

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİHİDROKSİ BUTİRATIN HALOFİLİK ARKE
İZOLATLARINDA ÜRETİMİ

Pınar TATLİCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral BİRBİR

İSTANBUL 2010

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİHİDROKSİ BUTİRATIN HALOFİLİK ARKE
İZOLATLARINDA ÜRETİMİ

Pınar TATLİCAN
(520608002)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşe OGAN

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Meral BİRBİR

İSTANBUL 2010

ÖNSÖZ

Bu Yüksek Lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya programında gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmam süresince, aktarmış olduğu birikimler, göstermiş olduğu yakın ilgi, destek ve anlayıştan dolayı, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayşe OGAN'a, deneyimlerini değerli görüş, öneri ve desteğini esirgemeyen ikinci tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Meral BİRBİR'e,

Deneysel çalışmalarım esnasında laboratuvarlarındaki elektron mikroskopunu kullanmama imkan sağlayan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji ABD Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na ve çalışmalarım boyunca bana yardımcı olan Yüksek Biyolog Ebru KARADEMİR ve Biyolog Fadime AKTAR'a

Tez çalışmalarım boyunca aynı laboratuvarı paylaştığım Fen Edebiyat Fakültesi Araştırma Görevlileri Başak YÜCE DURSUN, Serap DEMİR ve Özkan DANIŞ'a, Yüksek Lisans Öğrencileri İlker ÇAĞGERİŞ, Nur ÖZCAN ve Musa UYAN'a,

Hiç sıkılmadan bana yardımcı olan Sayın Cem GÜLENÇ'e,

Tüm yaşantım boyunca maddi ve manevi olarak hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok sevgili aileme,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
SEMBOL LİSTESİ.....	v
KISALTMA LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	2
GENEL BİLGİLER.....	2
II.1. BİYOPOLİMERLER VE ÖNEMİ.....	3
II.2. POLYESTERLER.....	4
II.3. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	6
II.4. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ.....	7
II.5. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN BİYOSENTEZİ.....	8
II.6. PHB ÜRETEN MİKROORGANİZMALAR.....	10
II.6.1. Endüstriyel PHB Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar.....	11
II.7. PHB ÜRETİCİSİ OLARAK HALOFİLİK ARKELER.....	12

II.7.1. Arkeler Hakkında Genel Bilgiler.....	12
II.7.3. Halofilik Arkelerde PHB üretimi.....	14
II.7.3.1. Halofillerdeki PHA sentezleyen enzimler.....	15
II.8. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN BİYOLOJİK OLARAK	
PARÇALANABİLİRLİĞİ.....	15
II.8.1. Ekstraselüler PHB-depolimeraz Enzimleri.....	17
II.9.YENİLENEBİLME ÖZELLİĞİ.....	19
II.10. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN KULLANIM ALANLARI...20	
II.11. PHB ÜRETİMİNDE KULLANILAN KARBON	
KAYNAKLARI.....	22
II.12. DÜŞÜK MALİYETLİ ALTERNATİF KARBON	
KAYNAKLARI.....	23
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI.....	26
III.1. ARAŞTIRMA ARAÇ VE GEREÇLERİ.....	26
III.1.1. Araştırma İmkanları.....	26
III.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
III.1.3. Kullanılan Mikroorganizmalar.....	26
III.1.4. Kullanılan Besiyerleri.....	27
III.1.4.1. Brown Besiyeri.....	27
III.1.4.2. Minimal Besiyeri... ..	27
III.1.5. Kullanılan Çözeltiler.... ..	28
III.1.5.1. %0.2'lik Sodyum Hipoklorit Çözeltisi	
(v/v).....	28
III.1.5.2. pH 7.4 Fosfat Tamponu (w/v).....	28
III.1.5.3. %2'lik Gluteraldehit Tespit Çözeltisi (v/v).....	28
III.1.5.4. %1'lik Osmiyum Tetraoksit Tespit Çözeltisi	
(v/v).....	28
III.1.5.5. %3,5'luk Uranil Asetat Çözeltisi (v/v).....	29
III.1.5.6. %2'lik Asetik Asit çözeltisi (v/v).....	29
III.1.5.7. %70 ve %90'lık Etanol Çözeltisi (v/v).....	29
III.1.5.8. Gömme Materyali Saf Epon Çözeltisi(v/v).....	29
III.1.5.9. (1:1) ve (1:3) Ölçülerinde Propilen Oksit-Epon	
Çözeltileri (v/v).....	29

III.1.6. Kullanılan Cihazlar.....	30
III.2. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	30
III.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Kültürü.....	30
III.2.2. Alternatif Karbon Kaynakları Kullanarak PHB üretimi....	31
III.2.3. PHB Granüllerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	31
III.2.4. PHB'nin Kantitatif Tayini.....	32
III.2.5. PHB Granüllerinin Elektron Mikroskobu ile saptanması.....	32
III.2.5.1. Halofilik Arke Hücrelerinin Tespiti.....	32
III.2.5.2. Halofilik Arke Hücrelerinin Dehidratasyonu.....	33
III.2.5.3. İnfiltrasyon İşlemi.....	33
III.2.5.4. Gömme İşlemi.....	33
III.2.5.5. Kesim İşlemi.....	34
BÖLÜM IV. SONUÇLAR.....	35
IV.1. HALOFİLİK ARKE İZOLATLARININ PHB ÜRETİM MİKTARLARI.....	35
IV.2. PHB GRANÜLLERİNİN TEM MİKROGRAFLARI.....	39
BÖLÜM V. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRMELER.....	40
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	56

ÖZET

POLİHİDROKSİ BUTİRATIN HALOFİLİK ARKE İZOLATLARINDA ÜRETİMİ

Çeşitli bakteri türleri hücre içinde Polihidroksi butirat (PHB) moleküllerini enerji ve karbon rezervi olarak biriktirirler. PHB'ler çevre dostu, biyobozunur ve biyouyumlu termoplastiklerdir. Formülasyonlarına dayanarak çeşitli dayanıklılıkta ve elastikiyette olan bu polimerler, birçok yönden benzer oldukları biyolojik olarak parçalanamayan petrokimyasal plastikler gibi kullanılabilirler.

Bu tez çalışmasında Kayacık Tuzlası, Tuz Gölü ve Tuzköy Tuz Madenlerinden izole edilmiş 5 adet Halofilik Arke izolatının PHB üretim kapasiteleri araştırılıp alternatif karbon kaynakları kullanılarak üretilen PHB miktarları tayin edilmiştir. İlk olarak hücreler besinsel olarak zengin Brown besiyerinde üretilmiştir. Daha sonra ise PHB üretimini gerçekleştirmek için Brown besiyerinde üretilmiş olan hücreler alternatif karbon kaynakları kullanılarak hazırlanan minimal besiyerine transfer edilmiştir. Halofilik Arke hücrelerinden PHB molekülleri izole edildikten sonra, izolatların PHB üretim miktarları spektrofotometreyle tespit edilmiştir. %2'lik mısır nişastalı besiyerinde inkübe edilen KYT1 İzolat 1'in en fazla miktarda PHB ürettiği gözlenmiştir.

ABSTRACT

POLYHYDROXY BUTYRATE PRODUCTION BY HALOPHILIC ARCHAEA STRAINS

Various species of bacteria accumulate Polyhydroxy butyrate (PHB) molecules within the cells as energy and carbon reserves. PHBs are environmentally friendly, biodegradable and biocompatible thermoplastics. Varying in durability and flexibility, depending on their formulation, they can be used in various ways similar to nonbiodegradable petrochemical plastics.

In this study, PHB production capacity of 5 halophilic archaeal isolates from Kayalık Tuzlası, Tuz Gölü and Tuzköy Salt Mine were investigated and the amount of PHB that was produced by using alternative carbon sources was determined. First, the cells were cultured in rich nutritional Brown medium. Later, to achieve the production of PHB, the cells that were cultured in Brown medium were transferred into the minimal mediums which were prepared using alternative carbon sources. After PHB molecules were isolated from halophilic archaea cells, PHB production quantities of strains were identified by spectrophotometer. KYT1 isolate 1, which were incubated in minimal medium with 2% corn starch, produced the highest amount of PHB was observed.

July, 2010

Pınar TATLİCAN

SEMBOL LİSTESİ

β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Derece
Da	: Dalton
μm	: Mikrometre
μL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
g	: Gram
nm	: Nanometre
α	: Alfa
m	: Ağırlık
L	: Litre
Kg	: Kilogram
%	: Yüzde
M	: Molarite
\$	: Dolar
MA	: Moleküler Ağırlık
MPa	: Mega Pascal
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
w/v	: Ağırlık/hacim
v/v	: Hacim/hacim

KISALTMA LİSTESİ

A	: Absorbans
c	: Konsantrasyon
PE	: Polietilen
PP	: Polipropilen
PHA	: Polihidroksi alkonat
PHB	: Polihidroksi butirat
PHBV	: Polihidroksi butirat-ko-hidroksi valerat
T_g	: Faz Değişirme Sıcaklığı
ATP	: Adenozin Trifosfat
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
CO₂	: Karbondioksit
H	: Hidrojen
C	: Karbon
O	: Oksijen
TCA	: Trikarboksilik asit
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
T_g	: Camsı Geçiş Sıcaklığı

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO.

Şekil II.1. Polihidroksi butiratın genel formülü.....	6
Şekil II.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın elektron mikrografında görülen PHB granülleri	6
Şekil II.3. PHB granülünün yapısı.....	7
Şekil II.4. PHB'ın metabolik yolu	10
Şekil II.5. <i>Alcaligenes latus</i> 'dan üretilen plastik malzemenin 1. günden 45. güne toprakta parçalanması	15
Şekil II.6. PHB'nin hücre içinde ve hücre dışındaki fiziksel durumu.....	17
Şekil II.7. PHB depolimerazın yapısı ve PHB materyaline tutunması.....	18
Şekil II.8. PHB'nin karbon döngüsü.....	20
Şekil II.9. Endüstriyel atıklardan elde edilen farklı karbon kaynaklarının kullanılmasıyla PHB üretiminde izlenen temel metabolik yollar.....	24
Şekil III.1. Kapsüllere gömülmüş hücre örnekleri.....	34
Şekil IV.1. PHB standardının absorbans-konsantrasyon Grafiği.....	36
Şekil IV.2. Halofilik Arke izolatlarının alternatif besi yerlerindeki PHB üretim oranları.....	38
Şekil IV.3. Halofilik Arke izolatlarının besiyeri karşılaştırmalı PHB verimleri.....	38
Şekil IV.4. KYT1 izolat 1'e ait hücrelerindeki PHB granüllerinin TEM ile çekilen mikrografları.....	39

TABLO LİSTESİ

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo II.1. PHB ve PP'nin fiziksel özellikleri.....	8
Tablo II.2. PHA üreten bakteri türleri	11
Tablo II.3. Çeşitli ortamlardan izole edilmiş PHB molekülünü parçalayabilen mikroorganizmalar	18
Tablo.II.4: PHB'yi üreten firmalar ve uygulama alanları.....	22
Tablo IV.1: Örneklerdeki PHB miktarları ve yüzde verim oranları.....	37

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde plastik, paketlenmede kullanılan cam ve kağıdın yerini alarak önemli bir malzeme haline gelmiştir (Luengo ve ark., 2003). Sahip olduğu avantajlı özelliklerine rağmen çevremizde parçalanamayan artık plastiklerin birikmesi yeryüzündeki pek çok canlı türünü olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Khanna ve Srivastava, 2004). Bu nedenle birçok ülke kullanılmış materyallerin hızlıca parçalanabilmesi için yeni arayışlara yönelmiştir (Luengo ve ark., 2003). Bu nedenle biyoparçalanabilir plastik diğer petrokimyasal kaynaklı plastiklerin yarattığı çevresel tehlikeye en iyi çözümü sunmaktadır (Khanna ve Srivastava, 2004).

Biyoplastikler farklı çevresel koşullar altında çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen sentetik olmayan polimerlerdir. Fizikokimyasal özellikleri petrokimyasal plastiklere benzer olan bu polyesterler mikroorganizmalardaki depo granüllerinde intraselüler olarak biriktirilirler. Bu polimerler bakteri fungus ve algler gibi organizmalar tarafından, nispeten kısa bir zamanda tamamen CO₂ ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir. Petrol türevli plastikler doğada ortalama 400 yılda parçalanırken, biyopolimerler ortalama 4 ay ile 1 yıl arasında geri dönüşüme uğramaktadır (Luengo ve ark., 2003; Verlinden ve ark., 2006). Biyoyum ve biyolojik parçalanma gibi pek çok avantajlı özelliklere sahip olan biyoplastikler tüm dünyanın ilgisini çekmesine rağmen petrokimyasal plastiklerin yerini henüz alamamıştır. Bunun en büyük nedeni ise yüksek maliyetli olmasıdır (Khanna ve Srivastava, 2004).

Bu tez çalışmasında Kayacık Tuzlası, Tuz Gölü ve Tuzköy Tuz Madenlerinden izole edilen daha önce çalışılmamış 5 adet halofilik arke izolatının üretim maliyetini düşürmek amacıyla alternatif karbon kaynakları kullanılarak PHB üretim kapasitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

Plastik materyaller, uygulama kolaylıkları, dayanıklı ve ekonomik olma gibi pek çok cazip özelliklerinden dolayı günümüzde hayatımızın önemli bir parçası haline gelmiştir (Lee.,1995). 1993 yılında, fosil yakıt bazlı, geleneksel polimerlerin yıllık üretimi tüm dünyada 100 milyon ton olarak tespit edilmiştir ve bu rakam 2000 yılı itibariyle 150 milyon tona ulaşmıştır. Gelişmiş ülkelerde, pek çok malzeme plastikten yapılmaktadır. Kullanım süreleri biten ürünler atılarak katı atık sahalarında gömülmektedirler. Gün geçtikçe büyüyen katı atık sahaları durdurulamayan bir problem haline gelmiştir (Braunegg ve ark.,1998). Her yıl doğada 25 milyon ton biyolojik olarak parçalanamayan plastik birikmektedir. Atık plastikler çevre ve insan sağlığı için büyük tehdit oluşturmaktadır. Biyoparçalanmaz özelliğinden ötürü, çevreye atılan plastikler geri dönüşü olmayan zararlara yol açar. Bu polimerler yüzey sularında doğal havalandırma işlemine engel olur; kanalizasyonu, drenaj borularını ve kanalizasyon arıtma tesislerindeki filtreleri tıkararak pek çok engel ve arızaya sebep olurlar (Khanna ve Srivastava, 2004). Bu kriz ancak plastik atıkların azaltılmasıyla önlenabilir. Bu nedenle, ABD ve Avrupa da plastik kullanımlarını azaltmayı hedefleyen yönetmelikler tasarlanmıştır. Fakat petrol türevli sentetik polimerlerin çok kullanışlı olmaları, üretim hızının düşürülmesini çok ciddi olarak engellemektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak için, plastiği gömmenin dışında başka çözümler üretilmelidir (Braunegg ve ark., 1998). Geri dönüştürme ya da atık yakma yöntemleriyle bu maddelerden kurtulmak mümkündür ancak atık yakma yöntemi zor, tehlikeli ve pahalı bir yöntemdir. Geri dönüştürme ise uzun bir süreçtir ve etkili değildir. Bazı plastikler ise üretilirken pigment, boya ve diğer katkı maddeleri eklendiği için geri dönüştürülemez ya da yakma yöntemleriyle yok edilemezler (Khanna ve Srivastava, 2004).

Biyolojik olarak parçalanabilme, doğal ürünlerin mikroorganizmalar tarafından yıkılma kapasitesi olarak tanımlanır. Bakteriler ve mantarlar bu süreçte görev alan esas canlılardır. Canlılar ürettikleri maddeleri kolayca parçalama yeteneğindedir. Biyoparçalanabilir maddeler bu nedenle hayatın doğal ürünleridir. Bazı sentetik polimerlerde mikroorganizmalar tarafından parçalanabilir fakat işlem genellikle çok yavaştır. Çoğu sentetik bileşik enzimlerle parçalanmaya karşı dirençlidir. Fakat termoplastik özellik gösteren mikroorganizmalar tarafından sentezlenen biyopolimerler enzimlerle parçalanmaya karşı dirençli değildir (Braunegg ve ark., 1998).

II.1. BİYOPOLİMERLER VE ÖNEMİ

Biyopolimerler farklı organizmalar tarafından sentezlenen ve katabolize edilen, yaygın biyoteknolojik uygulamaları olan doğal ürünlerdir (Luengo ve ark., 2003). Bu doğal ürünler kendi aralarında dört ana gruba ayrılırlar:

- Polisakkaritler
 - Selüloz, Nişasta
- Proteinler
 - Jelatin, Kazein, İpek
- Polyesterler
 - Polihidroksi alkonatlar (PHA)
- Diğer doğal polimerler
 - Lignin, Doğal Kauçuk

(Environment and Plastics Industry Council, 2000)

II.2. POLYESTERLER

Polihidroksi alkonatlar (PHA), biyopolimerlerin özel bir çeşididir. Bunlar farklı besinsel ve çevresel koşullar altında çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen polyesterlerdir. Lipit karakterli olan bu polimer ortamda bol miktarda karbon kaynağı olduğunda sentezlenir ve daha sonra parçalanarak biyosentez ve ATP yapmak için kullanılır (Madigan ve ark., 2009; Luengo ve ark., 2003).

PHA'lar çevre dostu biyoparçalanabilir ve biyoyumlu termoplastiklerdir (Verlinden ve ark., 2006). Toprak, deniz, göl ve lağım sularındaki bu polimerler aerobik koşullar altında tamamen su ve CO₂'e, anaerobik koşullarda ise metana parçalanırlar (Khanna ve Srivastava, 2004). Biyoparçalanabilir olmalarının dışında petrokimyasal termoplastikler gibi geri dönüştürülebilirler. Formülasyonlarına dayanarak çeşitli dayanıklılıkta ve elastikiyette olan bu polimerler, birçok yönden benzer oldukları biyolojik olarak parçalanamayan petrokimyasal kaynaklı plastikler gibi kullanılabilirler. Ancak bu plastikler, petrokimyasal kaynaklı plastiklerden çok daha pahalıdır, bu nedenle ancak ticari plastiklerin kullanılmadığı medikal uygulamalar gibi alanlarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda bilim adamları, alternatif substratların kullanımı, yeni ekstraksiyon metotları, genetik yollarla yükseltgenmiş türler ve kültür karışımları kullanarak PHA'ları ticari olarak daha çekici hale getirmeye çalışmaktadırlar (Verlinden ve ark., 2006).

Üzerinde en çok çalışılan ve en kapsamlı araştırmalar yapılan PHA türü ise Polihidroksi butirat (PHB)'dır (Anderson ve Dawes, 1990; Braunegg ve ark., 1998; Tabandeh ve Farahani, 2003; Trotsenko ve Belova, 2000; Verlinden ve ark., 2006; Madison ve Huisman, 1999; Khanna ve Srivastava, 2004).

PHB'nin bakteri hücrelerindeki varlıkları 1920'li yıllardan beri bilinmektedir. İlk kez Lemoigne (Lemoigne, 1926) tarafından topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir maddenin anaerobik olarak parçalanması sonucu 3-hidroksi bütirik aside rastlamıştır. Lemoigne bu

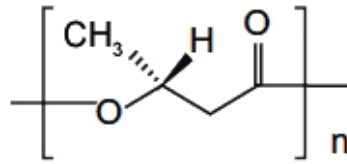
materyali poli-3-hidroksi butirat homopolyesteri olarak tanımlamıştır. Sonraki otuz yıl boyunca, PHB'ye olan ilgi, *Bacillus* hücrelerindeki sentezi, parçalanması, kültür koşulları ve bu molekülün tespit metotlarının araştırılmasına yol açmıştır. PHB'nin işlevsel rolü hakkındaki ilk ikna edici tasarı 1958 yılında Macrae ve Wilkinson (Macrae ve Wilkinson, 1958a), (Macrae ve Wilkinson, 1958b) tarafından yapılmıştır. Macrae ve Wilkinson, besiyerinde glukoz ve azot miktarının yüksek olması halinde *B. Megaterium* hücrelerinin hızlıca homopolimer depoladıklarını ve sonrasında ekzojen karbon ve enerji kaynaklarının yokluğunda bu polimerleri kullandıklarını gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar elde ettikleri verilerin yardımıyla PHB'nin karbon ve enerji depo maddesi olduğu sonucuna varmışlardır.

1973 yılında Viyana'da gerçekleşen 35. Petrol İhraç Eden Ülkeler Örgütü (OPEC) Konferansında örgüt üyeleri tarafından petrol fiyatlarına %70 oranında zam yapılmasına karar verilmiştir. Bu ani artışı aynı yıl Tahran Konferansında yapılan %130'luk zam takip etmiştir. Böylece 3\$ olan bir varil ham petrol (159 litre) 11.70\$'a yükselmiştir. Petrol fiyatlarına zamlar birbirini izlemiş ve 1980 yılında 30\$'a kadar ulaşmıştır (Braunegg ve ark.,1998). 1970'li yıllarda yaşanan bu krizden sonra petrol kaynaklı polimerlere alternatifler aranmış ve 1976 yılında, İngiltere'deki Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) bakteriyel fermentasyonla üretilen poli- β -hidroksi butirat (PHB) ile ilgili araştırmalara başlamıştır. Birçok bakteri türünü PHB üretimi açısından inceleyen Imperial Kimya Endüstrisi endüstriyel üretimde hücre kuru ağırlığının %90'ı üzerinde bu polimeri biriktiren *Alcaligenes eutrophus* kullanmaya başlamıştır. Patent alınarak piyasaya sürülen ilk ticari ürün BIOPOL®'dür (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Polihidroksi butiratu bu kadar önemli yapan sadece biyoparçalanma özelliği değildir. Aynı zamanda tarım ve endüstri artıkları gibi yenilenebilen karbon kaynaklarının kullanılmasıyla sentezlenmesi bu polimerleri diğerlerinden farklı kılmaktadır (Braunegg ve ark.,1998).

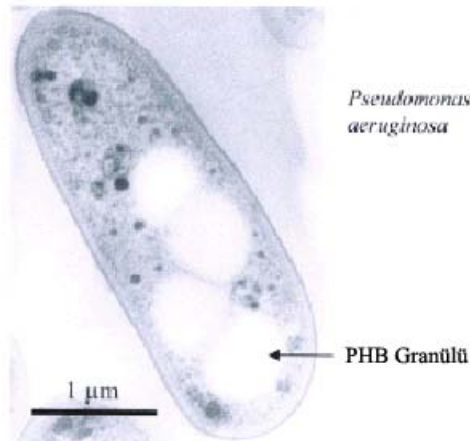
II.3. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Hücre içinde intraselüler granüllerde biriktirilen suda çözünmeyen PHB'nin yapısında kısa zincirli β -hidroksi yağ asitleri bulunmaktadır. Yan zincirinde bir metil grubu olan PHB'nin ampirik formülü $(C_4H_6O_2)_n$ şeklindedir ve n sayısı 35.000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Bu polimerler bir monomerin karboksil grubunun, komşu monomerin hidroksil grubuyla ester bağı oluşturmasıyla meydana gelirler (Madison ve Huisman, 1999).



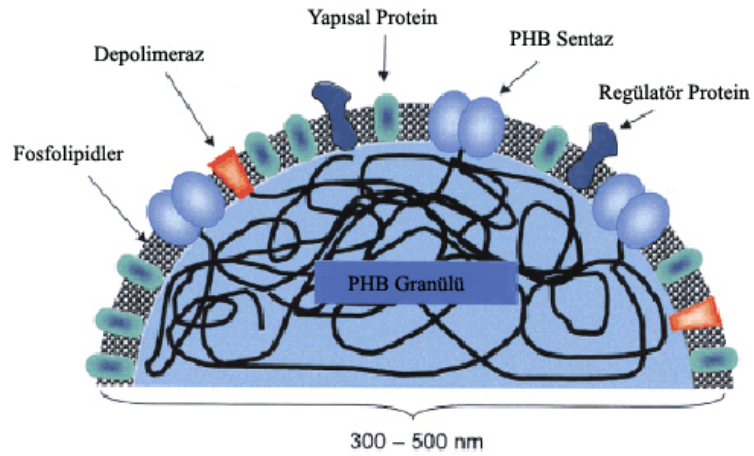
Şekil II.1: Polihidroksi butiratın genel formülü (Verlinden ve ark., 2006)

Bu polimerler dış yüzü fosfolipid ve proteinlerle, iç yüzü ise bir çeşit protein sınıfı olan “phasinler” ile kaplanmış granüllerde depolanırlar bu nedenle hücrelerin osmotik durumunun değişmesine neden olmazlar (Verlinden ve ark., 2006) .



Şekil II.2: *Pseudomonas aeruginosa*'nın elektron mikrografında görülen PHB granülleri (Rehm, 2003)

Hücrelerdeki granül sayısı PHB birikimine bağlı olarak değişmektedir. Yapılan deneylerle hücre başına düşen granül sayısının 7-12 olduğu görülmüştür. Genelde küre şeklinde olan granüllerin ortalama çapı ise 0.24-0.50 μm 'dir (Ballard ve ark., 1987). Yapılan çalışmalar sonunda granül içinde iki bölgenin var olduğu ortaya çıkmıştır. Granül, bir çekirdek bölgesi ve membranla çevrelenmiş birkaç katmandan oluşan kabuk bölgesinden meydana gelmiştir. Protein ve lipid yapıda olan membranın kalınlığı 2-4 nm'dir (Dunlop ve Robards, 1973).



Şekil II.3: PHB granülünün yapısı (Rehm, 2003)

Işık saçılımı yöntemiyle PHB granüllerinin ortalama molekül ağırlığı yaklaşık 5×10^9 Da olarak ölçülmüştür (Ellar ve ark., 1968). Her bir granül en az 1000 adet polimer zinciri içermektedir (Anderson ve Dawes, 1990).

II.4. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ

Cornibert ve Marchessault (1972) yapmış olduğu çalışmalarla PHB'ın soldan sağa dönen sıkı bir sarmal yapıda olduğunu göstermişlerdir. Çift dönüş eksenli bu sarmal yapıda 0.596 nm'lik tekrar eden iplikler bulunmaktadır

(Anderson ve Dawes, 1990). Polipropilene olan yapısal benzerliği Imperial Kimya Endüstrisi'nin (ICI) dikkatini çekmesine neden olmuştur. Özellikle biyouyumluluk ve biyoparçalanma niteliklerinin önemli olduğu medikal alanlarda PHB büyük potansiyele sahiptir. PHB ve polipropilen tamamen farklı kimyasal yapılara sahip olsalar da kristallik dereceleri ve camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) bakımından benzer özellikler göstermektedir (Anderson ve Dawes, 1990). PHB hücre içinde sıvı ve amorf durumdayken, hücreden organik çözücülerle ekstrasyonu sonrasında kristal hale gelirler. Bu durumda sert ve kırılırlardır. Kırılabilirliği nedeniyle gerilime dayanıklı değildir. (Madison ve Huisman, 1999). Fiziksel olarak PHB daha sert ve kırılırdır (Anderson ve Dawes, 1990).

Tablo II.1: PHB ve PP'nin fiziksel özellikleri (Howells, 1982)

FİZİKSEL ÖZELLİKLER	PHB	PP
T_m [$^{\circ}\text{C}$]	175	176
Kristallite [%]	80	70
MA [Dalton]	5×10^5	2×10^5
T_g [$^{\circ}\text{C}$]	4	- 10
Yoğunluk[g/cm ³]	1.250	0.905
Gerilme Direnci [MPa]	40	38
Kopmada Uzama [%]	6	400
UV Direnci	İyi	Zayıf
Çözücü Direnci	Zayıf	İyi
Kaynak	Şeker, Melas	Petrol
Maliyet Ücreti [\$/lb]	3.50	0.40

II.5. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN BİYOSENTEZİ

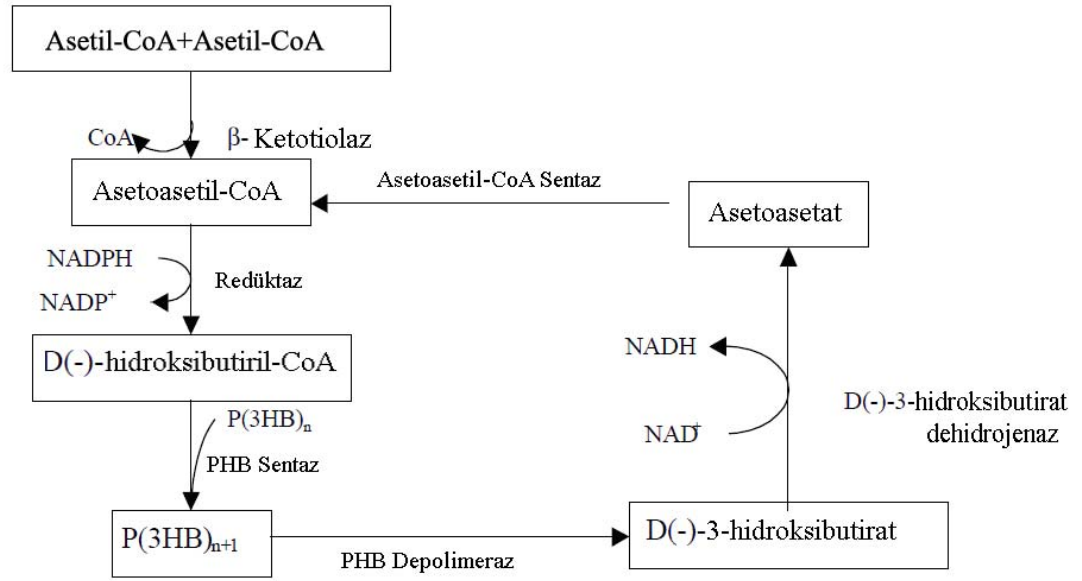
Bakteri hücrelerinde karbonhidratların yıkılması sonucunda piruvat meydana gelir. Piruvat ise dehidrojenasyon ile asetil-CoA ya dönüştürülebilir. Sonra, asetil-CoA Trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girer ve CoASH serbest kalır. Son olarak asetil-CoA'nın oksidasyonu, CO_2 ve ATP açığa çıkar. NADH, NADPH, FADH_2 gibi moleküller ve oksaloasetat gibi biyosentetik ön maddelerin miktarı düşer. Oksaloasetatın transaminasyonu ile amino asitler sentezlenir. TCA döngüsünde üretilen piridin nükleotidlerinin solunum zincirindeki oksidasyonu ile protein sentezinin endergonik

ihtiyaçlarını destekleyen fosfat bağlı ATP molekülleri meydana gelir. Bu nedenle TCA döngüsüne katılan asetil-CoA nın oranı, ortamda azot, fosfor ve diğer oksidatif elementlerin bulunmasına bağlıdır (Braunegg ve ark.,1998).

Böylelikle PHB birikimi mikroorganizmalarda besinsel kaynaklar dengesiz olduğunda, karbon ve enerji depolamak için izlenilen doğal bir yoldur. Bakteriyel büyüme ortamdaki azot, fosfor, oksijen ya da magnezyum oranlarının azalmasıyla sınırlanıyorsa ve aynı zamanda besiyerinde fazla miktarda karbon kaynağı bulunuyorsa bu polimerler hücre içinde biriktirilirler (Schlegel ve ark., 1961; Byrom, 1987; Verlinden ve ark., 2006; Lee.,1995; Lillo ve Valera., 1990)

Mikroorganizmaların büyümesinde önemli rolü olan bu elementlerin eksikliğinde protein sentezi durur. Protein sentezinin durması NADH ve NADPH'nin yüksek konsantrasyonda birikmesine neden olur. Bunlar sırayla sitrat sentaz ve izositrat dehidrojenazı inhibe ederler. TCA döngüsünün yavaşlamasıyla asetil-koenzim-A (asetil-CoA) PHB sentezine yönlendirilir (Dawes ve Senior, 1973). Bakteriler asetil-koenzim-A'yı (asetil-CoA)   farklı biyosentetik enzimle PHB'ye dönüştürülür (Verlinden ve ark., 2006; Madison ve Huisman, 1999; Braunegg ve ark.,1998). Bu enzimler sırasıyla 3-ketotiolaz, Asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sentaz'dır (Oeding ve Schlegel, 1973).

 lk basamakta, 3-ketotiolaz, asetoasetil-CoA oluşturmak için iki molek l asetil-CoA ile birleşir. Asetoasetil-CoA redüktaz, asetoasetil-CoA'nın NADH ile 3-hidroksib tiril-CoA ya redüksiyonuna neden olur. Sonunda PHB sentaz 3-hidroksib tiril-CoA'yı PHB'ye polimerize eder ve koenzim-A serbest kalır (Verlinden ve ark., 2006).



Şekil II.4: PHB'nin metabolik yolu (Gross ve Karla, 2002; Verlinden ve ark., 2006)

Normal bakteriyel gelişim süresince, 3-ketotiyolaz, Krebs çemberinden gelen serbest koenzim-A ile inhibe edilir. Fakat Krebs çemberine asetil-CoA girişi kısıtlandığında (karbonsuz besin limiti boyunca) fazla olan asetil-CoA PHB biyosentezine yönlendirilir (Verlinden ve ark., 2006).

II.10. PHB ÜRETEN MİKROORGANİZMALAR

PHB pek çok prokaryotik organizma tarafından üretilmektedir. Sayısız heterotrofik ve ototrofik aerobik bakteriler, fotosentetik anaerobik bakteriler, (Dawes ve Senior, 1973), Myxobakteriler (Pringsheim ve ark., 1963), *Actinomyces* spp (Davis, 1964; Kanan ve Rehacek, 1970), Cyanobakteriler (Carr, 1966), anaerobik yağ asidi okside eden Gram negatif bakteriler (McInerney ve ark., 1981) ile bazı arkelerin (Steinbüchel ve Fuchstenbusch, 1998) PHB biriktirdikleri yapılan araştırmalar sonucu tespit edilmiştir.

II.10.1. Endüstriyel PHB Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar

Imperial Kimya Endüstrisi ticari PHB üretiminde öncelikle düşük maliyetli metanolü karbon kaynağı olarak kullanan metilotrofik bakteriler üzerinde çalışmıştır. Fakat üretilen polimer miktarının az ve molekül ağırlığının ise düşük olması nedeniyle ikinci organizma olarak *Azotobacter* seçilmiştir. Her ne kadar *Azotobacter* mikrobiyolojik yapısı iyi bilinen bir organizma olsa da üzerinde çalışılan suşlar değişken olduğu için istenilen verim alınamamıştır (Madison ve Huisman, 1999). Son olarak Imperial Kimya Endüstrisi PHB üretim seviyesi daha yüksek olan *Alcaligenes eutrophus* suşlarını kullanarak PHBV Poli(3-hidroksibutirat-ko-hidroksivalerat) kopolimerini Biopol adı altında üretmiştir. Üzerinde en yoğun çalışılan *Alcaligenes eutrophus* türünün (Vandamme ve Coenye, 2004; Vaneechoutte ve ark., 2004) dışındaki diğer bakteri suşları ise *Bacillus* ssp., *Alcaligenes* ssp., *Pseudomonas* ssp., *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palutris*, *Escherichia coli*, *Burkholderia sacchari* ve *Halomonas boliviensis*'dir. Tablo.II.4 de PHB üreten bakteri suşları gösterilmektedir.

Tablo.II.2. PHA üreten bakteri ve arke cinsleri (Braunegg ve ark., 2004)

Acinetobacter	Escherichia	Paracoccus
Actinomyces	Ferrobacillus	Pedomicrobium
Alcaligenes	Gamphosphaeria	Photobacterium
Aphanethece	Haemophilus	Pseudomonas
Aquaspirillum	Halobacterium	Rhizobium
Asticcaulus	Hyphomicrobium	Rhodobacter
Azomonas	Lamprocystis	Rhodococcus
Azospirillum	Lampropedia	Rhodopseudomonas
Azotobacter	Leptothrix	Rhodospirillum
Bacillus	Methanomonas	Sphaerotilus
Beggiatoa	Methylobacterium	Spirillum
Beijerinckia	Methylocystis	Spirulina
Beneckea	Methylomonas	Stella
Caryophanon	Methylovibrio	Streptomyces
Caulobacter	Micrococcus	Syntrophomonas
Chloroflexus	Microcoleus	Thiobacillus
Chlorogloea	Microcystis	Thiocystis
Chromatium	Moraxella	Thiodictyon
Chromobacterium	Mycoplana	Thiopedia
Clostridium	Nitrobacter	Thiosphaera
Corynebacterium	Nitrococcus	Vibrio
Derrxia	Nocardia	Xanthobacter
Ectothiorhodospira	Oceanospirillum	Zoogloea

II.11. PHB ÜRETİCİSİ OLARAK HALOFİLİK ARKELER

II.11.1. Arkeler Hakkında Genel Bilgiler

Bilindiği gibi, ribozomal RNA'daki ribonükleotid sırasına göre canlılar, *Bacteria*, *Archaea* ve *Eukaria* olmak üzere üç ana âleme ayrılırlar. Bu âlemlerin her birinin pek çok fenotipik özelliği bulunmaktadır. Filogenetik açıdan önemli olan fenotipik özellikler; hücre duvarı yapısı, lipitler, RNA polimeraz ve protein sentezindeki farklılıklardır (Madigan ve ark. , 2009).

Bacteria aleminin tüm türleri, peptidoglikandan oluşan bir hücre duvarı içerirler (Madigan ve Martinko, 2006).

Archaea'da ise pseudopeptidoglikan, polisakkarit, protein ve glikoproteinden yapılmış olan çeşitli tipte hücre duvarı yapıları bulunmaktadır. Pseudopeptidoglikanın yapısında tekrarlanan üniteler halinde N-asetilglukozamin ve N-asetiltalosamuramik asit vardır. Ayrıca, bunlar arasında glikozidik bağ β -1,3' tür (Madigan ve ark. , 2009; Valera, 1988; Vreeland,1993).

Arkeler, *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Korarchaeota* ve *Nanoarchaeota* olarak dört ana alt aleme ayrılır. Euryarchaeota, Arkelerin fizyolojik olarak farklı gruplarını içerir ve bunların çoğu da farklı aşırı ortamlarda yaşarlar. Bu grubun içersinde metanojenik arkeler (metan gazı üretenler) ve aşırı halofiller (*Halobacteria*) gibi arkeler bulunur. Aşırı halofillerin büyük bir kısmı zorunlu aeroplardır. (Madigan ve ark., 2009; Munson, 1997; Spring ve ark.,1996; Valera, 1981; Vreeland,1993).

Aşırı halofil arkeler (*Halobacteriaceae* familyası) tuz konsantrasyonunun 250 -300 g/L' yi aştığı tuzlu ortamlarda baskın olarak bulunan, kırmızı pigmentasyon oluşturan heterotrofik organizmalardır. Parlak kırmızı rengin gelişiminin tuzlu ortamlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Aşırı halofil terimi mikroorganizmanın, hem tuzlu ortamlarda geliştiğini hem de mikroorganizmanın tuza çok fazla gereksinim duyduğunu belirtmek için kullanılır. Bazen bu tuz gereksinimi tuzun doyum noktasına kadar olabilir. Aşırı halofillerin gelişmesi için en an 1.5 M NaCl (yaklaşık %9) ve çoğu

türlerin optimal gelişmesi için 2-4 M NaCl (%12-23) gerekmektedir. Hemen hemen tüm aşırı halofiller 5.5 M NaCl' de gelişirler (NaCl doygunluğunun limiti % 32' dir). Buna rağmen bazı türler bu tuzlulukta çok yavaş gelişirler (Madigan ve ark., 2009; Valera, 1988)

Halobacteriaceae familyası 27 cins ve 100'den daha fazla farklı türleri içermektedir. Haloarkelerdeki PHA üretimi bu türlerin karakterizasyonu esnasında tespit edilmemiştir. Ancak taksonomik çalışmalarla *Haloterrigena hispanica*, *Haloquadratum walsbyi*, *Halorhabdus tiamatea*, *Halorhabdus utahensis*, *Halopiger aswanensis*, *Halobiforma haloterrestis*, ve *Natrinema altunense* gibi türlerin bu polimeri sentezleyebildikleri ortaya çıkmıştır (Quillaguaman ve ark., 2010).

Halofil arke toplulukları hakkında nitel ve nicel bilgilerin elde edilmesinde mikroskopik ve pratik sayımlar ve diğer metodlar kullanılır. Halofil arkelerin karotenoid pigmentleri olan bakterioruberinlerin nicel olarak tayin edilmesi, bu organizmaların toplulukları hakkında kaba bir tahmini mümkün kılar. Bütün halofil arke bakteriler aynı karotenoid içeriğine sahip değildir. Özellikle *Haloferax* türleri zayıf pigmentasyon gösterirler. Bununla birlikte pigment içeriği hücrelerin besinsel durumuna bağlı olabilir. Ayrıca tuzluluk da burada önemli rol oynar. Bazı *Haloferax* türleri yüksek tuzluluk oranında yüksek pigmentasyona sahip iken düşük tuz konsantrasyonlarında ise renksiz olabilirler (Jones ve ark., 1987; Kates ve ark., 1982; Madigan, 2006; Vreeland, 1993; Oren, 1994a; Stoeckenius, 1985; Tonosaki ve ark., 1984).

Halofilik arkelerde pigmentasyon, bakterioruberinler olarak adlandırılan kırmızı ve portakal renkli olan C50 karotenoidlerinden dolayıdır. Bu pigmentler enerji metabolizmasına katılır. Oksijen konsantrasyonunun az olduğu ortamlarda *Halobacterium salinarum* ve bazı diğer aşırı halofiller, bakteriorodopsin olarak adlandırılan mor bir protein sentezleyerek, bu proteini kendi membranı içine yerleştirirler. Bu retinal molekül ışığı absorplayarak proton motiv kuvvetin oluşmasını katalizler ve böylece düşük oksijen konsantrasyonlu durumlarda bakteriorodopsin sentezi başlar ve mikroorganizmanın rengi portakal ya da kırmızımsı renkten daha kırmızımsı mor renge dönüşür (Jones ve ark., 1987; Kates ve ark., 1982; Madigan ve ark.,

2009; Vreeland, 1993; Oren, 1994a; Stoeckenius, 1985; Tonosaki ve ark., 1984).

II.11.3. Halofilik Arkelerde PHB Üretimi:

Arkelerde PHB granüllerinin varlığı ilk olarak 1972 de halofilik izolatların karakterizasyonu yapılırken gözlemlenmiştir (Kirk ve Ginzburg, 1972; Han ve ark., 2007). *Haloferax*, *Haloarcula* ve *Haloquadratum* dahil birçok haloarke cinsinin PHB ve polihidroksi butirat-ko-valerat (PHBV) gibi PHA çeşitlerini biriktirdiği bulunmuştur. *Haloarkeal* suş 56 ve *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 dahil olmak üzere bazı halofilik arkelerin yüksek miktarlarda PHB biriktirdikleri (hücre kuru ağırlığının %60'ı) gösterilmiştir (Han ve ark., 2007)

Haloferax mediterranei; *Halobacteriaceae* familyasındaki en iyi PHB üreticisi olduğu öne sürülmüştür. Bu türlerin glikoz ya da nişastalı besiyerinde sınırlı miktarda fosfor bulunması halinde hücre kuru ağırlığının %65'i kadar PHB biriktirebildiği gösterilmiştir (Quillaguaman ve ark., 2009).

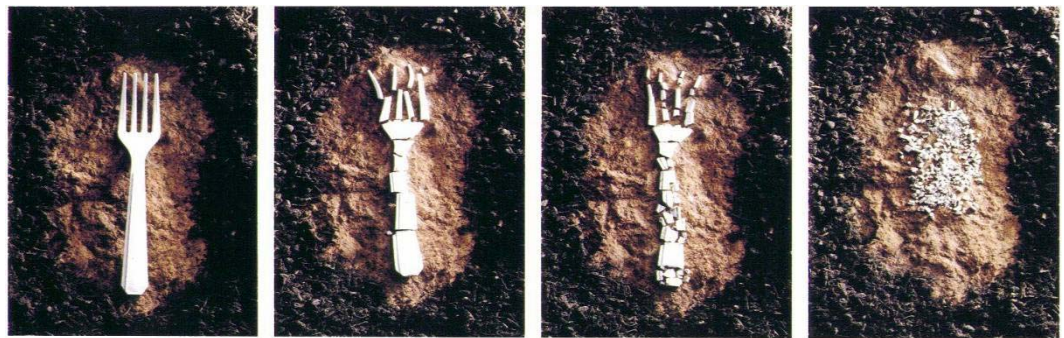
PHB üreticileri olarak kullanılan haloarke suşları pek çok avantaja sahiptir. Birincisi, haloarke aşırı tuzlu ortamda optimal büyüme gösteren bir arke grubudur. Yüksek tuz konsantrasyonunda sınırlı sayıda mikroorganizma büyüme gösterdiği için mikrobiyal kontaminasyon riski azalmıştır. İkincisi PHB sentezinde nişasta gibi bazı ucuz karbon kaynakları kullanılarak üretim maliyeti düşürülebilir. Ayrıca bu mikroorganizmalar distile suda kolayca patlayabildiklerinden organik çözücülerin yüksek miktarlarda kullanılmasına gerek yoktur (Han ve ark., 2007).

II.11.3.1. Halofillerdeki PHA Sentezleyen Enzimler

Halofillerde PHA sentaz enzimlerinin karakterizasyonu *Halopiger aswanensis* (suş 56) deki PHB sentaz ile başlamıştır (Hezayen ve ark., 2002a). Bu enzim *Halobacteriaceae* familyasının üyeleri tarafından üretilen diğer enzimler gibi yüksek ısı kararlılığı (60 °C ye kadar) gösterir. Dahası Halofilik olmayan mikroorganizmalardaki PHA sentaz enziminin tersine, *H. aswanensis*'deki enzim NaCl'ün hem varlığında (%30'a kadar) hem de yokluğunda aktif kalır ve çok dar bir substrat özgünlüğü sahiptir. *H. aswanensis* besiyerinde 3-hidroksi valerat (3-HV) ya da 4-hidroksi valerat (4-HV) gibi diğer hidroksi alkonat monomerlerinin bulunması halinde bile PHB sentezler (Hezayen ve ark., 2002a; Quillaguaman ve ark., 2009).

II.6.POLİHİDROKSİ BUTİRATIN BİYOLOJİK OLARAK PARÇALANABİLİRLİĞİ

PHB materyalinin en eşsiz biyolojik özelliğinden biri farklı ortamlarda biyolojik olarak parçalanabilmesidir (Khanna ve Srivastava, 2004; Anderson ve Dawes, 1990; Lee,1995). Bu materyalin toprak, deniz ve göl gibi doğal ortamlarda parçalanabilirliği ölçülmüştür. Biyoparçalanma oranı mikrobiyal popülasyon, sıcaklık, nem seviyesi, pH, besin miktarı, katkı maddeleri ve PHB'nin yüzey alanı gibi pek çok faktörden etkilenmektedir (Khanna ve Srivastava, 2004). PHB'nin biyoparçalanma oranı tipik olarak birkaç ay ile birkaç yıl arasında değişmektedir (Verlinden ve ark., 2006).

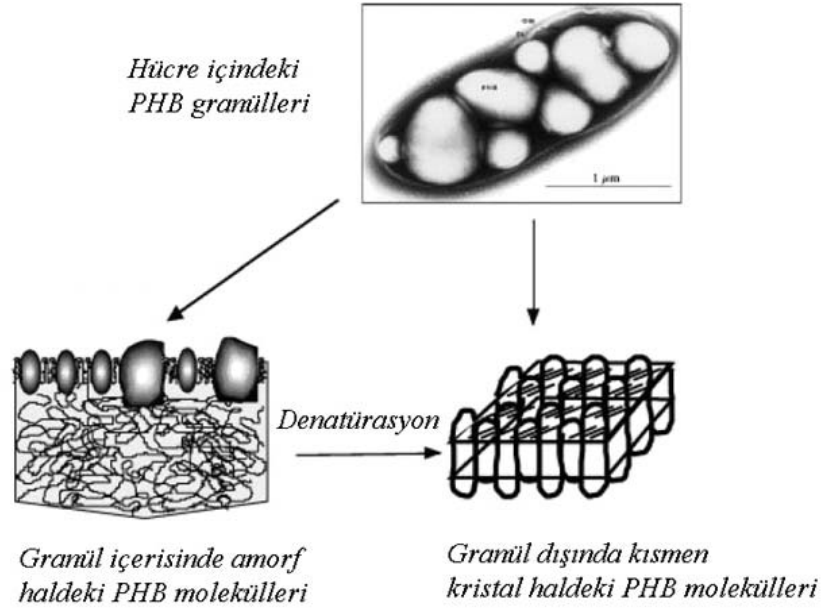


Şekil II.5: *Alcaligenes latus*'dan üretilen plastik malzemenin 1. günden 45. güne toprakta parçalanması (Miertus, 2007)

Yüksek moleköl ağırlıklı katı bir polimer olan PHB molekülleri mikroorganizmaların hücre duvarlarından taşınmazlar. Çeşitli mikroorganizmalar PHB'yi hidrolize eden ekstraselüler enzimler salgırlar. Hidroliz sonrasında suda çözünen oligomerler ve monomerler meydana gelir. Bunlar bakteri ve mantar gibi çeşitli canlılar tarafından besin maddesi olarak kullanılırlar (Khanna ve Srivastava, 2004).

PHB suda çözünmeyen bir substratken buna karşın PHB depolimeraz suda çözünebilen bir enzimdir. Bu nedenle enzimatik parçalanma iki basamaktan meydana gelen heterojen bir reaksiyondur. Reaksiyonun ilk basamağında enzim PHB materyalinin yüzeyine tutunur, ikinci basamağında ise enzim aktif kısmıyla polimer zincirini hidrolize eder. *Alcaligenes faecalis* türü üzerinde yapılan araştırmalarla PHB'nin enzimatik hidroliziyle esas olarak 3HB dimerlerinin az miktarda ise 3HB monomerlerinin meydana geldiği bulunmuştur. Ucu işaretlenmiş 3HB oligomerlerinin PHB depolimeraz enzimiyle hidrolize edilmesiyle de, enzimin hidroksil ucundaki sekonder ve tersiyer ester bağlarını ayırdığı görülmüştür (Shirakura ve ark., 1986).

Öncelikle PHB'nin intraselüler ve ekstraselüler parçalanmasının farklı olduğunu belirtmek gerekmektedir. İntraselüler parçalanma, endojen bir depo rezervinin aktif olarak bakterinin kendisi tarafından parçalanmasıdır. PHB'nin hücre içindeki yıkımını katalizleyen enzimler “intraselüler PHB depolimeraz” enzimleridir. Ekstraselüler parçalanma ise bu polimeri biriktiremeyen mikroorganizmaların PHB'yi ekzojen karbon kaynağı olarak kullanmasıdır (Jendrossek ve Handrick, 2002).



Şekil II.6: PHB'nin hücre içinde ve hücre dışındaki fiziksel durumu (Jendrossek ve Handrick, 2002).

Şekil.II.6'da görüldüğü gibi granül içerisindeki intraselüler PHB amorf haldedir ve moleküller hareketlidir. Hasar görmüş granüllerden hücre dışına çıkmış polimerler ise kristalleşir ve düzenli sarmal bir yapı haline gelir (Jendrossek ve Handrick, 2002).

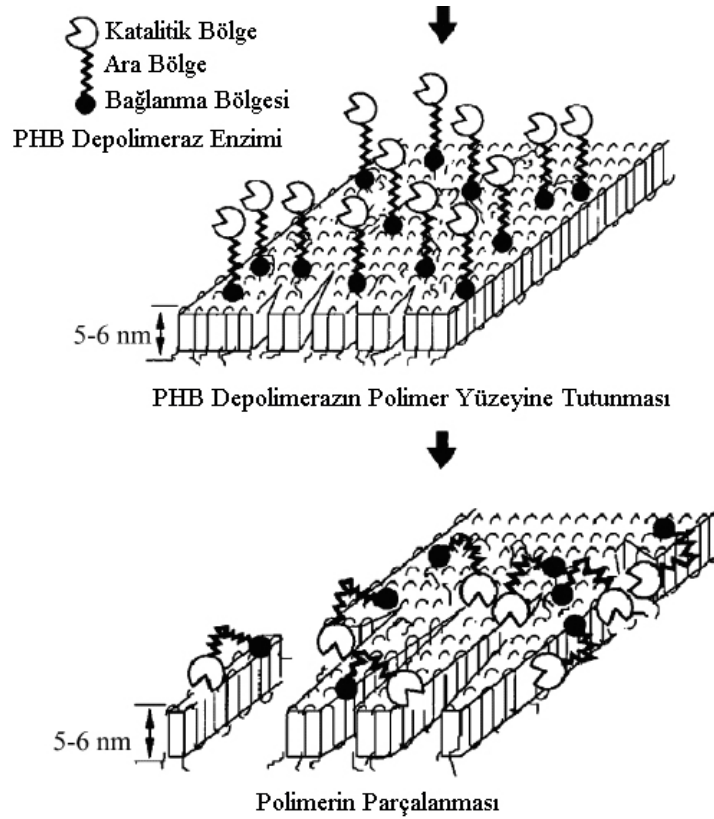
II.6.1. Ekstraselüler PHB-depolimeraz Enzimleri

PHB ve bu polimerin türevleri olan oligomerleri depolimerize etme yeteneğindeki ekstraselüler enzimler çeşitli organizmalarda bulunmuş fakat yapılan çalışmalar en çok *Alcaligenes faecalis* (Tanio ve ark., 1982) türünün üzerinde yoğunlaşmıştır. Tablo II.2'de PHB'yi parçalayabilen organizmalar gösterilmektedir (Khanna ve Srivastava, 2004).

Tablo II.3: Çeşitli ortamlardan izole edilmiş PHB molekülünü parçalayabilen mikroorganizmalar (Khanna ve Srivastava, 2004)

İzole Edildiği Ortam	Türler
Toprak	<i>Aspergillus fumigatus</i> (Mergaert ve Ark., 1993) <i>Acidovorax faecalis</i> (Mergaert ve Ark., 1993) <i>Comamonas sp.</i> (Jendrossek ve ark., 1993) <i>Pseudomonas lemoignei</i> (Delafield ve ark., 1965)
Aktive edilmiş çamur	<i>Alcaligenes faecalis</i> (Tanio ve ark., 1982) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Schirmer ve ark., 1993)
Deniz suyu	<i>Comamonas testosteroni</i> (Kasuya ve ark., 1994)
Göl suyu	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (Mukai ve ark., 1994)
Anaerobik çamur	<i>Ilyobacter delafieldii</i> (Jansen ve Harfoot, 1990)

Biyokimyasal ve moleküler karakterizasyon çalışmalarından bu enzimin PHB'nin yüzeyine tutunan hidrofobik bir bağlanma bölgesine, katalitik bir bölgeye ve ikisinin arasında bağlayıcı bir bölgeye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Lee, 1996).

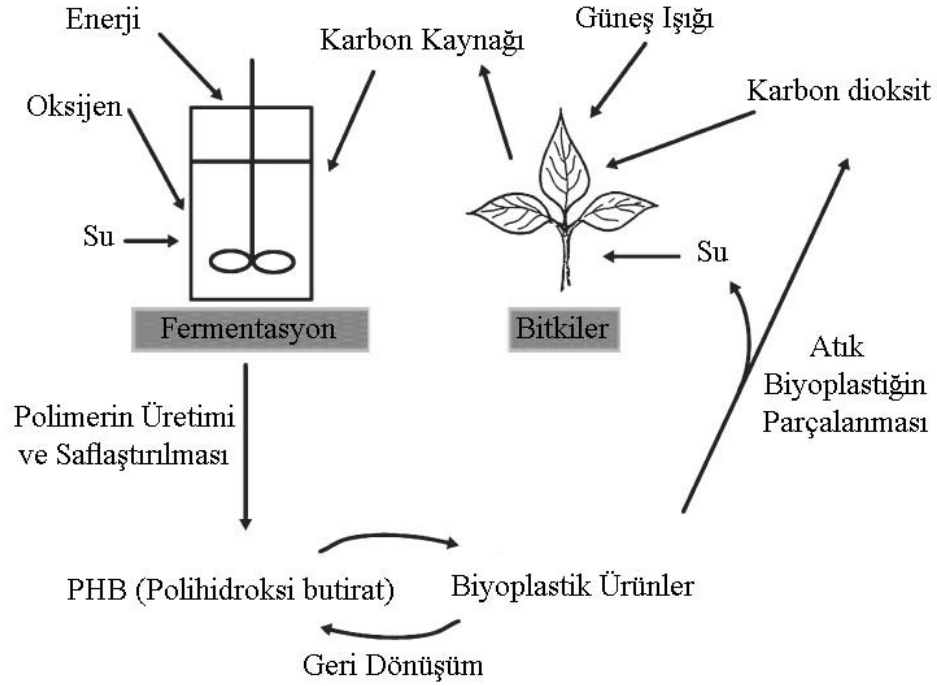


Şekil II.7: PHB depolimerazın yapısı ve PHB materyaline tutunması (Chen, 2010)

Ekstraselüler PHB depolimerazlar fonksiyon bakımından intraselüler olanlardan farklıdır. İntraselüler PHB kristal olmayan, hareketli elastomerler yapıda olduklarından intraselüler PHB depolimerazlar tarafından parçalanabilirler. İyileştirme sürecinde PHB denatüre olur ve daha kristal hale gelir. Denatüre olmuş PHB ekstraselüler depolimerazlar ile hidrolize edilebilirler fakat intraselüler depolimerazlar ile oldukça güç parçalanırlar (Lee, 1996).

II.7.YENİLENEBİLME ÖZELLİĞİ

PHB materyalinin biyolojik yapısı ve biyoparçalanır olması kadar önemli olan, diğer özelliği ise yenilenebilir kaynaklara dayalı olarak üretilmesi gerçeğidir (Braunegg ve ark., 2004; Madison ve Huisman, 1999). Bakteriyel orijinli olan bu doğal polimerlerin fermantatif üretiminde enerji ve karbon kaynağı olarak şekerler ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünler kullanılır (Kadouri ve ark., 2005). CO₂ ve suyun kullanılmasıyla üretilen bu zirai hammaddelerin PHB'ye dönüştürülmesinden sonra meydana gelen yıkım ürünleri yine CO₂ ve sudur. Açığa çıkan CO₂ bitkiler tarafından kullanılarak tekrar karbon kaynakları üretilir (Chen, 2010). Bu akış yeryüzünde kendiliğinden gerçekleştiğinden çevre koruması açısından oldukça önemlidir (Dave ve ark., 1996).



Şekil II.8: PHB'nin karbon döngüsü (Verlinden ve ark., 2007)

PHB'nin sentezi ve parçalanması Şekil.II.8'de gösterildiği gibi karbon döngüsüne tamamen uyumludur. Dolayısıyla PHB'nin biyolojik olarak parçalanması bazı uygulamalar için kritiktir. PHB'nin üretimi azalmakta olan fosil yakıtlar yerine yenilenebilir kaynaklara dayandığı için tüm dünyanın dikkatini çekmektedir (Gavrilescu ve Chisti, 2005).

II.8. POLİHİDROKSİ BUTİRATIN KULLANIM ALANLARI

PHB'nin biyoparçalanma ve biyoyumluluk özellikleri büyük çapta endüstriyel ilgiye neden olmuştur. (Verlinden ve ark.,2007; Lee, 1996). Geniş kapsamlı fiziksel özellikleri ve kimyasal modifikasyonlarla artırılmış performansı ile yaygın potansiyel kullanım alanları bulunmaktadır (Zhang ve ark., 1997; Avella ve ark., 2000; Lee ve Park, 2002; Gao ve ark., 2006; Kunze ve ark., 2006). Polipropilen ve Polietilen gibi petrokimyasal polimerlerin yerini alması beklenen PHB ilk olarak paketleme malzemesi olarak ve şampuan şişesi gibi günlük malzemelerin yapımında Wella Firması (Darmstadt, Almanya) tarafından kullanılmıştır (Weiner, 1997).

PHB'nin çeşitli alanlardaki kullanımları aşağıdaki gibidir:

- Paketleme filmleri, torbalar, kaplar ve konteynırlar
- Isıya duyarlı yapıştırıcılar, kauçuk ham maddesi
- Tek kullanımlık tıraş bıçakları, mutfak eşyaları, bebek bezleri ve kadın hijyen ürünleri
- Cerrahi pens ve iğneler, ameliyat iplikleri, ameliyat elbisesi, sargı bezleri ve pansuman bezi
- Cerrahi plakalar ve biyolojik implantasyon malzemeleri
- Kemik büyümesi stimülasyonu ve piezoelektrik özellikleriyle iyileştirme
- İlaç, hap, insektisit, herbisit ve gübrenin uzun sürede belirli hızda salınması için biyoparçalanır taşıyıcılar
- Kiral bileşen üretimi için başlatıcı maddeler
- Biyolojik yakıt üretimi (Lee, 1996; Chen, 2010)

Biyolojik uyumluluğa sahip PHB memeli dokularında implantasyon maddesi olarak kullanıldığında toksik etkiye neden olmaz (Lee, 1996). Medikal alandaki asıl avantajı ise biyoparçalanır olan bu polimerin insan vücuduna yerleştirilmesinden sonra tekrar çıkartılmasına gerek kalmamasıdır (Verlinden ve ark.,2007).

Son dönemlerde ise Zhang ve arkadaşları (2009) PHB ve mcl PHA'nın esterleşmesiyle elde edilen 3-hidroksibütirat metil ester (3HBME) ve mcl-3-hidroksialkonat metil esterin (3HAME) biyolojik yakıt olarak kullanılabileceğini yapmış olduğu çalışmalarla göstermiştir. Günümüzde ise Tablo.II.3. de görüldüğü gibi dünya çapında pek çok firma farklı uygulama alanlarında PHB üretimi yapmaktadır (Chen, 2009)

Tablo.II.4: PHB'yi üreten firmalar ve Uygulama Alanları (Chen, 2010)

Firma Adı, Ülke	Yıllık Üretim Miktarı (Ton)	Üretim Süresi	Uygulama Alanları
ICI, İngiltere	300	1980-1990	Paketleme Malzemesi
Chemie Linz, Avusturya	20-100	1980	Paketleme Malzemesi ve ilaç taşıyıcısı
BTF, Avusturya	20-100	1990	Paketleme Malzemesi ve ilaç taşıyıcısı
Biomers, Almanya	Bilinmiyor	1990'dan günümüze	Paketleme Malzemesi ve ilaç taşıyıcısı
BASF, Almanya	Deneme bazında	1980-2005	Blend Oluşturma
ADM, ABD	50.000	2005'den günümüze	Hammadde
Meredian, ABD	10.000	2007'den günümüze	Hammadde
Mitsubishi, Japonya	10	1990	Paketleme Malzemesi
Biocycles, Brezilya	100	1990'dan günümüze	Hammadde
Bio-on, İtalya	10.000	2008'den günümüze	Hammadde
Tianjin Northern Food, Çin	Deneme bazında	1990	Hammadde
Jiangsu Nan Tian, Çin	Deneme bazında	1990'dan günümüze	Hammadde
Tianjin Green Bioscience, Çin	10.000	2004'den günümüze	Paketleme Malzemesi ve Hammadde

II.9. PHB ÜRETİMİNDE KULLANILAN KARBON KAYNAKLARI

PHB'nin üretimi için kullanılan substratlar özellikle karbon kaynağı açısından bakıldığında, şekerler, yağ asitleri, triaçilgliseroller, alkanlar ve kloralkanoik asitler gibi bileşenlerdir (Brandl ve ark., 1991; Kato ve ark., 1992; Tanaka ve ark., 1993; Steinbüchel ve Fuchstenbusch, 1998; Yılmaz ve Beyazlı, 2003). Ayrıca butirik asit, pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksi hekzanoik asit, L-Laktat ve glukonat gibi karbon kaynaklarından PHB üretimi de denenmiştir (Rehm ve ark., 1998; Tanaka ve ark., 1993; Doi ve ark., 1986; Yılmaz ve Beyazlı, 2003).

II.10. DÜŞÜK MALİYETLİ ALTERNATİF KARBON KAYNAKLARI

Avantajlı özelliklerine rağmen PHB'nin ticari üretiminde bakteriyel fermantasyonun yüksek maliyette olması karşılaşılan en büyük sorun haline gelmiştir. Bakteriyel biyoplastik, maliyeti 0.25-0.50 US \$ (kg⁻¹) olan PP ve PE'den 5-10 kat daha pahalıya mal olmaktadır (Poirier ve ark., 1995). Üretim fiyatının yükselmesine neden olan en önemli faktör substrat (karbon kaynağı) maliyetidir. PHB üretim ekonomisi büyük ölçüde hammadde maliyeti tarafından belirlenir (Khanna ve Srivastava, 2003; Koller ve ark., 2010). PHB birikiminin aerobik koşullar altında olması intraselüler solunumla karbon kaynağında yüksek oranda kayıplara yol açar. Bu nedenle maksimum karbon kaynağının %50'si PHB oluşumuna katılır. PHB biyosentezinde başlangıç materyali olarak atık maddelerin kullanımı düşük maliyetli biyopolimer üretimi için uygun bir strateji oluşturduğu gibi sanayi atık sorunlarının üstesinden gelmek için de yardımcı olur (Chen, 2010).

Avrupa'daki süt ürünleri fabrikalarında PHB üretimi için laktoz sağlayan fazla miktarda peynir altı suyu mevcuttur. Burada yeni yasal durumla artan biyoyakıt üretimi, PHB üretimi için başlangıç malzemesi olan gliserolün devasa miktarlarda oluşmasına neden olmuştur. Farklı endüstriyel atıklar mikrobiyal suşların polimer üretiminde ihtiyaç duydukları azot kaynağı olarak yüksek potansiyel gösterirler. Kesim ve işleme endüstrisinden gelen et ve kemik ununun yanı sıra ot ve silaj atıklarıyla PHB üretebilen mikroorganizmalar üretilerek mükemmel sonuçlar elde edilmiştir (Chen, 2010).

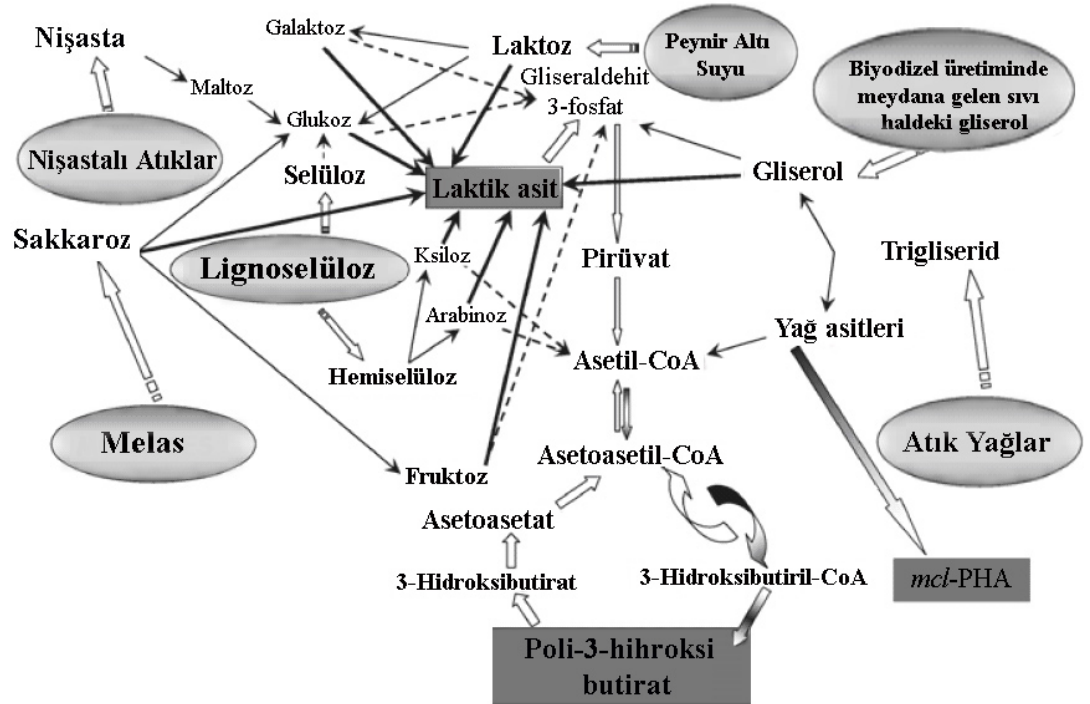
Dünyanın diğer bölgelerinde, şeker sanayisinden melas, nişasta, atık yağlar, metanol gibi alkoller (Bourque ve ark., 1995) ve özellikle de lignoselülozik hammaddeler endüstriyel süreç için uygun miktarlarda mevcuttur (Chen, 2010).

Yemeklik yağ atığı, zeytinyağı ve palmiye yağı üretiminden elde edilen atık sular, farklı bitki yağları gibi çeşitli kaynaklardan atık yağlar elde edilebilir. Her durumda, doğrudan karbon kaynağı olarak triaçilgliserit ya da

hidrolizasyondan sonra gliserol ve yağ asitleri veya transesterifikasyondan sonra biyodizelden meydana gelen gliserol kullanılmaktadır (Chen, 2010).

Lignoselülozik ve selülozik malzemeler (lignin, selüloz ve hemiselüloz lifler) PHB üretimi için yüksek miktarda hammadde sağlar. Bu atıkların büyük bir kısmını oluşturan sanayi dalları ağaç işleme, kağıt ve tarım endüstrileridir. Bugünlerde, dünya çapında pek çok ülke lignoselüloz ve selüloz atıkların biyopolimerlerin üretimi için gerekli olan başlangıç maddelerine dönüştürüldüğü rafineri tesislerinin geliştirilmesi için çaba göstermektedir (Chen, 2010).

Brezilya'da var olan bir şeker kamışı fabrikası pilot ölçekte sakkarozdan biyoetanol ve kısmen PHB elde etmektedir. Şekil.II.9 farklı karbon kaynaklarının kullanılmasıyla PHB üretiminde izlenen temel metabolik yolları göstermektedir (Chen, 2010).



Şekil.II.9. Endüstriyel atıklardan elde edilen farklı karbon kaynaklarının kullanılmasıyla PHB üretiminde izlenen temel metabolik yollar (Koller ve ark., 2010)

Atık yan ürünler asıl bileşenlerinin yanı sıra onları saf ve pahalı olan diğer substratlardan daha avantajlı hale getiren ek maddeler içerirler. Örneğin, süt fabrikalarından elde edilen peynir altı suyu sadece laktoz bakımından zengin değil aynı zamanda mikrobiyal büyüme üzerinde olumlu etkilere sahip mineral ve protein artıkları bakımından da zengindir. Ayrıca, yararlı büyüme bileşenleri olan vitaminlerin ve biotin melas gibi karbon kaynaklarında mevcut olduğu tespit edilmiştir (Purushothaman ve ark., 2001)

Diğer yandan böyle kompleks atıklar fermente olamayan bileşenleri ve hücrel büyüme hatta PHB üretimini inhibe eden maddeleri içerebilir (Solaiman ve ark., 2006). Bu bileşiklerin arasında fenoller, aldehitler ve farklı ağır metaller bulunmaktadır (Purushothaman ve ark., 2001; Silva ve ark., 2004). Bazı mikrobiyal türler için, biyoyakıt üretiminden elde edilen ham gliseroldeki metanol kalıntıları bu substratın kullanımından önce uzaklaştırılmalıdır (Braunegg ve ark., 2007). Buna ek olarak atık maddelerin kullanılmadan önce işlenmesi sonucunda toksik maddeler ortaya çıkabilir. Örneğin protein atıklarından serbest kalan amino gruplarıyla birlikte karbonhidratların termal sterilizasyon ile indirgenmesi kolayca maillard reaksiyon ürünleri ortaya çıkar. Çeşitli atık maddelerdeki dimerik ve polimerik cisimlerin asidik hidrolizi sık sık yan ürünlerin oluşumuna neden olur. Bu yan ürünler biyoişlemden istenilen hidrolizati imkansız yapar (Chen, 2010).

BÖLÜM III

ÇALIŞMALAR

III.1. ARAŞTIRMA ARAÇ VE GEREÇLERİ

III.1.1. Araştırma İmkanları

Tez kapsamındaki deneysel çalışmalar, Marmara Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarı ile İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Bölümü Elektron Mikroskobu Ünitesinde yapılmıştır.

III.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan NaCl, MgSO₄, KCl, Na₃C₃H₅O(CO₂)₃, Agar, Maya Özütü, Nişasta, KH₂PO₄, NH₄Cl, FeCl₃.6H₂O, MgCl₂, CaCl₂, NaHCO₃, NaBr, NaClO, OsO₄, Aseton, Etanol, Kloroform, Sülfürik asit, Gluteraldehit, Uranil asetat, Propilen oksit, Epon 812, DDSA, MNA, DMP ve Poli[(R)-3-hidroksibutirik asit] analitik saflıkta olup; Merck, Sigma, Fluka ve Carlo Erba Reagenti'den temin edilmiştir.

III.1.3. Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmalarda kullanılan, yüksek tuz konsantrasyonlarında üreme kabiliyeti olan 5 adet halofilik arke izolatı KYT1 İzolat 1, KYT1 İzolat 2, TG4 İzolat 1, TG6 İzolat 2, TK1 İzolat1 haloarkeal izolat M.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarı kültür koleksiyonundan elde edilmiştir.

III.1.4. Kullanılan Besi Yerleri

III.1.4.1. Brown Besiyeri

Maya Özütü	: 5 g
$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$	: 3 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	: 2 g
KCl	: 2 g
NaCl	: 250 g
Distile su	: 1000 mL

Besiyerinin pH değeri 7.00 olacak şekilde ayarlanmıştır. Katı Brown besiyeri hazırlamak için ortama 20 g/l agar ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltiler otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

III.1.4.2. Minimal Besiyeri

KH_2PO_4	: 3.75 mg
NH_4Cl	: 2 g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	: 8.38 mg
NaCl	: 194 g
$MgCl_2$	: 16 g
$MgSO_4$	: 24 g
$CaCl_2$	: 1 g
KCl	: 5g
$NaHCO_3$	: 0.2 g
NaBr	: 0.5 g
Distile su	: 1000 mL

Ortama karbon kaynağı olarak % 2'lik (w/v) çözünebilir saf nişasta, % 2'lik (w/v) mısır nişastası, % 1'lik (w/v) sakkaroz % 1'lik (v/v) peynir altı suyu % 1'lik domates artığı (v/v), % 2'lik elma artığı (v/v) ve % 2'lik kavun artığı (v/v) ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri 7.20 olacak şekilde ayarlanmıştır (Lillo ve Valera, 1990). Hazırlanan çözeltiler 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir (Lillo ve Valera, 1990).

III.1.5. Kullanılan Çözeltiler

III.1.5.1. % 0.2'lik Sodyum Hipoklorit Çözeltisi (v/v)

4 mL % 5'lik ticari Sodyum Hipoklorit alınıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Lillo ve Valera, 1990).

III.1.5.2. pH 7.4 Fosfat Tamponu (w/v)

Hassas terazide 0,9073 g KH_2PO_4 tartılıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak A çözeltisi hazırlanmıştır. B çözeltisini hazırlamak için ise 1,187 g NaHPO_4 alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra A çözeltisinden 19,7 mL, B çözeltisinden 80,3 mL alınarak balon jode iyice karıştırılmıştır (Semanza ve ark., 1962)

III.1.5.3. %2'lik Gluteraldehit Tespit Çözeltisi (v/v)

% 25'lik Gluteraldehitten 2,5 ml alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Tian ve ark., 2005).

III.1.5.4. %1'lik Osmiyum Tetraoksit Tespit Çözeltisi (v/v)

0,1 g OsO_4 ampülü kahverengi cam şişenin içine atılarak kırılıp üzerine 10 mL distile su ilave edilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Tian ve ark., 2005).

III.1.5.5. %3,5'luk Uranil asetat Çözeltisi (v/v)

%5'lik Uranil asetat 14 mL alınarak distile su ile 20 mL'ye tamamlanmıştır (Tian ve ark., 2005).

III.1.5.6. %2'lik Asetik asit çözeltisi (v/v)

Saf Asetik asitten 2 mL alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Dussault, 1955).

III.1.5.7. %70 ve %90'lık Etanol Çözeltisi (v/v)

%70'lik etanol çözeltisi hazırlamak için 70 mL etanol alınıp distile su ile 100 mL'ye, %90'lık etanol çözeltisi hazırlamak için 90 mL etanol alınıp distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır (Tian ve ark., 2005).

III.1.5.8. Gömme Materyali Saf Epon Çözeltisi(v/v)

50 mL saf epon çözeltisi hazırlamak için 22,75 mL Epon 812, 15,5 mL DDSA, 11,75 mL MNA ve 1,0 mL DMP cam bir kaptaki iyice karıştırılmıştır (<http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/embedding-media.html>).

III.1.5.9. (1:1) ve (1:3) Ölçülerinde Propilen oksit-Epon Çözeltileri (v/v)

(1:1) oranında karışım hazırlamak için 2 mL Propilen oksit alınarak üzerine 2 mL saf Epon, (1:3) oranında karışım hazırlamak için ise 1 mL Propilen oksit alınarak üzerine 3 mL saf Epon çözeltisi ilave edilerek cam spatül yardımıyla iyice karıştırılmıştır (<http://www.ou.edu/research/electron/bmz5364/embedding-media.html>).

III.1.6. Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı	SARTORIUS ANALİTİK TERAZİ ± 0,0001 g HASSASIYETLİ DİJİTAL
Manyetik Karıştırıcı	İKAMAG® RH
Otoklav	HMC HIRAYAMA
Santrifüj	SIGMA LABORATORY CENTIFUGES 3K30
Etüv	NÜVE INCUBATOR EN 055
Çalkalayıcı Etüv	SARTORIUS ANALİTİK TERAZİ ± 0,0001 G HASSASIYETLİ
Su Banyosu	CLIFTON DIGITAL SHAKER BATH, 0-100 °C
Buzdolabı	ARÇELİK
UV Spektrofotometre Cihazı	SHIMADZU UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER UV-1601 5
Transmission Elektron Mikroskobu	JEOL JEM-1011 ELECTRON MICROSCOPE
Mikrotom	REICHERT OMU3 MICROTOME

III.2. DENEYSEL YÖNTEMLER

III.2.1. Halofilik Arke İzolatlarının Kültürü

Halofilik Arke izolatlarının üretilmesi için hazırlanan Brown besiyerinin pH'sı 7.2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 121 °C' de 15 dakika steril edilmiştir (Lillo ve Valera, 1990). KYT1 İzolat 1, KYT1 İzolat 2, TG4 İzolat 1, TG6 İzolat2, TK1 İzolat 1 steril Brown besiyerine ekilerek 37 °C'de 120 rpm'de yaklaşık 10 gün boyunca çalkalanmışlardır (Lillo ve Valera, 1990). 10 günlük inkübasyon sonrasında PHB üretimini sağlamak için hücreler %2'lik çözünabilir saf nişasta içeren minimal besiyerine transfer edilerek çalkalayıcı etüvde 37°C de kültür edilmiştir (Lillo ve Valera, 1990). Hücreler durma fazının başında, 8000 g de 10 dakika santrifüj edilerek besiyerinden ayrılmıştır

(Lillo ve Valera, 1990). Santrifüj ile ayrılan pelet 40°C de 1 gün kurutularak hücrelerin kuru ağırlıkları ölçülmüştür (Lillo ve Valera, 1990).

III.2.2. Alternatif Karbon Kaynakları Kullanarak PHB üretimi

Brown besiyerinde üretilen Arke hücreleri, düşük maliyetli karbon kaynakları kullanılarak PHB moleküllerinin üretimini araştırmak amacıyla; % 2 mısır nişastası (w/v), % 1 sakkaroz (w/v), % 1 peynir altı suyu (v/v), % 2 kavun artığı (w/v), % 2 elma artığı (w/v) ve %1 domates artığı (w/v) kullanılarak hazırlanan ve pH'sı 7.2 (Lillo ve Valera, 1990) olacak şekilde ayarlanmış minimal besiyerlerine ayrı ayrı ekilmiştir. Hücreler çalkalayıcı etüvde 37°C de 10 gün inkübasyona bırakıldıktan sonra durma fazının başında, 8000 g de 10 dakika santrifüj edilerek besiyerinden ayrılmıştır (Lillo ve Valera, 1990). Santrifüj ile ayrılan pelet 40°C de 1 gün kurutularak hücrelerin kuru ağırlıkları ölçülmüştür (Lillo ve Valera, 1990).

III.2.3. PHB Granüllerinin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Hücreleri patlatmak için peletlerin üzerine 10 mL %0.2'lik sodyum hipoklorit konularak su banyosunda 37°C de 1 saat bekletilmiştir (Lillo ve Valera, 1990). Süspansiyon, santrifüj tüplerine eşit miktarlarda konulduktan sonra 8000 g de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Lillo ve Valera, 1990). Sıvı kısım atılarak elde edilen pelet önce distile su, sonrasında aseton ve etanol ile yıkanmıştır (Law ve Slepecky, 1960). Yıkama işleminin ardından peletlerin üzerine 5 mL saf kloroform eklenerek 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiştir (Law ve Slepecky, 1960).

III.2.4. PHB'nin Kantitatif Tayini

Kloroform buharlaştıktan sonra, her bir peletten 60µg örnek alınarak deney tüplerine konulmuştur. Örneklerle 10 mL konsantre H₂SO₄ eklendikten sonra 100°C'lik su banyosunda 10 dakika kaynatılmıştır (Law ve Slepecky, 1960). Açığa çıkan krotonik asidin 235 nm de absorbansı Shimadzu marka spektrofotometre ile ölçülmüştür (Law ve Slepecky, 1960).

Örneklerin içerdiği PHB miktarını hesaplamak için, analitik saflıkta olan Poli[(R)-3-hidroksibutirik asid] kullanılarak 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda PHB standart solüsyonları hazırlanmıştır (Law ve Slepecky, 1960). Hazırlanan standartların 235 nm deki absorbansları Shimadzu marka spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen absorbans verileriyle PHB standart eğrisi çizilerek suşların ürettiği PHB miktarları hesaplanmıştır (Law ve Slepecky, 1960).

III.2.5. PHB Granüllerinin Elektron Mikroskobu ile Saptanması

III.2.5.1. Halofilik Arke Hücrelerinin Tespiti

PHB granüllerini görüntülemek için en çok PHB molekülü üreten KYT1 izolat 1 minimal besiyerine ekilerek 37°C'de etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler durma fazının başında 8000g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan hücre peletinin üzerine % 2'lik gluteraldehit tespit solüsyonu konularak +4°C de 1 gün bekletilmiştir. Tespit edilen hücreler pH 7,4'lük fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra %1'lik osmiyum tetraoksit tespit çözeltisi içinde +4°C de 2 saat bekletilerek ikinci fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Pelet fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra % 3,5'luk uranil asetat çözeltisinde 30 dakika +4°C de bekletilmiştir (Tian ve ark.,2005). Ortamdaki tuzların uzaklaştırılması için hücreler % 2'lik asetik asit ile 5 dakika +4°C de yıkanmıştır (Dussault, 1955).

III.2.5.2. Halofilik Arke Hücrelerinin Dehidratasyonu

%2'lik asetik asitte 5 dakika bekleyen pelet fosfat tamponuyla yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi için % 70'lik etanolde 1 gece +4°C de bekletilmiştir. Ertesi gün pelet sırayla % 90, % 100, % 100 etanol ve % 100 propilen, % 100 propilen serilerinde 10 dakika bekletilmiştir (Tian ve ark., 2005).

III.2.5.3. İnfiltrasyon İşlemi

İnfiltrasyon işlemi için pelet sırasıyla 1:1 oranındaki propilen oksit-epon karışımı içinde 45 dakika, 1:3 oranındaki propilen oksit-epon karışımı içinde 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir (Tian ve ark., 2005).

III.2.5.4. Gömme İşlemi

Hücre peletlerinin gömme işlemi yapılmadan önce saf eponda 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra gömme kapsülleri hava kabarcığı oluşmayacak şekilde saf epon ile doldurulmuştur. Örnekler iğne yardımıyla kapsüllerin içine Şekil.III.1 de görüldüğü gibi yerleştirilmiştir. Kapsüllere gömülmüş hücre örnekleri 37°C de 18 saat bekletilerek polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Tian ve ark.,2005).



Şekil.III.1. Kapsüllere Gömülmüş Hücre Örnekleri

III.2.5.5. Kesim İşlemi

Minimal besiyerine ekilen Arke hücrelerinde PHB granüllerini tespit etmek için İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD Elektron Mikroskop Ünitesi'nde Reichert OMU3 Marka mikrotomla alınan ince kesitler, Jeol Jem-1011 marka transmission elektron mikroskobu (TEM) kullanılarak en fazla PHB üreten KYT1 izolat 1'e ait hücrelerin mikrografisi çekilmiştir (Tian ve ark.,2005; Lee, 1996).

BÖLÜM IV

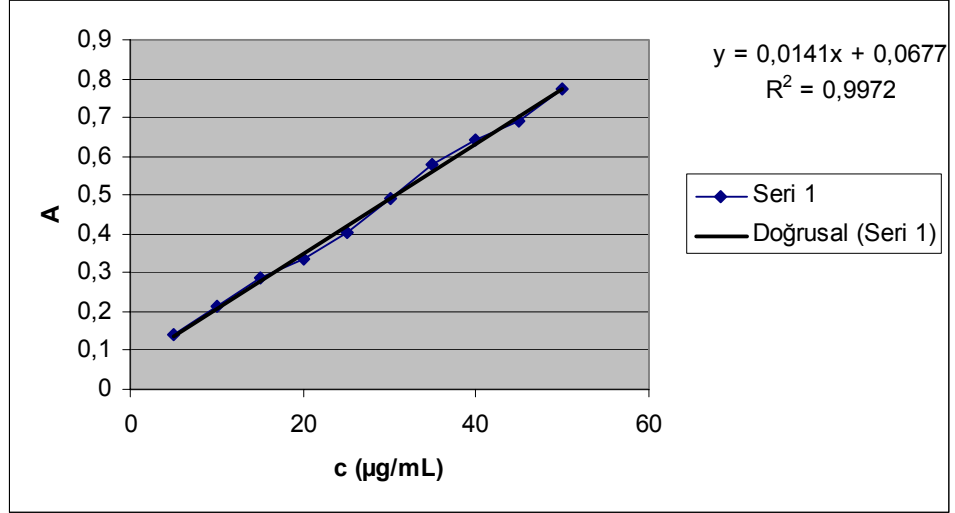
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Kayacık Tuzlası, Tuz Gölü ve Tuzköy Tuz Madenlerinden elde edilen halofilik arke izolatlarının PHB üretim kapasiteleri araştırılmış ve alternatif karbon kaynakları kullanılarak bu izolatlar tarafından üretilen PHB miktarları tayin edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda 5 adet Haloarke izolatı önce Brown besiyerinde üretilmiştir. Daha sonra ise PHB üretimini tespit etmek için hücrelerin alternatif karbon kaynakları kullanılarak hazırlanan minimal besiyerlerine ekimi yapılmıştır. Örneklerin içerdiği PHB miktarları saptandıktan sonra en çok PHB üreten izolatın transmission elektron mikroskobu (TEM) ile mikrofrafisi çekilmiştir.

IV.1. HALOFİLİK ARKE SUŞLARININ PHB ÜRETİM MİKTARLARI

PHB üretiminin gerçekleşmesi için minimal besiyerlerinde üretilen arke izolatlarının hücre kuru ağırlıkları Tablo IV.4’de görüldüğü gibi ölçülmüştür. PHB Standart Eğrisi (Şekil.IV.1) kullanılarak hesaplanan PHB miktarları ve yüzde verim oranları Tablo.IV.1 de, arke izolatlarının farklı besiyerlerindeki PHB üretim yüzdeleri ise Şekil.IV.2 de gösterilmektedir. Elde edilen verilerde de görüldüğü gibi halofilik arke izolatlarının PHB üretim yüzdeleri 1,97 -53,14 arasında değişmektedir. Farklı karbon kaynakları içeren besiyerlerinde en yüksek PHB verimi sırasıyla; % 1 sakkarozlu besiyerinde TG4 İzolat 1 % 4,11 oranında, % 1 peynir altı suyu içeren besiyerinde TK1 İzolat 1 % 47,69 oranında, % 2 kavun artığı içeren besiyerinde TG4 İzolat 1 % 21,19 oranında, % 2 elma artığı içeren besiyerinde TK1 İzolat 1 % 15,25 oranında, % 2 domates artığı içeren besiyerinde % 31,17 oranında olduğu saptanmıştır. % 2

mısır nişastalı besiyerinde inkübe edilen KYT1 İzolat 1'in ise % 53,14'lük verimle en fazla PHB biriktiren izolat olduğu tespit edilmiştir.

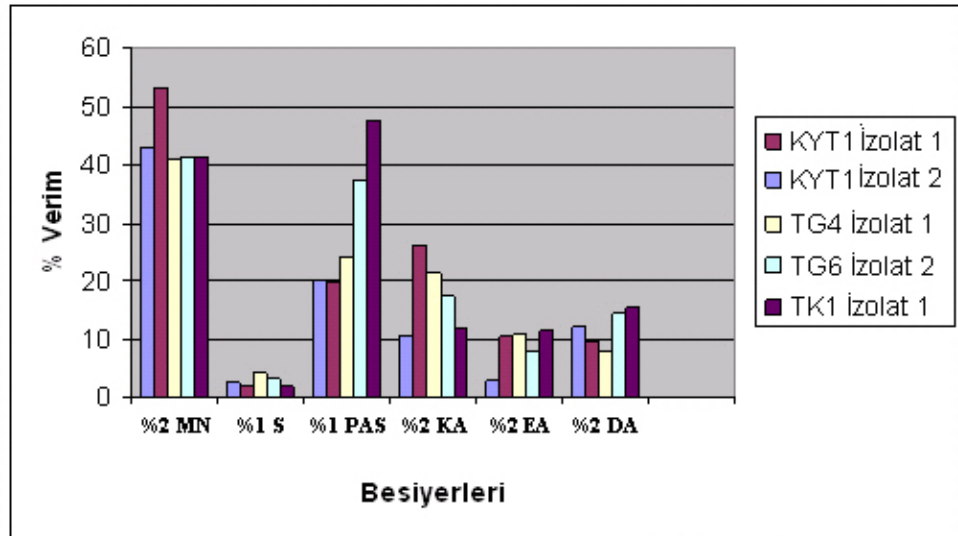


Şekil.IV.1. PHB Standardının Absorbans-Konsantrasyon Grafiği

Tablo IV.1: Örneklerdeki PHB Miktarları ve Yüzde Verim Oranları

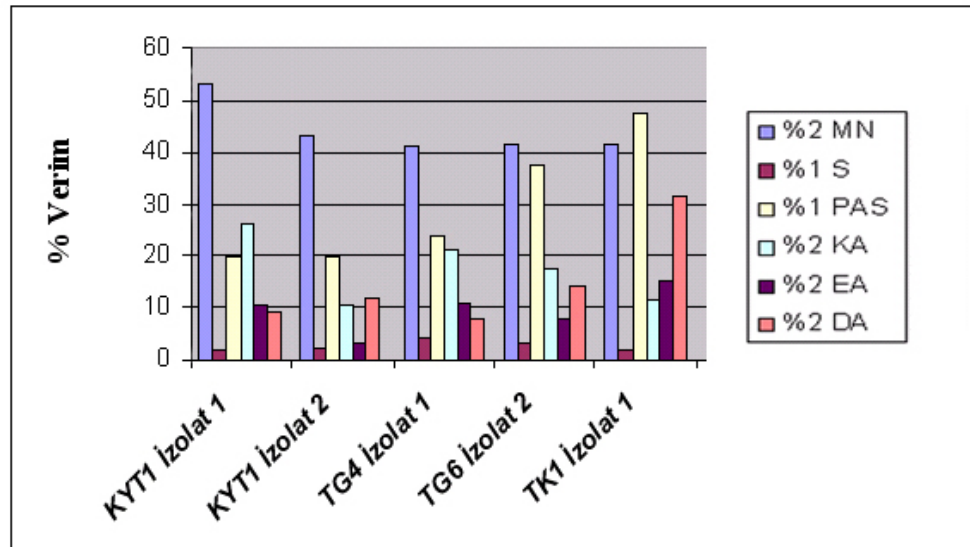
Arke İzolatı	Besiyeri	Hücre Kuru Ağırlığı (g/L)	PHB Miktarı (g/L)	Verim (%)
KYT1 İzolat 1	%2 MN ⁽¹⁾	0,1957	0,104	53,14
	%1 S ⁽²⁾	2,5665	0,048	1,87
	%1 PAS ⁽³⁾	0,3915	0,077	19,66
	%2 KA ⁽⁴⁾	0,555	0,146	26,30
	%2 EA ⁽⁵⁾	4,54	0,481	10,58
	%2 DA ⁽⁶⁾	2,523	0,231	9,39
KYT1 İzolat 2	%2 MN	0,174	0,075	43,10
	%1 S	2,2185	0,055	2,479
	%1 PAS	0,4568	0,091	19,92
	%2 KA	0,3711	0,039	10,50
	%2 EA	2,55	0,077	3,02
	%2 DA	3,858	0,464	12,03
TG4 İzolat 1	%2 MN	0,326	0,134	41,10
	%1 S	2,5491	0,105	4,11
	%1 PAS	0,435	0,104	23,90
	%2 KA	0,634	0,134	21,19
	%2 EA	1,918	0,206	10,74
	%2 DA	3,758	0,297	7,91
TG6 İzolat 2	%2 MN	0,435	0,180	41,38
	%1 S	3,436	0,112	3,26
	%1 PAS	0,4785	0,179	37,40
	%2 KA	0,4576	0,079	17,26
	%2 EA	3,7627	0,296	7,85
	%2 DA	2,436	0,348	14,28
TK1 İzolat 1	%2 MN	0,217	0,09	41,47
	%1 S	3,59	0,071	1,97
	%1 PAS	0,412	0,197	47,69
	%2 KA	0,593	0,068	11,46
	%2 EA	3,266	0,494	15,25
	%2 DA	2,797	0,872	31,17

- ⁽¹⁾ %2 Mısır Nişastalı Besiyeri
⁽²⁾ %1 Sakkarozlu Besiyeri
⁽³⁾ %1 Peynir Altı Sulu Besiyeri
⁽⁴⁾ %2 Kavun Artıklı Besiyeri
⁽⁵⁾ %2 Elma Artıklı Besiyeri
⁽⁶⁾ %2 Domates Artıklı Besiyeri



Şekil.IV.2. Halofilik arke izolatlarının alternatif besiyerlerindeki PHB üretim oranları

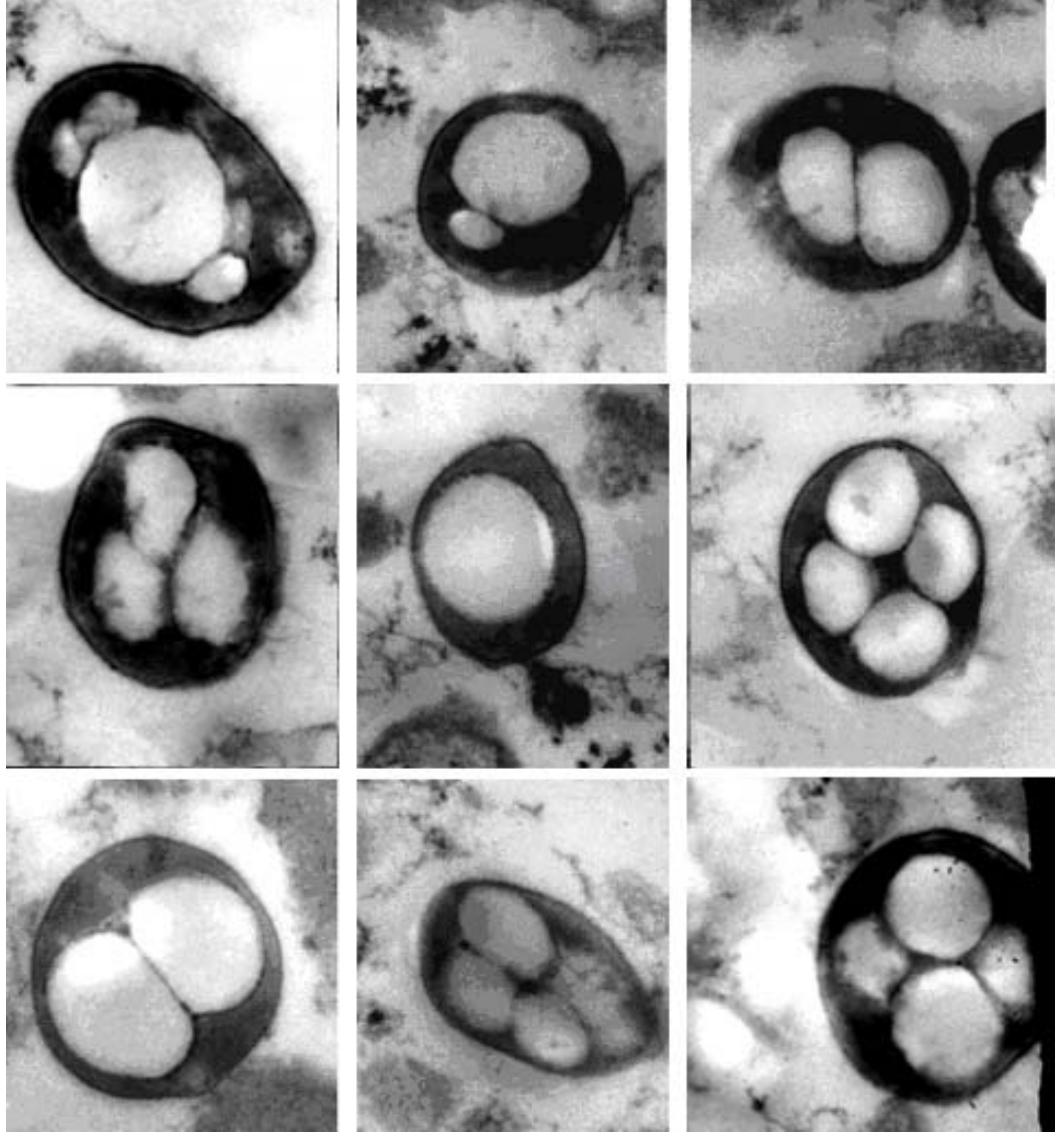
Şekil.IV.3. de ise her bir izolata farklı besiyerindeki verimi karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.



Şekil.IV.3. Halofilik arke suşlarının besiyeri karşılaştırmalı PHB verimleri

IV.2. PHB GRANÜLLERİNİN TEM MİKROGRAFLARI

% 53,14 verimle en fazla PHB biriktirdiği kantitatif olarak saptanan KYT1 izolat 1'in TEM mikrografları aşağıdaki gibi görüntülenmiştir.



Şekil.IV.4. KYT1 İzolat 1'e ait hücrelerindeki PHB granüllerinin TEM ile çekilen mikrografları

IV.3. TARTIŞMA

PHB pek çok canlı organizma tarafından sentezlenir. Yüksek oranda üretim yapan esas üretici adayları ise bitkiler ve bakterilerdir. Bitkilerde yüksek seviyedeki (kuru ağırlığın %10-40'ı) polimer miktarı, bitkinin gelişimi ve büyümesi üzerinde negatif etkiye sahiptir. Günümüzde hala bu problem çözülememiştir (Bohmert ve ark., 2002, Verlinden ve ark., 2007). Bakterilerde ise tersine, hücre kuru ağırlığının %90'nı kadar yüksek oranda PHB üretilir (Verlinden ve ark., 2007).

Bakterilerde PHB birikimi besinsel kaynaklar dengesiz olduğunda, karbon ve enerji depolamak için izlenilen doğal bir yoldur. Bakteriyel büyüme azot, fosfor ya da oksijen azalmasıyla sınırlanıyorsa ve ortamda fazla miktarda karbon kaynağı bulunuyorsa bu polimeri biriktirilirler (Verlinden ve ark., 2007). Maksimum PHB sentezi için, Asetoasetil-CoA redüktaz aktivitesini etkileyen NADPH ve/veya NADPH/NADP oranlarının en kritik faktörler olduğu rekombinant *E.coli* suşlarında yapılan çalışmalar sonrasında ortaya çıkmıştır (Lee ve ark., 1996). Endüstriyel PHB üretiminde en çok kullanılan *Alcaligenes eutrophus* mutant suşu minimal besiyerinde geliştirilmesiyle % 80 (Holmes, 1985), *Azotobacter vinelandii* UWD mutant suşundan ise %75 (Page ve Knosp, 1989) verim elde edilmiştir. Bu iki mutant suşu KYT1 izolat 1 ile karşılaştırdığımızda elde ettiğimiz PHB miktarının % 22-27 daha az olduğu görülmektedir. Brandl ve arkadaşları (1998) yaptıkları çalışmada *Pseudomonas oleovorans* bakterisinin hücre kuru ağırlığının %49'u kadar PHB ürettiğini tespit etmiştir (Ediz ve Beyatlı, 2005). Yapılan diğer araştırmalarda ise bazı *Bacillus* türlerinin hücre içinde %50'den fazla polimer biriktirdiği bildirilmektedir (Chen ve ark., 1991; Ediz ve Beyatlı, 2005). *Pseudomonas oleovorans* ve *Bacillus* türlerinin PHB üretim oranları ise KYT1 izolat 1 ile hemen hemen aynıdır. Maksimum PHB üretimi için oluşturulan rekombinant *E.coli* suşlarının minimal besiyerinde fermentasyonu sonunda %90 oranında PHB üretilmiştir (Kim ve ark., 1992; Lee ve ark., 1994; Lee, 1996). KYT1 İzolat 1'in PHB verimi rekombinant *E.coli* suşundan ise %37 daha düşüktür.

Bu tez çalışmasında kullanılan halofilik Arke izolatlarından KYT1 İzolat 1 ve KYT1 İzolat 2, Kayacık Tuzlası'ndan, TG4 İzolat 1 ve TG6 İzolat 2 Tuz Gölü'nden, TK1 İzolat 1 Tuzköy Tuz Madeninden izole edilmiştir. Kullanılan halofilik arke suşlarından en yüksek verimi KYT1 İzolat 1 göstermiştir. KYT1 izolat 1 mısır nişastalı besiyerinde %53,14 oranında PHB biriktirmiştir. Lillo ve Valera (1990) *Haloferax mediterranei* türüyle yapmış olduğu çalışmada % 60 oranında PHB verimi elde etmiştir. Diğer bir araştırmada ise Mısır'ın Aswan kenti yakınlarındaki aşırı tuzlu topraklardan izole edilen halofilik arke olan İzolat 40'ın aşırı karbon kaynağı bulunan besiyerinde % 53 oranında PHB biriktirdiği bulunmuştur (Hezayen ve ark., 2000). Bu oranlar KYT1 izolat 1'in ürettiği PHB miktarıyla hemen hemen aynıdır.

PHB üretiminde maliyeti etkileyen en önemli faktör kullanılan karbon kaynağıdır. Bu amaçla yaptığımız çalışmada mısır nişastası, sakkaroz, peynir altı suyu, kavun artığı, elma artığı ve domates artığı gibi düşük maliyetli karbon kaynakları kullanılmıştır. Huang ve arkadaşları (2006) besiyerinde karbon kaynağı olarak pirinç kepeği ve mısır nişastası karışımı kullanarak *Haloferax mediterraneii* (ATCC 33500) hücrelerinden % 55,6 oranında PHB üretmiştir.

Yaptığımız çalışmada en fazla verim KYT1 İzolat 1'den elde edilmiştir. Kantitatif olarak ürettiği PHB miktarı tayin edilen KYT1 İzolat 1'in PHB üretimi yapılan transmission elektron mikroskobu incelemeleriyle teyit edilmiş ve PHB granülleri Şekil.IV.4 deki gibi görülmüştür.

BÖLÜM V

SON DEĞERLENDİRMELER VE ÖNERİLER

Halofilik arkelerde PHB biriktirilmesiyle ilgili çalışmalar ilk kez 1985 yılında Valera (Castillo ve ark., 1985) tarafından yapılmıştır, araştırmacı *Haloferax mediterranei* üzerinde yaptığı çalışmada sınırlı miktarda fosfat bulunan besiyerinde inkübe edilen hücrelerin daha fazla miktarda PHB biriktirdiğini göstermiştir.

Halofilik arkeler PHB'nin ticari üretiminde henüz kullanılmıyor olsalar da, *Alcaligenes europaus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* türleri gibi organizmalarda olmayan bazı avantajları vardır (Oren, 2002). Birincisi, haloarke aşırı tuzlu ortamda optimal büyüme gösteren ekstrem bir arke grubu olduğundan hücre büyümesi ve PHB birikimi için tuz konsantrasyonu %22'nin (w/v) üstünde olması gerekmektedir (Han ve ark., 2007; Quillaguaman ve ark., 2009). Böyle yüksek tuz konsantrasyonunda halofilik olmayan mikroorganizmaların büyümesi engellenir ve dolayısıyla katı steril koşullar olmadan mikrobiyal kontaminasyon riskinin, fermantasyon ve besiyerinin hazırlanmasında kullanılan ekipmanların sterilizasyonu için gerekli enerjinin azaltılması sağlanır. Ayrıca organizmanın genomik kararlılığının yüksek olması ve kontaminasyon riskinin azalması önemli bir kazançtır (Oren, 2002). Bu da PHB üretim maliyetini önemli derecede etkiler. Yine de işlem maliyetini azaltmak, ekolojik sakıncaları en aza indirmek ve fermantasyon sonrasındaki atıkları bertaraf etmek için besiyerindeki tuzlar konsantre edilmeli ve geri dönüştürülmelidir (Quillaguaman ve ark., 2009). Diğer yandan tuz geniş ölçekli fermentörlerde kullanılan paslanmaz çeliğe zarar verebilir. Bu durum laboratuvar ortamında polietere keton, cam ve silisyum nitrat seramiklerinden yapılan biyoreaktörlerin kullanımıyla engellenmiştir (Hezayen ve ark., 2000). *Bacillus* türlerinin melas gibi ucuz karbon kaynaklarında hızlı bir şekilde gelişmesine rağmen, hücre duvarlarının kalın olması nedeniyle

yüksek sıcaklık ve osmatik basınca dayanıklılığı PHB ekstraksiyon işlemini zorlaştırmaktadır (Ediz ve Beyatlı, 2005). Haloarke suşları ise distile suda kolayca patladıkları için polimerin üretim süreci boyunca saflaştırılması daha basittir. Organik çözücülerin yüksek miktarda kullanımına gerek yoktur. Hücrelerin suyla temas etmesi hipoosmatik şoka neden olur bu da polimerin kolayca saflaştırılmasına yardım ederek %40 oranında izolasyon ve saflaştırma maliyetlerinin düşmesini sağlar. (Choi ve Lee, 1999; Han ve ark., 2007; Ventosa ve Nieto, 1995). *Haloferax mediterraneii* suşunun peynir altı suyu gibi ucuz karbon kaynağı kullanılmasıyla üretilen 1 kg P(3HB-co3-HV) kopolimerinin maliyeti 2.82 € olarak hesaplanmıştır (Koller ve ark., 2007b). *Haloferax mediterraneii* suşuyla üretilen polimerin maliyeti, rekombinant *E.coli* suşuyla üretilenden (4.0 €) oldukça düşüktür (Reddy ve ark., 2003; Koller ve ark., 2007b). Halofilik arkelerin metabolik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına dayanan üretim stratejileri mevcut sürecin daha da ilerlemesine neden olabilir (Quillaguaman ve ark., 2009). Diğer önemli avantajı ise PHB sentezinde nişasta gibi bazı ucuz karbon kaynakları kullanılarak üretim maliyetinin düşürülebilmesidir.

KAYNAKLAR

- [1] Anderson, A.; Dawes E.: "Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates", *Microbiol. Rev.*, 54 (1990) 450-472.
- [2] Avella, M.; La Rota, G.; Maruscelli, L.; Ramio, M.: "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and wheat straw fibre composites: thermal, mechanical properties and biodegradation behaviour", *J. Mater. Sci.*, 35 (2000) 829-836.
- [3] Ballard, D.G., H.; Holmes, P.A.; Senior, P.J.: "Formation of polymers of β -hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state", *Reidel (Kluwer) Publishing Co.*, 215 (1987) 239-253.
- [4] Bissery, M.C.; Valeriote, F.; Thies, C.: "Therapeutic efficacy of CCNU-loaded microspheres prepared from poly(D,L)lactide (PLA) or poly- β -hydroxybutyrate (PHB) against Lewis lung (LL) carcinoma", *Proc. Am. Assos. Cancer Res.*, 26 (1985) 355-355.
- [5] Bohmert, K.; Balbo, I.; Tischendorf, G.; Steinbüchel, A.; Willmitzer, L.: "Constitutive expression of the beta-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants", *Plant. Physiol.*, 128 (2002) 1282-1290.
- [6] Bourque, D.;Pomerleau, Y.;Groleau, D.: "High-cell-density production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*: production of high-molecular-mass PHB", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44 (1995) 367-376.
- [7] Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W.; Fuller, R.C.: "*Pseudomonas oleovorans* as a carbon source of poly(3-hydroxyalkanoates) for

- potential applications as biodegradable polyesters”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1988) 1977-1982.
- [8] Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W.; Lloyd, R.; Fuller, R.C.: “The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*” *Arch. Microbiol.*, 155 (1991) 337-340.
 - [9] Braunegg, G.; Lefebvre, G.; Genser, K.F.: “Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects”, *J. Biotechnol.*, 65 (1998) 127-161.
 - [10] Braunegg, G.; Bona, R.; Koller, M.: “Sustainable polymer production”, *Polym.-Plast. Technol.*, 43 (2004) 1779-1793.
 - [11] Brophy, M.R.; Deasy, P.B.: “In vitro and in vivo studies on biodegradable polyester microparticles containing sulphamethizole”, *Int. j. Pharm.*, 29 (1986) 223-231.
 - [12] Byrom, D.: “Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics”, *Trends Biotechnol.*, 5 (1987) 246-250.
 - [13] Carr, N.G.: “The occurrence of poly-beta-hydroxybutyrate in the blue-green alga *Chlorogloea fritschii*”, *Biochim. Biophys. Acta.*, 120 (1966) 308-310.
 - [14] Castillo, R.F.; Valera, F.R.; Ramos, J.G.; Berraquero, F.R.: “Accumulation of poly(β -hydroxybutyrate) by Halobacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51 (1985) 214-216.
 - [15] Chen, G.Q.; König, K.H.; Lafferty, R.M.: “Occurrence of poly-D-(-)-3-hydroxyalkanoates in genera *Bacillus*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 84 (1991) 173-176.
 - [16] Chen, G.Q.: “Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates, Microbial PHA Production from Waste Raw Materials”, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and*

Applications, Springer Heidelberg Dordrecht, 1st Edition; New York, USA, 14 (2010) 27-294.

- [17] Choi, J.; Lee, S.Y.: "Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 (1999) 13-21.
- [18] Cornibert, J.; Marchessault, R.H.: "Physical properties of poly- β -hydroxybutyrate: IV. Conformational analysis and crystalline structure", *J. Mol. Biol.*, 71 (1972) 735-756.
- [19] Dave, H.; Ramakrishna, C.; Desai, J.D: "Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp", *Ind. J. Exp. Biol.*, 34: (1996) 216-219.
- [20] Davis, J.B.: "Cellular lipids of a *Nocardia* grown on propane and *n*-butane", *Appl. Microbiol.*, 12 (1964) 301-304.
- [21] Dawes, J.B.; Senior, P.J.: "The role and regulation of energy polymers in microorganism", *Adv. Microb. Physiol.*, 19 (1973) 135-278.
- [22] Doi, Y.; Kunioka, M.; Nakamura, Y.; Soga, K.: "Magnetic resonance studies on poly(beta-hydroxybutrate) and a copolyester of beta-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16", *Macromolecules*, 19 (1986) 2865-2871.
- [23] Dunlop, W.F.; Robards, A.W.: "Ultrastructural study of poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus*", *J. Bacteriol.*, 114 (1973) 1271-1280.
- [24] Ediz, N.; Beyatlı, Y.: "*Bacillus* cinsi bakteriler tarafından biyoplastik üretimi", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*", 03 (2005) 1-22.
- [25] Ellar, D.; Lundgren, D.G.; Okamura, K.; Marchessault, R.H.: "Morphology of poly- β -hydroxybutyrate granules", *J. Mol. Biol.*, 35 (1968) 489-502.

- [26] Environment and Plastics Industry Council: “Biodegradable polymers: A review”, (2000) 1-11
- <http://www.plastics.ca/EnvironmentalSustainability/AnitLitter/index.php/pdf/BIODEGRADEABLE%20POLYMERS%20A%20REVIEW%2024%20Nov.%202000.%20Final.PDF>
- (22.10.2009)
- [27] Gao, Y.; Kong, L.; Zhang, L.; Gong, Y.D.; Chen, G.Q.; Zhao, N.M.; Zhang, X.F.: “Improvement of mechanical properties of poly(DL-lactide) films by blending of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate)”, *Eur. Polym J.*, 42 (2006) 764-775.
- [28] Gavrilescu, M.; Chisti, Y.: “Biotechnology: A sustainable alternative for chemical industry”, *Biotechnol. Adv.*, 23 (2005) 471-499.
- [29] Gould, P.L.; Holland, S.J.; Tighe, B.J.: “Polymers for biodegradable medical devices: 4-hydroxybutyrate valerate copolymers as nondisintegrating matrices for controlled-release oral dosage forms”, *Int. J. Pharm.*, 38 (1987) 231-237.
- [30] Grant, W. D.; Kamekura, M., McGinity, T. J.; Ventosa, A.: “Class III. *Halobacteria* class. nov.”, *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition.; Boone, D. R.; Castenholz; R. W.; Garrity, G. M. Editors., Springer-Verlag, New York, USA, 1 (2001) 294.
- [31] Grant, W. D.; Larsen, H.: “Extremely Halophilic Archaeobacteria Order *Halobacteriales* ord. nov.”, *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Staley, J.T; Bryant, M.P.; Pfennig, N.; Holt, J.G. Editors, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, (2001) 2216-2233.
- [32] Han, J.; Lu, Q.; Zhou, L.; Zhou, J.; Xiang, H.: “Molecular characterization of the *phaEC_{Hm}* genes, required for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon

Haloarcula marismortui”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (2007) 6058-6065.

- [33] Hezayen, F.F.; Rehm, B.H.A.; Eberhardt, R.: “Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion-resistant bioreactor”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54 (2000) 319-325.
- [34] Hezayen, F.F.; Steinbüchel, A.; Rehm, B.H.A.: “Biochemical and enzymological properties of the polyhydroxybutyrate synthase from the extremely halophilic archaeon strain 56”, *Arch. Biochem.*, 403 (2002a) 284-291.
- [35] Holmes, P.A.: “Application of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic”, *Phys. Technol.*, 16 (1985) 32-36.
- [36] Howells, E.R.: “Opportunities in biotechnology for the chemical industry”, *Chem. Ind.*, 8 (1982) 508-511.
- [37] Huang, T.Y.; Duan, K.J.; Huang, S.Y.; Chen, C.W.: “Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33 (2006) 701-706.
- [38] Irvine, D.: “Molecular principles of biomaterials”, *Biodegradable Polymeric Solids* (2006) 1-27,
http://ocw.mit.edu/NR/rdonlyres/Biological-Engineering/20-462JSpring-2006/20D152B0-8058-4FDB-BFD3-B6DC0746C9FB/0/lec1_clean.pdf
 (31.12.2009)
- [39] Jendrossek, D.; Handrick, R.: “Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates”, *Annu. Rev. Microbiol.*, 56 (2002) 403-432.
- [40] Jones, W.J.; Nagle, D.P.; Whitman, W.B.: “Methanogens and Diversity of Archaeobacteria”, *Microbiol. Rev.*, (1987) 135-177.

- [41] Kadouri,D.; Jurkevitch, E.; Okon, Y.:“Ecological and agriculture significance of bacterial polyhydroxyalkanoates”, *Crit. Rev. Microbiol.*, 31 **(2005)** 55-67.
- [42] Kanan, L.V.; Rehacek, Z: “Formation of poly-beta-hydroxybutyrate by Actinomycetes”, *Indian J. Biochem.*, 7 **(1970)** 126-129.
- [43] Kates, M.; Kushwaha, S.C.; Sprott, G.D.: “Lipids of Purple Membrane from Extreme Halophilise and of Methanogenic Bacteria”, *Method Enzymol.*, 88 **(1982)** 98-111.
- [44] Kato, N.; Konishi, H.; Shimao, M.; Sakazawa, C.: “Production of 3-hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124”, *J. Ferment. And Bioeng.*, 73 **(1992)** 246-247.
- [45] Khanna, S.; Srivastava, A.K: “Recent advances in microbial polyhydroxyalkanotes”, *Process Biochem.*, 40 **(2004)** 607-619.
- [46] Kim, B.S.; Lee, S.Y.; Chang, H.N.: “Production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*”, *Biotechnol. Lett.*, 14 **(1992)** 811-816.
- [47] Kirk, R.G.; Ginzburg, M.: “Ultrastructure of Two Species of Halobacterium”, *J. Ultrastruct. Rest.*, 41 **(1972)** 80-94.
- [48] Koller, M.;Hess, P.J.; Bona, R.; Kutschera, C.; Atlic, A.; Braunegg, G.: “Biosynthesis of High Quality Polyhydroxyalkanoate co- and Terpolyesters for Medical Application by the Archaeon *Haloferax mediterranei*, *Macromol. Symp.*, 253 **(2007b)** 33-39.
- [49] Kunze, C.; Bernd, H.E.; Androsch, R.; Nischan, C.; Freier, T., Kramer, T.; Kramp, B.; Schmitz, K.P.: “In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly(3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material”, *Biomaterials*, 27 **(2006)** 192-201.

- [50] Law, J.H.; Slepecky, R.A.: "Assay of polyhydroxybutyric acid", *J. Bacteriol.*, 82 (1961) 33-36.
- [51] Lee, M.S.; Park, W.H.: "Compatibility and thermal properties of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(glycidyl methacrylate) blends", *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 40 (2002) 351-358.
- [52] Lee, S.Y.; Lee, K.M.; Chang, H.N.: "Production of Poly(β -hydroxy butyric acid) by recombinant *Escherichia coli*", *Ann. NY Acad. Sci.*, 721 (1994) 43-53.
- [53] Lee, S.Y.; Lee, K.M.; Chang, H.N.; Steinbüchel, A.: "Comparison of *Escherichia coli* Strains for synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes", *Biotechnol. Bioeng.*, 44 (1994) 1337-1347.
- [54] Lee, S.Y.: "Bacterial polyhydroxyalkanoates", *Biotechnol. Bioeng.*, 49 (1996) 1-14.
- [55] Lemoigne, M.: "Produits de déshydratation et de polymerization de l'acid β -oxybutyrique", *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 8 (1926) 770-782.
- [56] Lillo, J.G.; Valera, F.R.: "Effects of culture conditions on poly(β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (1990) 2517-2521.
- [57] Luengo, J.M.; Garcia, B.; Sandoval, A.: "Bioplastics from microorganisms", *Current Opinion in Microbiology*, 6 (2003) 251-260.
- [58] Macrae, R.M.; Wilkinson, J.F.: "Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*", *J. Gen. Microbiol.*, 19 (1958a) 210-222.
- [59] Macrae, R.M.; Wilkinson, J.F.: "The influence of cultural conditions on poly- β -hydroxybutyrate synthesis in *Bacillus megaterium*", *Proc. R. Phys. Soc. Edin.*, 27 (1958b) 73-78.

- [60] Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Dunlop, P.V.; Clarck, D.P.: “Brock Biology of Microorganisms”, 12th Edition, Pearson Education International, San Francisco, USA, **(2009)**.
- [61] Madison, L.L; Huisman, G.W.: “Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastics”, *Mic. Mol. Bio. Reviews*, 63 **(1999)** 21-53.
- [62] McInerney, M.J.; Bryant, M.P.; Hespell, R.B.; Costerton, J.W.: “*Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. Nov., an anaerobic , syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 **(1981)** 1029-1039.
- [63] Miertus, S.; Sivasamy, A.; Foransiero1,P.; Zinoviev, S.; Langer, F.M.; Thraen, D.; Vogel, A.: “Technologies for biofuel production”, *Pure & Applied Chemistry Area ICS-UNIDO*, (2007) 1-14, www.ics.trieste.it (31.12.2009)
- [64] Munson, M.A.; Nedwll, D.B.; Embley, T.M.: “Phylogenetic Diversity of Archaea in Sediment Samples from Coastal Salt Marsh”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 **(1997)** 4729-4733.
- [65] Oeding, V.; Schlegel, H.G.: “Beta-ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism”, *Biochem. J.*, 134 **(1973)** 239-248.
- [66] Oren, A.: “The Ecology of the Extremely Halophilic Archaea”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 13 **(1994a)** 415-440.
- [67] Oren, A.: “Cellular Structure of Halophilic Microorganism”, *Halophilic Microorganism and Their Enviroments*, Kluwer Academic Publishers, **(2002)** 363-365.
- [68] Page, W.J.; Knops, O.: “Hyperproduction of poly- β -hydroxyutryate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 **(1992)** 1334-1339.

- [69] Poirier, Y.; Nawrath, C.; Somerville, C.: “production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers. In bacteria and plants”, *Biotechnol.*, 13 (1995) 142-150.
- [70] Pouton, C.W.; Akhtar, S.: “Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential drug delivery”, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 18 (1996) 133-162.
- [71] Pringsheim, E.G.; Wiessner, W.: “Minimum requirement for heterotrophic growth and reserve substance in *Beggiatoa*”, *Nature*, 197 (1963) 102.
- [72] Purushothaman, M.; Anderson, R.; Narayana, S.; Jarayaman, V.: “Industrial byproducts as cheaper medium components influencing the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) –biodegradable plastics”, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 24 (2001) 131-136.
- [73] Quillaguaman, J.; Guzman, H.; Thuoc, D.V.; Kaul, R.H.: “Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85 (2010) 1687-1696.
- [74] Reddy, C.S.K.; Ghai, R.; Rashmi, X.; Kalia, V.: “Polyhydroxyalkanoates: An overview”, *Bioresource Technol.*, 87 (2003) 137-147.
- [75] Rehm, B.H.A.; Krüger, N.; Steinbüchel, A.: “A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis”, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 24044-24051.
- [76] Rehm, B.H.A.: “Polyester synthases: natural catalysts for plastics”, *Biochem. J.*, 376 (2003) 15-33
- [77] Schlegel, H.; Gottschalk, G.; von Bartha, R.: “Formation and Utilization of Poly-beta-hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*)”, *Nature*, 191 (1961) 463-465.

- [78] Shirakura, Y.; Fukui, T.; Satio, T.; Okamoto, Y.; Narikawa, T.; Koide, K.: “Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1”, *Biochim. Biophys. Acta.*, 880 (1986) 46-53.
- [79] Silva, L.F.; Taciro, M.K.; Michelin Ramos, M.E.; Carter, J.M.; Pradella, J.G.C.; Gomez, J.G.C.: “Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria from Xylose, Glycose, Sugar Cane Bagasse hydrolysate”, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31 (2004) 245-254.
- [80] Solaiman, D.K.Y.; Ashby, R.D.; Foglia, T.A.; Marmer, M.N: “Conversion of Agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates)”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 71 (2006) 783-789.
- [81] Spring, S.; Ludwing, W.; Marquez, M.C.; Ventosa, A.; Schleifer, K.H.: “*Halobacillus* Gen.nov., with Description of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov. and Transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov.”, *Int J Syst Bacteriol*, 46 (1996) 492-496.
- [82] Steinbüchel, A.; Fuchstenbusch, B.: “Bacterial and Other Biological Systems for Polyester Production”, *Trend. Biotechnol.*, 16 (1998) 419-427.
- [83] Stoeckenius, W.: “The Rhodopsin-Like Pigments of Halobacteria: Light Energy and Signal Transducers in an Archaeobacterium”, *Biochem. Sci.*, 10 (1985) 483-486.
- [84] Tabandeh, F.; Vasheghani-Farahani, E.: “Biosynthesis of Poly- β -hydroxybutyrate as a Biodegradable Polymer”, *Iran. Polym. J.*, 12 (2003) 37-42.
- [85] Tanaka, K.; Katamune, K.; Ishizaki, A.: “Fermentative production of poly-Beta- hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*”, *Biotechnol. Lett.*, 15 (1993) 1217-1222.

- [86] Tanio, T.; Fukui, T.; Shirakura, Y.; Tomita, K.; Kaiho, T.; Masamune, S.; Saito, T.: "An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) by poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*", *Eur. J. Biochem.*, 124 (1982) 71-77.
- [87] Tonosaki, A.; Tokunaga, F.; Washioka, H.; Kataoka, M.; Hisatomi, O.: "Fine Structure of the Red Membrane of *Halobacterium halobium* (R1)", *Biomed. Res.*, 5 (1984) 1-8.
- [88] Trotsenko, Y.A.; Belova, L.L.: "Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria", *Microbiol.*, 69 (2000) 635-645.
- [89] Valera, F.R.; Berraquero, F.R.; Cormenzana, A.R.: "Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations", *Microbial Ecology*, 7 (1981) 235-243.
- [90] Valera, F.R.: "*In Halophilic Bacteria*", CRS Pres, Baco Raton, Florida, 1-2 (1988)
- [91] Vandamme, P.; Coenye, T.: "Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (2004) 2285-2289.
- [92] Vaneechoutt, M.; Kampfer, P.; De Baere, T.; Falsen, E.; Verschraegen, G.: "*Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii*", 54 (2004) 317-327.
- [93] Ventosa, A.; Nieto, J.J.: "Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms", *World J. Microb. Biot.*, 11 (1995) 85-94.

- [94] Verlinden, R.A.J.; Hill, D.J.; Kenward, M.A.; Williams, C.D.; Radecka, I.: "Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates", *J. Appl. Microbiol.*, 102 (2006) 1437-1449.
- [95] Vreeland, R.H.: "Taxonomy of Halophilic Bacteria", *In the Biology of Halophilic Bacteria*, CRS Pres, Baco Raton, Florida, (1993) 105-134.
- [96] Weiner, R.M.: "Biopolymers from marine prokaryotes", *Trend. Biotechnol.*, 15 (1997) 390-394.
- [97] Yılmaz, M.; Beyatlı, Y.: "Biyoplastik: Poli- β -hidroksibütirat (PHB)", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 01 (2003) 1-33.
- [98] Zhang, H.; Obias, V.; Gonyer, K.; Dennis, D.: "Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains", *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (1997) 1198-1205.

ÖZGEÇMİŞ

29.01.1983 tarihinde İstanbul'da dünyaya geldim. Lise eğitimimi Davutpaşa Lisesi'nde tamamladım. 2000 yılında Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım ve 2005 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2008 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı Biyokimya Bölümü'nde yüksek lisans eğitimime başladım ve halen yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.