

**RHİZOBİUM BAKTERİLERİ İLE
POLİ- β -HİDROKSİBÜTİRİK ASİT
ÜRETİMİ**

**Nilüfer DOMBAYCI
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül 2001**

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.
Proje No: 99 10.44**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nilüfer DOMBAYCI'nın "*Rhizobium* Bakterileri ile Poli- β -Hidroksibütirik Asit Üretimi" başlıklı Genel Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi.03.10.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Merih KIVANÇ	
Üye	: Doç. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	: Yrd.Doç.Dr. Nalan YILMAZ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03.10.2004 tarih ve30/2..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Orhan ÖZER
Fen Bilimleri Enstitüsü
MÜDÜRÜ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Rhizobium Bakterileri ile
Poli- β -Hidroksibütirik Asit
Üretimi

NİLÜFER DOMBAYCI

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Merih KIVANÇ

2001, 63 sayfa

Ülkemizde ve dünyada petrolden elde edilen plastikler, kullanımdan sonra atık olarak terk edilmesiyle önemli çevre sorunlarına yol açmaktadır. Bu çevresel endişelere cevap olarak biyoparçalanabilir materyal kullanımı başlamıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen materyallerden biri olan Poli- β -hidroksibütirik asit (PHB) geleneksel plastiklerin birçok özelliklerine sahiptir. PHB birçok mikroorganizmada dengesiz büyüme koşullarında doğal olarak sentezlenmekte ve karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, baklagil bitkilerinin kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* bakterileri ile çalışılmıştır. *Rhizobium* bakterilerinin PHB üretimleri incelenmiş ve %4.44-27.8 arasında verim bulunmuştur. Yüksek verim elde edilen 5 suş seçilerek farklı karbon ve azot kaynaklarındaki verimleri incelenmiş ve karbon kaynaklarında %10-27.8, azot kaynaklarında ise %10-17.7 arasında verim elde edilmiştir. Bu 5 suştan R15 ve R17'nin en yüksek verim alındığı karbon ve azot kaynakları seçilerek farklı çalkalama hızlarında denenmiş ve %21,6 ile 28,7 arasında verim elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Poli- β -hidroksibütirik asit, *Rhizobium*

ABSTRACT**Master of Science Thesis****Production of Poly- β -Hydroxybutyric Acid by *Rhizobium* sp.****NİLÜFER DOMBAYCI****Anadolu University****Graduate School of Natural and Applied Sciences****Biology Program****Supervisor: Prof. Dr. Merih KIVANÇ****2001, 63 pages**

The plastics which are produced from petroleum cause serious environmental problems when they left after use as waste all over the world and in our country. As an answer for this environmental anxiety, the usage of biodegradable materials are in use. Poly- β -hydroxybutyric acid (PHB), one of the biodegradable materials, has many characteristics of traditional plastics. PHB was synthesized in many microorganisms at unbalanced growing conditions naturally and used as carbon and energy source.

In this thesis, *Rhizobium* bacteria that was isolated from nodule of leguminous plant root was used. PHB production of *Rhizobium* bacteria was studied and yield was obtained as between 4,44-27,8%. Yield at different carbon and nitrogen sources was detected with the usage of 5 strains and high yield was obtained as between 10-27,8% at carbon sources, 10-17,7% at nitrogen sources. From these 5 strains, carbon and nitrogen sources that have the highest yield of R15 and R17 strains are choosen. Different shaking velocities were tried and yields were obtained between 21,6-28,7%.

Key Words: Poly- β -hydroxybutyric acid, *Rhizobium*

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminde yardımcı olan, araştırmalarım boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam sayın Prof. Dr. Merih KIVANÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezim boyunca bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'ya, bilgilerinden yararlandığım Doç. Dr. Kıymet GÜVEN ve Yrd. Doç. Dr. Nalan YILMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda literatürlerinden ve bilgilerinden yararlandığım hocalarım Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Yavuz BEYATLI, Doç. Dr. Belma ASLIM, Zehra MUMCU, Nazime MERCAN, Osmangazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünden Majied NOURBAKHS, Eskişehir Tarımsal Araştırma Enstitüsünden Sabri ÇAKIR'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında bana maddi ve manevi destek veren tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman bana destek olan, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Poli- β -Hidroksibütirik Asit (PHB) Granülleri.....	2
1.2. PHB Granüllerinin Morfolojisi.....	4
1.3. PHB'nin Fiziksel Özellikleri.....	6
1.4. PHB'nin Çözelti Özellikleri.....	7
1.5. PHB Sentezleyen Mikroorganizmalar.....	7
1.6. Organizma ve Substrat Seçimi.....	8
1.7. PHB'nin Boyama Reaksiyonu.....	9
1.8. PHB'nin Biyosentezi.....	10
1.9. PHB/PHA Oluşumunun Önemi.....	12
1.10. PHA'ları Üretme Koşulları.....	13
1.11. PHB'nin Endüstriyel Üretimi.....	14
1.12. <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin Genel Özellikleri.....	15
1.13. <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin PHB Üretimleri.....	17
1.14. Diğer Bakterilerle PHB Üretimi.....	18
1.15. PHB'nin Biyolojik Olarak Parçalanması.....	19
1.16. PHB ve Diğer PHA'ların Uygulama Alanları.....	21
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	24
2.1 Materyal.....	24

2.1.1. <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin İzole Ediliği Bitkilerin Toplandığı Yerler	24
2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	25
2.1.2.1. Yeast Extract Mannitol (YEM) Besiyeri.....	25
2.1.2.2. <i>Rhizobium</i> İçin Modifiye Edilmiş YEM Besiyeri.....	25
2.1.2.3. PHB Standardı.....	26
2.1.2.4. Kristal Viyole Çözeltisi.....	26
2.1.2.5. İyot (Lugol) Çözeltisi.....	26
2.1.2.6. Safranin Çözeltisi.....	26
2.1.2.7. Litmus Milk.....	26
2.1.2.8. Kongo Kırmızısı İçeren Besiyeri.....	27
2.1.2.9. Bromtimol Mavisi İçeren Besiyeri.....	27
2.1.2.10. MOPS Tuzları (MS) Ortamı.....	27
2.1.2.11. İdentifikasyon Testleri İçin Kullanılan Şekerler.....	28
2.1.2.12. %2'lik NaCl İçeren YEM Besiyeri.....	28
2.1.2.13. Farklı Karbon Kaynaklarının Denenmesinde Kullanılan Şeker Çeşitleri.....	29
2.1.2.14. Farklı Azot Kaynaklarının Denenmesinde Kullanılan Fermentasyon Ortamı.....	29
2.1.2.15. Farklı Azot Kaynaklarının Denenmesinde Kullanılan Azot Çeşitleri.....	30
2.1.2.16. Farklı Çalkalama Hızlarının Denenmesinde Kullanılan Fermentasyon Ortamı.....	30
2.1.2.17. 2N HCl Hazırlanması.....	31
2.2. Yöntem.....	32
2.2.1. <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin İzolasyonu.....	32
2.2.2. PHB Standardının Hazırlanması.....	32
2.2.3. PHB Üretim Yöntemi.....	33
2.2.4. İdentifikasyon Testleri.....	34
2.2.4.1. Gram Boyama.....	34
2.2.4.2. Kongo Kırmızısı İçeren Besiyerinde Gelişme.....	34
2.2.4.3. Bromtimol Mavisi İçeren Besiyerinde Gelişme.....	34

2.2.4.4. Farklı pH'da Gelişme.....	35
2.2.4.5. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme.....	35
2.2.4.6. Litmus Milk Besiyerinde Asit Reaksiyon.....	35
2.2.4.7. Penisiline Direnç.....	35
2.2.4.8. Şekerlerin Kullanımı.....	35
2.2.4.9. Hareketlilik.....	36
2.2.4.10. %2'lik NaCl İçeren YEM Besiyerinde Gelişme.....	36
2.2.5. Farklı Karbon Kaynaklarının PHB Miktarına Etkisinin Denenmesi.....	36
2.2.6. Farklı Azot Kaynaklarının PHB Miktarına Etkisinin Denenmesi.....	37
2.2.7. Farklı Çalkalama Hızlarının PHB Miktarına Etkisinin Denenmesi.....	37
2.2.8. Hesaplamalar.....	38
2.2.8.1. Kuru Hücre Ağırlığının (KHA) g/lit Olarak Hesaplanması.....	38
2.2.8.2. PHB'nin g/lit Olarak Hesaplanması.....	38
2.2.8.3. % Verim Hesaplanması.....	38
3. BULGULAR.....	39
3.1. PHB Standardının Belirlenmesi.....	39
3.2. İzole Edilen Örneklerin PHB Üretimlerinin Belirlenmesi.....	39
3.3. İdentifikasyon Testleri.....	41
3.3.1. Gram Boyama.....	41
3.3.2. Kongo Kırmızısı İçeren Besiyerinde Gelişme.....	41
3.3.3. Bromtimol Mavisini İçeren Besiyerinde Gelişme.....	41
3.3.4. Farklı pH'da Gelişme.....	41
3.3.5. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme.....	41
3.3.6. Litmus Milk Besiyerinde Asit Reaksiyon.....	42
3.3.7. Penisiline Direnç.....	42
3.3.8. Şeker Kullanımı.....	42
3.3.9. Hareketlilik.....	42

3.3.10. %2'lik NaCl İçeren Besiyerinde Gelişme.....	42
3.4. Farklı Karbon Kaynaklarında Geliştirilen <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin PHB Verimlerinin Belirlenmesi.....	44
3.5. Farklı Azot Kaynaklarında Geliştirilen <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin PHB Verimlerinin Belirlenmesi.....	46
3.6. Farklı Çalkalama Hızlarında Geliştirilen <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin PHB Verimlerinin Belirlenmesi.....	48
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	50
5. KAYNAKLAR.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Anormal büyüme koşulları ve PHA (Poli- β -hidroksialkonat), PHB (Poli- β -hidroksibütirat), PHV (Poli- β -hidroksivalerat) gibi intraselular depo materyallerinin mikrobiyal sentezi	3
1.2. PHA'ların temel yapısı	3
1.3. PHB'nin primer yapısı	5
1.4. PHB'nin biyosentezi ve parçalanma yol izi	11

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1 PHB'nin fiziksel özellikleri	6
1.2. PHB sentezleyen mikroorganizmalar	8
1.3. Rhizobia'nın son taksonomik sınıflandırılması	12
1.4. Çeşitli çevrelerde PHB'nin biyoparçalanması	20
2.1. <i>Rhizobium</i> bakterilerinin izole edildiği bitkilerin toplandığı yerler	24
2.2. PHB standardının hazırlanmasında kullanılan ana stok ve kloroform oranları	32
3.1. PHB standardı	39
3.2. Mannitol içeren fermentasyon ortamında geliştirilen <i>Rhizobium</i> bakterilerinin PHB verimleri	40
3.3. İdentifikasyon test sonuçları	43
3.4. R1 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki verimi	44
3.5. R4 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki verimi	44
3.6. R15 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki verimi	45
3.7. R17 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki verimi	45
3.8. R22 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki verimi	46
3.9. R1 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki verimi	46
3.10. R4 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki verimi	47
3.11. R15 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki verimi	47
3.12. R17 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki verimi	47
3.13. R22 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki verimi	48
3.14. R15 bakterisinin farklı çalkalama hızlarındaki verimi	48
3.15. R17 bakterisinin farklı çalkalama hızlarındaki verimi	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATP	: Adenozin tri fosfat
C	: Karbon
CoA	: Koenzim A
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EPS	: Ekzopolisakkarit
EPC	: Enantiomerik olarak saf bileşik
H	: Hidrojen
H₂O	: Su
HCl	: Hidroklorik asit
KHA	: Kuru hücre ağırlığı
L	: Latince
Mg	: Magnezyum
N	: Azot
Na	: Sodyum
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: Sodyum hidroksit
O₂	: Oksijen
P	: Fosfor
PHA	: Poli-β-hidroksialkonat (Poli-β-hidroksialkonoik asit)
PHB	: Poli-β-hidroksibütirik asit (Poli-β-hidroksibütirat)
PHV	: Poli-β-hidroksivalerat
PO₄⁻³	: Fosfat
RNA	: Ribonükleik asit
SO₄⁻²	: Sülfat
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü
UV	: Ultraviyole
YEM	: Yeast Extrakt Mannitol Besiyeri

cm	: Santimetre
cm³	: Santimetreküp
g	: Gram
ha	: Hektar
kg	: Kilogram
lt	: Litre
m²	: Metrekare
m³	: Metreküp
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Mili molar
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
rpm	: Dakika / devir
sp.	: Species (tür)
subsp.	: Subspecies (alt tür)
°C	: Santrigrat
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
µm	: Mikrometre
β	: Beta
+	: Pozitif
-	: Negatif
%	: Yüzde

1. GİRİŞ

20. yüzyılın ikinci yarısında büyük bir hızla hayatımıza giren plastikler günümüze kadar gittikçe artan bir hızla üretilmektedir. 1930 yılında kauçuk ve lifler hariç dünyada plastik üretiminin 100 000 ton olduğu, 1976 yılında bu miktarın 45 milyon tona ulaştığı ve 1976-1986 yılları arasında ise plastik tüketiminin her beş yılda bir ikiye katlandığı bildirilmiştir [1]. 1990'larda plastik üretiminin 140 milyon tona ulaştığı [2], 1998 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 2.5 milyar kg üretildiği ve tüketildiği tahmin edilmektedir [3]. Üretilen bu plastik malzemenin büyük çoğunluğu kullanımdan sonra fonksiyonunu kaybetmekte ve plastik atık olarak terk edilmektedir [2]. Petrol kökenli polimerik malzemelerin, doğada geride zararlı atıklar bırakmadan parçalanıp yok olmaları genellikle mümkün olmamaktadır. Bunun sonucu olarak uzun yıllardan beri kullanılmakta olan plastik poşet, şişe ve hastanelerde kullanılan polimer kökenli kan torbası, şırınga, eldiven vs. atıkların oluşturduğu dağlar, gelişmekteki ve gelişmiş ülkelerin çevre sorunlarının başında gelmektedir. Buna bağlı olarak toprağın, yer altı su kaynaklarının ve denizlerin kirlenmesi ise birçok ülkede üst düzeylerde olup doğal yaşam ve ekolojik dengeleri de ciddi boyutta sarsmaktadır [4].

Biyoparçalanmanın tarihi oldukça yenidir. Biyoparçalananan materyal kullanım çabaları esasen çevresel endişelere cevap olarak başlamıştır. 1988'de ABD'de üretilen plastiklerin 51 milyon poundun yaklaşık %30'u paketlemede kullanılmıştır. Atıkların okyanusa geniş ölçüde boşaltılması on yıldır devam etmektedir. Plastikler doğanın hücumuna karşı oldukça dirençlidir. Hem karada hem de denizde yabani yaşam tarafından plastiklerin yutulması bazen ölümle sonuçlanmaktadır [5].

Plastiklere karşılık, son derece yüksek molekül ağırlığının ve doğal olarak inert (etkisiz) olmasının saptanması ile kısa zamanda geniş ölçüde parçalanın yeni materyalleri sentezlemek mümkün olmuştur [5].

Endüstriyel polimerler ekseriyetle petrokimyasal esastır. Günlük kullanım için yapılmış eşyaların tümünü ya da bir kısmını kapsayan kumaşlar, zamklar (sakızlar), filmler, yapışkanlar ve astarların araştırılmasıyla yıllar

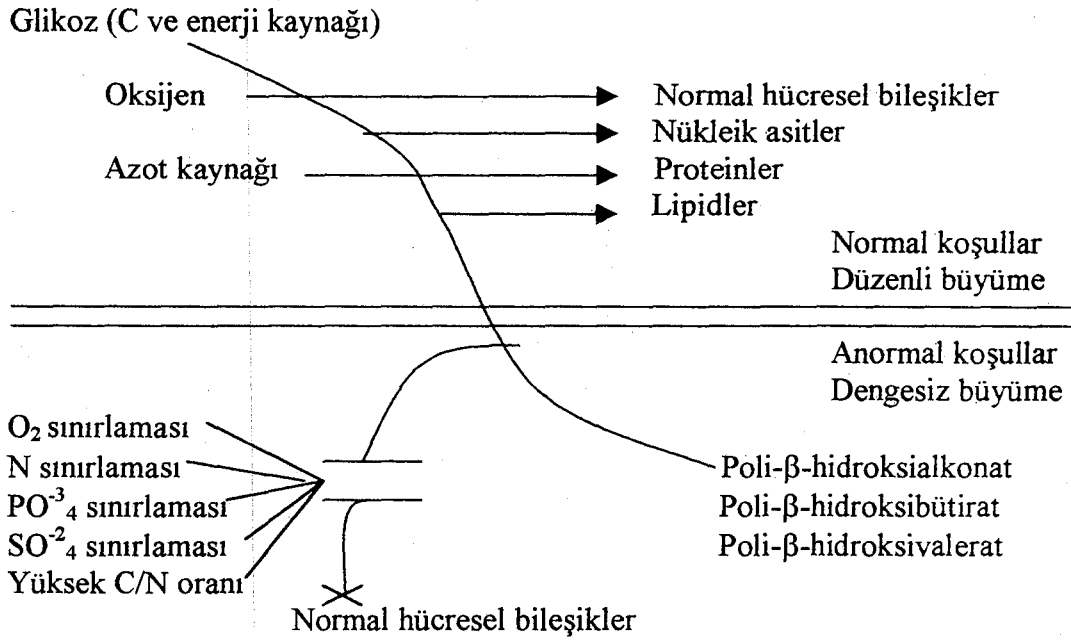
boyunca geliştirilmiştir. Plastiklerin iki önemli özelliği ucuz olarak ve çok büyük olarak üretilmesidir [6].

Petrolden elde edilen plastikler toprakta uzun süre parçalanmadığından çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu nedenle bu maddenin yerine, alternatif olarak parçalanabilen biyoplastik üretimi önem kazanmıştır. Bu çalışmada biyolojik olarak uyumlu, toksik olmayan, biyolojik olarak parçalanabilen ve ham maddelerinin ucuz olması gibi avantajlara sahip olan biyopolimerlerin üreticilerinden biri olan *Rhizobium* bakterileri baklagil bitkilerinin kök nodüllerinden izole edilerek poli- β -hidroksibütirik asit (PHB) üretim verimleri incelenmiştir.

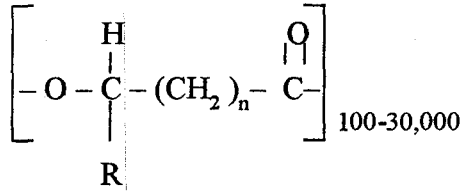
1.1. Poli- β -Hidroksibütirik Asit (PHB) Granülleri

Biyopolimerler genel sınıflandırmada polihidroksialkonat şeklinde bilinmektedir. Poli- β -hidroksialkonat granülleri birçok mikroorganizmada bulunan membranla çevrili en yaygın hücresel inklüzyonlardır. Bu depo materyalleri, dengesiz büyüme koşulları altında organizma tarafından sentezlenen biyoparçalanabilir bir termoplastiktir. Bu polimerler mikroorganizmada karbon ve enerji kaynağı olarak iş görmektedir [7-11]. Şekil 1.1'de bu koşullar verilmiştir.

Dengesiz büyüme koşulları ya özel bir makroelementin (C, H, N, O) ya da bir mikroelementin (P, Mg, vs.) tamamen olmadığı veya sadece optimum yoğunluğun altındaki yoğunluklarda bulunması halinde oluşmaktadır. PHA üretimi ayrıca karbon gibi özel bir elementin son derece yüksek yoğunlukta bulunduğu dengesiz büyüme koşulları ile şiddetli olarak teşvik edilebilmektedir. Bununla birlikte, protein ve/veya nükleik asitlerin sentezi ya nitrojenin yokluğundan dolayı ya da bir inhibitörün varlığı ile durdurulabilmektedir. Böylece ortamdaki yüksek bir C:N oranı, karbon içeren intraselular depo materyallerinin sentezlenme oranını geniş ölçüde arttırmaktadır [7]. PHA'ların temel yapısı Şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Anormal büyüme koşulları ve PHA (Poli-β-hidroksiakonat), PHB (Poli-β-hidroksibütirat), PHV (Poli-β-hidroksivalerat) gibi intraselular depo materyallerinin mikrobiyal sentezi [7]



n=1	R=hidrojen	Poli(3-hidroksipropiyonat)
	R=metil	Poli(3-hidroksibütirat)
	R=propil	Poli(3-hidroksivalerat)
	R=pentil	Poli(3-hidroksioktanat)
	R=nonil	Poli(3-hidroksidodekanat)
n=2	R=hidrojen	Poli(4-hidroksibütirat)
	R=metil	Poli(4-hidroksivalerat)
n=3	R=hidrojen	Poli(5-hidroksivalerat)
	R=metil	Poli(5-hidroksiheksanat)
n=4	R=heksil	Poli(6-hidroksidodekanat)

Şekil 1.2. PHA'ların temel yapısı [10,12]

PHA'nın bileşimi kullanılan mikroorganizmaya ve karbon kaynağına bağlı olarak değişmektedir [4].

PHA'ların bir çeşidi olan PHB, ilk defa 1923'de Lemoigne tarafından önemli bir bakteriyel ürün olarak belirlenmiştir. Lemoigne (1927) PHB'yi kimyasal olarak nitelendirmiş ve *Bacillus* spp. nin sporulasyonunda bulunduğunu belirlemiştir [13]. Lemoigne, *Bacillus subtilis* kültürlerini distile suda otoliz ettiğinde bilinmeyen bir asidin oluşması ile pH'ın azaldığını gözlemiştir. β -hidroksibütirik asidin diabetli hastalar tarafından salgılanan ve idrardan izole edilen keton bileşiklerinden biri olduğu önceden bilinmesine rağmen aynı olduğu daha sonradan bulunmuştur [7].

Uzun bir süre, Lemoigne'nin bulduğu sonuçların uygunluğu tanınmamış ve PHB'nin mikrobiyal sentezi yoğun bir bilimsel araştırma alanı olmamıştır. Daha sonra, başta Forsythe olmak üzere birçok araştırmacı tarafından (1958), genellikle Gram negatif bakterin PHB'yi sentezleme yeteneğine sahip olduğu ve bu yeteneğin varlığı ya da yokluğunun taksonomik bir belirleyici olarak kullanılabileceği bildirilmiştir [7].

Depo materyali olarak PHB biriktiren birçok bakteri, toprakta, deniz suyunda, aktif çamur veya kompostta bulunabilmektedir. Bu nedenle PHB genellikle bulunan bir madde olup kolayca parçalanabilir özelliktedir ve üç önemli özelliğe sahiptir. Bunlar: 1-Termoplastik işlenebilirliği; 2- Suya %100 dirençliliği; 3- %100 biyoparçalanabilirliğidir [14].

1.2. PHB Granüllerinin Morfolojisi:

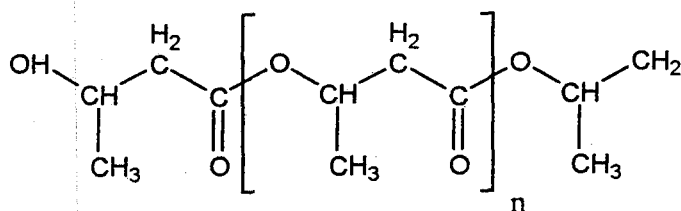
Bakteri hücreleri içindeki PHB granüllerinin varlığı faz-kontrast ya da elektron mikroskobu kullanarak kolayca incelenebilmektedir. Her bir granülün büyüklüğü çap olarak 100nm'den 800nm'ye kadar değişir ve genel olarak yuvarlak şekildedirler. 2-4nm kalınlığında üniter olmayan bir membranla çevrelenmiştir. İzole edilen PHB granüllerinin gerçek bileşiminin yaklaşık olarak %98'i PHB ve %2'si proteindir [7].

Dunlop ve Robards (1973) *Bacillus cereus*'tan izole ettikleri PHB granüllerinin ultrayapısını araştırmışlardır. Freeze-etching (dondurup kalıp

şeklinde çıkarma) yöntemini kullanarak her bir PHB granülünün, granül hacminin yaklaşık %50'sini oluşturan bir merkezi çekirdeğe sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çekirdek, en dışında PHB tarafından bir membranla tekrar çevrelenmiştir. Ellar ve ark. (1968) her bir granülün fibriler yapıya sahip olduğunu ve bunların 10-15nm uzunluktaki, uzamış polimerik PHB zincirlerinden oluştuğunu saptamışlardır. Doğal olarak bakteri hücrelerinden PHB'nin tam olarak alınmasının zorluğundan dolayı, PHB sentezinin asıl fiziksel mekanizmaları konusunda halen bazı şüpheler mevcuttur. Fakat kesin olan, hücre içindeki PHB granüllerinin yüksek kristallenme oranıyla (%80) fibriler bir yapıya sahip olmasıdır [7].

PHB, optik olarak aktif D(-)-3-hidroksibütirik asidin makromoleküler bir polimeridir ve Şekil 1.3'te gösterilen primer yapıya sahiptir. Tekrar eden ünitelerin sayısı (n), çok çeşitli faktörlere bağlıdır ve analitik işlemlerle belirlenmektedir. n sayısı 35.000 gibi çok büyük rakamlara ulaşabilmektedir. Molekül ağırlığı $3,39 \times 10^6$ 'ya kadar olan PHB örnekleri, diklorometan ya da kloroform ile hücresel kütlenin ekstraksiyonu yoluyla *Azotobacter vinelandii*'den elde edilmiştir. n değerinin çeşitliliğini etkileyen faktörler şu şekilde sıralanmıştır [7]:

1. İzolasyon yöntemi (PHB granüllerinin prokaryotik biyokütleden ekstraksiyonu),
2. Seçilen bakteriyal suş,
3. Kullanılan substrat tipi,
4. Hücrelerin fermentasyon süresi,
5. Büyüme sınırlayan faktörler,
6. Fermentasyon koşullarında önemli olan iki parametre sıcaklık ve oksijen kısmi basıncı.



Şekil 1.3. PHB'nin primer yapısı [7]

PHB lineer bir polimerdir. İzole edilen PHB 1,171 ve 1,260 g.cm⁻³ arasında değişiklik gösteren yoğunluğa sahiptir. Şekilsiz yoğunluğu düşük olmasına karşın kristal yoğunluğu yüksektir. PHB'nin erime noktası 157- 188°C arasında değişmektedir. PHB termoplastik özelliğe sahiptir ve preslenerek şekil verilebilmektedir. Bununla birlikte, 283°C'den yüksek sıcaklıklarda havada hızlı bir bozulma göstermektedir [7].

1.3. PHB'nin Fiziksel Özellikleri

PHB'nin bazı fiziksel özellikleri Çizelge 1.1'de özetlenmiştir. PHB, gerilme direnci ve kırılma açısından gösterdiği özellikler bakımından polietilen ve polistiren gibi bazı ticari plastiklere benzemektedir (Çizelge 1.1). PHB'nin fiziksel özellikleri kullanılan bakteri suşuna bağlı olarak moleküler ağırlığına ve test edilen numunenin saflığına bağlıdır. PHB'nin tamamen şekilsiz örneği, eritilmiş örneklerin hızla soğutulmasıyla elde edilmektedir. PHB soğutulduğu zaman yavaşça kristalize olmaktadır. Maksimum kristalizasyon 110-120°C arasında bulunmaktadır. Kesin bir kantitatif bilgi elde edilmemiş olmasına rağmen, ultraviyole ışıkta PHB'nin kararlılığının iyi olduğu kaydedilmiştir [7].

Çizelge 1.1. PHB'nin fiziksel özellikleri [7]

Materyal	Gerilmeye dayanıklılık (Ncm ⁻²)	Kırılmaya karşı genişleme (%)	Modül (Ncm ⁻² x10 ³)
Poli-HB	1500-2500	8	800-1000
Polietilen	800-3500	400-800	200-1400
Polipropilen	2100-3700	150-400	1100-1300
Polistiren	4000-6500	3-5	3300
Polivinilklorit	4000-6000	10-50	2000-3000
Plexiglass	7000-7600	4	3000
Poliamid	5000-9000	50-200	1300-3000

Hücredeki PHB, sıvı içinde amorf durumda bulunmaktadır. Ancak, organik çözücülerle hücreden çıkarıldıktan sonra kristalleşmektedir. Bu durumda sert fakat kolay kırılabilir bir materyaldir [15].

Bakteriyal hücrelerde PHA'ların analizi için varolan en yaygın metot gaz kromatografisidir (GC). PHA analizinde kullanılan diğer yöntemler ise kimyasal olarak ekstrakte edilmiş PHB'nin infrared (IR) spektroskopisi, fluometri ve hücre karbon analizini içermektedir. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi moleküler yapı çalışması için kullanılan rutin bir kimyasal tekniktir [16].

1.4. PHB'nin Çözelti Özellikleri

Akita ve ark. (1976 ve 1977) PHB'nin akışkanlığı, ozmotik basıncı, ışık saçılması ve optik çevirme dağılımı gibi çözelti özelliklerini etraflıca araştırmışlardır. PHB'nin kloroform, diklorometan, di-, tri-, tetra- kloroetan, dikloroasetat, dimetilformamid, etilen karbonat, etilasetoasetat, propilen karbonat, trifloroetanol, triolein, asetik anhidrit, asetik asit, 1 N sodyum hidroksit, alkoller (3C atomundan fazla) gibi çözücüler içinde çözünürlüklerinin yüksek olduğunu, dioksan, toluen, oktanol, piridin gibi çözücüler içinde oldukça çözünür olduğunu, H₂O, dilute mineral asitler, etil asetat, metanol, alkalın hipoklorit, etilmetilketon, etanol, dietileter, tetrahidrofuran, 1-Propanol, hekzan, 2-Propanol, benzen, bütil asetat, sikloheksanol, tribütil sitrat gibi çözücüler içinde ise çözünmediği bulmuşlardır. Çözünürlüklerinin sıcaklığa bağlı olduğunu saptamışlardır [7].

PHB'nin termal parçalanması geniş ölçüde araştırılmıştır. Vakum altında ve 338°C'ye kadar temel parçalanma ürünleri dimerler, trimerler, tetramerler, izokrotonik asit ve krotonik asit olduğu bulunmuştur [7].

1.5. PHB Sentezleyen Mikroorganizmalar

Bir fermentasyonun maliyeti, ürün kazanımını içeren birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bu nedenle teknolojinin karmaşıklığı, tesisin sermaye maliyeti, ürünün ayrılmasındaki kolaylık veya zorluk, maliyette kritik bir etkiye sahip olan özel bir üretici organizma ve substrat seçimi son derece önemlidir. Organizmaların yaygın bir sınıfının PHB veya PHB benzeri materyalleri depo ettikleri rapor edilmiştir. Bunlar Gram-pozitif ve Gram-negatif türleri ve Cyanobacteria'yı içermektedir [6,15].

PHB, aerobik azot fikse ediciler, kemolitotroflar, actinomycetler, *Beneckea* ve *Photobacterium* gibi biyoluminesent cinsler, *Micrococcus* gibi aerobik Gram(+) koklar, *Bacillus* gibi basiller, *Alcaligenes*, *Sphaerotilus*'u içeren aerobik Gram(-) basiller ve *Spirillum*, *Moraxella*, *Lampropedia* ve *Hyphomicrobium* gibi birçok aerobik mikroorganizmada bulunmuştur. PHB biriktiren tek anaerobik bakteri *Clostridia* ve mor sülfür fototrofik bakterilerdir [17]. Bu prokaryotik organizmalar liste halinde Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. PHB sentezleyen mikroorganizmalar [4,6,11]

<i>Acinetobacter</i>	<i>Lampropaedia</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Methylobacterium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Methylocystis</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Micrococcus</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Chrobacterium</i>	<i>Rhodopseudomonas</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Rhodospirillum</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Derxia</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Escherichia</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Ferrobacillus</i>	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Haloferax</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Halobacterium</i>	<i>Zoogloea</i>
<i>Hypomicrobium</i>	

1.6. Organizma ve Substrat Seçimi

PHB mikroorganizmaların yaygın birçok çeşidi tarafından üretilmektedir (Çizelge 1.2). Ancak endüstriyel proses için hangisinin temel olabileceği önemli bir sorudur. Çizelge 1.2'deki organizmaların bazıları yavaş gelişmekte (*Rhizobium*, *Ferrobacillus*), bazıları ışığa ihtiyaç göstermekte (*Chromatium*) veya sadece küçük miktarlarda polimer biriktirmektedirler. Bu mikroorganizmalar arasındaki en muhtemel adaylar *Azotobacter* sp., *Methylobacterium* sp. veya *Alcaligenes eutrophus*'dur. Bu üç mikroorganizma çeşitli substratları kullanabilmektedir. *Azotobacter* glukoz ve sukrozu; *Methylobacterium* metanol ve asetatı; *Alcaligenes eutrophus* etanol, glukoz ve hidrojen/karbondioksit/havayı kullanabilmektedir. Bu

üç mikroorganizmadan *A. eutrophus*, gelişiminin kolay olması, yüksek seviyede yüksek moleküler ağırlıklı polimer biriktirmesi (kuru hücre ağırlığının %80'i kadar) ve potansiyel olarak PHB üretimi için çok cazip olan substratları kullanması nedeniyle en çok tercih edilecek aday olarak görülmektedir [6].

1.7. PHB'nin Boyama Reaksiyonu

PHB'nin bazı özellikleri lipidlerle ilgilidir. Bu, onun hidrofobisitesi ile ifade edilmektedir. Etanol ile defalarca yıkandıktan sonra bile PHB içeren hücrelerden çıkmayan Sudan Siyahı B gibi lipofilik boyalarla kolayca boyanabilmektedir. Büyük miktarda PHB içeren hücreler koyu mavi-siyah ile boyanmakta ve tekrarlanan etanol yıkamasından sonra bile boya kalmaktadır. Ancak az miktarda PHB içeren hücreler ya renksizdir ya da belirsiz gri olarak görülmektedir [7].

Bununla birlikte, Ostle ve Holt, PHB için Sudan Siyahından daha büyük bir affinite ve daha büyük bir spesifiteye sahip olan suda eriyen esas oksazin boya olan Nile Blue A'nın kullanımını tavsiye etmişlerdir. Bu boya 460nm dalga boyunda parlak turuncu florasan vermektedir [18].

Lipofilik bir boya olan fosfin 3R'nin varlığında gelişen hücrelerin floresans şiddetlerine göre, nodül bakterilerinin hücrelerindeki PHB'in içeriğini tespit eden fluorometrik bir yöntem tanımlanmıştır. Bu yöntem, PHB'nin birikimine göre yüksek ve düşük aktiviteli nodül bakterilerinin suşlarının farklılaşması için kullanılmıştır. Az miktarda polimer içeren aktif suşların kolonileri ultraviyole ışıkta incelendiğinde floresansa sahip olmadığı, büyük miktarda PHB içeren düşük aktiviteli suşların kolonilerinin parlak yeşil floresans verdiği ve orta aktiviteli suşların kolonilerinin daha zayıf floresans verdiği gözlenmiştir [19].

1.8. PHB'nin Biyosentezi

PHA'ların sentezi için birkaç farklı yolun bakterilerde bulunduğu bilinmektedir. Bakteriyal PHA'ların bilinen hemen hemen tüm bileşiklerinin sentezi ve birleştirilmesi için dört farklı yol tanımlanmıştır [10].

Birincisi, *Alcaligenes eutrophus* için tanımlanmış olan en yaygın biyosentetik yoldur. PHB genellikle 3-ketotiolaz (asetil-CoA asetiltransferaz), asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sentaz tarafından katalizlenen 3 enzimik reaksiyon serisiyle asetil-CoA'dan sentezlenmektedir [20,21]. PHB sentezi, iki asetil koenzim A (asetil-CoA) molekülünün biyosentetik β -ketotiolaz ile katalizlenerek asetoasetil-CoA'ya kondanse olması ile başlamaktadır. Asetoasetil-CoA daha sonra NADPH-bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz ile 3-hidroksibütiril-CoA'ya indirgenmektedir. Son olarak, 3-hidroksibütiril-CoA monomeri PHA sentaz ile bir polyester molekülüne polimerize edilmektedir [10,15,22,23,24].

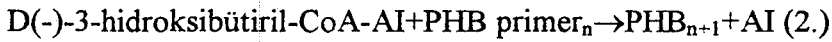
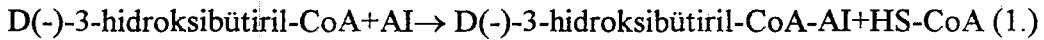
İkinci tip, fotosentetik bakteri *Rhodospirillum rubrum*'da beş adımlı PHA biyosentetik yoldur. Bu yolda, β -ketotiolaz tarafından oluşturulan asetoasetil-CoA, NADH-bağımlı redüktaz tarafından L(+)-3-hidroksibütiril-CoA'ya indirgenmektedir. L(+)-3-hidroksibütiril-CoA bundan sonra iki enoil-CoA hidrataz ile D(-)-3-hidroksibütiril-CoA'ya dönüştürülmektedir. Bu yoldaki son adımda PHA sentaz ile polimerizasyon katalizlenmektedir [10].

PHA biyosentetik yolun üçüncü tipinde, ribozomal RNA homoloji grup I'in üyesi olan çoğu *Pseudomonas*'larda aktif olduğu görülmektedir. Bu yolda alkanlar, alkanoller veya alkonatlardan çıkarılan aktive edilmiş yağ asitlerinin β -oksidasyonundan araçlar PHA biyosentezine yöneltilmektedir. Örneğin *Pseudomonas oleovorans*, oktan, oktanol, oktanatta kültür edildiği zaman ana parça olarak 3-hidroksioktanat ve 3-hidroksiheksanat içeren bir polyester biriktirmektedir [10].

Yolun dördüncü tipi, *P. oleovorans* hariç, rRNA homoloji grup I'in üyesi olan hemen hemen tüm *Pseudomonas*'larda bulunmuştur. Orta uzunlukta zincirli 3-hidroksialkonatları içeren kopolimerler asetil-CoA'dan sentezlenmektedir. PHA sentezi için öncüler, de novo yağ asit sentetik yollarından çıkarılmaktadır. Esas

de etkilemektedir. Özellikle yüksek NADH₂ düzeyi çemberin ilk enzimi olan sitrat sentazı ve izositrat dehidrojenazı inhibe etmektedir. Yüksek bir hücre içi NADH₂ düzeyi, hücrelerin yetersiz oksijen stoğundan kaynaklanabilir. Bu iki enzimin NADH₂ tarafından inhibisyonu, sonuç olarak asetil-CoA'nın seviyesinde bir artışla sonuçlanmakta ve böylece PHB sentezinde bir artışa neden olmaktadır. Hücre içi NAD/ NADH₂ oranını ve PHB sentezinin sonraki oranını mutlak olarak tespit eden bir faktör, ekstraselular oksijen kısmi basıncıdır [7]. Solunumun baskısıyla intraselular NADH seviyesinin artışının PHB sentezini tetiklediği bilinmektedir. Oksijenin yokluğu PHB sentezini arttırmaktadır [25].

D(-)-3-hidroksibütiril-CoA'nın PHB'ye polimerizasyonu doğrudan olmaz. Bunun için membrana bağlı özel bir protein fraksiyonunu gerekmektedir. Bu protein fraksiyon AI ve AII olmak üzere iki proteinden oluşmaktadır. Protein fraksiyonu AI, polimeraz aktivitesiyle bağlantılıyken AII fraksiyonu, PHB depolimeraz varlığıyla PHB'nin hidrolizini önlemektedir. AI, açılprotein kompleksi formunda β -hidroksibütiril parçası içinde aracı bir taşıyıcı olarak fonksiyonel olabilmektedir. İkinci bir reaksiyonda, PHB primeri bir hidroksibütiril ünitesi ile uzatılmaktadır. Membrana bağlı polimeraz ile katalize edilen reaksiyon şu şekilde gösterilmektedir [7]:



Bakteriyal PHA'ların yaygın bir bileşeni olan 3-hidroksibütirik asite ek olarak, 120'den fazla farklı hidroksialkanoik asit son 70 yılda bu bakteriyal polyesterin bileşeni olarak tespit edilmiştir [26].

1.9. PHB/PHA Oluşumunun Önemi

Ozmotik olarak inert (etkisiz) bir depo materyali olan PHB ve PHA'nın oluşumunun prokaryotik hücreler için önemi, şiddetli açlık dönemi boyunca karbon veya enerji kaynağı olarak görev yapmasıdır. Böylece besinlerin sınırlı olduğu şartlar altında mikroorganizmanın hayatta kalmasını pozitif olarak etkileyebilmektedir [7]. PHB, besin sınırlılığı boyunca hücresel komponentlerin parçalanmasını geciktirmektedir [27]. Bu durum, *Bacillus megaterium* ve

Micrococcus halodenitrificans gibi birçok mikroorganizma için de bildirilmiştir. Ayrıca *Alcaligenes eutrophus* suşları için açlık şartları altında hayatta kalmasının hücrelere depolanan PHB miktarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [7].

Alcaligenes suşlarında PHB sentezinin bir diğer fonksiyonu hücre içindeki aşırı redüksiyonun ortadan kaldırılmasıdır. Bu durum özellikle oksijenin kısmi basıncının büyüme için optimalden daha az olduğu çoğalma şartları boyunca önem taşımaktadır [7]. Sonuç olarak intraselular PHB/PHA sentezi elektron deposu olarak görev yapmaktadır [7,27].

Azotobacter beijerinckii'de azot fiksasyonundan sorumlu olan nitrogenaz sistemi oksijene duyarlıdır. *Azotobacter* türlerinde PHB sentezi, düşük oksijen kısmi basıncı ile stimule edilmektedir. Böylece PHB'nin sentezi ve varlığı, solunum aktivitesinin seviyesini arttırmaktadır. *Azotobacter*'de kistlerin ve çeşitli *Bacillus* suşlarında sporların oluşumu, besin sınırlandığında PHB'nin varlığı ve yeniden kullanımı ile ilişkilidir [7]. PHB granüllerinden serbest bırakılan hidroksibütirat, genellikle merkezi metabolizma vasıtasıyla asetil-CoA'nın üretimini yönetmektedir. Ayrıca hidroksibütirat, *Azotobacter vinelandii*'nin kistleri için esansiyel yeni lipidlerin öncüsü olarak gösterilmiştir [13].

1.10. PHA'ları Üretme Koşulları

Değişik tip bakteri sınıflarının kullanılması ve karbon kaynaklarının değiştirilmesi ile farklı biyopolimer ürün elde edilebilmektedir. Genelde PHA üretiminin yapılabilmesi için, bakterilerin büyüme ortamı ve polimer üretme ortamı olmak üzere iki değişik ortama ihtiyaçları vardır [4].

Büyüme ortamında, durgun faza girinceye kadar mikroorganizmaların büyümeleri sağlanmaktadır. Bu ortam gerekli tüm besinler açısından zengindir. İkinci ortamda ise, istenen PHA tipi için gerekli karbon kaynağı eklenirken, büyüme için şart olan bir faktör (azot, oksijen, fosfor, vb.) eksik bırakılarak stres ortamı hazırlanmaktadır. Bu durumda, bakteri, polimer üretimine ve ürettiği polimeri ileride daha kötü koşullarda kullanmak amacıyla bir zar içerisinde depolamaya zorlanmaktadır. Bakteriler bir süre sonra bu ortamdan alınmakta ve gerekli süreçlerden geçirilerek polimer elde edilmektedir [4].

PHB, kurutulmuş hücrelerden kloroform, metilen klorid, etilen klorid, diklorometan/etanol karışımı gibi çözücüler kullanılarak ekstrakte edilebilmektedir. Ayrıca Na-hipoklorür çözeltisi, litik deterjanlar, safra tuzu ve ekstrem alkali koşullar kullanılarak hücre duvarlarının yıkımı ve PHB'nin serbest kalması sağlanabilmektedir. Yüksek basınçlı homojenizatör, mekanik öğütücü, ultrasonik işlem ve basınç uygulaması ile de hücrelerin mekanik olarak parçalanması sağlanabilmektedir. Bundan sonra işlem görmüş biyomastan santrifüj, ekstraksiyon gibi işlemlerle PHB granülleri elde edilmektedir. Son olarak, aseton ve etanol gibi organik çözücüler veya su ile PHB/PHA saflaştırılmaktadır [7].

Elde edilen PHA'ların moleküler ağırlığı üretici organizma kadar gelişme ve ekstraksiyon koşullarına da bağlı olduğu bildirilmiştir [11].

1.11. PHB'nin Endüstriyel Üretimi

PHB anormal büyüme koşulları meydana geldiği zaman doğada normal olarak üretilen depo materyalidir. Anormal büyüme koşullarından sonra PHB, hücrelerde yüksek miktarlarda biriktirilmektedir. Bu nedenle bakteriler ile PHB üretiminde iki adımlı fermentasyon prosesi gerekmektedir. Ancak *Alcaligenes latus* ile fermentasyonun tek adımda yapılabileceği gösterilmiştir. *Alcaligenes latus btF-9* ile PHB üretiminde 15m³'lük fermentörde bir haftada 1000kg'dan daha fazla PHB üretilenmiştir. Fermentasyon prosesinde ilk önce hücreler agar plakları üzerinde geliştirilmiş ve daha sonra erlenlere transfer edilmiştir. Yeterli hücre yoğunluğuna erişildikten sonra 15m³'lük bir fermentöre inokule edilmiştir. Karbon kaynağına ilave olarak, fosfat, sülfat ve bazı iz elementleri içeren mineral tuz çözeltisi fermentasyon ortamına katılmıştır. pH kontrolü amacıyla ve azot kaynağı olarak amonyak solusyonu kullanılmıştır. Fermentasyondan sonra hücreler ayırma ünitesi kullanılarak toplanmıştır. Toplanan hücreler musluk suyu ile bir kez yıkanmış ve yeniden toplanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu daha sonra doğrudan doğruya geri alım prosesinde kullanılmıştır. Geri alım prosesinde ilk basamak, bir PHB solvent çeşidi olan metilenklorid ile hücre süspansiyonunun işlendiği ekstraksiyondur. Bu basamakta PHB içeren solvent, mekanik bir adım ile

hücre parçalarından ayrılmıştır. Daha sonra suyun eklenmesi ile PHB çöktürülmüştür. Çöktürülen PHB tabakası alınmış ve kurutulmuştur. Bu proses kullanılarak, %99 saflıkta PHB, tek bir ekstraksiyon ve bir presipitasyon basamağı ile yeniden elde edilebilmiştir [14].

PHA'ların ticari ürün haline gelmesinde en önemli problem üretim maliyetinin yüksek olmasıdır. Bu nedenle araştırmaların çoğu daha etkili fermentasyon ve geri dönüşüm prosesinin geliştirilerek üretim maliyetinin düşürülmesine ayrılmıştır. PHB'nin yüksek üretim maliyeti suş gelişimi, fermentasyon ve ayırma prosesinin geliştirilmesi ve ucuz bir karbon kaynağı kullanımı ile azaltılabilmektedir. PHB üretiminde toplam üretim maliyetinin yaklaşık %40'ı işlenmemiş materyal içindir. Bu nedenle, daha ucuz bir karbon kaynağının kullanılması PHB'nin yüksek üretim maliyetini azaltmaktadır [28].

1.12. *Rhizobium* Bakterilerinin Genel Özellikleri

Rhizobium cinsi bakteriler *Rhizobiaceae* familyasına dahildirler. Bunlar genetik olarak farklı, fizyolojik olarak heterojen bir grubu oluştururlar. *Rhizobium* bakterileri çubuk şeklinde, spor oluşturmayan, gram negatif, genel olarak aerobik metabolizmaya sahip olmakla beraber çok düşük oksijen varlığında da gelişebilen bakterilerdir. Optimum gelişme sıcaklıkları 25-30°C, gelişme pH'ları 6-7 arasındadır [29,30,31]. Karbonhidrat ve organik asit tuzlarını gaz oluşturmada karbon kaynağı olarak kullanabilirler. Selüloz ve nişastayı ise kullanamamaktadırlar. Karbonhidrat içeren ortamda genellikle ekstraselular salgı üretmektedirler. Yeni kültürde çubuk şeklinde, yaşlı kültürde veya kötü çevre koşullarında pleomorfiktirler (şişkin, küresel, elipsoidal veya dallanmış) [30].

Rhizobium bakterileri, baklagil bitkisinin köklerine yerleşerek bitki için gerekli azotu sağlarken bitki öz suyundan besin maddesi olarak yararlanmaktadır [7]. Etkili bir simbiyoziste, bakteri bitki köklerini enfekte etmekte ve nodül olarak adlandırılan özelleşmiş yapıların oluşumunu teşvik etmektedir. Nodüllerde bakteri bölünmekte ve bakteroid olarak adlandırılan özelleşmiş hücreler azotu amonyağa dönüştürmektedir. Dinitrojenin bu indirgenme reaksiyonu için gerekli enerji bitki tarafından fotosentez ile sağlanmakta ve son ürün bitki için gerekli

azot kaynağını sağlamaktadır [30]. Biyolojik olarak fikse edilen azotun %50'si (90 milyon ton) *Rhizobium* bakterisi ile baklagiller arasındaki simbiyotik ilişkiden kaynaklanmaktadır. Baklagillerle simbiyotik olarak yaşayan *Rhizobium* bakterilerinin toprağa fikse ettikleri azot miktarı ortalama 200 kg/ha/yıl dır [31]. *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* bakterileri ile konukçu baklagilin köklerinde azot fikse eden nodüllerin indüksiyonu, bitki ve simbiyotu arasında çok basamaklı bir prosesi içermektedir [32].

Rhizobium bakterileri son olarak 3 farklı tür *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Rhizobium* şeklinde sınıflandırılmış ve *R.fredii*'nin yeni tür ismi *Sinorhizobium* olarak değiştirilmiştir [33].

Elkan ve Bunn'un yapmış oldukları sınıflandırma Çizelge 1.3'de görülmektedir [30].

Çizelge 1.3. Rhizobia'nın son taksonomik sınıflandırması [30]

Tanımlanmış cins

Bradyrhizobium (Jordan, 1982)

Rhizobium (Jordan, 1982)

Azorhizobium (Dreyfus et al., 1988)

Sinorhizobium (Chen et al., 1988)

Tanımlanmış tür

B. japonicum (Jordan, 1982)

R. leguminosarum (Jordan, 1982)

R. meliloti (Jordan, 1982)

R. loti (Jordan, 1982)

R. galegae (Lindstrom, 1989)

A. caulinodans (Dreyfus et al., 1988)

S. fredii (Chen et al., 1988)

S. xinjiangensis (Chen et al., 1988)

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabında yer alan sınıflandırmada ise *R. leguminosarum*'un biovar *viceae*, biovar *trifoli* ve biovar *phaseoli* olmak üzere üç biovarı bulunmaktadır [29].

1.13. *Rhizobium* Bakterilerinin PHB Üretimleri

Diğer birçok bakteri ile beraber, *Rhizobium* türlerinin de depo materyali olarak PHA sentezledikleri ve depoladıkları bilinmektedir [34]. Baklagil bitkileri ile *Rhizobium* bakterileri arasındaki simbiyotik moleküler azotun fiksasyonu büyük miktarda enerji harcamayı gerektirmektedir [35,36]. Serbest yaşayan azot fikse eden bazı mikroorganizmalarda, azot fiksasyonunun yoğunluğu ve PHB içeriği arasında ters bir ilişki olduğu bulunmuştur. Romanov ve ark. PHB metabolizması ile azot fiksasyonu ve fotosentez arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. Başlangıçta fotoasimilasyonun bir bölümünün PHB'yi içerdiğini ve daha sonra PHB'nin azot fiksasyonu amacıyla kullanıldığını bulmuşlardır [35]. Farklı yayınlarda nitrogenaz aktivitesi ve PHB birikimi arasındaki ilişki gösterilmiştir. Buna göre, PHB metabolizması, hidroksibütirat dehidrojenaz aracılığıyla karbon iskeletleri, ATP ve/veya redüksiyon denklikleri sağlamasıyla azot fiksasyonunu desteklemektedir. İkinci olarak bu görüşün tersine, PHB metabolizması nitrogenazın harcanmasını yönetebilmekte veya onunla rekabet edebilmektedir. Üçüncü olarak, PHB metabolizması azot metabolizması üzerinde etkiye sahip olmamaktadır. Bununla birlikte, hem PHB metabolizması hem de azot fiksasyonu, bakteroid içinde aracı karbon metabolizmasına ihtiyaç gösterdiği belirtilmiştir [36]. Biyopolimer, simbiyotik azot fiksasyonunda enerji kaynağı olarak işin içine girmektedir. *Rhizobium*'da PHB, oksidasyon için uygun eksojen substratlar doğrudan doğruya elde edilemediğinde uygun olmayan çevresel koşullar altında nitrogenazı korumayı sağlamaktadır [27,37].

Bakteroid durumunda, azot fiksasyon aparatları redüksiyon denklikleri için PHB oluşumu ile rekabet etmektedir. *Rhizobium* bakterileri anaerobik ve mikroaerobik koşullar altında fonksiyonel TCA siklusunu (trikarboksilik asit döngüsünü) sürdürmek için mekanizmalar geliştirmiştir. Bakteroidde, redüksiyon denklikleri simbiyozisi desteklemek amacıyla azot fiksasyonu için kullanılmaktadır. Fakat redüksiyon denklikleri PHB oluşumu için de kullanılabilir. Serbest yaşam durumunda, nitrogenaz ifade edilmemekte ve PHB, TCA siklusu tamamen aktif olmadığı zaman, aşırı NADPH için bir depo olarak rol oynamaktadır [15].

Rhizobium esas olarak yüksek moleküler ağırlıklı polisakkaritleri dışarı salgılamaktadır. Bu ekzopolisakkaritler (EPS) ile PHB'nin üretimi arasındaki ilişki incelenmiş ve bu polimerlerin biyosentetik yollarının direk olarak bağlı olmadığı, fakat aynı zamanda üretildiği bulunmuştur [38]. *Rhizobium tropici*, *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium japonicum* ve *Azorhizobium caulinodans* gibi *Rhizobium*'lar serbest yaşam durumunda ve olgun nodüllerde PHB biriktirirken *Sinorhizobium meliloti* serbest yaşam durumunda ve nodül gelişiminin yalnız erken evresinde PHB biriktirmektedir [23].

R. meliloti'nin optimum olmayan koşullarda, ürettiği PHB miktarı kuru hücre ağırlığının %55-60'ı kadar olabilmektedir. Ayrıca uygun kültür koşullarında PHB-ko-PHV kopolimeri de biriktirebilmektedir [34].

1.14. Diğer Bakterilerle PHB Üretimi

Alcaligenes eutrophus glukozdan PHB ve glukoz ve propiyonik asit içeren karışık karbon kaynağından 3-hidroksibütirik asit ve 3-hidroksivalerik asit ünitelerinden oluşan PHA üretmektedir [20]. Sınırlı oksijen koşulları altında gazları geçirmeyen kapalı bir sistem kullanılarak *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697'nin kültürleri ile karbondioksitten PHB üretimi incelenmiş ve oksijenin sınırlı kültürde PHB birikiminin, amonyumdan yoksun kültürdekinden daha yüksek olduğu bulunmuştur [39]. Bir çeşit karbon kaynağından PHB biriktirebilen bir *Alcaligenes* sp. SH69 suşu izole edilmiş ve basit karbonhidrat substratları ile 24 saat batık kültürden sonra 3-hidroksibütirat ve 3-hidroksivalerat'dan oluşan kopolyester biriktirdiği görülmüştür [40]. Bir diğer çalışmada *Alcaligenes eutrophus* tarafından bütirik ve pentonik asitlerin nitrojensiz kültür solusyonlarında 3-hidroksibütirat ve 3-hidroksivalerat'ın kopolyesterlerinin üretimi yapılmıştır [41]. Yine 3-hidroksibütirat ve 4-hidroksibütirat'ın kopolimerleri sukroz ve γ -bütürolakton içeren kültür solusyonlarında *Alcaligenes latus* tarafından etkili olarak üretilmiştir [42].

Yapılan bir çalışmada azot sınırlılığında *Alcaligenes latus*'un batık kültürüyle yüksek verimlilikte ve yüksek polimer içerikli PHB üretimi çalışılmış

ve optimal sukroz besleme ile beraber azot sınırlılığı uygulamasıyla PHB sentezi oranında artış görülmüştür [43].

Azotobacter vinelandii UWD'nin gelişiminde valerat ve diğer kısa zincirli, eşit uzunlukta olmayan yağ asitlerinin glukoz ortamında PHA kopolimer [poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)] oluşumunu teşvik ettiği bulunmuştur [44].

PHA-polimeraz-kodlayan gen ve üretici PHA prokürsörleri içeren rekombinant *Escherichia coli*'nin yağ asitlerinden orta zincir uzunluklu PHA'ları sentezleyebildiği bulunmuştur. Ayrıca *Alcaligenes eutrophus*'da PHB biyosentetik yolun enzimlerini kodlayan genler değiştirilmiş ve yeşil bitki *Arabidopsis thaliana*'nın plastitlerinde ifade edilmiştir [45]. PHA-polimeraz-kodlayan gen ve hedefleyici peroksizom enzimi ile *Arabidopsis thaliana*'nın değiştirilmesi 6-16 karbon atomu arasında değişen doymuş ve doymamış monomerleri içeren orta zincir uzunluklu PHA'ların üretimiyle sonuçlanmıştır [46].

Yapılan bir çalışmada, *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) ve *Pseudomonas oleovorans* ile biyoteknolojik ramnoz üretiminin atığı olan yağı kullanılabilirliği çalışılmış ve bu mikroorganizmaların gelişmeleri ve PHA'ları biriktirmeleri için karbon kaynağı olarak bu atık materyali kullanabildikleri bulunmuştur [26].

1.15. PHB'nin Biyolojik Olarak Parçalanması

PHB, petrokimyasallara dayalı plastiklere biyoteknolojik bir alternatif olarak potansiyele sahip olan biyoparçalanabilir bir termoplastiktir [47]. Tek kullanımlık malzemelerin üretimi için bir termoplastik olarak PHB kullanımı biyoparçalanabilir olmasından dolayı önemli bir avantajdır. Birçok toprak mikroorganizması PHB'yi tamamen parçalayabilmekte ve karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir. PHB ekstraselular enzimler ile depolimerize edilebilmektedir. Oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yaygın bir mikroorganizma çeşidi için asimile edilebilir karbon içeren substratlardır [7]. Ekstraselular PHB çoğu bakterinin gelişimini destekleyen bir karbon kaynağı olarak kullanılabilirdiğinden toprak mikroorganizmaları için önemli bir karbon kaynağı

olabilmektedir. Brieses ve ark. (1994) nutrient brothda izole edilmiş aerobik toprak bakterilerinin hemen hemen %10'nunun PHB kullanabildiğini bulmuşlardır [22].

Doğada mikroorganizmaların pek çoğu PHA hidrolaz ve PHA depolimeraz kullanarak PHA'ları parçalayabilmektedir. Bu enzimlerin aktivitesi polimerin bileşimine, fiziksel formuna (amorf veya kristal), örneğin boyutuna ve en önemlisi çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir [15]. Farklı çevrelerde PHB'nin biyoparçalanması için örnekler Çizelge 1.4'te verilmiştir [7].

PHB'nin parçalanması için kullanılan enzimler intraselular ya da ekstraselular olabilmektedir. Fakat ekstraselular enzimler, biyoteknolojik işlemler için daha ilgi çekici olmaktadır. Birçok mikroorganizma PHB'yi hızlı olarak polimerlere ayıran ekstraselular bir depolimeraz salgılamaktadır. Genelde karbon ve enerji kaynağı olarak PHB'nin bakteriyal kullanımı aşağıdaki gibi olmaktadır: PHB'nin depolimerizasyonu ekstraselular bir depolimeraz (hidrolaz) ile katalizlenmektedir. Bu hidroliz reaksiyonunun ürünü esas olarak iz halindeki D(-)-3-hidroksibütirat monomerine eşlik eden bir dimerdir. Hücreler tarafından dimer ve monomerler içeri alınmaktadır. Hücre içinde intraselular β -hidroksibütirat dimer hidrolaz ile dimer kataliz edilmekte ve oluşan monomer ara metabolik yollara dahil edilmektedir [7].

Çizelge 1.4. Çeşitli çevrelerde PHB'nin biyoparçalanması [7]

Çevre	Imm kalınlığındaki kısmın çözülme periyodu (hafta)	Hafta başına yüzey korozyonunun ortalama oranı (μm)	50 μm kalınlığındaki paket filmlerinin %100 ağırlık kaybı için geçen periyot (hafta)
Anaerobik aktif çamur	6	100	0,5
Deniz dibi sedimenti	40	10	5
Aerobik aktif çamur	60	7	7
25°C'deki toprak	75	5	10
15°C'deki deniz suyu	350	1	50

1.16. PHB ve Diğer PHA'ların Uygulama Alanları

PHB ve PHA'ların olası uygulamalarının amacı direk olarak bu maddelerin bazı spesifik özellikleri ile ilgilidir. Bu özellikler:

- Biyolojik parçalanabilirlik,
- Termoplastik özellik,
- Piezoelektrik özellik,
- PHB monomeri D(-)-3-hidroksibütirik asit,
- Doğal kaynaklardan elde edilebilme,
- Biyouyumluluk,
- Toksik olmama şeklinde sıralanabilmektedir [4,7].

Özellikle PHB'nin parçalanma ürünü, D(-)-3-hidroksibütirik asidin bütün yüksek organizmalarda aracı bir bileşik olması önemlidir. Bu monomer, lipid metabolizmasının ürünü olarak bulunabilmektedir. Özellikle beyin ve kalp dokusu gibi özel dokular için enerji kaynağı olarak görev yapabilmektedir. D(-)-3-hidroksibütirik asit için beyin gelişiminde aminoasitlerin prokürsörü olarak fizyolojik rolü doğrulanmıştır. Diyabetiklerin kan serumunda anormal konsantrasyonlarda mevcut keton cisimlerinden biri olarak D(-)-3-hidroksibütirik asidin rolü hakkında birçok yayın bulunmaktadır [7].

Böylece hayvan dokularında PHB implantlarının şiddetli olarak toksik olmadığı farz edilebilmektedir. Parçalanabilir polimerler genellikle, büyük potansiyel gösteren iki kullanım alanı mikrosferlerle ilaç verilmesi ve doku cerrahlığında yoğun araştırma ve gelişme geçirmektedir [48]. PHB'nin bu özelliği absorbe edilebilir prostatik cihazlar ve cerrahi dikiş yapımına olanak vermektedir. PHB ve diğer PHA'lar için en ilgi çekici uygulamalar medikal ve farmakolojik uygulamalardır [7].

PHB homopolimeri ve PHB/PHV kopolimeri polietilen, polipropilen vs. gibi bazı ticari plastiklerin mekanik özelliklerine benzerliği ile termoplastik polyesterlerdir. PHB/PHV kopolimeri gibi PHB de şekillenebilmekte, lif şeklinde bükülebilmekte, film yapılabilmekte, polietilen gibi diğer sentetik polimerler ile heteropolimer yapımı için kullanılabilir. PHB ve PHV'nin kopolimerleri PHB homopolimerinden daha üstün bazı fiziksel özelliklere sahiptir. Genel

olarak, kopolimerler daha az kristalin, daha az kırılğan, daha sert ve daha esnektir. PHB/PHV kopolimerlerinin fiziksel özellikleri PHV/PHB oranında varyasyon yapılarak değiştirilebilmektedir [7].

PHB filmlerinin bir özelliği de, kısmen düşük oksijen sızdırabilirliği nedeniyle gıdaların paketlenmesindeki potansiyel kullanımınıdır. PHB açısından 25 μ m'lik bir film günde 45cm³/m²'lik oksijen geçirgenliğine sahiptir [7].

PHB ya da PHA'lerden yapılan malzemeler kısmen kısa bir süre içerisinde birçok ortamda mikroorganizmalar tarafından tamamen parçalanmaktadır. Bütün bir parçalanma için gerekli zaman (Çizelge 1.4) her bir numunenin kalınlığına ve yüzey özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Bu biyoparçalanabilirlik otomatik olarak tek kullanımlık malzemelerin üretimi için PHA'ların kullanımını sağlamaktadır. ICI ve yan şirketi Büyük Britanya'daki Marlborough Biopolimers gibi ticari şirketler aktif olarak PHA'ların araştırılması ve geliştirilmesinde birleşmişlerdir. Bu iki şirket biyoparçalanabilir PHA polimeri için ticari isim olarak "Biopol" adını vermiştir [7].

Bunlar dışında PHB ve PHA'ların ziraatta kullanımı çok umut verici görülmektedir. PHA filmlerinin kaplama folyoları olarak kullanıldığı arazi denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu gibi folyolar ekin sezonunun sonuna kadar kaldırılmak zorunda kalmamaktadır. Benzer bir uygulama da ekinlerin sulanmasında PHA borularının kullanımınıdır. Burada boruların hasat döneminin sonuna kadar tarlalardan kaldırılmasına gerek yoktur. PHB ve PHA ayrıca potansiyel olarak tohum kaplamasında ya da gübrelerin veya pestisidlerin kontrollü salınımı için kullanılabilir [7].

PHB ve PHV kopolimerlerinin diğer bir özelliği de polisakkaritler, polipeptidler ve polinükleoitidler gibi piezoelektrik polimer olmasıdır. Polivinilidon florid gibi sentetik piezoelektrik polimerlerin filmleri kemik büyümesini teşvik etmektedir. Bu nedenle, PHB ya da PHB/PHV kopolimerleri filmler halinde, kemik oluşumunu ve iyileşmesini desteklemek amacıyla kırık kemiklerin etrafına yerleştirilmektedir [7]. Bundan sonra kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilmekte ve vücut tarafından yavaşça resorbe edilebilmektedir. Bu sırada kemik kaynamakta ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir operasyona gerek kalmamaktadır [49].

Organik kimyada asimetrik sentez işlemleri birinci derecede önemlidir. Bu nedenle, enantiomerik olarak saf bileşikler (EPC) talep görmektedir. D(-)-3-hidroksibütirik asitte bu gruba ait olduğu için saf maddelerin daha fazla miktarda elde edilebilmesi için oldukça fazla ilgi bulunmaktadır [7].

PHB biyolojik olarak uyumludur. Monomerler insan vücudunda bulunan doğal metabolit olması nedeniyle, polimer vücutta sadece çok hafif bir immunolojik cevap oluşmasına neden olmaktadır. Bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü salınımı için test edilmiştir [49]. İlacın serbest bırakılması saatlerce süren bir dönemden birkaç aya kadar çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilik, örneğin ilaç konsantrasyonu, tabletleme basıncı, tablet büyüklüğü ve polimer granüllerinin büyüklüğü gibi bilinen parametrelere dayanmaktadır [7].

Alman marketlerinde Wella "SANARA" şampuan şişelerinin sunulması biyopolimerlerin kullanımına örnek olarak verilebilir [50].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. MATERYAL

2.1.1. *Rhizobium* Bakterilerinin İzole Edildiği Bitkilerin Toplandığı Yerler

Rhizobium bakterileri Nisan 1999-Eylül 1999 tarihleri arasında farklı yerlerden (Çizelge 2.1) toplanan baklagil bitkilerinin köklerinde bulunan nodüllerden izole edilmiştir. Baklagil bitkileri köklerine zarar verilmeden kürekle topraktan çıkarılmış ve bir torbaya konularak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvarda bitkilerin köklerdeki nodüller bir pens yardımıyla alınarak yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra *Rhizobium* bakterileri izole edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan standart *Rhizobium phaseoli* NRRL B-4408 United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service'den temin edilmiştir.

Çizelge 2.1. *Rhizobium* bakterilerinin izole edildiği bitkilerin toplandığı yerler

<u>Suş No</u>	<u>Bitki Adı</u>	<u>Toplandığı Yer</u>
R1, R2 (Aynı bitki)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	Vişnelik mahallesi (Esk.)
R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9,		
R10, R11, R12, R13 (Aynı bitki)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	Vişnelik mahallesi (Esk.)
R14	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	Vişnelik mahallesi (Esk.)
R15, R16 (Aynı bitki)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	TAE (Esk.)
R17, R18 (Aynı bitki)	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	TAE (Esk.)
R19	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	TAE (Esk.)
R20	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	TAE (Esk.)
R21	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	TAE (Esk.)
R22	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.(Fasulye)	Çukurhisar ilçesi (Esk.)
R23	<i>Medicago sativa</i> L.(Yonca)	TAE (Esk.)
R24	<i>Vigna anguiculata</i> L.(Börülce)	Kula (Manisa) 680m, Kara Divlit Batısı
R25	<i>Phaseolus sp.</i> (Barbunya)	Sütlüce mahallesi (Esk.)
R26, R27 (Aynı bitki)	<i>Lens culinaris</i> (Mercimek)	TAE (Esk.)

TAE: Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Esk. Eskişehir

2.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

2.1.2.1. Yeast Extract Mannitol (YEM) Besiyeri

K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Mannitol	10g
Yeast Extract	0,5g
Agar	15g
Saf su	1000ml

pH 6,8-7,0'ye ayarlanmıştır. Aktifleştirme için agar içermeyen Yeast Extract Mannitol besiyeri kullanılmıştır. Cam tüplerde 6ml'lik sıvı olarak hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilerek kullanılmıştır [29,30].

İzolatların saklanması için ise Yeast Extract Mannitol besiyerine 15g/lt olacak şekilde agar ilave edilmiş ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilerek kullanılmıştır.

2.1.2.2. *Rhizobium* İçin Modifiye Edilmiş YEM Besiyeri

K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Mannitol	10g
Yeast Extract	2,5g
Trypton	2,5g
Pepton	2,5g
Saf su	1000ml

pH 6,8-7,0'ye ayarlanmıştır. Fermentasyon ortamı için tartılan malzemeler 250ml'lik cam erlenlerde 100'er ml olacak şekilde dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilerek kullanılmıştır [51].

2.1.2.3. PHB Standardı

PHB	0,01g
Kloroform	10ml

PHB (Sigma) cam tüpte kloroform (Merck) içine konularak 60°C'de su banyosunda tamamen çözününceye kadar bekletilmiştir [51].

2.1.2.4. Kristal Viyole Çözeltisi

2g kristal viyole, 20ml etil alkol (%95'lik) içinde çözülmüştür. Diğer taraftan 0,8g amonyum oksalat 80ml saf suda çözülmüş ve bu iki çözelti birbirine karıştırılmıştır [52].

2.1.2.5. İyot (Lugol) Çözeltisi

2g potasyum iyodür (KI), 300ml damıtık su içinde çözülmüştür. Bu çözeltiliye daha sonra 1g iyice ezilmiş iyot kristali eklenmiş ve oda sıcaklığında tam bir çözünme sağlanıncaya kadar karıştırılmıştır [52].

2.1.2.6. Safranin Çözeltisi

0,25g safranin, 10ml %95'lik etil alkolde çözülerek saf su ile 100ml'ye tamamlanmıştır [52].

2.1.2.7. Litmus Milk

Skim milk powder	100g
------------------	------

Litmus	0,75g
Saf su	1lt

Malzemeler 110°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [53].

2.1.2.8. Kongo Kırmızısı İçeren Besiyeri

Kongo Kırmızısı	0,0025g
Yeast Extract Mannitol besiyeri	100ml
Agar	1,5g

Yeast Extract Mannitol besiyerine Kongo kırmızısı eklenmiştir. pH 6.8-7.0'ye ayarlanarak agar ilave edilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [29].

2.1.2.9. Bromtimol Mavisi İçeren Besiyeri

Bromtimol Mavisi	0,0025g
Yeast Extract Mannitol besiyeri	100ml
Agar	1,5g

Yeast Extract Mannitol besiyerine bromtimol mavisi eklenmiştir. pH 6.8-7.0'ye ayarlanarak agar ilave edilmiştir. 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [29].

2.1.2.10. MOPS Tuzları (MS) Ortamı

Morfolinopropan-sülfonik asit (MOPS Tampon)	8,37g
KOH	1,12g
NH ₄ Cl	1,07g
MgSO ₄	0,48g
K ₂ HPO ₄	0,21g

KH_2PO_4	0,05g
NaCl	5mg
CaCO_3	20mg
H_3BO_3	1mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,5mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1mg
EDTA	10mg
Na-Fe-EDTA	2mg
Saf su	1lt

MOPS-KOH (filtrasyonla steril edilmiş) ve MgSO_4 stok solüsyonları hazırlanmış, otoklavlanmış tuz solüsyonuna ilave edilmiştir. Şekerler filtre edilerek ortama 15mM eklenmiştir [29].

2.1.2.11. İdentifikasyon Testleri İçin Kullanılan Şekerler

2.1.2.10'da içeriği verilen besiyerine glukoz, galaktoz, fruktoz, arabinoz, ksiloz, ramnoz, maltoz, sukroz, laktoz, trehaloz, rafinoz, mannitol, fumarat, malat süksinat, sitrat, piruvat ayrı ayrı eklenerek denenmiştir[29].

2.1.2.12. %2'lik NaCl İçeren YEM Besiyeri

K_2HPO_4	0,05g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02g
NaCl	2g
Mannitol	1g
Yeast Extract	0,05g
Saf su	100ml

pH 6,8-7,0'ye ayarlanmıştır. Tüplerde 3ml olarak hazırlanan besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [29].

2.1.2.13. Farklı Karbon Kaynaklarının Denenmesinde Kullanılan Şeker Çeşitleri

1. Sukroz	10g/lt
2. Glukoz	10,5g/lt
3. Arabinoz	10,5g/lt
4. Na suksinat	14,35g/lt
5. Na asetat	14,5g/lt
6. Na fumarat	10,15g/lt
7. Fruktoz	10g/lt

Şekerler 0,45µm'lik disposable filtrelerden geçirilerek 2.1.2.2'de içeriği verilen fermentasyon ortamına mannitol çıkarılarak eklenmiştir [54].

2.1.2.14. Farklı Azot Kaynaklarının Denenmesinde Kullanılan Fermentasyon Ortamı

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150mg
CaCl ₂ .2 H ₂ O	150mg
MgSO ₄ . H ₂ O	250mg
FeEDTA	28mg
MnSO ₄ . 7H ₂ O	10mg
H ₃ BO ₃	3mg
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	2mg
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,25mg
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,04mg
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,025mg
KI	0,78mg
Biotin	0,01mg

Pantotenik asit	0,1mg
Folik asit	0,01mg
Vitamin B ₂	0,2mg
Vitamin B ₁	0,1mg
Vitamin B ₆	0,1mg
Vitamin B ₁₂	0,02mg
Mannitol	10g
Saf su	1000ml

2.1.2.15'te verilen azot kaynakları ayrı ayrı ortamlara ilave edilmiş ve pH 6.8-7.0'ye ayarlanarak 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [54].

2.1.2.15. Farklı Azot Kaynaklarının Denenmesinde Kullanılan Azot Çeşitleri

1. (NH ₄) ₂ SO ₄	0,66g/lt
2. Glutamin	0,73g/lt
3. Glisin	0,75g/lt
4. Asparajin	0,66g/lt
5. Üre	0,30g/lt
6. KNO ₃	1g/lt

Azot kaynakları içeriği 2.1.2.14'te verilen fermentasyon ortamına eklenerek 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir [54].

2.1.2.16. Farklı Çalkalama Hızlarının Denenmesinde Kullanılan Fermentasyon Ortamı

R15 suşu için içeriği 2.1.2.14'te verilen besiyerine üre 0,30g/lt ilave edilerek 250ml'lik erlenlerde 100ml olacak şekilde hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. R17 suşu için içeriği 2.1.2.14'te verilen besiyerine asparajin 0,66g/lt ilave edilerek 250ml'lik erlenlerde 100ml olacak şekilde hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

2.1.2.17. 2N HCl Hazırlanması

179,53ml HCl 1000ml saf suya tamamlanmıştır [51].

2.2. YÖNTEM

2.2.1. *Rhizobium* Bakterilerinin İzolasyonu

Laboratuvara getirilen baklagil bitkilerinin köklerinden elde edilen nodüllerin yüzeyi aşağıdaki basamaklardan geçirilerek steril edilmiştir [51]:

Sıvı deterjan → Steril saf su → 70'lik Alkol (20sn) → Çamaşır suyu (3dk)
→ Steril saf su → Steril saf su → Yeast Extract Mannitol Agar (YEM agar)

En son aşamada nodül, steril bir pens yardımıyla patlatılmış ve içeriği ile Yeast Extract Mannitol Agar besiyerine çizgi ekim yapılarak 30°C'de 4-5 gün etüvde inkübe edilmiştir. Oluşan koloniler yatık YEM agara çekilmiş ve identifikasyon testleri yapılmak üzere %15'lik gliserol içeren ependorflarda -20°C'de saklanmıştır.

2.2.2. PHB Standardının Hazırlanması

0,01g PHB tartılmış, cam tüp içerisinde üzerine 10ml kloroform ilave edilmiş ve 60°C'de su banyosunda bekletilerek tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Tamamen çözüldükten sonra Çizelge 2.2'de verilen oranlarda PHB çözeltisi hazırlanmıştır [51].

Çizelge 2.2. PHB standardının hazırlanmasında kullanılan ana stok ve kloroform oranları

	<u>Ana stok</u>	<u>Kloroform</u>
1. Tüp	0,1ml	-
2. Tüp	0,9ml	0,1ml
3. Tüp	0,8ml	0,2ml
4. Tüp	0,7ml	0,3ml
5. Tüp	0,6ml	0,4ml
6. Tüp	0,5ml	0,5ml
7. Tüp	0,4ml	0,6ml
8. Tüp	0,3ml	0,7ml
9. Tüp	0,2ml	0,8ml

Çizelge 2.2’de oranı verilen karışımlardan 0,1ml alınarak uzun cam tüplere konulmuştur. 100°C’ye ayarlanan sterilizatörde tüplerin içindeki kloroform tamamen uçuncaya kadar bekletilmiştir. Üzerine 5ml sülfürik asit (Merck) ilave edilerek 100°C’de 10 dakika bekletilmiştir. 235nm dalga boyunda UV spektrofotometrede okutulmuştur. Kör olarak sülfürik asit kullanılmıştır [51].

2.2.3. PHB Üretim Yöntemi

1. *Rhizobium* bakterileri 6ml sıvı Yeast Extract Mannitol besiyeri içeren cam tüplere öze ile ekilerek 30°C’lik etüvde 4 gün aktifleştirilmiştir.
2. 250ml’lik erlenlere 100ml hazırlanan modifiye edilmiş Yeast Extract Mannitol besiyerine tüplerden 5ml örnek olacak şekilde %5’lik ekim yapılmıştır.
3. Hücre kültürleri 3 gün 30°C’de 150rpm’de çalkalamalı etüvde geliştirilmiştir.
4. Santrifüj tüplerinin darası alınmış ve üreme görülen erlenlerin içeriği 40.000g’de 30 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
5. Sıvı kısım atılarak elde edilen pelletler 50°C’de tamamen kuruyuncaya kadar etüvde bekletilmiştir.
6. Kuru hücre ağırlığı ölçüldükten sonra üzerine 5ml steril saf su eklenerek 3 dakika ultrasonik muamele yapılmıştır.
7. Küçük hacimli santrifüj tüplerinde 2ml hücre süspansiyonuna 2ml 2N HCl ilave edilmiş ve hazırlanan bu süspansiyon 100°C’de 2 saat sıcak su banyosunda bekletilmiştir.
8. Süre sonunda 6000g’de 20 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek PHB granülleri çöktürülmüştür. Süpernatant atılarak pellet üzerine 5ml kloroform ilave edilmiş ve vortekste karıştırılarak pelletin dağılması sağlanmıştır. Tüplerin ağzı kapatılarak 30°C’de 150rpm’de bir gece çalkalamalı etüvde bırakılmıştır.
9. Daha sonra 6000rpm’de 30 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.
10. Sıvı kısımdan 0,1ml alınarak cam tüplere konulmuş ve tüpler 100°C’de bekletilerek kloroformun tamamen uçması sağlanmıştır.
11. Üzerine 5ml sülfürik asit ilave edilerek 100°C’de 10 dakika bekletilmiştir. Sülfürik asit ve PHB birleşince krotonik asit meydana gelmektedir. 235nm

dalga boyunda UV spektrofotometrede okuma yapılmıştır. Kör olarak sülfürik asit kullanılmıştır.

12. Elde edilen ölçüm sonuçları ile hesaplamalar yapılmıştır [19].

2.2.4. İdentifikasyon Testleri

2.2.4.1. Gram Boyama

Lam üzerinde tespit edilmiş preparat üzerine kristal viyole damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Sonra fazla boya dökülerek iyot çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda saf su ile yıkanmış, %95'lik alkol ile 10 saniye muamele edilerek renksizleştirme işlemi yapılmıştır. Daha sonra 20 saniye safranin uygulanmış, saf su ile boya yıkandıktan sonra preparat kurutulmuş ve immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte incelenmiştir [52].

2.2.4.2. Kongo Kırmızısı İçeren Besiyerinde Gelişme

Steril petrilere dökülen besiyerine çizgi ekim yapılarak 30°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda agar üzerinde oluşan koloniler renk yönünden incelenmiştir.

2.2.4.3. Bromtimol Mavisi İçeren Besiyerinde Gelişme

Steril petrilere dökülen besiyerine çizgi ekim yapılarak 30°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda yeşil renkli olan besiyerinin rengindeki değişim incelenmiştir.

2.2.4.4. Farklı pH'da Gelişme

Sıvı YEM besiyeri hazırlanmış, ayrı olarak pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 8.0, 9.0, 9.5 olarak ayarlanmış, tüplere 3'er ml dağıtılmış ve daha önce aktifleştirilmiş

kültürden 30µl ekim yapılmıştır. 30°C'de 3-4 gün inkübe edilerek üremelerine bakılmıştır.

2.2.4.5. Farklı Sıcaklıkta Gelişme

Sıvı YEM besiyeri hazırlanmış, pH 6.8-7.0 olarak ayarlanmış, tüplere 3'er ml dağıtılmış ve daha önce aktifleştirilmiş kültürden 30µl ekim yapılmıştır. 30, 37 ve 40°C'de 3-4 gün inkübe edilerek üremelerine bakılmıştır.

2.2.4.6. Litmus Milk Besiyerinde Asit Reaksiyon

3ml litmus milk besiyeri içeren tüplere 30µl ekim yapılarak 30°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerinin renginde değişim olup olmadığı incelenmiştir.

2.2.4.7. Penisiline Direnç

Katı YEM besiyeri hazırlanarak petrilere dökülmüştür. Sıvı YEM besiyerinde aktifleştirilmiş bakteri kültüründen 30µl alınarak petrinin yüzeyine yayılmıştır. Petrinin ortasına 0,6cm'lik penisilin diski konularak 30°C'de 3-4 gün inkübe edilmiş ve zon oluşumunun olup olmadığı kontrol edilmiştir.

2.2.4.8. Şekerlerin Kullanımı

İçeriği 2.1.2.11'de verilen besiyerinden 3'er ml steril tüplere dağıtılmış ve sıvı YEM besiyerinde aktifleştirilen bakterilerden 30µl alınarak ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda üremeleri kontrol edilmiştir.

2.2.4.9. Hareketlilik

Hareketliliğe Asılı Damla Yöntemi ile bakılmıştır. Bu yöntemde, çukur lam adı verilen özel bir lam kullanılmıştır. Önce çukur lam temizlenmiş ve çukur kısmın dört yanına çok az miktarda immersiyon yağı sürülmüştür. Temiz bir

lamelin orta kısmına bir damla sıvı bakteri damlatılmıştır. Çukur lam ters çevrilerek, lamel üzerindeki kültür damlası çukur lamın tam ortasına gelecek şekilde, lamel üzerine yavaşça bırakılmıştır. Daha sonra preparat ters çevrilerek mikroskop tablasına yerleştirilmiş ve lamel üzerine bir damla immersiyon yağı damlatılarak 100'lük objektifte hareketlilik incelenmiştir [52].

2.2.4.10. %2'lik NaCl İçeren Besiyerinde Gelişme

Sıvı YEM besiyerinde aktiveleştirilen bakterilerden 30µl alınarak 2.1.2.12'de içeriği verilen, 3ml besiyeri içeren tüplere ekim yapılmış ve tüpler 30°C'de 3-4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üremeleri incelenmiştir.

2.2.5. Farklı Karbon Kaynaklarının PHB Miktarına Etkisinin Denenmesi

PHB üretim verimlerine bakılan 27 örnekten en fazla verim alınan beş örnek seçilmiş (R1, R4, R15, R17, R22) ve farklı karbon kaynaklarındaki verimlerine bakılmıştır. Aktifleştirme için bakteri 6ml agar bulunmayan YEM besiyeri içeren tüplere öze ile ekilmiştir. 30°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 2.1.2.2'de içeriği verilen *Rhizobium* için modifiye edilmiş YEM besiyerinden mannitol çıkarılarak farklı şekerler ayrı ayrı eklenmiş, 250ml'lik erlenlerde 100'er ml hazırlanarak aktif kültürden 5ml ekim yapılmıştır. Bundan sonraki işlemler 2.2.3'te verilen PHB üretim yöntemindeki 3-12. basamaklarla aynıdır. Bu deneme 7 farklı şeker çeşidi için yapılmıştır.

2.2.6. Farklı Azot Kaynaklarının PHB Miktarına Etkisinin Denenmesi

Seçilen beş örneğin (R1, R4, R15, R17, R22) farklı azot kaynaklarındaki verimlerine bakılmıştır. Aktifleştirme için bakteri 6ml agar bulunmayan YEM besiyeri içeren tüplere öze ile ekilmiştir. 30°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 250ml'lik erlenlerde 100ml 2.1.2.14'te içeriği verilen farklı azot kaynaklarının denenmesinde kullanılan fermentasyon ortamı hazırlanmış,

içine azot kaynağı ilave edilmiş ve steril edilerek aktif kültürden 5ml ekim yapılmıştır. Bundan sonraki işlemler PHB üretim yöntemindeki 3-12. basamaklarla aynıdır. Bu deneme 6 farklı azot kaynağı için yapılmıştır.

2.2.7. Farklı Çalkalama Hızlarının PHB Miktarına Etkisinin Denenmesi

Seçilen beş örnekten yüksek verim elde edilen R15 ve R17 suşlarının farklı çalkalama hızlarındaki verimlerine bakılmıştır. Öncelikle bakteriler aktifleştirilmiştir. Aktifleştirme için bakteri 6ml agar bulunmayan YEM besiyeri içeren tüplere öze ile ekilmiştir. 30°C'de 4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda R15 suşu için 2.1.2.16'da içeriği verilen fermentasyon ortamı 250ml'lik erlenlere 100'er ml hazırlanarak steril edilmiş ve R15 suşunun aktif kültüründen 5ml ekim yapılmıştır. Aynı şekilde R17 suşu için 2.1.2.16'da içeriği verilen fermentasyon ortamı 250ml'lik erlenlere 100'er ml hazırlanarak steril edilmiş ve R17 suşunun aktif kültüründen 5ml ekim yapılmıştır. Hücre kültürleri 3 gün 30°C'de 100rpm, 200rpm, 250rpm'de çalkalamalı etüvde geliştirilmiştir. Bundan sonraki işlemler 2.2.3'te verilen PHB üretim yöntemindeki 4-12. basamaklarla aynıdır.

2.2.8. Hesaplamalar

2.2.8.1. Kuru Hücre Ağırlığının (KHA) g/l'te Olarak Hesaplanması

$$\begin{array}{r}
 100\text{ml} \quad \text{tartılan KHA} \\
 1000\text{ml} \quad \quad x \\
 \hline
 x = \frac{1000 \cdot \text{tartılan KHA}}{100} = A \text{ g/l}
 \end{array}$$

2.2.8.2. PHB'nin g/l'te Olarak Hesaplanması

$$\begin{array}{r}
 1 \mu\text{g/ml}^{-1} \quad \text{standart optik dansite (OD)} \\
 \times \quad \text{spektrofotometrede okunan OD} \\
 \hline
 x = \frac{\text{spektrofotometrede okunan OD}}{\text{standart optik dansite (OD)}} = B \mu\text{g/ml}^{-1}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{r}
 0,1\text{ml} \quad B \mu\text{g/ml}^{-1} \\
 1\text{ml} \quad x \\
 \hline
 x = \frac{B \mu\text{g/ml}^{-1}}{0,1\text{ml}} = C \mu\text{g/ml}^{-1} : 1000 = D \text{ g/l'te PHB}
 \end{array}$$

2.2.8.3. % Verim Hesaplanması

$$\begin{array}{r}
 A \text{ g/l'te KHA} \quad D \text{ g/l'te PHB} \\
 100 \quad x \\
 \hline
 x = E \% \text{ Verim}
 \end{array}$$

3. BULGULAR

3.1. PHB Standardının Belirlenmesi

Standart PHB 2.2.2'de belirtilen işlemlerden geçirilmiş UV spektrofotometrede 235nm dalga boyunda kör olarak sülfürik asit kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Elde edilen ölçüm sonuçları $1\mu\text{g/ml}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PHB standardı

	$1\mu\text{g/ml}^{-1}$
1. Tüp	0,0045
2. Tüp	0,0046
3. Tüp	0,0033
4. Tüp	0,0040
5. Tüp	0,0035
6. Tüp	0,0032
7. Tüp	0,0030
8. Tüp	0,0030
9. Tüp	0,0029

Elde edilen 9 değer toplanarak 9'a bölünmüş ve PHB standardı 0,0035 olarak bulunmuştur.

3.2. İzole Edilen Örneklerin PHB Üretimlerinin Belirlenmesi

Çizelge 2.1'de *Rhizobium* bakterilerinin izole edildikleri bitkiler ve bu bitkilerin toplandığı yerler verilmiştir. Çizelgede yer alan 27 örnek 2.2.3'te verilen PHB üretim yöntemine tabi tutulmuştur. UV spektrofotometrede yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar ile 2.2.8'de verildiği şekilde hesaplamalar yapılarak her birinin ürettiği PHB'nin %verimi bulunmuştur.

Çizelge 3.2. Mannitol içeren fermentasyon ortamında geliştirilen *Rhizobium* bakterilerinin PHB verimleri

Örnek	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
R1	1,05	0,082	0,23	21,9
R2	0,65	0,023	0,07	10,77
R3	0,85	0,039	0,11	12,94
R4	1,1	0,087	0,25	22,72
R5	2,1	0,049	0,14	6,7
R6	1,05	0,071	0,20	19,04
R7	1,25	0,048	0,14	11,2
R8	0,95	0,053	0,15	15,79
R9	0,65	0,032	0,09	13,8
R10	1,2	0,068	0,19	15,8
R11	1,1	0,019	0,05	4,55
R12	2,15	0,049	0,14	6,5
R13	0,85	0,016	0,05	5,88
R14	0,9	0,015	0,04	4,44
R15	1,15	0,112	0,32	27,8
R16	1,2	0,074	0,21	17,5
R17	2,95	0,275	0,79	26,8
R18	1,85	0,076	0,22	11,89
R19	1,1	0,069	0,20	18,18
R20	1,4	0,083	0,24	17,14
R21	1,0	0,054	0,15	15
R22	1,25	0,095	0,27	21,6
R23	2,2	0,044	0,13	5,9
R24	2,2	0,036	0,10	4,5
R25	0,9	0,047	0,13	14,44
R26	1,3	0,061	0,17	13,08
R27	1,65	0,061	0,17	10,3

27 örnek üzerinde yapılan denemeler sonucunda, izolatlardan elde edilen PHB (g/lt) miktarları ve %verimleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. En düşük PHB miktarı 0,07g/lt ile R14 suşunda elde edilirken, en yüksek PHB miktarı ise 0,79g/lt ile R17 izolatından elde edilmiştir. PHB %verimleri ise %4,44-27,8 arasında değişmiştir. En yüksek verim elde edilen R1, R4, R15, R17, R22 suşları seçilerek bu suşların *Rhizobium* oldukları doğrulanmaya çalışılmıştır. Daha sonra ise bu suşlar ile farklı karbon ve azot kaynaklarının PHB verimlerine etkisinin belirlenmesi amacıyla denemelere tabi tutulmuştur.

3.3. İdentifikasyon Testleri

3.3.1. Gram Reaksiyonu

Gram boyama ile boyanan preparatlar mikroskopta incelenmiş ve pembe renkli çubuklar olarak gözlenmiştir. Gram(-) basil olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.3).

3.3.2. Kongo Kırmızısı İçeren Besiyerinde Gelişme

Kongo kırmızısı içeren besiyerinde inkübasyon süresi sonunda gelişen koloniler incelenmiş ve izolatlar ve NRRL B-4408 suşu açık pembe renkli koloniler olarak görülmüştür (Çizelge 3.3).

3.3.3. Bromtimol Mavisi İçeren Besiyerinde Gelişme

Bromtimol mavisi içeren besiyerinde inkübasyon süresi sonunda besiyerinin rengi incelenmiş ve izolatların ve NRRL B-4408 suşunun geliştirildiği besiyerinin başlangıçta yeşil olan renginin sarıya dönüştüğü görülmüştür (Çizelge 3.3).

3.3.4. Farklı pH'da Gelişme

Farklı pH'lardaki besiyerinde geliştirilen izolatların ve NRRL B-4408 suşunun inkübasyon sonunda üremeleri kontrol edilmiş ve izolatlarda pH 5'e kadar, NRRL B-4408 suşunda ise pH 4,5'e kadar üreme olmadığı görülmüştür (Çizelge 3.3).

3.3.5. Farklı Sıcaklıklarda Gelişme

Farklı sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerin üremelerine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3. 3'de verilmiştir.

3.3.6. Litmus Milk Besiyerinde Asit Reaksiyon

Litmus milk besiyerine ekim yapılan izolatların ve NRRL B-4408 suşunun inkübasyon süresi sonunda renk değişimine bakılmış ve besiyerinde renk değişimi görülmemiştir (Çizelge 3.3).

3.3.7. Penisiline Direnç

İzolatların ve NRRL B-4408 suşunun inkübasyon süresi sonunda, petrilere penisilin disklerinin etrafında zon oluşturduğu gözlenmiş ve oluşan zonların çapı ölçülmüştür (Çizelge 3.3).

3.3.8. Şeker Kullanımı

İzolatların inkübasyon sonunda farklı şekerlerde üremeleri incelenmiş ve üredikleri gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

3.3.9. Hareketlilik

Asılı Damla Yöntemi kullanılarak hazırlanan preparatlar mikroskopta incelenmiş ve izolatların ve NRRL B-4408 suşunun hareketli oldukları gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

3.3.10. %2'lik NaCl İçeren Besiyerinde Gelişim

İzolatların ve NRRL B-4408 suşunun inkübasyon süresi sonunda üremeleri incelenmiş ve izolatlarda üreme olmadığı, NRRL B-4408 suşunun ürediği gözlenmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. İdentifikasyon test sonuçları

	R1	R4	R15	R17	R22	NRRL B-4408
Gram reaksiyonu	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)	Gram (-)
Hücre şekli	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil	Basil
Kongo kırmızısı içeren besiyerinde koloni rengi	Pembe	Pembe	Pembe	Pembe	Pembe	Pembe
Bromtimol mavisi içeren besiyerinin son rengi	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı
Litmus milk besiyerinde asit reaksiyon	-	-	-	-	-	-
pH 3,5'de gelişim	-	-	-	-	-	-
pH 4'de gelişim	-	-	-	-	-	-
pH 4,5'de gelişim	-	-	-	-	-	+
pH 5'de gelişim	+	+	+	+	+	+
pH 8'de gelişim	+	+	+	+	+	+
pH 9'da gelişim	+	+	+	+	+	+
pH 9,5'de gelişim	+	+	+	+	+	+
30°C'de gelişim	+	+	+	+	+	+
37°C'de gelişim	+	+	-	-	+	+
40°C'de gelişim	-	-	-	-	-	+
Gukoz, galaktoz, fruktoz, arabinoz, ksiloz, ramnoz, maltoz, sukroz, laktoz, trehaloz, rafinoz, manitol, fumarat, malat süksinat, sitrat, piruvat'ın kullanımı	+	+	+	+	+	
Yeast Ekstrakt Mannitol Agarda hızlı gelişim	+	+	+	+	+	+
Hareketlilik	+	+	+	+	+	+
Ekzopolisakkarit üretimi	+	+	+	+	+	+
Penisiline Direnç (Zon çapı/cm)	0,8	0,8	2,4	2	0,8	3,3
%2'lik NaCl içeren besiyerinde gelişim	-	-	-	-	-	+

3. 4. Farklı Karbon Kaynaklarında Geliştirilen *Rhizobium* Bakterilerinin PHB Verimlerinin Belirlenmesi

27 izolattan en yüksek verim elde edilen R1, R4, R15, R17 ve R22 suşlarının farklı karbon kaynaklarında verimlerinin belirlenmesi amacıyla 2.2.5'te verildiği şekilde denemeye tabi tutulmuştur. Denemeler sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. R1 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/l	Optik Dansite	g/l PHB	% Verim
Mannitol	1,05	0,082	0,23	21,9
Sukroz	4,1	0,181	0,52	12,7
Glukoz	0,65	0,040	0,11	16,9
Arabinoz	1,7	0,143	0,40	23,5
Na süksinat	2,25	0,082	0,23	10,2
Na asetat	1,4	0,053	0,15	10,7
Na fumarat	2,9	0,129	0,37	12,8
Fruktoz	2,4	0,210	0,60	25

R1 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük glukozda, en yüksek sukroz içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/l) en düşük glukozda, en yüksek fruktoz içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük Na süksinatta, en yüksek fruktoz içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.5. R4 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/l	Optik Dansite	g/l PHB	% Verim
Mannitol	1,1	0,087	0,25	22,7
Sukroz	2,75	0,152	0,43	15,6
Glukoz	1,5	0,076	0,21	14
Arabinoz	2,15	0,162	0,46	21,4
Na süksinat	2,35	0,085	0,24	10,2
Na asetat	1,05	0,043	0,12	11,4
Na fumarat	1,65	0,086	0,24	14,5
Fruktoz	1,8	0,140	0,40	22,2

R4 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük Na asetatda, en yüksek sukroz içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/l) en düşük Na asetatda, en yüksek

arabinoz içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük Na süksinat, en yüksek mannitol içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.6. R15 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
Mannitol	1,15	0,112	0,32	27,8
Sukroz	2,2	0,131	0,37	16,8
Glukoz	1,7	0,081	0,23	13,5
Arabinoz	1,1	0,073	0,20	18,1
Na süksinat	2,9	0,125	0,35	12,1
Na asetat	0,25	0,015	0,04	10
Na fumarat	2,05	0,112	0,32	15,6
Fruktoz	1,1	0,074	0,21	19

R15 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük Na asetat, en yüksek Na süksinat içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük Na asetat, en yüksek sukroz içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük Na asetat, en yüksek mannitol içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.7. R17 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
Mannitol	2,95	0,275	0,79	26,8
Sukroz	2,25	0,136	0,39	17,3
Glukoz	1,15	0,059	0,17	14,7
Arabinoz	1,75	0,064	0,18	10,2
Na süksinat	2,95	0,110	0,33	10,5
Na asetat	1,2	0,049	0,14	11,6
Na fumarat	1,55	0,070	0,20	12,9
Fruktoz	1,95	0,103	0,29	14,9

R17 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük glukozda, en yüksek mannitolde ve Na süksinat içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük Na asetat, en yüksek mannitol içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük arabinozda, en yüksek mannitol içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.8. R22 bakterisinin farklı karbon kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
Mannitol	1,25	0,095	0,27	21,6
Sukroz	1,4	0,105	0,30	21,4
Glukoz	1,9	0,116	0,33	17,3
Arabinoz	1,05	0,078	0,22	20,9
Na süksinat	2,8	0,130	0,37	13,2
Na asetat	0,9	0,032	0,09	10
Na fumarat	1,15	0,058	0,16	13,9
Fruktoz	3,3	0,190	0,54	16,4

R22 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük Na asetat, en yüksek fruktoz içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük Na asetat, en yüksek fruktoz içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük Na asetat, en yüksek mannitol içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 8).

3.5. Farklı Azot Kaynaklarında Geliştirilen *Rhizobium* Bakterilerinin PHB Verimlerinin Belirlenmesi

27 izolattan en yüksek verim elde edilen R1, R4, R15, R17 ve R22 suşlarının farklı azot kaynaklarında verimlerinin belirlenmesi amacıyla 2.2.6'da verildiği şekilde denemeye tabi tutulmuştur. Denemeler sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13'te verilmiştir.

Çizelge 3.9. R1 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
KNO ₃	3,5	0,210	0,60	17,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	0,010	0,028	14,2
Glutamin	0,3	0,013	0,03	10
Glisin	-	-	-	-
Asparajin	2,45	0,129	0,36	14,6
Üre	2,95	0,158	0,45	15,2

R1 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük (NH₄)₂SO₄, en yüksek KNO₃ içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük (NH₄)₂SO₄, en yüksek KNO₃ içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük glutamin, en yüksek KNO₃ içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 9).

Çizelge 3.10. R4 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/l	Optik Dansite	g/l PHB	% Verim
KNO ₃	2,2	0,112	0,32	14,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25	0,011	0,03	12
Glutamin	0,35	0,015	0,04	11,4
Glisin	-	-	-	-
Asparajin	1,8	0,078	0,22	12,2
Üre	1,2	0,061	0,17	14,1

R4 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük (NH₄)₂SO₄, en yüksek KNO₃ içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/l) en düşük (NH₄)₂SO₄, en yüksek KNO₃ içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük glutamin, en yüksek KNO₃ içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 10).

Çizelge 3.11. R15 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/l	Optik Dansite	g/l PHB	% Verim
KNO ₃	0,9	0,036	0,10	11,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25	0,012	0,03	12
Glutamin	0,35	0,019	0,05	14,2
Glisin	-	-	-	-
Asparajin	1,9	0,113	0,32	16,8
Üre	1,15	0,071	0,20	17,3

R15 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük (NH₄)₂SO₄, en yüksek asparajin içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/l) en düşük (NH₄)₂SO₄, en yüksek asparajin içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük KNO₃, en yüksek üre içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 11).

Çizelge 3.12. R17 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/l	Optik Dansite	g/l PHB	% Verim
KNO ₃	2,75	0,155	0,44	16
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,35	0,018	0,05	14,2
Glutamin	0,85	0,038	0,11	12,9
Glisin	-	-	-	-
Asparajin	2,35	0,140	0,40	17
Üre	1,65	0,094	0,26	15,7

R17 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en yüksek KNO_3 içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en yüksek KNO_3 içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük glutamin, en yüksek asparajin içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 12).

Çizelge 3.13. R22 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
KNO_3	2,25	0,141	0,40	17,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,3	0,011	0,03	10
Glutamin	0,5	0,021	0,06	12
Glisin	-	-	-	-
Asparajin	2,1	0,112	0,32	15,2
Üre	1,45	0,074	0,21	14,4

R22 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en yüksek KNO_3 içeren ortamda elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en yüksek KNO_3 içeren ortamda elde edilmiştir. Verim ise en düşük $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, en yüksek KNO_3 içeren ortamda elde edilmiştir (Çizelge 13).

3.6. Farklı Çalkalama Hızlarında Geliştirilen *Rhizobium* Bakterilerinin PHB Verimlerinin Belirlenmesi

R1, R4, R15, R17 ve R22 suşlarından R15 ve R17 suşları en yüksek verim gösterdikleri karbon ve azot kaynakları seçilerek farklı çalkalama hızlarındaki PHB verimlerinin belirlenmesi amacıyla 2.2.7’de verildiği şekilde denemeye tabi tutulmuştur. Denemeler sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.14 ve 3.15’te verilmiştir.

Çizelge 3.14. R15 bakterisinin farklı çalkalama hızlarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
100rpm	0,4	0,041	0,11	28,7
200rpm	0,3	0,029	0,08	26,6
250rpm	0,6	0,046	0,13	21,6

R15 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük 200rpm'de, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük 200rpm, en yüksek 250rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. Verim ise en düşük 250rpm, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir (Çizelge 14).

Çizelge 3.15. R17 bakterisinin farklı azot kaynaklarındaki PHB verimi

	Kuru Hücre Ağırlığı g/lt	Optik Dansite	g/lt PHB	% Verim
100rpm	0,9	0,079	0,22	25
200rpm	0,6	0,059	0,16	28
250rpm	0,6	0,049	0,14	23,3

R17 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük 200 ve 250rpm'de, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük 250rpm'de, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. Verim ise en düşük 250rpm'de, en yüksek 200rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir (Çizelge 15).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Endüstriyel polimerler genellikle petrokimyasal kaynaklıdır. Petrol kökenli plastikler, ucuz olarak ve büyük hacimlerde üretilebilmesinden dolayı uzun yıllardır kullanılmaktadır [6]. Fakat bu materyaller doğanın hücumuna karşı oldukça dirençli olmakta ve hem karada hem de denizde büyük problemlere yol açmaktadır [5].

Bu nedenlerden dolayı, bakterilerde spesifik koşullarda intraselular karbon ve enerji kaynağı olarak görev yapan ve biyoparçalanabilir özelliğe sahip olan PHB'nin, endüstriyel uygulamaları için yapılan çalışmalar önem kazanmıştır [38].

Yapılan çalışmalarda hızlı gelişen *Rhizobium* bakterilerinin (*Rhizobium leguminosarum* subsp. *phaseoli*, *R. leguminosarum* subsp. *trifolii* ve *R. meliloti*) serbest hücrelerinin ve bakteroidlerdeki hücrelerinin çeşitli polimerleri sentezledikleri bildirilmiştir. Benzer şekilde yapılan diğer çalışmalarda da *Rhizobium* bakterilerinin karbon depo ürünü olarak PHB sentezledikleri belirtilmiştir [38].

Çalışmamızda baklagil bitkilerinin köklerinde bulunan nodüllerden *Rhizobium* bakterileri izole edilmiş ve bu izolatların PHB sentezleri incelenmiştir. İzole edilen 27 *Rhizobium* suşunun PHB miktarı 0,04 ile 0,79g/lt arasında değişmiştir. Çeşitli bitkilerden elde edilen *Rhizobium* bakterilerinin PHB miktarları ve %verimleri suşlara göre büyük ölçüde değişiklik göstermiştir. En yüksek verimler *Phaseolus vulgaris* L. bitkilerinden elde edilen *Rhizobium* suşlarında saptanmıştır.

Bulduğumuz sonuçlara uygun olarak, Nair ve ark. [27] farklı ekolojik rejimlerde bulunan baklagillerin nodüllerinden izole ettikleri 45 rhizobia suşu ile yaptıkları denemelerde PHB içeriğinde büyük bir oranda farklılık olduğunu bulmuşlardır. Bu çeşitliliğin suşa spesifik olduğunu ve suş farklılaşması için taksonomik bir karakter olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Örneğin gövde nodüllerinden izole ettikleri rhizobial suşların PHB oranlarında belirgin olarak farklılık olduğunu bulmuşlardır. Benzer olarak, farklı ekolojik rejimlerde bulunan aynı baklagil türlerinden izole edilen suşların çok farklı PHB içeriğine sahip olduğunu bulmuşlardır.

Tombolini ve Nuti, *Rhizobium* bakterilerinin kuru hücre ağırlığının %55'ine kadar PHB biriktirebildiğini bildirmiştir [34]. Yapılan bir diğer çalışmada da, bakteroidlerin, biyomasının %50'sine kadar PHB biriktirdiğini belirtmişlerdir [18].

Çalışmamızda en yüksek verim aldığımız R1, R4, R15, R17 ve R22 suşlarının gram reaksiyonu, hücre şekli, kongo kırmızısı içeren besiyerinde, bromtimol mavisi içeren besiyerinde, farklı pH'da, farklı sıcaklıklarda ve %2'lik NaCl içeren besiyerinde gelişme, litmus milk besiyerinde asit reaksiyon, penisiline direnç, şeker kullanımı, YEM agar besiyerinde hızlı gelişim, hareketlilik, ekzopolisakkarit üretimi gibi özellikleri incelenmiştir. İncelenen bu özellikler büyük çoğunlukla Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de verilen *Rhizobium* bakterilerinin özelliklerine uygunluk göstermektedir. Ancak bu sonuçlarla tam bir identifikasyon yapılamamıştır.

Elkan ve Bunn, *Rhizobium* türlerinin başlangıçta baklagil bitkileriyle ilişkilerine dayandırılarak sınıflandırıldığını ve *Rhizobium* bakterilerinin baklagil bitkilerinde nodül oluşturma yeteneği ile doğrulandığını bildirmiştir. *Rhizobium* bakterilerinin baklagil bitkilerini enfekte etmesi ve nodül oluşumu enfektivite, konukçu spesifitesi, etkinlik ve nodül yerleşimi için esas rhizobia ile rekabet gibi birçok faktöre bağlı olduğundan bu işlemlerin yapılması oldukça güç olmakta ve bunların seralarda ve arazilerde tespit edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda ise serolojik testler, antibiyotik direnci, genetik işaretleyiciler, plazmidler ve DNA-DNA hibridizasyonu gibi testler kullanılarak tam bir identifikasyon yapılabilmektedir [30]. Çalışmamızda gram reaksiyonu, hücre şekli, kongo kırmızısı içeren besiyerinde ve bromtimol mavisi içeren besiyerinde gelişim, litmus milk besiyerinde asit reaksiyon, penisiline direnç, şeker kullanımı, YEM agar besiyerinde hızlı gelişim, hareketlilik, ekzopolisakkarit üretimi gibi özellikler Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de verilen *Rhizobium* bakterilerinin özelliklerine uygunluk göstermiştir. Jordan [29] *Rhizobium* bakterilerinin karbonhidrattan asit ürettiklerini, bununda en iyi bromtimol mavisi indikatörü kullanılarak gösterilebileceğini belirtmiştir. Çalışmamızda bromtimol indikatörü kullanılarak asit üretimleri belirlenmiştir. Buna karşılık, %2'lik NaCl içeren besiyerinde, farklı pH'da ve sıcaklıkta gelişim özelliklerinde sapmalar olmuştur.

Ancak suşlar baklagil bitkilerinin nodüllerinden izole edildiğinden *Rhizobium* olarak adlandırılmıştır.

Yaptığımız çalışmada, yüksek verim elde edilen 5 izolatın farklı karbon kaynaklarındaki PHB verimleri incelenmiştir. Bu denemelerde, kullanılan suşlarda verim açısından en uygun şekerin mannitol olduğunu bulunmuştur. Denenen farklı karbon kaynaklarındaki kuru hücre ağırlıkları R1, R4, R15 suşlarının suzrozda, R17 suşunun mannitol ve Na süksinatta, R22 suşunun ise fruktoz içeren besiyerinde yüksek olduğu bulunmuştur. Farklı karbon kaynaklarında PHB g/lit olarak karşılaştırıldığında R1 ve R22 suşlarının fruktozda, R4 suşunun arabinozda, R15 suşunun sukrozda, R17 suşunun ise mannitol içeren besiyerinde yüksek olduğu bulunmuştur. PHB verimleri karşılaştırıldığında ise R1 suşu fruktozda, R4, R15, R17 ve R22 suşları mannitol içeren besiyerinde yüksek verim vermiştir. En yüksek verim mannitol içeren besiyerinde geliştirilen R15 suşunda %27.8 olarak tespit edilmiştir.

Benzer bir çalışmada, Bonartseva ve ark. [54] farklı karbon ve azot kaynaklarında geliştirilen farklı *Rhizobium* bakterilerinin hücrelerindeki PHB içeriğini araştırmışlar ve maksimum PHB içeriğinin kültürün tipine bağlı olduğunu saptamışlardır. *R.trifolii* 348a ve 346a suşlarında NO_3^- veya NH_4^+ varlığında denedikleri farklı karbon kaynaklarından (glukoz, arabinoz, mannitol, süksinat, süksinat+ NH_4^+ , fumarat, fumarat+ NH_4^+ ve asetat) en yüksek verimi 348a suşunda süksinat+ NH_4^+ 'te, 346a suşunda ise glukozda elde etmişlerdir. *R.meliloti* 425a ve 434a suşlarında yaptıkları denemelerde 425a suşunda en yüksek verimi fumarat+ NH_4^+ 'te, 434a suşunda ise glukozda elde etmişlerdir. *R.phaseoli* 673 ve 680 suşlarında yaptıkları denemelerde 673 suşunda en yüksek verimi glukozda, 680 suşunda ise fumarat+ NH_4^+ 'te elde etmişlerdir. *R.trifolii*'de PHB içeriğinin aktif suşda (348a) düşük aktiviteli suşdan (346a) daha yüksek olduğunu ve kuru hücre ağırlığının %45'ine ulaştığını belirtmişlerdir. Ayrıca süksinat, fumarat ve asetat gibi organik asitler kullanıldığında daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Sukroz ve glisinde geliştirilen daha az aktif suş *R. meliloti* 434a'da ise PHB içeriğinin çok yüksek olduğunu saptamışlardır (kuru hücre ağırlığının %59 kadarı). Farklı karbon ve azot kaynaklarında geliştirilen tüm *Rhizobium* suşları

arasında en yüksek sukroz ve nitratta geliştirilen az aktif *R. phaseoli* suşunda kuru hücre ağırlığının %65'i kadar PHB birikimi elde etmişlerdir.

Tavernier ve ark. [38] *Rhizobium meliloti*'nin iki suşu (M5N1 ve Su47) ile hücre gelişimi, pH ve ekzopolisakkarit ve PHB üretimi üzerinde farklı azot ve karbon kaynaklarının etkilerini çalışmışlar ve özellikle M5N1 suşunda, glukoz ve fruktozda gelişen hücrelerin davranışlarında farklılıklar görmüşlerdir. Glukoz içeren ortamda gelişmeyi, hücre ölümünü izleyen kültür ortamının asidifikasyonu eşlik etmiştir. Fruktozda asidifikasyon, yalnızca mineral azotun sağlanması ile tespit edilmiştir. PHB içeriğindeki bir azalma, ortamda asidifikasyonun meydana geldiği koşullar altında her iki suş için de belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada, glukoz ve fruktoz içeren besiyerinin pH'sında düşme, sukroz, Na süksinat, Na asetat ve Na fumarat içeren besiyerinde yükselme, arabinozda ise R1 ve R4 suşunda düşme, R15, R17 ve R22 suşunda yükselme görülmüştür.

Tavernier ve ark. [38] karbon kaynağı olarak fruktoz kullandıklarında M5N1 suşunun %30-84.5, Su47 suşunun 32.8-66 arasında PHB biriktirdiğini, glukoz kullandıklarında ise M5N1 suşunun %40-44.1, Su47 suşunun 23.6-70.3 arasında PHB biriktirdiğini bulmuşlardır. Karbon ve azot kaynaklarının *R. meliloti* M5N1 ve Su47 suşlarında hem biyomas oluşumunu hem de biyopolimer üretimini etkilediğini belirtmişlerdir.

PHB'nin endüstriyel çapta üretimini sınırlayan faktörlerden biri ucuz hammadde sağlanmasıdır. Page [9] şeker ve kompleks azot kaynakları içeren ortamda *Azotobacter vinelandii* UWD ile PHB üretimini araştırmış ve *A. vinelandii* UWD'nin havalandırılmış batık kültürlerinde saf şeker içeren ortamda <1g PHB/lt ve şeker kamışı melası, mısır şurubu veya malt ekstrakt içeren ortamda ≤3g PHB/lt oluşturduğunu bulmuştur. Bununla birlikte, %5 pancar melası içeren ortamda geliştirildiğinde >7g PHB/lt elde edilmiştir. PHB ürününün artışının kompleks azot kaynağına ek olarak, saf veya arıtılmamış şekerleri içeren ortamda desteklendiğini belirtmiştir. En yüksek PHB miktarını, balık peptonu içeren ortamda glukozda ve mısır şurubunda elde etmiştir. Bunu sırasıyla malt ekstrakt, sukroz, fruktoz, şeker kamışı melası izlemiş ve en düşük maltozda bulmuştur.

Füchtenbuch ve ark. [26] çalışmalarında birkaç bakteride gelişme için karbon kaynağı olarak biyoteknolojik ramnoz üretiminden atık yağı kullanabildiğini göstermişlerdir. *Ralstonia eutropha* H16 ve *Pseudomonas oleovorans*'ın gelişim için ve PHA birikimi için tek karbon kaynağı olarak bu atık materyali kullanabilmiştir. *R.eutropha* H16 ve *P.oleovorans*'ın suşlarının tek karbon kaynağı olarak ramnoz üretiminin atık yağı ile mineral tuz ortamında kültür edildiği zaman, kuru hücre ağırlığının %38.9-41.3 arasında PHA biriktirdiğini bildirmişlerdir.

Bertrand ve ark. [60] *Pseudomonas pseudoflava* ile pentozlardan PHA'nın biyosentezini çalışmışlar ve bu mikroorganizmanın gelişimi için karbon ve enerji kaynağı olarak kavak ağacının hemiselulozik fraksiyonundan bir hidrolizat kullanabildiğini bulmuşlardır. Bununla birlikte, batık kültürde hidrolizat konsantrasyonunun %30'dan daha yüksek olduğunda gelişimi tamamen inhibe edilmiştir. *P.pseudoflava* batık kültürde hemiseluloz varlığında daha fazla şekerde geliştirildiğinde ve karbon kaynağı olarak glukoz, ksiloz veya arabinoz kullandığında PHB biriktirmiştir. Glukoz ve ksilozda kuru hücre ağırlığının %22'si, arabinozda ise %17'si kadar PHB içeriği elde etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, yüksek verim elde edilen 5 izolatin farklı azot kaynaklarındaki PHB verimleri incelenmiştir. Bu denemelerde, kullanılan suşlarda verim açısından en uygun azot kaynağının KNO_3 olduğunu bulunmuştur. Denenen farklı azot kaynaklarındaki kuru hücre ağırlıkları karşılaştırıldığında R1, R4, R17, R22 suşlarının KNO_3 'te, R15 suşunun asparajin içeren besiyerinde yüksek olduğu bulunmuştur. Farklı azot kaynaklarında PHB g/lt olarak karşılaştırıldığında R1, R4, R17 ve R22 suşlarında KNO_3 'te, R15 suşunda ise asparajin içeren besiyerinde yüksek olduğu bulunmuştur. PHB verimleri karşılaştırıldığında ise R1, R4 ve R22 suşlarında KNO_3 'te, R15 suşunda ürede, R17 suşunda asparajin içeren besiyerinde yüksek verim vermiştir. En yüksek verim KNO_3 içeren besiyerinde geliştirilen R22 suşunda %17.7 olarak tespit edilmiştir.

Benzer bir çalışmada, Bonartseva ve ark. [54] karbon kaynağı olarak sukroz kullanarak farklı azot kaynaklarında (KNO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, glutamin, üre, asparajin, glisin) geliştirilen farklı *Rhizobium* bakterilerinin hücrelerindeki PHB

içeriğini araştırmışlar ve *R.trifolii* 348a ve 346a suşlarında en yüksek verimi glutaminde elde etmişlerdir. *R.meliloti* 425a ve 434a suşlarında yaptıkları denemelerde en yüksek verimi glisinde elde etmişlerdir. *R.phaseoli* 673 ve 680 suşlarında yaptıkları denemelerde 673 suşunda en yüksek verimi glutamin ve ürede, 680 suşunda ise KNO_3 'te elde etmişlerdir.

Çalışmamızda kullandığımız azot kaynaklarında yaptığımız ölçüm sonucunda $(NH_4)_2SO_4$, glutamin, üre ve asparagin içeren besiyerinde pH'da düşme, KNO_3 'te ise yükselme tespit edilmiştir. Azot kaynağı olarak glisin kullanıldığında *Rhizobium* bakterilerinin üremedikleri gözlenmiştir. Jordan [29] *Rhizobium* bakterilerinin azot ihtiyaçlarını nitrat, amonyum tuzları ve birçok aminoasit tarafından karşılayabildiklerini, glisin gibi bazı aminoasitlerin ise inhibitör etkisi yaptığını belirtmiştir. Çalışmamızda ayrıca Na süksinat, Na fumarat ve Na asetat gibi organik asitler kullanıldığında çoğunlukla PHB veriminin daha düşük olduğu saptanmıştır.

Denemelerimizde havalandırmanın PHB üretimine etkisi denenmiş ve bunun için çalkalayıcıda 100, 200 ve 250rpm'de çalışılmıştır. Farklı çalkalama hızlarında denenen R15 ve R17 suşlarından, R15 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük 200rpm'de, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük 200rpm, en yüksek 250rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. Verim ise en düşük 250rpm, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir.

R17 suşunda kuru hücre ağırlığı en düşük 200 ve 250rpm'de, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. PHB miktarı (g/lt) en düşük 250rpm'de, en yüksek 100rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. Verim ise en düşük 250rpm'de, en yüksek 200rpm hızdaki çalkalamada elde edilmiştir. Bu organizmalarda çalkalamanın PHB üretimine belirgin bir etkisi olmadığı saptanmıştır.

Benzer bir çalışmada, Ateş [49] *Alcaligenes latus* IAM 12599, *Alcaligenes latus* LMG 3325, *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM) ile yaptığı denemelerde, 60, 80, 100, 120, 140, 160rpm'de çalışmış ve 4 organizmada da çalkalamanın PHB üretimine belirgin bir etkisinin olmadığını belirtmiştir.

PHB gibi intraselular depo materyalleri, uygun ortamlarda özel bir makro elementin (C, H, N, O) veya mikroelementin (P, S, Fe, Mg, vs.) tamamen olmadığı veya optimumun altındaki yoğunluklarda bulunması gibi dengesiz büyüme koşullarında sentezlenmektedir [7]. Bonartseva ve ark. [35] bazı *Rhizobium* suşlarında PHB içeriği ve nitrogenaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi araştırmış ve anaerobik koşullar altında nitratsız CS-7 ortamında gelişim sırasında *R.japonicum* 646 ve *R.vigna* 164 suşlarının sırasıyla kuru hücre ağırlığının %21 ve %18'i kadar PHB sentezlediğini, nitrogenaz aktivitesinin ise bu koşullarda düşük olduğunu bulmuşlardır. Buna karşılık, nitrat içeren ortamda geliştirildiklerinde, nitrogenaz aktivitesinin nitrat içermeyen aynı koşullardakinden 10 kat daha fazla olduğunu, PHB'nin ise nitratin varlığında minimum olduğunu bulmuşlardır.

Wang ve Lee [43] *Alcaligenes latus* ile PHB üretiminde nitrojen sınırlılığının etkisini araştırmışlar ve batık kültürde PHB sentezi oranında, nitrojen sınırlılığı uygulamasıyla önemli derecede artış olabildiğini belirtmişlerdir. PHB içeriğinin, batık kültürde nitrojen sınırlılığının uygulanmasıyla yeterli nitrojen koşullarında tipik olarak elde edilenden (%50) çok daha yüksek olarak %87'ye kadar artabildiğini bulmuşlardır.

Yaptığımız çalışmada, yapılan diğer çalışmalara göre daha düşük verimler elde edilmiştir. Bunun sebebi, çalışmamızda *Rhizobium* bakterileri için optimum sıcaklık ve pH kullanmış olmamızdan kaynaklanmış olabilir. Nair ve ark. [27] rhizobia'nın gelişme için optimum olan sıcaklıklarda PHB içeriğinin minimum olduğunu, ekstrem sıcaklıklarda (suboptimal ve supraoptimal), strese cevap olarak PHB birikiminin nispeten daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Sardesai ve Babu'nun [37] yaptığı çalışmada, soğuk olmayan bir iklime alıştıran *Rhizobium* DDSS69 kültürlerinin PHB içeriğinde soğuk stresin bir azalmaya yol açtığını, buna karşılık, soğuk bir iklime alıştıran *Rhizobium* ATR1 suşunun soğuk stresi altında hem PHB seviyesi hem de PHB metabolizmasının enzimlerinin aktivitesinde önemli herhangi bir değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir. Çalışmalarında 28°C'de geliştirilen DDSS69 suşunun PHB içeriğinin (10,59mg.g⁻¹) 5°C'de (5,99mg.g⁻¹) geliştirilen kültüründe yaklaşık %40 daha düştüğünü, buna karşılık, ATR1 suşunun 5°C'de geliştirilen kültürlerinin

PHB seviyelerinin ($97,80\text{mg.g}^{-1}$) 28°C 'de geliştirilen kültürlerinden ($81,25\text{mg.g}^{-1}$) %20 daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Düşük verim elde edilmiş olmasının diğer bir sebebi de, *Rhizobium* bakterileri için fermentasyon süresinin uzun tutulmuş olmasından kaynaklanmış olabilir. Araştırmacılar, *Rhizobium* bakterilerinin PHB üretimlerinin, suşa ve kültür şartlarına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında bazı *Rhizobium* suşlarının karbonhidratlı substratlarda üretilmesinde PHB ürettikleri, fakat besi ortamında karbonhidratların azalması ile üretilen PHB'nin metabolize edildiğini belirtmişlerdir [2].

Bonartseva ve ark. [54] yaptıkları çalışmalarda *R.phaseoli* strainlerinin kuru hücre ağırlığının %65'ine kadar PHB biriktirebildiğini ve elde ettiklere bilgilere dayanarak bu suşun, PHB sentezinin koşullarının optimum hale getirilmesinden sonra endüstriyel üretim amacıyla kullanabileceğini belirtmişlerdir.

Enüstriyel PHB üretiminde, basit substratlarda iyi geliştiği ve yüksek miktarda PHB depoladığı (kuru hücre ağırlığının %80'i) için *Alcaligenes eutrophus* daha fazla kullanılmasına rağmen, *Rhizobium* bakterileri ile ilgili çalışmaların artmasıyla ve dezavantajlarının ortadan kaldırılmasıyla ileride belki de daha uygun bir üretici haline gelecektir.

Bazı fabrika atıklarının karbon kaynağı olarak kullanılması ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Eskişehir'de ve ülkemizde bol miktarda bulunması ve ucuz olması nedeniyle, şeker fabrikalarının bir atığı olan pancar melasının karbon kaynağı olarak kullanılması mümkündür. Bu şekilde hem atık maddelerin değerlendirilmesi hem de PHB üretiminin maliyetinde büyük bir sorun olan pahalı substratların kullanımına bir alternatif olacaktır.

Bu denemelerin devamında farklı pH, farklı sıcaklık, farklı şeker konsantrasyonlarının, farklı inkübasyon sürelerinin PHB miktarına etkisi incelenerek ve *Rhizobium* bakterileri için optimum şartlar belirlenerek verim artırılmasına çalışılabilir. Ayrıca melas, şilempe, peynir altı suyu gibi fabrika atıklarının ucuz substratlar olarak kullanımına yönelik çalışmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

1. NOURBAKHS, M., *Alcaligenes eutrophus* Mikroorganizması ile Biyopolimer Üretiminin İncelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1995.
2. BEYATLI, Y., *Mikrobiyal Termoplastik Üretimi*, Kükem Dergisi, **19**, 23-32, (1996.)
3. FANG, Q. ve HANNA, M.A., *Preparation and Characterization of Biodegradable Copolyester-Starch Based Foams*, Bioresource Technology, **78**, 115-122 (2001).
4. GÜRSEL, İ. ve HASIRCI, V., *Mikroorganizmal Kökenli Biyopolimerler*, Bilim ve Teknik Dergisi, **334**, 97-98 (1995).
5. HUANG, J.C., SHETTY, A.S. ve WANG, M.S., *Biodegradable Plastics: A Review*, Advances in Polymer Technology, Vol. 10, No. 1, 23-30, 1990.
6. BYROM, D., *Polymer Synthesis by Microorganisms: Technology and Economics*, TIBTECH, Vol. 5, 246-250, 1987.
7. LAFFERTY, R.M., KORSATKO, B. ve KORSATKO, *Biotechnology*, W, Rehm, H.J. ve Reed, G. (ed), Volume 6b, Weinheim, Germany, 1988.
8. HAYWOOD, G.W., ANDERSON, A.J. ve DAWES, E.A., *A Survey of the Accumulation of Novel Polyhydroxyalkanoates by Bacteria*, Biotechnology Letters, Vol. 11, No. 7, 471-476, 1989.
9. PAGE, W.J., *Production of Poly- β -hydroxybutyrate by Azotobacter vinelandii UWD in Media Containing Sugars and Complex Nitrogen Sources*, Appl Microbiol Biotechnol, **38**: 117-121, 1992.
10. LEE, S.Y. ve CHOI, J.I., *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Chapter 51. (Ed) Atlas, R.M., Cohen, G., Hershberger, C.L., Hu, W.S., Sherman, D.H., Willson, R.C., Wu, J.H.D., Washington, D.C.
11. ANDERSON, A.J., HAYWOOD, G.W., WILLIAMS, D.R. ve DAWES, E.A., *The Production of Polyhydroxyalkanoates from Unrelated Carbon Sources*, Novel Biodegradable Microbial Polymers, 119-129, 1990.

12. GARCIA, B., OLIVERAS, E.R., MINAMBRES, B., VALVERDE, M.F., CANEDO, L.M., PRIETO, M.A., GARCIA, J.L., MARTINEZ, M. ve LUENGO, J.M., *Novel Biodegradable Aromatic Plastics from a Bacterial Source*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No. 41, pp. 29228-29241, 1999.
13. PAGE, W.J., *Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Natural Biodegradable Plastics With a Great Future*, Can.J.Microbiol., Vol. 41, 1-3, 1995.
14. HRABAK, O., *Industrial Production of Poly- β -hydroxybutyrate*, FEMS Microbiology Reviews, 103, 251-256, 1992.
15. MADISON, L.L. ve HUISMAN, G.W., *Metabolic Engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 63, No. 1, p. 21-53, 1999.
16. KANSIZ, M., JACOB, H.B. ve McNAUGHTON, D., *Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant Escherichia coli Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 66, No. 8, p. 3415-3420, 2000.
17. ALIO, C.P., MAS, J. ve GUERRERO, R., *The Influence of Poly- β -hydroxybutyrate Accumulation on Cell Volume and Buoyant Density in Alcaligenes eutrophus*, Arch Microbiol, 143: 178-184, 1985.
18. ANDERSON, A.J. ve DAWES, E.A., *Occurrence, Metabolism, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Microbiological Reviews, Vol. 54, No. 4, p. 450-472, 1990.
19. BONARTSEVA, G.A. ve MYSHKINA, V.L., *Fluorescence Intensity of Strains of Nodule Bacteria (Rhizobium meliloti and Rhizobium phaseoli) Differing in Activity, Grown in the Presence of the Lipophilic Vital Stain Phosphine 3R*, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the USSR, Vol. 54, No. 4, pp. 661-667, 1985.
20. HAYWOOD, G.W., ANDERSON, A.J., CHU, L. ve DAWES, E.A., *Characterization of Two 3-Ketothiolases Possessing Differing Substrate Specificities in the Polyhydroxyalkanoates Synthesizing Organism Alcaligenes eutrophus*, FEMS Microbiology Letters, 52, 91-96, 1988.

21. ANDERSON, A.J., HAYWOOD, G.W. ve DAWES, E.A., *Biosynthesis and Composition of Bacterial Poly(hydroxyalkanoates)*, Int. J. Biol. Macromol., Vol. 12, 102-105, 1990.
22. CHARLES, T.C., CAI, G. ve ANEJA, P., *Megaplasmid and Chromosomal Loci for the PHB Degradation Pathway in Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, Genetics, 146, 1211-1220, 1997.
23. MANDON, K., REYDELLET, N.M., ENCARNACION, S., KAMINSKI, P.A., LEIJA, A., CEVALLOS, M.A., ELMERICH, C. ve MORA, J., *Poly- β -hydroxybutyrate Turnover in Azorhizobium caulinodans is Required for Growth and Affects nifA Expression*, Journal of Bacteriology, Vol. 180, No. 19, p. 5070-5076, 1998.
24. KIM, S.A. ve COPELAND, L., *Acetyl Coenzyme A Acetyltransferase of Rhizobium sp. (cicer) Strain CC 1192*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 9, p. 3432-3437, 1997.
25. MORINAGA, Y., YAMANAKA, A.I. ve HIROSE, Y., *Growth Characteristics and Cell Composition of Alcaligenes eutrophus in Chemostat Culture*, Agric. Biol. Chem., 42(2), 439-444, 1978.
26. FÜCHTENBUSCH, B., WULLBRANDT, D. ve STEINBÜCHEL, A., *Production of Polyhydroxyalkanoic Acids by Ralstonia eutropha and Pseudomonas oleovorans from an Oil Remaining from Biotechnological Rhamnose Production*, Appl Microbiol Biotechnol, 53: 167-172, 2000.
27. NAIR, S., JHA, P.K. ve BABU, C.R., *Variation in Poly- β -hydroxybutyrate Synthesis in Rhizobia Reflects Strain Differentiation and Temperature Regulation*, J. Basic Microbiol., 33, 35-39, 1993.
28. KIM, B.S., *Production of poly(3-hydroxybutyrate) from Inexpensive Substrates*, Enzyme and Microbial Technology, 27, 774-777, 2000.
29. JORDAN, D.C., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Krieg, N.R.(ed), Vol. 1, p. 235, USA, 1984
30. ELKAN, G.H. ve BUNN, C.R., *The Prokaryotes*, Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H.(ed), Vol. 3, p. 2197, 1992.

31. HALKMAN, K., *Tarım Mikrobiyolojisi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 1991.
32. KO, Y.H. ve GAYDA, R., *Nodule Formation in Soybeans by Exopolysaccharide Mutants of Rhizobium fredii USDA 191*, Journal of General Microbiology, 136, 105-113, 1990.
33. AYHAN, K., *Rhizobium Bakterilerindeki Nodülasyon Genlerinin Fonksiyonları ve Regülasyonu*, Kükem Dergisi, Cilt: 17, Sayı: 2, 43-48, 1994.
34. POVOLO, S., TOMBOLINI, R., MOREA, A., ANDERSON, A.J., CASELLA, S. ve NUTI, M.P., *Isolation and Characterization of Mutants of Rhizobium meliloti Unable to Synthesize Poly- β -hydroxybutyrate*, Can. J. Microbiol., 40: 823-829, 1994.
35. BONARTSEVA, G.A., MYSHKINA, V.L. ve ZAGREBA, E.D., *Relationship Between Poly- β -hydroxybutyrate Content and Nitrogenase and Hydrogenase Activity in Some Strains of Rhizobium*, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the USSR, Vol. 58, No. 6, pp. 920-922, 1989.
36. KARR, D.B., WATERS, J.K., SUZUKI, F. ve EMERICH, D.W., *Enzymes of the Poly- β -hydroxybutyrate and Citric Acid Cycles of Rhizobium japonicum Bacteroids*, Plant Physiol., 75, 1158-1162, 1984.
37. SARDESAI, N., BABU, C.R., *Poly- β -hydroxybutyrate Metabolism Is Affected by Changes in Respiratory Enzymatic Activities Due to Cold Stress in Two Psychrotrophic Strains of Rhizobium*, Current Microbiology, Vol. 42, pp. 53-58, 2001.
38. TAVERNIER, P., PORTAIS, J.C., SAUCEDO, J.E.N., COURTOIS, J., COURTOIS, B. an BARBOTIN, J.N., *Exopolysaccharide and Poly- β -hydroxybutyrate Coproduction in Two Rhizobium meliloti Strains*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 1, p. 21-26, 1997.
39. ISHIZAKI, A. ve TANAKA, K., *Production of Poly- β -hydroxybutyric Acid from Carbon Dioxide by Alcaligenes eutrophus ATCC 17697*, Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 71, No. 4, 254-257, 1991.
40. KIM, G.J., YUN, K.Y., BAE, K.S. ve RHEE, Y.H., *Accumulation of Copolyesters Consisting of 3- hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by*

- Alcaligenes sp. SH-69 in Batch Culture*, Biotechnology Letters, Vol. 14, No. 1, 27-32, 1992.
41. DOI, Y., TAMAKI, A., KUNIOKA, M. ve SOGA, K., *Production of Copolyester of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from Butyric and Pentanoic Acids*, Appl Microbiol Biotechnol, 28: 330-334, 1988.
42. HIRAMITSU, M., KOYAMA, N. ve DOI, Y., *Production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Alcaligenes latus*, Biotechnology Letters, Vol. 15, No. 5, 461-464, 1993.
43. WANG, F. ve LEE, S.Y., *Poly(3-hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of Alcaligenes eutrophus under Nitrogen Limitation*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 9, p. 3703-3706, 1997.
44. PAGE, W.J. ve MANCHAK, J., *The Role of β -oxidation of Short-Chain Alkanoates in Polyhydroxyalkanoates Copolymer Synthesis in Azotobacter vinelandii* UWD, Can. J. Microbiol, 41: 106-114, 1995.
45. SINGLETON, P., *Bacteria*, 3rd Edition, England, p 224, 1995.
46. WITHOLT, B. ve KESSLER, B., *Perspectives of Medium Chain Length Poly(hydroxyalkanoates), a Versatile Set of Bacterial Bioplastics*, Current Opinion in Biotechnology, 10: 279-285, 1999.
47. BARNARD, G.N. ve SANDERS, J.K.M., *The Poly- β -hydroxybutyrate Granule in Vivo*, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 264, No. 6, pp. 3286-3291, 1989.
48. KNOWLES, J.C. ve HASTINGS, G.W., *In Vitro Degradation of a PHB/PHV Copolymer and a New Technique for Monitoring Early Surface Changes*, Biomaterials, Vol. 12, p. 212-214, 1991.
49. ATEŞ, M., *Batık Kültür Fermentasyonu Yöntemiyle Bazı Bakterilerden PHB Üretimi*, Doktora Tezi, 1997.
50. BRUNGER, P.M., *'Biopol' a Natural, Biodegradable, Thermoplastic Packaging Material*, ICI Bio Product and Fine Chemicals, 1992.

51. ASLIM, B., MUMCU, Z., MERCAN, N., *Gazi Üniversitesi personeli*, Kişisel iletişim, 2000.
52. TEMİZ, A., *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, sayfa 91, 217, 218, 219, 1996.
53. SPECK, M.L. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*, Washington, DC, p 45, 1976.
54. BONARTSEVA, G.A., MYSHKINA, V.L. ve ZAGREBA, E.D., *Poly- β -hydroxybutyrate Content in Cells of Various Rhizobium Species During Growth with Different Carbon and Nitrogen Sources*, *Microbiology*, 63(1): 45-48, 1994.