

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HALOFİLİK ARKELERDE POLİHİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMİNİN
BELİRLENMESİ VE OPTİMİZASYONU**

Eylem TÜRE

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**SAMSUN
2019**

Her hakkı saklıdır.

TEZ ONAYI

Eylem TÜRE tarafından hazırlanan “Halofilik Arkelerde Polihidroksibütirat Üretiminin Belirlenmesi ve Optimizasyonu” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç. Dr. Metin KONUŞ

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz KAYA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yukardaki sonucu onaylarım/..../2019

Prof. Dr. Bahtiyar ÖZTÜRK

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

...../...../.....

Eylem TÜRE



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

HALOFİLİK ARKELERDE POLİ- β -HİDROKSİBÜTİRAT ÜRETİMİNİN BELİRLENMESİ VE OPTİMİZASYONU

Eylem TÜRE

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Poli- β -hidroksibütiratlar (PHB), stres koşulları altında bir karbon ve enerji kaynağı olarak arke ve bakteri hücrelerinde biriktirilen biyoplastiklerdir. Petrol türevli plastikler doğada ciddi çevre sorunlarına neden olurken PHB'ler, biyolojik olarak çözünebilir plastiklerin üretimi için çok önemli bir alternatif sunmaktadırlar. Ancak, üretim maliyeti diğer plastiklerden daha yüksek olduğundan, etkin bakteri suşlarının geliştirilmesi, fermentasyon ve geri kazanım süreçlerinin optimizasyonu çalışmaları oldukça önemlidir. Bu çalışmada, tuzcul habitatlardan daha önceden izole edilmiş on adet haloarke suşunun en iyi üreme gösterdiği sıcaklık 37 °C olarak belirlenmiş ve MSM besiyerinde %PHB verimleri karşılaştırılmıştır. En iyi %PHB veriminin elde edildiği *Haloarcula* sp. TG1 suşunda denenen beş farklı besiyeri kombinasyonu arasında, SW25 ön kültür ve MSM fermentasyon besiyeri tercih edilmiştir. Farklı sıcaklık ve pH değerleri ile farklı NaCl konsantrasyonlarında suşa ait MSM kültürlerinde PHB birikimi tespit edilmiştir. Buna göre, *Haloarcula* sp. TG1 suşunda en yüksek %PHB verimi için optimum koşullar 37 °C sıcaklık, pH: 7.35 ve 5 M NaCl olarak belirlenmiştir. Optimum inkübasyon süresi ise 72 saat olarak bulunmuştur. Bu koşullarda, *Haloarcula* sp. TG1 suşunda PHB birikimi, hücre kuru ağırlığının %34,64'üne ulaşmıştır. Karbon kaynağı olarak kullanılan glukozun yerine nişasta ve gliserol kullanıldığında %PHB veriminde düşüş gerçekleşmiştir. Çalışmanın devamında, MSM fermentasyonunda ucuz karbon kaynağı olarak tarımsal atıklar (şeker pancarı küspesi, mısır koçanı ve fındık zurufu) kullanılmıştır. Şeker pancarının %27,99 oranla en iyi %PHB verimini sağladığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, *Haloarcula* sp. TG1'de optimum koşullarda ve ucuz maliyetli fermentasyon besiyerinde biyoteknolojik açıdan umut verici oranda PHB birikimi sağlanmaktadır.

Ocak 2019, 83 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Haloarcula* sp.TG1, Polihidroksibütirat (PHB), Optimizasyon, Tarımsal atık

ABSTRACT

Master's Thesis

DETERMINATION AND OPTIMIZATION OF POLY- β -HYDROXYBUTYRATE PRODUCTION IN HALOPHYLIC ARCAEA

Eylem TÜRE

Ondokuz Mayıs University
Graduate School of Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Poly- β -hydroxybutyrates (PHB) are bioplastics which accumulate in the cells of archaea and bacteria as a source of carbon and energy sources under stress conditions. While petroleum-derived plastics cause serious environmental problems in nature, PHBs offer an important alternative for the production of biodegradable plastics. However, since the cost of production is higher than that of other plastics, the development of effective bacterial strains, optimization of fermentation and recovery processes are very important. In this study, the best temperature for growth of ten haloarchaeal strains isolated from saline environments previously was determined as 37 °C and their %PHB yields were compared in MSM medium. Among the five different combinations of media tested, SW25 preculture and MSM fermentation broth were preferred for PHB production in *Haloarcula* sp TG1 strain from which the best % PHB yield was obtained. The PHB accumulation in MSM cultures of the strain was determined at different NaCl concentrations with different temperature and pH values. The optimum incubation time was found as 72 hours. In these conditions, the PHB accumulation of the *Haloarcula* sp TG1 strain reached 34,64% of the dry cell weight. When starch and glycerol were used instead of glucose as a carbon source, %PHB yield was lowered. Next, agricultural wastes (sugar beet pulp, corn cob and green hazelnut shell) were used as a cheap carbon source in MSM fermentation. And, the best PHB yield of 27,99% was obtained by the use of sugar beet. In conclusion, *Haloarcula* sp. TG1 provides a biotechnologically promising rate of PHB accumulation in optimum conditions and in a low-cost fermentation medium.

January 2019, 83 pages

Keywords: *Haloarcula* sp. TG1, Polyhydroxybutyrate (PHB), Optimization, Agricultural waste

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

Yüksek Lisans eğitimim sırasında bilimsel bilgilerini benimle paylaşan ve her türlü konuda büyük desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım değerli hocam Sn. Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli Araş. Gör. Zafer SEÇGİN'e değerli çalışma arkadaşlarım Dok. Öğr. Büşra ABANOZ SEÇGİN, Dok. Öğr. Çiğdem OTUR, Haktan ŞAFAK, Çağrı AKCAN, Merve BUDAK, Kazım AKÇAY ve Mutlu YALÇIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenim hayatım boyunca gösterdikleri maddi manevi her türlü destekleri ve fedakarlıkları için Aileme, Mustafa ve Ayten HIRKALI çiftine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması PYO.ZRT.1904.17.056 numaralı “Halofilik Arkelerde Polihidroksibütirat Üretiminin Belirlenmesi ve Optimizasyonu” başlıklı Bilimsel Araştırma Projesi olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Ocak 2019, Samsun

Eylem TÜRE

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Polihidroksialkonatlar (PHA).....	3
2.2. Polihidroksibütiratlar (PHB): Tanımı ve Tarihçesi.....	5
2.3. PHB'nin Genel Özellikleri	6
2.4. PHB Sentezi	7
2.5. PHB'nin Kullanım Alanları	9
2.6. PHB'nin Biyolojik Olarak Parçalanabilirliği	10
2.7. PHB'nin Ziraatte Kullanımı	11
2.8. PHB'nin Maliyet Azaltılması Çalışmaları: PHB Üretimi İçin Ucuz Kaynakların Değerlendirilmeleri	12
2.9. Halofilik Mikroorganizmalar ve Biyoteknolojik Önemleri.....	16
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar, Besiyerleri ve Kültür Koşulları.....	22
3.2. Çözeltiler	23
3.3. Kimyasallar	23
3.4. Suşların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi	23
3.5. Hücre Kuru Ağırlığının Belirlenmesi.....	23
3.6. PHB Ekstraksiyonu	23
3.7. PHB Standartının Hazırlanması	24
3.8. PHB Üretiminin Optimizasyonu	25
3.8.1. Sıcaklık etkisi.....	25
3.8.2. pH etkisi	25
3.8.3. NaCl etkisi.....	25
3.8.4. İnkübasyon süresinin etkisi.....	25
3.8.5. Farklı karbon kaynaklarının etkisi	25
3.8.6. Tarımsal atıkların karbon kaynağı olarak besiyerine eklenmesi.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Suşların 37 °C ve 50 °C Sıcaklıklarda SG Besiyerindeki Üreme Profilleri....	27
4.2. Suşların PHB Üretimlerinin Belirlenmesi.....	37
4.3. Farklı Besiyeri Kombinasyonlarının <i>Haloarcula</i> sp. TG1, ÇKT3 ve <i>Halolamina</i> sp. YKT2 Suşlarının %PHB Verimleri Üzerine Etkisi.....	39
4.4. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 Suşunda PHB Üretiminin Optimizasyonu	42
4.4.1. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunun %PHB verimi üzerine farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisi.....	42
4.4.2. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunun %PHB verimi üzerine pH etkisi	43
4.4.3. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunun %PHB verimi üzerine NaCl etkisi.....	45

4.4.4. Optimum koşullarda <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunda en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi	47
4.4.5. Farklı karbon kaynaklarının <i>Haloarcula</i> sp. TG1’de %PHB birikimi üzerindeki etkisi.....	48
4.1.1. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunun MSM besiyerinde karbon kaynağı olarak tarımsal atıkların kullanımı ve %PHB verimi üzerindeki etkileri	50
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	56
EKLER.....	65
EK 1 BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI VE İÇERİKLERİ.....	66
EK 2 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER.....	69
EK 3 KİMYASALLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	71



SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

° C	: Santigrat Derece
g	: Gram
l	: Litre
Mm	: Milimolar
M	: Molarite
rpm	: (Revolution Per minute) Dakikadaki devir sayısı
sn	: Saniye
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
UV	: Ultraviyole
%	: Yüzde
nm	: Nanometre

KISALTMALAR

PHA	: Polihidroksialkanoat
PHB	: Polihidroksibütirat
NaCl	: Sodyum klorür
dH ₂ O	: Distile (Saf) Su
EM	: Elektron mikroskobu
Mt	: Milyon ton
Da	: Dalton

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. PHA'ların genel formülü (Anjum vd, 2016).....	4
Şekil 2.2. PHB biyosentez yolağı (Lee, 1996)	8
Şekil 2.3. PHB'nin parçalanması ve sentezi (Lafferty vd, 1988).....	11
Şekil 2.4. Küçük alt ünite rRNA gen dizisinden faydalanarak oluşturulmuş filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların dağılımı (Oren, 2008)	18
Şekil 3.1. PHB miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik	24
Şekil 4.1. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	28
Şekil 4.2. <i>Haloarcula</i> sp. TG2 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	29
Şekil 4.3. <i>Haloarcula</i> sp. TG3 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	30
Şekil 4.4. <i>Haloarcula</i> sp. TG4 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	31
Şekil 4.5. <i>Haloarcula</i> sp. TG5 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	32
Şekil 4.6. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT1 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	33
Şekil 4.7. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT2 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	34
Şekil 4.8. <i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	35
Şekil 4.9. <i>Halolamina</i> sp. YKT1 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri	36
Şekil 4.10. <i>Halolamina</i> sp. YKT2 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri.....	37
Şekil 4.11. Suşlara ait MSM kültürlerinde kuru hücre ağırlığına göre %PHB üretimi <i>Haloarcula</i> sp. TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3, <i>Halolamina</i> sp. YKT1 ve YKT2.....	38
Şekil 4.12. Suşların farklı besiyeri kombinasyonlarında PHB üretimleri ve %PHB verimleri	41
Şekil 4.13. Suşların AS168-MST kültürlerindeki %PHB verimleri	41
Şekil 4.14. <i>Haloarcula</i> sp. TG1'e ait MSM kültürlerinde farklı inkübasyon sıcaklıklarında HKA, PHB üretimi ve %PHB verimi.....	43
Şekil 4.15. <i>Haloarcula</i> sp. TG1'in farklı pH değerlerinde %PHB verimi.....	44
Şekil 4.16. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunda farklı NaCl konsantrasyonlarındaki %PHB verimi	46
Şekil 4.17. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunda optimum kültür koşullarında zamana bağlı %PHB verimi	48
Şekil 4.18. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunun farklı karbon kaynakları varlığında %PHB verimi	49
Şekil 4.19. <i>Haloarcula</i> TG1 suşunun tarımsal atıklar kullanılarak PHB üretimi	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması (Kushner, 1985).....	17
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar	22
Çizelge 4.1. Suşlara ait MSM kültürlerinde %PHB verimleri	38
Çizelge 4.2. Suşların PHB üretimlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan besiyeri kombinasyonları	39
Çizelge 4.3. Suşlara ait farklı kültürlerde PHB üretimleri ve %PHB verimleri	39
Çizelge 4.4. <i>Haloarcula</i> sp. TG1'e ait MSM kültürlerinde farklı inkübasyon sıcaklıklarında HKA, PHB üretimi ve %PHB verimi	42
Çizelge 4.5. <i>Haloarcula</i> sp. TG1'e ait farklı pH değerlerindeki MSM kültürlerinde HKA, PHB birikimi ve %PHB verimi	44
Çizelge 4.6. <i>Haloarcula</i> sp. TG1'in ait farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren MSM kültürlerinde HKA, PHB birikimi ve %PHB verimi.....	45
Çizelge 4.7. <i>Haloarcula</i> sp. TG1 suşunda optimum kültür koşullarında zaman bağlı %PHB verimi	47

1. GİRİŞ

Petrol türevli plastikler küresel olarak yoğun bir kullanıma sahiptir. Söz gelimi, 2015 yılındaki global plastik kullanımı yaklaşık 269 milyon tondur. Kolay şekil verilebilme, taşıma sırasında rahatlık ve ucuz maliyet gibi avantajları sayesinde elektrikli ev aletleri, otomotiv sektörü, mutfak eşyası, inşaat malzemesi, gıda ambalajı, kozmetik, tarım ürünleri, tekstil ve sağlık sektörü gibi bir çok alanda çokça tercih edilen ürünlerdir (Özdemir ve Erkmen, 2013).

Bununla birlikte, plastikler biyolojik olarak parçalanamayan atıklar oluşturmakta, yaygın kullanımı sonucunda, çöplüklerden yeraltı sularına küçük toksik bileşik parçalarının sızması, ayrıca kirlenme ve bozunma işlemi sırasında sera gazlarının açığa çıkması ve diğer organik kirleticilerin salınımı gibi birçok olumsuzluk nedeni ile çevresel kaygıların odağı haline gelmektedir (Moonda vd, 2017). Bundan dolayı, çevresel kaygılar, bilim insanlarını petrol kökenli plastiklerin yerine biyolojik olarak parçalanabilen polimer alternatiflerinin kullanımının geliştirilmesi konusunda araştırmalara yönlendirmektedir (Shah vd, 2008). Yenilenebilir karbon kaynaklarından ya da biyolojik kökenli polimerlerden elde edilen plastikler olarak tanımlanan biyoplastikler; bitki, hayvan, mantar, alg ve bakteriler gibi canlı organizmalar tarafından üretilen biyomateryallerdir (Merugu vd, 2012). Biyomateryaller klasik sentetik ürünlerin aksine pek çok canlı tarafından kolayca indirgenebilir ve biyo-uyumlu yapıda oldukları için bulundukları organizmada toksik etkiye neden olmazlar (Vroman ve Tighzert, 2009). Bu bilgiler ışığında biyoplastikler, farklı besin ve çevresel koşullar altında geliştirilen çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretimi sağlanan biyomateryallerin özel bir formu olarak da tanımlanabilir. Biyoplastik kökenli ürünlerin petrol kökenli plastiklerden üstün özellikleri; doğada kolay bir şekilde çözünebilmeleri, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmaları, toksik etki barındırmamaları, geri dönüşümlerinin daha kolay olması, üretim aşamalarında daha az enerjiye ihtiyaç duymaları, yenilenebilir ve çevreye duyarlı olmaları şeklinde açıklanabilir (Luengo vd, 2003).

Günümüz biyoplastik üretimi yıllık %30 büyümeye ile geleneksel plastik üretim oranından (%5) çok daha yüksek bir büyümeye hızına sahiptir. Pazar araştırmaları

biyoplastik üretimini 2013’de 2,33 milyon ton (mt), 2020’de ise 3,45 mt olarak öngörmektedir (Shen vd, 2009). Polihidroksibütirat (PHB) gibi biyoparçalanabilir, yenilenebilir, biyouyumlu ve doğayla dost biyoplastiklerin bakterilerde sentezi ve polimer kimyasındaki uygulamaları konusunda elde edilen olumlu sonuçlar biyoplastik alanına olan ilginin artmaya devam etmesini sağlamaktadır (Chaudhry vd, 2011).

Bu çalışmada, tuzcul habitatlardan izole edilmiş on adet *Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşlarında PHB üretimleri karşılaştırılmış, en iyi PHB üretiminin elde edildiği suşda %PHB veriminin arttırılmasına yönelik optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, plastiklere karşı en büyük dezavantaj olan yüksek maliyetin önüne geçebilmek amacıyla tarımsal atıklar kullanılarak düşük maliyetli karbon kaynaklarının PHB üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Polihidroksialkonatlar (PHA)

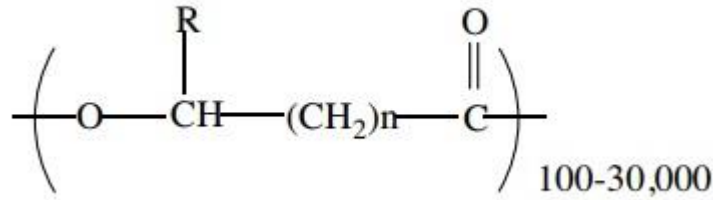
Petrol kaynaklı plastik ürünler; sağlamlık, dayanıklılık, hafiflik ve deformasyona karşı dayanıklı olma gibi birçok özelliği sayesinde günlük yaşantımızda oldukça değerli malzemeler haline gelmişlerdir. Kullanılmaya başlandığı günden beri medikal ürünler, ambalajlar, mobilyalar, makineler ve diğer birçok maddenin yapısına katılarak endüstriyel alanlarda, kaliteyi ve konforu arttıran plastikler bu sayede geniş bir uygulama yelpazesine ulaşmışlardır (Khanna ve Srivastava, 2009). Dünya çapında her yıl yaklaşık olarak 150 milyon ton plastik malzemeler tüketilmektedir (Zhou vd, 2009). Petrol türevi plastiklere olan yüksek bağımlılık, ham petrol kaynaklarının azalması ve ciddi çevre kirliliği sorunlarının artması ile sonuçlanmıştır.

Plastik ürünleri imha etmede tercih edilen yöntemler oldukça zorludur. Depolama alanlarındaki bozulma oranları son derecede yavaş olan plastik ürünlerin yakılarak imha edilmesi ise zehirli yan ürünlerin oluşmasına sebep olmakta ve önemli miktarlarda maliyet içermektedir. Bu sebeplerden yola çıkarak plastik ürünlerin çevreye karşı olumsuz etkilerinin azaltılması amacıyla; geleneksel petrol türevli polimerlere benzer fiziko-kimyasal özellikler gösteren polilaktitler, polisakkaritler, alifatik poliestерler ve polihidroksialkanoatlar gibi biyopolimerlerle yer değiştirmesi gerekmektedir (Castilho vd, 2009). Biyopolimerler; biyoçözünabilirlikleri ve çevre dostu üretim işlemleri sayesinde birçok alanda önemli uygulama alanlarına sahip olarak petrol türevli polimerlerin önemli alternatifleri haline gelmişlerdir. Biyopolimerler, çeşitli mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından doğal olarak üretilmektedirler. Bu yüzden, biyopolimerlerin birçoğu biyo-uyumlu yapıya sahiptir ve biyolojik sistemler üzerinde negatif etki oluşturmazlar (Marjadi vd, 2010; Sukan vd, 2015).

Polihidroksialkanoatlar; bol miktarda karbon kaynağının olduğu fakat oksijen, azot, fosfor, nitrojen gibi maddelerin sınırlı olduğu koşullarda, çok sayıda mikroorganizma tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak sentezlenen ve depolanan granül yapıda polyesterlerdir (Steinbüchel ve Lütke-Eversloh, 2003; Shah

vd, 2008). PHA'lar biyolojik yollarla tamamen parçalanabilen polimerlerdir. Depolanan bu granüllerin plastiklere benzer özellikte olması ve bu maddelerin doğada tekrardan mikroorganizmalar tarafından parçalanabiliyor olması, mikroorganizmalar kullanılarak plastik madde üretimini kapsayan bir sektörün ortaya çıkmasına neden olmuştur (Poirier, 2002).

Besin sınırlayıcı bir durumla karşılaşıldığında, hücrenin canlılığını sürdürebilmesi için enerji rezervi bileşikleri ayrıştırılır ve karbon kaynağı olarak bakteri üremesi için kullanılır. Bakterilerdeki bu hücre içi depo materyalinin insanlardaki yağ ve bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bildirilmiştir (Ojumu vd, 2004). Yapısal özellikler bakımından, PHA'lar kısa ve orta zincir uzunluğu olarak iki ayrı grupta incelenebilir. Kısa zincirli PHA'lar (PHASCL) 3–5 karbon atomundan oluşurlar. Bu grubun en önemli üyesi polihidroksibütirat(PHB)'lar olarak gösterilmektedir (Aldor ve Keasling, 2003). Kısa zincirli yapıdaki biyopolimerler sert ve kırılgan olmalarıyla birlikte %60-80 aralığında kristallik özelliği gösterirken, orta zincirli polimerler esnek ve düşük kristalli yapıdadırlar (Reddy vd, 2003). PHA'ların genel formülü Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. PHA'ların genel formülü (Anjum vd, 2016)

PHA'lar, genel olarak $0,2 \pm 0,5$ mm çapındaki hücre sitoplazmasında granüler inklüzyon cisimcikleri şeklinde biriktirilir ve yüksek reflektiviteleri sayesinde Sudan Black B, Nil Blue A ve Nil Red gibi boyaların kullanımıyla nitel olarak görselleştirilebilirler. Bu bileşiklerin moleküler ağırlığı, mikroorganizmaların türüne, ortamın pH değerine, karbon kaynağının konsantrasyonu ve çeşidine bağlı olarak 2×10^5 ila 3×10^5 Da arasında değişiklik gösterebilmektedir (Khanna ve Srivastava, 2005). PHA'lar fiziksel ve kimyasal özellikler bakımından büyük ölçüde farklılık gösterirler. Polimerin hidrofobik özelliği, erime sıcaklığı, cam geçiş sıcaklığı ve kristallik seviyesi tamamıyla monomerin yapısına bağlıdır (Crank vd, 2004).

Biyolojik bozunma ve biyo-uyumluluk, PHA'ların en önemli özelliklerinin başında gelmektedir. Bu pozitif özellikleri sayesinde geleneksel petrol türevli plastiklerden ayrılırlar. Bu biyopolyesterler havada kararlı bir yapıda olmakla birlikte neme karşı dayanıklıdır ve suda çözünmezler (Ojumu vd, 2004). Biyolojik yollarla çözünebilirlik çalışmaları sonucunda, PHA'nın %85'inin yedi haftalık bir süreçte çözünebildiği, sulu ortamdaki çözünmesinin ise 60 °C sıcaklıkta 254 gün sürdüğü rapor edilmiştir (Murphy, 2007). PHA'lar hava, deniz, göl ve kanalizasyon gibi ortamlarda yaşayan mikroorganizmalar tarafından aerobik koşullarda su ve karbondioksitde ayrışabilirken, anaerobik şartlar altında ise metan ve karbondioksitde tamamen ayrışabilirler (Khanna ve Srivastava, 2005). PHA'yı üreten bakterilerin birçoğu, polimeri hücre içinde parçalayabilirken, ısı uygulaması veya enzimatik hidroliz ile de parçalanabilmektedirler. Erime sıcaklığı, biyo-bozunurluk çalışmalarında dikkat edilmesi gereken önemli bir faktördür. Erime sıcaklığı derecesi arttıkça, biyo-çözünebilirlik azalma göstermektedir. Artan erime sıcaklığı ile birlikte, enzimatik parçalanabilirlik oranı azalmaktadır (Philip vd, 2007).

2.2. Polihidroksibütiratlar (PHB): Tanımı ve Tarihçesi

Düz zincirli, uzun, 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden oluşan mikrobiyal polyesterler olan PHA'lar zengin bir çeşitliliğe sahiptir (Madison ve Huisman, 1999). Üzerinde en çok araştırma yapılan ve ticari açıdan ilgi duyulan PHA grubu polihidroksibütirat (PHB)'dir (Madison ve Huisman, 1999).

İlk olarak 1923 yılında Lemoigne topraktan izole ettiği *Bacillus megaterium* hücresinde bilinmeyen bir maddenin parçalanmasıyla tespit edilen 3-hidroksi bütirik asiti poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri olarak tanımlamıştır. Daha sonraki yıllarda PHB'ye karşı ilgi hızlı bir artış göstermiş ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içerisinde PHB sentez ve parçalanmasını belirleyen mekanizma üzerinde çalışmalar yapmışlardır (Holmes, 1985). Yoğunlaşan çalışmalar neticesinde bakteriyel biyokütlerde PHB'nin kantitatif olarak elde edilmesi için çeşitli metotlar belirlenmiştir. Bakteri hücreleri içerisindeki PHB granülleri haricinde tüm bileşiklerin ayrıştırılabildiği standart koşullarda alkali hipoklorit solüsyonu oldukça kullanışlı olmuştur. Bu metod ile birlikte PHB granüllerinin yoğunluğu, hücre içindeki PHB miktarıyla bağlantılı olarak belirlenmiştir. Lemoigne, bu tarz pratik metotlar belirlenmeden önce PHB'yi kuru bakteri biyokütlesinden kloroform yardımı

ile ayırmış ve gravimetrik olarak belirlemiştir (Lafferty vd, 1988). Yapılan birçok araştırma sonucunda, termoplastik ve elastomerik bir materyal olduğu belirlenen PHB patenti alınmış bir ürün haline dönüşmüştür (Poirier, 2002). 1980'li yıllarda Imperial Kimya Endüstrisi PHB üretimi adına bir fermantasyon metodu geliştirmiştir (Holmes, 1985). *Alcaligenes eutrophus* bakterisinin kullanıldığı bu fermantasyonda, PHB üretimi için en önemli parametre olan karbon kaynağı için propionik asit ve glikoz tercih edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, *A. eutrophus*'un hücre kuru ağırlığının %90'ı oranında PHB biriktirdiği tespit edilmiş ve bu bakterinin endüstriyel anlamda kullanılabileceği görülmüştür (Lee, 1996; Madison ve Huisman, 1999). Daha sonraki dönemlerde, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Bacillus* gibi bakteri cinsleri üzerinde PHB ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiş ve PHB'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metodları, metabolizması gibi bir çok özelliği tespit edilmiştir (Braunegg vd, 1998).

Biyoçözünebilir ve termoplastik özelliklere sahip olan PHB polimerinin petrol kökenli plastiklerin yerini alabilmesi adına ticari üretimi üzerine yapılan çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamasına karşın endüstriyel anlamda üretimi 1980'li yıllarda gerçekleştirilebilmiştir (Holmes, 1985; Anderson ve Dawes, 1990). Bu amaçla, üretimi gerçekleştirilen ilk ticari ürün BIOPOL adı kullanılarak patentlenmiştir (Lafferty vd, 1988). Bu dönemde, Imperial Kimya Endüstrisi (IKE) tarafından *A. eutrophus* suşundan endüstriyel ölçekte PHB üretimi gerçekleştirilmiştir (Madison ve Huisman, 1999).

2.3. PHB'nin Genel Özellikleri

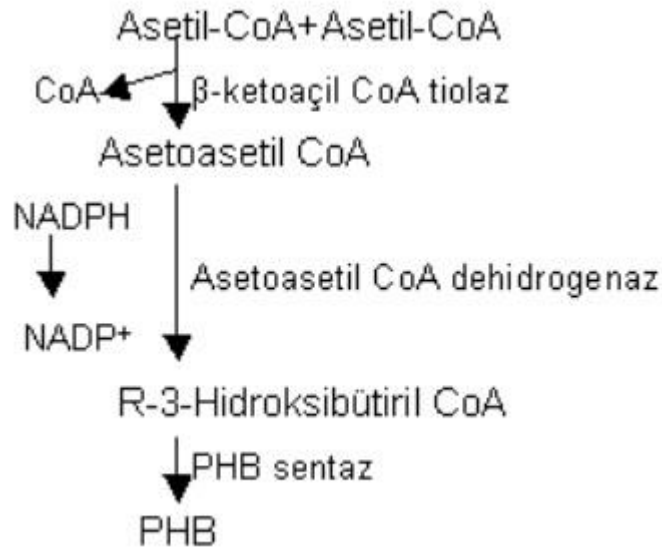
Prokaryotik hücrelerde granüllü yapıda sentezlenen ve depolanan PHB, yapısal olarak kısa zincirli 3-hidroksi yağ asitlerini barındıran ve membran ile çevrilmiş hücre içi depo maddesi olup, tekrarlı hidrofobik parçalardan meydana gelen uzun zincirli bir polimerdir (Poirier, 2002). PHB hücre içerisinde bir redoks düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Valentin vd, 1994). Elektron mikroskobu (EM) kullanılarak bakteri içerisindeki PHB granülleri nitel olarak gözlemlenmektedir. PHB genel olarak küre şeklindedir, her bir granülün çapı 100 ila 800 nm arasında değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca bu granüller 2-4 nm kalınlıkta olup, üniter olmayan bir membran ile çevrili yapıdadır. Granüller genellikle %98 oranında PHB,

%2 oranında ise protein içermektedir (Lafferty vd, 1988). EM kullanılarak yapılan çalışmalarda, granüllerin bir merkezi kısım ve birkaç farklı tabakadan oluşan membranla çevrilmiş kabuktan meydana geldiği tespit edilmiştir (Dunlop ve Robards, 1973). PHB'ler, petrol türevli bir materyal olan polipropilen gibi plastiklere benzer karakteristik özellikler göstermektedirler (Madison ve Huisman, 1999). Termoplastik bir materyal olan PHB polietilene kıyasla dört kat daha sert bir yapıdadır. Hücre içerisinde sıvı formda olan PHB, atmosferde katı halde bulunmaktadır, organik çözücüler yardımıyla hücreden izole edildiğinde ise kristalize bir yapıya kavuşmaktadır (Dave vd, 1996). Katı materyal olmasının yanı sıra kırılgan bir yapıda olan PHB 157 °C ile 188 °C arasında erime özelliği göstermektedir ve bu sıcaklık değerleri polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa oldukça yakın bir değerdir. Termoplastik özellik göstermelerinden dolayı preslenerek şekil alabilirler (Madison ve Huisman, 1999). PHB, UV ışınlarına karşı dayanıklı bir materyal olmasına karşın asit ve baz gibi kimyasallara karşı daha hassastır. Ayrıca, su ve hava geçirmez yapıda oluşu hidrolitik parçalanmaya karşı direnç sağlamakta bu ise PHB'nin kullanım olanaklarını daha fazla genişletmektedir (Poirier, 2002). Polimerin molekül ağırlığı, özellikle üretici bakteri türüne bağlı olmakla birlikte, üreme koşulları ve hücrenin yaşam döngüsündeki yerine göre de farklılık gösterebilmektedir (Taidi vd, 1994). PHB molekülünün ağırlığı 60.000–2.000.000 Da arasında değişmektedir (Braunegg vd, 1998). Karbon kaynağı olarak metanol kullanıldığında PHB'nin moleküler ağırlığının, *Methylobacterium xtorquens* suşunda $0,6 \times 10^6$ Da, *A. eutrophus*'ta $1,1 \times 10^6$ Da iken, süksinat kullanıldığında bu suşlarda sırasıyla $1,7 \times 10^6$ Da ve $1,6 \times 10^6$ Da olduğu tespit edilmiştir (Taidi vd, 1994).

2.4. PHB Sentezi

Polimerin yapısal biyosentezi, monomer yapılarının oluşması ve monomerlerin birleştirilmesi aşamalarından meydana gelen farklı enzimatik işlemleri gerektirmektedir. Üretim seviyesi ve oluşan zincir uzunluğu bu enzimlerin performansına bağlıdır (Taguchi vd, 2001). Hücre içerisinde PHB birikim miktarının yüksek olması için, yüksek NAD(P)H ve asetil-CoA ile birlikte düşük miktarda serbest CoA faktörlerinin olması gerekmektedir. Bu parametrelerin oluşumu, mikroorganizma türlerine göre farklılık göstermesinin yanı sıra genel olarak oksijen, nitrojen, sülfür veya potasyum miktarlarının sınırlandırılması gibi gelişimi etkileyen

etmenlere bağlıdır (Braunegg vd, 1998). PHB'nin biyosentezi, üç ayrı enzim tarafından katalize edilen, üç farklı reaksiyondan meydana gelmektedir (Şekil 2.2). Birinci reaksiyon, iki adet Asetil-CoA molekülünün, β -ketoaçıl CoA tiolaz enzimi tarafından Asetoasetil CoA'ya dönüştürülmesi ile gerçekleşmektedir. *phbA* geni tarafından ifade edilen β -ketoaçıl CoA tiolaz, açıl-CoA+asetil-CoA'daki substratların tiolitik ayrılmasını içeren enzim ailesinin bir üyesidir. Yüksek yapılı ökaryotlarda, mayalarda ve prokaryotlarda doğal olarak bulunmaktadırlar (Madison ve Huisman, 1999). İkinci reaksiyon, Asetoasetil CoA'nın NADPH'ye bağlı bir Asetoasetil CoA dehidrogenaz enzimi tarafından R-3 Hidroksibütiril CoA'ya indirgenmesidir. *phbB* geni tarafından kodlanan Asetoasetil CoA dehidrogenaz, R-3-hidroksiaçıl CoA dehidrogenazlar grubundadır ve 3-hidroksibütiril-CoA'yı asetoasetil-CoA'ya dönüşmesini sağlayan ikinci basamağı katalizler (Madison ve Huisman, 1999). Son reaksiyon ise, oluşturulan R-3 Hidroksibütiril CoA monomerlerinin *phbC* geni tarafından kodlanan PHB sentaz enzimi tarafından, PHB'ye polimerize edilmesidir. Asetil CoA ve 3-Hidroksibütiril CoA, PHB sentezi sırasındaki ara elemanlardır. Asetat ve PHB, Asetil CoA'nın konsantrasyonunu yükseltebilir ve aynı zamanda hücrede 3-Hidroksibütiril CoA ve 3H'nin sentezini kolaylaştırırlar (Madison ve Huisman, 1999).



Şekil 2.2. PHB biyosentez yolağı (Lee, 1996)

2.5. PHB'nin Kullanım Alanları

Günümüzde çevresel kirliliğe karşı olan duyarlılığın artması ile birlikte doğada tamamen çözünebilen PHB'ye olan ilgi de her geçen gün artmaktadır. Kolay şekil verilebilme ve doğada tamamen parçalanabiliyor olması gibi özellikleri sayesinde, PHB, genel olarak tek kullanımlık materyaller ve paketleme malzemelerinin üretiminde yaygın kullanıma sahiptirler (Wang vd, 2012). Biyo-uyumlu bir materyal olmaları dolayısıyla da canlılarda implantasyon maddeleri olarak kullanımını her geçen gün yaygınlaşmaktadır (Lootz vd, 2001). Bu avantajları nedeni ile, ilaç salınım deneylerinde PHB'nin taşıyıcı olarak kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Michalak vd, 2013). Ayrıca, PHB insanlar için üretilen stent, kemik plağı ve çivi yapımında kullanılmaktadır. Yapılan *in-vitro* testler neticesinde PHB'lerin osteoblast, epitel hücreleri ve kondrosit gibi hücre türlerine karşı biyo-uyumlu oldukları belirlenmiştir (Türkay, 2013). Ayrıca, hayvansal dokularda ve ökaryotların hücre zarının yapısında doğal olarak bulunan β -bütirik asidin kanda 0,3 ve 1,3 mM konsantrasyon aralığında var olmasının toksik bir etkiye sebep olmadığı tespit edilmiştir (Muhammadi vd, 2015). PHB ve onun kopolimeri olan polihidroksibütirat-co-polihidroksivaleerat P (HB-HV), gıda ve kozmetik sanayisindeki paketleme maddelerinde, tarımda, kişisel bakım ürünlerinde ve biyomedikal materyallerde oldukça fazla tercih edilmektedir. PHB, lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların yapımını sağlayabilir (Weber, 2000). İnsan vücudunun PHB depolimeraz enzimini ihtiva etmemesinden ötürü vücut içerisinde hızlı bir biyolojik parçalanma göstermezler. Bu özelliği sayesinde, insan vücudu için protezler, cerrahi dikişler ve iğneler gibi cerrahi ürünlerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Firouzi vd, 2003).

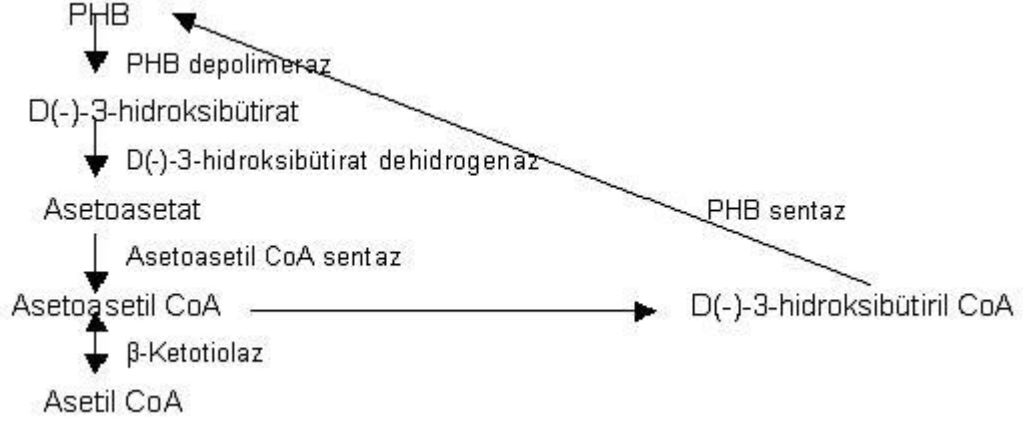
Kanada'da bulunan bir Hamur ve Kâğıt Araştırma Enstitüsü, ortak bir proje kapsamında PHB ile kaplanmış kâğıt üretimini gerçekleştirmiştir. Bu şekilde kaplanmış olan kâğıtlar doğada tamamen biyolojik yollarla parçalanabilmektedir. Bu sayede kaplanmış olan kâğıtların geri dönüşüm süreçleri daha kolay hale gelmiştir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

2.6. PHB'nin Biyolojik Olarak Parçalanabilirliği

PHB'nin biyolojik yollarla parçalanması sürecinde, toprakta bulunan çok sayıda mikroorganizma görev almaktadır (Lafferty vd, 1988). Toprak yapısında bulunan ve parçalama özellikleri ile ön plana çıkan mikroorganizmalara örnek olarak; belirli gram negatif mikroorganizmalar, gram pozitif basiller, küf mantarları ve streptomisetler verilmektedir (Mergaert vd, 1993). PHB, biyolojik olarak parçalanabilirliğinden dolayı tek kullanımlık eşyaların üretiminde büyük katkı sağlar (Lafferty vd, 1988). PHB'nin en önemli özelliklerinin başında, insan vücudu ve toprak gibi önemli alanlarda, toksiteye sebebiyet vermeksizin tümüyle parçalanabiliyor olması gösterilebilir. PHB'nin aerobik ortamlarda parçalanması sonucu ortaya çıkan ürünler karbondioksit ve su olurken anaerobik ortamlarda parçalanma ürününün metan olduğu bildirilmiştir (Braunegg vd, 1998). PHB'nin parçalanma süresi içerdiği katkı maddelerinin oranlarına göre değişiklik göstermektedir. Bu süreç birkaç aydan birkaç yıla kadar uzayabilmektedir. Parçalanma sırasında nitrojen oksidin ortaya çıkmaması, çevrenin korunmasında önemli bir etkidir. Parçalanmış biyoplastik bitkilerin gelişmesini pozitif olarak etkilemektedir (Chen vd, 1991; Dave vd, 1996; Madison ve Huisman, 1999).

Polimerin parçalanması işleminde, fiziksel faktörler olarak; güneş ışığı, nem ve mekanik aşınma, biyolojik faktörler; bakteriler, mantarlar ve yüksek yapılı organizmalar, kimyasal faktörler olarak ise hidroliz ve oksidasyon doğrudan etkilidirler (Madison ve Huisman, 1999). PHB'nin yenilenebilir özelliği, biyolojik yapısı ve biyolojik olarak yıkıma uğramasının yanı sıra, bu maddenin yenilenebilen kaynaklara dayalı üretilmesinde oldukça önemli bir avantajdır. Bakteri kökenli doğal bir materyal olup bir çok mikroorganizma tarafından parçalanabilme özelliğindedir. (Madison ve Huisman, 1999). PHB'nin fermantatif yollarla elde edilmesi, şeker ve yağ asitleri gibi tarımsal materyallerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine dayalıdır (Lee, 1996).

PHB'nin, mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi için depolimerize bir yapıda olması gerekir. Depolimerizasyonun ardından meydana gelen monomer yapıdaki 3-hidroksibütirikasit ve dimer yapı çok sayıda mikroorganizma tarafından kullanılabilir özellikte substratlardır (Şekil 2.3) (Lafferty vd, 1988).



Şekil 2.3. PHB'nin parçalanması ve sentezi (Lafferty vd, 1988)

PHA depolimeraz ve PHA sentaz aktivitelerinin, granüllerdeki protein kökenli membran tabakası ile etkileşimde olduğu ve bu membranı parçalayıcı ya da tahrip edici metodlar olan PHB ekstraksiyon metodlarının, sentaz aktivitesindeki azalmaya ve depolimerizasyona karşı hassasiyetin artmasına sebep olduğu bildirilmektedir (Braunegg vd, 1998). PHB'nin hücre içerisinde parçalanma olayı ise PHA depolimeraz'ın PHB'yi hidrolize etmesi sonucu gerçekleşir. R-3-hidroksibütirat dehidrogenaz ve asetoasetil-CoA sentaz, R-3-hidroksibütirat monomer ve dimerlerinin oluşumuna neden olurlar (Braunegg vd, 1998).

2.7. PHB'nin Ziraatte Kullanımı

PHB; bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından uygun çevre koşullarında kısa süre içerisinde tamamen CO₂ ve enerji formuna dönüştürülerek parçalanabildiğinden, toprak içerisinde biyolojik parçalanma gerektiren uygulamalar için oldukça uygundur (Wendlandt vd, 2001). Tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında, gübre veya pestisitlerin ya da bitki büyüme regülatörlerinin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak ve ayrıca sulama olukları yapımında kullanılabilmektedir (Holmes, 1985).

Toprak yapısını iyileştirmek amaçlı yapılan bir çalışmada en iyi tamponlama etkisini PHB'nin sağladığı ve bu etkinin PHB konsantrasyonu ile kontrol edilebileceği rapor edilmiştir (Khachatoorian vd, 2003). Ayrıca *Azotobacter chroococcum*'dan elde edilen PHB; Ronilan ve Sumilex adında iki farklı fungusidin immobilizasyonunda kullanılmıştır. Bu immobilize fungusitlerin bir toprak

fitopatogeni olan *Botrytis cinerae* fungusunun topraktaki popülasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Savenkova vd, 2002).

PHA'lar, tarımsal amaçlı malç filmleri olarak kullanılmıştır. Son yıllarda, Procter&Gamble, biyolojik olarak parçalanabilen tarımsal film yapımında kullanılabilecek Nodax'ı üretmiştir. Nodax, PHB ve az miktarda MCL monomeri içeren bir kopolimerdir. Nodax anaerobik olarak bozunabilir ve bu nedenle çeltik tarlalarında kullanılmak üzere üre gübresi veya herbisitler ve insektisitler için bir kaplama materyali olarak kullanılabilmektedir (Philip vd, 2007).

PHBV'nin tarımdaki özel uygulamalarından birisi de insektisitlerin kontrollü salınımıdır. İnsektisitler PHBV topraklarına entegre edilebilir ve çiftçinin mahsulleriyle birlikte ekilebilmektedir. Polimeri parçalayan bakteriler, toprak zararlıları ile aynı çevresel koşullardan etkilendiklerinden, insektisit, zararlı aktivite seviyesine bağlı bir oranda salınacaktır (Holmes, 1985; Philip vd, 2007).

PHA'ların tarımdaki bir diğer kullanım alanı, bitkilerde azot fiksasyonunu arttırmak için uygulanan bakteri inokulantları(aşıları)dır. Aşılama preparatlarında tarımsal amaçlar için kullanılan bakteri kültürünün uzun süre depolanma, kuraklık ve sıcaklık şartları gibi stresli ortamlara karşı dirençli olması gerekmektedir. Aşılanan bakteriler, taşıyıcı içerisinde yüksek oranda hayatta kalma yeteneğine sahip olmak zorundadır. Bu nedenle, bu alandaki araştırmalar, bakterilerin taşıyıcılar içerisinde uzun süre hayatta kalmasını sağlamak üzere besin veya diğer sentetik ürün benzeri elementlerin eklenmesine odaklanmıştır (Dobbelaere vd, 2001; Philip vd, 2007). *Azospirillum brasilense* inokulantlarının bitki büyümesini teşvik etme fonksiyonunun taşıyıcı materyalin çeşidinden ziyade bakterinin içerdiği yüksek hücre içi PHA miktarında bağlı olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular Meksika'da mısır ve buğday tarla denemeleri ile de doğrulanmıştır. Sonuç olarak, hücre içi PHA'nın, ticari aşılayıcıların raf ömrünü, verimliliğini ve güvenilirliğini arttırmada oldukça büyük öneme sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Kadouri vd, 2003; Kadouri vd, 2005).

2.8. PHB'nin Maliyet Azaltılması Çalışmaları: PHB Üretimi İçin Ucuz Kaynakların Değerlendirilmeleri

PHB, petrol türevi plastiklere kıyasla daha yüksek maliyetli olması nedeniyle henüz geniş kullanım alanlarına erişememiştir. PHB kullanımının yaygın hale gelmesini

engelleyen en önemli parametre olan yüksek maliyeti, genetik manipölasyonu yapılmış mikroorganizmaların kullanımı ya da mevcut kültürün iyileştirilmesi ve proses sisteminin geliştirilmesi olabileceği gibi saf kültür kullanımı yerine karışık kültürlerin kullanımı, ya da ucuz karbon kaynakları kullanılarak yüksek PHB veriminin sağlanması gibi stratejileri kapsamaktadır (Klinke vd, 1999). PHB üretim maliyetinin azaltılması çalışmalarından bir diğeri de yüksek PHB verimine sahip olan suşların besiyeri koşullarının belirlenmesidir. Son yıllarda yapılan çalışmaların birçoğu, suşların en uygun üretim koşullarının optimizasyonu üzerine odaklıdır. PHB üretiminde saf kültür kullanımı yerine karışık kültürlerin kullanımı diğerlerine göre daha düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmakla birlikte, elde edilen PHB verimi daha düşüktür (Dut, 2015).

PHB üretiminde en az maliyetli ve kolay yöntem ucuz hammaddeler ile çalışmaktır. PHB üretiminde kullanılan yüksek maliyetli hammaddelerin %20-50 arasında ürün fiyatı üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Oluşan bu yüksek maliyeti düşürmek için substrat olarak doğal ürünler, endüstriyel ve tarımsal atıklar alternatif olarak kullanılan kaynaklardır (Sathiyanarayanan vd, 2013). Yüksek miktarlarda, tarımsal üretim ve gıda işleme sanayilerinden elde edilen atıklar PHB üretiminde kullanılabilecek yenilenebilir hammaddeyi temsil etmektedirler. Bu tarz atıkların PHB üretiminde değerlendirilmeleri substrat maliyetini düşürdüğü gibi atıkları imha etme maliyetini de düşürmektedir (Chee vd, 2010).

PHB üretiminde farklı birçok tarımsal atık karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında dikkat çeken kaynaklar; pancar melası, şeker kamışı melası, peynir altı suyu, hurma şurubu, elma atığı, kavun atığı, bezelye kabuğu, domates atığı, ksiloz ve soya atık suları olmuştur (Gouda vd, 2001; Kumar vd, 2009; Chee vd, 2010). Melas ucuz PHB üretimi için kullanılabilen bir karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Melas gibi mısır koçanı şurubu da vitamin ve diğer bileşenleri bünyesinde bulundurmakta olup karbon kaynağı olmaktan ziyade zengin bir azot kaynağıdır (Gouda vd, 2001). Melas %4-11 arasında inorganik bileşikler (potasyum, sodyum klorür, demir sülfat, magnezyum, kalsiyum ve fosfat) içermektedir. Şeker pancarı melasında genellikle potasyum oranı yüksektir. Melasta B grubu vitaminler de yer almaktadır. *Bacillus* sp.'lerin melas gibi ucuz substratlarda

hızlı bir şekilde üredikleri tespit edilmiştir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Ediz ve Beyatlı, 2005).

PHB, daha çok *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Azotobacter* sp. tarafından üretilmesinin yanı sıra farklı toprak bakterileri gibi çok sayıda mikroorganizma tarafından da sentezlenmektedir (Lafferty vd, 1988; Jan vd, 1996; Braunegg vd, 1998; Rosovitz vd, 1998).

Page vd (1992), *Azotobacter vinelandii* UWD suşu ile yapmış olduğu bir çalışmada, şeker pancarı melasını kullanılarak elde ettiği karbon kaynağında, yüksek PHB veriminin sağlandığını saptamıştır (Page vd, 1992). Yapılan bu çalışmalar ışığında iyi bir PHB üreticisi olduğu bildirilen *A. vinelandii* UWD suşunun, ucuz karbon kaynağı olarak kullanılan şeker pancarı melasından üretildiğinde, glukozaya göre üç kat daha az bir üretim maliyetiyle fermantasyonunun gerçekleştiği rapor edilmiştir (Page, 1989). Gouda vd, Mısır'da geniş kullanımı olan şeker kamışı melasını karbon kaynağı olarak kullanarak *Bacillus megaterium* üzerinde PHB üretimini araştırmışlardır. Şeker kamışı melası %2'lik oranda besiyerinde kullanıldığında %46,5 oranında PHB üretimi gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Gouda vd, 2001).

Düşük maliyetli karbon kaynakları kullanımının yanı sıra peyniraltı suyu atıklarından PHB üretimi çalışmaları gerçekleştirilerek verimin artırılması amaçlanmaktadır. Ahn vd (2000), *Alcaligenes latus*'un PHB biyosentez genlerini barındıran rekombinant *E. coli* CGSC 4401 suşunu kullanarak peynir altı suyundan 2,57 g/L'lik oranda PHB verimi elde ettiklerini açıklamışlardır (Ahn vd, 2000).

Biyodizel yakıt üretiminde kullanılan palmiye yağının rafinerizasyon süreci sırasında bir yan ürün olarak açığa çıkan gliserol bir çok alanda kullanım görmektedir. Gliserol çeşitli mikroorganizmaların PHA üretim süreçlerinde uygun bir karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Luengo vd, 2003; Liu vd, 2014).

PHB üretiminde arzu edilen bitkisel kaynaklar arasında mısır yağı, soya fasulyesi yağı, hurma yağı, palmiye yağı, buğday ve çeltik kepeği gösterilebilir. Bunların birçoğu şekerlere göre daha az maliyetlidir. Şekerlere oranla, miktar başına daha fazla karbon içeriğine sahip bitkisel yağların hücre biyokütlesinde ve PHB üretiminde daha yüksek verim sağladığı bildirilmiştir (Gouda vd, 2001; Chee vd, 2010).

Güneydoğu Asya Bölgesi'nde en çok yetiştirilen ürünler arasında yağ palmiyesi bulunmaktadır. Bu ürünün içerdiği selüloz oranı %50, hemiselüloz oranı ise %20 değerlerindedir. Selüloz ve hemiselüloz gibi polisakkaritler hidroliz sonucunda glikoz ve ksiloz gibi şekerlere dönüşebilirler. *Bacillus megaterium* R11 suşu ile yapılan bir çalışmada hidrolize edilmiş palmiye demetinden PHB üretimi tespit edilmiştir. Çalışmalar sonucunda PHB veriminin %40-46 aralığında olduğu bildirilmiştir (Zhang vd, 2013).

Bacillus thuringiensis R1 suşunun PHB birikiminin incelendiği bir çalışmada besiyerine gliserol ilave edildiğinde maksimum PHB birikimi 1,4 g/L olup %34,18 oranında bir verim gözlemlenmiştir (Rohini vd, 2006).

Bacillus'ların amilaz ve proteinaz enzimlerinin varlığı nedeniyle gıda atık sularından faydalanabileceğini bildiren Law vd, aktif çamurdan izole ettikleri *Bacillus* sp. suşlarını arpa ve soya atık suyunda geliştirerek PHB verimlerini araştırmışlar ve *Bacillus* sp. HF-1 suşunun atıklar kullanıldığında %19,22, HF-2'nin ise %10,18 PHB verimine ulaştığını rapor etmişlerdir (Law vd, 2001). Karbonhidrat bakımından zengin fakat azot bakımından fakir olan karton endüstrisi atık suyunu değerlendirmek amacıyla *Bacillus* sp. NA10 suşunun bu atık suda üreme ve PHB üretim potansiyeli araştırılmıştır. %100 atık konsantrasyonu C/N oranının yüksek olması sebebiyle PHB üretimi için uygun bir ortam sağlayarak, suş tarafından maksimum PHB birikimini sağlamıştır (34 g/L PHB ve 7,4 g/L biyokütle). Atık suyun seyreltilmesinin PHB üretimini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (Bhuwal vd, 2014).

Sathiyanarayanan vd (2013), Hindistan'daki atık sorunlarından olan tapyoka (tropik bölgelere özgü manyok bitkisinin nişastalı köklerinden hazırlanan yiyecek maddesi olup puding ve çorba yapımında kullanılır), sanayi atıkları, palmiye şekeri, hourse gram unu (yem ve gıda içi Hindistan'da yetişen bir tropikal baklagil), buğday kepeği, pirinç kepeği, mandıra, bira fabrikası ve mango küspesi gibi endüstriyel atıkları *Bacillus megaterium* MSBN04 suşunda PHB üretimi amacıyla besiyeri içeriği olarak kullanmışlardır. Tapyoka sanayi atığı suşta %52 PHB birikimini sağlaması ile en uygun kaynak olarak belirlenmiştir. Tapyoka atığı ile üretimin optimizasyonu için palmiye şekeri, buğday kepeği, pirinç kepeği gibi karbon kaynaklarının bu şartlardaki etkileri araştırılmıştır. Palmiye şekerinin PHB üretimini arttırdığı ve en iyi ek karbon kaynağı olduğu gözlenmiştir. Çeşitli endüstriyel atıklara

palmye şekerinin eklenmesiyle tapyoka sanayi atığı %55, nişasta sanayi atığı %52 PHB verimi vermiştir. Azot kaynağı olan house gram unu ve tapyoka sanayi atıkları beraber kullanıldığında PHB miktarında artış olduğu bildirilmiştir (%55) (Sathiyarayanan vd, 2013).

Halofilik arke izolatlarının PHB üretimi ucuz karbon kaynağı olarak çözünebilir saf nişasta, mısır nişastası, sakkaroz, peynir altı suyu, domates atığı, elma atığı ve kavun atığının kullanıldığı farklı besiyerinde incelenmiştir. Karbon kaynağına göre maksimum PHB verimlerinin sırasıyla sakkarozda %4,11; peynir altı suyunda %47,69; kavun atığında %21,19; elma atığında %15,25; domates atığında %31,17; mısır nişastasında %53,14 olduğu bildirilmiştir (Tatlıcan vd, 2010).

2.9. Halofilik Mikroorganizmalar ve Biyoteknolojik Önemleri

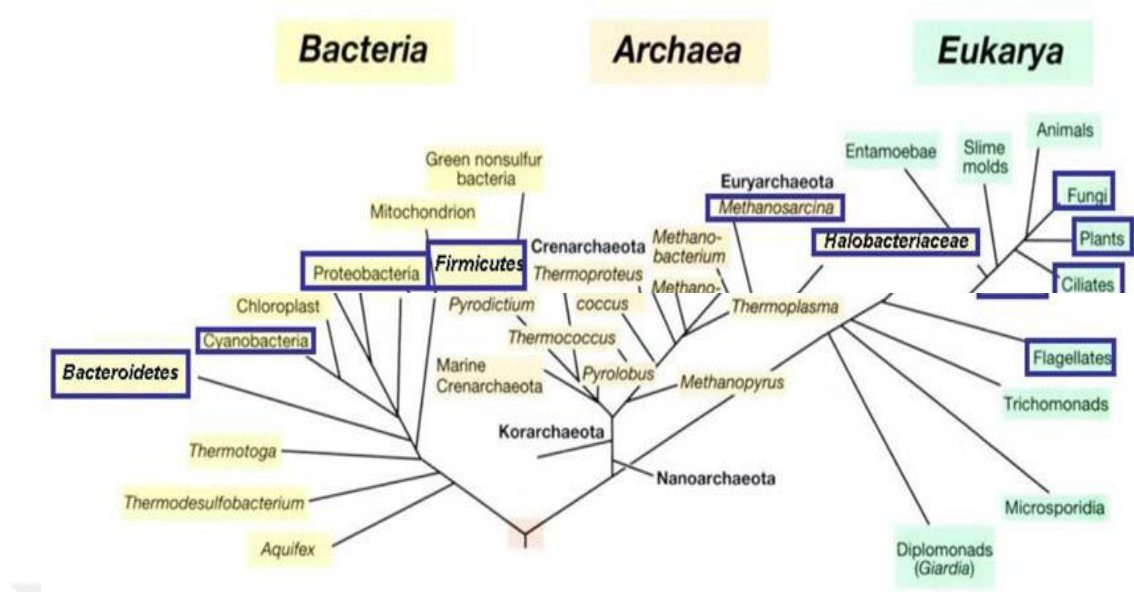
Halofik mikroorganizmalar, yaşamlarını sürdürebilmek adına yüksek oranda tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duyan ve bu özellikteki tuzcul çevrelerde yaşayabilmek için kendine özgü stratejiler geliştirmiş, hem prokaryotik hem de ökaryotik temsilciler içeren geniş bir canlı grubudur. Bu mikroorganizmalar; tuz gölleri, tuz üretim tesisleri, denizler, kaya tuzu mağaraları ve yapay olarak tuzlanmış balık ve hayvan derilerinin yüzeyi gibi çeşitli tuzcul habitatlarda bulunmaktadır (DasSarma ve DasSarma, 2001). Bu tip aşırı tuzlu yaşam alanlarına “hipersalin” adı verilmektedir. Halofilik mikroorganizmalar üreyebilmeleri için ihtiyaç duydukları en uygun NaCl miktarına göre sınıflandırılarak gruplara ayrılmıştır (Çizelge 2.2) (Pikuta vd, 2007). Bu canlıların üreyebilmeleri için ihtiyaç duydukları NaCl konsantrasyonları %1’in altında bulunanlar halofilik olmayan, %1-3 arasındaki değerlerde olanlar az halofiller, %3 ila %15 aralığında olanlar ılımlı halofiller ve %15’den fazla olanlar ise aşırı (ekstrem) halofiller olarak adlandırılmıştır. Ekstrem halofilik mikroorganizmaların üremeleri için çok yüksek miktarda tuz konsantrasyonuna ihtiyaç duymalarından dolayı bu isimle tanımlanmışlardır (Madigan, 2000). Ayrıca, bu gruplandırmaya ek olarak NaCl varlığında ya da yokluğunda gelişim gösteren halotolerant mikroorganizmalar da bulunmaktadır (DasSarma, 2006). Bu mikroorganizmalara örnek olarak *Staphylococcus aureus* ve *Vibrio* sp. örnek gösterilebilir (Ventosa vd, 1998). Bu sınıflandırmaya ek olarak zorunlu halofiller de bulunmaktadır (DasSarma vd, 2017).

Çizelge 2.1. Halofilik mikroorganizmaların sınıflandırılması (Kushner, 1985)

Kategori	Tuz konsantrasyonu
Halofilik olmayanlar	<%1
Az halofiller	%1-3
Ilımlı halofiller	%3-15
Aşırı (ekstrem) halofiller	>%15

Halofillerin birçoğu tuzcul ortamlarda, ozmotik stresi dengelemek için uyumlu çözücüler biriktirmektedir. Bazı halofiller ise solvasyonu arttırarak yüksek tuzlulukta işlev gören ve proteinlerin bir araya toplanmasını, çökelmesini ve denatürasyonu engelleyen asidik proteinler üretmektedir. Ekstrem halofilik mikroorganizmalar düşük tuz konsantrasyonlarında üreme gösteremezler (DasSarma vd, 2017).

Halofilik mikroorganizmaların yaşamış oldukları tuzlu ortamların kaynağı olan sodyum klorürün yanı sıra, sodyum klorürün mineral formu olan ve genellikle sülfat, halojen tuzu ya da boraks asidi tuzu gibi minerallerin oluşturduğu kaya tuzu mağaraları da bu tarz ortamlara örnek verilebilir. Aşırı tuzlu olan bu ortamlar, tuz ihtiyacı ve metabolizmaları oldukça farklı olan aşırı halofilik arke türlerini içermektedir (Oren, 1994; Oren ve Ventosa, 2000; Huddleston vd, 2001; Tunalı vd, 2012). Filogenetik yaşam ağacında rRNA küçük alt ünite dizilerinin incelenmesi sonucu halofilik mikroorganizmaların üç farklı alan içerisinde dağılım gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 2.4) (Oren, 2008; DasSarma vd, 2012).



Şekil 2.4. Küçük alt ünite rRNA gen dizisinden faydalanarak oluşturulmuş filogenetik ağaç ve halofilik mikroorganizmaların dağılımı (Oren, 2008)

Archaea domaini içerisinde halofilik mikroorganizmalar üç ayrı familyada yer almaktadır: *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae*. *Methanospirillaceae* ve *Methanosarcinaceae* deniz tuzluluğuna ve hipersalin çevre şartlarına uyum sağlamış organizmaları ve halofilik olmayan türleri barındırmaktadır. *Halobacteriaceae* ve *Halobacteriales* ordosu ise tümüyle halofillerden oluşmaktadır. (Oren ve Mana, 2003).

Halofilik arkelerin büyük bölümü 35 °C ile 50 °C arasındaki sıcaklıklarda optimum üreme profili sergilemektedirler (Shand ve Perez, 1999). Bu tarz yüksek sıcaklıklarda üreme becerisi göstermelerindeki faktör; tuz oranı yüksek çevrelerin oluşmasında etkili olan sıcaklık ile doğru orantılı olan buharlaşma arasındaki ilişki olduğu ve bu koşullara adaptasyonlarının sağlandığı düşünülmektedir. Ancak, bu durumun aksine daha düşük sıcaklık değerlerine adapte olmuş suşlar da mevcuttur. Örneğin, Antartika’da bulunan Deep Lake, dönemsel olarak sıcaklık derecesi 0 °C ile 11,5 °C arasında değişiklik gösteren ve yüksek oranda tuz konsantrasyonuna sahip bir göldür. Bu gölden izole edilmiş halofilik bir arke türü olan *Halorubrum lacusprofundi*’nin optimum üreme aralığı 31 °C ile 37 °C arasında olmasına karşın 4 °C gibi düşük bir sıcaklık derecesinde yavaş da olsa üreme göstermektedir (Franzmann vd, 1988).

Halofilik arkeler 5,2 M'lık bir NaCl konsantrasyonunda yaşayabilmek için, sahip oldukları “salt-in” özelliği ile ozmotik dengelerini sağlamak durumundadırlar. Bundan dolayıdır ki yüksek ozmotik basınca dayanıklı olabilmek adına sitoplazmalarında K^+ ve Cl^- iyonları ağırlıklı olmakla beraber yüksek bir oranda iyon biriktirmektedirler. Yaklaşık olarak 5 M olan hücre içi tuz konsantrasyonunun büyük bir bölümünü KCl ve NaCl oluşturmaktadır (Kushner, 1985; Smith vd, 1989).

Halofilik mikroorganizmalar, son dönemlerde bilimsel araştırmalarda ve çalışmalarda çokça tercih edilen bir ekstremofil gruptur. Diğer ekstremofil mikroorganizmalara göre daha kolay kültürlerinin yapılabilmesi ve aseptik şartlara olan ihtiyacın az olması tercih edilme sebeplerindendir. Ekstrem yaşam şartlarında mezofilik mikroorganizmaların gelişimleri sınırlıyken, halofilik mikroorganizmaların bu yaşam ortamlarına kolay adapte olmalarından dolayı bu organizmaların hücresel yapılarındaki farklılıklar dikkat çekmiştir. Bu farklılıklardan yola çıkılarak biyoteknolojik olarak uygulamaları üzerine çalışmalar önem kazanmıştır (Beard vd, 1997).

Halofilik mikroorganizmalar doğada kirliliğe sebebiyet veren çevresel atıkları degridede edici özelliklere sahiptirler. Petrol kirliliğini gidermede önemli bir rol üstlenen halofilik ve halotolerant mikroorganizmalar sahip oldukları yüzey gerilimini azaltma özellikleri sayesinde hidrofobik hidrokarbonların çözünürlüğünü artırarak degridasyonu sağlarlar (Litchfield, 2011). Zeytin yağı elde etme sürecinde oluşan atık sulara polifenolik bileşikler, polialkoller ve toksik aromatik bileşikler açığa çıkarmaktadır. Fenolik bileşiklerden olan tirosol, zeytinyağı atık sularının ana fenolik bileşiğidir. *Halomonas* sp. HTB24 suşlarının tirosolü iki doğal antioksidan olan hidroksitirosol ve 3,4 dihidroksifenilasetik asite dönüştürdüğü rapor edilmiştir (Kalwasińska vd, 2015).

Halofilik arkeler tarafından salgılanan polisakkaritler petrol arama faaliyetlerinde kullanılmakta, aynı zamanda salgılanan bu haloarkeal polimerler biyolojik olarak parçalanabilen plastikler için bir ham madde niteliği taşımaktadırlar (Eichler, 2001). Haloarkelerde PHA granüllerinin varlığı ilk olarak Kirk ve Ginzburg (1972) tarafından rapor edilmiş olup, suş *Haloarcula marismortui*'dir (Kirk ve Ginzburg, 1972; Oren vd, 1990). Ardından, *Haloferax*, *Halobiforma* ve *Haloquadratum* cinslerinin de PHB veya PHBV gibi PHA'ları biriktirdikleri belirlenmiştir (Fernandez-Castillo vd, 1986; Hezayen vd, 2002; Burns vd, 2004).

1996 yılında ise Escalona vd, *Haloferax mediterranei*'de PHA'nın ticari üretimi için patent yayınlamışlardır (Escalona vd, 1996).

Bakteri domainindeki haloofilik üyelerle karşılaştırıldığında, haloarkeler PHA üreticileri olarak çeşitli avantajlara sahiptirler. Söz gelimi, ucuz karbon kaynaklarını kullanabilmeleri, sıkı sterilizasyon koşullarına gerek duymamaları, haloarkelerin NaCl olmadığında parçalanmaları nedeni ile PHA izolasyonunun çok daha kolay olması bunlar arasındadır (Han vd, 2010; Quillaguamán vd, 2010). Haloofilik PHA üretici bakterilerin hücre içi PHA granüllerinin salınması için hücre duvarının fiks, kimyasal veya enzimatik yolları kullanımını gerektirmektedir. Bu ise tüm PHA üretim tutarının %50'den fazlasına karşılık gelmektedir (Chen vd, 2001).

Haloferax, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorubrum*, *Halobiforma*, *Halorhabdus*, *Halalkalicoccus*, *Halobacterium*, *Natranema*, *Halostagnicola*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronorubrum*, *Haloterrigena*, *Halopiger* ve *Halococcus* cinslerine üye bazı suşlarda ucuz karbon kaynağı kullanılarak PHB üretiminin belirlenmesine dair çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Tekin vd, 2012). Genel olarak, birçok PHA üreticisi haloarkelerde üretilen PHA, hücre kuru ağırlığının %0,8-22,9'una karşılık gelmektedir (Han vd, 2010). *Haloferax mediterranei*'de fosfat sınırlaması altında, nişasta veya glukoz hücre kuru ağırlığının %60'ı kadar üretilen PHBV sürekli kültürde farklı karbon kaynaklarının kullanımı sonrasında hücre kuru ağırlığının %87,5'ine ulaşmıştır (Koller vd, 2007). *Halopiger aswanensis*'e ait PHB verimi hücre kuru ağırlığının %53'üne karşılık gelmektedir (Hezayen vd, 2002). Farklı kültürasyon koşulları PHB üretim verimini etkilediğinden daha çok haloarke suşunun PHB üretimi bakımından karşılaştırılması ve optimum kültür koşullarının belirlenmesi önemli bir araştırma alanıdır.

Mevcut Çalışma

Farklı kültürasyon koşulları PHB verimini etkilediğinden daha çok haloarke suşunun PHB üretimi bakımından karşılaştırılması ve optimum kültür koşullarının belirlenmesi önemli bir araştırma alanıdır. Bu çalışmada, Tuz Gölü (*Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4, TG5), Çankırı Kaya Tuzu Mağarası (*Haloarcula* sp. ÇKT1, ÇKT2 ve ÇKT3) ve Yozgat Kaya Tuzu Mağarası (*Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2) izolatlarının farklı besiyerlerindeki PHB üretimleri karşılaştırılmıştır. Tespit edilen en iyi PHB üreticisi haloarke suşunda kuru ağırlığa kıyasla en yüksek %PHB

veriminin elde edilmesi amacıyla farklı sıcaklık, NaCl konsantrasyonu, pH değerleri, inkübasyon süresi ve farklı karbon kaynakları kullanarak kültür koşulları optimize edilmiştir: Son aşamada, ucuz karbon kaynağı olarak şeker pancarı küspesi, mısır koçanı ve findık zurufu kullanarak optimum koşullarda %PHB verimi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla, şeker pancarı küspesinin ucuz karbon kaynağı olarak kullanılmasıyla *Haloarcula* sp. TG1 suşunda hücre kuru ağırlığın %27,99'u kadar PHB üretimi sağlanabilmiştir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar, Besiyerleri ve Kültür Koşulları

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

Suş adı	Özellik	Kaynak
<i>Haloarcula sp.</i>		
TG1		
TG2		
TG3	Tuz Gölü izolatı	
TG4		
TG5		
ÇKT1		(Abanoz, 2016)
ÇKT2	Çankırı Kaya Tuzu Mağarası izolatı	
ÇKT3		
<i>Halolamina sp.</i>		
YKT1	Yozgat Kaya Tuzu Mağarası izolatı	
YKT2		

Çalışmada, daha önce üç lokasyondan izole edilmiş olan (Abanoz, 2016) *Haloarcula sp.* ve *Halolamina sp.* suşları Sehgal–Gibbons (SG) (Sehgal ve Gibbons, 1960) (Ek 1) besiyerine ekilerek 37 °C’de 150 rpm’de 15 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Uzun süreli saklama için, üreyen kültürlerden 4 mL alınıp santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Oluşan pelet 800 µL SG’de çözüldükten sonra %86’lık steril gliserol ile 1:1 oranında karıştırılarak -86 °C’de saklanmıştır.

Suşların PHB üretimlerinin belirlenmesi için kullanılan besiyerleri SG (Sehgal ve Gibbons, 1960), Mineral Salt Medium (MSM) (Getachew ve Woldeesenbet, 2016), Nutrient-rich AS168 (Alsafadi ve Al-Mashaqbeh, 2017), Nutrient limited MST (Lu vd, 2008), Bazal besiyeri (Taran, 2011) ve SW-25 medium (Tekin vd, 2012) kullanılmıştır. Besiyeri içerikleri Ek 1’de verilmiştir.

3.2. Çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltileri içerikleri ve hazırlanışları Ek 2’de verilmiştir.

3.3. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Ek 3’de verilmiştir.

3.4. Suşların Üreme Eğrilerinin Belirlenmesi

Haloarcula sp. TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3 ve *Halolamina* sp. YKT1, YKT2 suşlarına ait stoklardan (OD_{600} ~1.8-2.0) 1 mL alınıp SG ve SW25 olmak üzere iki farklı sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. 37 °C’de 150 rpm’de inkübe edilen kültürlerden 24 saat aralıklarla 10 gün boyunca örnek alınarak 600 nm’deki absorbans değerleri Shimadzu UV spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

3.5. Hücre Kuru Ağırlığının Belirlenmesi

50 mL fermantasyon kültürü 10.000 rpm’de 15 dak. santrifüj edilip elde edilen pelet NaCl uzaklaştırılması amacıyla steril dH₂O ile yıkanmıştır. Aynı koşullarda santrifüj sonrasında elde edilen pelet etüvde 55 °C’de 16 saat inkübe edilerek kuruması sağlanmıştır. Hücre kuru ağırlığı hassas terazi ile tartılarak belirlenmiştir.

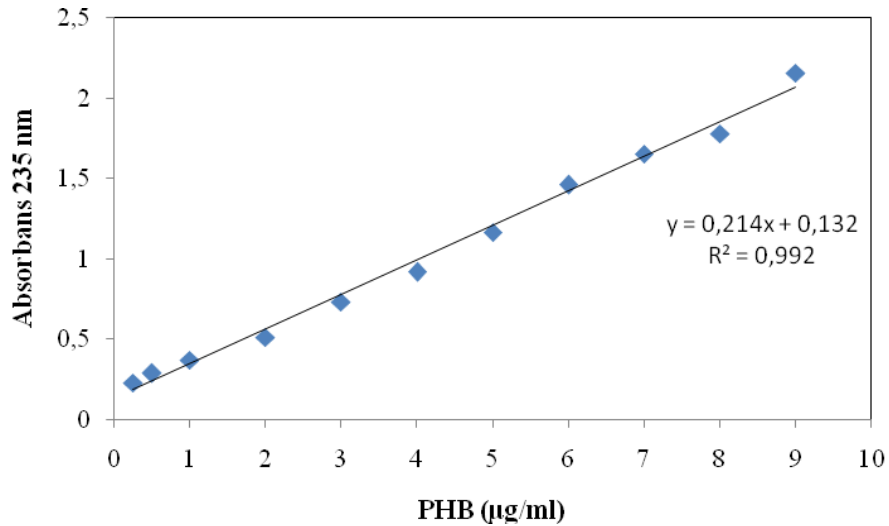
3.6. PHB Ekstraksiyonu

96 saat süren fermantasyon işlemi sonunda PHB ekstraksiyonu Taran (2011) tarafından rapor edilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon sonrasında, 5 mL kültür 10.000 rpm’de 10 dak. santrifüj edilmiştir. Hücre duvarının ozmotik basınca maruz kalarak patlatılması ve besiyerindeki tuz vb. kalıntıların uzaklaştırılması amacı ile oluşan peletlere aynı hacimde steril distile su eklenerek 1 saat 37 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından, aynı koşullarda (10.000 rpm’de 10 dak.) santrifüj işleminin sonrasında elde edilen peletteki PHB’nin ekstrakte edilmesi amacıyla sırasıyla 5 mL aseton ve etanol ile yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Oluşan pelet üzerine 5 mL kloroform eklenerek pipetleme yoluyla homojen bir karışım elde edilmiştir. Kloroform tamamen uçurulana kadar karışım su banyosunda

bekletilmiştir. Elde edilen pelet üzerine 5 mL H₂SO₄ (EK 3) eklenerek kaynayan su içerisinde 40 dak. bekletilmiştir. Bu işlem sonucunda meydana gelen krotonik asit, 1 mL sülfirik asit körüne karşı kuvarz küvetlerde 235 nm absorbans değerinde Shimadzu UV spektrofotometre’de ölçülmüştür. Sonuçlar, standart PHB grafiği ile karşılaştırılarak kuru hücre başına rölatif PHB miktar tayin edilmiştir (Ateş, 1997).

3.7. PHB Standardının Hazırlanması

250 mL’lik erlen içerisinde 0.05 g PHB (Sigma Aldrich) (Ek 3) 100 mL kloroform ile karıştırılarak 50 °C ısıdaki manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüştür. Çözünen PHB çözeltisinden 1’er mL alınarak iki ayrı erlen kloroformla (99 mL) 1/100 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu çözeltilerden 50 mL’lik erlenlere sırasıyla 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 mL aktarılmış ve kloroformun uçurulması için 100 °C’de su banyosunda inkübe edilmişlerdir. Ardından, her bir örnek üzerine 10 mL sülfirik asit eklenerek 10 dak. 100 °C’de inkübasyon sonrasında PHB granüllerinin krotonik asite dönüşmesi sağlanmıştır. Bu işlem sonrasında, erlenlerde 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/mL PHB’ye karşılık gelen krotonik asit elde edilmiştir. Örneklerle aynı absorbans değerinde sülfirik aside karşı ölçüm yapılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Ateş, 1997) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. PHB miktarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.8. PHB Üretiminin Optimizasyonu

3.8.1. Sıcaklık etkisi

İzolatların PHB üretim miktarlarının artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmalarında, en iyi PHB üretiminin gerçekleştiği besiyerinde 28 °C, 37 °C ve 50 °C'deki sıcaklıklarda fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve PHB üretim miktarları tespit edilmiştir.

3.8.2. pH etkisi

En iyi PHB üretiminin gerçekleştiği besiyerinin pH'sı 1 M NaOH ve %50'lik Hidroklorik asit (HCl) yardımıyla pH 6.5, 7.35, 8 ve 9 değerlerine getirilerek optimum sıcaklık değerinde fermentasyon gerçekleştirilmiş ve PHB üretim miktarları tespit edilmiştir.

3.8.3. NaCl etkisi

İzolatların PHB üretim miktarlarının artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmalarında, en iyi PHB üretiminin gerçekleştiği besiyerinde diğer bileşenler sabit tutularak 0, 1, 2, 3, 4, 5 M NaCl konsantrasyonlarında fermentasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve PHB üretim miktarları tespit edilmiştir.

3.8.4. İnkübasyon süresinin etkisi

İzolatların PHB üretim miktarlarının artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmalarında, en iyi PHB üretiminin gerçekleştiği MSM besiyeri kullanılarak inkübasyon süresinin PHB üretimine etkisi tespit edilmiştir. Bu çalışma; fermentasyon aşaması sırasında, fermentasyon kültüründen her 24 saatte bir alınan kültürlerin PHB üretim miktarlarını belirlemek üzerine olmuştur. Bu işlem PHB üretim miktarının azalma gösterdiği saate kadar sürdürülmüştür.

3.8.5. Farklı karbon kaynaklarının etkisi

İzolatların PHB üretim miktarlarının artırılmasına yönelik optimizasyon çalışmalarında, en iyi PHB üretiminin gerçekleştiği besiyerinde glukoz, nişasta ve

gliserol gibi farklı karbon kaynakları %4 oranında eklenerek fermantasyon işlemi gerçekleştirilmiş ve PHB üretim miktarları tespit edilmiştir.

3.8.6. Tarımsal atıkların karbon kaynağı olarak besiyerine eklenmesi

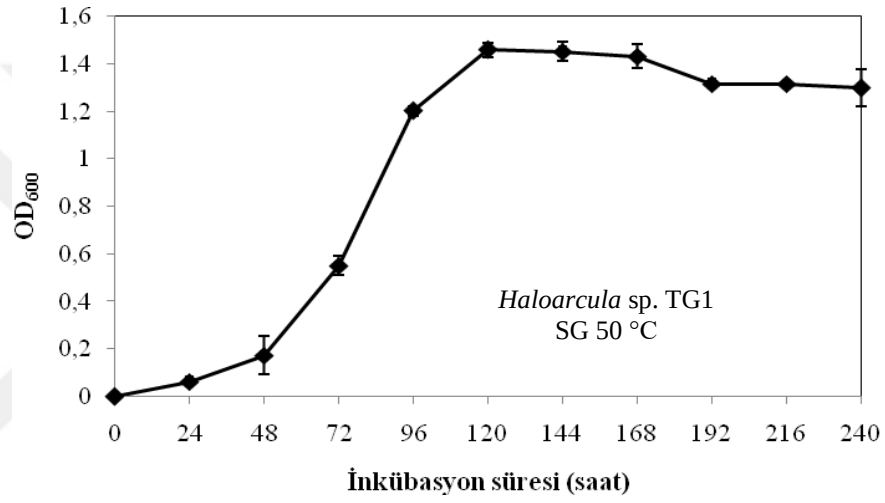
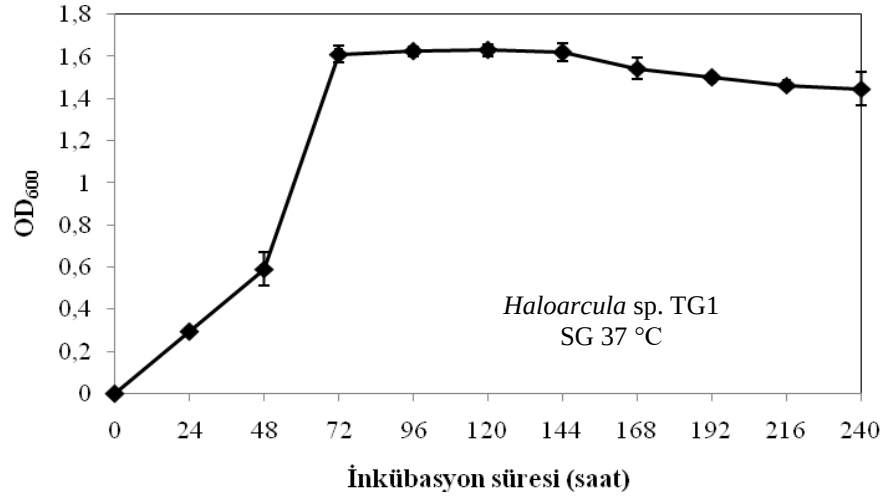
Şeker pancarı küspesi, mısır koçanı ve fındık zurufunu olabildiğince ince parçalara ayrılarak yaklaşık 1 hafta boyunca 60 °C’de fırında kurutulup ince tanecikler halinde öğütülmüştür. Chen ve Yang (1984) tarafından açıklandığı şekilde kurutulan maddeler çinko klorür metodu ile hidrolize edilmiştir. Buna göre; 1 g örnek 5 mL %2 oranında HCl içeren ZnCl₂ çözeltisi içerisinde şişirilmiş, ardından, 98 °C’de 10 dak. inkübasyon ile hidrolize edilerek selülozun çözünmesi sağlanmıştır. Oluşan çözelti içerisine 5 mL %2’lik HCl eklenmiştir. 98 °C’de 10 dak. ısıtılarak selülozun glikoza hidrolizi sağlanmıştır. Deney sonrasında elde edilen sıvıdaki glukoz miktarı DNS yöntemi (Miller, 1959) ile tayin edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Suşların 37 °C ve 50 °C Sıcaklıklarda SG Besiyerindeki Üreme Profilleri

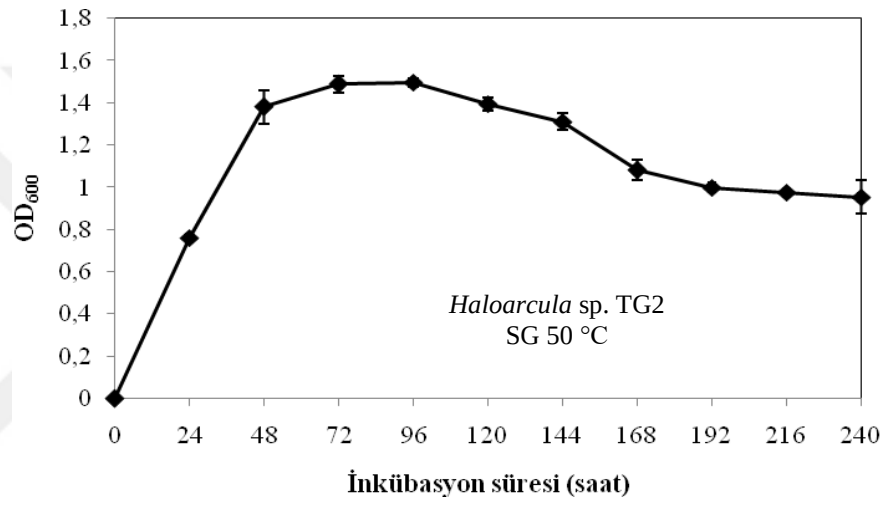
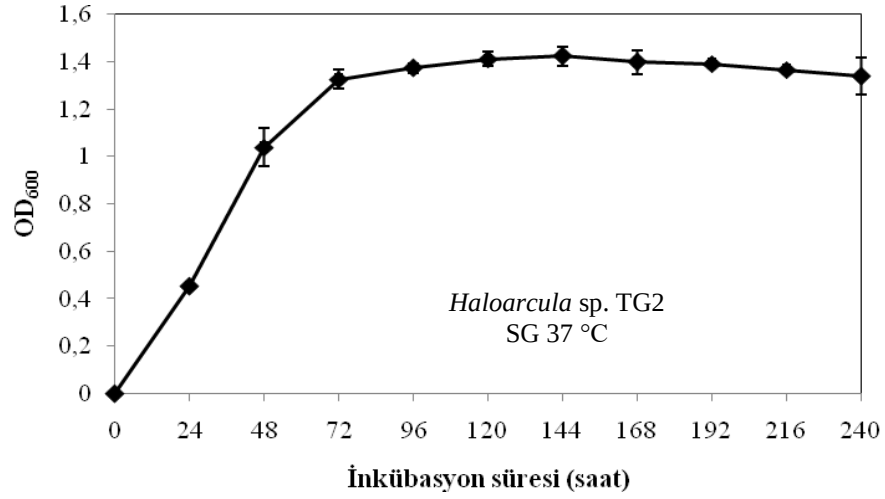
Mikroorganizmaların PHB üretimleri genel olarak üremenin en iyi olduğu logaritmik fazdan başlamaktadır, ve üreme hız ve başarısıyla doğru orantılı olarak üretimleri gerçekleşmektedir. Bu nedenle, suşların üremelerinin iyi olduğu SG (Abanoz, 2016) besiyerinde iki farklı sıcaklıkta üreme profillerini elde etmek ve fermantasyon öncesi ön kültür süresini tespit etmek amacıyla stoklardan ($OD_{600} \sim 1.8-2.0$) 1 mL alınıp 500 mL'lik erlenler içerisindeki 100'er mL SG sıvı besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir. Tüm suşlar 37 °C ve 50 °C olmak üzere iki farklı sıcaklık kullanılarak 150 rpm'de 10 gün boyunca çalkalayıcı inkübatörde (Labwit) inkübe edilmiştir. 24 saat aralıklarla kültürden örnekler alınarak 600 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometre cihazı (Shimadzu UV) ile ölçülmüştür.

İki farklı sıcaklıkta SG besiyerinde üretilen *Haloarcula* sp. TG1 suşuna ait üreme eğrileri Şekil 4.1'de verilmektedir. 37 °C'de SG kültüründe lag fazı gözlenmeyen suşda logaritmik fazın $T_{48}-T_{72}$ arasında gerçekleştiği görülmektedir. Örneklemeye yapılan son saat olan T_{240} ya kadar durgunluk fazının devam ettiği tespit edilmiştir. En yüksek OD_{600} değeri 1.6'dır. *Haloarcula* sp. TG1 suşunun 50 °C'de inkübe edilen SG kültürlerinde, kısa bir lag fazının ardından (T_{48} 'e kadar) $T_{48}-T_{120}$ aralığında logaritmik faz evresini gerçekleştirmiş, $T_{120}-T_{240}$ aralığında durgunluk fazı devam etmiştir. Durgunluk fazı gerçekleştirdikten sonra ise ölüm fazına geçiş yapmıştır. Bu kültürün en yüksek OD_{600} değeri 1,4 olarak tespit edilmiştir. Bu suşun üremesi için en uygun sıcaklık olarak 37 °C tespit edilmiştir.



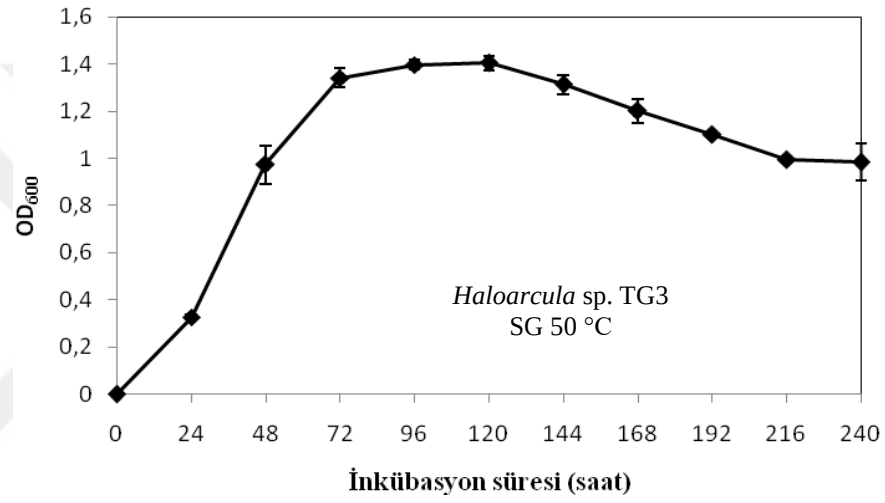
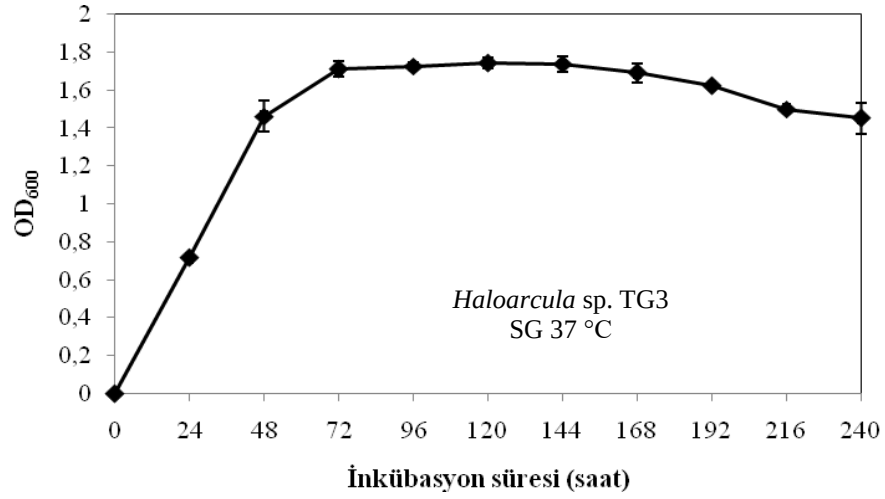
Şekil 4.1. *Haloarcula* sp. TG1 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Haloarcula sp. TG2 suşunun 37 °C’de ve SG besiyerinde lag fazı olmadan logaritmik fazı yaşadığı (T_{24} - T_{72}), bu saatten sonra inkübasyonun 240. saatine kadar durgunluk fazının devam ettiği görülmektedir. Optik yoğunluğu ise maksimum OD₆₀₀ 1,4 civarındadır. Aynı suşun 50 °C’de ve SG kültürlerinde çok hızlı bir üreme profili elde edilmiştir. lag fazı yaşanmadan hızlı bir logaritmik ve durgunluk fazları sonrasında (sırasıyla T_{24} - T_{48} ve T_{48} - T_{96}), T_{96} ’dan itibaren ölüm fazına girilmiştir. (Şekil 4.2). Bu bakımdan, bu suş için de 37 °C’nin üreme için daha uygun olduğu görülmüştür.



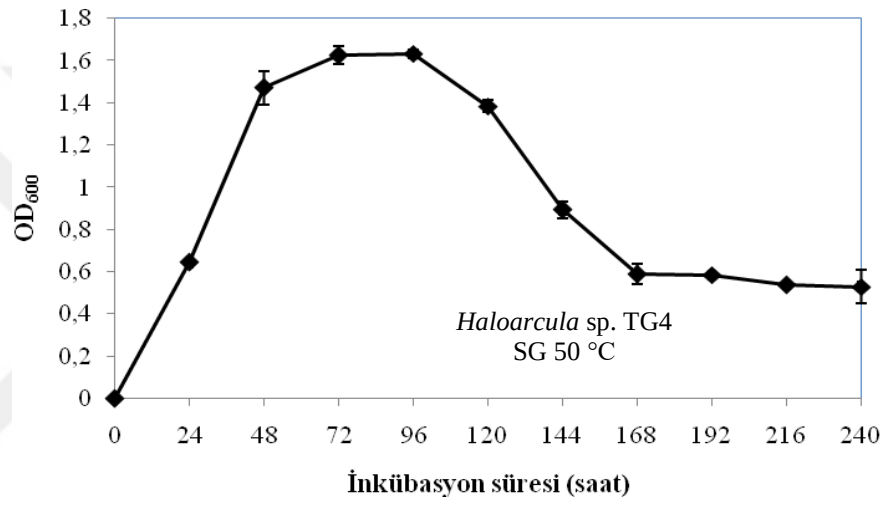
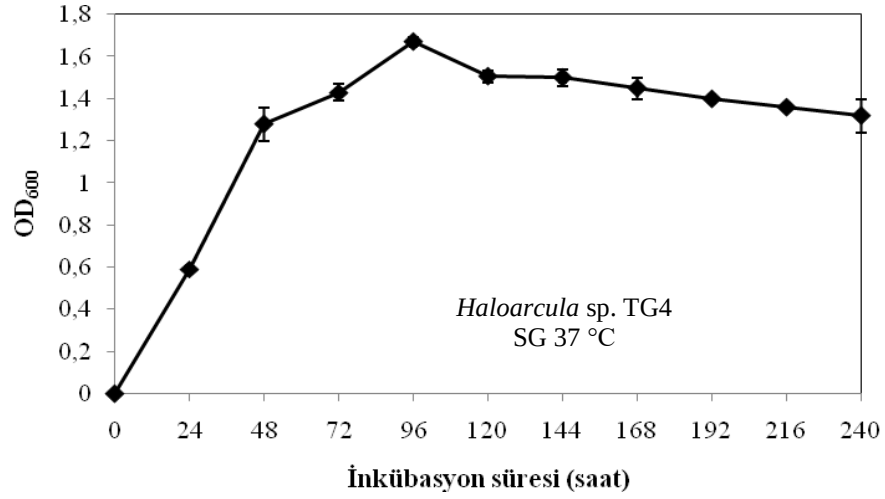
Şekil 4.2. *Haloarcula* sp. TG2 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Haloarcula sp. TG3 suşunda, 37 °C'de SG kültürlerinde üreme profili incelendiğinde; T₂₄₋₇₂ aralığında logaritmik faz, 72. saatten T₁₉₂'ye kadar durgunluk fazı ve ardından ölüm fazı gerçekleşmektedir. Maksimum OD₆₀₀~1.7 olarak tespit edilmiştir. Diğer yandan, aynı suşun 50 °C'deki SG kültürlerinde logaritmik faz profili T₂₄-T₇₂ arasında belirlenmiş, ölüm fazına ise T₁₂₀'de geçiş yapmıştır. (Şekil 4.3).



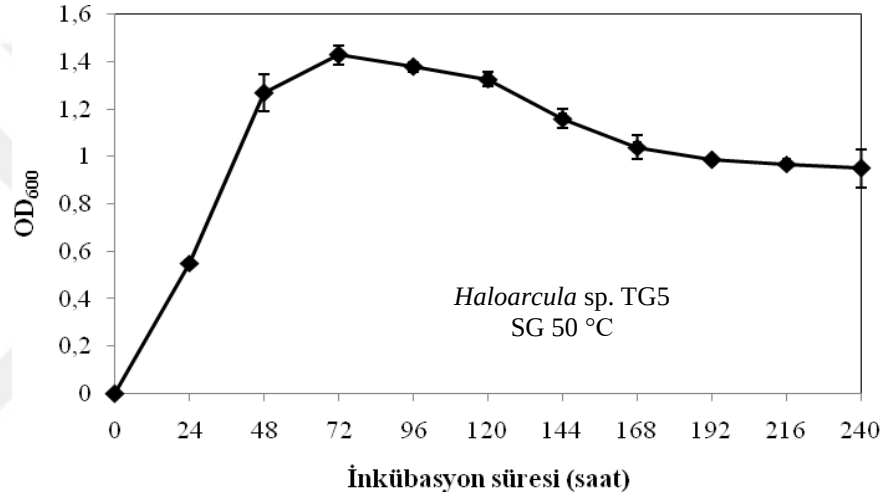
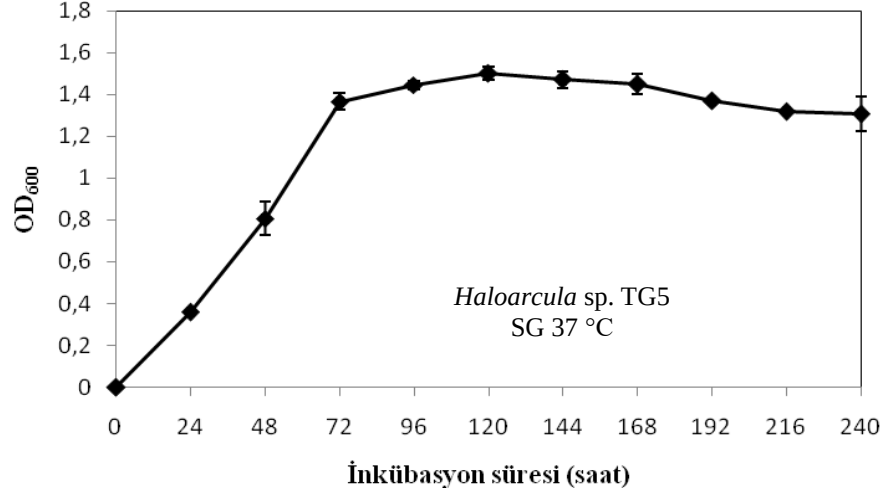
Şekil 4.3. *Haloarcula* sp. TG3 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Haloarcula sp. TG4 suşu, 37 °C’de ve SG besiyerinde doğrudan logaritmik faza geçerek T₇₂₋₁₂₀ arasındaki kısa bir durgunluk fazı sonrasında ölüm fazına geçiş yapmıştır. 50 °C’de ve SG kültürlerinde çan eğrisi şeklinde bir üreme profili elde edilmiştir. Kısa bir logaritmik ve durgunluk evrelerinin ardından T₉₆ sonrası ölüm fazına girilmiştir (Şekil 4.4).



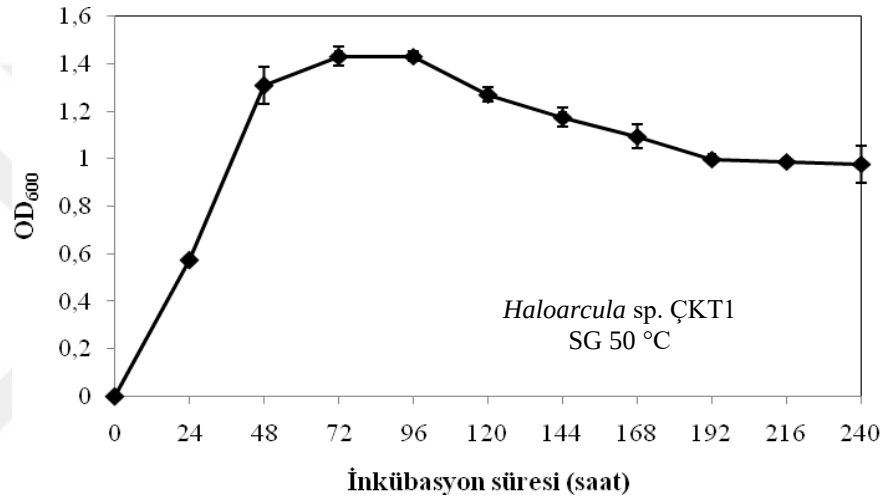
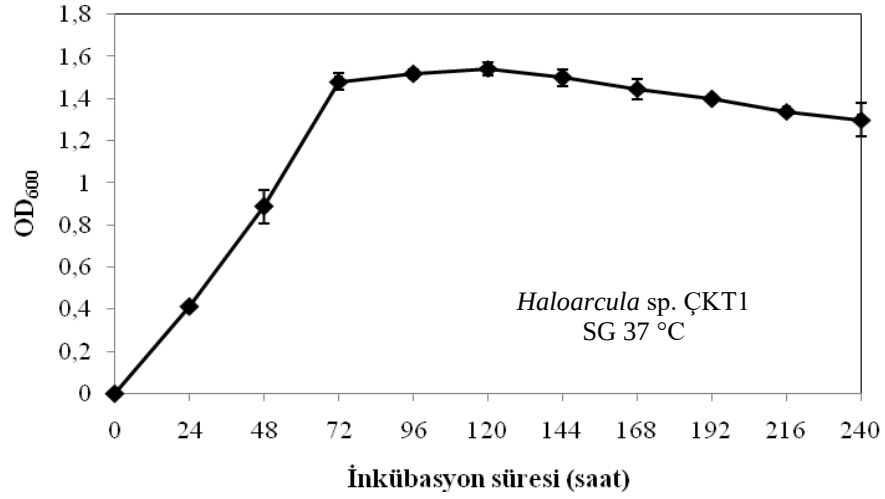
Şekil 4.4. *Haloarcula* sp. TG4 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Haloarcula sp. TG5 suşunun üreme profili incelendiğinde, 37 °C'de SG besiyerinde T₂₄- T₇₂ arasında logaritmik faz gözlemlenirken, T₇₂ sonrasında başlayan durgunluk fazı T₂₄₀'a değin devam etmektedir. *Haloarcula* sp. TG5 suşu 50 °C sıcaklıkta SG kültürlerinde, *Haloarcula* sp. TG4 suşu gibi, T₂₄-T₇₂ arasında logaritmik evresini yaşayıp, durgunluk fazını atlayarak doğrudan ölüm fazına geçmektedir (Şekil 4.5).



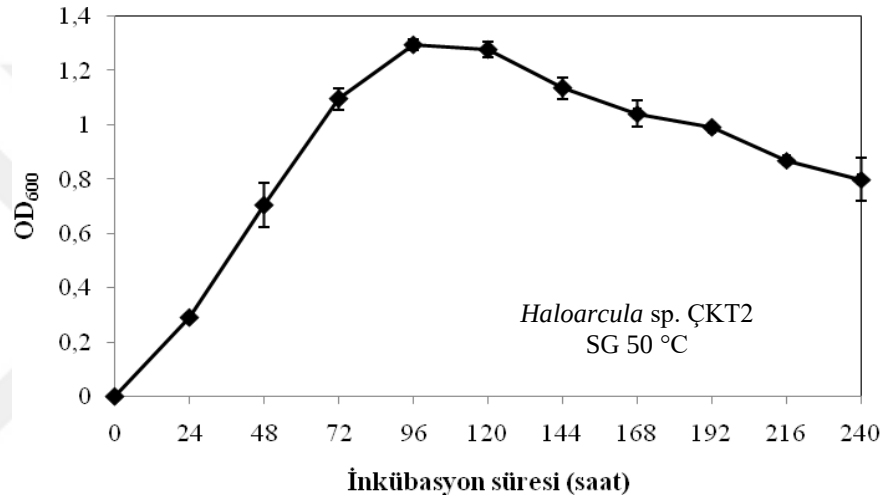
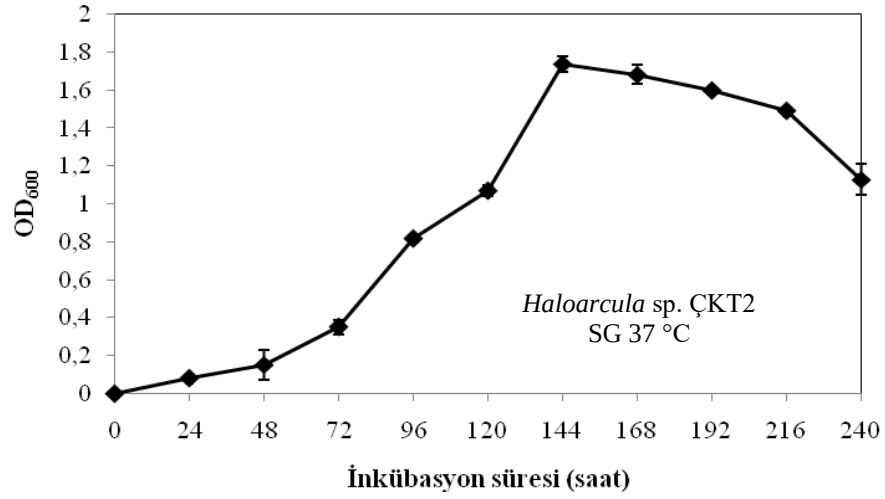
Şekil 4.5. *Haloarcula* sp. TG5 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Haloarcula sp. ÇKT1 suşu 37 °C'de SG besiyerinde, T_{72} 'ye kadar ki logaritmik fazı sonrasında kısa bir durgunluk evresi ve devamında T_{120} 'den itibaren yavaş seyreden bir ölüm fazını geçirmektedir. 50 °C'de SG besiyerinde bu suşun logaritmik fazı T_{24} - T_{72} arasında gözlemlenmiş olup, durgunluk fazı T_{72} - T_{96} aralığı iken, 96. saatten sonra ölüm fazına geçiş yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



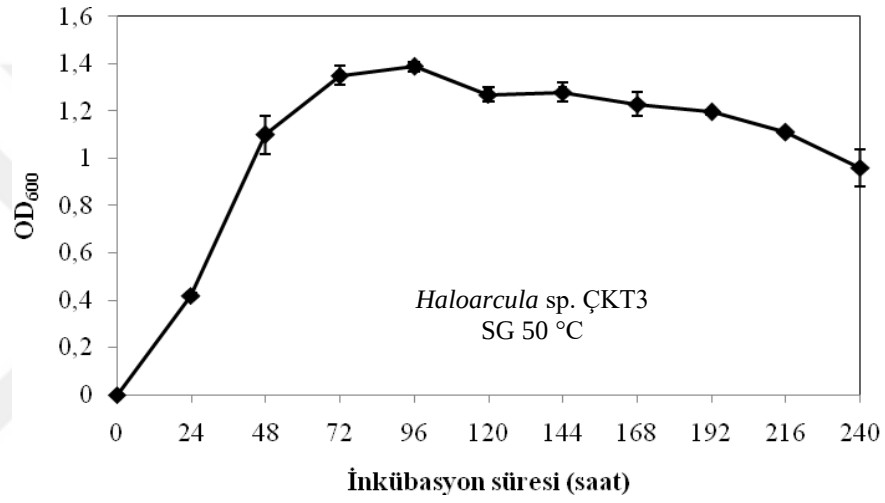
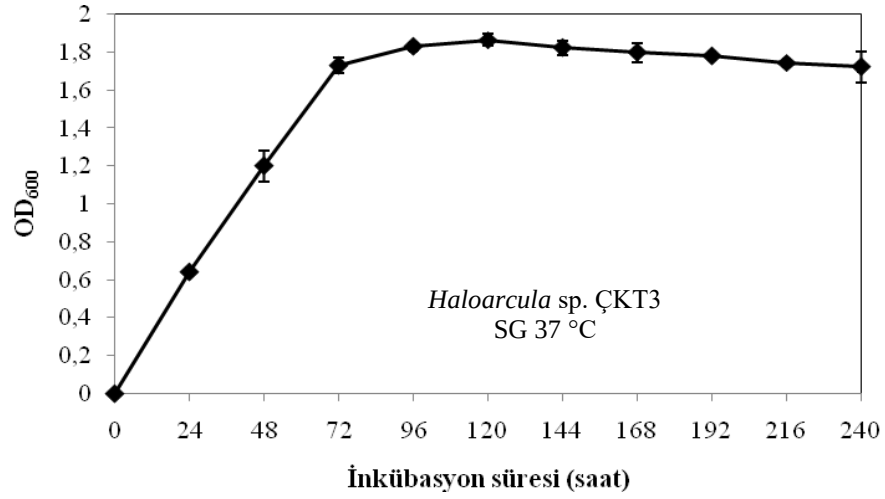
Şekil 4.6. *Haloarcula* sp. ÇKT1 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Haloarcula sp. ÇKT2 suşu, 37 °C ve SG besiyerinde T₂₄-T₇₂ saatleri arasındaki lag fazının ardından T₇₂-T₁₄₄ arasında logaritmik fazı geçirmiş, T₁₄₄-T₂₁₆ aralığında üremesinde yavaş, bu saat sonrasında ise hızlı bir azalma kaydedilmiştir. *Haloarcula* sp. ÇKT2 suşunun 50 °C'deki SG kültürlerinde lag fazı yaşamadan T₉₆'ya kadar hızlı bir logaritmik evre ve bu saatin ardından ölüm evresi gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). En yüksek optik yoğunluk OD₆₀₀:1,8 olarak ve 37 °C'deki kültürlerinde kaydedilmiştir.



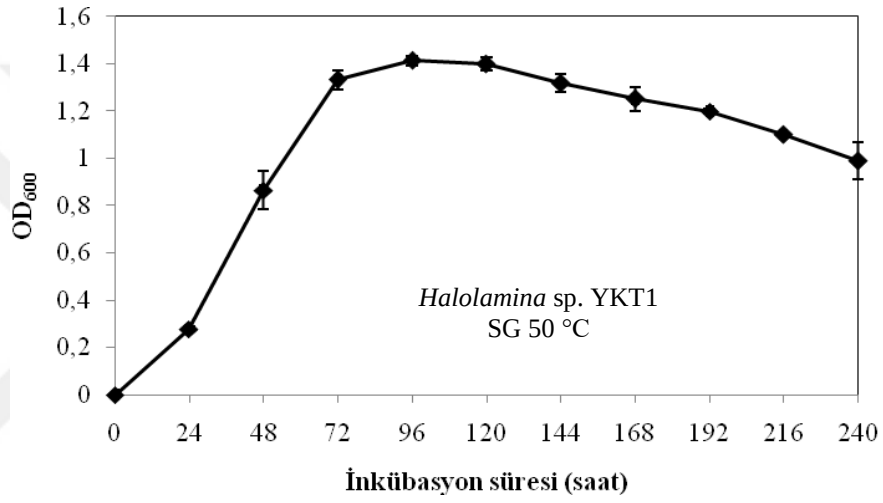
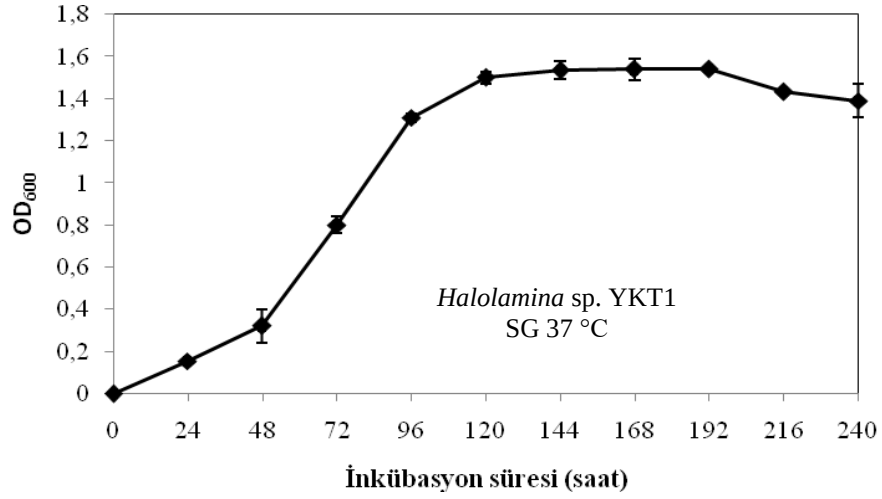
Şekil 4.7. *Haloarcula* sp. ÇKT2 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

37 °C’de ve SG besiyerinde inkübe edilen *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunun üreme profili incelendiğinde, doğrudan ve T₂₄-T₉₆ aralığında logaritmik faza geçiş yaptığı ve 10. güne kadar durgunluk fazının devam ettiği tespit edilmiştir. Diğer yandan, 50 °C’de SG besiyerindeki üremesi daha az olup, SG kültüründe T₇₂’ye kadar logaritmik fazı yaşayıp ardından yavaş yavaş ölüm fazına geçmiştir (Şekil 4.8).



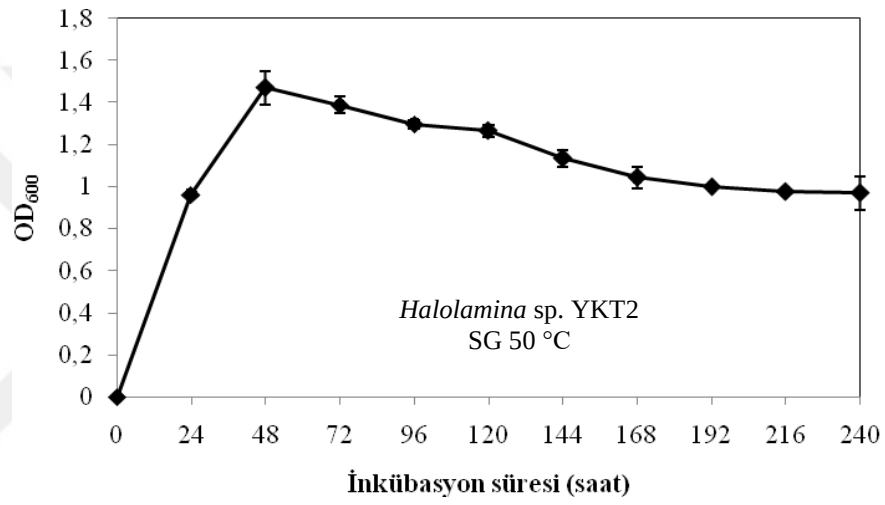
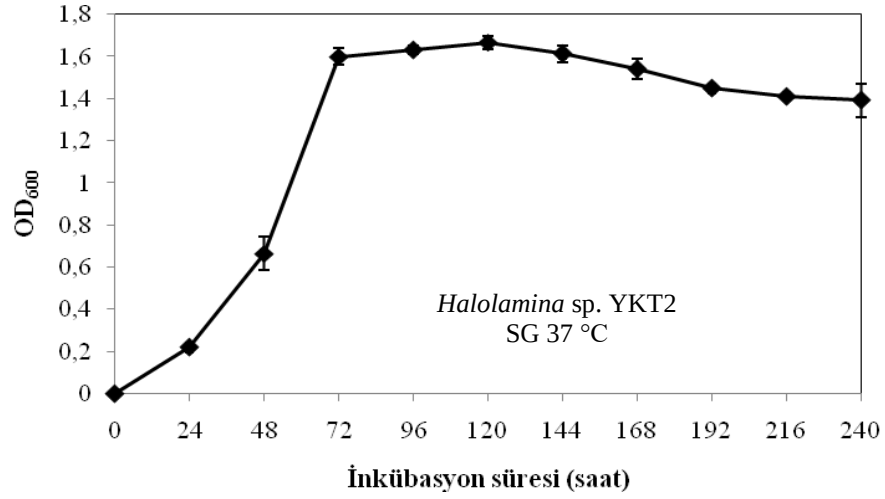
Şekil 4.8. *Haloarcula* sp. ÇKT3 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Halolamina sp. YKT1 suşunun üreme eğrisi incelendiğinde, 37 °C'deki SG kültürlerinde T_{24-48} aralığındaki kısa bir lag fazının devamında T_{120} 'ye kadar süren bir logaritmik faz geçirdiği görülmektedir. Durgunluk fazı $T_{120}-T_{192}$ aralığında olup T_{192} 'den sonra ölüm fazına geçmiştir. 50 °C'deki SG kültürlerinde lag fazı görülmeyen sušta logaritmik faz $T_{24}-T_{72}$ arasında, durgunluk fazı ise inkübasyonun 72-120 saatleri arasında tespit edilmiştir. Ardından, suşun üreme eğrisinde düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. *Halolamina sp. YKT1* suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

Halolamina sp. YKT2 suşunun üremesi incelendiğinde ise logaritmik fazı 37 °C'deki SG kültürlerinde logartimik fazı T_{24} - T_{72} aralığında geçirdiği ve devamında durgunluk fazında kaldığı görülmektedir. 50 °C'deki SG kültürlerinde T_{48} 'e kadar hızlı bir üreme ardından ise üremede dereceli bir azalma söz konusudur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. *Halolamina* sp. YKT2 suşunun 37 °C ve 50 °C sıcaklıkta SG besiyerinde üreme profilleri

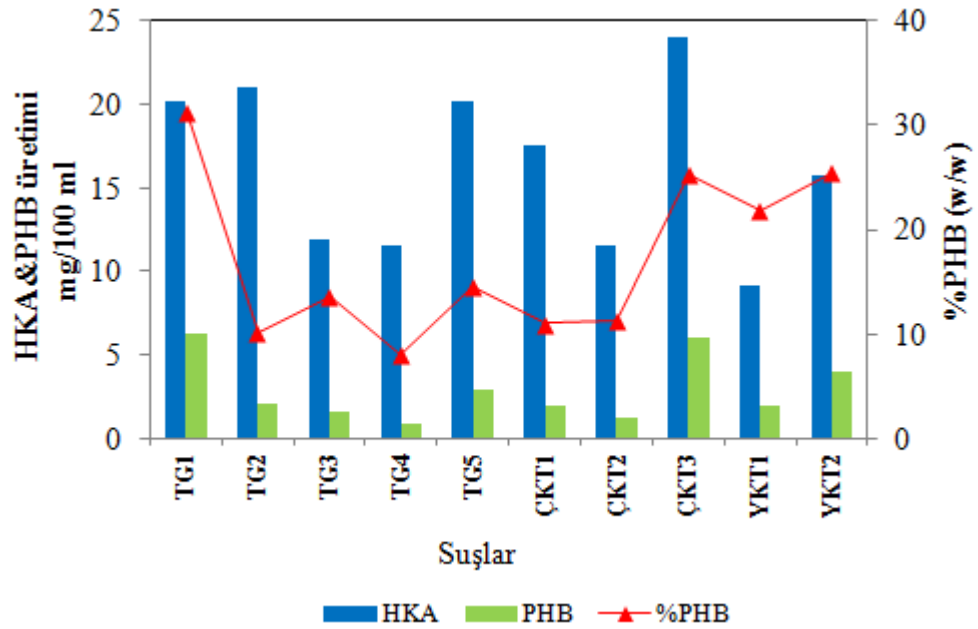
Sonuçlar incelendiğinde, suşların SG besiyerindeki üreme profillerinin 37 °C'de daha iyi olduğu ve 72 saatin genel olarak logaritmik fazın sonu durgunluk fazın başlangıcı olarak uygun bir süre olduğu tespit edilmiştir.

4.2. Suşların PHB Üretimlerinin Belirlenmesi

Çalışmada *Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşlarında PHB üretimlerinin belirlenmesi amacıyla, stoklardan 1 mL alınıp 50 mL'lik SG besiyerlerine ekim yapılmış, 72 saat inkübasyon sonrasında %3 oranında 100 mL'lik MSM (Getachew ve Woldeesenbet, 2016) besiyerine ekim gerçekleştirilmiştir. 37 °C ve 150 rpm'de 96 saatlik inkübasyon sonrasında suşların kuru hücre ağırlıkları ve PHB üretimleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.11).

Çizelge 4.1. Suşlara ait MSM kültürlerinde %PHB verimleri

Suşlar	Hücre Kuru Ağırlığı (HKA) (mg/100 mL)	PHB miktarı (mg/100 mL)	Verim (%)
<i>Haloarcula</i> sp. TG1	20,2	6,33	31,36
<i>Haloarcula</i> sp. TG2	21	2,14	10,20
<i>Haloarcula</i> sp. TG3	11,9	1,62	13,66
<i>Haloarcula</i> sp. TG4	11,5	0,92	8,04
<i>Haloarcula</i> sp. TG5	20,2	2,93	14,52
<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT1	17,5	1,92	11,02
<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT2	11,6	1,30	11,27
<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3	24,0	6,05	25,23
<i>Halolamina</i> sp. YKT1	9,2	2,01	21,89
<i>Halolamina</i> sp. YKT2	15,8	4,03	25,51



Şekil 4.11. Suşlara ait MSM kültürlerinde kuru hücre ağırlığına göre %PHB üretimi *Haloarcula* sp. TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, ÇKT1, ÇKT2, ÇKT3, *Halolamina* sp. YKT1 ve YKT2

MSM besiyeri kullanılarak gerçekleştirilen fermantasyon sonrasında en iyi %PHB verimine sahip suş %31,36 ile *Haloarcula* sp. TG1 olarak belirlenirken, onu sırasıyla *Halolamina* sp. YKT2 (%25,51) ve *Haloarcula* sp. ÇKT3 (%25,23) suşları izlemektedir. Çalışmanın devamında, en yüksek %PHB verimlerinin elde edildiği bu üç suş kullanılarak farklı besiyerlerinde %PHB verimleri karşılaştırılmıştır.

4.3. Farklı Besiyeri Kombinasyonlarının *Haloarcula* sp. TG1, ÇKT3 ve *Halolamina* sp. YKT2 Suşlarının %PHB Verimleri Üzerine Etkisi

Bakterilerde PHB üretiminin saptanması amacıyla farklı besiyeri kombinasyonları denenerek suşların PHB üretimleri belirlenmiştir. Farklı çalışmalarda PHB üretimi için kullanılan besiyerleri 4 farklı şekilde biraraya getirilerek (Çizelge 4.2) MSM'de en iyi %PHB veriminin elde edildiği üç suшта PHB üretimleri ve % verimleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.3, Şekil 4.12). *Haloarcula* sp. ve *Halolamina* sp. suşlarının üreme gereksinimleri dikkate alınarak besiyerlerine 5 M NaCl eklenmiştir (Abanoz, 2016).

Çizelge 4.2. Suşların PHB üretimlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan besiyeri kombinasyonları

Ön kültür/Fermantasyon	Kombinasyonun kullanıldığı çalışma
Sehgal Gibbons (Sehgal ve Gibbons, 1960)/ MSM (Mineral tuz besiyeri) (Getachew ve Woldesenbet, 2016) (SG-MSM)	Bu çalışma
Nutrient-rich AS16 (Alsafadi ve Al-Mashaqbeh, 2017)/ Nutrient limited MST besiyeri (Lu vd, 2008) (AS168-MST)	(Alsafadi ve Al-Mashaqbeh, 2017)
Nutrient-rich AS168 / Bazal besiyeri (Taran, 2011) (AS168-Bazal)	Bu çalışma
SW-25/SW-25 (Tekin vd, 2012) (SW25-SW25)	(Tekin vd, 2012)
SW-25/MSM	Bu çalışma

Çizelge 4.3. Suşlara ait farklı kültürlerde PHB üretimleri ve %PHB verimleri

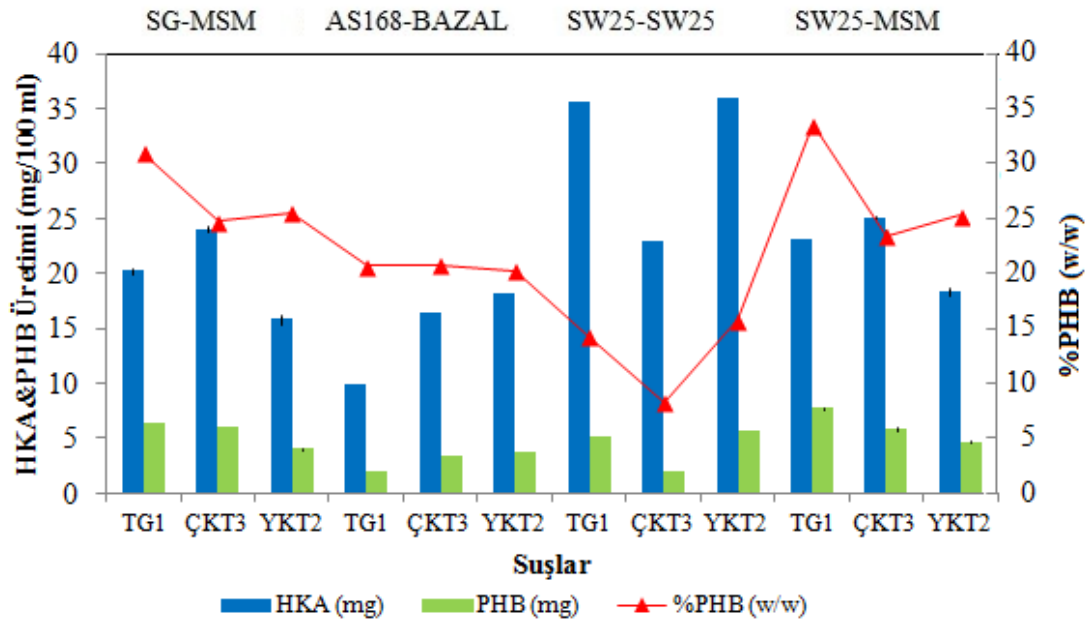
	<i>Haloarcula</i> sp. TG1			<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3			<i>Halolamina</i> sp. YKT2		
Besiyeri kombinasyonları	HKA* (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim
SG-MSM	21,98	6,8	30,95	25,120	6,26	24,76	19,72	5,03	25,5

Çizelge 4.3. (devam)

Besiyeri kombinasyonları	<i>Haloarcula</i> sp. TG1			<i>Haloarcula</i> sp. ÇKT3			<i>Halolamina</i> sp. YKT2		
	HKA* (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim
AS168-MST	136	2,34	1,72	231	2,57	1,11	189	3,36	1,77
AS168-Bazal	9,9	2,04	20,66	16,5	3,42	20,75	18,2	3,67	20,20
SW25-SW-25	35,6	5,06	14,22	23,0	1,89	8,24	35,9	5,66	15,77
SW25-MSM	23,08	7,75	33,56	25,1	5,87	23,4	18,35	4,68	25,23

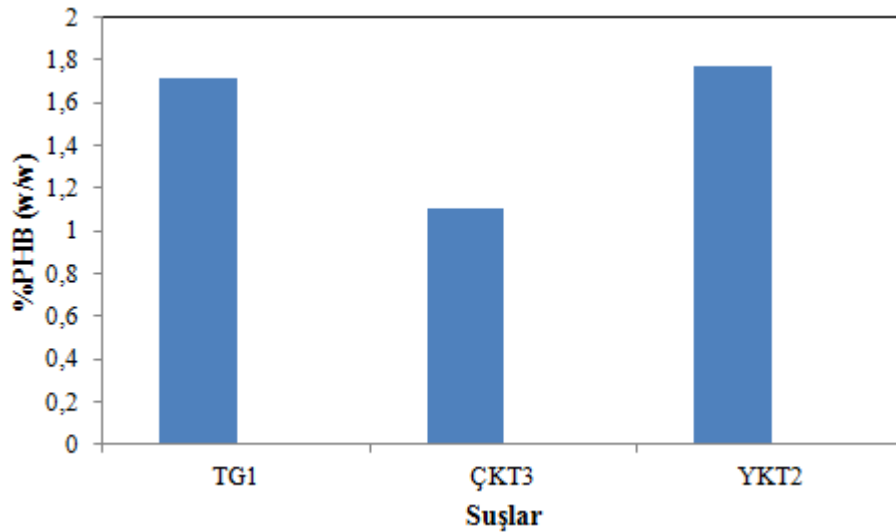
*HKA: Hücre Kuru Ağırlığı

AS168-Bazal besiyeri kombinasyonunda, tüm suşlarda %20 oranında %PHB verimleri elde edilmiştir. Üremenin iyi olduğu SW25 kültürlerinde ise %8-15 aralığında %PHB verimi sağlanmıştır. Karşılaştırılan besiyeri kombinasyonları içerisinde tüm suşlarda en iyi %PHB verimi SG önkültür MSM fermantasyon besiyerinde tespit edilmiştir. SG/MSM fermantasyonu sonrasında en yüksek %PHB verimi %31,36 değeri ile *Haloarcula* sp. TG1 suşunda kaydedilmiştir. Bu suşa ait SW25 ön kültürünün kullanıldığı MSM fermantasyonu sonrasında ise hücre kuru ağırlığının (23,08 mg/100 mL) %33,56'sı kadar PHB (7,75 mg/100 mL) üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Suşların farklı besiyeri kombinasyonlarında PHB üretimleri ve %PHB verimleri

Tüm suşlarda en iyi üremeyi sağlayan fermantasyon besiyeri MST olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, %PHB verimleri karşılaştırıldığında, en düşük değerler bu fermantasyon sonucunda elde edilmiştir. HKA (mg/100 mL) değerleri çok yüksek olduğundan Şekil 4.13'te ayrı olarak suşların %PHB verimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Suşların AS168-MST kültürlerindeki %PHB verimleri

Bu nedenle, çalışmanın devamında fermantasyon için en uygun önkültür/fermantasyon besiyeri kombinasyonu olan SW25/MSM kullanılarak

Haloarcula sp. TG1 suşunun farklı kültür koşullarında (sıcaklık, pH, NaCl konsantrasyonu, farklı karbon kaynakları ve inkübasyon süresi) %PHB birikiminin belirlenmesi için optimizasyon deneyleri yürütülmüştür.

4.4. *Haloarcula* sp. TG1 Suşunda PHB Üretiminin Optimizasyonu

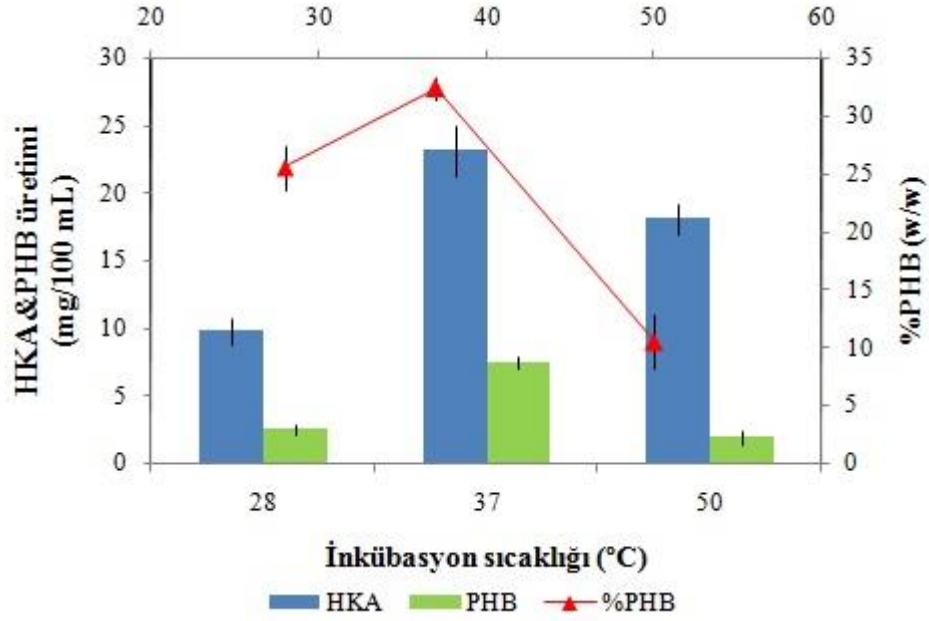
Optimizasyon çalışmalarında MSM besiyeri kullanılarak *Haloarcula* sp. TG1 suşu için optimum %PHB verimi parametre değerleri belirlenmiştir.

4.4.1. *Haloarcula* sp. TG1 suşunun %PHB verimi üzerine farklı inkübasyon sıcaklıklarının etkisi

Haloarcula sp. TG1 suşu MSM besiyerinde 28, 37 ve 50 °C olmak üzere farklı inkübasyon sıcaklıklarında 96 saat süresince üretilmiştir. Elde edilen HKA (mg/100 mL) ve PHB üretim değerleri ile %PHB (w/w) verimleri Çizelge 4.4 ve Şekil 4.14'te verilmektedir.

Çizelge 4.4. *Haloarcula* sp. TG1'e ait MSM kültürlerinde farklı inkübasyon sıcaklıklarında HKA, PHB üretimi ve %PHB verimi

Sıcaklık (°C)	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	%Verim
28	9,77	2,50	25,57±1,88
37	23,16	7,49	32,38±0,91
50	18,12	1,90	10,49±2,29



Şekil 4.14. *Haloarcula* sp. TG1'e ait MSM kültürlerinde farklı inkübasyon sıcaklıklarında HKA, PHB üretimi ve %PHB verimi

Haloarcula sp. TG1 suşunun MSM kültürleri hücre kuru ağırlığının (23,16 mg/100 mL) %32,38'i kadarlık bir %PHB üretimi (7,49 mg/100 mL) ile en iyi PHB birikimini 37 °C sıcaklığında sağlamıştır. Sıcaklığın 50 °C'ye çıkarılması sonucunda PHB birikiminde %30 değerinde azalma kaydedilmiştir.

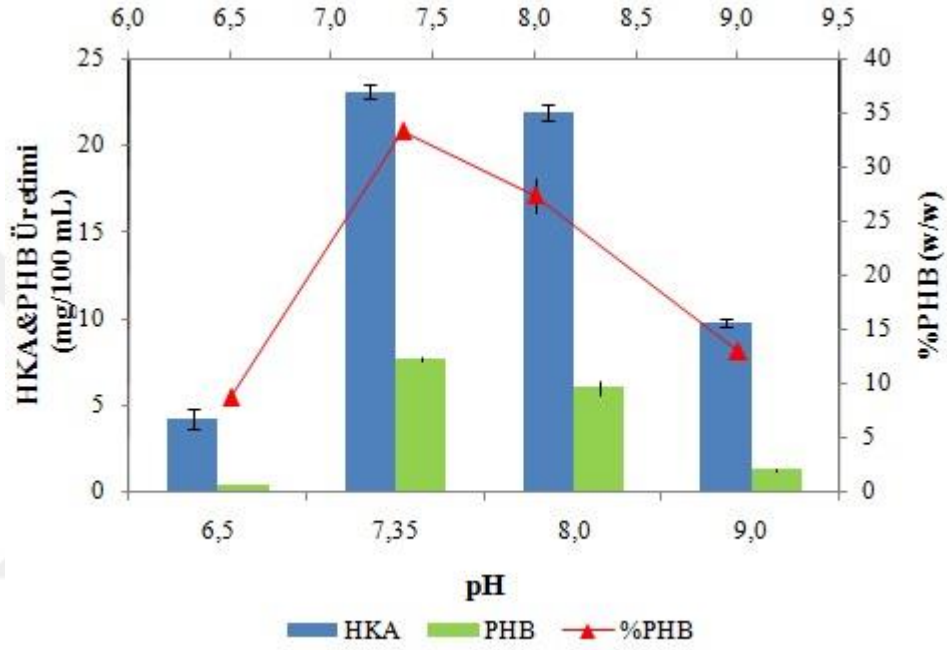
Flora vd (2010) farklı inkübasyon sıcaklıklarının *Azotobacter beijerinckii* suşunun PHB verimi üzerine etkisini araştırmış, en yüksek PHB veriminin 37 °C gerçekleştiğini ve hücre kuru ağırlığının %63'ne karşılık geldiğini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise *Rhodobacter sphaeroides* ES16 suşunun en yüksek PHB üretimini %49,05 verimle 32,6 °C'de gerçekleştirdiği tespit edilmiştir (Sangkharak ve Prasertsan, 2007). Yine PHB üretiminde sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada Taran (2011), *Haloarcula* sp. IRU1 suşunun 47 °C'de %46,6 oranında PHB ürettiğini belirlemiştir.

4.4.2. *Haloarcula* sp. TG1 suşunun %PHB verimi üzerine pH etkisi

Haloarcula sp. TG1 suşu farklı pH değerlerine (pH: 6.5-7.35-8.0-9.0) sahip MSM besiyerinde 37 °C sıcaklıkta ve 150 rpm'de 96 saat süresince inkübe edilmiştir. Elde edilen HKA (mg/100 mL) ve PHB üretim değerleri ile %PHB (w/w) verimleri Çizelge 4.5 ve Şekil 4.15'te verilmektedir.

Çizelge 4.5. *Haloarcula* sp. TG1'e ait farklı pH değerlerindeki MSM kültürlerinde HKA, PHB birikimi ve %PHB verimi

pH Değerleri	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim
6.5	4,16	0,36	8,64±0,53
7.35	23,13	7,78	33,28±0,53
8	21,93	6	25,52±1,51
9	9,73	1,26	13,10±0,05



Şekil 4.15. *Haloarcula* sp. TG1'in farklı pH değerlerinde %PHB verimi

Haloarcula sp. TG1 suşunun asidik pH değerinde (pH:6.5) üremesi ve PHB üretimi oldukça az olduğundan, %PHB verimi çok düşük orandadır (%8,64). pH:9.0'da ise asidik pH değerine kıyasla üreme, PHB üretimi ve %PHB verimi (%13,1) bir miktar daha yüksektir. Hücre kuru ağırlığına (23,13 mg/100 mL) kıyasla en yüksek PHB birikimi (7,78 mg/100 mL) %33,28 ile pH:7.35 değerinde elde edilmiştir. pH'nın 8.0 olması suşun %PHB verimini, pH:7.35'teki değerine göre %24 oranında azaltmıştır. Dolayısı ile, *Haloarcula* sp. TG1 suşu 37 °C sıcaklıkta ve pH 7.35 değerinde hücre kuru ağırlığına göre en iyi PHB birikimini gerçekleştirmektedir.

Singh vd (2011), *Bacillus* sp. üzerine yapmış oldukları pH optimizasyonu çalışmalarında, 7 farklı pH değerinin (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) PHB verimine etkisini incelemişlerdir. Çalışmalar sonucunda en yüksek PHB verimini %60,57

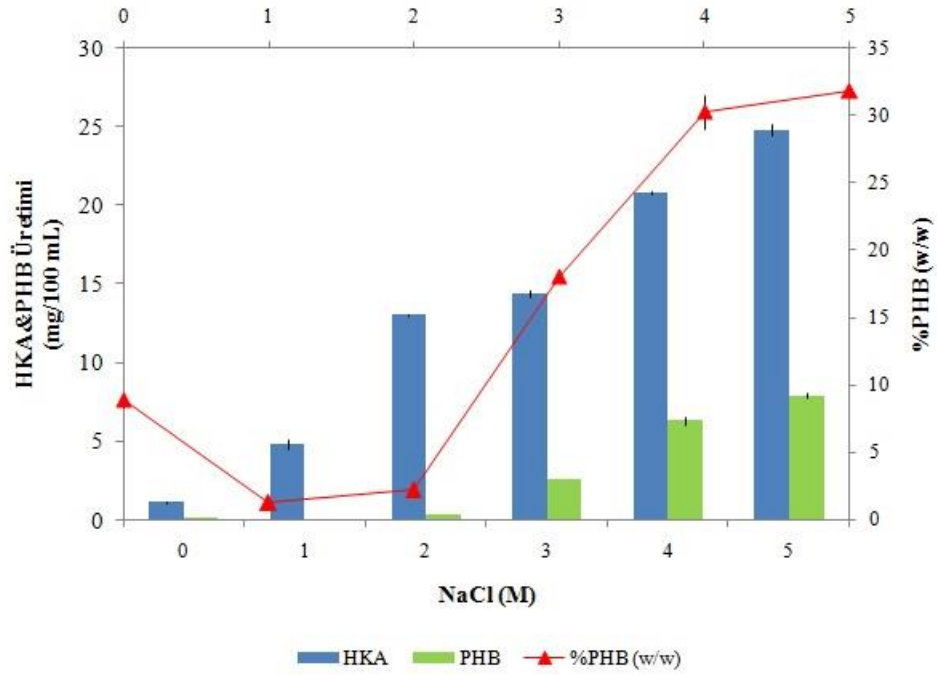
oranla pH 7.0 değerinde tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada, yapılan optimizasyon çalışmaları neticesinde *Nostoc muscorum* suşunun pH: 7.5 değerinde hücre kuru ağırlığının %6,44' oranında PHB ürettiği bildirilmiştir (Ansari ve Fatma, 2016).

4.4.3. *Haloarcula* sp. TG1 suşunun %PHB verimi zerine NaCl etkisi

Haloarcula sp. TG1 suşu NaCl içermeyen ve 1-5 M aralığında NaCl içeren MSM besiyerinde (pH; 7.35), 37 C sıcaklıkta ve 150 rpm'de 96 saat süresince inkübe edilmiştir. Elde edilen HKA (mg/100 mL) ve PHB retim değerleri ile %PHB (w/w) verimleri izelge 4.6 ve şekil 4.16'da verilmektedir.

Çizelge 4.6. *Haloarcula* sp. TG1'in ait farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren MSM kültürlerinde HKA, PHB birikimi ve %PHB verimi

NaCl konsantrasyonu (M)	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	%Verim
0	1,13	0,101	8,92±0,53
1	4,86	0,06	1,23±0,06
2	13,06	0,3	2,29±0,16
3	14,4	2,6	18,05±0,25
4	20,86	6,3	30,20±1,23
5	24,8	7,9	31,85±0,13



Şekil 4.16. *Haloarcula* sp. TG1 suşunda farklı NaCl konsantrasyonlarındaki %PHB verimi

Haloarcula sp. TG1 suşunun hücre kuru ağırlığına (24,8 mg/100 mL) oranla %PHB birikimi (7,9 mg/100 mL) %31,85 oranı ile en yüksek 5 M NaCl konsantrasyonunda elde edilmiştir. NaCl içermeyen MSM kültürlerinde hem üreme hem de PHB üretimi çok düşük olup hücre kuru ağırlığının (1,13 mg/100 mL) %8,92'si PHB granüllerinden oluşmaktadır. Şekil 4.16'da görüldüğü üzere NaCl konsantrasyon artışına paralel olarak %PHB verimi artış göstermektedir.

Fernandez-Castillo vd (1986), 3 farklı halofilik suş (*Haloferax volcanii*, *Haloferax gibbonsii* ve *Haloferax hispanicum*) ile yapmış oldukları çalışmada, NaCl konsantrasyonunun PHB verimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Suşların en yüksek PHB verimlerinin %25 NaCl konsantrasyonu içeren besiyerinde ve sırasıyla hücre kuru ağırlıklarının %7, %1,2 ve %2,4'ü oranında olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada Tekin (2008), İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan izole ettiği *Haloferax alexandrinus*'un PHB veriminin farklı NaCl konsantrasyonlarını kullanarak optimizasyonu üzerine yapmış olduğu çalışmada en yüksek PHB verimini %20 NaCl konsantrasyonunda %4,48 olarak belirlemiştir. Alsafadi ve Al-Mashaqbeh (2017), *Haloferax mediterranei* bakterisinin PHB üretimi üzerinde NaCl konsantrasyonu

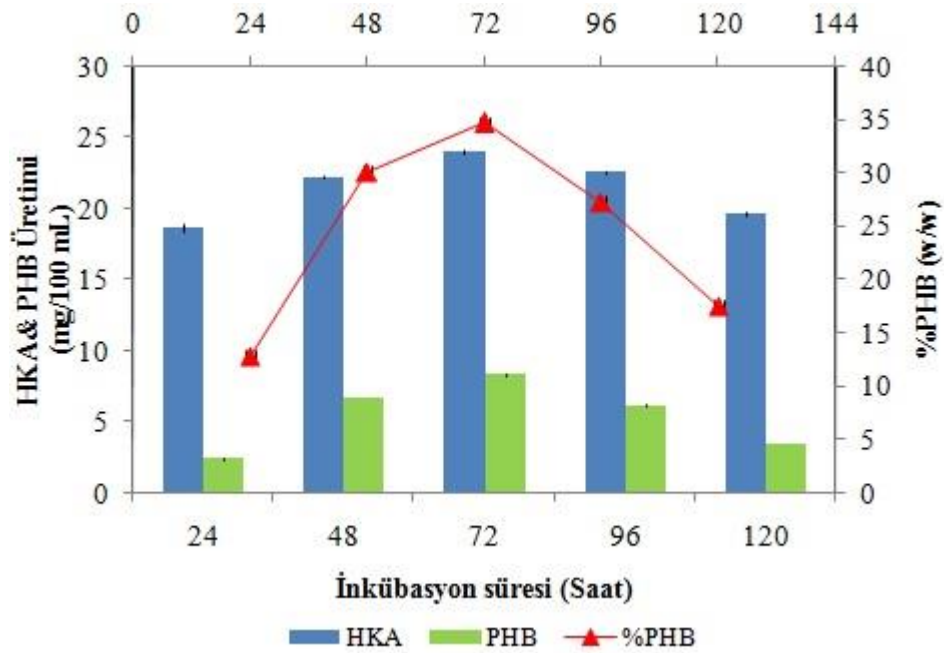
etkisini belirlemek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, suşun en yüksek PHB üretimini %22'lik NaCl konsantrasyonunda gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir.

4.4.4. Optimum koşullarda *Haloarcula* sp. TG1 suşunda en uygun inkübasyon süresinin belirlenmesi

Haloarcula sp. TG1 suşu MSM besiyerinde en iyi %PHB verimi için tespit edilen optimum koşullar 37 °C sıcaklık, pH: 7.35 değeri ve 5 M NaCl olup, hücre kuru ağırlığına göre %31,85 oranında PHB birikimi sağlanmıştır. 150 rpm çalkalama ve 120 saat inkübasyon süresince 24 saatte bir örneklem yapılarak suşun optimum koşullarda zaman bağlı %PHB verimi tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.17'de verilmektedir.

Çizelge 4.7. *Haloarcula* sp. TG1 suşunda optimum kültür koşullarında zaman bağlı %PHB verimi

İnkübasyon süresi (Saat)	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim
24	18,66	2,38	12,74±0,06
48	22,17	6,66	30,05±0,14
72	24	8,31	34,64±0,51
96	22,51	6,13	27,23±0,13
120	19,58	3,42	17,46±0,03



Şekil 4.17. *Haloarcula* sp. TG1 suşunda optimum kültür koşullarında zamana bağlı %PHB verimi

Şekil 4.17’de görüldüğü üzere, *Haloarcula* sp. TG1 suşu MSM kültürlerinde optimum koşullarda en iyi %PHB üretimini %34,64 ile inkübasyonun 72. saatinde gerçekleştirmektedir.

Bhagowati vd (2015)’nin *Bacillus cereus* SE-1 suşu ile yapmış olduğu PHB üretimi optimizasyonu çalışmalarında, sodyum hipoklorit-kloroform ekstraksiyonu metodunu kullanarak suşa ait en yüksek PHB veriminin 72. saat sonunda alınan örneklerden elde edildiği bildirilmiştir. Quillaguamán vd (2007) *Halomonas boliviensis* LC1 suşu ile yapmış oldukları çalışmada, MSM fermantasyon besiyerinde karbon kaynağı olarak süktroz kullanıldığında, farklı inkübasyon sürelerinin PHB üretimine etkisini araştırmışlardır. 19 saatlik inkübasyon süresi sonunda PHB üretiminin (7.7 g/L) hücre kuru ağırlığına (14.0 g/L) oranını %54 olarak tespit ederek en iyi inkübasyon süresinin 19. saat olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Ömeroğlu ve Karaboz (2010), İzmir Orta Körfezi’nden izole ettikleri *Vibrio* sp.’nin en yüksek PHB üretiminin gerçekleştiği inkübasyon süresini 42. saat olarak belirlemişlerdir. Buna göre *Vibrio* sp.’nin 42. saatlik inkübasyonu sonucunda PHB üretiminin (58,15 mg/L) hücre kuru ağırlığına (242,1 mg/L) oranını %24 olarak belirlemişlerdir. *Haloarcula* sp. TG1 ile gerçekleştirdiğimiz inkübasyon süresi optimizasyonu çalışmamızda 72. saatte üretilen PHB veriminin %24’ten %22,51’e düştüğü belirlenmiştir. Bu durum stres koşulları altında karbon ve enerji kaynağı olarak depo edilen PHB’nin mikroorganizma tarafından kullanılmaya başlanması ile açıklanabilir (Ömeroğlu ve Karaboz, 2010). İnkübasyon süresinin uzaması sonucunda, üretilen PHB miktarının azalması Mercan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir. Bu çalışmada, *Rhizobium* bakterisi inkübasyonun 48. saatinde %74,03’lük bir %PHB verimine sahipken, 72. saatte verim %36,10 ve 96. saatte %21,72’ye kadar düşmüştür (Mercan vd, 2002).

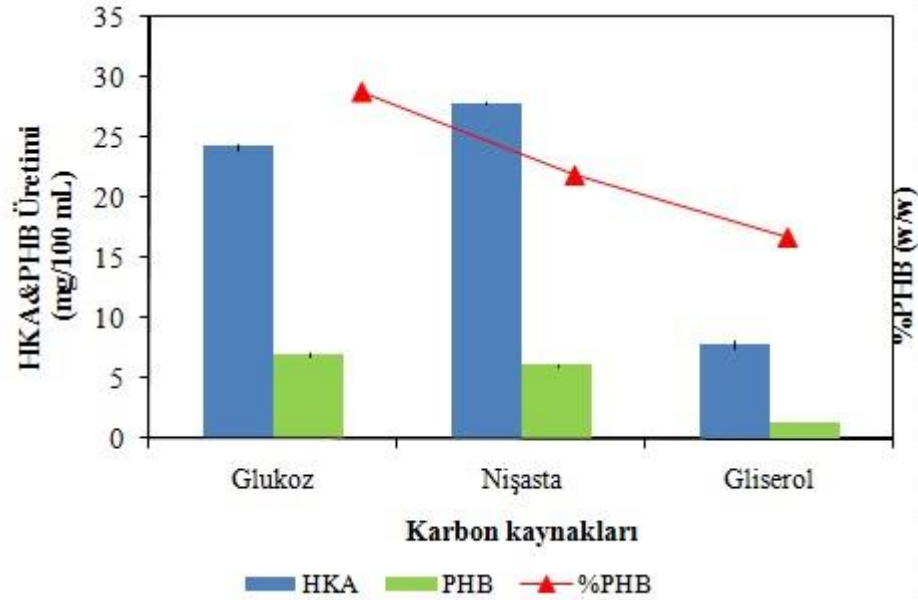
4.4.5. Farklı karbon kaynaklarının *Haloarcula* sp. TG1’de %PHB birikimi üzerindeki etkisi

MSM besiyeri %4 oranında glukoz içermektedir. Bilindiği gibi, farklı karbon kaynaklarının kullanımı suşların PHB birikimlerini farklı oranlarda etkilemektedir. Çalışmanın devamında, optimize edilen kültür koşulları altında glukoz kontrol olarak

kullanılarak aynı konsantrasyonda nişasta ve gliserol varlığında *Haloarcula* sp. TG1 suşunun hücre kuru ağırlığına oranla %PHB verimi karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.8, Şekil 4.18). Karşılaştırılan üç farklı karbon kaynağından glukozun olduğu MSM kültürlerinde hücre kuru ağırlığının (24,3 mg/100 mL) %28,8'inin PHB (7 mg/100 mL)'den oluştuğu tespit edilmiştir. Glukozun ardından %22,58 oranında PHB verimi ile nişasta, %16,66 PHB verimi ile gliserol gelmektedir.

Çizelge 4.8. *Haloarcula* sp. TG1'de farklı karbon kaynaklarının %PHB verimi

Karbon kaynakları	HKA (mg/100 mL)	PHB (mg/100 mL)	% Verim
Glukoz	24,3	7	28,8±0,63
Nişasta	27,9	6,1	22,58±0,27
Gliserol	7,8	1,3	16,66±0,45



Şekil 4.18. *Haloarcula* sp. TG1 suşunun farklı karbon kaynakları varlığında %PHB verimi

Literatürde mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarında PHB üretimlerinin belirlenmesi üzerine yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Söz gelimi, PHB üretimi üzerine en çok çalışılan bakterilerden olan *Alcaligenes eutrophus*'un karbon kaynağı olarak fruktozun kullanıldığı besiyerinde geliştirilmesiyle %80'e varan oranda %PHB verimi elde edilmiştir (Kim vd, 1994) *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun glukoz ve balık peptonu içeren besiyerinde fermantasyonu sonucunda da yine %80'e varan PHB verimi sağlanmıştır (Page ve

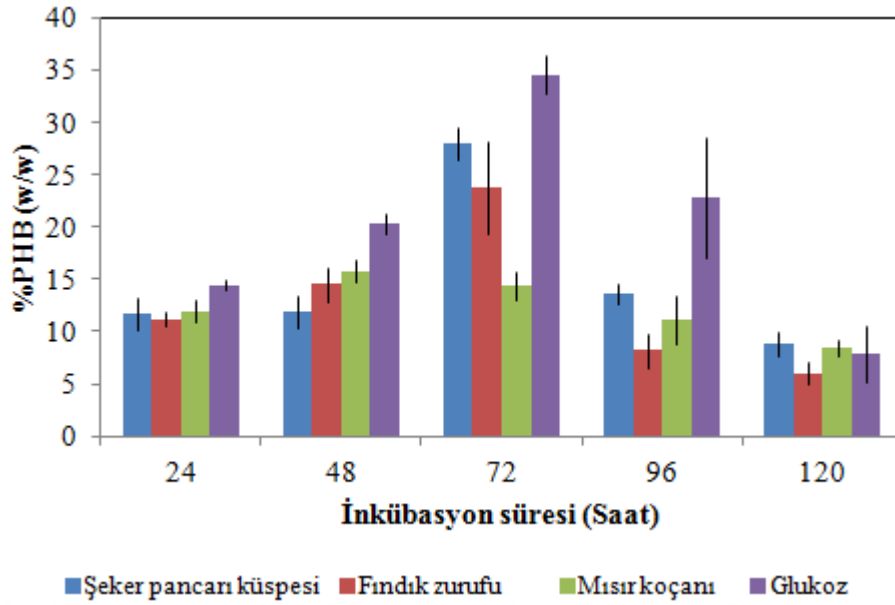
Manchak, 1995). Halofilik arkelerden *Haloferax mediterranei* ise glukoz ve nişasta içeren besiyerinde geliştirilip fosfor sınırlandırılması uygulandığında %60 verimle PHB üretmektedir (Lillo and Valera, 1990). Quillaguamán vd (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, yine halofilik bakterilerden *Halomonas boliviensis* LC1 suşunun substrat olarak nişasta hidrolizati kullanıldığında hücre kuru ağırlığının %56'sı oranında PHB biriktirdiği rapor edilmiştir. *Halomonas boliviensis* hücrelerinin oksijen sınırlandırmasının olmadığı koşullarda bu oranın %35'e düştüğü rapor edilmiştir (Quillaguaman vd, 2005). Bhagowati vd (2015)'nin *Bacillus cereus* SE-1 suşu ile yapmış olduğu çalışmada, farklı karbon kaynakları (dekstroz, laktoz, sükroz, maltoz, fruktoz ve galaktoz) arasından maltoz kullanıldığında suşun en yüksek PHB verimini gerçekleştirdiği ve PHB üretiminin (5,63 g/L) hücre kuru ağırlığına (12,72 g/L) oranının %44,23 olduğu bildirilmiştir.

4.1.1. *Haloarcula* sp. TG1 suşunun MSM besiyerinde karbon kaynağı olarak tarımsal atıkların kullanımı ve %PHB verimi üzerindeki etkileri

Çorum Şeker Pancarı Fabrikası'ndan temin edilen şeker pancarı küspesi, farklı kaynaklardan elde edilen mısır koçanı ve fındık zurufunun karbon kaynağı olarak kullanıldığı fermantasyon deneyinde, *Haloarcula* sp. TG1 suşunun hücre kuru ağırlığına (21,33 mg/100 mL) kıyasla %PHB verimi (5,97 mg/100 mL) en iyi şeker pancarı küspesi varlığında (%27,99 mg/100 mL) elde edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.19).

Çizelge 4.9. Karbon kaynağı olarak tarımsal atıkların kullanıldığı MSM kültürlerinde %PHB verimi

Saat	Glukoz			Şeker pancarı küspesi			Mısır koçanı			Fındık zurufu		
	HKA	PHB	%Verim	HKA	PHB	%Verim	HKA	PHB	%Verim	HKA	PHB	%Verim
24	21,85	3,16	14,4 ± 0,45	21,33	2,48	11,72 ± 1,58	25	2,97	11,97 ± 1,08	24,33	2,71	11,23 ± 0,59
48	21,57	4,36	20,2 ± 0,97	25,66	3,07	11,92 ± 1,47	20,66	3,26	15,82 ± 1,01	25,33	3,66	14,51 ± 1,6
72	21,86	7,54	34,5 ± 1,8	21,33	5,97	27,99 ± 1,6	24,66	3,52	14,33 ± 1,33	25,33	5,89	23,73 ± 4,4
96	20,24	4,61	22,8 ± 5,75	22,66	3,07	13,61 ± 0,95	23,33	2,57	11,17 ± 2,34	24	1,93	8,23 ± 1,62
120	19,31	1,51	7,85 ± 2,62	23	2	8,82 ± 1,21	24	2	8,43 ± 0,82	25,66	1,54	6,04 ± 1,06



Şekil 4.19. *Haloarcula* TG1 suşunun tarımsal atıklar kullanılarak PHB üretimi

Myshkina vd (2008), *Azotobacter chroococcum* 7B suşunun PHB üretiminin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, besiyerine %4 oranında glukoz eklediklerinde PHB üretiminin (3,7 g/L) hücre kuru ağırlığına (4,8 g/L) oranını %77,3 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada tarımsal atık olarak şeker kamışı kullanıldığında (%6), PHB üretiminin (0,9 g/L) hücre kuru ağırlığına (2,5 g/L) oranı %36,5 olarak belirlenmiştir. PHB üretiminde optimum pH ve sıcaklık denemelerinde ise sırasıyla, pH 7.0 ve 37 °C değerleri belirlenmiştir.

Gouda vd (2001)'ne ait çalışmada, şeker kamışı melası ve mısır suyu karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanılarak *B. megaterium*'da PHB üretimi incelenmiş, hücre gelişiminin en iyi olduğu melas yüzdesinin %3 olmasına rağmen, en yüksek PHB verimi olan %46,2'lik oranın %2 melas içeren besiyerinde elde edildiği bildirilmiştir.

Beaulieu vd (1995), *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 suşunda %3 glukoz ve farklı amonyum kaynakları ile şeker kamışı melasında PHB verimini araştırdıkları çalışmalarında, en iyi üreme ve PHB üretiminin amonyum sülfat içeren besiyerinde olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada, bakteri tarafından metabolize edilemeyen melas, karbon kaynağı olarak değil sadece büyüme aktivatörü olarak kullanılmıştır. Optimum üreme ve PHB üretiminin %0,3 melas oranında sağlandığı rapor edilmiştir. Çalışmada ulaşılan en yüksek PHB verimi ise %26 olarak bildirilmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Plastikler keşfedildikleri günden bugüne kadar en önemli endüstriyel ürünler arasında yerlerini almışlardır. Bu ürünlerin kullanımındaki kolaylıklar ve tercih edildikleri her alana kolay entegre olabilmeleri sayesinde oldukça talep gören ürünler olmuşlardır. Fakat, bu ürünlere karşı olan talebin her geçen gün artması, birçok sağlık ve çevresel sorunları da beraberinde getirmiştir. Kanserojen özelliklere sahip oldukları bilinen petrol türevi plastik ürünler, kullanımlarının ardından doğaya atıldıklarında yüzlerce yıl bozunmadan kalabilmekte ve tüm canlıların yaşam alanlarını olumsuz yönde etkilemektedirler. Bu nedenle, hayatın her alanına entegre olmuş plastik materyallere alternatif olabilecek biyoçözünür ve biyouyumlu özelliklere sahip biyoplastik ürünler üzerinde çalışmalar hızla devam etmektedir.

Bu çalışmada, Çankırı ve Yozgat Kaya Tuzu mağaraları ile Tuz Gölü olmak üzere Türkiye'deki üç farklı tuzcul habitatlardan önceden izole edilmiş *Haloarcula sp.* TG1, TG2, TG3, TG4, TG5, ÇKT1, ÇKT2 ve ÇKT3 ile *Halolamina sp.* YKT1 ve YKT2 suşlarının %PHB birikimleri belirlenmiştir. PHB üretim miktarındaki artış biyokütle ile doğru orantılı olduğundan (Chaudhry vd, 2011), öncelikle, suşların 37 ve 50 °C'lerde SG besiyerinde üreme profilleri incelenmiş ve 37 °C'de daha iyi bir üreme profili sergiledikleri tespit edilmiştir. Çalışmanın devamında, on farklı Haloarke suşunun SG önkültürü yapılarak MSM fermantasyon besiyerine ekim yapılmış 37 °C'de, 150 rpm'de 96 saat inkübasyon sonrasında kültürlerde PHB birikimi krotonik asit yöntemi ile belirlenmiştir. Hücre kuru ağırlığına kıyasla en iyi %PHB üreticisi suşun %31,36 değeri ile *Haloarcula sp.* TG1 olduğu bulunmuştur.

En iyi %PHB birikimine sahip olan suşun tespitinin ardından %PHB birikimini arttırmak amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. *Haloarcula sp.* TG1'de hücre kuru ağırlığına kıyasla %PHB birikimini belirlemek amacıyla beş farklı önkültür ve fermantasyon besiyeri kombinasyonu (SG-MSM, SW25-MSM, SW25-SW25, AS168-MST, AS168-Bazal) kullanılmıştır. En iyi %PHB verimi (%33,56) önkültür olarak SW25, fermantasyon besiyeri olarak MSM'nin kullanıldığı kombinasyon ile elde edilen kültürden elde edilmiştir.

Haloarcula sp. TG1'in MSM kültürlerinde PHB üretiminin artırılması amacıyla sıcaklık (28, 37, 50 °C) ve pH (6.5, 7.35, 8.0, 9.0) değerleri, farklı NaCl konsantrasyonları (0, 1, 2, 3, 4, 5 M), farklı inkübasyon süresi ve farklı karbon kaynakları (nişasta, gliserol, mısır koçanı, şeker pancarı küspesi, fındık zurufu parametrelerinin etkileri araştırılmıştır.

28, 37 ve 50 °C sıcaklıklarda inkübe edilen *Haloarcula* sp. TG1'e ait MSM kültürlerinde en iyi üreme ve PHB üretimi 37 °C'de gerçekleşmiştir. Hücre kuru ağırlığına karşı (23,16 mg/100 mL) %32,38 oranında PHB birikimi (7,49 mg/100 mL) sağlanmıştır. 28 °C'de %25,57; 50 °C'de ise %10,49 oranında PHB verimi söz konusudur. Sıcaklığın artması, üremeden ziyade suşun PHB üretimini olumsuz etkilemiştir.

37 °C'de, 150 rpm ve 96 saat süreyle farklı pH değerlerine (6.5, 7.35, 8.0, 9.0) sahip MSM'de inkübe edilen suşun üremesine paralel bir şekilde PHB üretiminin pH 7.35 ve 8.0'de en yüksek olduğu görülmektedir. Bu pH değerlerinde hücre kuru ağırlığına (23,13 mg/100 mL) kıyasla %PHB (7,78 mg/100 mL) verimi sırasıyla %33,33 ve %27,37'dir. pH 9.0'da ise %12,94'e düşmektedir.

Sıcaklık ve pH optimizasyonunun ardından NaCl etkisini belirlemek üzere farklı NaCl konsantrasyonlarında (0-5 M) fermentasyon gerçekleştirilmiştir. 0-2 M NaCl konsantrasyon aralığında *Haloarcula* sp. TG1 suşunun %PHB verimi %10'un altındadır. NaCl konsantrasyonu arttıkça üreme de artmakta, paralelinde PHB granüllerinin oluşum miktarı da yükselmektedir. 5 M NaCl varlığında hücre kuru ağırlığına (24,8 mg/100 mL) kıyasla elde edilen %PHB (7,9 mg/100 mL) verimi %31,85'tir.

Sıcaklık, pH ve NaCl parametrelerinin optimizasyonu sonrasında inkübasyon süresi dikkate alındığında, en iyi PHB üretiminin inkübasyonun 72. saatinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. T₇₂'de elde edilen *Haloarcula* sp. TG1 suşuna ait %PHB verimi %34,64 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, 37 °C'de, 150 rpm çalkalama hızında, 5 M NaCl varlığında ve MSM besiyerinde (pH:7.35) 72 saat inkübasyon; *Haloarcula* sp. TG1 suşunda en yüksek %PHB verimi için optimum koşullar olarak kaydedilmiştir.

Haloarkelerin üremesi için en uygun karbon kaynakları maya özütü, tripton, kazaminoasit, pepton, gliseroldür (Schneegurt, 2012). Farklı karbon kaynağı içeren

kültürler haloarkelerin PHB verimleri üzerinde değişik etkilere sahiptir. Literatürde haloarkelerin farklı karbon kaynakları varlığında %PHB verimleri incelendiğinde; *Haloarcularia marismortui* suşunun maya özütü/glukoz kombinasyonunda hücre kuru ağırlığının %21'i (Han vd, 2007), *Haloarcularia* sp. IRU1 ve *Haloarcularia japonica* T5 suşlarının glukoz varlığında hücre kuru ağırlığının sırasıyla %63 ve %0,5'i, *Halobiforma haloterrestris* suş 135^T'in ise maya özütü, proteoz pepton, kazamino asit kombinasyonunda kuru ağırlığının %15'i (Hezayen vd, 2002) oranında %PHB verimine sahip oldukları tespit edilmiştir. MSM besiyerine glukoz yerine nişasta ilave edildiğinde, *Haloarcularia* sp. TG1 suşunun üremesinin biraz daha iyi olduğu, buna karşın, %PHB veriminin %21,86'ya düştüğü saptanmıştır. Bununla birlikte, gliserolün tek karbon kaynağı olarak kullanılması üremede ciddi bir azalma ve beraberinde %PHB veriminde %16,67'ye düşüşü beraberinde getirmiştir. Karşılaştırılan üç karbon kaynağı arasında, %PHB verimini destekleyen en uygun karbon kaynağı glukoz olarak belirlenmiştir. Elde edilen %PHB verimi (%28-34) literatürde kaydedilen %PHB verimleri ile karşılaştırılabilir düzeydedir.

Tarımsal atıkların ucuz karbon kaynağı olarak MSM'de kullanılması amacıyla, şeker pancarı küspesi, mısır koçanı ve fındık zurufu karbon kaynağı olarak besiyerine eklenmiştir. *Haloarcularia* sp. TG1 suşunun en yüksek %PHB veriminin, şeker pancarı küspesinin karbon kaynağı olarak kullanıldığı besiyerinde ve 72. saatte %27,99 oranında olduğu belirlenmiştir.

Glukoza kıyasla %PHB veriminin tarımsal atık kullanılan kültürlerde daha düşük olması, bu maddelerde selülozun glukoz indirgenme başarısı ile bağlantılı olabilir. Yine de, sonuçlar değerlendirildiğinde, ucuz karbon kaynaklarının *Haloarcularia* sp. TG1'de PHB birikimi için besiyeri içeriği olarak kullanılabileceğini ve biyoplastiklerin en önemli dezavantajı olan maliyet sorununun çözülmesinde oldukça önemli bir sonuç ortaya koyduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan yola çıkılarak gelecek çalışmalarda PHB üretiminde farklı birçok tarımsal atığın kullanılabileceği belirlenmiştir. Kullanılan tarımsal atıkların yüksek karbon içeriğinden faydalanabilmesi neticesinde PHB birikiminde artış gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Abanoz, B. 2016. Halofilik bakterilerde tuz direncini sağlayan moleküler mekanizmaların ve endüstriyel enzim üretimlerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Samsun, 120.
- Ahn, W. S., Park, S. J. and Lee, S. Y. 2000. Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* with a Highly Concentrated Whey Solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:8, 3624-3627.
- Aldor, I. S. and Keasling, J. D. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:5, 475-483.
- Alsafadi, D. and Al-Mashaqbeh, O. 2017. A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*. *New Biotechnology*, 34, 47-53.
- Anderson, A. J. and Dawes, E. A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54:4, 450-472.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N. and Tabasum, S. 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161-174.
- Ansari, S. and Fatma, T. 2016. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, 11:6, e0158168.
- Beard, S. J., Hayes, P. K. and Walsby, A. E. 1997. Growth competition between *Halobacterium salinarum* strain PHH1 and mutants affected in gas vesicle synthesis. *Microbiology*, 143:2, 467-473.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J. 1995. Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of *Alcaligenes eutrophus* and Production of Polyhydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1, 165-169.
- Bhagowati, P., Pradhan, S., Dash, H. R. and Das, S. 2015. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79:9, 1454-1463.
- Bhuwal, A. K., Singh, G., Aggarwal, N. K., Goyal, V. and Yadav, A. 2014. Poly- β -hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10. *Bioresources and Bioprocessing*, 1:1, 9.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K. F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*, 65:2-3, 127-161.

- Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H. and Dyll-Smith, M. L. 2004. Cultivation of Walsby's square haloarchaeon. *FEMS Microbiology Letters*, 238:2, 469-473.
- Castilho, L. R., Mitchell, D. A. and Freire, D. M. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100:23, 5996-6009.
- Chaudhry, W. N., Jamil, N., Ali, I., Ayaz, M. H. and Hasnain, S. 2011. Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources. *Annals of Microbiology*, 61:3, 623-629.
- Chee, J.-Y., Yoga, S.-S., Lau, N.-S., Ling, S.-C., Abed, R. M. and Sudesh, K. 2010. Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1395-1404.
- Chen, G.-Q., König, K.-H. and Lafferty, R. M. 1991. Occurrence of poly-d (-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 84:2, 173-176.
- Chen, G., Zhang, G., Park, S. and Lee, S. 2001. Industrial scale production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57:1-2, 50-55.
- Chen, L. F. and Yang, C.-M. 1984. Quantitative hydrolysis of cellulose to glucose using zinc chloride: Google Patents.
- Crank, M., Patel, M., Marscheider-Weidemann, F., Schleich, J., Hüsing, B. and Angerer, G. (2004). *Techno-Economic Feasibility of Large-Scale Production of Bio-Based Polymers in Europe (PRO-BIP). Final report*. Retrieved from
- DasSarma, P., Laye, V., Harvey, J., Reid, C., Shultz, J., Yarborough, A., Lamb, A., Koske-Phillips, A., Herbst, A. and Molina, F. 2017. Survival of *halophilic Archaea* in Earth's cold stratosphere. *International Journal of Astrobiology*, 16:4, 321-327.
- DasSarma, P., Zamora, R. C., Müller, J. A. and DasSarma, S. 2012. Genome-wide responses of the model archaeon *Halobacterium* sp. NRC-1 to oxygen limitation. *Journal of Bacteriology*, JB. 01153-01112.
- DasSarma, S. 2006. Extreme halophiles are models for astrobiology. *Microbe-American Society for Microbiology*, 1:3, 120.
- DasSarma, S. and DasSarma, P. 2001. *Halophiles*. *eLS*, 1-13.
- Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J. 1996. Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403. *Indian Journal of Experimental Biology*, 34:3, 216-219.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J. F. and Kapulnik, Y. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Functional Plant Biology*, 28:9, 871-879.

- Dunlop, W. F. and Robards, A. 1973. Ultrastructural study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 114:3, 1271-1280.
- Dut, E. 2015. Farklı Ortam Koşullarında *Bacillus thuringiensis* RSKK 381'in Üreme ve Biyoplastik (PHB) Üretiminin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara., 147.
- Ediz, N. ve Beyatlı, Y. 2005. *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından biyoplastik üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3:5, 1-22.
- Eichler, J. 2001. Biotechnological uses of archaeal extremozymes. *Biotechnology Advances*, 19:4, 261-278.
- Fernandez-Castillo, R., Rodriguez-Valera, F., Gonzalez-Ramos, J. and Ruiz-Berraquero, F. 1986. Accumulation of poly (β -hydroxybutyrate) by *halobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51:1, 214-216.
- Firouzi, R., Shekarforoush, S. and Hajikhani, F. 2003. Effect of microwave radiation on survival of some bacterial species. *Journal of Applied Animal Research*, 24:2, 207-211.
- Flora, G., Bhatt, K. ve Tuteja, U. 2010. Optimization of Culture Conditions for Polyhydroxybutyrate Production from Isolated *Bacillus* Species. *Journal of Cell & Tissue Research*, 10:2.
- Franzmann, P., Stackebrandt, E., Sanderson, K., Volkman, J., Cameron, D., Stevenson, P., McMeekin, T. and Burton, H. 1988. *Halobacterium lacusprofundi* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Deep Lake, Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, 11:1, 20-27.
- Getachew, A. and Woldeesenbet, F. 2016. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, 9:1, 509.
- Gouda, M. K., Swellam, A. E. and Omar, S. H. 2001. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156:3, 201-207.
- Han, J., Hou, J., Liu, H., Cai, S., Feng, B., Zhou, J. and Xiang, H. 2010. Wide distribution among halophilic archaea of a novel polyhydroxyalkanoate synthase subtype with homology to bacterial type III synthases. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:23, 7811-7819.
- Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Zhou, J. and Xiang, H. 2007. Molecular characterization of the phaECHm genes, required for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:19, 6058-6065.
- Hezayen, F. F., Steinbüchel, A. and Rehm, B. H. 2002. Biochemical and enzymological properties of the polyhydroxybutyrate synthase from the extremely halophilic archaeon strain 56. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403:2, 284-291.
- Holmes, P. 1985. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16:1, 32.

- Huddleston, J. G., Visser, A. E., Reichert, W. M., Willauer, H. D., Broker, G. A. and Rogers, R. D. 2001. Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chemistry*, 3:4, 156-164.
- Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. and Seguin, J. 1996. ¹H NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 18:3, 195-201.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E. and Okon, Y. 2003. Involvement of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* stress endurance and root colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:6, 3244-3250.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., Okon, Y. and Castro-Sowinski, S. 2005. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*, 31:2, 55-67.
- Kalwasińska, A., Felföldi, T., Walczak, M. and Kosobucki, P. 2015. Physiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline distillery lime. *Polish Journal of Microbiology*, 64:4, 369-377.
- Khachatoorian, R., Petrisor, I. G., Kwan, C.-C. and Yen, T. F. 2003. Biopolymer plugging effect: Laboratory-pressurized pumping flow studies. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 38:1-2, 13-21.
- Khanna, S. and Srivastava, A. K. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40:2, 607-619.
- Khanna, S. and Srivastava, A. K. 2009. On-line characterization of physiological state in poly (β -hydroxybutyrate) production by *Wautersia eutropha*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157:2, 237-243.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K. and Woo, S. I. 1994. Production of poly (3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering*, 43:9, 892-898.
- Kirk, R. G. and Ginzburg, M. 1972. Ultrastructure of two species of halobacterium. *Journal of Ultrastructure Research*, 41:1-2, 80-94.
- Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B. and Kessler, B. 1999. Production of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:2, 540-548.
- Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlić, A. and Braunegg, G. (2007). Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co- and terpolyesters for potential medical application by the archaeon *Haloferax mediterranei*. *Macromolecular symposia*, Wiley Online Library, 33-39.
- Kumar, T., Singh, M., Purohit, H. and Kalia, V. 2009. Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste. *Journal of Applied Microbiology*, 106:6, 2017-2023.
- Kushner, D. 1985. The halobacteriaceae. *The bacteria*, 8, 171-214.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B. and Korsatko, W. 1988. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. *Biotechnology*, 6, 135-176.

- Law, K.-H., Leung, Y.-C., Lawford, H., Chua, H., Lo, W.-H. and Yu, P. H. (2001). Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge. Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Springer, 515-524.
- Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49:1, 1-14.
- Litchfield, C. D. 2011. Potential for industrial products from the *halophilic Archaea*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38:10, 1635.
- Liu, Y., Huang, S., Zhang, Y. and Xu, F. 2014. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. *Journal of Environmental Sciences*, 26:7, 1453-1462.
- Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K.-P. and Becher, B. 2001. Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate. *Biomaterials*, 22:18, 2447-2452.
- Lu, Q., Han, J., Zhou, L., Zhou, J. and Xiang, H. 2008. Genetic and biochemical characterization of the poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthase in *Haloferax mediterranei*. *Journal of Bacteriology*, 190:12, 4173-4180.
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E. R. 2003. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6:3, 251-260.
- Madigan, M. T. 2000. *Journey to Diverse Microbial Worlds*. Springer, 61-72.
- Madison, L. L. and Huisman, G. W. 1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63:1, 21-53.
- Marjadi, D., Dharaiya, N. and Ngo, A. 2010. Bioplastic: a better alternative for sustainable future. *Everyman's Science*, 90.
- Mercan, N., Aslım, B., Yüksekdağ, Z. N. and Beyatlı, Y. 2002. Production of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) by some Rhizobium bacteria. *Turkish Journal of Biology*, 26:4, 215-219.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A. and Swings, J. 1993. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:10, 3233-3238.
- Merugu, R., Rudra, M. P., Girisham, S. and Reddy, S. 2012. PHB (Polyhydroxybutyrate) production under nitrogen limitation by *Rhodobacter capsulatus* KU002 isolated from tannery effluent isolated from tannery effluent. *Int J Chem Tech Res*, 4:3, 1099-1102.
- Michalak, M., Marek, A. A., Zawadiak, J., Kawalec, M. and Kurcok, P. 2013. Synthesis of PHB-based carrier for drug delivery systems with pH-controlled release. *European Polymer Journal*, 49:12, 4149-4156.

- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31:3, 426-428.
- Moonda, D. M., Saechow, S., Thammasittirong, S. N.-R. and Thammasittirong, A. 2017. Screening and Optimization of Polyhydroxyalkanoate Production from *Bacillus* spp. *Burapha Science Journal*, 22, 288-298.
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M. and Hameed, S. 2015. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8:3-4, 56-77.
- Murphy, D. J. 2007. Improving containment strategies in biopharming. *Plant Biotechnology Journal*, 5:5, 555-569.
- Myshkina, V., Nikolaeva, D., Makhina, T., Bonartsev, A. and Bonartseva, G. 2008. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44:5, 482-486.
- Ojumu, T., Yu, J. and Solomon, B. 2004. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African Journal of Biotechnology*, 3:1, 18-24.
- Oren, A. 1994. The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, 13:4, 415-439.
- Oren, A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4:1, 2.
- Oren, A., Ginzburg, M., Ginzburg, B., Hochstein, L. and Volcani, B. 1990. *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40:2, 209-210.
- Oren, A. and Mana, L. 2003. Sugar metabolism in the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *FEMS Microbiology Letters*, 223:1, 83-87.
- Oren, A. and Ventosa, A. 2000. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the taxonomy of Halobacteriaceae. Minutes of the meetings, 16 August 1999, Sydney, Australia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:3, 1405-1407.
- Ömeroğlu, E. E. ve Karaboz, İ. İzmir Orta Körfezi'nden İzole Edilen Biyoluminesen *Vibrio* İzolatının Poli-B-Hidroksi Bütirat (PHB) Üretim Verimliliğinin Belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*:2, 21-26.
- Özdemir, N. ve Erkmén, J. 2013. Yenilenebilir biyoplastik üretiminde alglerin kullanımı. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 3:8, 89-104.
- Page, W. J. 1989. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31:4, 329-333.
- Page, W. J. and Manchak, J. 1995. The role of β -oxidation of short-chain alkanoates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* UWD. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:13, 106-114.

- Page, W. J., Manchak, J. and Rudy, B. 1992. Formation of poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:9, 2866-2873.
- Philip, S., Keshavarz, T. and Roy, I. 2007. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82:3, 233-247.
- Pikuta, E. V., Hoover, R. B. and Tang, J. 2007. Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33:3, 183-209.
- Poirier, Y. 2002. Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, 41:2, 131-155.
- Quillaguamán, J., Guzmán, H., Van-Thuoc, D. and Hatti-Kaul, R. 2010. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:6, 1687-1696.
- Quillaguaman, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B. and Hatti-Kaul, R. 2005. Poly (β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate. *Journal of Applied Microbiology*, 99:1, 151-157.
- Quillaguamán, J., Muñoz, M., Mattiasson, B. and Hatti-Kaul, R. 2007. Optimizing conditions for poly (β -hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74:5, 981.
- Reddy, C., Ghai, R. and Kalia, V. C. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87:2, 137-146.
- Rohini, D., Phadnis, S. and Rawal, S. 2006. Synthesis and characterization of poly- β -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1.
- Rosovitz, M., Voskuil, M. and Chambliss, G. 1998. *Bacillus*, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology: by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman, Oxford University Pres, New York.
- Sangkharak, K. and Prasertsan, P. 2007. Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *Journal of Biotechnology*, 132:3, 331-340.
- Sathiyarayanan, G., Kiran, G. S., Selvin, J. and Saibaba, G. 2013. Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 253-261.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Muter, O., Nikolaeva, V., Dzene, A. and Tupureina, V. 2002. PHB-based films as matrices for pesticides. *Process Biochemistry*, 37:7, 719-722.
- Schneegurt, M. A. 2012. *Advances in Understanding the Biology of Halophilic Microorganisms*. Springer, 35-58.

- Sehgal, S. and Gibbons, N. 1960. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 6:2, 165-169.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S. 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26:3, 246-265.
- Shand, R. F. and Perez, A. M. 1999. *Enigmatic Microorganisms and Life in Extreme Environments*. Springer, 411-424.
- Shen, X.-W., Yang, Y., Jian, J., Wu, Q. and Chen, G.-Q. 2009. Production and characterization of homopolymer poly (3-hydroxyvalerate)(PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4. *Bioresource Technology*, 100:18, 4296-4299.
- Singh, G., Mittal, A., Kumari, A., Goel, V., Aggarwal, N. K. and Yadav, A. 2011. Optimization of poly-B-hydroxybutyrate production from *Bacillus* species. *European Journal of Biological Sciences*, 3:4, 112-116.
- Smith, L., Budgen, N., Bungard, S., Danson, M. and Hough, D. 1989. Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochemical Journal*, 261:3, 973-977.
- Steinbüchel, A. and Lütke-Eversloh, T. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16:2, 81-96.
- Sukan, A., Roy, I. and Keshavarz, T. 2015. Dual production of biopolymers from bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 126, 47-51.
- Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, H. and Doi, Y. 2001. Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. *FEMS Microbiology Letters*, 198:1, 65-71.
- Taidi, B., Anderson, A. J., Dawes, E. A. and Byrom, D. 1994. Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly (3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40:6, 786-790.
- Taran, M. 2011. Utilization of petrochemical wastewater for the production of poly (3-hydroxybutyrate) by *Haloarcula* sp. IRU1. *Journal of Hazardous Materials*, 188:1-3, 26-28.
- Tekin, E. 2008. İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan Polibetahidroksibütirat (PHB) üreticisi halofilik mikroorganizmaların izolasyonu, fenotipik karakterizasyonu ve PHB üretim verimliliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 122.
- Tekin, E., Ateş, M. and Kahraman, Ö. 2012. Poly-3-hydroxybutyrate-producing extreme halophilic archaeon: *Haloferax* sp. MA10 isolated from Çamaltı Saltern, İzmir. *Turkish Journal of Biology*, 36:3, 303-312.
- Tunalı, Y., Karaca, H., İşcan, G., Demirci, F. ve Benkli, K. 2012. Antibacterial and antifungal activities of some trimethoprim salts. *Medicinal Chemistry Research*, 21:6, 932-935.

- Türkay, D. 2013. Kardiyovasküler Sistem Rahatsızlıklarının Teşhis ve Tedavisinde Kullanılmak Üzere Yeni Nesil Nanotaşıyıcıların Geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Nano Teknoloji ve Nano Tıp Anabilim Dalı, Ankara, 114.
- Valentin, H. E., Lee, E. Y., Choi, C. Y. and Steinbüchel, A. 1994. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40:5, 710-716.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. and Oren, A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:2, 504-544.
- Vroman, I. ve Tighzert, L. 2009. Biodegradable polymers. *Materials*, 2:2, 307-344.
- Wang, R.-Y., Shi, Z.-Y., Chen, J.-C., Wu, Q. and Chen, G.-Q. 2012. Enhanced co-production of hydrogen and poly-(R)-3-hydroxybutyrate by recombinant PHB producing *E. coli* over-expressing hydrogenase 3 and acetyl-CoA synthetase. *Metabolic Engineering*, 14:5, 496-503.
- Weber, C. J. 2000. *Biobased Packaging Materials For the Food Industry: Status and Perspectives, a European Concerted Action*. Copenhagen KVL,
- Wendlandt, K.-D., Jechorek, M., Helm, J. and Stottmeister, U. 2001. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *Journal of Biotechnology*, 86:2, 127-133.
- Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y. 2003. Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1:09, 1-33.
- Zhang, Y., Sun, W., Wang, H. and Geng, A. 2013. Polyhydroxybutyrate production from oil palm empty fruit bunch using *Bacillus megaterium* R11. *Bioresource Technology*, 147, 307-314.
- Zhou, L.-M., Li, F.-M., Jin, S.-L. and Song, Y. 2009. How two ridges and the furrow mulched with plastic film affect soil water, soil temperature and yield of maize on the semiarid Loess Plateau of China. *Field Crops Research*, 113:1, 41-47.

EKLER

EK 1 BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI VE İÇERİKLERİ

EK 2 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER

EK 3 KİMYASALLAR



EK 1 BESİYERLERİNİN HAZIRLANMASI VE İÇERİKLERİ

SG besiyeri (Sehgal ve Gibbons, 1960)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	20
KCl	2
Sodyum sitrat	3
Casamino asit	7,5
Yeast extract	1
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0023

Ortam içeriği 1000 mL'ye göre tartılarak dH₂O eklenmiştir. pH'sı baz olarak 1 M NaOH ile asit olarak %50'lik HCl ile 7.35'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C'de 1.1 atm basınçta 15 dk steril edilmiştir. Ekim ise %3 (v/v) oranında yapılmıştır.

MSM (Getachew ve Woldesenbet, 2016)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Glukoz	40
Üre	1
Yeast extract	0,16
KH ₂ PO ₄	1,52
Na ₂ HPO ₄	4,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52
CaCl ₂	0,02
iz element çözeltisi	0,1 mL
İz element çözeltisi	<u>Miktar (g/L)</u>
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,13
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,06
H ₃ BO ₃	0,06

Nutrient-rich AS-168 (Alsafadi ve Al-Mashaqbeh, 2017)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	250
MgSO ₄ .7H ₂ O	20
KCl	2
trisodium citrate	3
Sodium glutamate	1
FeSO ₄ .4H ₂ O	50 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36 mg
Casamino Acids	5
Yeast extract	5

Nutrient limited MST besiyeri (Lu vd, 2008)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	200
MgSO ₄ .7H ₂ O	20
KCl	2
Sodium glutamate	1
KH ₂ PO ₄	37,5 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36 mg
Yeast extract	1

Bazal besiyeri (Taran, 2011)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	250
MgCl ₂ .6H ₂ O	34,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	49,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,92
NaBr	0,058
KCl	0,5
NaH ₂ CO ₃	0,17

SW-25 medium (Tekin vd, 2012)

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	202,5
MgCl ₂	17,5
MgSO ₄	24
CaCl ₂	0,9
KCl	5
NaHCO ₃	0,15
NaBr	0,065
Yeast extract	5

EK 2 TAMPONLAR VE ÇÖZELTİLER

DNS ajanı (3,5 dinitro salisilik asit)

DNS
dH₂O

1g
100 mL



EK 3 KİMYASALLAR

Kloroform	Merck
Etanol	Sigma
Gliserol	Sigma
Hidroklorik Asit	Sigma
Metanol	Sigma
Magnezyum klorür	Merck
Sodyum klorür	Sigma
Sodyum Hidroksit	Merck
Kalsiyum klorür	Sigma
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma
MnCl ₂ .4H ₂ O	Sigma
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma
Sülfirik asit	Merck
Yeast extract	Merck
Sodyum bromür	Merck
Aseton	Merck

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Eylem TÜRE
Doğum Yeri : Amasya
Doğum Tarihi : 13.09.1991
Yabancı Dili : İngilizce
E-Posta : eylemture005@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Atakum Teknik Lise ve Endüstri Meslek Lisesi (2010)
Önlisans : Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Teknolojisi Bölümü (2013)
Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü (2016)
Yüksek Lisans : Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2019)

Yayınlar

Türe Eylem, Kurt Kızıldoğan Aslıhan (2017). *Tuz Gölü İzolatı Halofilik Arkelerde Polihidroksibütirat (PHB) üretiminin belirlenmesi*. Çukurova Üniversitesi 6. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 5-7 Ekim, 92. Adana, Türkiye.