccgtga
3541 aaaaattccc tggaacacca ccaagggcc caagacggcc caatgaagga gagacgagat
3601 gactcaaaaa ctgcttacg tgacggcgcg catggcgccg atcggctact cgatgtgcca
3661 acgctgcac aaggacggct tcaaggtcat cgccggctgc ggtccgagcc gcgactacca
3721 gaagtggctg gacgagcaga aggccctgg ctacacgttc tacgcctcg tgggcaacgt
3781 ggccgactgg gactccaccg tcgtcgctt cgagaaggtc aaggccgagc acggcacggt
3841 ggacgtgctg gtgaacaacg ccggcatcac gcgtgacggc cagttccgca agatgagcaa
3901 ggccgattgg caggcgtga tgtccacca cctggacagc atgttcaacg tcaccaagca
3961 ggtgatcgac ggcatgctg acaagggtg gggccgcac atcaacatct cctcgtcaa
4021 cggcgagaag ggccagttcg gccagacca ctactccgc gccaaaggcg gcatgcacgg
4081 cttcaccatg gccctggcg aggaagtgg tgccaaggcg gtgacggtca acaccgtgag
4141 ccccggtac atcgccaccg acatggtcaa ggccatccgc caggacgtgc tggacaagat
4201 cgtctccacc attcccatca agcgctggg caccgcggag gaaatcgct ccatcgtggc
4261 ctggctggcg ggcgacgaat ccggcttcac caccggtgcc gacttcagct gcaacggcgg
4321 cctgcacatg ggctgacccg tgccgaacct gcggcccctt atggggccgc gtcgggcagc
4381 aaaaaaggcc gcgactgcg cgccctttt atttgtccc gcgacccga aatgtctggg
4441 ccgtggcggg cggtattctt gttattccac gatgcccgc atgaaatatt tgataagccc
4501 cttggccgca aaaccagca agccaaagcc cagtgccagg aacagcacga aggtgccgaa
4561 tttggccgcc ttgattctc tcgccaattg aatgatgat aacaccatgt acagcatgaa
4621 ggccgtgacg ccgacggtca ggcccagctg ggcgatattt tcctcgttga attc

```

Şekil 3.1. *A.latus* DSM 1124 PHB biyosentez operonu (Erişim No; U47026). Operonda pembe ile gösterilen DNA bölgesi PHA polimeraz enzimini kodlayan *phaC*, yeşil ile gösterilen DNA bölgesi ketotiyolaz enzimini kodlayan *phaA* ve gri ile gösterilen DNA bölgesi ise asetoasetil-CoA redüktazı kodlayan *phbB* genidir.

Promotor ve terminatör dizilerini de içeresine alan *A.latus* DSM 1124 PHB biyosentez operonunun toplam baz çifti uzunluğu 3974 baz çiftidir. *A.latus* DSM 1124 ırkında PHB polimeraz enzimini kodlayan *phbC* geni toplam 1698 bç. uzunluğundadır ve 565 aa.'lık bir proteini (Şekil 3.2) kodlamaktadır. *phbA* geni ise 1179 uzunluğundadır ve 392 aminoasitlik ketotiyolaz enzimini (Şekil 3.3) kodlamaktadır. PHB biyosentez yolağının son enzimi olan Asetoasetil-CoA redüktazı kodlayan *phbB* geni 738 bç. uzunluğunda olup 245 aa. uzunluğunda bir protein kodlamaktadır. Operonda yer alan genlerin açık okuma pencereleri (ORF) arasında kodlanmayan bölgeler ve bu bölgelerin içerisinde de bireysel ribozom bağlanma bölgeleri yer almaktadır.

```

1 mtlqaipalq tfgdnatalg aaisdalrtm sglnlpmqam aklqgeylne atalwnkltlg
61 rlqadgsaep akldrfsa aewaqpaaa ylaqvllna rtlmqmaesi egdakakari
121 rfavqqwida aapsnfmaln peaqrkalet kgesisqglq qlwhdiqqgh vsqtdesvfe
181 vgknvatteg svvyendmfq lleykpltak vhekpflfvp pcinkyield lqpdnsiiry
241 tiaqghrvfv vswrnpdast adktwddyve hgvirairai qqitgqdkln algfcvggti
301 lstalavlaa rgeqpvaslt llttlldfsn tgvldlfide tgvrlremti gekapngagl
361 lngkelattf sflrpndlvw nyvvgnylkg eappafdlly wnsdstnlpg pmfcwylrnt
421 ylenklrvpg altvcgekvd lsrieapvyl ygsredhivp wesaytstql lsgpkryvlg
481 asghiagvin ppqkkksyw tneqlvadan qwletstehp gswttdwsdw lkqhagkeia
541 apktpgnkty kpiepagry vkqka

```

Şekil 3.2. *A.latus* DSM 1124 ırkında kodlanan PHB polimeraz enziminin protein dizilimi (erişim numarası; AAD10274).

```

1 mtdivivaaa rtavgkfggs lakipapelg aavikallek tvggadqige vimqqvlaag
61 agqnparqam mkagiaketp altinavcgs glkavmlaa aiawgdseiv iaggqenmsa
121 sphvlqgsrd gqrmgdwkmv dtmindglwd vynkyhmgit aenvakahdi treqqdalal
181 asqqkataaq eagkfkdeiv pvaipqrkgd pvmfdtdefi nkktnaeala glrpafdkag
241 svtagnasgi ndgaaavmvm saakaeqlgl kplariasfg tsgldpatmg mgpvpatrka
301 leragwqvvd vdlfelneaf aaqacavnke lgvdpakvnn nggaiaighp igasgcrrlv
361 tllhemqrdd akkgvaalci gggmgvslav er

```

Şekil 3.3. *A.latus* DSM 1124 ırkında kodlanan ketotiyolaz enzimini protein dizilimi (erişim numarası; AAD10275).

```

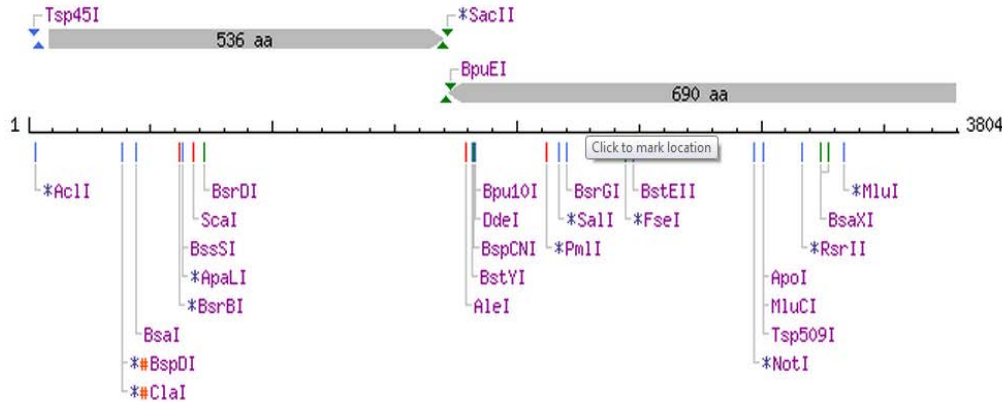
1 mtqklayvtg gmggigtsmc qrlhkdgfkv iagcgpsrdy qkwldeqkal gytfyasvgn
61 vadwdstvva fekvkaehgt vdlvnnagi trdgqfrkms kdwqavmst nldsmfnvtk
121 qvidgmldkg wgriinissv ngekgqfgqt nysaakagmh gftmalaqev aakgvtvntv
181 spgyiatdmv kairqdvldk ivstipikrl gtpeeiasiv awlagdesgf ttgadfcng
241 glhmg

```

Şekil 3.4. *A.latus* DSM 1124 ırkında kodlanan asetasetil-CoA redüktaz enzimini protein dizilimi (erişim numarası; AAD10276).

3.1.2 *Alcaligenes latus* phbCAB operonunun restriksiyon kesim haritası

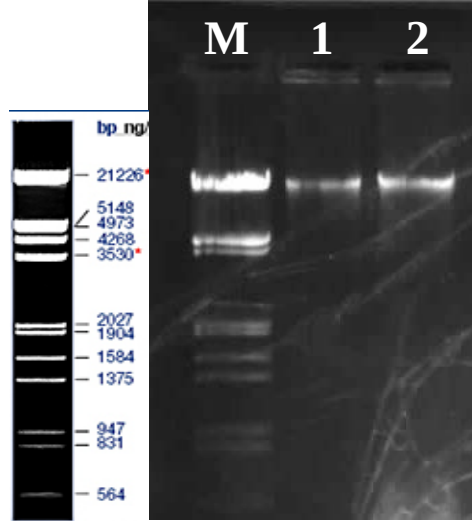
NCBI veritabanından elde edilen operona ait nükleotid dizisi (3804 bç.) NEBcutter 2.0 programı ile analiz edilmiş ve operonu iç bölgeden kesmeyen enzimler belirlenmiştir (Şekil 3.5). Operonu kesmeyen enzimlerden aynı zamanda protein ifadesinde kullanılacak vektörlere uygun olanları primer tasarımında kullanılacaktır. Operonu iç bölgeden kesmeyen toplam 60 adet enzim bulunmuştur ve bu enzimlerden ifade vektörlerine uygun olanlar *EcoRI*, *BglII*, *XhoI* ve *HindIII* dür. Bu enzimlerden pSP72, pQE40 ve pUC19 vektörlerine klonlama yapabilmek için *EcoRI* ve *BglII* ileri primerlerde *XhoI* ve *HindIII* ise geri primerlerde kullanılacaktır. Genin restriksiyon kesim haritası aşağıda verilmiştir.



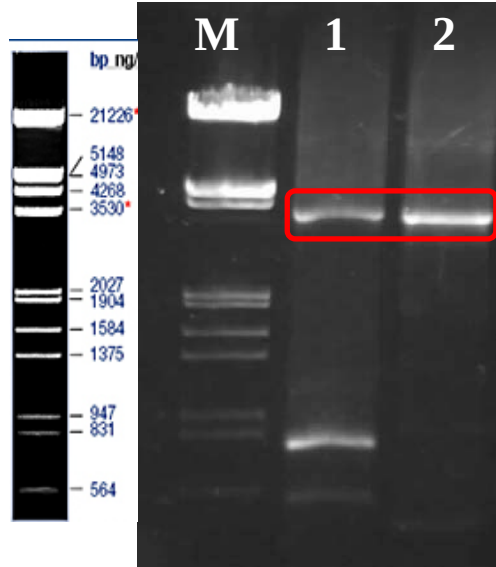
Şekil 3.5. *A. latus* DSM 1124 PHB biyosentez operonuna ait restriksiyon kesim haritası

3.2 *A. latus* phbCAB Operonunun PZR ile Üretilmesi

Bölüm 3.2.1’de yer alan prosedür uygulanarak *A. latus* DSM 1124 ırkından genomik DNA (gDNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). *phbC* geninin başlangıç kodonu ile *phbB* geninin bitiş kodonu arasında kalan 3804 baz çifti uzunluğundaki DNA parçasının pSP72, pQE40 ve pUC19 vektörlerine aktarılabilmesi için PZR reaksiyonu ile üretimi Bölüm 2.2.2’de belirtilen şartlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre deney sonuçları Şekil 3.7’de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre jelde elde edilen DNA fragmentinin büyüklüğünün yaklaşık olarak 3800 bç. olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.6. *A. latus* DSM 1124 genomik DNA izolasyonu . M) marker λ DNA EcoRI/Hind III Marker, 1 ve 2 numaralı kuyucuklar *A. latus*'a ait genomik DNAların görüntüsü (%1' lik agaroz jel'e 2 μ l λ DNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 100 V 50 dk. yürütülmüştür).



Şekil 3.7. *A. latus* DSM 1124 ırkından phbCAB operonunun çoğaltılması için gerçekleştirilen PZR reaksiyonu sonuçlarına ait agaroz jel görüntüsü . M) Marker λ DNA EcoRI/Hind III Marker, 1 ve 2 numaralı kuyucuklar; yaklaşık 3,8 kb.'lik phbCAB operonu (kırmızı kutucuk içerisinde) (%1' lik agaroz jel'e 2 μ l λ DNA EcoRI/Hind III marker ile birlikte yüklenmiş ve 100 V 50 dk. yürütülmüştür).

PZR çalışması sonucunda elde edilen bant jelden kesilerek saflaştırma işlemine alınmıştır. Burada amaç klonlanacak parçanın PZR reaksiyonunda

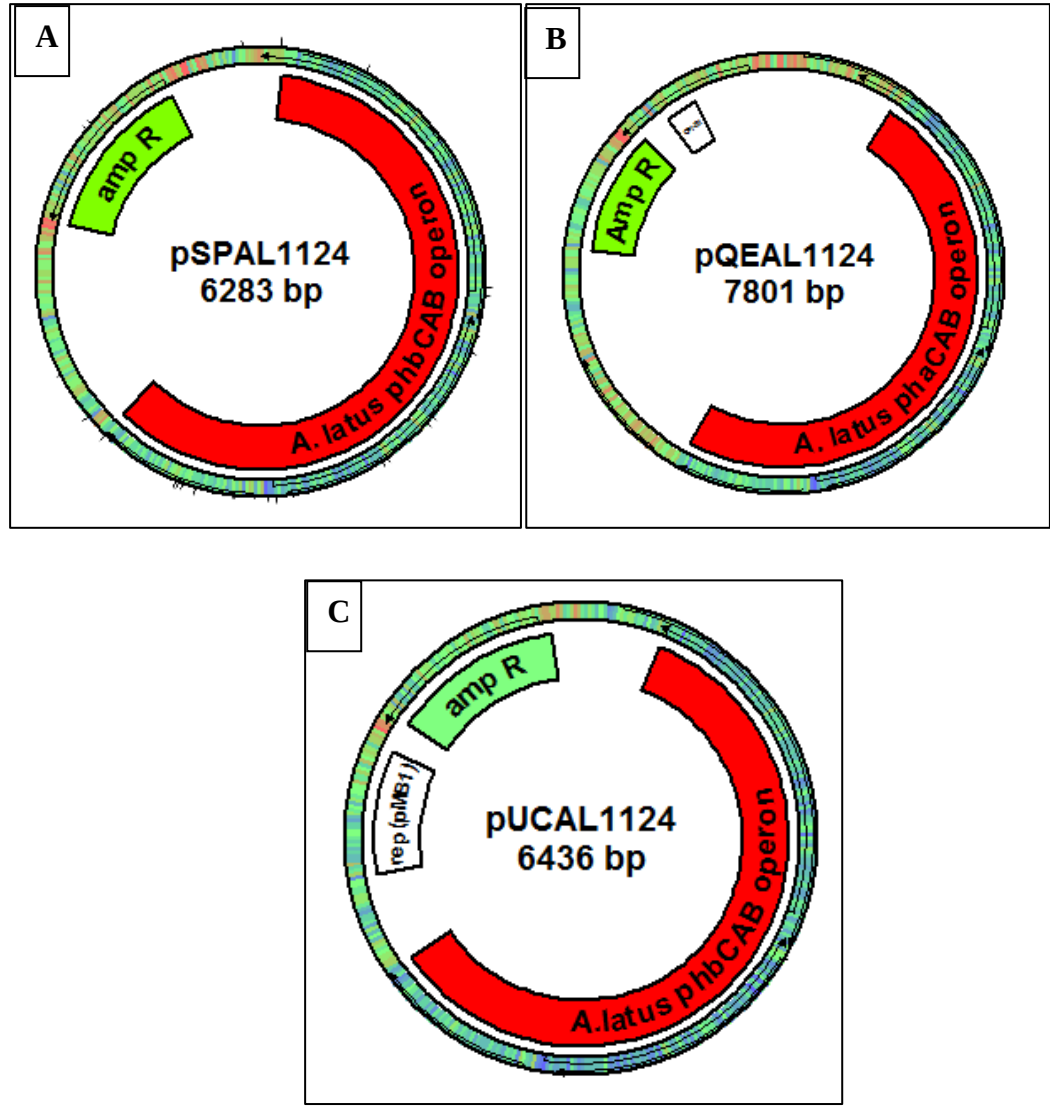
kullanılan maddelere ait kirliliği içermemesidir. Bu amaçla ilk olarak kesilen jel parçasının ağırlığı belirlenmiş ve Bölüm 2.2.3'te verilen protokol değiştirilmeden uygulanmıştır.

3.3 PZR Ürünlerinin Vektörlere Aktarılması

Saflaştırma sonucunda elde edilen PZR ürününün plazmit DNA'lara klonlanması için öncelikle hem vektörler hem de *phbCAB* operonu oligonükleotid primerlerin uç kısımlarında yer alan restriksiyon tanıma bölgelerinden aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, operonun pSP72 ve pQE40 vektörlerine ligasyonu için operon ve her iki plazmit BglIII ve HindIII restriksiyon enzimleri, pUC19 plazmitine ligasyon işlemi için ise hem operon hem de plazmit DNA *EcoRI* ve *HindIII* enzimleri kullanılarak Bölüm 2.2.4'te yer alan prosedüre göre kesim işlemine alınmışlardır.

Restriksiyon kesim reaksiyonu sonrasında uçlarından kesilmiş olan PZR ürünleri ve lineer hale getirilmiş olan plazmit DNA'lar tekrardan agaroz jelde yürütülmüş ve ilgili DNA bantları jelden kesilerek saflaştırılmıştır (Bölüm 2.2.3'teki protokol uygulanmıştır). Saflaştırılan ürünlerin miktarlarını belirlemek için ürünler tekrar jelde yürütülmüş ve miktarları belirlenmiştir (*BglIII* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilen operon: yaklaşık 100 ng/μl, *EcoRI* ve *Hind III* enzimleri ile kesilen operon: yaklaşık 150 ng/μl, pSP72 vektörü yaklaşık 150 ng/μl, pQE40 vektörü yaklaşık 200 ng/μl ve pUC19 vektörü yaklaşık 100 ng/μl olarak belirlenmiştir).

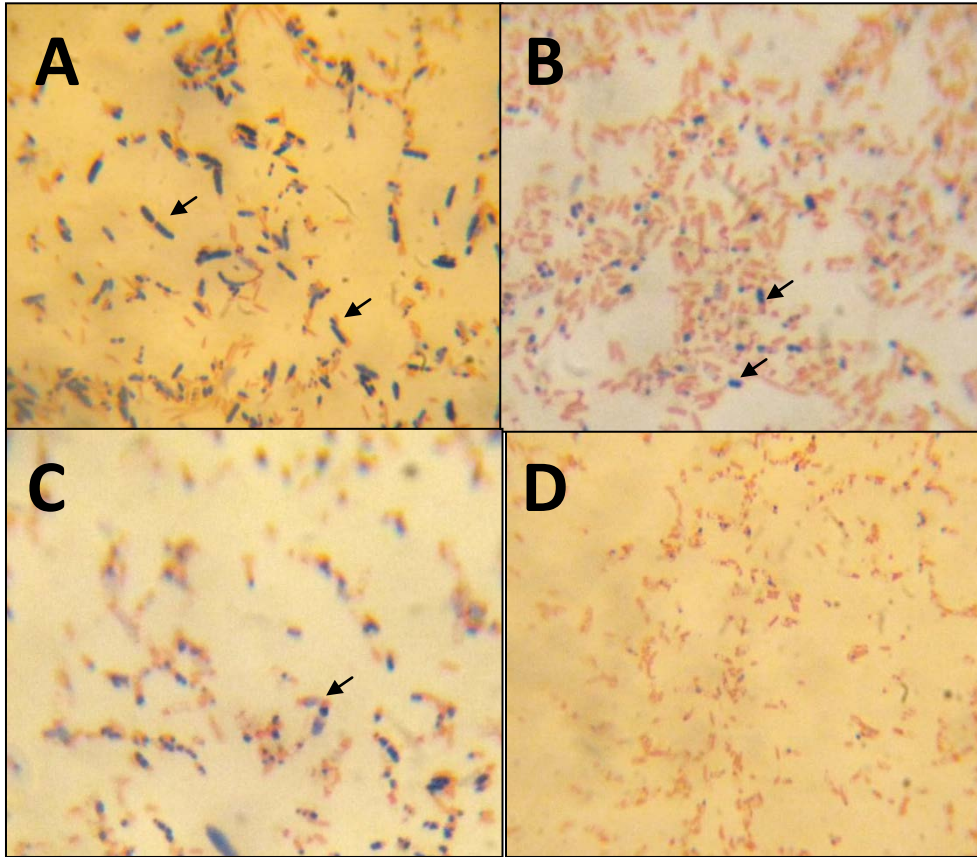
Elde edilen bu sonuçlardan sonra jelden saflaştırılmış olan *phbCAB* operonları ve plazmit DNA'lar Bölüm 2.2.4'te verilen protokole göre ligasyon işlemine alınmıştır. Ligasyonu gerçekleştirilen plazmitler daha sonra Bölüm 2.2.6'da belirtilen protokole göre *E.coli* XL-1 Blue konakçısına transforme edilmiştir. Oluşturulan rekombinant plazmitlerin vektör haritaları Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



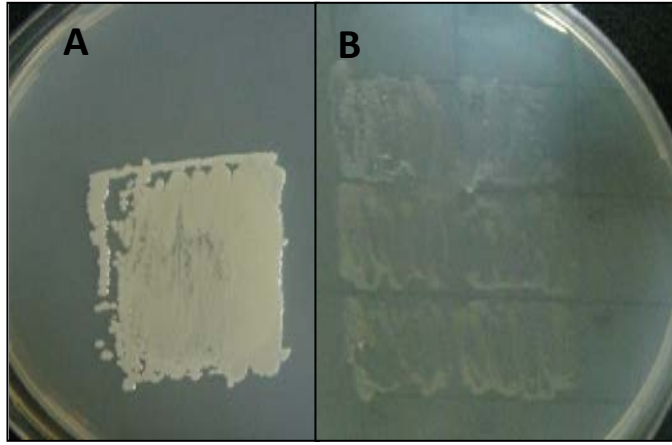
Şekil 3.8. PHB üretimi için oluşturulan rekombinant plazmitler. A) 3,8 kb'lık phbCAB operonunu içeren pSP72 vektörü (pSPAL1124). B) 3,8 kb'lık phbCAB operonunu içeren pQE40 vektörü (pQEAL1124). C) 3,8 kb'lık phbCAB operonunu içeren pUC19 vektörü (pUCAL1124). Kırmızı ile gösterilen kısım operonu, yeşil ile gösterilen ise antibiyotik direnç bölgelerini göstermektedir.

Transformasyon sonucunda petri kaplarında çok sayıda koloni elde edilmiştir ve bu kolonilerden her bir petri tabağı için yaklaşık 25 adedi glukoz, IPTG ve amfisilin içeren master tabağa ekilmiş ve bir gece 37°C'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında master tabağında gelişim gösteren kolonilerden opak renkli olanlar belirlenmiştir. Glukoz içeren agar ortamında PHB üretimi gerçekleştiren rekombinant *E. coli* hücreleri ışığı geçirmeyen opak bir koloni yapısı gösterirken, PHB üretmeyen hücreler ise ışığı geçiren bir yapıdadır (Choi et al., 1998; Jung et al., 2005).

Glukoz, IPTG ve amfisilin içeren ortamda opak renk oluşturan kolonilerden bazıları Bölüm 2.2.8’de belirtilen prosedüre göre Sudan Black boyası ile boyanmış ve PHB üretiminin varlığı göz ile gözlemin yanı sıra mikroskopik olarak da belirlenmiştir (Şekil 3.9). Hücrelerin içerisindeki siyah noktalar PHB granüllerini göstermektedir. Ayrıca Şekil 3.10’da Rekombinant *E. coli*’de Glukoz içeren katı besiyerinde PHB üretiminin verilmiştir. PHB üretimi gerçekleşen hücrelerde biriken PHB’dan ötürü petri kabında ışığı geçirmeyen opak bir koloni görünümü oluşmaktadır.



Şekil 3.9. Farklı rekombinant plazmitleri içeren *E. coli* hücrelerinin Sudan Black ile görüntülenmesi. A) pQEAL1124 plazmitini taşıyan *E. coli* hücresi. B) pUCAL1124 plazmitini taşıyan *E.coli* hücresi. C) pSPAL1124 plazmitini taşıyan *E.coli* hücresi. D) Herhangi bir plazmit taşımayan *E.coli* hücresi Oklar PHB granüllerini işaret etmektedir.



Şekil 3.10. Rekombinant *E. coli*'de Glukoz içeren katı besiyerinde PHB üretiminin görüntülenmesi. A) PHB üretimi gerçekleştiren mikroorganizma (opak). B) PHB üretimi gerçekleştirmeyen mikroorganizma.

3.4 PHB Üreticisi *E. coli* Irkının Belirlenmesi

En yüksek miktarda ve verimde PHB üreten *E. coli* ırkını belirlemek amacıyla *A.latus* DSM 1124 *phbCAB* operonunu içeren üç farklı rekombinant plazmit Çizelge 3.1'de listelenmiş olan on farklı *E. coli* ırkına ısı şoku ile transforme edilmiştir. Gerçekleştirilen transformasyon işlemleri sonucunda toplam PHB üretimi yapabilen 26 farklı ırk elde edilmiştir. Transformasyon işleminde karşılaşılan problemler nedeniyle pSPAL1124 plazmiti *E.coli* Rosetta ırkına, pSPAL1124 ve pQEAL1124 plazmitleri *E.coli* Rosetta DE3 plyss ırkına ve pSPAL1124 plazmiti ise *E.coli* JM105 ırkına aktarılamamıştır.

Elde edilen 26 farklı ırktan hangilerinin PHB üreticisi olabileceğini belirlemek amacıyla hücreler LB+amp (0,1 mg/ml) ortamında gece boyu inkübe edilmiştir. Üretilen aşı kültürler 10 g/L glukoz, 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin içeren PHB üretim ortamlarına aşılansmıştır. Bu hücrelerden 24 ve 48. saatlerde kuru kütle ve PHB analizleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre 24 ve 48. saatler arasında kayda değer bir fark gözlenmedi. Çizelge 3.1'de 24 ve 48 saat sonunda hücrelerdeki kuru kütle ve PHB miktarları gösterilmiştir. Sonuçlar üç farklı hücrenin ön plana çıktığını göstermektedir. *E. coli* Rosetta pQEAL1124, *E. coli* JM-105 pQEAL1124, *E. coli* DH5- α pSPAL1124 ırkları %10'un üzerinde PHB üretimi gerçekleştirmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi birçok ırk çok düşük miktarlarda (%1-5 arasında) PHB üretimi gerçekleştirmiştir.

Çizelge 3.1. 24 ve 48 saat sonrasında farklı rekombinant *E.coli* hücrelerinde PHB üretimi.

İrk	Plazmit	Kuru kütle (gr/L)		PHB (gr/L)		%PHB	
		24	48	24	48	24	48
<i>E. coli</i> Rosetta	-	-	-	-	-	-	-
	pUCAL1124	1,7	2,2	0,11	0,1	6,48	4,5
	pQEAL1124	2,1	1,9	0,4	0,41	19,04	21,5
<i>E. coli</i> Rosetta DE3	pSPAL1124	1,83	1,36	0,029	0,01	1,38	0,7
	pUCAL1124	2	1,73	0,087	0,07	4,75	4
	pQEAL1124	1,9	1,8	0,026	0,015	1,36	0,8
<i>E. coli</i> Rosetta DE3 plyss	-	-	-	-	-	-	-
	pUCAL1124	1,9	1,8	0,141	0,12	7,42	6,6
	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	pSPAL1124	1,26	1,5	0,1	0,07	7,9	4,6
	pUCAL1124	3,03	1,6	0,04	0,02	1,3	1,25
	pQEAL1124	2,9	2,3	0,36	0,46	12,41	2
<i>E. coli</i> TCS062	pSPAL1124	2,26	2	0,04	0,03	1,76	1,5
	pUCAL1124	1,23	1,8	0,02	0,014	1,62	0,7
	pQEAL1124	2,5	2,1	0,057	0,042	2,28	8,8
<i>E. coli</i> JM-105	-	-	-	-	-	-	-
	pUCAL1124	1	1,5	0,023	0,014	2,3	0,9
	pQEAL1124	1,96	2	0,25	0,29	12,75	14,5
<i>E. coli</i> DH5- α	pSPAL1124	2,2	2	0,62	0,65	28,18	32,5
	pUCAL1124	1,5	1,6	0,03	0,029	2	1,8
	pQEAL1124	1,96	1,8	0,18	0,17	9,18	9,4
<i>E. coli</i> BL21 DE3 plyss	pSPAL1124	1,93	1,8	0,1	0,087	5,18	4,8
	pUCAL1124	1,9	1,3	0,02	0,026	1,05	2
	pQEAL1124	2,06	1,5	0,029	0,022	1,4	1,46
<i>E. coli</i> SURE	pSPAL1124	1,93	1,4	0,09	0,068	4,66	4,8
	pUCAL1124	1,53	1,4	0,033	0,026	2,15	1,85
	pQEAL1124	1,5	1,7	0,13	0,125	8,66	7,3
<i>E. coli</i> Top10	pSPAL1124	2,1	1,4	0,12	0,115	5,71	8,2
	pUCAL1124	2,1	1,7	0,065	0,052	3,09	3,05
	pQEAL1124	1,5	1,3	0,042	0,039	2,8	3

Hücreler kuru kütle üretimleri açısından incelendiğinde en yüksek kuru kütle miktarını 3,03 g/L ile pUCAL1124 plazmitini taşıyan *E. coli* XL1- Blue hücresi vermiştir, ancak bu hücredeki PHB miktarı oldukça düşük miktardadır. PHB üretimi açısından ise en verimli iki ırk 0,4 g/L ve 0,62 g/L üretim ile sırasıyla *E. coli* Rosetta pQEAL1124 ve *E. coli* DH5 α pSPAL1124'tür.

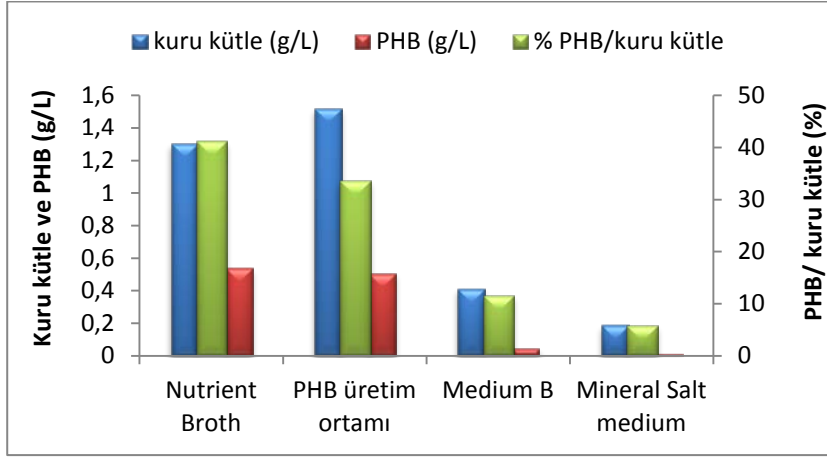
PHB üretiminin artırılması amacıyla gerçekleştirilecek optimizasyon çalışmalarına elde edilen bulgular neticesinde en yüksek PHB miktarına ve PHB/kuru kütle oranına erişen *E. coli* Rosetta pQEAL1124, *E. coli* DH5 α pSPAL1124 ve *E. coli* JM105 pQEAL1124 ırkları ile devam edilmesine karar verildi. Ayrıca gerçekleştirilen 24 ve 48 saatlik denemeler arasındaki farklar anlamlı olmadığı için sonrasında gerçekleştirilecek optimizasyon çalışmalarında kültürasyon süresinin 24 saat olarak gerçekleştirilmesine karar verildi.

3.5 Farklı Besi Yerlerinin PHB Üretimine Etkisi

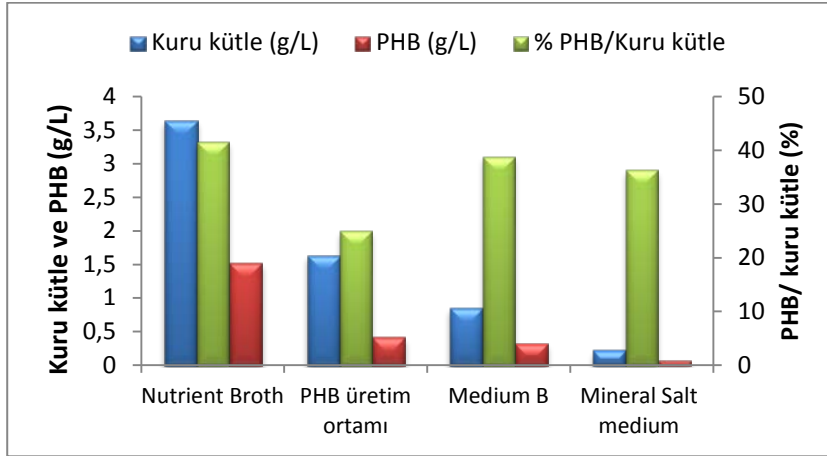
Farklı besi yerlerinin PHB üretimi üzerine etkilerini incelemek için dört farklı besi yerinde (Nutrient Broth, PHB üretim ortamı, Medium B, Mineral Salt medium (amonyum sülfat içermeyen)) (Genser et al., 1998) PHB üretimi incelenmiştir. *E. coli* Rosetta pQEAL1124, *E. coli* DH5 α pSPAL1124 ve *E. coli* JM105 pQEAL1124 ırkları hücreler LB+amp (0,1 mg/ml) ortamında gece boyu inkübe edilmiştir. Üretilen aşı kültürler 10 g/L glukoz, 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin içeren Nutrient Broth, PHB üretim ortamı, Medium B, Mineral Salt medium (amonyum sülfat içermeyen) ortamlarına %2 oranında inoküle edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonrasında her bir hücre için dört farklı ortamda PHB üretimi ile kuru kütle miktarları belirlendi.

E. coli DH5 α pSPAL1124 ırkında gerçekleştirilen denemelerde dört farklı besiyeri için elde edilen sonuçlara göre; Nutrient Broth besiyerinde kuru kütle, PHB ve verim miktarları sırasıyla 1,3 g/L, 0,53 g/L ve %41,2 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.11). PHB üretim ortamında ki denemelerde kuru kütle miktarı dört ortam içerisinde en yüksek değere ulaşmış ve 1,52 g/L olarak belirlenmiştir, bu besiyerinde PHB miktarı 0,51'de kaldığı için verim %33 olarak hesaplanmıştır. Medium B ve Mineral Salt medium (amonyum sülfat içermeyen) ortamlarında ise verim sırasıyla %11 ve %5,9 olarak belirlenmiştir.

E. coli Rosetta pQEAL1124 ırkının kullanıldığı besiyeri optimizasyonu çalışmasında bu organizma için en verimli ortamın Nutrient Broth olduğu görülmektedir. Nutrient Broth ortamında 24 saat sonunda organizma 3,65 g/L kuru kütle ve 1,52 g/L PHB üretimi gerçekleştirerek %41,6'lık verime ulaşmıştır. Ayrıca aynı organizma diğer ortamlarda maksimum 1,6 g/L kuru kütle ve 0,4 g/L PHB üretebilmiştir (Şekil 3.12).



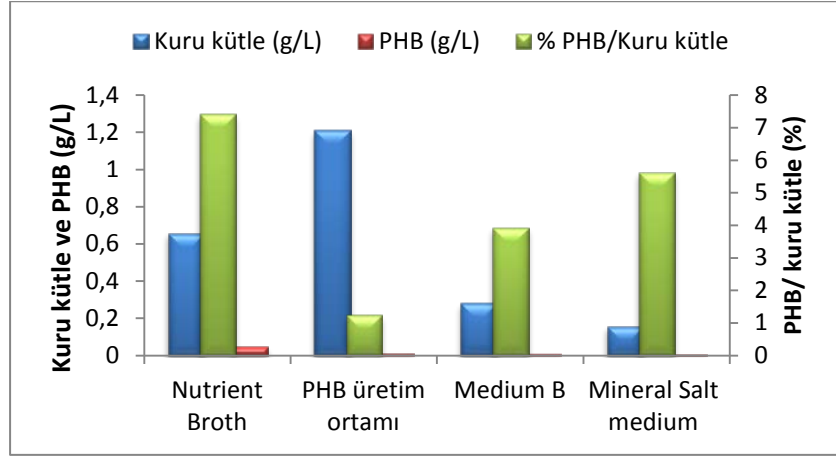
Şekil 3.11. *E. coli* DH5α pSPAL1124 ırkında PHB üretimine besi yerinin etkisi.



Şekil 3.12. *E. coli* Rosetta pQEAL1124 ırkında PHB üretimine besi yerinin etkisi.

Farklı besiyeri ortamlarının PHB üretimine olan etkisinin incelenmesi amacıyla üretim gerçekleştirilen son organizma olan *E. coli* JM105 pQEAL1124 için her dört ortam için de üretim miktarları ve verim oldukça düşüktür (Şekil 3.13). Bu organizma ile maksimum kuru kütle 1,2 g/L ile PHB üretim ortamında elde edilirken bu ortamdaki PHB miktarı 0,015 g/L'de kalmıştır.

Her üç organizma için dört farklı ortam denemesi gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler ışığında PHB üretiminin gerçekleştirilebilmesi için aday organizma ve kültür ortamının *E. coli* Rosetta pQEAL1124 ve Nutrient Broth olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 3.13. *E. coli* JM105 pQEAL1124 ırkında PHB üretimine besi yerinin etkisi.

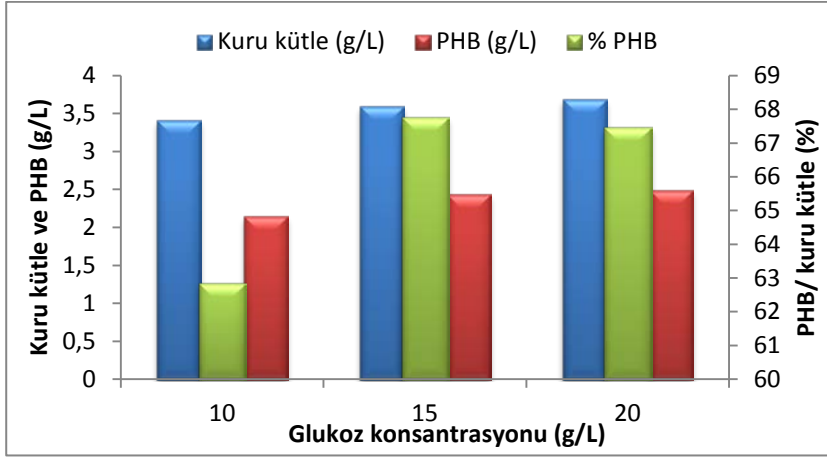
3.6 Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisi

PHB üretimine karbon kaynaklarının etkisini incelemek amacıyla dört farklı karbon kaynağı test edildi. Bu amaçla Nutrient Broth ortamına glukoz, sakkaroz, fruktoz ve laktoz 10-15-20 g/L olacak şekilde besi yeri otoklavlandıktan sonra filtre edilerek haricen eklendi. Elde edilen kültür ortamlarına ayrıca 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin eklenerek gece boyu kültüre edilmiş *E. coli* Rosetta pQEAL1124 hücrelerinden %2 aşılama yapılarak kültürler 24 saat 37°C'de 165 rpm'de çalkalanarak üretim gerçekleştirildi. 24 saat sonunda ortamlardaki kuru kütle ve PHB miktarları belirlendi.

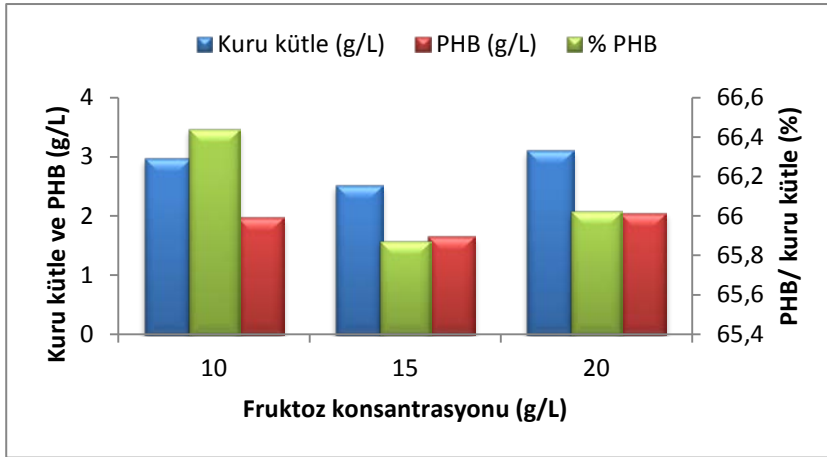
Nutrient Broth ortamına 10, 15 ve 20 g/L glukoz eklenerek yapılan üretimler sonucunda her üç konsantrasyonda da kuru kütle miktarları birbirine oldukça yakın çıkmıştır. 10 g/L glukoz içeren besi yerinde kuru kütle, PHB ve verim miktarları sırasıyla 3, 42 g/L, 2,15 g/L ve yaklaşık % 63'tür. 15 ve 20 g/L glukoz içeren ortamlarda ise bu veriler 3,6 g/L, 2,4 g/L ve %67'dir (Şekil 3.14).

Karbon kaynağı olarak fruktozun kullanıldığı ortamlarda ise elde edilen sonuçlar şu şekildedir; 10 g/L fruktoz ortamında 2,98 g/L kuru kütle, 1,98 g/L PHB ve %66 üretim verimi elde edilmiştir. 15 g/L fruktoz ortamında kuru kütle 2,52 g/L, PHB 1,66 g/L'dir. Son olarak 20 g/L fruktoz içeren ortamda ise bu

veriler sırasıyla 3,12 g/L, 2,06 g/L ve %66'dır (Şekil3.15). Yüzde olarak verimler glukoz ile benzer olmasına rağmen kuru kütle ve PHB miktarları glukoz içeren ortamlarda daha fazladır.



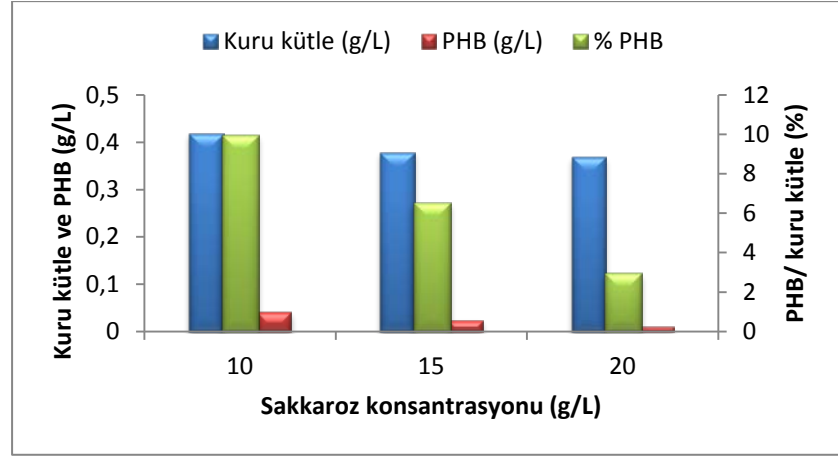
Şekil 3.14 PHB üretimine glukozun etkisi.



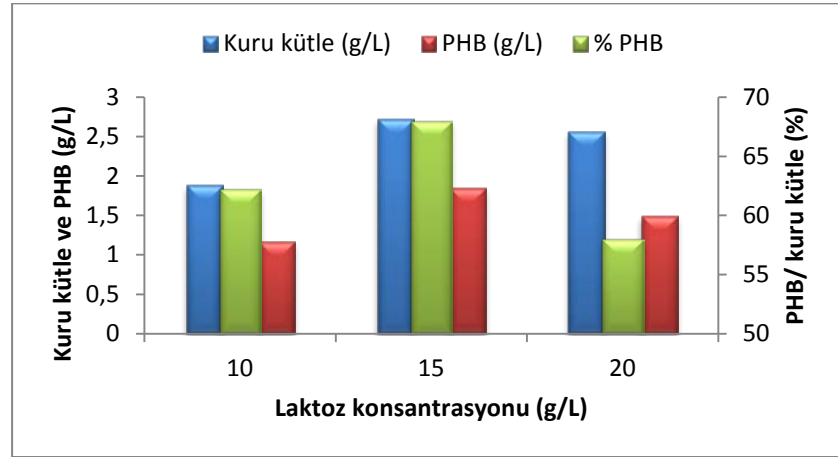
Şekil 3.15 PHB üretimine fruktozun etkisi.

Sakkaroz etkisinin incelendiği ortamlarda Kuru kütle, PHB miktarları ile verim oldukça düşük seviyelerde kalmıştır (Şekil 3.16). Sakkarozun her üç konsantrasyonunda da kuru kütle yaklaşık 0,4 g/L civarında iken PHB miktarı ise 0,04'te kalmıştır.

PHB üretimi üzerine etkisi incelenen son karbon kaynağı laktozdur. 15 g/L laktoz içeren ortamda PHB verimi açısından en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu ortamda 2,72 g/L kuru kütle, 1,85 g/L PHB ve %68 verim elde edilmiştir. Diğer iki konsantrasyonda 15 g/L'ye göre daha düşük veriler elde edilmiştir (Şekil 3.17).

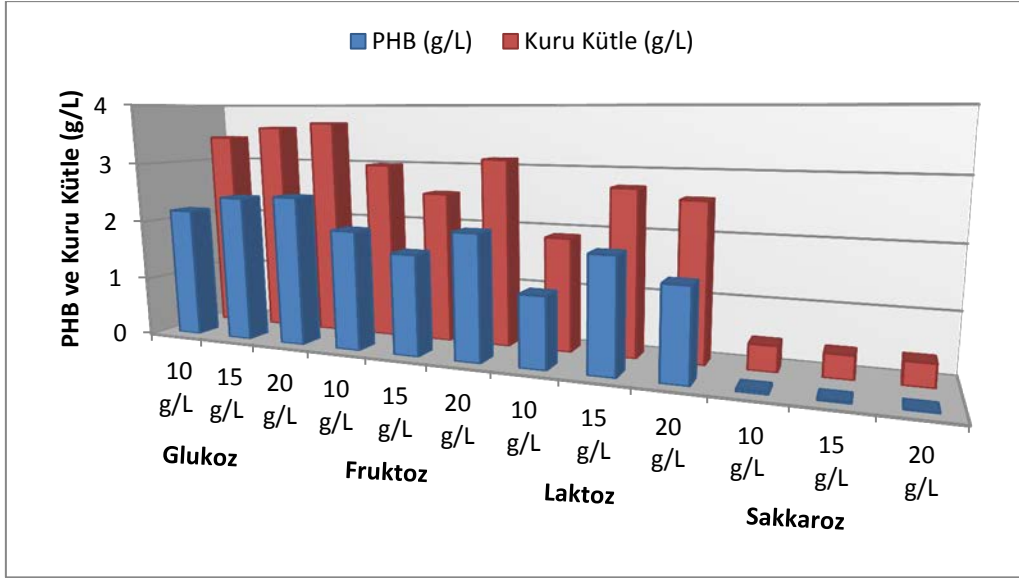


Şekil 3.16 PHB üretimine sakkarozun etkisi.

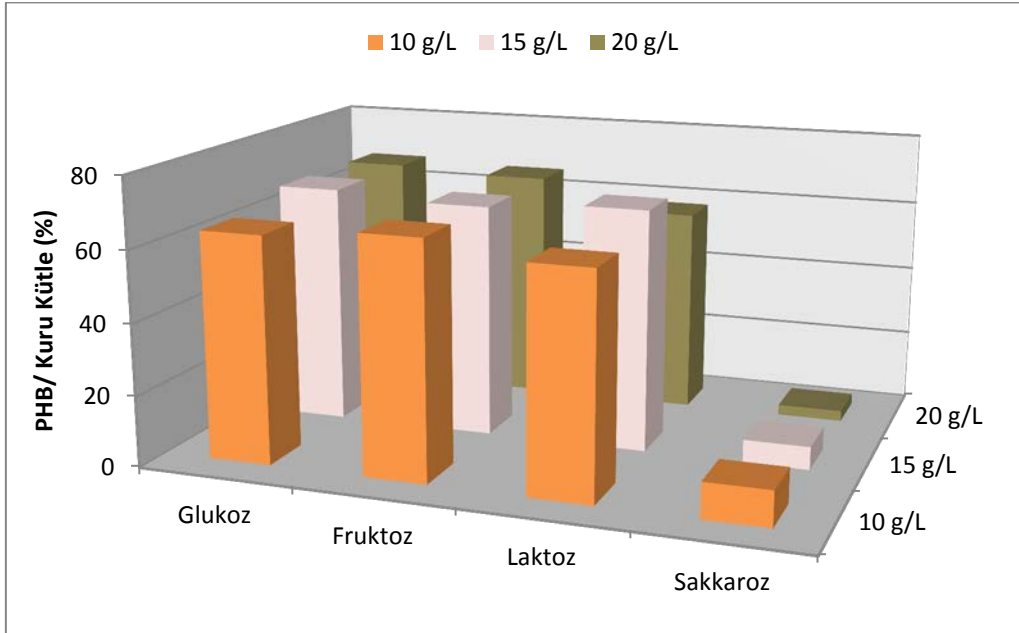


Şekil 3.17. PHB üretimine laktozun etkisi.

Gerçekleştirilen karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisinin incelendiği çalışmalar sonucunda glukoz, fruktoz ve laktozda üretilen PHB'nin kuru kütleyle olan oranları birbirine yakın olmasına rağmen (yaklaşık %65), miktarsal olarak en fazla kuru kütle ve PHB üretimi glukoz içeren ortamlarda gerçekleşmiştir (Şekil 3.18 ve Şekil 3.19). 15 g/L glukoz içeren ortamın üretim miktarları 10 g/L'den daha fazla olmasına rağmen aradaki fark %50 daha fazla karbon kaynağı kullanmaya gerektirecek kadar anlamlı değildir (Şekil 3.14). Aynı zamanda glukozun diğerlerinden daha ucuz olmasından dolayı denemelerin devamında üretim için karbon kaynağı olarak 10 g/L glukoz kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.18. Farklı Karbon kaynakların kuru kütle ve PHB üretimine etkisi

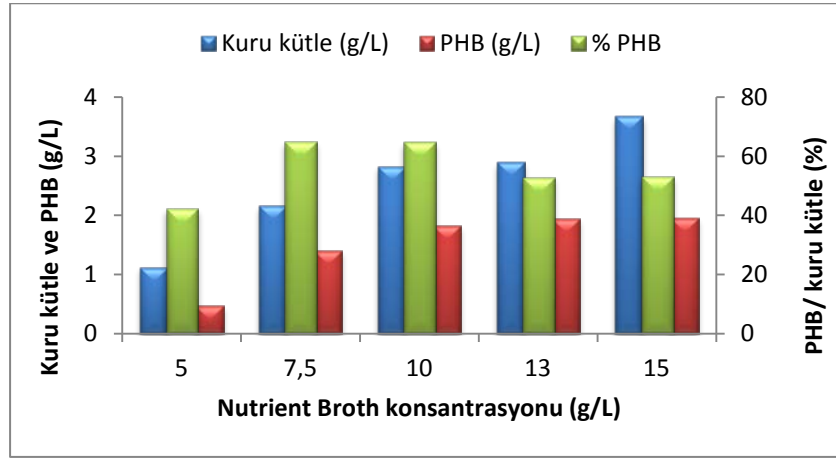


Şekil 3.19. Farklı Karbon kaynakların PHB verimine etkisi

3.7 Farklı Nutrient Broth Konsantrasyonlarının PHB Üretimine Etkisi

Standart bir Nutrient Broth ortamı (Oxoid) 13 gram toz besiyeri 1 litre distile suda çözülerek hazırlanmaktadır. Besiyerinin içerisindeki karbon/azot oranının (C/N) PHB üretim verimini etkilediği bilindiği için, karbon kaynağı olan glukoz sabit tutularak (10 g/L) nutrient broth miktarının değiştirilmesi vasıtasıyla C/N oranı değiştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla 5 g/L, 7,5 g/L, 10 g/L, 13 g/L ve

15 g/L olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda nutrient broth besiyeri ortamları hazırlanmıştır. Kültür ortamlarına ayrıca 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin eklenerek gece boyu kültüre edilmiş *E. coli* Rosetta pQEAL1124 hücrelerinden %2 aşılama yapılarak kültürler 24 saat 37°C'de 165 rpm'de çalkalanarak üretim gerçekleştirildi. 24 saat sonunda ortamlardaki kuru kütle ve PHB miktarları belirlendi.

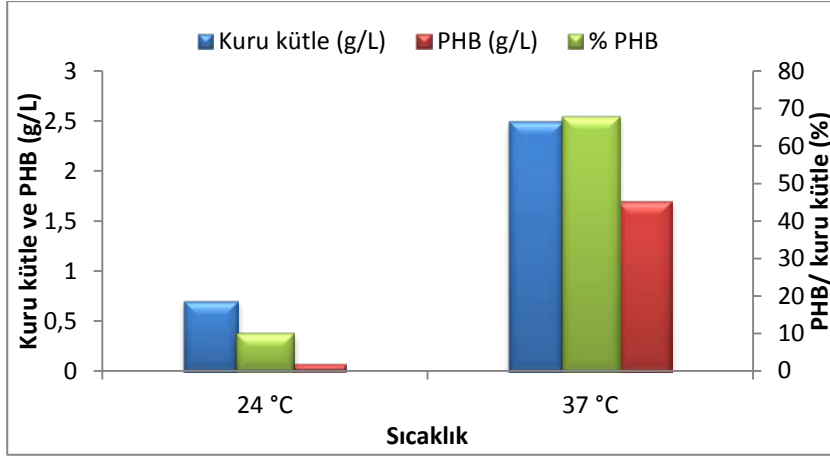


Şekil 3.20 PHB üretimine Nutrient Broth konsantrasyonunun etkisi (10 g/L glukoz)

Şekil 3.20'de görüldüğü gibi kuru kütle miktarı konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. Ancak PHB miktarı 5 g/L, 7,5 g/L ve 10 g/L konsantrasyonlarda artmış sonrasında ise birbirine yakın seyretmiştir. Bu nedenle de verim önce artmış sonrasında azalmıştır. 10 g/L konsantrasyon ile elde edilen sonuçlar diğer konsantrasyonlara göre daha tatmin edici olduğundan bu konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

3.8 Sıcaklığın PHB üretimine etkisi

E. coli'nin optimum büyüme sıcaklığı 37°C'dir. Ancak biyoteknolojik süreçlerde gerçekleştirilen üretimlerin oda sıcaklığında gerçekleştirilebilmesi üretim maliyetlerini azaltmaya yönelik önemli parametrelerden biridir. Bu nedenle rekombinant *E. coli*'de PHB üretimi için 24°C ve 37°C olmak üzere iki farklı sıcaklık denenmiş ve bu sıcaklık değişiminin PHB verimliliğine olan etkisi incelenmiştir. 10 g/L konsantrasyondaki Nutrient Broth ortamına ayrıca 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin eklenerek gece boyu kültüre edilmiş *E. coli* Rosetta pQEAL1124 hücrelerinden %2 aşılama yapılarak kültürler 24 saat 24°C ve 37°C'de 165 rpm'de çalkalanarak üretim gerçekleştirildi. 24 saat sonunda ortamlardaki kuru kütle ve PHB miktarları belirlendi.

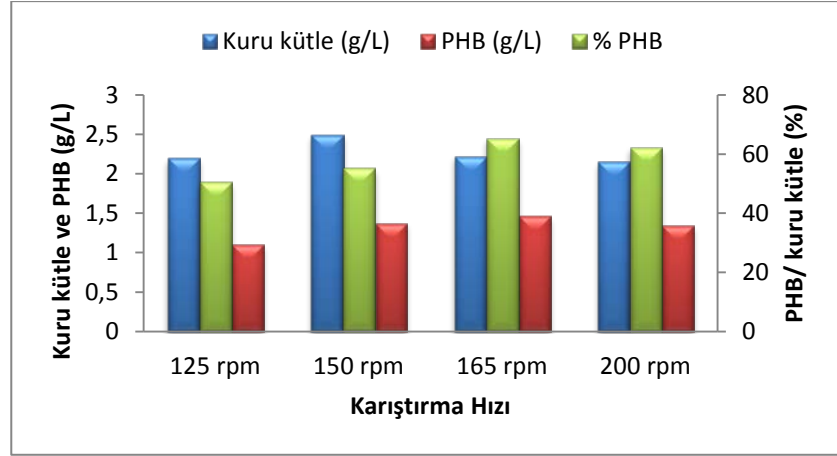


Şekil 3.21. Sıcaklığın PHB üretimine etkisi

Gerçekleştirilen sıcaklık optimizasyonu neticesinde daha önceki denemelerde kullanılan 37°C’de elde edilen sonuçlar 24°C ile elde edilen sonuçlara göre daha tatmin edicidir. 24°C’de kuru kütle, PHB ve verim miktarları sırasıyla 0,7 g/L, 0,07 g/L ve %10’dur. Aynı miktarlar 37°C için ise sırasıyla 2,5 g/L, 1,7 g/L ve %68’dir (Şekil 3.21). Bulgular 37°C sıcaklığın PHB üretimi için daha uygun olduğunu göstermiştir.

3.9 Karıştırma Hızının PHB Üretimine Etkisi

Kültür ortamında mikroorganizmaların gerek duyduğu oksijenlenme karıştırma ile sağlanmaktadır. *E. coli* hücrelerinin güçlü bir çalkalama ile jenerasyon süresinin 20 dakika olduğu bilinmektedir. Bu bağlamda pQEAL1124 plazmitine sahip rekombinant *E. coli* hücrelerinde PHB üretimine karıştırma hızının etkisini belirlemek amacıyla 4 farklı karıştırma hızı denenmiştir. 10 g/L Nutrient Broth içeren ortama 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin ilave edilmiş ve gece boyu kültüre edilmiş *E. coli* Rosetta pQEAL1124 hücrelerinden %2 aşılama yapılarak kültürler 24 saat boyunca 125 rpm, 150 rpm, 165 rpm ve 200 rpm’de kültüre edilmişlerdir.



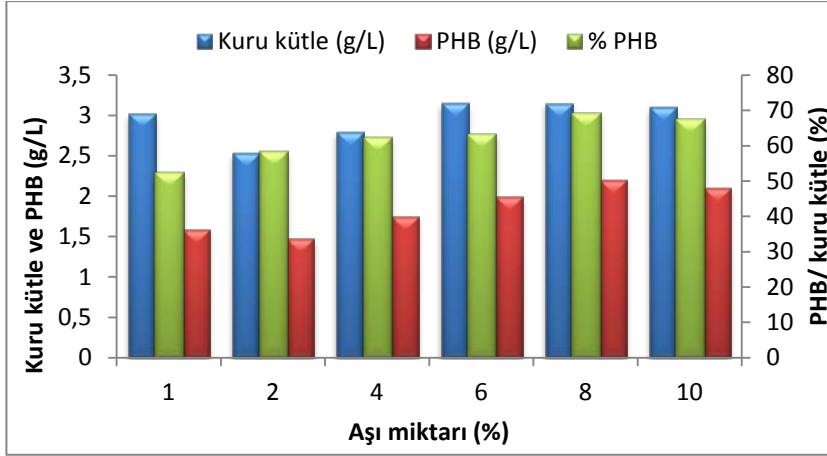
Şekil 3.22. Karıştırma hızının PHB üretimine etkisi

Şekil 3.22’de *E. coli*’de PHB üretimine karıştırma hızının etkisi gösterilmektedir. 125 rpm karıştırma hızında 2,2 g/L kuru kütle, 1,1 g/L PHB elde edilmiştir ve verim %50 dolayındadır. 150 rpm’de ise bu değerler artarak kuru kütle 2,5 g/L’ye, PHB miktarı 1,38 g/L’ye ve verim de %55’e çıkmıştır. 200 rpm karıştırma hızı ile kuru kütle 2,16 g/L, PHB 1,35 g/L ve verim %62,5 olarak bulunmuştur. Karıştırma hızı denemelerinde hem PHB miktarı hem de %cinsinden verim en yüksek olarak 165 rpm’de bulunmuştur. Bu karıştırma hızında kuru kütle miktarı 2,23 g/L, PHB miktarı 1,46 g/L ve verim ise %65,4 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Elde edilen bulgulara göre daha önceden uygulanan karıştırma hızı olan 165 rpm değerinin aynı kalmasına karar verilmiştir.

3.10 Aşı Kültür Miktarının PHB Üretimine Etkisi

Kültür işleminde aşılamanın hücre miktarının PHB üretimine etkisini tayin etmek için %1, 2, 4, 6, 8 ve 10 olacak şekilde aşı miktarı denenmiştir. Bu amaçla 10 g/L Nutrient Broth içeren ortama 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin ilave edilmiş ve gece boyu kültüre edilmiş *E. coli* Rosetta pQEAL1124 hücrelerinden farklı oranlarda aşılama yapılarak kültürler 24 saat boyunca 165 rpm’de kültüre edilmişlerdir. Kültür süresi sonunda örnek alınarak kuru kütle ve PHB miktarları belirlenmiştir.



Şekil 3.23. Aşı miktarının PHB üretimine etkisi

Rekombinant *E. coli*'de optimum aşı miktarının tespiti için yapılan çalışma sonuçları şekil 3.23'de gösterilmiştir. %8 aşılama kadar PHB verimi aşı miktarı ile doğru oranda artmıştır ancak %10 aşılama verim %8'e göre daha düşüktür. Elde edilen bulgulara göre PHB veriminin yanı sıra en yüksek kuru kütle ve PHB miktarı da %8 aşılama ile elde edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında %8 aşılamanın PHB üretiminde kullanılmasına karar verilmiştir.

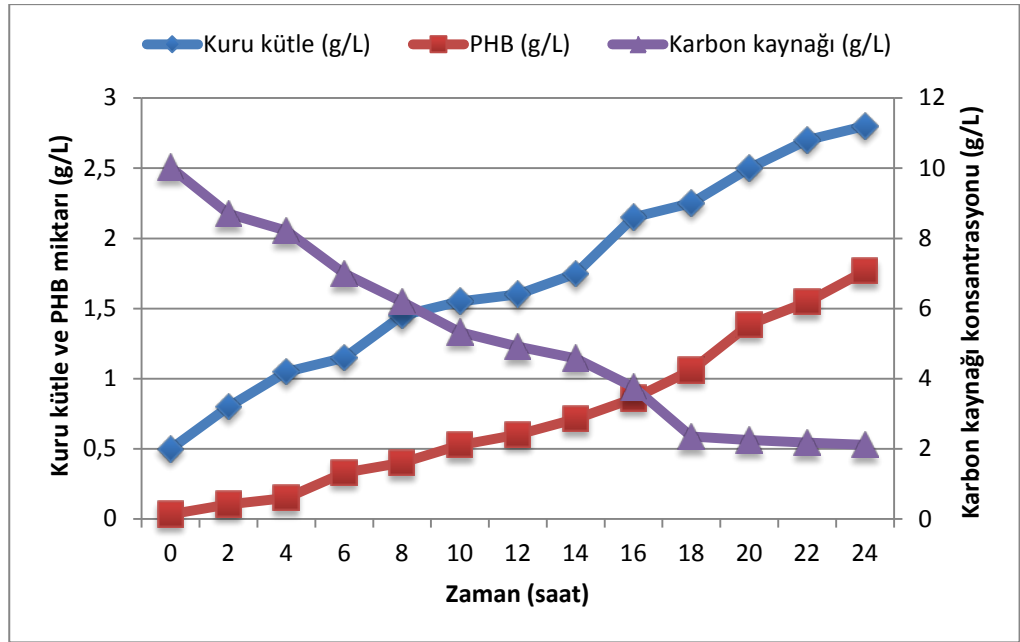
3.11 PHB üretim profilinin oluşturulması

Üretim profilinin oluşturulması amacıyla her iki saatte bir kültür ortamından örnek alınarak kuru kütle ve PHB miktarı ile karbon kaynağının değişimi incelenmiştir.

Şekil 3.24'de gerçekleştirilen üretim işlemi sonrasında kuru kütle ve PHB'nin zamana bağlı artışı ile karbon kaynağı olarak kullanılan glukozun zamana bağlı azalması gösterilmiştir.

%8 aşılama işlemi sonrasında hücre çok uzun olmayan bir logaritmik evre sonrasında (yaklaşık 6 saat) durağan faza girmiştir. Kuru kütle ile PHB miktarı ise hücre yoğunluğu ile doğru orantılı bir şekilde artmaktadır. Karbon kaynağının miktarı incelendiğinde ise diğer parametreler ile orantılı olarak bir azalış gözlemlenmektedir.

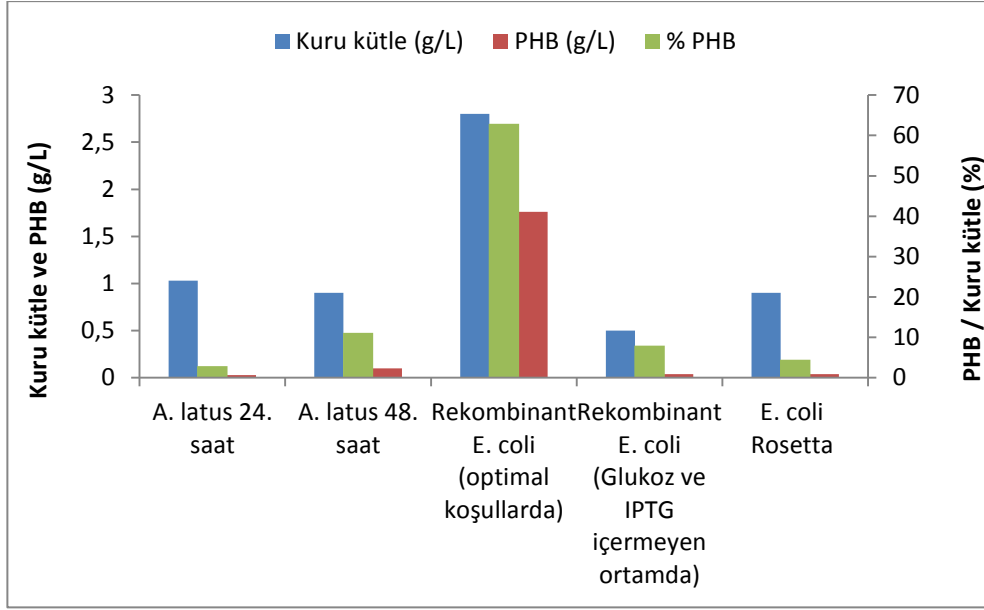
Gerçekleştirilen bu işlem neticesinde toplamda 2,8 g/L kuru kütle, 1,76 g/L PHB elde edilmiştir. Glukoz ise kültür işleminin sonlarına doğru sabitlenerek yaklaşık 2 g/L civarında kalmıştır.



Şekil 3.24. Rekombinant *E. coli*'de PHB üretim profili.

3.12 *Alcaligenes latus*, *E. coli* ve rekombinant *E. coli*'de PHB üretiminin karşılaştırılması

Doğal üretici olan *A. latus* DSM1124, rekombinant üretici ırk *E. coli* Rosetta pQEAL1124 ve doğal üretici olmayan *E. coli* Rosetta ırklarında PHB üretim farklılıklarını gözlemlemek için üretim işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla NB ortamında büyütülen *A. latus* DSM1124 ırkı 10 g/L sakkaroz içeren NB ortamına aşılanmış ve 48 saat 30°C'de 165 rpm çalkalama ile inkübe edilmiştir. Rekombinant *E. coli* Rosetta ırkında üretim işlemi için gece boyu kültürlerden 10 g/L glukoz, 10 g/L Nutrient Broth, 0,1 mM IPTG ve 0,1 mg/ml amfisilin içeren ve sadece Nutrient Broth ile antibiyotik içeren ortamlarda 24 saat boyunca belirlenmiş optimum koşullarda üretim işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca doğal üretici olmayan *E. coli* Rosetta ırkı ise 10 g/L glukoz, 10 g/L Nutrient Broth içeren besi ortamında inkübe edilmiştir. *A. latus* kültüründen 24 ve 48. saatlerde örnek alınmış, *E. coli* hücrelerinden ise 24 saat sonunda alınan örnekler ile kuru kütle, PHB ve verim analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.25. Farklı mikroorganizmalar ile PHB üretimi.

Rekombinant üretici, doğal üretici olan ve olmayan üç farklı mikroorganizma ile yapılan üretim çalışmasının sonuçları şekil 3.25'te gösterilmiştir. Sakkaroz içeren ortamda kültüre edilen *A. latus* DSM1124 ırkı 48 saat sonunda 0,1 g/L PHB üretimi gerçekleştirmiş ve PHB verimi %11'de kalmıştır. Rekombinant *E. coli* ise karbon kaynağı ve indüktör içermeyen ortamda 0,04 g/L PHB içermektedir. Aynı zamanda doğal üretici olmayan *E. coli* Rosetta ırkı 10 g/L glukoz içeren şartlarda karbon kaynağı içermeyen rekombinant üretici ile aynı miktarda yani 0,04 g/L PHB içermektedir. Bu durum rekombinant *E. coli* hücrelerinin doğal üreticiden çok daha yüksek miktarda ve verimde PHB ürettiğini göstermektedir.

3.13 Rekombinant *E.coli*'den PHB izolasyonu

Bölüm 2.2.21'de belirtilen şekilde 24 saat optimum koşullarda kültüre edilmiş rekombinant *E. coli* hücrelerinden PHB izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre peleti kurutulmuş ve beyaz toz halinde PHB biyopolimeri saflaştırılmıştır (Şekil 3.26). Saflaştırma işleminde 1,55 g/L PHB üretimi gerçekleştirmiş olan kültür kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi neticesinde yaklaşık 1,5 g/L PHB saflaştırılabilmektedir bu da saflaştırma işleminin % 96 verimde gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca saflaştırılan biyopolimerin saflığını belirlemek amacıyla

1,1 mg polimer 5 ml derişik sülfürik asit ile kaynar su banyosunda muamele edilmiş ve 235 nm’de absorbans alınarak PHB miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu işlem sonrasında 1,1 mg polimerde 1,06 mg PHB olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç saflaştırılan polimerin yaklaşık %96 saflıkta olduğunu göstermiştir.

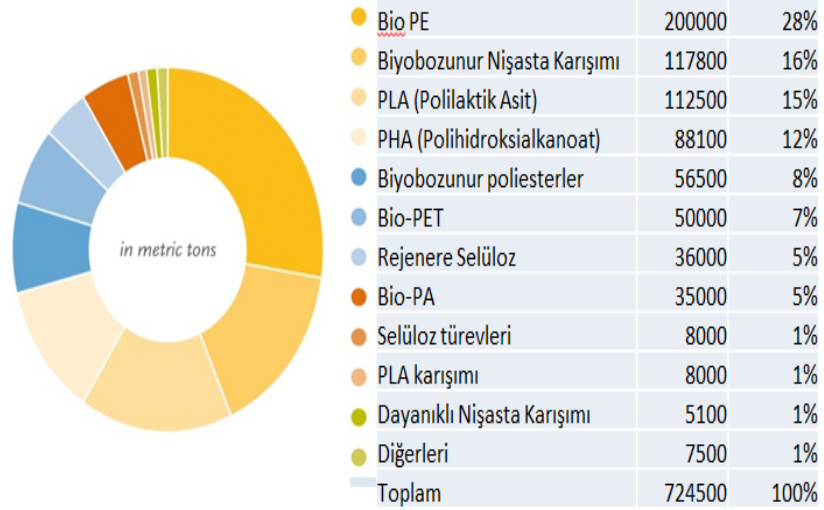


Şekil 3.26. Saflaştırılan PHB biyopolimeri

4 TARTIŞMA

Dayanıklı, ucuz ve kolaylıkla istenen özelliklere sahip olabilmeleri nedeniyle günümüzde petrol türevli plastikler metal ve ağaç gibi diğer malzemelere üstünlük sağlayarak hayatımızın her alanına girmiş ve modern yaşamın bir parçası haline gelmiştir (Chee et al., 2010; Lee, 1997; Alvarez-Chavez, 2012). Genellikle tek kullanımlık olarak üretilen plastikler günlük kullanıma sunulan ürünlerde yaygın bir şekilde kullanılmakta ve sonrasında bilinçsiz bir şekilde doğaya bırakılmaktadır. Her yıl milyonlarca ton plastik üretilmekte (2010 yılında 265 milyon ton) ve bunların çok büyük kısmı atık olarak doğaya salınmakta ve bu plastikler biyolojik bozunmaya uğramadıkları için doğada birikerek doğal yaşamı ciddi ölçüde tehdit etmektedir (Plastics europe, 2010; Chanpreteep, 2010). Dünya nüfusunun giderek artması nedeniyle plastiğe duyulan ihtiyaç her geçen gün artmakta ve tüketilen plastik miktarı da buna bağlı olarak her yıl yaklaşık %9 oranında artmaktadır (Chanpreteep, 2010). Dünyada toplam petrol tüketiminin yaklaşık %7’lik kısmı petrol türevli plastiklerin üretimi için kullanılmaktadır (Austin, 2010). Petrol kaynaklarının azalmasına paralel artan petrol fiyatlarına bağlı olarak sentetik plastiklerin fiyatının %50-80 arasında artabileceği ön görülmektedir (Chanpreteep, 2010).

Petrol bazlı plastiklerin yol açtığı doğa sorunlarını bertaraf etmek için yaygın olarak bu plastikler yakılmakta ya da geri dönüştürülmektedir ancak ortaya konan bu çözüm önerileri de sorunu tamamen ortadan kaldıramamaktadır. Son yıllarda plastiklere karşı ortaya atılan bir diğer çözüm ise bunların yerine biyolojik kaynaklı plastiklerin kullanımınıdır. Bu plastiklere örnek olarak nişasta, selüloz, PHA, PLA verilebilir. Geleneksel plastiklere alternatif olarak üretilen biyoplastiklerin kullanımı her geçen yıl artmaktadır. Dünya genelinde 2009 yılında toplam 218000 ton biyoplastik üretilirken bu rakam 2010 yılında %100’den fazla artarak 724500 tona ulaşmış ve yapılan tahminlere göre 2015 yılında 1700000 ton biyoplastik üretimi beklenmektedir (Endres and Siebert-Raths, 2011). PHA’lar 2010 yılında üretilen 724500 ton plastiğin 88100 ton ile %12’sini oluşturmaktadır (European Bioplastics, 2012) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Dünyada 2010 yılında gerçekleşen biyoplastik üretimi (European Bioplastics, 2012)

Petrol bazlı plastiklere en büyük adaylardan biri olan PHA'lar 300'den fazla mikroorganizma tarafından doğal olarak üretilen bir biyoplastiktir (Choi et al., 1998). PHA'ların geleneksel plastikler ile yarışında ki en büyük handikapı yüksek üretim maliyetleridir. Petrol bazlı plastikler 0,5-0,7 €/kg dolaylarında iken en ucuz PHA biyopolimeri 3,5 €/kg'den başlamakta ve 15 €/kg'ye kadar çıkmaktadır (Plastics europe, 2010; Endres and Siebert-Raths, 2011).

PHA'ların pazardaki payının artırılması için yüksek olan üretim maliyetlerinin düşürülmesi gerekmektedir. Bu amaçla ticari olarak PHA üretimi gerçekleştirmek için mikroorganizmalardan bitkilere ve böceklere kadar birçok organizma kullanılmıştır (Keshavarz and Roy, 2010; Khanna and Srivastova, 2007; Haleem et al., 2007; Williams, 1996; Bohmert et al., 2000). Gerçekleştirilen çalışmalarda mikroorganizmaların diğer organizmalara göre daha avantajlı olduğu görülmüştür.

Mikrobiyal PHA üretiminde başlarda doğal üretici organizmalar kullanılmakla birlikte bu organizmaların ürettikleri PHA biyopolimerlerin parçalamaları ve kolay şekilde kültüre edilememeleri gibi olumsuz yönleri araştırmacıları rekombinant organizmaların geliştirilmesine itmiştir. Bu kapsamda yaygın olarak doğal üreticilere ait PHA biyosentez genlerinin *E. coli* bakterisine aktarılarak yüksek miktarda PHA üretimi gerçekleştirilmiştir (Choi et al., 1998).

Bu çalışmada gen kaynağı olarak kullanılan *A. latus* doğal bir PHB üreticisi olup *Ralstonia eutropha* ile birlikte endüstriyel üretimde kullanılan bir organizmadır. *A. latus* rapor edilen doğal üreticiler içerisinde en yüksek verimde

ve hızlı şekilde PHB üretimi gerçekleştiren mikroorganizmadır ve bunun nedeninin de sahip olduğu PHB biyosentez genlerinin katalitik aktivitesi olduğu düşünülmektedir (Choi et al., 1998; Genser et al., 1998).

Alcaligenes latus DSM1123 ve DSM1124 ırklarına ait PHB biyosentez yolları daha önceden DSM1123 ırkı Choi ve arkadaşları, DSM1124 ırkı Genser ve arkadaşları tarafından shotgun klonlama yöntemi ile klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu yöntemde önce organizmadan genomik DNA izolasyonu yapılmış ve çeşitli restriksiyon enzimleri ile genom kesilmiş ve ardından *Ralstonia eutropha* PHB biyosentezine yakın büyüklükteki DNA fragmentleri (4-6 kb.) plazmit DNA'lara aktarıldıktan sonra *E. coli* hücrelerine transfer edilmiştir. Elde edilen klonlardan opak renkli olanlar karakterizasyon işlemine alınmışlardır. Sonuçlara göre Choi ve arkadaşları 6.3 kb'lık Genser ve arkadaşları ise 5.5 kb'lık fragmentlere sahip plazmitleri taşıyan *E. coli* hücrelerinin PHB ürettiğini belirlemişlerdir (Choi et al., 1998; Genser et al., 1998). Her iki ırka ait PHB biyosentez operonları incelendiğinde aralarında bazı farklılıkların bulunduğu görülmüştür. Gerçekleştirilen dikey hizalama işlemi neticesinde iki ırkın operonlarının %91 oranında benzediği görülmüştür. Ayrıca *A. latus* DSM 1124 ırkına ait *phbC* geni DSM 1123 ırkının *phbC* geninden yaklaşık 87 bç. daha uzundur ve kodladığı proteinde 27 aminoasit daha fazla içermektedir. Bunların dışında *A. latus* DSM 1124 ırkının PHB polimeraz enzimini kodlayan gen standart ATG başlangıç kodunu yerine alternatif olan GTG kodunu ile başlamaktadır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında büyük DNA fragmenti taşıyan plazmitlerin hücre yoğunluğunun azaldığı ve durağan fazda daha çabuk bir şekilde öldükleri bilgisinden yola çıkarak (Cheah et al., 1987) *A. latus* DSM 1124 ırkından izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılmış ve sadece PHB polimeraz geninin başlangıç kodunu ile NADP bağımlı redüktaz geninin bitiş kodonunu içine alan yaklaşık 3800 bç. uzunluğundaki DNA bölgesi PZR tekniği ile üretilmiş ve plazmit DNA moleküllerine aktarılmıştır. Gerçekleştirilen PZR işlemleri esnasında *A. latus* DSM 1124 ırkına ait PHB biyosentez geninin yüksek GC içeriğine sahip olması (%66,4) ve fragment uzunluğunun fazlalığı nedeniyle amplifikasyon problemleri ile karşılaşmış ve bu problemlerin ortadan kaldırılması için literatürde belirtildiği üzere DMSO, betain, ve bunların

kombinasyonlarını içeren çeşitli PZR katkı maddeleri kullanılmış ve 3,8 kb. uzunluğundaki PHB operonunun içeren DNA fragmenti başarılı bir şekilde amplifiye edilmiştir (Jensen et al., 2010; Roux, 1995; Sarkar et al., 1990; Henke et al., 1997).

PZR amplifikasyonu ile elde edilen operon ardından PHB üretim farklılıklarının incelenmesi amacıyla 3 farklı plazmit ve 10 farklı *E. coli* ırkına aktarılmışlardır. Elde edilen rekombinant plazmitlerden en yüksek verim vermesi beklenen bir protein ifade plazmiti olan PQE 40 plazmiti ve konakçısı olan *E. coli* Rosetta ile *E. coli* BL21 DE3 plyss ırklarıdır. Elde edilen bulgular bu hipotezi doğrular niteliktedir. Elde edilen 26 farklı üretici ırktan ilk denemelere göre pQEAL1124 vektörünü taşıyan *E. coli* Rosetta, *E. coli* JM105 ve pSPAL1124 vektörünü taşıyan *E. coli* DH5 α ırkları ön plana çıkmış ve sonraki çalışmalar neticesinde en verimli ırkın %60'ın üzerinde PHB üretimi ile *E. coli* Rosetta pQEAL1124 olduğu görülmüştür.

PHB üretim çalışmalarının artırılması amacıyla yapılan çalışmalar neticesinde aynı organizma ile maksimum hücre kuru ağırlığının maksimum %69'una kadar PHB üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Elde edilen bulgular aynı organizma ile yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında Genser ve arkadaşları gerçekleştirdikleri klonlama çalışması neticesinde 5,5 kb büyüklükteki PHB operonunu içeren pSP72 plazmitini taşıyan *E. coli* BL21 ırkında %50 civarında bir üretim gerçekleştirmiştir (Genser et al., 1998). Klonlanan DNA parçasının boyutunun azaltılması ve kullanılan konakçı ırk değiştirilmesi ile daha önceki çalışmadan daha yüksek yüzde ile PHB üretimi gerçekleştiren bir rekombinant *E. coli* ırkı elde edilmiştir.

Ayrıca çalışma kapsamında elde edilen rekombinant *E. coli* ırkı aşırı karbon kaynağı içermeyen besiyerinde ve bunun yanı sıra PHB operonu içermeyen *E. coli* aşırı glukoz içeren ortamda ve *A. latus* DSM 1124 ise sakkaroz içeren ortamda üretilmiş ve PHB üretim verimleri açısından karşılaştırılmışlardır. PHB analiz işlemleri sonunda rekombinant *E. coli* hücresinin doğal üreticilerden çok daha yüksek verimde PHB ürettiği kanıtlanmıştır. Ayrıca rekombinant *E. coli*'nin de PHB üretimini gerçekleştirebilmesi için yüksek miktarda karbon kaynağına ihtiyaç duyduğu da görülmüştür (Şekil 3.22).

PHB eksponansiyel faz da aşırı ölçüde üretilmemektedir. PHB hücrelerin büyümesi yavaşlamaya başlayınca üretilmeye başlamaktadır. Bunun sebeplerinden biri Asetil-CoA'nın bulunup bulunmama durumudur. Hücreler eksponansiyel olarak büyüdüklerinde, glikoliz ile elde edilen Asetil-CoA enerji sağlamak ve hücresel bileşenleri sentezlemek için kullanılır. Ancak kültür stasyonier faza girdiğinde bol miktarda bulunan Asetil-CoA PHB için kullanılabilecek durumdadır, çünkü hücreler daha fazla enerji ve prekürsor moleküle ihtiyaç duymazlar. Ayrıca *E. coli*'de yüksek miktarda PHB üretiminin gerçekleştirilebilmesi için yüksek miktarda gen ürününe ihtiyaç vardır (Lee et al., 1994).

Rekombinant *E. coli* kullanımına yönelik gerçekleştirilen literatür çalışmaları incelendiğinde (Çizelge 4.1), *A. latus* DSM 1123 ırkının PHB biyosentez genlerini taşıyan *E. coli* ile yapılan çalışmalar neticesinde %70'in üzerinde üretim gerçekleştirilebilmiştir (Choi et al., 1998). *Alcaligenes eutrophus* PHB biyosentez genleri aktarılmış *E. coli*'de hücre kuru ağırlığının %30'una kadar PHB üretimi sağlanmıştır (Kusaka et al., 1997). Başka bir çalışmada *Aeromonas caviae* ve *Ralstonia eutropha*'dan alınan genler ile ancak %6,5'e kadar üretim başarılabilmıştır (Sato et al., 2007). Benzer bir çalışmada Liu ve Steinbüchel *Clostridium acetobutylicum*'dan *Buk* ve *Ptb* genleri ile *Thiocapsa pfennigii*'den *phaE* ve *phaC* genlerini *E. coli*'ye aktarmış ve kuru hücre ağırlığının %68,7'si kadar 3HB ve 4HB kopolimeri üretmişlerdir (Liu and Steinbüchel, 2000). *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209 ırkına ait genleri taşıyan *E. coli* ise kuru ağırlığının maksimum %60'ına kadar PHB homopolimerini sentezlemiştir (Mahishi et al., 2003).

PHA üretimindeki yüksek maliyetleri düşürmeye yönelik olarak yüksek verimde PHA üreten mikroorganizmaların geliştirilmesinin yanı sıra daha ucuz karbon kaynaklarının kullanımı da gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda tarım artıkları, endüstri artıkları, bitkisel yağlar gibi ucuz karbon kaynakları kullanılmış ve toplam üretim maliyetlerinin azaltılması yönünde önemli adımlar atılmıştır (Santiamono et al., 2009; Kahar et al., 2004; Arun et al., 2006; Santhanam and Sasidharan, 2010).

Çizelge 4.1 Farklı rekombinant *E. coli* ırklarında PHA üretimi

PHA üreticisi ırk	PHA biyosentez genleri	PHA içeriği (%)	Referans
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>Alcaligenes latus</i>	%73	Choi et al., 1998
<i>E. coli</i> HMS 174	<i>Ralstonia eutropha</i>	%80	Liu et al., 1998
<i>E. coli</i> GSCS4401	<i>Alcaligenes latus</i>	%87	Ahn et al., 2001
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>Ralstonia eutropha</i> , <i>Clostridium kluyveri</i>	%36	Song et al., 1999
<i>E. coli</i> RS3097	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	%38	Qi et al., 1998
<i>E. coli</i>	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	%66-70	Chien et al., 2010
<i>E. coli</i>	<i>Streptomyces</i> sp., acetoacetyl-coenzyme A sentaz ve <i>phaCBRe</i>	% 10.5	Matsumoto et al., 2011
<i>E. coli</i> JM109	<i>Comamonas</i> sp. EB172 DSM 23953, <i>phaCAB</i>	% 44	Yee et al., 2012
<i>E. coli</i>	<i>Chromobacterium</i> sp. USM2 (PhaC _{CS})	%76	Bhubalan et al., 2011
<i>E. coli</i> JM 109	<i>phaC1</i>	%54	Tao et al., 2008
<i>E. coli</i> CT1061-PHB	ArcA2 mutanıtı	%51	Nikel et al., 2008

Kullanılan karbon kaynağından sonra toplam PHA üretim maliyetlerine etkileyen en önemli parametre saflaştırma sürecidir. Saflaştırma sürecinde yaygın olarak PHA dışındaki hücresel materyalin hipoklorit içerisinde ve PHA'nın da kloroform içerisinde çözündürülmesi esasına dayanmaktadır (Hahn et al., 1995; Jacquelin et al., 2008). Kullanılan bu yöntem ile yüksek miktarda çözgen ve kimyasal kullanılmakta bu durum hem çevreye zarar vermekte hem de maliyeti yükseltmektedir. Bu nedenle mevcut çalışmada saflaştırma maliyetlerini ve süresini azaltan bir yöntem kullanılmıştır (Strazzullo et al., 2008). Yöntemin temeli hücrelerin öncelikle ozmotik olarak su ile parçalanması ve ardından da hem sonikasyon hem de otoklav ile parçalanmasına ve PHB dışında kalan hücresel materyalin suda çözünmesine dayanmaktadır. Yöntemde kimyasal olarak sadece SDS deterjanı kullanılmıştır. Kullanılan ekstraksiyon yöntemi ile oldukça saf ve yüksek verimde PHB elde edilebilmiştir.

Bu tez projesi kapsamında elde edilen bulgular literatür verileri ile karşılaştırıldığında genel olarak literatürde var olan PHB verimine yakın bir verim elde edildiği açıktır.

5 SONUÇ

Yapılan araştırma bütünsel olarak değerlendirildiğinde elde edilen sonuçları aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür;

1. *Alcaligenes latus* DSM 1124 ırkına ait 3800 bç. uzunluğunda olan ve yüksek GC içeriğine sahip PHB biyosentez operonu PZR koşullarında çoğaltılmıştır.
2. Elde edilen PZR ürünü farklı özelliklere sahip 3 farklı plazmit DNA'ya aktarılarak rekombinant plazmitler elde edilmiştir.
3. Rekombinant plazmitler (pSPAL1124, pUCAL1124 ve pQEAL1124) 10 farklı *E. coli* ırkına aktarılmış ve bunlar arasındaki PHB üretim farklılıkları belirlenmiştir.
4. *E. coli* Rosetta pQEAL1124 ırkı ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları neticesinde PHB miktarının hücre kuru ağırlığına olan oranı %20'den %60'ın üzerine çıkarılmıştır.
5. Rekombinant *E. coli*'de üretilen PHB biyopolimeri basit ve kullanışlı bir yöntem ile saflaştırılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abuelhamd, A. T., Abd-el-haleem, D. A. M., Sahar, A., Amara, A. and Aboelreesh, G. M. S.,** 2007, Genetic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* to produce bacterial polyhydroxyalkanoates, *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, 11 (2): 83 – 90.
- Ahn, W.S., Park, S.J. and Lee, S.Y.,** 2001, Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 23: 235–240.
- Álvarez-Chávez, C. R., Edwards, S., Moure-Eraso, R. and Geiser, K.,** 2012, Sustainability of bio-based plastics: general comparative analysis and recommendations for improvement, *Journal of Cleaner Production*, 23: 47-56.
- Amara, A., Zaki, S., Abulhamd, A., Abulreesh, G., Engineering, G., Applications, T. and City, N. B.-elarab.,** 2007, Biosynthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates biopolymers in genetically modified yeasts, *Int. J. Environ. Sci. Tech*, 513-520.
- Arun, A., Murrugappan, R., Ravindran, A. D. D. and Veeramanikandan, V.,** 2006, Utilization of various industrial wastes for the production of poly- β -hydroxybutyrate PHB by *Alcaligenes eutrophus*, *Journal of Biotechnology*, 5: 1524-1527.
- Austin S.,** 2010, “Making oil from plastic”, <http://www.oil-price.net/en/articles/making-oil-from-plastic.php> (2010) (Erişim tarihi: 12 Mayıs 2012)
- Azhar, A., Abdelhady, H. M., Hafez, A. M. A. and Khodair, T. A.,** 2009, Batch production of polyhydroxybutyrate PHB by *Ralstonia Eutropha* and *Alcaligenes latus* using bioreactor different culture strategies, *Journal of Applied Sciences Research*, 5: 556-564.
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., Valentino, F., Vallini, G. and Villano, M.,** 2009, Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84: 901-908.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berekaa, M. M. and Thawadi, A. M. A.,** 2012, Biosynthesis of polyhydroxybutyrate PHB biopolymer by *Bacillus megaterium* SW1-2 : Application of Box- Behnken design for optimization of process parameters, *Journal of Microbiology*, 6: 838-845.
- Bhubalan, K., Chuah, J.-A., Shozui, F., Brigham, C. J., Taguchi, S., Sinskey, A. J., Rha, C. and Sudesh, K.,** 2011, Characterization of the highly active polyhydroxyalkanoate synthase of *Chromobacterium* sp. strain USM2., *Applied and environmental microbiology*, 77: 2926-33.
- Bohmert, K., Balbo, I., Kopka, J., Mittendorf, V., Nawrath, C., Poirier, Y., Tischendorf, G., Trethewey, R. N. and Willmitzer, L.,** 2000, Transgenic Arabidopsis plants can accumulate polyhydroxybutyrate to up to 4% of their fresh weight., *Planta*, 211: 841-5.
- Cai, L., Yuan, M.-Q., Liu, F., Jian, J. and Chen, G.-Q.,** 2009, Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates PHA by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442., *Bioresource technology*, 100: 2265-70.
- Chaijamrus, S. and Uduay, N.,** 2008, Production and characterization of polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748, *Agricultural Engineering X*: 1-12.
- Chanprateep, S.,** 2010, Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates., *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 110: 621-32.
- Cheah U.E., Weigand W.A. and Stark B.C.,** 1987, Effects of recombinant plasmid size on cellular processes in *Escherichia coli*, *Plasmid*, 18 (2): 127-134.
- Chee, J.-yee, Yoga, S.-salim, Lau, N.-sean, Ling, S.-chen, and Abed, R. M. M.,** 2010, Bacterially produced polyhydroxyalkanoate PHA : Converting renewable resources into bioplastics, *Current Research, Technology And Education Topics in Applied Microbiology And Microbial Biotechnology*, 1395-1404.
- Chen G-Q.,** 2010, *Plastics from bacteria*, Springer, Münster, 453 p
- Choi, J. and Lee, S. Y.,** 1999, Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 13-21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Choi, Jong-il, Sang YUP Lee, and Kyuboem Han.,** 1998, Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 64: 4897-4903.
- de. Rijk, I. T. C. D., Meer, I. P. V. D. and Eggink, G.,**2005, Methods for analysis of Poly(3-hydroxyalkanoate) composition, *Analysis*, 1-12.
- Domb A. J., Kost J. and Wiseman D.M.,** 1998, Handbook of Biodegradable Polymers, CRC Press, 544 p.
- Endres H-J. and Siebert-Raths A.,** 2011, Engineering Biopolymers Markets, Manufacturing, Properties and Applications, Hanser Publishers, Munich, 674 p.
- Gengadharan, V. and Ramadas, V.,** 2011, Microbial production of biopolymer polyhydroxybutyrate PHB by *Azotobacter vinelandii* using maize cob as a raw material, *International Journal of Environmental Science and Development*, 2: 8-11.
- Genser, K. F., Renner, G. and Schwab, H.,** 1998, Molecular cloning , sequencing and expression in *Escherichia coli* of the poly 3-hydroxyalkanoate synthesis genes from *Alcaligenes latus* DSM1124, *Journal of Biotechnology*, 64: 123 - 135.
- Grothe, E., Moo-young, M. and Chisti, Y.,** 1999, Fermentation optimization for the production of poly (hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic, *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 132-141.
- Guerry, P., D.J. LeBlanc and Falkow S.,** 1973, General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 116(2): 1064-1066.
- Hahn, J. J., Eschenlauer, A. C., Narrol, M. H., Somers, D. A. and Srien, F.,** 1997, *Alcaligenes eutrophus* Poly-hydroxybutyrate synthesis pathway, *Biotechnol. prog.*, 347-354.
- Hahn, S. E. I. K., Chang, Y. K. and Lee, S. Y. U. P.,** 1995, Recovery and characterization of poly 3-hydroxybutyric acid synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recombinant *Escherichia coli*, *Applied And Environmental Microbiology*, 61: 34-39.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S. and Chang, H. N.,** 1994, Optimization of microbial poly 3-hydroxybutyrate recovery using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 256-261.
- Hempel, F., Bozarth, A. S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A. and Maier, U. G.,** 2011, Microalgae as bioreactors for bioplastic production., *Microbial Cell Factories*, 10: 81.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D. and Loening, S. A.,** 1997, Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences., *Nucleic acids research*, 25: 3957-8.
- Horng, Y.-T., Chien, C.-C., Wei, Y.-H., Chen, S.-Y., Lan, J. C.-W., Sun, Y.-M. and Soo, P.-C.,** 2011, Functional cis-expression of phaCAB genes for poly3-hydroxybutyrate production by Escherichia coli., *Letters in Applied Microbiology*, 52: 475-83.
- Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S. and Wang, S. S.,** 2008, Isolation and purification of bacterial poly3-hydroxyalkanoates, *Biochemical Engineering Journal*, 39: 15-27.
- Jensen, M. a, Fukushima, M. and Davis, R. W.,** 2010, DMSO and betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in de novo synthesis., *PloS one*, 5: e11024.
- Jiang, Y., Song, X., Gong, L., Li, P., Dai, C. and Shao, W.,** 2008, High poly β -hydroxybutyrate production by Pseudomonas fluorescens A2a5 from inexpensive substrates, *Enzyme and Microbial Technology*, 42: 167-172.
- Jung, I. L., Phyoo, K. H., Kim, K. C., Park, H. K. and Kim, I. G.,** 2005, Spontaneous liberation of intracellular polyhydroxybutyrate granules in Escherichia coli., *Research in microbiology* 156, 865-73.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. and Doi, Y.,** 2004, High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by Ralstonia eutropha and its recombinant strain, *Polymer Degradation and Stability* 83, 79-86.
- Khardenavis, A. Kumar, M.S., Mudiar, S.N. and Chakrabarti, T.,** 2007, Biotechnological conversion of agro- industrial wastewater into biodegradable plastics, poly- β -hydroxybutyrate, *Bioresource Technology*, 98: 3579-3584.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Keshavarz, T. and Roy, I.**, 2010, Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda., *Current Opinion In Microbiology*, 13: 321-6.
- Khanna, S. and Srivastava, A. K.**, 2007, Polyhydroxybutyrate—an alternative to plastics, btc.iitkgp.ernet.in (Erişim tarihi; 10 Mayıs 2010).
- Kumar, B. S. and Prabakaran, G.**, 2006, Production of PHB bioplastics using bio-effluent as substrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Indian Journal of Biotechnology*, 5: 76-79.
- Kunasundari, B.**, 2011, Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates, *Express Polymer Letters*, 5: 620-634.
- Kusaka, S., Abe, H., Lee, S. Y. and Doi, Y.**, 1997, Molecular mass of poly[R-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*., *Applied Microbiology And Biotechnology*, 47: 140-3.
- Law, K.-H., Leung, Y. U.-C., Lawford, H., Chua, H., Lo, W.-H. and And Yu, P. H.**, 2001, Production of Polyhydroxybutyrate by *Bacillus* Species Isolated from municipal activated sludge, *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 91-93.
- Leaf, T. A., Peterson, M. S., Stoup, S. K., Somers, D. and Srienc, F.**, 1996, *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacterial polyhydroxybutyrate synthase produces poly-3-hydroxybutyrate., *Microbiology*, 142: 1169-1180.
- Lee, S. Y.**, 1997, January *E. coli* moves into the plastic age., *Nature Biotechnology*, 15: 17-18
- Lee, S. Y.**, 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. and Choi, J.-il.**, 1998, Effect of fermentation performance on the economics of poly-3-hydroxybutyrate production by *Alcaligenes latus*, *Polymer Degredation and Stability*, 3910: 387-393.
- Liu, F., W. Li, D. Ridgway and T. Gu.**, 1998, Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, Vol 20 No.4: 345-348.
- Liu, S. J. and Steinbüchel, A.**, 2000, A novel genetically engineered pathway for synthesis of polyhydroxyalkanoic acids in *Escherichia coli*., *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 739-43.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lo, K. W., Chua, H., Lawford, H., Lo, W. H. and Yu, P. H. F.,** 2005, Effects of fatty acids on growth and poly-3-hydroxybutyrate production in bacteria., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 575-80.
- Loo, C.-yee, and Sudesh, K.,** 2007, Polyhydroxyalkanoates : Bio-based microbial plastics and their properties, *Polymer Journal*, 2: 31-57.
- Lu, X.-yun, Wu, Q., Zhang, W.-jiao, Zhang, G. and Chen, G.-qiang.,** 2004, Molecular Cloning of Polyhydroxyalkanoate Synthesis Operon from *Aeromonas hydrophila* and Its Expression in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Prog.*, 1332-1336.
- Madison, L. L. and Huisman, G. W.,** 1999, Metabolic Engineering of Poly 3-Hydroxyalkanoates : From DNA to Plastic, *Microbiology and molecular biology reviews*, 63, 21-53.
- Mahishi, L. H., Tripathi, G. and Rawal, S. K.,** 2003, Poly 3-hydroxybutyrate PHB synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes : Effect of various carbon and nitrogen sources, *Microbiol. Res.*, 158: 19-27.
- Menzel, G., Harloff, H.-J. and Jung, C.,** 2003, Expression of bacterial poly3-hydroxybutyrate synthesis genes in hairy roots of sugar beet *Beta vulgaris* L., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 571-6.
- Mohammadi, M. and Ali, M.,** 2011, Recovery and purification of intracellular polyhydroxyalkanoates from recombinant *Cupriavidus necator* using water and ethanol, *Biotechnol Lett.*,
- Nikel, P. I., de Almeida, A., Melillo, E. C., Galvagno, MA. and Pettinari, M. J.,** 2006, New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly3-hydroxybutyrate from agroindustrial by-products, *Applied and Environmental Microbiology*, 72. 3949-54.
- Nikel PI, Pettinari MJ, Galvagno MA. and Mendez BS.** 2008, Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77: 1337-1343
- Philip, S., Keshavarz, T. and Roy, I.,** 2007, Polyhydroxyalkanoates : biodegradable polymers with a range of applications, *Chemical Technology*, 247: 233-247.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Plasticker, 2011**, http://plasticker.de/preise/preise_monat_multi_en.php (Erişim tarihi: 06 Aralık 2011).
- Plastics Europe, 2010**, Plastics - the Facts 2011 An Analysis of European Plastics Production, Demand and Recovery for 2010, European plastics manufacturers annual report, 32 p.
- Poirier, Y., Erard, N. and MacDonald-Comber Petétot, J., 2002** Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Pichia pastoris*., *FEMS Microbiology Letters*, 207: 97-102.
- Purwadi, R., 2006**, Fermentation production of poly 3-hydroxyalkanoates, Manuscript.
- Qi, Q., Steinbuchel, A. and Rehm, B.H., 1998**, Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (fadR): inhibition of fatty acid beta-oxidation by acrylic acid. *FEMS Microbiol. Lett.*, 167: 89–94.
- Ramsay JA, Berger E, Ramsay BA. and Chavarie C., 1994**, Recovery of poly-3-hydroxyalkanoic acid granules by a surfactant–hypochlorite treatment. *Biotechnol. Techning*, 9(10):709-712.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R. and Kalia, V. C., 2003**, Polyhydroxyalkanoates : an overview, *Bioresource Technology*, 87: 137-146.
- Ribera, R. G., Monteoliva-sanchez, M. and Ramos-cormenzana, A., 2001**, Production of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas putida* KT2442 harboring pSK2665 in wastewater from olive oil mills alpechín , *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Romano, A., van der Plas, L. H. W., Witholt, B., Eggink, G. and Mooibroek, H., 2005**, Expression of poly-3-R-hydroxyalkanoate PHA polymerase and acyl-CoA-transacylase in plastids of transgenic potato leads to the synthesis of a hydrophobic polymer, presumably medium-chain-length PHAs., *Planta*, 220: 455-64.
- Roux, K. H., 1995**, Optimization and Troubleshooting in PCR, *Genome Research*, 185-194.
- Sambrook, J. and Russell D., 2001**, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3 ed. Cold Spring Harbour Laboratory

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Santhanam, A. and Sasidharan, S.**, 2010, Microbial production of polyhydroxy alkanotes PHA from *Alcaligenes* spp. and *Pseudomonas oleovorans* using different carbon sources, *Journal of Biotechnology*, 9: 3144-3150.
- Santiamono M.C. and Parabhu N.N, G. S.**, 2009, PHA Production Using Low-Cost Agro-Industrial Wastes by *Bacillus* sp. Strain COL1A6, *Research Journal of Microbiology*, 4: 89-96.
- Sarkar, G., Kapelner, S. and Sommer, S. S.**, 1990, Formamide can dramatically improve the specificity of PCR, *Nucleic Acid Research*, 7465-7465.
- Sato, S., Nomura, C. T., Abe, H., Doi, Y. and Tsuge, T.**, 2007, Poly[R-3-hydroxybutyrate] formation in *Escherichia coli* from glucose through an enoyl-CoA hydratase-mediated pathway., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103: 38-44.
- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D. and Foglia, T. A.**, 2003, Effect of inactivation of polyhydroxyalkanoates depolymerase gene on the properties of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas resinovorans*., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 536-43.
- Solaiman, D. K. Y., Swingle, B. M. and Ashby, R. D.**, 2010, A new shuttle vector for gene expression in biopolymer-producing *Ralstonia eutropha*., *Journal of Microbiological Methods*, 82: 120-3.
- Song, S., Hein, S. and Steinbuchel, A.**, 1999, Production of poly(4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.*, 21: 193–197.
- Strazzullo, G., Gambacorta, A., Monica, F., Immirzi, B., Romano, I., Calandrelli, V. and Nicolaus, B.**, 2008, Chemical-physical characterization of polyhydroxyalkanoates recovered by means of a simplified method from cultures of *Halomonas campaniensis*, *Applied Microbiology*, 1513-1519.
- Sudesh, K. and Abe, H.**, 2010 Practical Guide to Microbial Polyhydroxyalkanoates, Smithers, Shawbury, p 158.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. and Shah, S.,** 2007, Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review., *Biotechnology Advances*, 25: 148-75.
- Talon, O. and Berezina, N.,** 2011, Method for rapid control of bacterial PHA production through thermogravimetric analysis, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 86: 1195-1197.
- Tao J, Zheng CG, Zhang B, Guo WB, Wang SF. and Sun CJ.,** 2008, Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate by two types of (PHAMcL) by *Pseudomonas mendocina* NK.01. *Microbiology*, 35(5): 782-787
- Thakor, N., Trivedi, U. and Patel, K. C.,** 2005, Biosynthesis of medium chain length poly3-hydroxyalkanoates mcl-PHAs by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils., *Bioresource Technology*, 96: 1843-50.
- Tilbrook, K., Gebbie, L., Schenk, P. M., Poirier, Y. and Brumbley, S. M.,** 2011, Peroxisomal polyhydroxyalkanoate biosynthesis is a promising strategy for bioplastic production in high biomass crops., *Plant Biotechnology Journal*, 1-12.
- Tsuda, H.,** 2012, Generation of poly- β -hydroxybutyrate from externally provided acetate in rice root, *Plant Physiology and Biochemistry*, 50: 35-43
- Salmiati, Ujang, Z., Salim, M. R. and Olsson, G.,** 2009, Recovery of Polyhydroxyalkanoates PHAs from Mixed Microbial Cultures by Simple Digestion and Saponification 8-15.
- Williams, M. D., Rahn, J. a, Smith, S., Joshi, a K. and Sherman, D. H.,** 1998, Production of a polyhydroxyalkanoate biopolymer in insect cells with a modified eucaryotic Fatty Acid synthase., *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 383.
- Williams, S. F. and Martin, D. P.,** 1996, Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy, *Medicine*, 1-38.
- Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M. and Peoples, O. P.,** 1999, PHA applications : addressing the price performance issue I . Tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 25: 111 - 121.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, Y.-H., Brigham, C., Willis, L., Rha, C. and Sinskey, A.**, 2011, Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates PHAs., *Biotechnology Letters*, 33: 937-42.
- Yee, L.-N., Chuah, J.-A., Chong, M.-L., Phang, L.-Y., Raha, A. R., Sudesh, K. and Hassan, M. A.**, 2012, Molecular characterisation of phaCAB from *Comamonas* sp. EB172 for functional expression in *Escherichia coli* JM109, *Microbiological Research*, 6-13.
- Yu, P. H., Chua, H., Huang, a L. and Ho, K. P.**, 1999, Conversion of industrial food wastes by *Alcaligenes latus* into polyhydroxyalkanoates., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 445-54.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Yunus ENSARİ
Doğum Tarihi: 30/09/1985
Doğum Yeri: İstanbul
Medeni Hali: Bekar
Adres: Ergene mahallesi, 544 sokak, No 19, C blok D:11
Bornova/İZMİR
Mobil Telefon: 0544 739 7201
Email : yunusensari85@gmail.com

Eğitim bilgileri

Yüksek Lisans (2009-2012): Ege Üniversitesi – Fen Bilimleri Ens.
Biyoteknoloji A.B.D
Lisans (2004-2009): Anadolu Üniversitesi – Fen Fak. Biyoloji Bölümü

Katıldığı Eğitimler

- Real-Time PCR ve İleri Uygulamaları. 20 Kasım 2010.
- Metabolizma Mühendisliği Lisansüstü Yaz Okulu 20-25 Haziran 2011 (Teknik komite).
- Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Lisansüstü Yaz Okulu. 4-9 Temmuz 2011.

Katıldığı Sempozyumlar

- Programlı Hücre Ölümü 9.Nisan 2008, İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi. İstanbul
- Evrin Konferansı. 3-4 Aralık 2011. Orta Doğu Teknik Üniversitesi. Ankara

-Evrin Sempozyumu. 17-18 Aralık 2011. Boğaziçi Üniversitesi. İstanbul

Ulusal Kongreler

-Ege Üniversitesi 1. Moleküler Biyoloji Ve Genetik Öğrenci Kongresi 27-30 Ağustos 2008 İZMİR

-Ege Üniversitesi Uluslar Arası Katılımlı 3. Moleküler Biyoloji Ve Genetik Araştırma Ve Uygulama Platformu 27-30 Ağustos 2009 İZMİR.

Uluslararası Kongreler

- The International Congress on Bioinformatics and Biomics, May 2011, Kusadasi-Aydın.
- European Biotechnology Congress 2011, 28 September- 1 October 2011, Istanbul-TURKEY.

Sunumlar

1. Yunus Ensari, Muhittin Arslanyolu (2009). Lisans Bitirme Tez Araştırmalarında Literatürün Tekrarlanabilirliği: *Thermus aquaticus* DNA Polimeraz (Taq) Enziminin *E. coli* 'de Rekombinant Protein Olarak Üretimi Ve Aktivite Analizi. Ege Üniversitesi Uluslar Arası Katılımlı 3. Moleküler Biyoloji Ve Genetik Araştırma & Uygulama Platformu, Ağustos 2009, İzmir.(Sözlü Bildiri)
2. Sercan Sahutoğlu, Yunus Ensari, Tuğba Demir, Seçil Önal, Nurdan Pazarlıoğlu (2009). *Pycnopus cinnabarinus* ' tan Derin Kültür Yöntemi İle α -D-Galaktosidaz Üretimi. XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Aralık 2009, Antalya. (Poster Sunumu)
3. Yunus Ensari, Nurdan Pazarlıoğlu (2010) *Alcaligenes latus* Phbcab Genleri Klonlanmış Rekombinant *E.coli*'de Error-Prone Pcr Metodu İle Phb Üretiminin Arttırılması. 1. Ege Ar-Ge ve Teknoloji Günleri – AreGE, Aralık 2010, İzmir. (Poster Sunumu)
4. Yunus Ensari, Emre Erden, Nurdan Pazarlıoğlu (2011) PHA PRODUCTION by DIFFERENT RECOMBINANT *Escherichia coli*

STRAINS. The International Congress on Bioinformatics and Biomics, May 2011, Kusadasi-Aydin. (Poster Sunumu)

5. Yunus Ensari, Emre Erden, Nurdan Pazarlıoğlu (2011) METABOLIC APPROACHES FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES. The International Congress on Bioinformatics and Biomics, May 2011, Kusadasi-Aydin. (Poster Sunumu)
6. Yunus Ensari, Alper Akkaya, Nurdan Pazarlıoğlu (2011) Capstems as Nutrient for the PHB Production. European Biotechnology Congress 2011, 28 September- 1 October 2011, Istanbul-TURKEY. . (Poster Sunumu)
7. Sercan Sahutoğlu, Yunus Ensari, Nurdan Pazarlıoğlu (2011) Isolation of Ethanol-Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strains by Using a Novel Mutagenesis Method. European Biotechnology Congress 2011, 28 September- 1 October 2011, Istanbul-TURKEY. . (Poster Sunumu)