

Bakteriyal Biyoplastikler ve Kullanım Potansiyelleri¹

Nazime Mercan² Yavuz Beyatlı³

Özet

Bir çok bakteri, besinlerin sınırlandığı şartlarda polihidroksialkanatları (PHA) karbon ve enerji depo materyali veya elektron havuzu olarak sentezlemekte ve biriktirmektedir. Bunlar çok sayıda gram pozitif ve gram negatif bakteri tarafından sentezlenen yapısal olarak basit makromoleküllerdir. PHA'lar, biyolojik yönden parçalanabilir plastikler olarak tanımlanmalarına rağmen, geleneksel plastiklere göre maliyetinin yüksek olması, bunların geniş alanda kullanımını sınırlandırmaktadır. Çok sayıda bakteri ve rekombinant *E. coli*, yüksek verimlilikte PHA üretimi için geliştirilmektedir. Bunun yanı sıra, bakteriyal biyosentez genlerinin bitkilere aktarılması ile PHA'ların ekonomik üretimi de gerçekleştirilmektedir. Fermantasyon saflaştırma teknolojisindeki atılımlar ile bakteriyal suşlar veya bitkilerdeki gelişmeler, bakteriyal biyoplastikleri geleneksel plastiklerle yarışabilir bir konuma getirecektir.

Anahtar kelimeler: Bakteriyal biyoplastikler, polihidroksialkanatlar, polimer üretimi

1. Giriş

Son yıllarda çevre koruma bilincinin artırılmasına yönelik çalışmalarda önemle üzerinde durulan konulardan birisinin de plastik ambalaj malzemeleri olduğu görülmektedir. Yerine kullanılabilir başka bir malzeme cinsi bulunmadığı sürece, getirilmeye çalışılan her türlü yasaklama ve kısıtlamanın ambalaj malzemesi olarak plastiklerin kullanılmasını engellemeyeceği açıktır.

Atıkların büyük bir bölümünü plastik materyaller oluşturmaktadır. Atık plastikler genellikle diğer evsel atıklarla birlikte çöp boşaltma sahalarına atılmakta veya çöp çukurlarına dökülmektedir. Atık boşaltma sahalarının ve çukurlarının giderek dolması, yakma gibi alternatif yöntemlerin giderek artan maliyetleri, çeşitli teknik sorunlar, enerji kaynaklarını koruma ve atıkları çevresel açıdan kabul edilebilir şekilde azaltma

¹ Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Prof. Dr. Yavuz Beyatlı'nın danışmanlığı altında hazırlanıp, Haziran 2002 'de tamamlanmış olan "*Rhizobium* Cinsi Bakterilerin Poli- β -Hidroksibütirat Üretimlerinin Belirlenmesi, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Elde Edilen Toplam Protein Profillerinin ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır.

² Yrd. Doç. Dr., Pamukkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kınıklı, Denizli. Yazışmalardan sorumlu Yazarın E-posta adresi: namercan@pamukkale.edu.tr

³ Prof. Dr., Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Teknikokullar, Ankara.

isteğiyle birleşince atık plastiklerin yeniden kullanımı konusu gündeme gelmiştir (1). Fakat atık plastiklerin tekrar kullanıma hazırlanması için toplama, ayıklama, hammadde haline getirme aşamaları maliyeti arttırmaktadır. Gerçekten de gittikçe artan ve bilinmeyen çevresel sonuçlar, biyolojik olarak parçalanabilen plastiklere ilginin her geçen gün büyümesine neden olmuştur (2). Bu sorunların çözümüne yönelik polimer biliminde yapılan çalışmalar arasında biyopolimerler (mikrobiyal termoplastikler) önemli bir yer tutmaktadır.

Biyolojik olarak parçalanabilen poli- β -hidroksibütirik asit (PHB)'in özellikleri yıllardan beri bilinmesine ve alınan patentlerin 1962'de J.N. Baptist tarafından Amerika'da orijinal olarak dosyalanmasına rağmen 1982'de Imperial Chemistry Industries Plastic (ICI plc.) tarafından bu polimerin Biopol ticari adıyla pazarlanmasına kadar, polihidroksialkanatların (PHA) ve PHB'nin endüstriyel üretimi üzerinde yeterince durulmamıştır (3). Biopol, *Alcaligenes* cinsine ait bakteriler kullanılarak endüstriyel olarak üretilmiş ilk biyodönüştürülebilir plastiktir. Bu materyal, doğal ve sentetik polimerlerin tüm avantajlarını taşımaktadır. Güçlü kristal yapıda olup polimer ya da monomer birimlerine bağlı olan, elastik kauçuklara benzeyen çeşitli özelliklere sahiptir (4).

1920'li yıllarda, bazı bilim adamlarının, bakteri hücrelerinde yedek enerji kaynağı olarak PHA sınıfının bir üyesi olan PHB'nin biriktirildiğini saptamaları, o zamanlar henüz farkına varılmayan günümüzde yoğun ilgi odağı olan yeni bir plastik malzeme sınıfının keşfinin başlangıcı olmuştur. Karbon, azot, fosfor, potasyum gibi elementlerin herhangi birinin kısıtlanması ile bakteri bu gerilimli ortamda canlılığını devam ettirebilmek için ilerde kullanmak amacıyla enerji deposu olarak bu polimeri biriktirmektedir (5).

Birçok mikroorganizma tarafından doğal olarak sentezlenen PHB'nin, yüksek miktarlarda üretilen ve çoğunlukla ambalaj malzemesi olarak kullanılan polipropilenin özelliklerine benzerlik göstermesi, bu termoplastiğin Avrupa, Amerika ve Japonya'da endüstriyel çapta üretimine hız kazandırmıştır. Doğaya terk edildiği zaman petrol kökenli plastiklerin uzun yıllar bozulmadan kalması yaban hayat için toksik etki yapmaktadır. Sonuç olarak tüm dünyada geleneksel polimerlerin kullanımının azaltılması amaçlanmış, buna yönelik çalışmalara başlanmıştır (6).

2. Prokaryotik Hücre İnküzyonları ve Poli- β -Hidroksibütirat (PHB)'in Tarihçesi

Hücre inküzyonu formunda olan ökaryotik depo materyalleri, genelde lipitler veya polisakkaritlerdir. Mayalar, filamentli funguslar gibi ökaryotik hücreler ve hayvansal hücreler, büyüme koşulları düzensiz olduğunda, nişasta veya glikojen (amilopektin) gibi çözünmeyen polisakkaritler ya da intrasellüler yağ kürecikleri biriktirirler. Bunlar basit boyama yöntemleri uygulanarak kolaylıkla tanımlanabilirler (7). Birçok prokaryot ve ökaryot mikroorganizma karbon içeren hücre içi depo materyallerini sentezleyecek enzimatik kapasiteye sahiptir. Bu depo materyalleri, dengesiz büyüme koşulları gibi özel koşullar altında organizmalar tarafından sentezlenen maddeler olarak bilinirler.

Mikroskobun, mikrobiyoloji alanında kullanılmaya başlamasından bu yana, birçok kez küçük "yağ damlaları"nın bazı bakteri hücrelerinde düzenli bir şekilde gözlemlendiği

belirtmiştir. *Rhizobium* hücreleri içindeki böyle granüllerin nodüllerden izole edilen bakteroidlerde de bulunduğu gözlenilmiş ve bunlar “ışığı kıran damlacıklar” olarak belirtilmiştir. Birçok mikrobiyolog, bakterilerdeki lipofilik granülleri çok önceden tanımlamış olmasına rağmen, bu partiküllerin yapısı ilk kez Lemoigne tarafından 1923 yılında ortaya konmuştur. Araştırmacı, *Bacillus subtilis* kültürleri distile suda otolize olduğu zaman, bilinmeyen bir asit oluşumu ile pH'nın azaldığını gözlemiştir. Bu bilinmeyen asidin, şeker hastalarında görülen ürindeki β -hidroksibütirik asite benzer olduğu sonradan bulunmuştur. Araştırmacılar, *Bacillus megaterium*'un otolizi esnasında β -hidroksibütirik asit monomerleri oluştuğunu ve bu monomerlerin kaynağının poli- β -hidroksibütirik asit olduğunu kesin olarak ortaya koymuşlardır (3, 5).

PHB'nin mikrobiyal sentezi uzun yıllar araştırma konusu olmamıştır. Lafferty ve ark.'nın (7) bildirdiğine göre, gram negatif bakterilerde PHB sentezini ilk kez gösteren Forsythe ve grubu olmuştur. Buna ilaveten araştırmacılar PHB sentez yeteneğinin varlığının ya da yokluğunun, bir taksonomik kriter olarak kullanılabileceğini de rapor etmişlerdir. Aynı yıllarda bakteriyel biomasstan PHB'nin kantitatif belirlenmesi için ilk pratik metotlardan biri geliştirilmiştir. Hücreleri, PHB'nin dışında tüm hücresel bileşiklerin çözünebildiği standart şartlarda alkali hipoklorit solusyonu ile muamele etmişlerdir. Bu şekilde elde edilen PHB granüllerinin yoğunluğu, hücre içindeki PHB miktarıyla bağlantılı olarak belirlenmiştir Bu metot geliştirilmeden önce Lemoigne, PHB'yi kuru bakteri kütesinden kloroform ile ayırmış ve gravimetrik olarak belirlemiştir (7).

Birçok bakteri cinsinin PHB sentezleme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür ve farklı cinslerde sentezlenen PHB'nin infrared absorpsiyonu ile X-ışını differaksiyonu gibi fiziksel özellikleri birbirine benzemektedir. Böylece bir depo materyali olan PHB'yi sentezleme yeteneğinin prokaryotik mikroorganizmalarda çok yaygın olduğu bulunmuştur (6).

3. PHB'nin Özellikleri

Bakteri hücrelerinde PHB granülleri faz-kontrast veya elektron mikroskop kullanıldığında kolayca gözlenebilir. Granüller, 100-800 nm çapında olup genellikle küresel şekildedirler. 2-4 nm kalınlığında ünit olmayan bir membranla çevrilidir. İzole edilen PHB granülleri yaklaşık %98 PHB ve %2 protein içermektedir. *Bacillus cereus*'tan izole edilen PHB granüllerinin %50'si merkezi bir çekirdekten oluşmaktadır. Bu çekirdek en dışta bir membranla tekrar çevrilmiştir. Yapılan araştırmalar sonunda herbir granülün fibriler yapıda olduğu saptanmıştır (3). Araştırmacılar bu fibrillerin eş zamanlı sentez ve suda çözünmeyen bir polimer yapısında, kristalizasyonun bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar, bakteri hücrelerinden hiç bozulmamış doğal PHB granülleri elde etmedeki zorluklar nedeniyle, PHB sentezinin fiziksel mekanizması konusunda halen bazı belirsizlikler olduğunu açıklamışlardır. Ancak, hücre içindeki PHB'nin yüksek bir kristallenme yüzdesiyle (%80) fibriler bir yapıya sahip olduğu kesin olarak bilinmektedir (8).

Optik olarak aktif olan PHB, D(-) konfigürasyonundadır. Konfigürasyonu ve kaynama noktalarının birbirine yakınlığı nedeniyle polipropilen ve PHB, yapısal olarak benzerlik

göstermektedirler. Biyouygunluk ve biyodönüşüm gibi önemli özelliklere sahip olmaları, aynı derecelerde kristalleşmelerine rağmen bunların kimyasal özellikleri tamamen farklıdır. Fiziksel olarak PHB, propilenden daha sert ve kırılındır. Fakat UV ışığına karşı daha dirençlidir (4).

PHB, D(-)-3-hidroksibütirik asitin makromoleküler bir polimeridir. İzolasyon yöntemi, kullanılan bakteriyal suş, substratın tipi, inkübasyon süresi ve oksijenin kısmi basıncı polimerin kimyasal yapısında değişikliklere neden olmaktadır (3, 9). Barham ve ark (10), çözelti halindeki PHB'yi çöktürerek tek lamelli kristaller elde etmişler, lameller arasındaki kalınlık ile 25-125 °C arasındaki kristalleşme sıcaklığının birbiriyle ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmacılar eritmeyle kristalizasyonda PHB'yi kimyasal olarak saf ve küresel şekilde elde edip, bunları kristalizasyon sıcaklığına göre ayırmışlardır. Bu yüzden PHB'nin preparasyon yöntemi onun hem morfolojisi hem de fiziksel özelliklerini belirlemektedir. PHB'nin fiziksel özellikleri, kullanılan bakteri suşundan elde edilen polimerin moleküler ağırlığına bağlıdır. Ayrıca PHB'nin mikrobiyal kütleden ekstraksiyonu sırasında moleküler ağırlığında bir azalma olmaktadır (7).

Işık-yayıma ölçümlerine göre PHB granüllerinin moleküler ağırlıkları 5×10^9 civarındadır ve her bir granül minimum 1000 polimer zincirinden oluşmaktadır. *A. eutrophus*'taki PHB granüllerinin %40 su içerdiği tespit edilmiştir. Hücredeki granül sayısı da incelenmiş, granül sayısının polimer birikiminin başladığı erken gelişme safhalarında sabit olduğu belirlenmiştir (3). PHB, kopolimerleri kadar iyi bir şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve polietilen gibi diğer sentetik polimerlerle heteropolimerler yapımında kullanılabilir. Sentetik polimerlere kıyasla PHA'nın fiziksel özellikleri PHV/PHB moleküler oranının değiştirilmesiyle düzenlenebilir. PHB kopolimerleri diğer kopolimerlerden çok daha kullanışlıdır (11).

Fonksiyonel PHA'ların, primer sekansındaki diğer metabolitler veya çeşitli fonksiyonel monomerlerle bağlantılı olarak biyosentetik prosedürlerle hazırlanabildiği açıklanmıştır. *A. eutrophus*'un, polietilen glikol ve polisakkarit içeren ortamdaki fermentasyonu ile -OH uçlu blok polimer içeren PHA sentezlenmiştir (12). Besi ortamında yapılan değişikliklerle kopolimerin monomer kompozisyonunun ve moleküler ağırlığının kontrol edilebildiğini ispatlamışlardır. Araştırmacılar, sentezledikleri kopolimer bloğun termoplastik olarak kullanımda yüksek bir potansiyele sahip olduğunu da açıklamışlardır.

Madden ve ark. (13), *Ralstonia eutropha*'yı glukoz, propiyonik asit ve 4-hidroksibütirik asit veya bütürolakton karbon kaynaklarında geliştirdiklerinde bakterinin poli-3-hidroksibütirat-co-3-hidroksivalerat-co-4-hidroksibütirat terpolimerlerini sentezlediğini saptamışlardır. Monomerlerin farklı kısımlarını içeren terpolimerlerin termal ve mekanik özelliklerini karakterize etmişlerdir. Terpolimerlerin, kaynama sıcaklığının oldukça düşük olduğunu ve monomerlerin mekanik yönden daha üstün özellikte olduğunu savunmuşlardır. Hücre içi depo granülü olarak sentezlenen ve biriktirilen PHB, mikroorganizma için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Buna ilaveten lokal oksijen konsantrasyonlarının düzenlenmesinde, sporulasyon için enerji sağlanmasında ve redükleyici ekvalentler için elektron havuzu olarak da rol oynar (3, 9).

4. PHB'nin Biyosentezi

Prokaryotik hücrelerde PHB'nin intrasellüler sentezi için ilk bileşik Asetil CoA'dır. Genel olarak PHB, 3-Ketotiolaz, asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sintaz tarafından katalize edilen üç reaksiyon basamağı ile Asetil CoA'dan sentezlenmektedir (14, 15). Asetil CoA'nın hücrelerarası konsantrasyonunu artırıcı şartlar, PHB'nin sentezi üzerinde pozitif etki yapmaktadır (5). PHB'nin hücre içi sentezi üzerine çeşitli ara yolların etkisi *B. megaterium*'da incelenmiştir. Birçok mikroorganizmanın PHB sentezinde ara bileşik olarak asetatı içerdiği bildirilmiştir. ¹⁴C-β-hidroksibütiril-CoA kullanmak suretiyle bu bileşiğin *Rhodospirillum rubrum* ve *B. megaterium*'da PHB sentezinde önemli bir ara ürün olduğu gösterilmiştir (3, 5). Steinbüchel ve Schlegel (16), PHB sentezinde anahtar reaksiyonun, iki molekül Asetil CoA'nın Asetoasetil CoA'ya dönüştüğü reaksiyonun olduğunu doğrulamışlardır.

A. eutrophus H16'da PHB'nin sentezindeki başlıca reaksiyonun, iki molekül CoA'nın Asetoasetil CoA'ya dönüşümünü içerdiği belirlenmiştir. Bu reaksiyon, β-ketotiolaz ile katalize olmaktadır. Asetil CoA, reaksiyonun asetoasetil CoA redüktaz tarafından katalize edilmesiyle β-hidroksibütiril-CoA'ya dönüşmektedir. Bu molekül de PHB polimeraz enzimi ile PHB'ye polimerize olmaktadır. Polimeraz enzimi sadece PHB'nin sentezinde rol oynamamakta, aynı zaman da PHB'nin hücrelerde tekrar kullanılmasında da görev yapmaktadır (5).

5. Bakterilerde PHB Üretimi

Polihidroksialkanatlar, hidroksialkanatların poliesterleridir. Bu poliesterlerin en iyi bilineni üzerinde en çok çalışılmasından dolayı PHB'dir. Birçok bakteri PHB ve diğer kopolimerleri, fazla karbon kaynağı altında azot, fosfor, magnezyum veya oksijenin sınırlandığı dengesiz gelişme şartlarında sentezler ve intrasellüler olarak depo eder. Günümüzde PHB depo eden 300'den fazla Gram negatif ve Gram pozitif bakteri tespit edilmiştir. Bu nedenle polimerin etkili üretimi için teşvik edilebilecek kültür stratejilerinin geliştirilmesi önemlidir. *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* 'nin mutant suşları ve diğer birçok bakterinin PHB'yi depoladığı bilinmektedir. Polimerin endüstriyel üretimi, uygun mikroorganizmanın seçimi, seçilen bakterinin gelişim oranı, polimer sentezi, depolamadaki maksimum oran ve ucuz karbon kaynaklarının seçimi gibi birçok faktöre bağlıdır. PHA'ların üyesi olan üzerinde en sıklıkla durulan P(3HB), P(3HB-co-3HV) ve P(3-hidroksikekzanat-co-3-hidroksioktanat kopolimerleri bakterilerde yüksek verimlilikte üretilmeye başlanmıştır (5).

5.1. *Alcaligenes eutrophus* ve *A. latus*

Alcaligenes eutrophus, endüstriyel PHB üretiminde en fazla kullanılan bakteri olup, hücre içinde yüksek miktarda PHB depoladığı (hücre kuru ağırlığının % 80'i) tespit edilmiştir. İngiltere'de (Imperial Chemical Industries), *A. eutrophus* 'un endüstriyel biyoplastik üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (4).

A. eutrophus suşunun PHB biyosentez geninin *E. coli*'ye klonlandığı ve alıcı bakteride gen ekspresyonunun gerçekleştiği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir

(5, 9, 17, 18). Bakteri tarafından üretilen termobiyoplastiğin, toprakta fungus ve bakteriler tarafından bir kaç haftada parçalanabileceği bildirilmiştir (3).

Avustralya'da Biyoteknoloji Araştırma Ünitesi'nde parçalanabilen biyoplastik üretimi ile ilgili teknik yöntemler geliştirilmiştir. Üretimde, *A. latus*'un mutant tipleri kullanılmıştır. Adı geçen bakterinin normal koşullarda üretildiğinde hücre içi PHB depoladığı bildirilirken, bakteri pancar şekeri besi ortamında üretildiğinde, PHB miktarının hücre kuru ağırlığının %80'den fazla olduğu ve PHB ekstraksiyonundan sonra uygulanan çöktirmede PHB'nin saflığının %99'dan fazla olduğu açıklanmıştır (19). *A. latus* bakterisinin kopolimer (R)-3-hidroksibütirat ve 4-hidroksibütirat üretimleri de incelenmiştir. Bakteri %1 sakkaroz ve %0.02 gammabütürolakton besi ortamında 30 °C'de 2 gün üretilmiştir. Sakkarozun 3HB'ye dönüştüğünü ve bu maddenin bakteri kuru ağırlığının %58'i kadar olduğunu ve (4HB) kopolimerin gamma-bütürolaktondan meydana geldiğini, bu madde ile toplam polimerin %60'a yükseldiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bakteri yalnız gamma bütürolakton substratlarda üretildiğinde, bakterinin üremediği ve polimerin oluşmadığını bildirirken, iki maddeyi içeren besi ortamına fruktoz şekeri ilave edildiğinde, bakteri üremesini sitümlü ettiği tespit edilmiştir (20).

5.2. *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas* Cinsi Bakteriler

A. vinelandii UWD mutant suşunun, eksponansiyel gelişme fazında hücre kuru ağırlığının %75'i PHB'dir (21). Şeker pancarı melasında, yüksek miktarda PHB depo edildiği de gösterilmiştir. Ayrıca farklı kompleks azot kaynakları ilavesinin PHB sentezine etkisi incelenmiş, %0,2 balık pepton ilavesiyle bakterideki PHB konsantrasyonun 7,5 g/l'ye ulaştığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, hücrelerin bu besi ortamında kolay kırılabilir olduklarını, 45 °C'de 10 dak 1 N amonyaklı suda muamele ederek, polimerlerin saflaştırılabildiğini de rapor etmişlerdir (22, 23).

Brandl ve ark. (24), *Pseudomonas oleovorans* 'ı, n-alkanoik asitlerin karbon kaynağı olarak kullanıldığı homojen bir sucul sistemde geliştirmişlerdir. Bu ortamda 24 saatten sonra bakteri hücre ürününün 1,5 g/l'yi geçtiği ve hücre kuru ağırlığının %49'unun polimer olduğunu rapor etmişlerdir. *P. oleovorans* alkan hidrolaz enzim kompleksini kodlayan OCT plazmidi ile yağ asitlerini oksitlemekte, β-oksidasyon yolu ile katabolize ederek polimeri oluşturmaktadır. Metilotrofik bir bakteri olan *Pseudomonas extorquens*'in PHB üretim yeteneği değişik karbon kaynakları içeren substratlarda araştırılmıştır. Bakterinin en yüksek PHB üretimi %0,5 metanol içeren substratta, hücre kuru ağırlığında %27 olarak saptanmıştır (25).

5.3. *Bacillus* Cinsi Bakteriler

Doğal PHB granülleri, ilk kez *Bacillus megaterium* ve *Azotobacter beijerinckii*'nin DNaz ile muamele edilen hücrelerinden, gliserol yüzeyinden toplanarak izole edilmiştir (3). Benoit ve ark. (26), *B. thuringiensis* HD-1 suşunda, sporulasyon ile PHB üretimi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. HD-1 suşunun, glukoz-tripton mineral tuz karışımında geliştirildiğinde laktat, pirüvat, asetat, aseton ve PHB ürettiği bulunmuştur. Bakterinin, asetatı 2-3 bütandiol siklusuna okside ettiği, daha sonra

PHB üretimi için kullanıldığı belirlenmiştir. Hücrede biriktirilen PHB'nin, sporulasyon sırasında enerji kaynağı olarak tüketildiği de saptanmıştır.

Aktif çamur biyokütlesinde de biyolojik polimerin varlığı kanıtlanmıştır (2). Araştırmacılar, teşhis ettikleri 12 bakteriyal suştan, *Bacillus* cinsine ait 10 bakterinin PHB ürettiğini bulmuşlardır. Suşlar arasında en yüksek PHB üretimini *Bacillus* sp. IPCB-403 göstermiş, optimum kültür şartlarında bakterinin %70'inin PHB olduğu tespit edilmiştir. Aslım vd. (27), topraktan izole ettikleri farklı *Bacillus* türlerinde PHB miktarlarının suş ve türlere göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, suşların hücre kuru ağırlıklarına göre %6,53-48,13'ünün PHB olduğunu rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, *B. sphaericus* suşlarının yüzde PHB verimleri %5-25,88 arasında tespit edilmiştir. Suşların, Beef ekstrakt ve Sodyum asetatın farklı konsantrasyonlarındaki PHB üretimleri incelenmiş ve %0,2 Beef ekstrakt konsantrasyonunda *B. sphaericus* ATCC 7055'in maksimum PHB verimine (%32,50) ulaştığı tespit edilmiştir (28).

5.4. Azot Fiksasyonunda ve *Rhizobium* Bakterilerinde PHB

Rhizobium türlerinde PHA ve diğer poliesterlerin oluşumu, polimerlerin üretimi, nedenleriyle birlikte çok detaylı olarak çalışılmamıştır. Fakat bu grup bakterilerde, hücre metabolizması ve poliester oluşumu arasında karşılıklı etkileşime de güzel bir ortam hazırlanmaktadır (9). *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* cinslerine ait birçok tür, serbest hücrede ve simbiyotik yaşamda PHB depolamaktadır (29). *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsi bakterilerle baklagil bitkileri arasındaki simbiyotik azot fiksasyonunda, PHB'nin enerji kaynağı olduğu düşünülmektedir (30, 31). *R. meliloti* ve diğer türlerde ise sadece serbest hücre devresinde veya nodül gelişiminin ilk aşamasında PHB depolanmaktadır. Bu türlerde azotu fikse eden bakteroidlerde PHB depolanmamaktadır. Simbiyotik ilişkide bu bileşiklerin fizyolojik rolü tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, bakteroidlerde depo edilen PHB'nin karanlık evrede azot fiksasyonunu teşvik ettiği ve azot fiksasyonunun ön uzama evresini desteklediği açıklanmıştır. Çünkü bakteroidler, düşük oksijen konsantrasyonunda PHB'yi kullanmaktadırlar (32).

Bakteroid hücrelerin azot fiksasyonu için gereksinim duyduğu enerji, kök nodüllerine transfer edilen karbon bileşiklerin, prensip olarak, organik asitlerin fotosentetik metabolizması ile sağlanmaktadır. Bakteroid biyokütlenin, %50'sinden fazlası PHB'dir. *Bradyrhizobium japonicum*'da PHB sentez yolunun *Azotobacter beijerinckii*'dekine çok benzer olduğu ve bakteroidlerde polimer birikiminin mikroaerofilik şartların etkisiyle başladığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda nitrogenaz aktivitesindeki artış ile de yakından ilişkili olduğu bulunmuştur (3). Oksijen sınırlamasının PHB üretimi üzerine etkisi detaylı olarak araştırılmamış olmasına rağmen, hücrede depo edilen PHB'nin düzenleyici bir rolü olduğu ve enerji azalması halinde metabolizma faaliyetleri ile nitrogenaz aktivitesi için eşit oranda paylaşıldığı düşünülmektedir (30).

Emden-Meyerhof ve Etner-Doudorff iz yollarındaki enzim aktivitesi, bazı *Rhizobium*'larda ölçülmüş olmasına rağmen, bu enzim aktivitesinin azot fiksasyonuna bağlı olup olmadığı tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (31). Araştırmacılar, bazı bilim adamlarının, bakteroidlerde radyoaktif işaretli substratlar kullanmak suretiyle

sitrik asit siklusunun varlığını gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmada *B. japonicum* bakteroidlerinde sitrik asit ve PHB siklusundaki enzimlerin aktivitesini incelemişlerdir. Nitrogenaz enzim aktivitesindeki artışa paralel olarak fumarazın spesifik aktivitesinin, hidrosibütirat dehidrogenaz, β -ketotiolaz ve pirüvat dehidrogenaz kompleksinin arttığını, aseto-asetat süksinil-CoA transferaz ve izositrat dehidrogenazın azaldığını tespit etmişlerdir. Malat dehidrogenaz aktivitesi sabit kalmıştır. Araştırma sonunda nitrogenaz aktivitesi ve PHB depo edilmesi arasındaki ilişkinin daha detaylı olarak çalışılıp açıklığa kavuşturulması gerektiği sonucuna varılmıştır (31).

Rhizobium türleri ile bunların konukçu bitkileri arasındaki simbiyosis, bakteroidlerdeki bakteriyal nitrogenazların aktivitesi doğrultusunda atmosferik azotun fikse edildiği sistemle sağlanmaktadır (33). P(3HB)'nin, nodüldeki bakteroidlerin fizyolojisinde bir rolü olduğu bilim adamları tarafından kabul edilmektedir. Diğer taraftan bakteroidin metabolik aktivitesinin ancak başarılı bir simbiyoz düzeneğinin oluşturulmasıyla çözülebileceği ileri sürülmüştür (9).

Povolo ve ark. (34), P(3HB) üretme yönünden defektli *R. meliloti*'nin 4 adet transpozon mutantlarını elde etmişler ve bu mutant suşların simbiyosisteki etkilerini araştırmışlardır. P(3HB)-negatif mutantların yoncada nodul oluşturma yönünden atasal suşa benzediğini bildirmişlerdir. Buna ilaveten araştırmacılar, nitrogenaz enzim aktivitesinin, PHB-negatif mutantlarda değişiklik göstermediğini de tespit etmişler ve *R. meliloti* ile yonca arasındaki simbiyosisin, P(3HB) sentez yollarındaki değişikliklerden etkilenmediği kanısına varmışlardır. Oksotrofik *R. etli* CE3 suşunun, biotin ve tiamin vitaminlerinin yokluğunda PHB'yi yüksek miktarda depoladığı bildirilmiştir (9). Araştırmacılara göre, oksotroflarda TCA siklusu aerobik serbest hücrelerde optimal olarak fonksiyon göstermemektir. Ancak karbon metabolizmasındaki artış, TCA siklusunun rolünün P(3HB) oluşumu olarak ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Cevallos ve ark. (32), *R. etli* phaC mutantını elde etmişlerdir. Atasal suşun aksine mutant suşun oluşturduğu nodüllerin daha yüksek ve uzun süre nitrogenaz aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Araştırmacılar, *R. etli* ile bezelye arasındaki simbiyosiste PHB ilişkisini açıklayamamışlar, fakat PHB'nin bakterinin canlılığını devam ettirmede bir rol oynadığına inanmışlardır.

PHA biyosentezi, PHA oluşumundan spesifik olarak sorumlu birkaç enzimin aktivitesiyle gerçekleşir. Buna ilaveten diğer aktiviteler de, hücrelerde biriktirilen PHB miktarını etkilemektedir. Polimerin metabolizmasının moleküler fizyolojisinin detaylı olarak anlaşılabilmesi, başarılı transgenik PHA üreticilerinin geliştirilmesine bağlıdır. Bakteri hücrelerinin, PHA sentezini nasıl düzenleyebildiği çözümlendiği takdirde çok daha etkili PHA proseslerin geliştirilebilmesi mümkün olabilecektir (5, 9).

5.5. Diğer Bakterilerde PHB

Bir araştırmada, iki adet *Acinetobacter* sp. suşunun PHB üretimleri incelenmiştir. Ra3117 suşunun amonyak ve fosfat içermeyen sentetik besi ortamında PHB üretmediği, RA 3757 suşunun fosfat, amonyum veya sülfat içeren farklı substratlarda ürettiği PHB miktarının sırasıyla 2,0; 7,8 ve %11,5 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, β -ketotiolaz ve asetoasetil-CoA redüktaz enzimlerinin yalnız RA3757 hücre ekstraktında serbest olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Her iki suşun PHB ürettiği

veya üretmediği durumlarda, β -ketotiaz enzimini sentezlenirken asetoasetil-CoA'ya sadece PHB üreten bakteride rastlanıldığı açıklanmıştır. RA3757 suşu amonyum içermeyen ve karbon kaynağı olarak asetat, bütirat, karbon ve etanol içeren besi ortamında üretildiğinde benzer miktarda PHB ürettiği ve bu suşun valerat içermeyen substratta %5,6 poli- β -hidroksivalerat ve %0,9 oranında PHB ürettiği saptanmıştır (19, 9).

Azospirillum brasilense cd suşu, amonyum-malt tuzlarını içeren besi ortamında kesikli ve sürekli kemostat fermenterlerde üretilmiştir. Kemostat fermenterlerde oksijenin sınırlandırılmasında, kesikli fermenterlerde ise C/N oranı yüksek tutulduğunda hücrelerin eksponansiyel fazda yüksek miktarda PHB biriktirdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, bakterinin ölüm döneminde nitrogenaz aktivitesi incelenmiş, enzim aktivitesinin yüksek olduğu, hidroksibütirat dehidrogenaz aktivitesinin az olduğu açıklanmıştır (35). İki adet metanotrof tip II bakterinin PHB üretimi incelenmiş, *Methanobacterium organophilum* bakteride PHB'nin bulunduğu ve besi ortamlarına metanol ilave edildiğinde, bakterilerin PHB üretebildiği rapor edilmiştir (9). Brandl ve ark. (36), fototrofik ve non-sülfür bir bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides*'in PHB üretim potansiyelini araştırmışlardır. Azotun sınırlandırıldığı ortamda hücre kuru ağırlığının %60-70'inin PHA olduğunu bildirirken, bu polimerin %98 mol 3HB ve %2 mol 3HV monomerinden oluştuğunu tespit etmişlerdir.

5.6. Rekombinant *E. coli*

Maksimum polimer üretimi için rekombinant organizmaların oluşturulması, PHA biyosentez genlerinin transferi ile mümkün olmaktadır. Rekombinant sistemlerde polimerlerin yüksek konsantrasyonlarda üretimi, hiç kuşkusuz konukçu-plazmid sistemlerin ve üretim stratejilerinin gelişimine de bağlıdır. Buna ilaveten, etkili bir üretim için, yüksek kopya sayılı stabil plazmidlere gereksinim duyulduğu gibi, test edilen farklı suşlar arasında uygun bir *E. coli* suşunun da seçiminin önemli olduğu bildirilmiştir (5, 9).

A. eutrophus (= *Ralstonia eutropha*), önemli bir PHB üreticisi olmasına rağmen, bakterinin besi ortamında yavaş gelişmesi, kolay lize olması ve genetik yönden tam olarak karakterize edilememesi gibi problemler, PHB'nin ticari gelişimini engellemektedir (9). PHB'nin üretimindeki bu tür engeller, rekombinant sistemlerle aşılmaya çalışılmaktadır. Bu tür çalışmalar için PHB'yi doğal olarak sentezleyemeyen *E. coli* suşları kullanılmaktadır (5). *E. coli* 'de ilk kez phb genleri eksprese olmasına rağmen, bir çok araştırmacı PHB dışında PHB-co-PHV gibi diğer kopolimerleri de sentezlediklerini açıklamışlardır (3). Rekombinant *E. coli*'de depo edilen PHB, fermentasyon sonunda hücre kuru ağırlığının %80-90'ını oluşturmaktadır. 10 farklı *E. coli* suşu ile yapılan bir çalışmada %2 glukoz-LB besi ortamında W, K-12 ve EC3132 suşları %15-33 arasında PHB depolarken, B suşunun hücre kuru ağırlığının %76'sının PHB olduğu bildirilmiştir. Tipik olarak klonlanan XL1-Blue, JM109 ve HB101 suşları ise hücre kuru ağırlıklarına göre %75-85 arasında PHB biriktirmişlerdir. Yüksek kopya sayılı plazmidlerle stabilize edilen XL1-Blue suşunun, %2 glukoz-LB besi ortamında saatte 2,1 g/l üretim ile %81 oranında PHB ürettiği açıklanmıştır (9).

5.7. Transgenik Bitki (= *Arabidopsis thaliana*)

Arabidopsis thaliana, bir tahıl bitkisi olmamasına rağmen transgenik polimer çalışmaları için seçilen ilk bitkidir ve günümüzde transgenik bitkilerdeki ekspresyon çalışmaları için model organizmadır (9). Bitkide, PHB sentez izyoluna ait 3-ketoaçil-CoA tiolaz enzimi bulunmaktadır. Bu sitoplazmik enzim, izoprenoidlerin öncüsü olan mevalonatı sentezlemektedir. Tiolaz enzim aktivitesinin varlığı nedeniyle, *Ralstonia eutropha*'nın phbB ve phbC genleri bitkiye transfer edilmiştir. Sitoplazma, vakuol ve nukleusta 0,2-0,5 µm çapında PHB granüllerinin depolandığı görülmüştür. Bitki taze ağırlığının 100 µg/g'ünün PHB olduğu açıklanmıştır. Mevalonat izyolundan substratın ani azalışının, bitkinin zayıf gelişmesine neden olduğunu, bu problemin giderilmesi ve polimer birikiminin artırılabilmesi için doku spesifitesi ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi gerektiği rapor edilmiştir (5). Araştırmacılar asetil-CoA'ya doğru karbon akışının yoğun olduğu bitki plastidlerinin, PHB üretimi için çok daha uygun olduğunu savunmuşlardır (5, 9). Plastidlerdeki maksimum PHB miktarı 10 mg/g, yüzde verim hücre kuru ağırlığa göre %14'tür. Plastidlerden izole edilen PHB'nin moleküler ağırlığı 500 000 Da olarak hesaplanmıştır (5, 9).

Saccharomyces cerevisiae, böcek ve buğdayda da PHB üretimi ile ilgili çalışmalara başlanmıştır. Ancak bu organizmalarda PHB miktarının henüz çok az olduğu bildirilmiştir (9).

Bitkilere aktarılacak PHB geninin gelişimi sağlanabildiği takdirde PHB üretiminin ekonomik olabileceği düşünülmüştür. Belki de gelecekte çiftçiler tarlalarında plastik yetiştireceklerdir. Market raflarında "plastik patates" etiketlerine bile rastlamak mümkün olabilir (5).

5.8. PHB'nin Biyolojik Parçalanabilirliği ve Yenilenebilir Özeiliği

PHB'nin temel özelliklerinden birisi, topraktaki birçok mikroorganizma tarafından parçalanabilmesidir. PHB, hücre dışı enzimlerle depolimerize edildiğinde oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır. Biyolojik parçalanma oranı, polimerin yüzey özelliklerine bağlıdır (7). Polimer degradasyonunda bakteri, fungus ve yüksek yapılı organizmalar biyolojik faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir. PHB, salgılanan hidrolazlar ve depolimerazlar ile yıkılırlar. Bu enzimlerin aktiviteleri, polimerin fiziksel özelliklerine ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (9). Biyopolimer, mikroorganizmalar tarafından su ve karbondioksite kadar parçalanabilmektedir. Parçalanma nitrojen oksidi oluşmadığından çevre korunmasında önemlidir. Parçalanmış biyoplastik, bitkilerin gelişimini olumlu yönde etkilemektedir (5). PHB'nin yıkım hızı birkaç aydan (anaerobik), birkaç yıla (denizsu) kadar olabilmektedir. PHB'nin fermentatif üretimi, şeker ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır (9).

6. PHB'nin Kullanım Alanları

Endüstriyel üretilen termobiyoplastiklerin sertlik durumlarının, polietilene oranla dört misli daha fazla olduğu (20 kg/m) tespit edilmiştir. Üretilen biyoplastik maddelerin, çeşitli paketlenme materyalleri olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir. En çok bilinen ve en yaygın kullanılan PHA tipi olan PHB'nin fiziksel özellikleri petrol kökenli polipropilen ile karşılaştırıldığında PHB'nin daha kristal bir yapıda olması, özgül ağırlığının daha yüksek oluşu, UV'ye dirençliliği gibi bazı özellikleri nedeni ile PHB üretiminin iyi bir seçenek olduğu bildirilmiştir (10, 19, 37). PHB'nin doğaya atıldığında tamamen yok olması ve çevre kirliliği oluşturmaması nedeniyle, PHB/V tipi polimerlerden veya bunların başka polimerlerle karışımından özellikle gıda ve kozmetik sanayiinde şişeleme malzemesi olarak yararlanılmaya başlanmıştır. PHA'lar çevre dostu fiziksel özelliklere sahip oluşlarından dolayı, endüstriyel uygulamalar açısından çekici olmalarının yanı sıra, özel karakteristik özellikleri sayesinde biyomedikal alanda kullanımı çok fazladır (5, 38).

6.1. Ziraatta kullanım alanları

PHB ve kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında tamamen karbondioksit ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir. Parçalanma için geçen süre kalınlık ve yüzey özelliklerine bağlı olarak düzenlenebilir (5). PHB ve PHA, özellikle toprakta biyodegradasyon gerektiren uygulamalara çok uygundur. Çoğunlukla bunlar bir alüminyum folyo gibi film şeklinde kaplamada kullanılmaktadır. Tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında muhafaza ve gübre ya da pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak kullanılabilir (4).

6.2. Veterinerlikte Kullanım Alanları

Veterinerlik hekimliğinde ilaçların salınımı için biyolojik parçalanabilen bir matriks olarak PHB'nin 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'nin büyük kapsülleri yapılmıştır (4).

6.3. Tıpta Kullanım Alanları

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte, biyolojik uygunluğundan dolayı son zamanlarda tıp ve eczacılıkta sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Hayvan dokularında toksik etki yapmadığından, vücutta absorbe edilen protez aletlerin ve cerrahi dikişlerin yapımında PHB'nin kullanılması birçok bilim adamının, bu alanda çalışmalara ağırlık vermesine neden olmuştur. PHB ve kopolimerleri, hayvan dokularına implante edildiğinde onların biyolojik olarak parçalanabildiği görülmüş ve PHA'ların kullanımına olan ilgi artmıştır. Neticede veterinerlikte ve insanların ilaçla tedavisinde teröpatik bileşiklerin kontrollü olarak salınması için PHA'lar kullanılmıştır (7). Polimerin uygulama alanları onun özelliklerine bağlı olarak, doğrudan kullanılmasının yanında depolimerizasyon ürünü

olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da yaygındır. Özellikle PHB'nin parçalanma ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit bu alanda çok önemlidir. Çünkü bu tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşiğidir; lipid metabolizmasının ürünü olarak bulunur ve insan kanının normal bir ögesidir (4). Belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağı olarak rol oynar. Bu durum ilk olarak Krebs tarafından bulunmuştur ve daha sonra bunun beyin gelişiminde rol alan aminoasitlerin öncüsü olarak fizyolojik bir role sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca D(-)-3-hidroksibütirik asitin diyabetiklerin kan serumunda anormal konsantrasyonlarda var olan keton yapılarından biri olarak rol oynadığına dair birçok bilgiler de vardır. Middlesex hastanesindeki çalışmalar, D(-)-3-hidroksibütirik asidin damar içi veya ağızdan karbon sağlanması için kullanılabilirliğini ve daha yaygın olarak kullanılan glukoz yerine bazı klinik avantajlara sahip olduğunu göstermiştir. PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. Çünkü insan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB, cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır (4). PHB'nin hastanelerde cerrahi swaplar, yara sargıları, cerrahi eldivenler için de bir yağlayıcı madde olarak veya ince toz formunda kullanılması uygun görülmüştür. Ameliyat sonrası hastalarda unutulmuş pamuk swaplar, ABD'de ve diğer ülkelerde birçok hukuk davalarının başında geldiği düşünülürse bu avantaj oldukça önemlidir (4). Yüksek teknoloji ile PHB'nin 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 getirilebilir. Bu, vücudun doğrudan tepkisini alan sentetik arterlerdeki blokaj ve pıhtı oluşum problemini tamamen yok edecektir (4).

PHB'nin bir diğer önemli özelliği de onun piezoelektrik polimer olmasıdır. PHB ve kopolimerleri poliviniliden florit polimeri gibi kesikli piezoelektrisite göstermektedir. Poliviniliden florit polimeri filmleri, kemiği elektriksel stimülasyon ile kuvvetlendirmekte ve kemiği onarmaktadır. Dolayısıyla, bir kemik kırığını sabitleyen levhalar benzer mekanik özelliklere sahip takviyeli bir PHB karışımından yapılırsa, stimüle edilen kemik büyür ve gelişir. Böyle bir kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından resorbe edilebilir. Bu süre içinde de kemik kaynar ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir ameliyata gerek kalmaz (4).

6.4. Özel Uygulamalarda Kullanılması

PHB, oldukça aktiftir ve polimeri oluşturan her bir hidroksibütirat ve hidroksivalerat monomer ünitesi kiral bir karbon atomuna sahip olup, bunların herbiri D(-) konfigürasyonundadır. PHB solusyonları ve PHB'den yapılan filmler, kendi içinden geçen polarize ışığın konumunu çevirecektir. Bu optik izomerler buldukları ortamda kiral merkezleriyle diğerlerinden daha kuvvetli bağlanma özelliğine sahip olduğundan kromatografide kullanılabilir. Polimerlerin hidrolizi ile elde edilen birçok ilaç, sadece bir kiral formda aktiftir ve bu materyal böyle bileşiklerin organik sentezinde bir çimento bloku olarak kullanılabilir. Tokyo Üniversitesinden Prof. Mori, HB monomerinden, Hindistan mısırındaki haşaratin bir seks hormonu, bir balarısı hormonu, long-horned-beetle bir böceğin koruyucu substratı ve güzel koku olarak S-citronellol gibi 6 kimyasal maddenin sentezini rapor etmiştir (4). PHB ve kopolimerleri paketleme filmleri ve tek kullanımlık malzemelerin yapımında da kullanılmaktadır. Bu

materyallerin özellikleri polietilen, polipropilen gibi bazı ticari plastiklere benzediğinden termoplastik materyallerdir. PHB filmleri, polipropilen filmleri kadar güçlüdür, fakat PET (polyethylene terephthalate) kadar dayanıklı değildir. Cam takviyeli PHB kalıpları ise naylona olan benzerliğine göre daha sert ve dayanıklıdır (4).

7. PHB Üretimi Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları

A. eutrophus'un PHA⁻ mutantları ilk kez Schlegel ve grubunca, 1-nitroso-3-nitro-1-methylguanidine mutageni ile elde edildiğini bildiren Povolo ve ark. (34) 1994 yılında Tn5 transpozon mutagenезisi ile *R. meliloti*'nin PHB⁻ mutantlarını elde etmişlerdir. Yaklaşık 1000 koloni üzerinde gaz-kromatografik inceleme sonunda elde edilen 4 mutantın atasal suşa benzerlikleri kontrol edilmiş, mutasyonun genetik manipulasyonların bir sonucu olarak, genomda ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. Mutantların mega plazmid sayısı ve büyüklüklerinin atasal suşa benzediğini saptamışlardır. β -ketotiaz, PHB sintaz ve asetoasetil-CoA redüktaz enzim aktivitelerine bakılmış ve tüm mutantlarda sadece PHB sintaz enziminin inaktif olduğu bulunmuştur. Elektron mikroskop çalışması ile PHB granüllerine rastlanmadığı desteklenmiştir. PHB⁻ mutantların yoncada nodül oluşturabildikleri ve simbiyotik azot fiksasyonunun etkilenmediği de görülmüştür. Araştırmacılar, PHB içeriğinde azalma olan *Rhizobium* hücrelerinin, enerji gereksinimlerini alternatif bir depo materyalini kullanarak karşıladıkları hipotezini ileri sürmüşlerdir. Diğer taraftan, Ludwig ve ark. (39), bazı *Rhizobium* mutantlarında azot fiksasyon yeteneklerinde artış olmasına rağmen, PHB ve glikojeni sentezleyemediklerini ve PHB-simbiyoz ilişkisinin hala aydınlatılmadığını da bildirmişlerdir. PHA'ı depolayamayan mutantların mevcut olması, polimerin enzimolojisi ve fizyolojisinin anlaşılması için önem taşımaktadır (9). PHB biriktiremeyen *Rhizobium* suşları ile yapılan denemeler, simbiyotik azot fiksasyonunda polimerin rolünü açıklamaya yardımcı olacaktır (5).

8. Melasın PHB Üretiminde Kullanılması

Melas, şeker üretiminin teknik ve ekonomik şartlar altında şuruplardan en fazla kristal şeker alındıktan sonra geriye kalan ana şuruptur. Şeker teknolojisinde işlenen pancara göre yaklaşık %4-5 oranında melas elde edilir. Melasta bulunan şeker sakkarozdur. İndirgen şeker olarak kamış melasında %12-35 oranında glukoz ve fruktoz vardır. Trisakkarit olan rafinoz, pancar melasında %2 konsantrasyona kadar bulunabilir. Melasta bulunan şeker dışındaki organik maddelerin başlıcaları; azotlu maddeler, organik asitler, nişasta ve pentozanlar gibi kompleks karbohidratlardır. Ayrıca mumsu maddeler, steroller ve pigmentler de az miktarda bulunur. Melasta bulunan azotlu maddeler aminoasitler, amidler ve diğer basit azotlu maddelerdir. Şeker pancarı melasında baskın halde bulunan azotlu maddeler betain ve glutamik asittir ve bu bileşikler melasın karakteristik koku ve lezzetinin büyük bir kısmını oluştururlar. Melasta bulunan azotun ancak %40-60 kadarı mikroorganizmalar tarafından kullanılır, bu nedenle amonyum tuzları, sıvı amonyak veya üre ortama katılarak azot zenginleştirilmesi yapılır (40, 41).

Asetik asit, bütirik asit, formik asit ve propiyonik asit, melasta bulunan organik asitlerdir. Melasta %4-11 arasında inorganik bileşikler vardır. Bunlar potasyum,

sodyum, demir, sülfat, magnezyum, kalsiyum, klorür ve fosfatlardır. Pancar melasında genellikle potasyum oranı yüksektir. Melasta biyotin, pantotenik asit, inositol, tiyamin, riboflavin, nikotinik asit, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler vardır (42). Melasın endüstriyel fermentasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır ancak kompleks bir substrat olduğu için bazı toksik maddeler ve mineral maddeler de içerir. Bu maddelerin yüksek konsantrasyonları da inhibitör etki yapar (42).

Bilimsel literatürde melastan PHA/PHB üretimine ait çalışma sayısı oldukça azdır. Ticari bir ürün olan melas, glukozdan daha ucuzdur ve maya fermentasyonunda karbon kaynağı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Melas besi ortamında *A. eutrophus*, *Azotobacter vinelandii* ve rekombinant *E. coli*'nin PHA üretimi de son yıllarda çalışılmaya başlanmıştır (18, 43, 44, 45).

Şeker pancarı melası, *Azotobacter vinelandii* UWD suşunda PHA üretimi için besiyortamı olarak kullanılmış ve rafine edilmemiş şeker kaynaklarının en iyisi olduğu açıklanmıştır (43, 44, 46). Bakteride, %10 melas konsantrasyonunda polimer üretimi gerçekleşmezken, ortama ekstra nutrientlerin ilavesi UWD suşunun gelişimine uyarıcı etki yapmış ve hücrede PHA biriktiği görülmüştür. Bakteri %2 sukroz içeren %5 melasta 1 g/l PHA sentezlemiştir. Kültür ortamında ilk 10 saatte polimer üretimi oldukça azken, 35 saat ve sonrasında PHA miktarında artış olduğu açıklanmıştır. Melasa öncü olarak valerat ilave edildiğinde β -hidroksivalerat içeren kopolimerlerin üretildiği de tespit edilmiştir. Sonuç olarak PHA/PHB üretimi üzerine saf olmayan şeker kaynaklarının arttırıcı bir etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (43).

A. eutrophus DSM 545 suşu, %3 glukoz, çok sayıda amonyum substratları ve şeker pancarı melasında pH=7.0'de geliştirilmiş ve bakterideki PHB içeriği gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. En iyi hücre gelişimi ve PHB üretimi amonyum sülfatlı ortamda elde edilmiştir. Gelişme faktörü olarak melasa amonyum sülfat ilave edildiğinde %0,3 melas konsantrasyonunda optimal PHB (%17-26) depolandığı bildirilmiştir (45).

Liu ve ark (18), rekombinant *E. coli* 'nin tek karbon kaynağı olarak melastaki PHB üretim yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, yüksek melas konsantrasyonlarında PHB üretiminin arttığını açıklamışlardır. 35 saat sonra bakteri kuru ağırlığının %80'inin PHB olduğunu rapor etmişlerdir. Glukoz yerine melas kullanımının daha ucuz ve ekonomik olacağı sonucuna varmışlardır.

9. SONUÇ ve ÖNERİLER

Özellikle son yıllarda dünya nüfusunun hızla arttığı ve buna paralel olarak da yaşam şartlarına göre plastik kullanımlarında artış görüldüğü bir dönemde, petrolden elde edilen plastiğin bir takım ekolojik problemler yarattığı göz önüne alınırsa, çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenen PHB'nin çevre sorununun çözülmesinde önemli katkı sağlayacağı açıktır. Ancak, biyolojik plastikler, çevre korunmasına karşı petrolden elde edilen plastiklere alternatif olarak kabul edilseler de, geniş bir uygulama alanına sahip petrol kökenli geleneksel plastiklerle karşılaştırıldığında maliyetinin yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle biyolojik polimerlerle ilgili araştırmalar, farklı mikroorganizmalardaki PHB üretimi, farklı

çevrelerden PHB üreten yeni mikroorganizmaların izolasyonu, PHB ürettiği bilinen mikroorganizmaların özelliklerinin iyileştirilip üretiminin artırılmasına ya da çeşitli ve ekonomik karbon kaynaklarında gelişebilen mikroorganizmaların seçimine yöneliktir.

Her geçen gün artan plastik tüketimi, özellikle yüksek miktarlarda geri dönüşümlü plastik üretiminin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bu gereksinim petroplastığe olan talebi de azaltacaktır. Nitekim, petrol fiyatlarının hızlı artışı ve dünyadaki petrol rezervlerinin gittikçe tükenmesi, plastik üretimi için yeni kaynaklar bulunmasının oldukça akıllıca olacağını göstermektedir. Böylece 21. yy ve sonrasında tükenebilecek kaynakların yerine bir yenisi konabilecektir. Hiç kuşkusuz bakterilerden üretilecek PHB'ler, petrokimyasal plastiklere kıyasla daha ucuz ve ekonomik olacaktır.

Kaynaklar

1. Savaşçı, Ö.T., Uyanık, N. ve Akovalı, G., 1998, Plastikler ve plastik teknolojisi, Çantay Kitabevi, 505 s.
2. Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J.D., 1996, Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp., IPCB-403, Indian Journal of Experimental Biology, 34, 216-219.
3. Anderson, A.J. and Dawes, E.A., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, Microbiol. Reviews, 54, 4, 450-472.
4. Holmes, P.A., 1985, Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic, Phys. Technol., 16, 32-36.
5. Lee, S.Y., 1996, Bacterial polyhydroxyalkanoates, Biotechnology and Bioengineering, 49, 1-14.
6. Braunegg, G., Lefebeure, G. and Genser, K.F., 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects, Journal of Biotechnology, 65, 127-161.
7. Lafferty, R.M., Korsatko, B. and Korsatko, W., 1988, Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid, Biotechnology, edited by H. J. Rehm and G. Reed. Volume 6b, Special Microbial Processes.
8. Abe, H., Kikkawa, Y., Iwata, T., Aoki, H., Akehata, T. and Doi, Y., 2000, Microscopic visualization on crystalline morphologies of thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymer, Polymer, 41, 867-874.
9. Madison, L.L. and Huisman G.W., 1999, Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63, 21-53.
10. Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L. and Holmes, P.A., 1984, Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate, Journals of Materials Science, 19, 2781-2794.
11. Witholt, B. and Kessler, B., 1999, Perspectives of medium chain length polyhydroxyalkanoates, a versatile set of bacterial bioplastics, Current Opinion in Biotechnology, 10, 279-285.
12. Hiki, S., Miyamoto, M. and Kimura, Y., 2000, Synthesis and characterization of hydroxy-terminated [RS]-Poly-(3-hydroxybutyrate) and its utilization to block copolymerization with L-lactide to obtain a biodegradable thermo-plastic elastomer, Polymer, 41:7369-7379.

13. Madden, L.A., Anderson, A.J., Asrar, J., Berger, P. and 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*, 3499-3505.
14. Anderson, A.J., Haywood, G.W. and Dawes, E.A., 1990, Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates), *Int. J. Biol. Macromol.*, 12, 102-105.
15. Poirier, Y., 2002, Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41, 131-155.
16. Steinbüchel, A. and Schlegel, G., 1991, Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, *Mol. Microbiol.*, 5, 3, 535-542.
17. Slater, S., Gallaher, T. and Dennis, D., 1992, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 4, 1089-1094.
18. Liu, F., Li, W., Ridgway, D. and Gu, T., 1998, Production of poly- β -hydroxybutyrate or molasses by recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters*, 20, 4, 345-348.
19. Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal termoplastik üretimi, *Kükem Dergisi*, Cilt, 19, Sayı 2, 23-32.
20. Hiramitsu, M., Koyaman, N. and Doi, Y., 1993, Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*, *Biotechnology Letters*, 15:461-646.
21. Page, W.J., and Knosp, O., 1989, Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1334-1339.
22. Page, W.J., 1992, Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, 117-121.
23. Page, W.J., and Cornish, A., 1993, Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of Poly- β -Hydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4236-4244.
24. Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C., 1988, *Pseudomonas oleovorans* as an source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 8, 1977-1982.
25. Karaboz, İ. ve Umay, B., 1994, *Pseudomonas extorquens*'den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi, *Ulusal Biyoloji Kongresi*, Edirne, 14-18.
26. Benoit, T.G., Wilson, G.R. and Baugh, C.L., 1990, Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1, *Lett. Appl. Microbiol.*, 10, 15-18.
27. Aslım, B., Sağlam, N. ve Beyatlı, B., 1998, Topraktan izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin poly- β -hydroxybutyrate (PHB) üretim miktarının belirlenmesi, III. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumu-Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği, 67-74.
28. Mercan, N. ve Beyatlı, Y., 2001, *Bacillus sphaericus* suşlarının Poly- β -hydroxybutyrate üretimlerinin incelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25: 2, 1-7.
29. Karr, D.B., Waters, J.K. and Emerich, D.W., 1983, Analysis of poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection, *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 6, 1339-1344.
30. McDermott, T.R., Griffith, S.M., Vance, C.P. and Graham, P.H., 1989, Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids, *FEMS Microbiology Reviews*, 63, 321-340.
31. Karr, D.B., Waters, J.K., Suzuki, F. and Emerich, D.W., 1984, Enzymes of the poly- β -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids, *Plant Physiol.*, 75, 1158-1162.

32. Cevallos, M. A., Encarnacion, S., Leija, A., Mora, Y. and Mora, J., 1996, Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate, *Journal of Bacteriology*, 178, 6, 1646-1654.
33. Stowers, M.D. 1985, Carbon metabolism in species, *Ann.Rev.Microbiol.*, 39, 89-108.
34. Povolito, S., Tombolini, R., Morea, A., Anderson, A.J., Casella, S. and Nuti, M.P., 1994, Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium meliloti* unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate, *Can. J. Microbiol.*, 40, 823-829.
35. Tal, S. and Okon, Y., 1985, Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd., *Can. J. Microbiol.*, 31, 608-613.
36. 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.
37. Bluhm, T.L., Hamer, G.K. and Sundararajan, P.R., 1998. Isodiorphism in poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate) copolyesters, *Polymer Prepr.*, 29, 603.
38. Page, W.J., 1995, Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future, *Can. J. Microbiol.*, 141 (Suppl.1), 1-3.
39. Ludwig, E.M., Allaway, D., Wheeler, T., Downie, A.J. and Poole, P.S., 2001, Poly- β -hydroxybutyrate and glycogen metabolism in *Rhizobium leguminosarum*, <http://www.ams.rdg.ac.uk/microbiology/phb%20and%20glycogen%20metabolism>, 1p.
40. Katirciođlu, H. ve Aksöz, N., 1996, Tek hücre proteini eldesi ve bunun *Drosophila* gelişimine etkisi, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 16:2, 37-44.
41. Göksungur, Y., 1998, Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu, *Ege Üniv. Fen Bil. Enst. Gıda Müh. A.B.D.*, Doktora Tezi, İzmir, 19-63.
42. Burrows, S., 1970, Baker's yeast, 365-369, *The yeast*, Rose, A.H. and Harrison J.S. (Eds), Academic Press, London and New York.
43. Page, W.J., 1992, Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, *FEMS Microbiology Reviews*, 103, 149-158.
44. Page, W.J., 1992, Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD, *Biotechnology Letters*, 14:5, 385-390.
45. Beaulieu, M. Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J., 1995, Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1, 165-169.
46. Page, W.J., 1989, Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 31, 329-333.