

## Biyoplastik: Poli- $\beta$ -Hidroksibütirat (PHB)<sup>1</sup>

Miraç Yılmaz<sup>2</sup>,Yavuz Beyatlı<sup>3</sup>

### Biyoplastik (PHB) ve Önemi

Günlük hayatımızın bir parçası olan plastik ürünler, kanıtlanmış pek çok dezavantajlarına rağmen; kolay şekil alma, elastikiyet, nakliyede rahatlık ve ucuzluk gibi nedenlerden dolayı tercih edilen malzemeler olmuşlardır. Ancak, plastiğin “kullanılıp-atılabilme” özelliği, şimdiden çevre kirliliği açısından en büyük sorunlardan biri haline gelmiştir (1). Her yıl birkaç yüzbin ton plastik denize atılır ve okyanusta birikir (2). Dünyada biriken yıllık plastik miktarı ise 25 milyon ton kadardır (3). Bu nedenle, son yıllarda plastikler, ekolojik problemlerin kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadırlar (2).

90'lı yıllarda 100 milyon tonun üzerinde üretilen ve 2000 yılında bu rakamın 150 milyon ton olduğu tahmin edilen sentetik polimerlerin, yerine kullanılacak başka bir malzeme türü olmadığı sürece, çevre ve insan sağlığına getireceği yükler gittikçe artacaktır (4, 5, 6, 7).

Petrolden elde edilen sentetik polimerler, plastik atık olarak doğaya terk edildiklerinde, toprakta uzun süre parçalanamadığından çevre kirliliğine ve toksik madde birikimine neden olmaktadır. Bu nedenle, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretimi önem kazanmış ve petrol kökenli polimerlerin yerini almalarına yönelik çalışmalar artmıştır (1, 5).

1970'li yıllardaki petrol krizinden sonra petrol fiyatlarının artmasına da bağlı olarak, petrol kökenli polimerlere alternatifler aranmış ve 1976 yılında, İngiltere'deki Imperial Kimya Endüstrisi (ICI), bakteriyel fermentasyonla üretilen poli-Beta-hidroksibütirat'la (PHB) ilgili araştırmalara başlamıştır (7).

---

<sup>1</sup>Bu çalışma Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü biyoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Yavuz Beyatlı danışmanlığı altında Miraç Yılmaz tarafından yapılan ve 2003 yılında tamamlanan “Toprakta İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi” adlı Doktora tezinden alınmıştır.

<sup>2</sup>Dr. Öğr. Grv., Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanlar Eğitimi Bölümü Biyoloji Eğitimi ABD, Beytepe, Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: [mirac@hacettepe.edu.tr](mailto:mirac@hacettepe.edu.tr)

<sup>3</sup>Prof. Dr., Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Ankara.

Günümüzde, PHB gibi biyoparçalanabilir, yenilenebilir, biyouyumlu ve doğayla dost plastiklerin bakterilerde sentezi ve polimer kimyasındaki uygulamaları ile ilgili alınan olumlu sonuçlarla biyoplastiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (7, 8).

Çeşitli araştırmacılar, biyoplastik üretiminde bakteriyel biyoplastiklerin, gelecek uygulamalar için kullanılabileceğini bildirmektedirler (4, 9). Avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB üretimi yapmak için uygun suşların tespiti araştırmalarında, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, ve *Bacillus* cinsi gibi bakteri grupları da yer almaktadır. Çalışmalarda, bu cinslere ait vejetatif bakteri hücrelerinin, diğer metabolik ürünlerin yanısıra poli- $\beta$ -hidroksibütirat gibi metabolik materyaller de depoladıkları bildirilmiştir (10, 11, 12).

## **Poli- $\beta$ -hidroksibütirat 'ın (PHB) Tanımı ve Tarihçesi**

Bakteriyel plastik veya biyoplastik de denilen ve petrokimyasal plastiklerin neden olduğu çevresel kirliliğe alternatif olarak ortaya çıkan poli- $\beta$ -hidroksialkanatlar (PHA), geleneksel plastik potansiyeline sahip, mikrobiyal olarak üretilen polimerlerdir (12, 13). PHA'ların bakterilerde, insandaki yağ veya bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bildirilmektedir (2, 14).

Bir çok çeşidi bulunan PHA'lar, linear, uzun, 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden ibaret, aktif mikrobiyal polyesterlerdir (12, 15). Bunlar içinde yer alan poli-Beta-hidroksibütirat (PHB), PHA'ların en yaygın ve geniş kapsamlı olarak çalışılan tipidir ve polimerin bu sınıfına ticari ilginin doğmasına neden olan PHA'dır (15, 16).

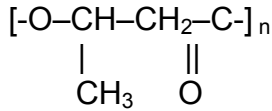
İlk kez, Lemoigne tarafından, 1920'li yıllarda, topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksi bütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri (PHB) olarak tanımlamıştır. Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içinde PHB sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır (7, 12, 17). PHB ile ilgili araştırmalarla, termoplastik ve elastomerik bir materyal olduğu anlaşılan polimer, patentli ürünlere dönüşmüştür (8).

Biyoparçalanabilir, termoplastik bir materyal olan PHB'ın, petrol türevli plastiklerin yerini almak için ticari olarak üretimi çalışmaları, 1960'lı yıllarda başlamış, ancak ilk endüstriyel üretimi 1970'li yıllarda gerçekleşmiştir (12, 15, 17). Üretilen ilk ticari ürün BIOPOL adıyla patentlenmiştir (18).

Bu yıllarda İngiltere'de Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) birçok bakteriyel türü, potansiyel PHB üretimi açısından incelemiş ve endüstriyel üretimde, hücre kuru ağırlığının % 90'ı üzerinde PHB biriktiren *Alcaligenes eutrophus* bakterisini kullanmaya başlamıştır (15). Daha sonraki yıllarda PHB ile ilgili çalışmalar *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Bacillus* vb. bakteri cinsleriyle devam etmiş; PHB'ın fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metodları, metabolizması, iç-dış parçalanması gibi çok yönlü özellikleri incelenmiştir (7, 12).

## PHB'in Genel Özellikleri

Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen PHB, yapısında kısa zincirli  $\beta$ -hidroksi yağ asitleri içeren, prokaryotların membranla çevrili hücre içi depo maddesi olup, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun bir polimerdir (2, 8, 18, 19, 20).



Şekil 1. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı

Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB'in genel formülü  $(C_4H_6O_2)_n$  şeklindedir (Şekil 1). (n) sayısı 35 000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilir (4, 12, 15, 18, 21, 22)

Hücrede bir redoks düzenleyicisidir (12, 15, 18, 19, 21, 23, 24). Faz kontrast veya elektron mikroskobu (EM) kullanıldığında, bakteriyel hücrelerde PHB granülleri kolaylıkla gözlenebilir. PHB, genellikle küre şeklinde olup, her granül çap olarak 100-800 nm arasındadır. Bunlar 2-4 nm kalınlığında üniter olmayan bir membranla çevrilidir. Granüllerin yaklaşık % 98'i PHB, % 2'si ise protein içermektedir (18, 25).

Yapılan EM çalışmalarında, granülün içte yer alan bir merkezi kısım ve birkaç tabakalı membranla çevrilmiş kabukdan oluştuğu bildirilmiştir (25). PHB'lar, polipropilen gibi petrol türevli yaygın plastiklere benzer materyal özellikler gösterirler (15). Ancak, bir termoplastik olan PHB'in sertliği, polietilene kıyasla dört misli fazladır. Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden özütlendiğinde kristalize olur (4, 15, 18).

Katı ama kırılğan bir materyal olan PHB'in erime sıcaklığı, 157-188 °C olup, bu, polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakındır. PHB termoplastik olduğundan preslenip şekil verilebilir (4, 15, 18).

PHB'in, UV ışımalarına dirençli olduğu ancak, asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf dirence sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, polimerin su ve hava geçirmez oluşu hidrolitik parçalanmaya karşı direnç sağladığından PHB'in kullanım olanakları genişlemektedir (8).

Polimerin molekül ağırlığı, özellikle bakterinin türüne bağlı olmakla birlikte, büyüme koşulları ve hücrenin yaşam döngüsündeki yerine göre de değişebilir (25, 26). PHB molekülünün ağırlığının 60.000–2.000.000 Da arasında değiştiği bildirilmektedir (7). Taidi ve arkadaşları (26), PHB'in moleküler ağırlığının, karbon kaynağı olarak metanol kullanıldığında *Methylobacterium extorquens* bakterisinde  $0,6 \times 10^6$  Da, *Alcaligenes eutrophus* bakterisinde,  $1,1 \times 10^6$  Da; süksinat kullanıldığında ise *M. extorquens* bakterisinde  $1,7 \times 10^6$  Da ve *A. eutrophus* bakterisinde  $1,6 \times 10^6$  Da moleküler ağırlığında olduğunu bildirmişlerdir.

PHB biyosentez genlerinin, kromozomda veya Plasmid DNA'da lokalize olduğu bildirilmektedir (27). PHB'in, biyolojik parçalanabilirliği, biyolojik uyum yeteneği ve

toksik olmayışı sayesinde endüstriyel uygulamalarda kolayca kullanılabilceği bildirilmektedir (28, 29).

## PHB Oluşum Şartları ve Tayini

Araştırmacılar, PHB'ın birçok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulduğunu (18, 30) ve PHB birikiminin genellikle, fazlaca karbon kaynağı varlığında, ancak büyüme için gerekli nitrojen kaynağı, oksijen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe vb.) gibi besleyici maddelerin eksikliğinde gerçekleştiğini bildirmektedirler (12, 16, 18, 19, 22, 23, 30, 31).

Yapılan araştırmalarda, büyüme ve PHB biriktirimi arasında yakın bir ilgi tespit edilmiştir. Buna göre, bakteri gelişiminin eksponansiyel fazında PHB birikimi artmakta, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise maksimum düzeye ulaşmaktadır (22). Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir (3). Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (21, 32). Yapılan bir çalışmada, *Rhizobium* bakterilerinde, kültür ortamının asitleşmesine bağlı olarak hücre ölümünün arttığı ve PHB içeriğinin buna bağlı olarak düştüğü bildirilmiştir (33).

UV spektrofotometrik olarak tayini yapılabilen PHB, hücreden ayrıldığında, sülfürik asitle krotonik aside dönüştürülerek, 235 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülebilir (34).

PHB'ın hücrede teşhisi ve konsantrasyonunun belirlenmesinde <sup>1</sup>H NMR ve Gaz Kromatografisi analizi ve FTIR spektroskopi yöntemi kullanılabilir (30, 35, 36). Canlı bakteri hücresi içerisindeki PHB depo granüllerinin tespit edilmesi için geniş olarak kullanılan metotlardan biri de lipofilik boyalarla boyamadır. Bu amaçla Nil Blue A, Sudan Black B ve Sudan III gibi bazı florosan boyalar kullanılabilir (37, 38, 39, 40).

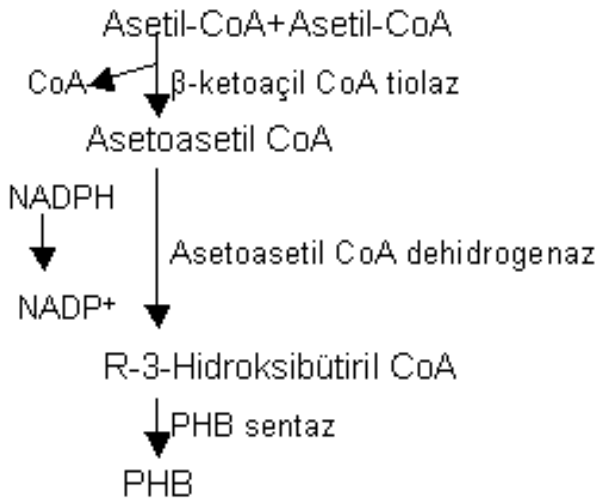
## PHB Sentezi

Polimerin biyosentezi, monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi, iki enzimatik aşama gerektirir. Üretim seviyesi, zincir uzunluğu ve oluşan kopolimerlerin kompozisyonu, bu enzimlerin performansına bağlıdır (41).

Hücre içinde PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek asetil-CoA ve düşük serbest CoA düzeyinin olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu, mikroorganizmalara göre değişmekle beraber genelde nitrojen, potasyum, sülfür veya oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır (7).

En kapsamlı karakterize edilen polimer olan PHB'ın biyosentezi, üç değişik enzim tarafından katalize edilen, üç enzim reaksiyonundan oluşmaktadır (Şekil 2). İlk reaksiyon, iki Asetil-CoA molekülünün,  $\beta$ -ketoasil CoA tiolaz tarafından, Asetoasetil

CoA'ya dönüştürülmesini içermektedir. İkinci reaksiyon, Asetoasetil CoA'nın NADPH bağlı bir Asetoasetil CoA dehidrogenaz tarafından, R-3 Hidroksibütiril CoA'ya indirgenmesidir. Son olarak, R-3 Hidroksibütiril CoA monomerleri PHB sentaz tarafından, PHB'a polimerize olmaktadır. Asetil CoA ve 3-Hidroksibütiril CoA, PHB sentezindeki ara araçlardır. Asetat ve PHB, Asetil CoA'nın konsantrasyonunu arttırabilir ve hücrede 3-Hidroksibütiril CoA ve 3H'ın sentezini bundan dolayı kolaylaştırır (15).



Prokaryot hücrelerde PHB'ın hücre içi sentezi için başlangıç bileşiği, Asetil CoA'dır. Substrat ve Asetil CoA'nın hücre içi konsantrasyonunun artmasıyla oluşan koşullar, sentezde pozitif bir etkiye sahiptir. Bu aynı zamanda PHB sentezini basitleştirmektedir. Enzimatik olarak katalizlenen reaksiyonun düzenleyici mekanizma idaresi altında olması bunun nedeni olarak gösterilmektedir (18).

Şekil 2. PHB Sentezi (3)

PHB oluşumunda ilk basamağı katalizleyen,  $\beta$ -ketoaçil CoA tiolaz (phbA geni ile kodlanan), açil-CoA+asetil-CoA'daki substratların tiolitik ayrılmasını içeren enzim ailesinin bir üyesidir. Yüksek ökaryotlardan, mayalara ve prokaryotlara kadar doğal olarak bulunurlar (15).

Asetoasetil CoA dehidrogenaz (phbB geni ile kodlanan), bir R-3-hidroksiaçil CoA dehidrogenazdır ve 3-hidroksibütiril-CoA'yı asetasetil-CoA'ya çeviren ikinci basamağı katalizler (15). PHB biyosentez yolunda, tiolaz ve dehidrogenaz enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyonlar, polimerizasyon için monomer sağlar. Oluşan bu R-3 Hidroksibütiril CoA monomerleri ise, PHB sentaz tarafından (phbC ile kodlanan) PHB'a polimerize edilir (15).

PHB granülleri ile sentaz enzimi polimerizasyonu arasındaki ilişki yıllardır bilinmektedir. Sınırlı karbonlu ortamda gelişme sırasında, sentaz enzimi çözünmüş formda oluşmaktadır. Nitrojen azlığında ise PHB sentaz oluşmaktadır. Çözünmüş sentazın bu şartlar altında hızla tükenmesi PHB granülleri ile ilişkilidir (12).

PHA sentezinin anahtar enzimleri olan ve 3-hidroksi-açil-CoA substratlarının PHA'lara dönüşümünü katalizleyen PHA sentazların, 54 farklı çeşidi tayin edilmiş ve klonlanmıştır. Alt ünite kompozisyonu ve substrat özgüllüğüne bağlı olarak PHA sentazlar üç çeşit olarak ele alınır. I. Sınıf PHA sentazlar *Alcaligenes eutrophus*'dan, II. Sınıf PHA sentazlar *Allochromatium vinosum* ve III. Sınıf PHA sentazlar *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan enzimlerdendir (42). *Caulobacter crescentus* 'dan izole edilen 2019 Nükleotid içeren ve 673 aminoasidi kodlayan PHB sentaz geni, phaC, yaklaşık 73 kDa olan moleküler ağırlığı ile bugüne kadar tanımlanan en büyük PHA sentaz enzimidir (43).

Miyake ve arkadaşları (44), asetil-CoA'nın asetilfosfata dönüşümünü sağlayan fosfotransasetilaz enzimi ile ilgili yaptıkları çalışmada, bu enzimin açığa çıkardığı asetil fosfatın PHB sentaz aktivatörü gibi rol oynadığını ve PHB sentezini aktive ettiğini bildirmişlerdir. Ancak, bu enzimdeki azalmanın da PHB sentezi izyolundaki asetil-CoA substratını arttırabileceğini ve sonuç olarak PHB birikiminin yükselebileceğini rapor etmişlerdir.

PHB sentezinde iş gören enzimlerin farklı hücre içi şartlara uyum sağlayabilmeleri, PHB üreten mikroorganizmaların geniş bir çeşitliliğe sahip olmalarına neden olmaktadır. Ancak, her ne kadar PHB biriktirimi bir çok prokaryotik mikroorganizmada görülür ise de,  $\beta$ -keto açil CoA Thiolaz, Asetasetil CoA Dehidrogenaz ve PHB Sentazın enzimatik mekanizmaları ile ilgili biyokimyasal araştırmalar sadece bunların iki doğal yapımcısı olan *Zooglea ramigera* ve *Alcaligenes eutrophus* da yapılmıştır. Örneğin, *Bacillus megaterium* PHB'ın ilk olarak izole edildiği ve tanımlandığı bakteri olmasına karşın, henüz biyosentez mekanizması tam olarak karakterize edilememiştir (15).

## **PHB 'ın Biyolojik Parçalanabilirliği**

PHB, biyolojik parçalanabilirliği nedeniyle, bir kez kullanılıp atılan eşyaların üretiminde büyük avantajlar sağlar (18).

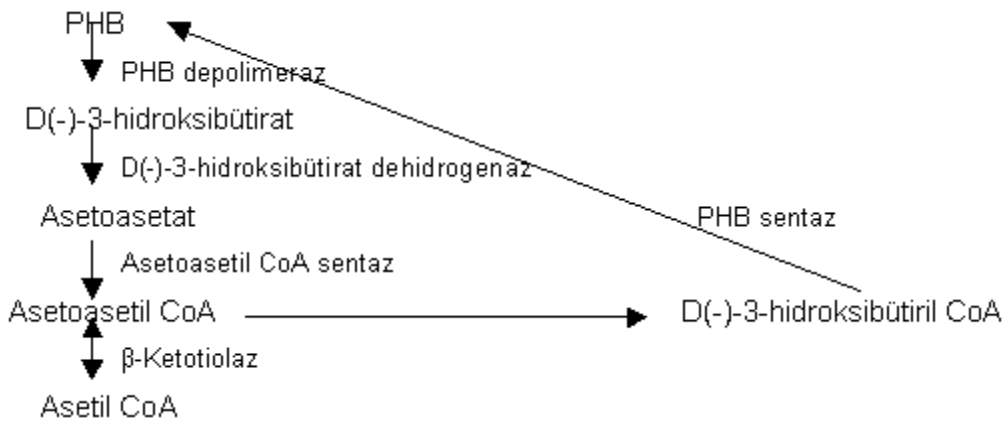
PHB'ın en önemli özelliklerinden biri, toprak ve insan vücudu vb. yerlerde, toksik ürünler meydana getirmeksizin tamamen parçalanabiliyor olmasıdır. PHB'ın aerobik ortamdaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su; anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise metandır (1, 3, 7).

PHB'ın parçalanma süresi bir kaç aydan (anaerobik), bir kaç yıla (denizsu) kadar, katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanmada nitrojen oksidi oluşmaması, çevre korunmasında önemlidir. Parçalanma biyoplastik bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir (4, 15, 45) . Polimerin parçalanmasında, bakteri, mantar, ve yüksek organizmalar biyolojik faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon kimyasal faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir (15).

PHB ve onun kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında, nispeten kısa bir periyot içerisinde tamamen CO<sub>2</sub> ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir (18). Tamamen parçalanma için gereken zaman ve biyoparçalanma oranının, kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal nüfus gibi etkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (3, 18).

Nguyen ve arkadaşları (46), PHB, PHV ve P(HB-HV) (polihidroksibütirat-co-hidroksivalerat) kopolimerlerinde, ısıya bağlı (170-200 °C) parçalanmayı araştırdıkları çalışmalarında, reaksiyonun ilk birkaç saatteki tabakalaşmayı, ısı etkisiyle erimenin takip ettiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, ısı etkisiyle PHB parçalanmasının hızlandığını belirterek, bunun polimerlerin oligomer formlarının krotonat son grupları ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Mergaert ve arkadaşları (47) ise, PHB'nin toprakta ve steril tampon çözeltide parçalanmasını araştırdıkları çalışmada, her iki ortamda da molekül ağırlığının düştüğünü, ancak kütle miktarındaki azalmanın sadece toprakta görüldüğünü ve bunun toprak çeşidine bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Buna göre, kütle azalmasındaki en yüksek düzeye killi toprakta ulaşılmıştır. Bazı araştırmacılar da, topraktaki P(HB-HV) biyoparçalanabilirlik yüzdesinin toprağın çeşidi ve içerdiği su miktarına bağlı olarak değiştiği bildirmektedirler (48).

PHB'nin, karbon ve enerji kaynağı olarak bakteriler tarafından kullanılabilmesi için depolimerize olması gerekmektedir. Depolimerizasyon sonucu oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır (Şekil 3) (18).



Şekil 3. PHB'nin parçalanması ve sentezi (3)

PHB'nin depolimerizasyonu için kullanılan enzimler hücre içi veya hücre dışı enzimler olabilir. PHB'ı parçalayan hücre içi enzimler *Bacillus megaterium* ve *Alcaligenes eutrophus*'da saptanmıştır (18).

Hücre içi depolimerazların, hücre dışı depolimerazlardan farklı fonksiyonları vardır. Hücre içi depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, doğal PHB elastomerlerini parçalarlar. Dönüşüm sonrasında kristalize olan, denature edilmiş PHB ise hücre dışı depolimerazlar tarafından hidrolize edilir (3).

Bununla beraber, hücre dışı PHA depolimerazlarla hücre içi depolimerazlar

arasındaki yapısal farklılık nedeniyle, bozulmamış, doğal PHA granüllerinin hücre dışı PHA depolimerazlarla direkt olarak parçalanamadığı bildirilmektedir (7).

PHA sentaz ve PHA depolimeraz aktivitelerinin, granüllerin membran protein tabakası ile yakın ilişkili olduğu ve membranı parçalayıcı veya tahrip edici metodlar olan PHB ekstraksiyon metodlarının, sentaz aktivitesinin kaybına ve depolimerizasyona hassasiyetin artmasına yol açtığı bildirilmektedir (7).

PHB'ın hücre içi parçalanması, PHA depolimeraz enziminin PHB'ı hidrolize etmesi ile başlar. R-3-hidroksibütirat dehidrogenaz ve asetoasetil-CoA sentaz, R-3-hidroksi bütirat monomer ve dimerlerinin oluşumuna neden olur (7).

*A. eutrophus*'da PHB'ın in vivo depolimerizasyonu sonucu oluşan 3-hidroksi bütirik asit monomerlerinin, hücredeki düşük -R(-)-3-hidroksi bütirik asit dehidrogenaz ve yüksek PHA depolimeraz aktivitesi ile oluşturulduğu bildirilmiştir (3).

Ancak, Gribel'in (1968) *B. megaterium* 'la yaptığı çalışmada PHA sentaz ve PHA depolimeraz enzimlerinin granüle bağlı olmayıp, çözülmüş halde olduğu bildirilmiştir. Burada, granül dış membranının bir proteini, depolimeraz aktivitesini engeller. Buna göre, çözücü ile granül yapısının tahrip olması üzerine polimer hidrolizindeki artış açıklanabilir (7).

PHB'ın, hücre dışı parçalanması depolimeraz tarafından katalizlenir. Bu enzimlerin aktiviteleri polimerin kompozisyonuna, amorf veya kristalin olmasına, yani fizik formuna, örneğin bölümlerine ve en önemlisi çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (15).

*Alcaligenes faecalis* 'de PHB depolimeraz enziminin etkinliğinin kristal yapının kalınlaşması ile azaldığı bildirilmiştir (49).

Abe ve Doi (50), (R)-3-hidroksialkanoik asitlerle koployester oluşturan (R)-3-hidroksibütirik asitlerin enzimatik parçalanması üzerine yaptıkları çalışmada, *Alcaligenes faecalis* T1 PHB depolimeraz enzimi varlığında, kopolyesterin erozyon oranının hem kristaliniteye hem de örneğin tabaka kalınlığına bağlı olduğunu ve enzimatik parçalanmanın monomer birimlerin karbon sayısındaki artışla arttığını bildirmişlerdir.

Hidroliz reaksiyonunun ürünü iz halindeki D(-)-3-hidroksibütirat monomeriyle esasen bir dimerdir. Dimer ve monomerler hücrelerce içeriye alınır. Hücre içinde bir hücre içi Beta-hidroksibütirat dimer hidrolaz tarafından dimer katalizlenir ve daha sonra oluşan monomer ara metabolik yol izlerine dahil edilir (18). Örneğin, *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas lemoignei* 'den elde edilen hücre dışı PHB depolimeraz enzimi, PHB'dan 3-Hidroksibütirik asit dimer ve trimer yapılarını serbestleştirmiştir. Yine *Bacillus megaterium* ile yapılan çalışmalarda da PHB'ın parçalanması sonucu 3-Hidroksibütirik asit trimer yapılarının hücrede biriktirildiği görülmüştür (51).

Charles ve arkadaşları (52), *Rhizobium meliloti* 'de PHB'ın parçalanma iz yolunu etkileyen genlerin kromozom ve mega plazmidde yerleştiğini tespit etmişlerdir.



## PHB 'ı Parçalayan Mikroorganizmalar

PHB 'ın parçalanmasında, topraktaki birçok mikroorganizma görev alır (18). Aerobik ve anaerobik PHB parçalayan bakteriler dışında funguslar da, bu yıkıma katılmaktadır. Bunlar toprak, kompostlar, aerobik ortamlar, anaerobik bataklıklar, göl-deniz suları ve hava gibi çeşitli ekosistemlerden izole edildiklerinden PHB'ın bu ortamlarda parçalanabildiği bildirilmiştir (53, 54). Topraklarda yer alan parçalayıcı organizmaların bazı Gram negatif mikroorganizmalar, Gram pozitif basiller, streptomycetler ve küf mantarları olduğu bildirilmiştir (47).

PHB depolimeraz enzimi salgılayan bakteri ve mantarlar, PHA'ları suda çözünebilen oligomer ve monomerlere hidrolize ederler. Aerobik ve anaerobik PHA parçalayan mikroorganizmaların bu yetenekleri PHA kristalleri veya filmleri üzerinde yapılan çalışmalarla gerçekleştirilir (49).

Molitoris ve arkadaşları (54), bir çalışmalarında, *Comomonas* sp., *Pseudomonas lemoignei* ve *P. fluorescens* tarafından polihidroksiakonatların yüzey tabakasının bakteriyel olarak parçalandığını bildirmişlerdir. Bakteriyel hidroliz sırasında polimerdeki morfolojik değişikliklerin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile araştırıldığı çalışmada, parçalanmış örnekler bakıldığında hidrolizin yüzeyden başladığı görülmüştür.

Denitrifikasyon yapan bazı bakteriler, PHB'ı anaerobik olarak parçalayabilmektedirler. Khan ve Hiraishi (55), aktif çamurdan izole ettikleri yeni bir denitrifikant kemoorganotrof bakterinin PHB ve kopolimeri P(HB-HV)'ı aerobik ve anaerobik şartlarda parçalayabildiğini bildirmişlerdir. Denitrifikasyon bakterilerinin PHB ve P(HB-HV)'ı parçalamaları onları elektron vericisi olarak kullanmaları ile mümkün olmaktadır. Stieb ve Schink (56), denizin anoksik kısmından izole ettikleri, zorunlu anaerobik, Gram negatif bir bakteri olan *Ilyobacter polytropus*'un 3-hidroksibütiratı, bütirata fermente ettiğini tespit etmişlerdir.

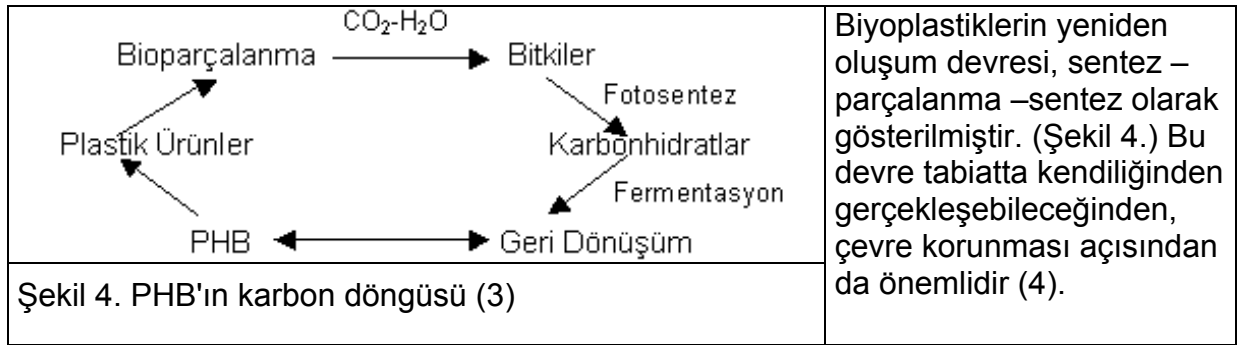
Çevreyle dost, biyoparçalanabilir plastiklerin kullanım ve tüketimlerinin artması doğal çevredeki birikim ve biyoparçalanabilir potansiyellerinin iyice bilinmesi gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla, polimerleri parçalayıcı mikroorganizmalar ve mekanizmalar üzerinde yapılan çalışmalar da her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, Sei ve arkadaşları (57), PHB parçalayan mikroorganizmaların hızlı ve duyarlı bir şekilde tespitine yarayan, bir PCR primer seti ve gen probu dizayn etmişler ve bunun çalışmalarında kullandıkları 57 PHB parçalayan mikroorganizmadan 47'si üzerinde olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

## PHB 'ın Yenilenebilirlik Özelliği

PHB'ın biyolojik yapısı ve biyolojik yıkıma uğraması kadar önemli olan, onun yenilenebilir kaynaklara dayalı üretilebilmesi gerçeğidir. Bir doğal materyal olan bu polyester bakteriyel orijindir ve gerçekten bir çok mikroorganizma, bu

makromolekölü parçalama yeteneğindedir. Bunun yanı sıra, petrokimyasal termoplastlar gibi, geri dönüştürülebilir bir biyoparçalanma gösterirler (15).

PHB'in fermentatif üretimi, şekerler ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır. Bu, tarımsal kaynaklı karbondioksit ve sudan meydana gelmektedir ve bunların biyoparçalanabilir PHB'a çevriminden sonra, yıkım ürünleri yine karbondioksit ve sudur (3). Dolayısıyla, bazı uygulamalar için biyoparçalanma kritik iken, PHB'lar, azalmakta olan fosil yakıtların yerine yenilenebilir bileşikler olarak dikkat çekmektedirler (15).



## PHB 'ın Kullanım Alanları

PHB, kolay şekil alma ve parçalanabilme özellikleri nedeniyle daha çok paketlenme malzemesi olarak kullanılmaktadır (15) Ancak, biyoyoum yeteneklerinin de olması, implantasyon maddesi olarak kullanımını da her geçen gün artırmaktadır (58).

Özellikle PHB ve kopolymer poli-β-hidroksibütirat-co-polihidroksivalerat P(HB-HV), gıda ve kozmetik alanındaki paketlenme maddeleri, tarım, kişisel temizlik araçları ve biyomedikal ürünler gibi alanlarda çok geniş potansiyel uygulamalara açıktır. Hidroksiasit uzun yan zincirli PHB'lar basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılmaktadır. PHB, lateks gibi kağıt örtüler, günlük krem öncülleri üretimi ve gıdalardaki unun dağılımını sağlayan ajanların yapımını sağlayabilirler (15, 29, 58).

Biyoyoumlu olan PHB monomerleri insan vücudunda bulunan doğal metabolit olması nedeniyle, polimer vücutta sadece çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur. Bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü salınımı için test edilmiştir. Böyle çalışmalarda ilaç, PHB den yapılmış bir hap içine sıkıştırılmış ve ağız yoluyla hastalara verilmiştir (17).

PHB'ın vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. İnsan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır (17).

Yapılan alışmalar, tekstil sanayinde, PHB'dan yararlanılabileceğini göstermiştir. *Alcaligenes eutrophus* 'dan izole edilen genlerin pamuk bitkisine (*Gossypium hirsutum* L.Cv DP50) aktarılması sonucu, transgenik pamuğun lif lümenleri içinde PHB retimi sağlanmıştır. PHB granülleri sayesinde yüksek ısı kapasitesi ve düşük termal geçirgenliğe sahip olan transgenik liflerin tekstil sanayi uygulamalarında avantaj sağladığı bildirilmiştir (59).

Biyobozunur plastiklerin paketleme, gıda, tıp, eczacılık ve tarımdaki kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır:

-Paket filmleri, poşetler, torbalar, gıda muhafazasında kullanılmak üzere tepsiler ve çeşitli kaplar,

-şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının i yüzey kaplamaları,

-İlaç, tablet, insektisit, herbisit ve gübrenin uzun sürede, belli hızda saliverilmesi için biyoparalanır taşıyıcılar,

-Bir kereye mahsus kullanılan traş bıçağı, atal, bıçak, tabak gibi mutfak kapları ve bebek bezleri,

-Cerrahi pens, ameliyat ipliği, eldiven, önlük ve maske,

-Kemik değiştirilmesi ve cerrahi plakalar,

-Pansuman sargısı,

-Kan damarı değiştirilmesi,

-Bitki sulama boruları, bitki yapraklarının kaplanması,

-Pi (izoelektrik nokta) zelliklerinden yararlanılarak kemik büyütülmesi ve tedavisi,

-Kiral bileşenler üretimi için başlatıcı materyaller,

-Taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı koruma veya parlaklık sağlama, aroma kaybını nleme amacıyla kullanım (3).

## **PHB 'ın Ziraatta Kullanım Alanları**

PHB, özellikle toprakta biyoparçalanma gerektiren uygulamalar için çok uygundur. Örneğin, film şeklinde kaplamada alüminyum folyo gibi kullanılmıştır. Benzer bir uygulama olarak ekin sulaması için PHA'lardan yapılacak oluklar kullanılabilir. Bu durumda hasat mevsiminin sonunda bunların tarladan toplanması gerekmeyecektir. Ayrıca bunlar tohum kapsllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre yada pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak kullanılabilir. Kış mevsiminde buğdayı topraktaki bir zararlıdan korumak gerektiğinde, uygun bir insektisit PHB granülü içine alınabilir ve sonbaharda buğdayla birlikte toprağa ekilir (17).

Topraktaki bakteriler PHB granülünde kolonize olmaya başlayacak ve PHB yaklaşık bir haftalık inkübasyon periyodundan sonra insektisidi serbest bırakmaya başlayacaktır. Bu süre kimyasalların olmadığı bir çevrede tohumların çimlenmesi için yeterli zamandır. Bitki büyümesi ve mikrobiyal büyüme insektisidin salınımıyla beraber geç sonbahara kadar sürecektir. Yaklaşan kışla beraber toprağın sıcaklığı düşecek, mikrobiyal büyüme oranı azalacak ve böylece daha az insektisit serbest bırakılacaktır. Böylece aktif kimyasallar atılmadan toprakta zararlının aktivitesi tüm kış boyunca düşecektir. İlkbahar ve toprak zararlısı geri geldiğinde yüksek toprak sıcaklığı PHB pelletlerinin daha fazla mikrobiyal parçalanmasını teşvik edecektir. Böylece diğer zararlılar için insektisit mevcut olacak ve bu güzel bir “biyolojik geribesleme” mekanizması ortaya çıkaracaktır (17)

### **PHB'in Veterinerlikte Kullanım Alanları**

Veteriner hekimliğinde ilaçların salınımı için biyolojik parçalanabilen bir matriks olarak PHB'in birçok kullanım alanı vardır. Polimer özellikle sığırların rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir. Bu konuda çok tipik bir örnek olarak bir yıl boyunca hayvanların kurtlanmasını önlemek için antihelmitik ilaç içeren PHB'in büyük kapsülleri yapılmıştır. Çiftçiler, ilacı, yönetmelikte önerilen dozda iki ayda bir sığırların etrafına bırakarak onların parazitlenmesini engellemişlerdir (17).

### **PHB'in Tıpta Kullanım Alanları**

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte, son zamanlardaki en ilginç uygulamalar biyolojik uygunluğu ve maliyetinden dolayı tıp ve eczacılık alanlarındadır. Bu alanlardaki gelişmeler de oldukça ilerlemiş safhadadır. Hayvan dokularına PHB girişi yüksek şiddette toksik etki yapmadığından; vücutta absorbe edilebilen protez aletlerin, yapay kan damarlarının ve cerrahi dikişlerin yapımında PHB'in kullanılması birçok araştırmacıya kılavuzluk etmiştir.

PHB ve kopolimerlerinin hayvan dokularına implante edildiğinde onların biyolojik olarak parçalanabildiği görülmüş ve bu alanda hem tıbbi, hem de eczacılık amaçları için de PHA'ların kullanımına olan ilgi artmıştır. Sonuçta, veterinerlikte ve insanların ilaçla tedavisinde teropatik bileşiklerin kontrollü olarak salınması için PHA'lar kullanılmıştır (18, 59, 61).

Polimerin uygulama alanları onun özelliklerine bağlı olarak, doğrudan kullanılmasının yanında depolimerizasyon ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da oldukça ilginç ve yaygındır. Özellikle PHB'in parçalanma ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit bu alanda çok önemlidir. Çünkü bu tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşimidir; lipid metabolizmasının ürünü olarak bulunur. İnsan kanının normal bir ögesi olan 3-hidroksibütirik asit, belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağı olarak hizmet eder ve bunun beyin gelişiminde rol alan aminoasitlerin prekürsörü olarak fizyolojik bir role sahip olduğu saptanmıştır (17).

D-(-)-3-hidroksibütirik asitin diabetiklerin kan serumunda anormal konsantrasyonlarda var olan keton yapılarından biri olarak rol oynadığına dair birçok bilgiler de vardır. Çalışmalar, D-(-)-3-hidroksibütirik asidin damar içi veya ağızdan. karbon sağlanması için kullanılabileceğini ve daha yaygın olarak kullanılan glikoz yerine bazı klinik avantajlara da sahip olduğunu göstermiştir. İlginç olan bir diğer çalışmada da, çok şişman (obese) hastalar, 14 gün boyunca terapatik açlık altında tutulduklarında hiç açlıktan şikayet etmemişlerdir (17).

Kronik osteomyolitis hastalarının tedavisinde biyoparçalanabilir, biyouyum ve kemik geçirgenliğini sağlayan piezoelektrik özellikleri bulunan P(HB-co-HV) kopolimeri kullanılarak, bu kopolimerden hazırlanan kapsüller içine antibiyotik konmuştur. Tavşanın tibia kemiği içine yerleştirilen kapsülün, ilaç salınımının etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, kopolimerin antibiyotik taşıyıcı bir sistem olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (62).

PHB'ın hastanelerde cerrahi sargılar ve eldivenler içinde bir yağlayıcı madde olarak veya ince toz formunda kullanılması oldukça ilginçtir. Ayrıca biyolojik parçalanabilirliğiyle ilgisi olmaksızın yarada kalabilecek olan bu PHB sargılarındaki fibrillerin, normal sargılardakilerden çok farklı delik yapısına sahip oluşu bir avantaj da sağlar. Hastalar içinde unutulmuş pamukların, birçok ülkede hukuk davalarının başında geldiği düşünülürse bu avantaj oldukça önemlidir (17).

Yüksek teknolojiyle PHB'ın geleceğe yönelik kullanım alanlarından biri de; uygun ölçülerde su geçirmez bir tüp formunda düzenlenen çok ince fibrillerden meydana gelen kan damarı veya bir vasküler aşı gibi kullanılmasıdır. Bu aşı vücut içinde gelişen yeni dokular için geçici bir yapı iskelesi olarak rol alabilir ve sonuçta doğal dokular tarafından tamamen eski haline gelebilir. Bu, vücudun doğrudan tepkisini alan sentetik damarlardaki engelleme ve pıhtı oluşum problemini tamamen yok eder (17).

Metal yapı iskeleleri yerine emilebilen maddelerin kullanılmasının en önemli avantajları, bunların metabolize olabilmeleri, operasyon sonrasında istenmeyen cerrahi değişimlerin engellenmesi ve oluşan damarların iskeletin sağlanabilmesidir. Ayrıca yapı iskelelerinin emilmesi sayesinde, ilaç serbestleştirici farmakolojik ajanların vücuda dahil edilmesi mümkün olur (58).

PHB ve kopolimerlerinin önemli bir özelliği de polipeptitler, polinükleotitler, polisakkaritler ve proteinler gibi piezoelektrik polimer olmasıdır. PHB ve kopolimerleri polivinilidon, florit polimeri gibi kesikli piezoelektrikite göstermektedir. Poliviniliden florit polimerinin filmleri kemiği elektriksel stimülasyon ile kuvvetlendirebildiği ve kemiğin onarıldığı bilinmektedir. Bu durumda bir kemik kırığını sabitleyen levhalar benzer mekanik özelliklere sahip takviyeli bir PHB karışımından yapılırsa, uyarılan kemik büyür ve gelişir. Böyle bir kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından bulunduğu yerde yavaşça emilebilir. Bu sırada kemik de kaynar ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir operasyona gerek kalmaz (17).

## PHB'in Kimyasalların Eldesinde Kullanılması

(R)-(-)-hidroksi karboksilik asitler, büyük oranda antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve feromonlar gibi ince kimyasalların sentezi için kiral yapı blokları olarak kullanılabilirler. Yeni bileşenlerin sentezi için, kiral bir merkeze sahip olan bu bileşikler, iki fonksiyonel grup (OH, COOH) içerirler (63).

Organik kimyada asimetric sentez işlemi çok önemlidir ve bu alanda enantiomerik saf bileşikler revaçtadır. D-(-)-3 -hidroksibütirik asit de bu gruba ait olduğundan, saf maddelerin geniş miktarlarda eldesinde PHB'in kullanılması önem kazanmaktadır. Doğada en yaygın form olan D-(-)-konfigürasyonuna sahip olan bu optik izomerler, buldukları ortamda kiral merkezleriyle diğerlerinden daha kuvvetli bağlanma özelliğine sahip olduğundan kromatografide kullanılabilir. Ayrıca bunların yağ/su emülsiyonları için, emülsifikasyon ajanı olarak kullanımı da mümkündür (17).

Birçok ilaç, sadece bir kiral formda aktiftir ve D-(-)-3-hidroksibütirat böyle bileşiklerin organik sentezinde bir çimento bloğu gibi kullanılır. D-(-)-3 hidroksibütirat monomerinden, Hindistan mısırındaki haşaratın bir seks hormonu, bir balarısı hormonu, *Cerambycidae* familyasından bir böceğin koruyucu substratı ve güzel koku olarak S-citronellol gibi 6 saf kimyasalın organik olarak sentezlendiği belirtilmiştir (17).

## PHB'in Paketleme Filmleri ve Tek Kullanımlık Malzemelerin Yapımında Kullanılması

PHB ve kopolimerlerinin mekanik özellikleri polietilen, polipropilen vs. gibi bazı ticari plastiklere benzediğinden termoplastik poliesterlerdir. PHB daha kırılğan olması ve zayıf çözgen dayanıklılığı dışında, polipropilenle benzer özelliklere sahiptir (18). Düşük su buharı geçirgenliği gibi besin paketleme endüstrisi açısından önemli olan bir özelliği ile de, düşük yoğunluklu polietilene benzemektedir (29). Kopolimerler ise daha esnektir ve daha düşük erime sıcaklığına sahip olduğundan, preslenmiş ürünlerin imalatı için daha kullanışlıdır. Diğer taraftan sadece belirli bakteriler tarafından üretilen uzun yan zincirli (C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>) polimerler, daha düşük erime noktaları ve cam geçirgenlik sıcaklığına sahiptir. Bu materyaller lastik benzeridir ve gerçekte bir termo-elastomerdir (18).

PHB, kopolimerleri kadar iyi bir şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve klorine edilmiş polietilen gibi diğer sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir (18).

PHB kalıp yapımı, sıkıştırılmış film ve bazı fibrillerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Yapılan paket filmleri mükemmel bir gaz bariyeri özelliğindedir. 25 µm kalınlığındaki bir PHB filmi 45 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/gün'lük bir oksijen geçirgenliğine sahiptir. Düşük olan bu oksijen geçirgenliğinden dolayı gıda maddelerinin paketlenmesinde PHB filmleri rahatlıkla kullanılabilir. Bu PHB filmleri polipropilen filmleri kadar güçlüdür, fakat polietilene kadar dayanıklı değildir. Oysa cam takviyeli PHB kalıpları naylon

benzerlerine göre daha sert ve dayanıklıdır. Fakat bunların da sıcaklığa dayanıklılığı mühendislik açısından iyi değildir. Ancak birçok plastik, cam-fiber dolgusu ilavesiyle kuvvetlendirilebilmiştir (17, 18).

PHB mükemmel olan gaz bariyer özelliğinden dolayı, film şeklinde kaplamacılıkta kullanılmıştır. Kanada'daki Hamur ve Kağıt Araştırma Enstitüsü, Montreal'deki Mc Gill Üniversitesi ile PHA laktik üreten bir firma olan Ecole Politeknik ve Imperial Kimya Şirketi arasındaki ortak bir projeye PHB, kaplanmış kağıt ve yüksek kalitede film yapmak için kullanılmıştır. Bu kaplanmış kağıtlar tamamen biyolojik olarak parçalanabilmektedir ve ticari olarak, kaplanmış kağıtlarda geri dönüşüm daha kolay olmuştur (18).

Biyolojik olarak parçalanabilirliğinden dolayı tek kullanımlık ürünlerin üretimi için PHA'lara yönelinmiştir. Bu alanda Imperial Kimya Şirketi ve bunun yan kuruluşu olan Marlborough Biopolimers gibi şirketler PHA'ların araştırılması ve geliştirilmesinde aktif olarak rol almıştır. PHA polimerine bu iki şirket ticari isim olarak BIOPOL adını vermiştir ve 1970' li yıllarda ilk ticari prosesleri patentlemişlerdir (18).

Imperial Kimya Şirketi, kadınlara mahsus hijyenik ürünler, tek kullanımlık çocuk bezleri ve geri dönüşümü güç olan plastik filmler gibi tek kullanımlık mutfak malzemeleri için PHA'ın potansiyel bir pazar olduğunu önceden görmesine rağmen PHA'ın ilk ticari kullanıcısı Almanya'da Wella kozmetik şirkettir. Bu şirket PHA'ı enjeksiyonla şişe şeklinde kalıplamış ve saç şampuanlarını paketlemek için kullanmıştır (18).

Polipropilene fiziksel özellikleri yüzünden çok benzeyen PHB, polipropilenden yapılan yıkanabilir kaplar, kırıştırılabilen paketler ve ipler gibi pek çok ürünün yapımında da kullanılabilmektedir (17).

## PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar

PHB ve çeşitli PHA'ların üretimi için kullanılan substratlar özellikle karbon kaynağı açısından bakıldığında, glukoz, sükroz ve yağ asitleri ile alkanlar ve kloroalkanoik asitler gibi kimyasal bileşenlerdir (30, 51, 64) Ayrıca, bütirik ve pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit, L-Laktat gibi karbon kaynakları kullanımı da denenmiştir (64, 65)

PHB ve kopolimerlerin kompozisyonu, kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişebildiği, ancak bu dağılımın tesadüfi olabileceği de söylenmiştir (65, 66) .

Ramsay ve arkadaşları (67), *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas pseudoflava*, *Pseudomonas cepacia* ve *Micrococcus halodenitrificans* bakterilerini glukoz ve propiyonik asit bulunan ortamda geliştirdiklerinde, nitrojeni sınırlandırılmış şartlar altında P(HB-co-HV) kopolimeri ürettiklerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, kopolimer içindeki HV oranının propiyonik asit miktarına bağlı olarak değiştiğini de saptamışlardır.

Chen ve arkadaşları (45), hücre kuru ağırlığının %85'i kadar PHB biriktirdiğini

bildikleri *A. latus* DSM 1122 suşunun PHV üretimi üzerine yaptıkları çalışmada, ortama Na-valerat eklediklerinde sadece PHV, oysa propiyonat ve asetatı aynı anda ilave ettiklerinde PHB ve PHV elde edildiğini tespit etmişlerdir.

Amonyum klorür (51), amonyum asetat, balık peptonu (68) amonyum sülfat (7) vb. azot içeren kaynaklardan da PHB verimini artırıcı çalışmalarda yararlanılmaktadır. Durner ve arkadaşları (69), *Pseudomonas oleovorans* ile yaptıkları çalışmada, oktonat ve amonyum içeren besiyerini farklı C/N oranlarında hazırlamışlar ve C/N oranı arttığında PHA birikimini yükseldiğini ve bunun nitrojenin sınırlanmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir

*Pseudomonas pseudoflava* ile yapılan bir çalışmada da, besiyerinde karbon kaynağı olarak glukoz ve ksiloz kullanılırsa %PHB veriminin %22, arabinoz kullanılırsa %17 olabileceği bildirilmiştir. Araştırmacılar, arabinoz ve ksiloz içeren ortamda, PHB biriktirilmesinin son aşamasında nitrojen sınırlandırıldığında, PHB miktarının düştüğünü de bildirmişlerdir (70).

Page ve arkadaşları (71), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunu, glukoz ve balık peptonu içeren besi ortamında geliştirdiklerinde %80 PHB verimine ulaşmışlardır *Rhizobium meliloti*'nin fruktozlu ortamda üretildiğinde yüksek miktarda PHB depo ettiği bildirilmiştir (30).

*Alcaligenes eutrophus*'da Tanaka ve arkadaşları (64), L-Laktatlı besiyerinde % 55 PHB birikimi tespit etmişlerdir.

*A.eutrophus*'un polietilen glikol veya polisakkaritlerden kopolimerler ürettiği ve bu kopolimer kompozisyonu ve moleküler ağırlığının yapılan müdahalelerle kontrol edilebileceği bildirilmiştir (72). Yine aynı bakterinin glukoz, propiyonik asit veya 4-hidroksi bütirik asit ya da bütirolacton kullanıldığında P(3HB-co-3HV-co-4HB) ürettiği bildirilmiştir (73).

Biyoparçalanabilir plastiklerin imali için potansiyel hammadde olan PHB'ın, fermentasyon olayı ile kütle üretiminin geliştirilmesi yoluna gidilmiştir. Fermentasyon olayı, kesikli, yarıkesikli ve sürekli fermentasyon olarak gerçekleştirilebildiği bildirilmiştir (7).

## **PHB'ın Ucuz Üretimi**

PHB oluşumu için kullanılan şeker substratının fiyatının, PHB üretiminin ticari başarısında sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu ve polimer üretiminin her bir tonu için, 3 ton glukoz kullanılması gerektiği bildirilmektedir (74). Kullanılan glukozun, maliyeti yükselmesi sonucunda üretilen PHB'ın kg fiyatı 15-30 US Dolar arasında değişmektedir (75).

Polimerin kullanım sınırlarını belirleyecek olan maliyet fiyatını düşürmek için, rekombinant türler üzerinde çalışmalar yapılmasının yanısıra, farklı ve ucuz karbon



kaynakları kullanarak yüksek PHB verimi elde eden suşlar üzerinde araştırmalar da yapılmaktadır (75).

Düşük fiyatlı biyoplastik üretimi için melas, (1, 10, 74, 76) ksiloz, arpa ve soya atık suları (77) ve peynir altı suyunun (78) kullanılması araştırılmaktadır. Ucuz PHB üretimi için kullanılabilen melas, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile, büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır (79).

Page (74), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun şeker pancarı melası gibi kompleks karbon kaynaklarında da yüksek PHB verimine sahip olduğunu saptamıştır.

Page (1), iyi bir polimer üreticisi olan *A. vinelandii* UWD suşunun, ucuz karbon kaynağı olan şeker pancarı melasında üretildiğinde, glukozun üçte biri maliyete mal olduğunu ve eğer ortama valerat ilave edilirse PHV kopolimerinin oluştuğunu bildirmiştir. Şeker pancarı melasının tanımlanmamış büyümeyi uyarıcı faktörler içerdiğini söyleyen Page, şeker pancarı melasından polimer üretimini arttırmak için ortama azot bileşenleri ilave edilebileceğini de belirtmiştir.

PHB'in pratik uygulamalarında üretim fiyatlarının indirgenmesi için daha ekonomik kültür ortamları araştırılırken substrat maliyetinin düşürülmesinin yanı sıra, karbondioksitin dönüştürülüp ucuz yoldan PHB üretilebilmesi için, *Cyanobacter* ile de çalışmalar yürütülmektedir. (31, 44, 64, 80, 81, 82)

Ucuz karbon kaynakları ve hatta peyniraltı suyu gibi atıklardan PHB üretimi yapılarak verimin arttırılması amaçlanmaktadır. Ahn ve arkadaşları (78), rekombinant *E. coli* kullanarak peynir altı suyundan yüksek PHB verimi alındığını bildirmişlerdir. Kim (83) ise çalışmasında, yine rekombinant *E. coli*'yi peynir altı suyunda geliştirmiş ve %20 PHB verimi; *Azotobacter chroococcum*'u ise nişasta içeren besi ortamında geliştirerek, oksijeni sınırlandırılmış şartlar altında %46 PHB verimi elde etmiştir.

## Mikroorganizmalarda PHB Üretimi

Prokaryotik mikroorganizmaların geniş bir kısmı tarafından sentez edilebilen PHB, toprak, deniz ve tatlısu, bunların sedimentleri gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, çok sayıda heterotrofik ve ototrofik aerobik, fotosentetik anaerobik bakteriler, *Actinomycetes*ler, cyanobakteriler, anaerobik, yağ asidi okside eden bakteriler, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından depolanabilmektedir (9, 19).

PHB, özellikle *Alcaligenes* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. ve çeşitli toprak mikroorganizmaları gibi bir çok mikroorganizma tarafından oluşturulur (7, 11, 12, 18, 30).

Ticari olarak biyoplastik üretiminde İmperial Kimya Şirketi öncelikle metilotrofik bakterileri ve *Azotobacter*leri kullanmış, ancak daha sonra PHB üretim seviyesi daha yüksek olan *Alcaligenes eutrophus* bakterisi ile devam etmiştir.

## **Alcaligenes ve Azotobacter Cinsi Bakterilerde PHB üretimi**

Yapılan çalışmalarda, *Alcaligenes eutrophus* bakterisinin, fruktozu karbon kaynağı olarak kullanarak hücre kuru ağırlığının % 80'inden fazlasını PHB olarak biriktirebildiği (15) ve *Alcaligenes eutrophus*'un glukozu kullanabilen mutantlarının da PHB üretiminde kullanılabileceği bildirilmektedir. *Alcaligenes latus* gibi bu cinse ait diğer türler de birçok karbon kaynağını kullanarak yüksek PHB verimi sağlarlar. Ortamdaki C/N oranının artışının polimer sentezini kolaylaştırması nedeniyle, *Alcaligenes* türlerinde PHB üretiminin kinetiğinde büyüme fazını takiben, azot kaynağının sınırlı hale getirilmesinin oldukça belirgin bir depo fazı oluşturduğu rapor edilmiştir (18).

Beaulieu ve arkadaşları (79), *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 suşunda %3 glukoz ve farklı amonyum kaynakları ile şeker kamışı melasında PHB verimini araştırdıkları çalışmalarında, en iyi büyüme ve PHB üretiminin amonyum sülfat içeren besiyerinde olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada, bakteri tarafından metabolize edilemeyen melas, karbon kaynağı olarak değil sadece büyüme aktivatörü olarak kullanılmıştır. Optimal büyüme ve PHB üretiminin %0,3 melas oranında sağlandığı rapor edilmiştir. Çalışmada ulaşılan en yüksek PHB Verimi ise %26 seviyesindedir.

Tanaka ve arkadaşları (64) ise, geliştirdikleri iki aşamalı fermentasyon metodunda, *A. eutrophus*'un *Lactococcus lactis*'in ksilozdan üretmiş olduğu L-Laktat içeren besiyerinde büyütülürse, % 55 oranında PHB biriktirdiği tespit etmişlerdir.

Kim ve arkadaşları (84), *A. eutrophus* NCIMB 11599 suşunun farklı zamanlarda ve amonyumu sınırlı şartlarda incelemişlerdir. Araştırmacılar, en yüksek hücre yoğunluğu sırasında sınırlanan amonyum oranının PHB veriminde %76'lık bir artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir.

Borman ve arkadaşları (85), *Azotobacter beijerinckii* bakterisinin kasein pepton, maya özütü, kasamino asit ve üre gibi organik azot kaynaklarının glukoz veya sükroz gibi karbon kaynaklarıyla kombine edildiğinde, azot sınırlamasına gerek kalmadan %50'den fazla PHB üretebileceğini bildirmişlerdir. PHB'ın büyüme ilişkili şartlardan etkilendiğini ve özellikle kazein pepton içeren besiyerinde büyümenin durgun fazında en yüksek PHB üretim değerine ulaştığını söylemişlerdir. Çalışmada, oksijeni sınırlandırılmış şartlarda PHB üretiminin arttığı da vurgulanmıştır.

Farklı *Azotobacter* türlerinin PHB verimi üzerine yapılan çalışmalardan birinde, *A. vinelandii* UWD suşunun glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz gibi rafine karbon kaynakları ile şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, mısır şurubu , malt ekstraktı gibi kompleks karbon kaynaklarında yüksek PHB verimi elde edildiği bildirilmiştir (74, 86).

Page ve Knosp (87), *A. vinelandii* UWD suşunun, glukoz ve yanısıra amonyum asetat veya N<sub>2</sub> içeren besi ortamında 24 saatlik kültür sonucunda, hücre kuru ağırlığına oranla sırasıyla %65 ve %75 PHB verimine ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu suşda polimer üretiminin oksijen sınırlandırılmasına bağlı

olmadığını, glukozun PHB'a dönüşümünün etkinliğinin oksijeni sınırlı kültürlerde arttığını bildirmişlerdir.

Nişasta gibi ucuz substratlardan PHB üretiminin araştırıldığı bir çalışmada *Azotobacter chroococcum* kullanılmış ve farklı oksijen konsantrasyonları altındaki PHB verimleri araştırılmıştır. Oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığı belirtilen araştırmada, PHB veriminin %20'den %46'ya ulaştığı bildirilmiştir (83).

## ***Bacillus* ve *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerde PHB Üretimi**

Çeşitli araştırmacılar, biyoplastik üretiminde *Bacillus* biyopolimerlerinin potansiyel gelecek uygulamalar için kullanılabileceğini bildirmektedirler (4, 9). Ayrıca, *Bacillus* 'ların melas gibi ucuz substratlarda hızlı bir şekilde büyüdükleri; yüksek sıcaklık ve yüksek osmotik basınca dayanıklı oldukları ancak, hücre duvarı yapılarının kalın oluşu nedeniyle PHB ekstraksiyonu zor olduğu bildirilmiştir. Yine de avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB üretimi yapmak için uygun suşların tespiti araştırmaları devam etmektedir (10).

*Bacillus* türlerinde PHB sporulasyon için hücre içi enerji rezervi olarak işlev görmektedir. Örneğin, *B. cereus*'da spor oluşumundan hemen önce PHB birikiminin maksimum oranda olduğu ve bakterinin sporulasyon döneminde PHB'ın kullanıldığı bildirilmektedir (21). Benoit ve arkadaşları (32), *B. thuringiensis* üzerinde yaptıkları çalışmada, durgun fazdaki sporulasyon sırasında PHB'ın tüketilmeye başladığını ve PHB'ın spor şekillenmesi sırasında enerji kaynağı olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. Kato ve arkadaşları (51) yaptıkları çalışmada, *B. megaterium* 'da 3-Hidroksibütirik asit trimer yapılarının geç ekspanansiyel fazda biriktirildiğini, durgunlaşma ve ölüm fazında ise parçalanma sonucunda en yüksek düzeye ulaştıklarını söylemişlerdir.

Lach ve arkadaşları (88), filamentli, küçük sferik hücreler oluşturan *B. megaterium* PV302 mutantında, PHB miktarının hücre kuru ağırlığının %16'sı kadar olduğunu tespit etmişlerdir. Atasal suşla karşılaştırıldığında, mutantta sporulasyon ve gelişmede bozukluklar görüldüğü bildirilmiştir.

Yapılan araştırmalarda bazı *Bacillus* suşlarının hücre kuru ağırlığının %50 den fazlasını PHB şeklinde biriktirebildiği bildirilmektedir (4, 45, 89)

Chen ve arkadaşları (45), zenginleştirilmiş besiyerinde büyütülen *Bacillus* bakterilerinde hücre kuru ağırlığına göre %5-20 arasında PHB biriktirildiğini bildirmektedirler.

Kato ve arkadaşları (51) da kendi izole ettikleri *B. megaterium* B-124 suşunun hücre kuru ağırlığının %20 sinin PHB olduğunu bildirmişlerdir. Dave ve arkadaşları (4), aktif çamurdan izole edilen 10 *Bacillus* suşundan özellikle birinin %70 PHB verimliliğe sahip olduğunu söylemişlerdir.

Mercan ve Beyatlı (90), 10 adet *B. sphaericus* suşunun PHB üretimlerini tespit ettikleri çalışmalarında, PHB üretiminin %5,00-%25,88 arasında bulmuşlardır. Ancak

özellikle üretimi en yüksek olan bazı suşların, %0,2 beef ekstrakt içeren besi ortamında yüzde verimlerinin %32,50'ye kadar çıktığını bildirmişlerdir. Labuzek ve Radecka (9), *B. cereus* UW85 suşunu nitrojeni sınırlandırılmış şartlarda geliştirmişler ve PHB verimini %9 olarak tespit etmişlerdir.

Wu ve arkadaşları (10), melaslı besiyerindeki oksijen şartlarını değiştirerek yaptıkları çalışmada, oksijen miktarındaki azalmanın sporulasyona neden olduğunu ve PHB üretiminin düştüğünü; nitrojen ve fosforun oranının karbona göre düşük olduğu besiyerlerinde ise PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. Jma5 suşunun, PHB verimini %25-35 olarak tespit etmişlerdir.

*Bacillus* 'ların amilaz ve proteinaz enzimlerinin varlığı nedeniyle gıda atık sularından faydalanabileceğini bildiren Law ve arkadaşları (77), aktif çamurdan izole ettikleri *Bacillus* suşlarını arpa ve soya atık suyunda geliştirerek PHB verimlerini araştırmışlar ve suşlardan HF-1'in atıklardan %19,22 HF-2'nin ise %10,18 PHB verimine ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, düşük maliyetli PHB üretimi için ucuz karbon kaynaklarının kullanılabilmesini bildirmişlerdir.

Gouda ve arkadaşları (76), şeker kamışı melası ve mısır suyunu karbon ve nitrojen kaynağı olarak kullanarak *B. megaterium* 'da PHB üretimini incelemişler ve en yüksek PHB miktarının melas ve glukoz içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hücre gelişiminin en iyi olduğu melas yüzdesinin %3 olmasına rağmen, en yüksek PHB verimi olan %46,2'lik oranın %2 melas içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Hoffmann ve arkadaşları (91), çalışmalarında, glukonat veya asetat gibi basit karbon kaynaklarında üretilirlerse, çeşitli *Pseudomonas* bakterilerinin, orta zincir uzunluğunda, 3-hidroksi yağ asitlerinden şekillenen (C6-C14) PHA biriktirme yeteneğinde olduğunu belirtmişlerdir.

*Ps. aeruginosa*, *Ps. putida* ve *Ps. fluorescens* gibi diğer floresan *Pseudomonas* suşları da, karakteristik bir özellik olarak karbon kaynakları varlığında ve sınırlayıcı şartlar altında PHB üretimi yapmazlar. Ancak, Huisman ve arkadaşları (92), yağ asitlerinde üretilirlerse, orta zincir uzunluğunda (C6-C12) PHA üretebildiklerini göstermişlerdir. Araştırmacılar, polimer oluşturma yeteneğinin plasmid DNA'dan kaynaklanmadığını, özel bir enzim sisteminin PHA üretiminde etkin olduğunu belirtmişler ve PHB üretmeme özelliklerinin bu bakterilerin sınıflanmasında kullanılabilmesini bildirmişlerdir.

Metilotrofik organizmalardan olan bazı *Pseudomas* 'ların da PHB üretimi araştırılmış ve yüksek verim görülmüştür. *Ps. oleovorans*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* ve *Ps. testoterani*, n-alkoller ve n-alkanoik asitler kullanılarak PHB üretimi gözlenmiştir (12, 17). Karaboz ve Umay (93), *Ps. extorquens* bakterisini metanol içeren karbon kaynağında ürettiklerinde % 27 PHB üretimi saptamışlardır.

Fakültatif metilotrof *Pseudomonas* sp.135 suşu üzerinde yapılan bir çalışmada metanol varlığında NH<sub>4</sub>'ün sınırlı tutulduğu ortamda %55, Mg<sup>+2</sup> eksikliğinde %42,5 ve PO<sup>3-4</sup> eksikliğinde ise %34,5 PHB verimi sağlandığı tespit edilmiştir (94).

Xi ve arkadaşları (95), *Ps. stutzeri* 1317 suşunu glukoz, glukonat, yağ asidi ve alkol içeren ortamda yetiştirmişler ve PHA yapısının ortamdaki yağ asidi ve alkollere bağlı olarak değiştiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, glukoz içeren besiyerinde 20. saatte başlayan nitrojen eksikliğinin hem hücre sayısı hem de polimer miktarında artmaya neden olduğunu ve %50 PHB verimine ulaştıklarını bildirmişlerdir.

Ateş ve Ekmekçi (96), *Pseudomonas extorquens* DMS 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'in pancar melası içeren besi ortamındaki PHB üretimini inceledikleri araştırmalarında, *P. extorquens* DSM 1337'nin %22,98 ve *A. chroococcum* (TEM)'in %12,10 PHB üretim verimine ulaştığını bildirmişlerdir.

## **Diğer Bakterilerde PHB Üretimi**

Biyolojik olarak parçalanabilen plastik olan PHA'ın fotosentetik üretimi için, güneş ışığı yardımıyla, sera etkisi yaratan gaz olan karbondioksitin kullanımı çevresel olarak kabul edilebilir olduğundan, bu iş için siyanobakterlerin seçiminin uygun olduğu belirtilmiştir. Karbondioksitten PHA biriktiren üç grup mikroorganizma vardır ki bunlar, hidrojen okside eden kemoototrofik bakteriler, genetik mühendisliği ile yükseltilmiş bitkiler ve siyanobakterlerdir. Bunlar oksijenik fotosentez ile PHA depo ederler. Asada ve arkadaşları (81), termofilik izolat *Synechococcus* MA19 suşu ile yaptıkları çalışmada, fotoototrofik şartlarda ve nitrojen azlığında PHB biriktirdiğini ve PHB granüllerinin tilakoid membranla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Gomez ve arkadaşları (97), toprak Gram negatif bakterilerinin şeker kamışı türevli şekerler olan sükroz, fruktoz ve glukoz ile propiyonik asitten PHB üretimini incelemişler ve %50-80 arasında verime ulaşmışlardır.

Bitkide nodül oluşturan toprak bakterilerinden olan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de hücre içi PHB depo etme yeteneği birçok araştırmaya konu olmuştur. Bonartseva ve arkadaşlarının (98) yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, PHB içeriği, nitrogenaz enzimi aktivitesi ile ters, hidrogenaz enzimi aktivitesi ile doğru orantılıdır. Yine, *R. leguminosarum*, *R. trifoli*, *R. galega*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* gibi farklı türlerle yapılan çalışmalarda da, PHB üretimlerinin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğu bildirilmiştir. Sükroz içeren besiyerinde, farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada, en yüksek PHB veriminin KNO<sub>3</sub>'lü besiyerinde %65 ile *R. phaseoli* 'den elde edildiği bildirilmiştir (5, 99).

Jan ve arkadaşları (30), *R. meliloti* 'de ortamda karbon kaynağı olduğunda ve gelişme için gerekli nitrojen gibi elementler sınırlı tutulduğunda PHB'ın depo edildiğini bildirmişlerdir. Karbon kaynağı tümüyle kullanıldığında ise PHB metabolize edilmektedir. *R. meliloti* fruktozlu ortamda üretildiğinde büyük miktarda PHB depo etmektedir.

Tal ve Okon (100), *Azospirillum brasiliense* Cd suşunun, ekspanansiyel fazın son aşamasında, yüksek C/N oranında, oksijen sınırlandırıldığında %5 olan PHB veriminin, %40'a ulaştığını bildirmişlerdir.

Brandl ve arkadaşları (31), fotosentetik bakteriler olan *Rhodospirillum* ve *Rhodobacter* cinsleri üzerinde yaptıkları araştırmalarda bunların da n-alkanoik asitlerden polimer depo ettiğini, ayrıca nitrojenin sınırlandırılması durumunda %PHB veriminin hücre kuru ağırlığının %60-%70'i kadar olabildiğini bildirmişlerdir.

Lillo ve Rodriguez-Valera (101) ise, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan halofilik bakterilerden olan *Halobacter mediterranei* 'nin, karbon kaynağı olarak glukoz ve nişasta kullanıldığında, fosfatı sınırlandırılmış şartlar altında %60 PHB verimi elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bunların dışında Laktik asit bakterilerinin de PHB üretimi için kullanılabileceği bildirilmiştir. *Lactobaciller* sürekli fermentasyon şartlarında üretilseler, daha fazla PHB biriktirdikleri ve bunun ticari termoplastik üretiminde de kullanılabileceği söylenmiştir (5).

Qi ve Rehm (43), yaptıkları çalışmada en büyük PHB sentaz genini tespit ettikleri *Caulobacter crescentus* bakterisinin, glukoz varlığında %18 PHB ürettiğini tespit etmişlerdir. Bu bakteri özellikle içerdiği PHB sentaz enzimi nedeniyle dikkat çekmiş ve genetik uygulamaya tabii tutulmuştur.

Manna ve arkadaşları (102), topraktan izole ettikleri 55 toprak streptomycet üzerinde yaptıkları çalışmada, *Streptomyces griseorubiginosus* olarak tanımlanan izolatin, %2 glukoz varlığında, durgun fazda, miselial kuru ağırlığının %9,5'u kadar PHB ürettiğini tespit etmişlerdir.

Semenov ve arkadaşları (103), birkaç *polyprothecate* bakterisi ile yaptıkları çalışmalarında, *Labrys* cinsinde yer alan bakterilerin %26, *Prothecomicrobium* cinsindeki bakterilerin ise %23 PHB miktarına ulaştıklarını bildirmişlerdir.

Aktif çamur bakterilerinde de PHB'nin varlığı rapor edilmiş ve PHB gibi bakteriyel depo polimerlerinin önemi, aktif çamur işlemlerinde karbon substrat değişimlerinin anlaşılmasında ayrıntılı olarak çalışılmıştır (104). Mikrobiyal oksidasyon sırasında yapışkan, topaklı ve gri-siyah bir yapı olan aktif çamur, mikrobiyal hücre, heteropolisakkaritler ve polyester içerdiği bildirilmiştir (105).

Loosdrecht ve arkadaşları (13), aktif çamur içindeki bakterilerin PHB depo ettiklerini ve hücre dışı maddeler tükendiğinde, depolar aracılığıyla gelişmelerini sürdürdüklerini belirtmişlerdir.

## Genetik Uygulamalarla PHB Eldesi

1920'li yıllardan bu yana hakkında birçok bilgi edinilmiş olmasına rağmen, ticari PHB üretiminin hala çok yüksek maliyete neden olması, sentetik polimerlerin yerini alabilecek kapasiteye sahip olan bu biyoplastiğin en önemli dezavantajıdır. Son yıllarda, moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, daha fazla ve ucuz PHB üreten rekombinant bakteriyel suşların ve transgenik bitlilerin geliştirilmesi çalışmaları hız kazanmıştır (78, 8).

## Rekombinant Mikroorganizmalardan PHB Üretimi

PHB'in rekombinant mikroorganizmalardan yüksek oranda üretimi, vektör veya promotor aktivitesindeki zenginleşmeye bağlı olarak artmaktadır (41). Bu amaçla *Alcaligenes eutrophus* ve *Alcaligenes latus* bakterilerinin PHB biyosentez genlerinin başarıyla aktarıldığı rekombinant *Escherichia coli* suşları kullanılmaktadır (78). Nitekim, 1987 yılında *A. eutrophus* genleri, *E. coli* bakterisine başarıyla klonlanmış ve normalde PHB üretmeyen bakterinin, modifiye edildikten sonra PHB ürettiği gösterilmiştir (14).

PHB biyosentetik genlerinin (phbA, phbB ve phbC) *Alcaligenes eutrophus*'da kromozom ve megaplasmid pHG1'de yerleştiği bildirilmiştir (27). Gelişen Hibridizasyon teknikleri ve heterolog tamamlayıcılar, bu ve diğer bakterilerin PHB biyosentez genlerinin izolasyonunu ve klonlanmasını mümkün kılmaktadırlar (28).

*E. coli*, PHB üretimi çalışmaları için etkin olarak kullanılabilen bir konakçı suş olup; sadece çok düşük molekül ağırlığa sahip granül halde olmayan PHB biriktirdiği bildirilmiştir (106). Rekombinant *E. coli*'nin PHB üretimi için geliştirilmesinin hızlı üreyerek, gerekli hücre yoğunluğuna ulaşması; polimerin yüksek miktarda biriktirilebilmesi; ucuz karbon kaynağı kullanabilmesi, üretilen PHB'in kolay saflaştırılabilmesi ve sentezlenen polimerin depolimerizasyonuna neden olan enzimlerin eksikliği gibi önemli bazı avantajları vardır. Bu nedenle, rekombinant *E. coli* bakterilerinden %80-90 oranında PHB verimi elde etmek mümkün olduğu bildirilmektedir (3).

Lee ve arkadaşları (63), *E. coli*'de PHB üretimi için, *A. eutrophus* PHB sentez genleri taşıyan plazmidler kullanmışlar ve plazmid stabilitesinin yüksek olduğunu belirttikleri çalışmalarında, PHB veriminin %80,1'e ulaştığını bildirmişlerdir.

Peynir altı suyu gibi ucuz substratlardan PHB üretiminin, bir rekombinant *E. coli* suşu kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, farklı oksijen konsantrasyonları altındaki PHB verimleri araştırılmıştır. Oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığı tespit edilen çalışmada, yüzde PHB verimi %80'e ulaşmıştır. Araştırmacılar, rekombinant *E. coli* 'de PHB biyosentez zamanı ve oksijen sınırlandırılması zamanının PHB verimi için önemli olduğunu belirtmişlerdir (83).

Klinke ve arkadaşları (82) da, şeker veya melas gibi ucuz karbonhidrat kaynaklarından, rekombinant *E. coli* yardımıyla PHA üretimi için alternatif stratejiler yapılabileceğini ve *E. coli*'nin kısa sürede üreme, PHA'nın kolayca saflaştırılabilmesi, polimeri parçalayıcı enzim sisteminin yokluğu nedeniyle dikkat çektiğini söylemişlerdir. Araştırmacılar,  $\beta$ -oksidasyon döngüsünü işletemeyen bir *E. coli* suşuna, glukonattan PHA sentezleyemeyen *Pseudomonas* bakterisinden orta zincir uzunluğunda PHA polimeraz enzimini kodlayan geni aktararak, onun glukonattan orta zincir uzunluğunda PHA üretmesini sağlamışlardır. Rekombinant *E. coli* 'deki PHA verimi %2,3 olarak tespit etmişlerdir.

Qi ve Rehm (43), bilinen en büyük PHB sentaz genine sahip olduğunu bildirdikleri, glukoz varlığında %18 PHB üreten, *Caulobacter crescentus* bakterisini genetik uygulamaya tabii tutmuşlardır. Bakterideki PHB sentaz enzimi genini, phaC, kodlayan bölgeyi mutant *A. eutrophus* PHB(-)4 ve rekombinant *E. coli* JM109'a aktarmışlardır. Sonuçta yüzde PHB verimi sırasıyla %62 ve %6 olarak tespit edilmiş, özellikle *A. eutrophus* PHB(-)4'den alınan verim dikkate değer görülmüştür.

Ahn ve arkadaşlarının (78), *Alcaligenes latus* PHA biyosentez genlerini kopyaladıkları *E. coli* CGSC 4401 suşunun, peynir altı suyundan ürettiği PHB miktarını tespit ettikleri çalışmalarında, yüzde PHB veriminin yaklaşık %60 civarında olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, farklı oranlardaki çözünmüş oksijen konsantrasyonunun etkisini de inceledikleri araştırmalarının sonucunda, mikroorganizmanın aktif PHB sentez fazını geçirdiği sırada çözünmüş oksijen konsantrasyonunun düşürülmesinin PHB sentezini hızla arttırdığını bildirmişlerdir.

Slater ve arkadaşları (20) yaptıkları çalışmada, *A. eutrophus* 'dan alınan PHB biyosentez genlerini *E. coli* fadR atoC mutant bakterisine aktararak, glukoz ve propiyonat içeren ortamda P(HB-co-HV) kopolimerinin üretilmesini sağlamışlar ve özellikle ortamdaki propiyonat miktarının HV şekillenmesinin oranını değiştirdiğini tespit etmişlerdir.

Föllner ve arkadaşları (107), metanol içeren ve nitrojen ve fosforu sınırlandırılmış ortamda, çok az miktarda PHB biriktiren *Mycoplana rubra* B346 suşuna PHA sentaz enimi genlerini aktarmışlar ve PHB birikimini %9,6'den %25'e yükseldiğini bildirmişlerdir.

Hori ve arkadaşları (108), *Bacillus megaterium* 'un kendini yıkan bir suşu üzerinde yaptıkları çalışmalarla elde ettikleri transformantın PHB üretimini incelemişler ve ortamda glukoz tükenince hücrelerin kendiliğinden parçalanıp, PHB'ın serbestleştiğini tespit etmişlerdir.

## **Transgenik Bitkilerden Biyoplastik Eldesi**

Bitkiler birer PHB üreticisi olmamalarına karşın, PHB genlerinin taşıyıcısı olabildiklerinden, PHB üretebildikleri (24) ve bu nedenle, transgenik bitkilerin çok miktarda ve ucuz PHB üretimi için potansiyel organizmalar olduğu bildirilmiştir (8, 24,



82). Yapılan çalışmalarda bunlardan, kuru ağırlıklarının %20-40 arasında PHB elde edilebilmiştir (82).

Bitkilerde biyoplastik sentezinin değişik metabolik yollarla, sitoplazma, plastid veya peroksizomda gerçekleşebildiği bildirilmektedir (8). Araştırmacılar, gen aktarımı yapılmış bitkilerin, PHB üretimine başladıktan sonra nişasta üretimini bıraktıklarını ve tüm enerjilerini polimer yapımı için yönlendirdiklerini söylemektedirler. Bunun, yeni enzimlerin eklenmesi ve varolan enzimlerin çalışmasının engellenmesi ile ortaya çıktığını düşünen bilim adamları, PHB'ı metabolize edemeyen bitkilerin tohumlarının gelişmemesini ise bir problem olarak belirtmektedirler (14).

*Alcaligenes eutrophus* 'dan alınan PHB genleri, mısır, patates gibi birkaç farklı bitkiye aktararak, onların polimer üretmesi sağlanabildiği ve Imperial Kimya Şirketi'nin pilot uygulamalarında yılda 50 ton PHB-HV kopolimerinin elde edilebildiği bildirilmiştir (14). Mısır ve arpa yağlı tohumlarında, ayçiçeği ve soya fasulyesinde PHA'ların üretilmesi için büyük şirketler tarafından araştırmalara devam edilmektedir (7).

Bitkilerden PHB eldesinde tüm fermentasyon işlemlerinin ortadan kalktığını ve plastiğin direkt olarak elde edilebildiğini bildiren araştırmacılar, genetik olarak değiştirilmiş mısır bitkisine sentez ettirilen plastiğin, bitkinin çok fazla büyümeden hasat edilmesi ile elde edildiğini rapor etmişlerdir (109).

Modifiye mısırdan PHA eldesinin ise, oldukça sert ve ağır bir işlem gerektirdiği ancak karbondioksit ve güneş ışığının, karbon ve enerji kaynağı olduğu bu PHA üretiminde yapılması gerekenlerin, fermentasyon işlemlerinden daha fazla olmadığı söylenmektedir (7).

Bitkilere PHA genlerinin aktarılması ile ilgili ilk araştırmalarda, *A. eutrophus* bitkisinden alınan genlerin aktarıldığı bitki, *Arabidopsis thaliana* olmuştur (8). Poirier (8), *A. thaliana* sitoplazmasında, *A. eutrophus*'un PHA sentaz ve asetoasetil-CoA redüktaz genlerinin etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. 3-ketotiazolaz geni bitki sitoplazmasında mevcuttur. Bu deneyler, tüm bitki dokularının koful, çekirdek ve sitoplazmalarında PHB sentezinin olduğunu fakat, düşük miktarda ve zayıf tohum gelişimine sebep olduğunu göstermiştir.

Daha sonraki araştırmalar, asetil-CoA'dan trigliseridlerin olduğu yer olan, plastid gibi özel organellerde PHB üretilme yöntemlerinin geliştirilmesine yönlendirilmiştir. Bu çalışmalarla, sitoplazmada depolanan PHB'den 100 kez daha fazla, bitkinin kuru ağırlığının %14'ü kadar homopolimer elde edilmiştir ve PHB granüllerin şekli ve büyüklüğü, bakteriyel granüllere benzemektedir (7).

*A. eutrophus*'un PHA sentaz ve asetoasetil-CoA redüktaz genlerinin aktarıldığı pamuk bitkisinde de, pamuk liflerinin PHA içerdiği ve bu liflerin yüksek ısıya daha dayanıklı hale geldiği bildirilmiştir (7).

Şimdiye dek yapılan çalışmalar, PHB üretiminin transgenik bitkiler ile ucuzlatılabileceğini göstermektedir ki bu gelecekte marketlerde "plastik patatesler"le karşılaşabileceğimizi düşündürmektedir (3).

Araştırmalarda elde edilen sonuçlardan, PHB üretiminin mikroorganizmaların türüne, üretim şartlarına ve rekombinasyonların başarısına bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Gelecek yıllarda PHB polimerinin, geniş kullanım alanlarına sunulabilecek düzeyde üretiminin büyük faydalar getireceği açıktır.

## Kaynaklar

1. Page, W. J., 1992b, Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, FEMS Microbiology Reviews, 103, 149-158.
2. <http://www.bact.wisc.edu/ScienceEd/BacterialPlastics.html>
3. Lee, S. Y., 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49, 1-14.
4. Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J. D., 1996, Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403. Ind. Jour. Exp. Bio., 34: 216-219
5. Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, KÜKEM Dergisi, 19, 2, 23-32.
6. Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y., 1998, Toprakta izole edilen Bazı *Bacillus* türlerinin Poly- $\beta$ - hydroxybutyrate (PHB) üretim miktarlarının belirlenmesi, Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği Sempozyumu'98, Anadolu Üni. Ve Biyoteknoloji Derneği, 23-24 Ekim 1998 Eskişehir.
7. Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. L., 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, Journal of Biotechnology, 65, 127-161.
8. Poirier, Y., 2002, Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, Progress in Lipid Research, 41, 2, 131-155.
9. Labuzek S., and Radecka, I., 2001, Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85, Journal of Applied Microbiology, 90, 353-357.
10. Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., ho, K., Chen, G., 2001, Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Jma5 cultivated in molasses media, Antonie van Leeuwenhoek, 80, 111-118.
11. Rosovitz, M., J., Voskuil, M., I., Chambliss, G., H., 1998, *Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Sussman, Oxford University Press, Ninth Edition, Volume 2, New York.
12. Anderson, A., Dawes, E., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydrxyalkanoates, Microbiological Reviews, 54, 4, 450-472.
13. Loosdrecht, M. C. M., Pot, M. A., Heijnen, J. J., 1997, Importance of bacterial storage polymers in bioprocesses, Wat. Sci. Tec., 35, 1, 41-47.
14. Pool, R., 1989, In search of the plastic potato, Science, 245, 1187-1189.
15. Madison, L. L., Huisman, G. W., 1999, Metabolic Engineering of Poly(3-Hydrxyalkanoates): From DNA to Plastic, Mic. Mol. Bio. Reviews, 63, 21-53
16. <http://www.clt.astate.edu/dgilmore/Research%20students/phas.html>
17. Holmes, P. A., 1985, Applications of PHB – A Microbially produced Biodegradable Thermoplastic, Phys. Technol., 16, 32-36.

18. Lafferty, R. M., Korsatko, B., Korsatko, W., 1988, Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid, *Biotechnology*, edited by H. J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
19. Findlay, R. H. and White, D. C., 1983, Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1, 71-78
20. Slater, S. Gallaher, T., Dennis, D., 1992, Production of polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4, 1089-1094.
21. Nickerson, K. W., Zarnick W. J. and Kramer, V. C., 1981, Poly-B-Hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 12: 327-331.
22. McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., Cannon, M. C., 1996, Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 138, 41-48.
23. Valentin, H. E., Lee, E. Y., Choi, C. Y., Steinbüchel, A., 1994, Identifications of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 710-716.
24. [http:// www. bio.umass.edu/biochem/cannon/htmlfiles/research.html](http://www.bio.umass.edu/biochem/cannon/htmlfiles/research.html)
25. Dunlop, W. F., Robards, A. W., 1973, Ultrastructural Study of Poly- $\beta$ - hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*, *J. of Bacteriol.* 114, 3, 1271-1280.
26. Taidi, B., Anderson, A., Dawes, E. A., Byrom, D., 1994, Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 786-790.
27. Steinbüchel, A., Schlegel, H. G., 1991, Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, *Molecular Microbiology*, 5, 3, 535-542.
28. Steinbüchel, A., 1991, Recent advances in the Knowledge of the Metabolism of bacterial polyhydroxyalkanoic acids and potential impacts on the production of biodegradable thermoplastics, *Acta Biotechnol.*, 11, 5, 419-427.
29. Weber, C. J., 2000, Biobased Packaging Materials for the food Industry, The EU Directorate 12, Frederiksberg.
30. Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N. and Seguin, J. P., 1996,  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, *Enzyme and Microbial Technol.*, 18, 195-201.
31. Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. and Fuller, R. C., 1991, The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*, *Arch. Microbiol.*, 155, 337-340.
32. Benoit, T. G., Wilson, G. R. and Baugh, C. L., 1990, Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 15-18
33. Tavernier, P., Portais, J. C., Saucedo, J. E. N., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N., 1997, Exopolysaccharide and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1, 21-26.

34. Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., 1985, Fluorescence intensity of strains of nodule Bacteria (*Rhizobium melliloti*, *R. phaseoli*) differing in activity, Grown in the Presence Lipophilic vital stain phosphine 3R, *Microbiol.*, 54, 4, 535-541.
35. Misra, A. K., Thakur, M. S., Srinivas, P., Karanth, N. G., 2000, Screening of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-producing microorganism using Fourier transform infrared spectroscopy, *Biotechnology Letters*, 22, 1217-1219.
36. Yan, Y., Wu, Q., Zhang, R., 2000, Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by  $^{13}\text{C}$  NMR, *FEMS Microbiology Letters*, 193, 269-273.
37. Ostle, A., Holt, J. G., 1982, Nil Blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 1, 238-241.
38. Bonartseva, G. A., 1985, Testing for activity of nodule bacteria in terms of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation following vital staining of the colonies with phosphine 3R, *Microbiology*, 54, 3, 371-374.
39. Pierce, L., Schroth, M. N., 1994, Detection of *Pseudomonas* colonies that accumulate poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on Nile blue medium, *Plant Disease*, 78,7, 683-685.
40. McCool, G. J. and Cannon, M. C., 1999, Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body-Associated Proteins and Coding Region in *Bacillus megaterium*, *J. Bacteriol.*, 181 (2), 585-592.
41. Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakamura, H., Doi, Y., 2001, Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system, *FEMS Microbiology Letters*, 198, 65-71.
42. Rehm, B. H. A., Antonio, R. V., Spiekermann, P., Amara, A. A., Steinbüchel, A., 2002, Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594, 178-190.
43. Qi, Q., Rehm, B. H., 2001, Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase, *Microbiology*, 147, 12, 3353-3358.
44. Miyake, M., Miyamoto, C., Schnackenberg, J., Kuraane, R., Asada, Y., 2000, Phosphotransacetylase as a key factor in biological production of polyhydroxybutyrate, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84-86, 1039-1044.
45. Chen, G. Q., König, K. H. and Lafferty, R. M., 1991, Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Mic. Lett.*, 84:174-176.
46. Nguyen, S., Yu Ge, G. E., Marchessault R. H., 2002, Thermal degradation of poly(3-hydroxyalkanoates): Preparation of well defined oligomers, *Biomacromolecules*, 3, 1, 219-224.
47. Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J., 1993, Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 10, 3233-3238.
48. Yakabe, Y., Nohara, K., Hara, T., Fujino, Y., 1992, Factors affecting the biodegradability of biodegradable polyester in soil, *Chemosphere*, 25, 12, 1879-1888.

49. Abe, H., Kikkawa, Y., Iwata, T., Aoki, H., Akehata, T., Doi, Y., 2000, Microscopic visualization on crystalline morphologies of thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid ] and its copolymer, *Polymer*, 41, 867-874.
50. Abe, H., Doi, Y., 2002, Side-chain effect of second monomer units on crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability for random copolyesters of (R)-3-hydroxybutyric acid with (R)-3-hydroxyalkanoic acids, *Biomacromolecules*, 3, 1, 133-138.
51. Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. and Sakazawa, C., 1992, Production of 3-Hydroxybutyric Acid Trimer by *Bacillus megaterium* B-124. *Jour. Ferment. And Bioeng.*, 73, 3: 246-247.
52. Charles, T. C., Cai, G., Aneja, P., 1997, Megaplasmid and chromosomal Loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, *Genetics*, 146, 1211-1220.
53. Budwill, K., Fedorak, P. M., Page, W. J., 1996, Anaerobic microbial degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) with various terminal electron acceptors, *Journal of Environmental Polymer, Degradation*, 4, 2, 91-102.
54. Molitoris, H. P., Moss, S. t., de Koning, G. J. M., 1996, Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 570-579.
55. Khan, S. T., Hiraishi, A., 2001, Isolation and characterization of a new poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, denitrifying bacterium from activated sludge, *FEMS Microbiology Letters*, 205, 253-257.
56. Stieb, M., Schink, B., 1984, A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytropus*, *ge. Nov. sp. nov.*, possessing various fermentation pathways, *Arch. Microbiol.*, 140, 139-146.
57. Sei, K., Nakao, M., Mori, K., Ike, M., Kohno, T., Fujita, M., 2001, Design of PCR primers and a gene probe for extensive detection of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacteria possessing fibronectin type III linker type-PHB depolymerases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 801-806.
58. Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K. P., Becher, B., 2001, Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate, *Biomaterials*, 22, 2447-2452.
59. Chowdhury, B. and John, M., 1998, Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate, *Thermochimica Acta*, 313, 43-53.
60. Miller, N. D. and Williams, D. F., 1987, On the biodegradation of poly-  $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly-  $\beta$ -hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers, *Biomaterials*, 8, 129-137.
61. [http:// www. snf.ch/de/com/prr/prr\\_arh\\_00feb21.asp](http://www.snf.ch/de/com/prr/prr_arh_00feb21.asp)
62. Yağmurlu, M. F., Korkusuz, F., Gürsel, I., Korkusuz, P., Örs, Ü., Hasırcı, V., J. 1999, Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis, *Biomed. Mater. Res.*, 46, 494-503.
63. Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N., Chang, Y. K., 1994, Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology*, 32, 203-211.

64. Tanaka, K., Katamune, K., Ishizaki, A., 1993, Fermentative production of poly-Beta-hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*, *Biotechnology Letters.*, 15, 12, 1217-1222.
65. Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K., 1986, Nuclear Magnetic Resonance Studies on Poly ( Beta- hydroxybutyrate) and a Copolester of Beta- Hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, *Macromolecules*, 19, 2860-2864.
66. Bloembergen, S., Holden, D., Hamer, G., Bluhm, T., Marchessault, R., 1986, Studies of Composition and Crystallinity of Bacterial Poly( $\beta$ - hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate), *Macromolecules*, 19, 2865-2871.
67. Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C, Dube, B., Bataille, P., Ramsay, J. A., 1990, Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 7, 2093-2098.
68. Page, W. J. and Cornish, A., 1993, Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, *Appl. Environ. Microbiol.* 5, 12, 4236-4244.81. Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R. and Tokiwa, Y., 1999, Photosynthetic accumulation of poly(hydroxybutyrate) by cyanobacteria – the metabolism and potential for CO<sub>2</sub> recycling, *International Journal of Biologicals Macromolecule.*,25, 37-42.
69. Durner, R., Witholt, B., Egli, T., 2000, Accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, 3408-3414.
70. Bertrand, J. L., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C, 1990, Biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates from Pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 10, 3133-3138.
71. Page, W. J., Sherburne, R., D'Elia, L., Graham, L. L., 1995, Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Can. J. Microbiol.*,41, 22-31.
73. Madden, L. A., Anderson, A. J., Asrar, J., Berger, P., Garrett, P.,2000, Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures, *Polymer*, 41, 3499-3505.
74. Page, W. J., 1992a, Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnol. Lett.*, 14, 5, 385-390.
75. Witholt, B., Kessler, B., 1999, Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 279-285.
76. Gouda, M. K., Swellam A. E., Omar, S. H., 2001, Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources, *Microbiological Research*, 156, 3, 201-207.
77. Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W., Yu, P. H., 2001, Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 515-524.
78. Ahn, W. S., Park, S. J., Lee, S. Y., 2000, Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8, 3624-3627.

79. Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., Goulet, J., 1995, Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1, 165-169.
80. Philippis, R., Ena, A., Guastini, M., Sili, C., Vincenzini, M., 1992, Factors affecting poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *cyanobacteria* and in purple non-sulfur bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 103, 187-194.
81. Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R. and Tokiwa, Y., 1999, Photosynthetic accumulation of poly(hydroxybutyrate) by cyanobacteria – the metabolism and potential for CO<sub>2</sub> recycling, *International Journal of Biologicals Macromolecules*, 25, 37-42.
82. Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B., Kessler, B., 1999, Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from Gluconate by recombinant *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2, 540-548.
83. Kim, B. S., 2000, , Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 774-777.
84. Kim, S. B, Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H. N., Chang, Y. K., and Woo, S. I., 1994, Production of poly(3-hydroxybutyric Acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 892-898.
85. Bormann, E. J., Leissner, M., Beer, B., 1998, Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 84-88.
86. Page, W. J., 1989, Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 329-333.
87. Page, W. J. and Knosp, O., 1989, Hyperproduction of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 6, 1334-1339.
88. Lach, D. A., Sharma, V. K., and Vary, P. S., 1990, Isolation and characterization of a unique division mutant of *Bacillus megaterium*, *J. Gen. Microbiol.*, 136, 545-553.
89. Beyatlı, Y., Aslım, B., Mumcu, Z. N., 1999, Doğada Parçalanabilen Termobiyoplastiklerin Üretimi. Devlet Planlama Teşkilatı Projesi (DPT : 97K121150), s.21-37, Ankara,
90. Mercan, N., Beyatlı, Y., 2001, *Bacillus sphaericus* suşlarının poli- $\beta$ -hidroksibütirat (PHB) üretimlerinin incelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25, 2, 1-7.
91. Hoffmann, N., Steinbüchel, A., Rehm, B. H. A., 2000, Homologous functional expression of cryptic phaG from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 665-670.
92. Huisman, G. W., Leeuw, O., Eggink, G., Witholt, B., 1989, Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates, is a common feature of fluorescent *Pseudomonads*, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 8, 1949-1954.
93. Karaboz, İ., Umay, F. B., 1994, *Pseudomonas extorquens* den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 6-8 Temmuz 1994 Edirne, 14-17.
94. Daniel, M., Choi, J. H., Kim, J. H., Lebeault, J. M., 1992, Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 702-706.

95. Xi, J., Wu, Q., Yan, y., Zhang, Z., Yu, P. H. F., Cheung, M. Zhang, R., Chen, G., 2000, Hyperproduction of polyester consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 43-49.
96. Ateş, M., Ekmekçi, S., 2001, Pancar melası kültüründe *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'dan PHB üretimi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25, 3, 61-70.
97. Gomez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Bueno Netto, C. L., Oliveira, M. S., da Silva, L. F., 1996, Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 785-791.
98. Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., Zagreba, E. D., 1989, Relationship between poly- $\beta$ -hydroxybutyrate content and nitrogenase and hydrogenase activity in some strains of *Rhizobium*, *Mikrobiologiya*, 58, 6, 920-922.
99. Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., Zagreba, E. D., 1994, Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate content in cells of various *Rhizobium* species during growth with different carbon and nitrogen sources, *Microbiol.*, 63, 1, 45-48.
100. Tal S. and Okon, Y., 1985, Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd, *Can. J. Microbiol.*, 31, 608-613.
101. Lillo, J. G., Valera, F. R., 1990, Effects of culture conditions on poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 8, 2517-2521.
102. Manna, A., Banerjee, R., Paul, A. K., 1999, Accumulation of poly(3-Hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*, *Current Microbiology*, 39, 153-158.
103. Semenov, A. M., Hanzlikova, A., Jandera, A., Quantitative estimation of poly-3-hydroxybutyric acid in some oligotrophic polyprosthecate bacteria, *Folia Microbiol.*, 34, 267-270.
104. Beun, J. J., Dircks, K., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J., 2002, Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures, *Water Research*, 36, 1167-1180.
105. Wallen, L. L. and Rohwedder, K. W., 1974, Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge, *Environmental Science&Technology*, 8, 6, 576-579.
106. Sim, S. J., snell, K. D., Hogan, S. a., stubbe, J., Rha, C., Sinskey, A. J., 1997, PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo, *Nature Biotechnology*, 15, 63-67.
107. Föllner, C. G., Müller, S., Steinbüchel, A., Babel, W., 1995, Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyric acid by the facultatively methanol-assimilating bacterium *Mycoplasma rubra* B346 and recombinant strains, *J. Basic Microbiol.*, 35, 3, 179-188.
108. Hori, K., Kaneko, M., Tanji, Y., Xing, XH., Unno, H., 2002, Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2-3), 211-216.
109. [http:// www. sciam.com/2000/0800issuegerngross.html](http://www.sciam.com/2000/0800issuegerngross.html)