

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**PSEUDOMONAS İZOLATLARININ ÇEŞİTLİ POLİHİDROKSİALKANOATLARI
BİYOPARÇALAMA YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Ahmet ÇOLAK

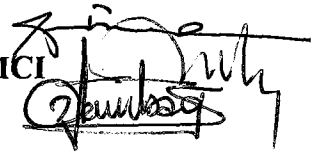
**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"Doktora (Kimya)"
Ünvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

109850

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 18.01.2001
Tezin Savunma Tarihi : 16.03.2001**

**Tez Danışmanı
Jüri Üyesi
Jüri Üyesi**

**: Doç.Dr. Saadettin GÜNER
: Prof.Dr. Şule PEKYARDIMCI
: Doç.Dr. Zihni DEMİRBAĞ**



Enstitü Müdürü

: Prof.Dr. Asım KADIOĞLU



Trabzon 2001

ÖNSÖZ

“*Pseudomonas* İzolatlarının Çeşitli Polihidroksialkanaotları Biyoparçalama Yeteneklerinin İncelenmesi” adlı çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Lisans Üstü ve Spektroskopi Laboratuvarlarında, Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Lisans Üstü Laboratuvarında, Mühendislik Mimarlık Fakültesi Makine Mühendisliği Bölümü Taramalı Elektron Mikroskobu Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Doktora tezime konu olan bu çalışmaya verdiği maddi destekten dolayı Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu'na ayrıca doktora programı sırasında sağladığı maddi destekten dolayı TÜBİTAK Münir Birsnel Vakfına teşekkür ederim.

Doktora tez danışmanlığımı üstlenen, bu çalışmanın doktora tezi olarak seçiminde ve gerçekleşmesinde değerli zamanlarını ayırarak bana yön veren, ayrıca benden düşünsel desteğini ve güler yüzünü hiç esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç.Dr. Saadettin GÜNER'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tezime juri üyesi olarak seçilen, tez savunmam sırasında yaptıkları olumlu eleştirilerle tezimi daha nitelikli kılmak hususundaki değerli görüşlerinden dolayı sayın Prof.Dr. Şule PEKYARDIMCI'ya ve ayrıca izolatların kullanımı konusunda yardımcı olan sayın Doç.Dr. Zihni DEMİRBAĞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan sevgili arkadaşlarım Arş.Gör. Sabriye DÜLGER'e, Arş.Gör.Dr. Ahmet Faik AYAZ'a, Öğr.Gör. Cüneyt VOLGA'ya, Öğr.Gör. Barbaros DİNÇER'e, Arş.Gör. Nagihan SAĞLAM'a, Arş.Gör. İsmail DEMİR'e ve sayın hocalarım Doç.Dr. Ali Osman BELDÜZ ve Y.Doç.Dr. Sevgi KOLAYLI'ya, Kimya ve Biyoloji bölümündeki değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile bugüne kadar hep yanımda olan ve bundan sonrada olacaklarına inandığım aileme sevgilerimi sunar, çok teşekkür ederim.

Ahmet ÇOLAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET.....	VI
SUMMARY.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Polimerlerin Biyosistemlerdeki Karakterleri.....	2
1.2.1. Polimerlerin Biyobozunması.....	2
1.2.2. Polimerlerin Biyoyumluluğu.....	5
1.3. Biyobozunur Polimerler.....	5
1.4. Polihidroksialkanoatlar (PHA).....	10
1.4.1. Polihidroksialkanoatların Genel Özellikleri.....	11
1.4.2. Polihidroksialkanoatların Biyosentezi.....	15
1.4.3. Polihidroksialkanoatların Biyobozunması.....	18
1.4.4. Polihidroksialkanoat Metabolizmasının Düzenlenmesi (Regülasyonu)	21
1.4.5. Polihidroksialkanoat Biyosentezinin Moleküler Analizi.....	23
1.4.6. Polihidroksialkanoat Bozunmasının Moleküler Analizi.....	26
1.5. PHA Depolimerazların Biyoteknolojik Yönleri, Çalışmanın Amacı, Bilimsel ve Pratik Önemi.....	27
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	29
2.1. Cihazlar.....	29
2.2. Kimyasal Maddeler.....	29
2.3. Kullanılan İzolatlar.....	30
2.4. Çözeltilerin Hazırlanması.....	30
2.4.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	30
2.4.2. Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması.....	31

2.4.2.1. Lenta-Bertani Agar (LBA) Besiyerinin Hazırlanması.....	31
2.4.2.2. E ⁻ Besiyeri Ortamının Hazırlanması.....	31
2.4.3. PHB Depolimeraz Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu İçin Gerekli Çözeltiler.....	32
2.4.4. Protein Elektroforezi İçin Gerekli Çözeltiler.....	32
2.5. İzolatların Katı ve Sıvı Besin Ortamlarında Büyütülmesi.....	34
2.6. Büyüme Eğrilerinin Elde Edilmesi.....	34
2.7. Polimer Filmlerinde Kütle Kaybının Tespiti.....	35
2.8. PHB Depolimeraz Enzim Ekstraktı Hazırlanması.....	35
2.9. Protein Tayini.....	36
2.10. “Clear-Zone” Tekniğiyle Polimer Filmlerinin Parçalanmasının İncelenmesi	36
2.11. PHB Depolimeraz Aktivitesinin Tayini.....	37
2.11.1. PHB Depolimeraz Aktivitesine Substrat Konsantrasyonu Etkisi.....	37
2.11.2. PHB Depolimeraz Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi.....	37
2.11.3. PHB Depolimeraz Aktivitesine Metal İyonu Etkisinin İncelenmesi.....	38
2.11.4. PHB Depolimeraz Aktivitesine İnhibitör Etkisinin İncelenmesi.....	38
2.12. Ekstraktlarda PHB Depolimeraz Mevcudiyetinin Elektroforetik Olarak İncelenmesi.....	38
2.13. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi.....	39
2.14. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile Molekül Kütlesi Tayini.....	39
2.15. 16S rRNA Genlerinin Dizin Analizinin Yapılması.....	40
2.15.1. Genomik DNA'nın İzolasyonu.....	40
2.15.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemiyle 16S rRNA Analizi.....	41
2.15.3. 16S rRNA Genlerinin pNOT Vektörüne Klonlanması.....	41
2.15.4. Gece Kültürünün Hazırlanması.....	42
2.15.5. Kompetent Hücrenin Hazırlanması.....	42
2.15.6. Plazmid Transformasyonu.....	42
2.15.7. Plazmid DNA İzolasyonu.....	43
2.15.8. 16S rRNA Genlerinin Dizin Analizinin Yapılması ve Tür Tayini.....	43
3. BULGULAR.....	44
3.1. İzolatların Katı Besiyeri Ortamında Büyütülmesi.....	45
3.2. İzolatların Sıvı Besiyeri Ortamında Büyümeleri ve Büyüme Profilleri.....	46
3.3. İzolatların Polihidroksibutiratla İndüklenmesi ve Depolimeraz Aktivitesi.....	46

3.4. Polimer Filmlerinde Kütle Kaybının Tespit Edilmesi.....	49
3.5. <i>Pseudomonas</i> İzolatları ile Parçalanmış Filmlerin Jel Geçirgenlik Kromatografisi ile Molekül Kütlesinin Tayini	49
3.6. “Clear-Zone” Tekniği ile Polimer Filmlerinin Parçalanmasının İncelenmesi.....	50
3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Parçalanmış Filmlerin Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi.....	52
3.8. PHB Depolimeraz Varlığının Elektroforetik Olarak İncelenmesi.....	55
3.9. PHB Depolimeraz Aktivitesinin Karakterize Edilmesi.....	56
3.9.1. PHB Depolimeraz Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi.....	56
3.9.2. PHB Depolimeraz Aktivitesine Substrat Konstrasyonu Etkisi.....	57
3.9.3. PHB Depolimeraz Aktivitesine Metal İyonu Etkisi.....	59
3.9.4. PHB Depolimeraz Aktivitesine İnhibitör Etkisi.....	60
3.10. 16S rRNA Genlerinin Dizin Tayini.....	60
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	64
5. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ÖZET

Bu çalışmada, topraktan izole edilen ve daha önce fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından *Pseudomonas* oldukları belirlenen bazı izolatların polihidroksialkanoat (PHA) parçalama yetenekleri incelendi. 24 saat boyunca izolatlara maruz bırakılan polihidroksibutirat (PHB) filmleri ile kontrol filmlerinin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu ile incelendiğinde, izolatlara maruz bırakılmış filmlerde kontrole göre, çok sayıda düzensiz çukurların ve yüzey erozyonunun olduğu gözlemlendi. Hem jel geçirgenlik kromatografisi ile tayin edilen molekül kütlesi azalmasının hem de kütle kaybının %30'lara varması bu izolatların PHB filmlerini parçalayabildiğini göstermektedir. Katı besiyeri ortamı üzerine yayılan polihidroksioktanoat, polihidroksinonanoat ve kopolimer (PHB-co-HV) filmlerinin parçalanması, bu polimer filmleri üzerine izolatların uygulanması sonucu berrak bölgelerin oluşumu ile de belirlendi. 50-60 kDa molekül kütleli bazı peptidlerin elektroforetik olarak gözlenmesi diğer *Pseudomonas* türlerinde benzer molekül kütleli bir depolimerazın varlığı ile ilgili önceki gözlemlerle oldukça uyumludur. Depolimeraz aktivitesinin karakterizasyonu ise *p*-nitrofenilbutirat substratı varlığında gerçekleştirildi ve bazı kinetik değerler daha önce bildirilen değerlerle karşılaştırıldı. Elde edilen verilerden, bu aktiviteden sorumlu enzim için bu substrat varlığında K_M ve V_{maks} değerleri sırasıyla 2.3 mM ve 2.8 Ünite olarak hesaplandı. Belirlenen depolimeraz aktivitesinin belirli konsantrasyonlardaki Na^+ , K^+ ve Mg^{+2} iyonları varlığında arttığı, yüksek konsantrasyonlarında ise azaldığı gözlenmiştir. Ca^{+2} durumunda ise aktivasyon, artan iyon konsantrasyonlarında bile belirli düzeylerde sabit kalabilmiştir. Fenilmetilsülfonilflorür, ditiyotreitol, siyanür, sodyum azid, deoksikolik asit sodyum tuzu ve etilen diamin tetraasetik asit sodyum tuzu gibi kimyasalların test edilen izolatlarda mevcut olabilecek depolimeraz aktivitesi için inhibisyon davranışları incelendiğinde, elde edilen veriler diğer depolimerazlarda bildirildiği gibi benzer bir depolimerazın çalışılan izolatlarda bulunabileceği sonucunu ortaya koymaktadır. 16S rRNA genlerinin dizi analizlerinden PHA parçalama yetenekleri karakterize edilen bu izolatların *Pseudomonas* türü oldukları belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Polihidroksibutirat, Depolimeraz, Biyobozunma, *Pseudomonas*

SUMMARY

Investigation of biodegradabilities of some polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas isolates*

In this study, polyhydroxyalkanoate biodegradation capabilities of some species isolated from soil and identified previously as *Pseudomonas sp.* in terms of some physiological and biochemical properties were investigated. Surface morphologies of solution-cast PHB films at the end of 24 h of incubation with the isolates were monitored by Scanning Electron Microscopy. Several irregular pits and erosion on film surfaces exposed to *Pseudomonas* isolates were observed. Both decrease in molecular weight determined by GPC and weight loss up to 30% have shown that the isolates are able to degrade the films. Degradation of polyhydroxyoctanoate, polyhydroxynonanoate or copolymer (PHB-*co*-HV) films poured on a solid medium was also observed by clear zone formation after incubation of isolates. The presence of some peptides with molecular weight of 50-60 kDa was electrophoretically identified. This result is consistent with the earlier observations that a depolymerase with similar molecular weight is present in other *Pseudomonas* species. Characterization of depolymerase activity was assayed in the presence of *p*-nitrophenylbutyrate as a substrate and some kinetic data were compared with the reported values. From the data, K_M and V_{max} values in the presence of the substrate were calculated as 2.3 mM and 2.8 Units, respectively, for the enzyme responsible for this activity. It was also observed that depolymerase activities were stimulated by Na^+ , K^+ or Mg^{+2} at specific concentrations but decreased at their greater concentrations. On the contrary, the activation of enzyme in the presence of Ca^{+2} stay constant even in the presence its higher concentrations. The inhibition behaviour of some chemicals such as phenylmethylsulfonylfluoride, dithiothreitol, cyanide, sodium azide, deoxycholic acid sodium salt and ethylenediamine tetraacetic acid sodium salt on the observed depolymerase activity has evidenced the presence of an enzyme in the isolates similar to depolymerase reported earlier. Moreover, the isolates with PHA degradation properties were identified as *Pseudomonas sp.* from the 16S rRNA gene analyses.

Key words: Polyhydroxybutyrate, Depolymerase, Biodegradability, *Pseudomonas*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Polihidroksialkanoatların genel kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.	Hücrenin %70-90'ını dolduran granül PHA birikimini gösteren <i>R. rubrum</i> 'un elektron mikrografi.....	16
Şekil 3.	<i>R. eutropha</i> 'da asetil-CoA'dan PHB sentezindeki reaksiyon basamakları.....	17
Şekil 4.	<i>R. eutropha</i> 'da polihidroksialkanoatların sentez yolu.....	18
Şekil 5.	<i>R. eutropha</i> 'da PHB parçalanmasındaki reaksiyon basamakları.....	20
Şekil 6.	Bakterilerde enerji üretimi, hücre büyümesi ve PHA üretiminin regülasyonu ve kontrolü.....	22
Şekil 7.	PHA polimerizasyon ve depolimerizasyon reaksiyonları için önerilen regülatör mekanizmalar.....	22
Şekil 8.	<i>R. eutropha</i> 'da polihidroksialkanoat biyosentezi operonunun organizasyonu.....	24
Şekil 9.	LBA besiyeri ortamında 30 °C'de ve 1 gece büyütülen izolatlar.....	45
Şekil 10.	E* besiyeri ortamında <i>Pseudomonas</i> izolatlarının büyüme profilleri.....	46
Şekil 11.	11 izolatının PHB ile indüklenmesi ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi.....	47
Şekil 12.	21 izolatının PHB ile indüklenmesi ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi.....	47
Şekil 13.	24 izolatının PHB ile indüklenmesi ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi.....	48
Şekil 14.	38 izolatının PHB ile indüklenmesi ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi.....	48
Şekil 15.	PHO polimerinin 11 izolatı ile parçalanmasının "clear zone" tekniği ile izlenmesi.....	50
Şekil 16.	PHN polimerinin 24 ve 38 izolatları ile parçalanmasının "clear zone" tekniği ile izlenmesi.....	51

Şekil 17. PHB-co-PHV kopolimerinin 21 izolatu ile parçalanmasının “clear zone” tekniği ile izlenmesi.....	52
Şekil 18. <i>Pseudomonas</i> izolatlarına ve biyobozunmaya maruz bırakılmadan önce PHB filmi yüzeyinin taramalı elektron mikrofisi.....	53
Şekil 19. E* besiyerinde <i>Pseudomonas</i> izolatlarının 24 saatlik bir süreç içerisinde parçaladığı PHB filmlerinin taramalı elektron mikrofisi...	54
Şekil 20. 24 nolu izolatu büyütülmesi sırasında çeşitli zaman dilimlerinde alınan örneklerdeki ekstraselüler karışımların SDS-PAGE profili.....	55
Şekil 21. 24 nolu izolatu için PHB depolimeraz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi.....	56
Şekil 22. 24 izolatuındaki depolimeraz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi....	57
Şekil 23. 24 izolatuındaki depolimeraz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi.....	58
Şekil 24. 24 izolatuındaki depolimeraz aktivitesi için Eadie-Hofstee eğrisi.....	58
Şekil 25. İzolatların baz sırası tayininin model gösterimi.....	61
Şekil 26. PHB depolimerazlar için önerilen ester bağının enzimatik hidrolizinin şematik bir modeli.....	68

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bazı sentetik plastik malzemelerin doğada bozunma yetenekleri.....	3
Tablo 2. Endüstriyel olarak üretilen ve kullanımda olan bazı biyobozunur plastikler.....	6
Tablo 3. Hücre içi depo maddesi olarak PHA'ları ürettiği bilinen çeşitli mikroorganizmalar.....	12
Tablo 4. Polipropilen (PP) ve PHB'nin bazı fiziksel özellikleri açısından kıyaslanması.....	14
Tablo 5. Mikrobiyal PHA depolimeraz genlerinin karakterleri.....	27
Tablo 6. Tris-Glisin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için %12'lik ayırma jeli karışımı.....	33
Tablo 7. Tris-Glisin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için %5'lik yükleme jeli karışımı.....	33
Tablo 8. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için boyama (staining) çözeltisi karışımı.....	33
Tablo 9. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için boya uzaklaştırma (de-staining) çözeltisi karışımı.....	34
Tablo 10. PHB depolimeraz aktivitesi tayini için reaksiyon karışımı.....	37
Tablo 11. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için nümune hazırlama reaksiyon karışımı.....	39
Tablo 12. E* kültür ortamında <i>Pseudomonas</i> türleri tarafından 1 cm ² lik PHB filmlerinin 24 saatlik bir zaman diliminde parçalanmasına bağlı olarak kütle kaybı.....	49
Tablo 13. E* kültür ortamında <i>Pseudomonas</i> türleri tarafından 24 saatlik bir zaman diliminde parçalanmış PHB filmlerinin, GPC ile molekül ağırlığı değişimleri.....	50
Tablo 14. "Clear-Zone" tekniği ile polimer filmlerinin parçalanması.....	52
Tablo 15. 24 nolu izolat için çeşitli iyonların depolimeraz aktivitesi üzerine etkisi.....	59
Tablo 16. PHB depolimeraz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi.....	60
Tablo 17. PHA parçalayan izolatların 16S rRNA gen dizileri için homolojileri.....	69

SEMBOLLER DİZİNİ

4HB	: 4-Hidroksibutirat
ABS	: Akrilonitril-butadien-stiren kopolimeri
ATP	: Adenozintrifosfat
bp	: Baz çifti
CoASH	: KoenzimA
dATP	: Deoksiadenozintrifosfat
dCTP	: Deoksisitidintrifosfat
DEAE	: Dietilaminoetil
dGTP	: Deoksiguanozintrifosfat
DNA	: Deoksiribonükleikasit
DTT	: Ditiyotreitol
dTTP	: Deoksitimidintrifosfat
DY PE	: Düşük yoğunluklu polietilen
EDTA-Na	: Etilendiamin tetraasetik asit sodyum tuzu
FADH ₂	: Flavindenindinükleotid (indirgenmiş)
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
GTP	: Guanozintrifosfat
HB	: Hidroksibutirat
HC	: Hidroksikaproat
HD	: Hidroksidekanoat
HDD	: Hidroksidodekanoat
HH	: Hidroksiheptanoat
HN	: Hidroksinonanoat
HO	: Hidroksioktanoat
HUD	: Hidroksiundekanoat
HV	: Hidroksivalerat
kDa	: Kilodalton
K _M	: Michealis-Menten değeri
LBA	: Lauria-Bertani agar
NAD	: Nikotinamid adenindinükleotid

NAD ⁺	: Nikotinamid adeninükleotid (okside)
NADH	: Nikotinamid adeninükleotid (indirgenmiş)
NADPH	: Nikotinamid adeninükleotid fosfat (indirgenmiş)
OD	: Optik yoğunluk
P(3HB)	: Poli-3-hidroksibutirat
P(3HB-co-3HV)	: Poli(3-hidroksibutirat/3-hidroksivalerat) kopolimeri
P(3HV)	: Poli-3-hidroksivalerat
PA	: Poliamid
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PAH	: Polianhidrat
PAK	: Poliakrilat
PCL	: Polikaprolakton
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	: Polietilen
PEO	: Polietilenoksit
PET	: Polietilentereftalat
PF	: Polifosfazan
PGA	: Poliglikolikasit
PHA	: Polihidroksialkanoat
<i>phaZ</i>	: PHA depolimeraz
PHB	: Polihidroksibutirat
<i>phbA</i>	: 3-Ketotiyolaz
<i>phbB</i>	: AsetoasetilCoA redüktaz
<i>phbC</i>	: Polihidroksibutirat sentaz
PHB-co-HV	: Polihidroksibutirat-valerat kopolimeri
PHN	: Polihidroksinonanoat
PHO	: Polihidroksioktanoat
PIK	: Poliiminokarbonat
PLA	: Polilaktikasit
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
PNPB	: <i>p</i> -nitrofenilbutirat
PP	: Polipropilen
PS	: Polistiren

PÜ	:	Poliüretan
PVA	:	Polivinilalkol
PVAS	:	Polivinilasetat
PVC	:	Polivinil klorür
RNA	:	Ribonükleik asit
RNaz	:	Ribonükleaz
rpm	:	Dakikada dönme
rRNA	:	Ribozomal RNA
SDS	:	Sodyumdodesilsülfat, sodyumlaurilsülfat
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
TE	:	Tris-EDTA tamponu
TEMED	:	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilendiamin
THF	:	Tetrahidrofur
Tris	:	Tris(hidroksimetil)aminometan
V_0	:	Hız
V_{maks}	:	Maksimum hız
YY PE	:	Yüksek yoğunluklu polietilen

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Son 20 yıl içerisinde, uzun ömürlülükleri ve parçalanmaya karşı gösterdikleri dirençten dolayı plastikler çeşitli endüstriyel ve tüketim amaçlı ürünler için ideal malzemeler olmuşlardır. Oldukça farklı yapıları ve özellikleri ile çeşitli uygulama alanlarında yaygın olarak kullanılan bu malzemelerin büyük bir çoğunluğu petrolden kaynaklanan hammaddelerin işlenmesi sonucu üretilirler. Gıda, boya, tekstil yanında tıp ve eczacılıkta, elektrikli ve elektronik malzemelerin yapımında, yapıştırıcı, kaplayıcı, tekstil ipliği, paketleme malzemeleri ve filmler, izolasyon köpüğü olarak, tıbbi cihazların ve optik malzemelerin yapımında sağlam, ucuz, kimyasal olarak inert ve hafif malzemeler olmalarından dolayı oldukça yaygın ve geniş ölçüde kullanılmaktadırlar. Bu malzemeler piyasa taleplerini karşılamak üzere elde ediliyorken, ihtiyaca göre reçine, pudra, boya gibi katkı maddeleri ile işlenirler ve böylece malzemenin kullanım alanlarına göre sağlamlığı ve çeşitli etkenlere karşı dayanıklılığı sağlanmış olur. Plastik malzeme, bu polimerik maddelerin katkı maddeleri ile karıştırılıp farklılandırılmış ve kullanıma sunulmuş şekline verilen addır (Stein, 1992; Brown, 1994; Poirier vd., 1995).

İlk polimer ve kompozit malzemelerin çoğu biyolojik kaynaklı olmuştur. İpek, mekanik ve estetik özellikleri tekstil endüstrisi tarafından benimsenen bir lifli proteindir. Fonksiyonel eşdeğeri olan naylon, amit bağının polimer bilimciler tarafından kullanılmasıyla ortaya çıkmıştır. Diğer bir lifli protein ise keratinden yapılmış olan yündür. Bu tür biyolojik esaslı polimerlerden en önemlisi pamuk halindeki selülozik malzemelerdir. Polimer endüstrilerinin başlangıcında ise selüloz nitrat ve selüloz asetat gibi selüloz türevleri üretilmiştir. Bununla birlikte, bu türden biyolojik malzemelerin teknolojik öneme sahip olabilmeleri için kolayca elde edilebilir bir halde ve büyük miktarlarda elde edilebilir olması gerekmektedir. Ayrıca nihai ürün, kimyası ve özellikleri açısından yeniden üretilebilir olmalıdır (Brown, 1994).

Günümüze kadar plastik üretiminde kullanılan polimerler konusunda yapılan çalışmaların pek çoğu; daha çok plastikleri daha kararlı kılmak ve parçalanmalarına veya bozunmalarına sebep olan ultraviyole ışık ile bir çok çevresel etkene karşı daha dirençli yapmak üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak, plastik malzemelerin oldukça yaygın ve bol

miktarda tül etmeleri, doğaya atıldıktan sonra pek çoğunun geri dönüşümlerinin olmaması sonucu büyük bir çevresel kirlilik problemi ortaya çıkarmışlardır. Petrol esaslı veya geleneksel plastiklerin dünyadaki yıllık üretimi 1995 yılına kadar yaklaşık olarak 100 milyon ton kadar olmuştur (Rudolph, 1994) ve bu bozunmayan plastikler çevrede yılda yaklaşık 25 milyon ton'luk bir hızla birikmektedirler (Lee vd., 1991). Çevre kirliliğine karşı toplumların gösterdiği tepkiden ve daha temiz bir çevrenin arzu edilmesinden dolayı pek çok yasal düzenlemeler yapılmıştır (Leaversuch, 1987). İtalya dahil bir çok Avrupa ülkesi ve Amerika Birleşik Devletleri tüm plastik paketleme malzemelerinin biyobozunur olması konusundaki kanunları 1990'lı yılların başlarında yürürlüğe koymuşlardır. Bu problemlerin çözümü için son yıllarda, doğada parçalanabilir plastik malzemelerin üretilmesi ve geliştirilmesi konusunda oldukça detaylı çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle petrol türevli ve çevrede bozunmayan plastiklerden kaynaklanan çevre kirliliğinin önlenmesinde çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır ve depozitolu kullanım, yeniden şekil vererek geri kazanma, piroliz ile polimerik maddeyi parçalayıp monomerlerini geri elde etme ve plastik atıkları yakıt olarak kullanma bunlardan en önemlileridir. Gelişmiş ülkeler daha çok ilk üç yöntemi kullanıyorken gelişmekte olan ve az gelişmiş olan pek çok ülke %50-70 oranında yakma ile uzaklaştırma yöntemini tercih etmektedirler (Stein, 1992; Rudolph, 1994).

1.2. Polimerlerin Biyosistemlerdeki Karakterleri

1.2.1. Polimerlerin Biyobozunması

Bozunabilir bir plastik, kullanım sırasında yeterince performans sağlayabilmeli ve kullanımdan sonra ise uygun atık işleme sistemleri ile çevrede uyumlu olacak bileşenlere ayrılabilmelidir (Booma vd., 1994). Bu tür plastikler genellikle; biyobozunur, ışıkla bozunur, oksidasyonla bozunur veya hidrolitik olarak bozunur şeklinde sınıflandırılabilirler. Polimerik yapıdaki protein, selüloz, nişasta ve glikojen gibi bir çok biyomolekül çevreye atıldıktan sonra birkaç hafta içerisinde doğada biyolojik olarak parçalanabilmektedir. Bazı sentetik polimerlerin de doğal polimerler gibi tabiatta biyolojik olarak kendiliğinden bozunabildiği bulunmuştur. Bunlar çoğunlukla eter, ester veya alkol grupları içeren; poliamidler (PA), polianhidratlar (PAH), polivinilalkol (PVA), polivinil asetat (PVAS), poliglikolik asit (PGA), polietilenoksit (PEO), poliüretan (PÜ),

polifosfazan (PF), poliiminokarbonatlar (PIK), ve poliakrilatlardır (PAK). Bu türden polimerlerin yıllık atık miktarları ve doğada bozunmadan kalabilme süreleri Tablo 1'de verilmiştir (Huang vd., 1990; Booma vd., 1994).

Bir makromolekül kimyasal, biyolojik ve fiziksel metodlarla parçalanabilir. Kimyasal işlemlerden farklı olarak mikrobiyal parçalanma (biyobozunma) işlemleri belli bir dereceye kadar otokatalitiktir. Çünkü parçalanan substrat (polimer) organizmanın popülasyonunda bir artışa sebep olur. Bakteriler, parçalanmadan da faydalanır ve oluşan daha küçük molekülleri de kullanırlar. En önemli parçalanma türü ester, amit veya glikozidik bağların hidrolizidir. Bu polimerleri parçalayan organizmalarda bulunan hidrolazlar reaksiyonlarını tamamlayabilmek için en genel ekstraselüler ortam olan suya ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla glikolat, laktat, malat ve 3-hidroksi asit türevlerinin biyolojik olarak parçalanabilme şansı oldukça fazladır (Booma vd., 1994).

Tablo 1 . Bazı sentetik plastik malzemelerin doğada bozunma yetenekleri. YY PE: Yüksek yoğunluklu polietilen, DY PE: Düşük yoğunluklu polietilen, PVC: polivinil klorür, PP: polipropilen, PS: polistiren, ABS: Akrilonitril-butadien-stiren kopolimeri, PET: polietilen tereftalat

Polimer Türü	En Yaygın Kullanım Şekli	Yıllık Atık Miktarı (ton)	Zamanla Bozunabilen Miktarı (ton)		
			< 1 yıl	2-10 yıl	>10 yıl
DY PE	Ambalaj, %62	3151	1193	1109	849
PVC	Yapı malzemesi, %62	2397	771	642	984
PS	Ambalaj, %46	1697	981	474	242
PP	Ambalaj, %22	1665	605	906	144
YY PE	Ambalaj, %60	1131	205	558	368
ABS	Ambalaj, %30	319	37	232	50
PET	Plastik Şişe, %72	288	288	-	-
Diğer		795	100	285	400
Toplam		11433	4180	4216	3037
%		100	36	37	27

Bozunabilir plastikler ya fotobozunur ya da biyobozunur olarak gruplandırılırlar. Fotobozunur plastikler, polimer iskeletine doğrudan bağlanmış ışığa duyarlı gruplar veya bu türden katkı maddelerini içerirler. Fotobozunma ile polimer daha küçük parçalara

aynılamayan parçacıklara dönüşür ve böylece malzemenin yapısal bütünlüğü bozulur (Booma vd., 1994).

Biyobozunma, mikroorganizmalar gibi canlı nesnelere etkisiyle genellikle zararsız ürünlere parçalanabilme kapasitesi olarak tanımlanır (Braunegg, 1998). Doğada biyobozunma işlemlerine katılan temel organizmalar bakteriler ve mantarlardır. Böylece, biyobozunur plastikler, ya enzimatik olmayan hidroliz ile veya mikroorganizmalarda bulunan enzimlerin etkisiyle kısmen yada tamamen parçalanabilen malzemelerdir ve biyobozunma, katabolik işlemler dizisi olarak da tanımlanabilir. Son yıllarda polietilen ve nişastadan oluşturulan bazı plastikler yarı-biyobozunur olarak dikkate alınırken polihidroksibutirat (PHB) gibi bazı polimerler ise %100 biyobozunur olarak değerlendirilmektedir. Bu biyobozunur plastiklerin şu anda dünyadaki piyasası yılda yaklaşık olarak 1.5 milyon ton kadardır. Son yıllarda, teknolojik olarak faydalı bu türden biyobozunur polimerik malzemelerin geliştirilmesi amacıyla mikroorganizmalar oldukça ilgi çekici olmuşlardır ve bu amaçla yapısal bir endüstriyel plastik malzeme olan bakteriyel poliesterlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bazı sentetik polimerlerin de mikrobiyal olarak parçalanabileceği bildirilmiştir. Ancak kimyasal bileşenlerinin enzimlerin saldırısı için oldukça dirençli olmasından dolayı bu işlemin yavaş olduğu tespit edilmiştir (Steinbüchel, 1992; Pranamuda vd., 1995).

Çevre ve plastikler konusunda duyarlı olan çeşitli uluslararası kurumlar, çevrede biyobozunan polimerler için 3 temel şart kabul etmiştir (Booma vd., 1994).

- i) Kullanımlarının ortaya konması. Bir biyobozunur polimer kıymete değer bir atık yönetimi seçeneğini sağlıyor olmalıdır.
- ii) Çevrede nasıl bir etki bıraktıklarını açık olarak belirten tanımlamanın herkesçe kabul edilir olması. Biyobozunma mekanizması önemli olmasına karşın, biyobozunur polimerlerin polimer atık yönetimindeki rolünü belirlemede, bu tür polimerlerin çevrede oluşabilen ürünlerini ve etkilerini tanımlayan bir referansı içermelidir. Çevreye atılan polimerlerde bazı değişimler olacaktır. Aerobik mineralleşme ile karbondioksit, su ve tuz gibi ürünler oluşabilir veya bu tür ürünler kısmi biyobozunma ile de sağlanabilir. Her iki işlem de biyobozunma olarak tanımlanabilir.
- iii) Çevrede beklenileni yaptıklarını gösteren test işlemleri. Çevresel olarak biyobozunur olduğu kabul edilen polimerler için yapılan tanımlama polimerin bozunma derecesini, herhangi bir ürünün çevredeki durumunu ve etkilerini içerdiğinden test protokolleri bu ikisini de kantitatif olarak ölçmelidir. Kantitatif protokoller ve çevresel ürün ve etki testleri polimerlerin biyobozunurluklarının kabulü için anahtar testlerdir. Kontrollü çürüme

şartlarında k biyobozunma, toprağa gömme şartlarında anaerobik biyobozunma, tatlı su ortamına maruz bırakma, uyarılmış deniz suyu ortamına maruz bırakma, uyarılmış toprağa gömme, uyarılmış gübre ortamına maruz bırakma gibi test metotları bunların bir kaçıdır (Booma vd., 1994).

1.2.2. Polimerlerin Biyoyumluluğu

Polimerlerin sahip olabileceği biyoparçalanma gibi mükemmel bir özellik yanında bir diğer önemli özellik ise biyoyumluluktur. Biyoyumluluk (biyokompatibilite), biyobozunur bir polimerin bir canlı sistemde kullanımı sırasında veya kullanımdan sonra bozunmasıyla ve çevreye atılması sonucu oluşabilecek ürünlerin organizmada veya çevrede olumsuz bir etki oluşturmaması, organizma ve çevre ile uyumlu olması şeklinde ifade edilebilir (Howells, 1982; Holmes, 1985; Gogolewski vd., 1993). Günümüzde endüstriyel olarak üretimi sağlanan PHB' nin monomeri olan 3-hidroksibutirat, insan kanının normal bir bileşenidir. PHB' nin parçalanma ürünü olan 3-hidroksibutirik asit ayrıca bir çok metabolik olayda da ara ürün olarak oluşturulur. Dolayısıyla bu tür polimerlerin kemik doku ya da ameliyat ipliği olarak kullanılmasında oluşacak parçalanma ürünlerinin herhangi bir yan tesiri olmayacağı açıktır.

1.3. Biyobozunur Polimerler

Biyobozunur polimerler, bir mikrobiyal etki sonucu tamamen parçalanabilen polimerlerdir. Bu tür polimerlerden oluşturulan plastik malzemeler parçalandıktan sonra kendilerini oluşturan kimyasal yapı elemanları, ekosistemin bir parçası haline getirilirler. Günümüz teknolojileri ile üretildiklerinde petrolden türeyen plastiklere göre daha pahalı olmasına rağmen bu plastikler birçok kullanım alanında oldukça tercih edilirler. Bunlardan birkaçı günümüzde; yemek servis paketlenmesinde, farmasötik kapsüllerde ve birçok tıbbi malzemenin yapımında kullanılmaktadırlar.

Mikrobiyal parçalanmaya duyarlı polimerler varlığında, mikroorganizmalar, polimere saldırabilen ve onu daha küçük parçalara ayırabilen enzimleri salgırlar. Bu enzimler, -COOH, -OH ve -NH₂ gibi hidrofilik grupları yüksek oranda içeren yüksek molekül ağırlıklı proteinlerdir. Bu enzimler polimerlere saldırarak bunların hidrolitik ve yükseltgeyici reaksiyonlarla parçalanmalarını sağlarlar. Polimer 500 g/mol den daha düşük

bir molekül ağırlığına parçalanınca, mikroorganizmalar tarafından kullanılır bir şekle gelmiş olur. Bu türden biyobozunma işlemlerinin gerçekleşebilmesi için;

- i) mikroorganizmaların varlığı,
- ii) oksijenin varlığı, ortamın nem ve mineral içeriği,
- iii) organizmanın türüne bağlı olarak 20–60 °C'ye kadar değişebilen sıcaklık değerleri,
- iv) yaklaşık 5-8 arasındaki pH değerleri gibi şartlar mutlaka sağlanmalıdır.

Biyobozunma mekanizması, bakteri veya mantarların polimer yüzeyinde kolonize olmalarını diğer bir ifade ile büyümelerini içerir. Dolayısıyla, mikroorganizmanın bu yüzeylere tutunması ve kolonize olması; yüzey gerilimi, yüzeyin yapısı, gözenek yapısı, çevrede kalma süresi ve yüzey alanına bağlıdır. Doğal olarak mikroorganizmalar dahil çeşitli organizmalar tarafından pek çok sayıda farklı biyobozunur polimer sentezlenebilmesine rağmen sadece birkaç endüstriyel amaçlı üretilebilmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Endüstriyel olarak üretilen ve kullanımda olan bazı biyobozunur plastikler
PP: polipropilen, PE: polietilen

Ticari Adı	Üretici Firma	Kimyasal Bileşim	Özellik
Biopol	ICI Cargil Ecochem	Polihidroksibutirat Polilaktik asit Polilaktik asit	Kristalin, PP benzeri özellik Kristalin, rijit, biyouyumlu Toprakta bozunur, geri kazanılabilir
Tone Polymers	Union Carbide	Polikaprolakton	Kristalin, PE' e benzer özellik
Vinex	Air Products and Chem.	Polivinil alkol	Suda çözünür ve toprakta bozunur
Enviroplastic	Planet Packaging Techn.	Polietilen oksit	Geri kazanılabilir

Biyobozunur polimerler, organizmalarda genellikle bir stok malzemesi olarak ve daha sonra enerjiye ihtiyaç olduğunda hemen kullanılmak üzere organizmanın belirli bölgelerinde depolanırlar. Bu polimerler üretildikleri organizma türüne de bağlı olarak içerdikleri bileşenlerin kimyasal yapısına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler. Endüstriyel olarak kullanıma sunulmak üzere geliştirilmekte olan bazı biyobozunur plastik malzemelere örnek olarak polisakkaritler, alifatik poliesterler, polihidroksialkanoat (PHA) lar, polilaktitler veya bunların kopolimerleri verilebilir (Leaversuch, 1987; Dawes, 1990; Byrom, 1991; Chum, 1991; Swift, 1993; Chang, 1994). 2000 yılına kadar bu

biyobozunur polimerlerin dünyadaki üretiminin 1.4 milyon tona ulaşacağı ve bu üretimin çok daha büyüyeceği bildirilmektedir (Leaversuch, 1987).

Polisakkaritler veya diğer genel adlarıyla karbohidratlar olarak tanımlanan biyopolimerler, şekerlerin ya düz ya da dallanmış zincirlerini içerirler. Glikojen, nişasta, selüloz, çitin, pullulan ve levan maddeleri bu gruba aittirler. Nişasta bitkiler tarafından sentezlenen polimerik bir yapıdır. Amiloz ve amilopektin olarak tanımlanan iki polimerik bileşenden oluşur. Amiloz, α -1,4-zincirli D-glukoz moleküllerinin oluşturduğu polimerik yapı elemanıdır ve yaklaşık molekül ağırlığı 1×10^5 - 2×10^6 kadardır. Amilopektin ise α -1,4-zincirli D-glukoz polimer zincirlerinin α -1,6-zincirleri ile çapraz bağlanması sonucu oluşturulan yapıdır ve molekül ağırlığı 4×10^7 - 4×10^8 kadardır. Nişastanın bir hammadde olarak düşük maliyeti, kolay bulunabilmesi ve günümüz teknolojileri ile işlenebilmesi gibi ilginç özellikleri vardır. Nişastaya birçok enzim etki ederek kendini oluşturan birimlere hidroliz olmasını ve dolayısıyla parçalanmasını sağlayabilir. Dolayısıyla nişasta polimerleri hem biyobozunur hem de biyoyumlu polimerler olarak endüstride oldukça önemli biyopolimerlerdir. Polisakkaritler sınıfına giren diğer bir biyopolimer selülozdur ve selüloz biyosferde doğal olarak en bol bulunan polimerdir. Bu polimerik yapının sudaki birçok organik çözücüdeki çözünürlüğü oldukça sınırlıdır. Selüloz mikroorganizmaların içerdiği selülaz enzim kompleksi ile düzenli bir şekilde sellobiyoz ve glukozu kadar depolimerize edilebilir ki bu bileşenler de hücresel işlemlerde kullanılırlar. Selüloz, bol miktarda içerdiği hidrojen bağlarından dolayı erirmeden önce termal bozunmaya uğrar ve dolayısıyla termal olarak işlenemez. Paketleme endüstrisinde, şeffaf olması ve yağlara karşı geçirgen olmamasından dolayı çeşitli besinlerin saklanması selofan adı ile yaygın olarak bilinen bir formu halinde kullanılır. Kimyasal olarak türevlendirilmiş selüloz ise genellikle biyobozunur değildir ve modifikasyon derecesi parçalanma kinetiğini önemli ölçüde etkiler. Çapraz bağlanma ile de biyobozunma önemli derecede azalır. Ayrıca hidrofilik derecesindeki bir azalmanın da parçalanma hızını azalttığı bildirilmektedir. Endüstriyel öneme sahip diğer karbohidrat türü polimerlere çitin, çitozan, pullulan ve levan adlı polisakkaritler örnek olarak verilebilir. Bu polimerler özellikle film ve lif oluşturabilecek mükemmel mekanik özelliklere sahiptirler ve düşük oksijen geçirgenliğine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı çitin, çitozan veya türevleri besin katkı maddesi olarak, kaplama malzemesi ve film şeklinde kullanılırlar (Booma vd., 1994).

Proteinler, aminoasit olarak adlandırılan monomerik birimlerin peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturduğu ve belirli 3-boyutlu yapılara sahip olan biyopolimerlerdir.

Çok çeşitli besel fonksiyonları yanında sayıları oldukça sınırlı olsa bile bazı proteinlerin birer plastik hammaddesi olarak endüstride çeşitli kullanım alanları söz konusudur. Özellikle maddeye büyük mekanik ve fiziksel destek sağlayan lifli yapılara sahip olan kollagen gibi proteinlerle kazein ve albümin gibi bazı globüler proteinlerin özellikle gıda endüstrisinde kullanımları söz konusudur. Kollagen hayvan dokusunda bulunan önemli bir yapısal proteindir. Glisin, prolin ve hidrokisprolin aminoasitlerinin oluşturduğu trimerlerin tekrarlanması ile oluşturulan polipeptit zincirlerinden meydana gelir. Tüm proteinlerde olduğu gibi kollagen, proteaz adı verilen enzimlerle parçalanarak depolimerizasyona uğrayabilir. Kollagen daha çok filmler halinde kullanılmasına rağmen çapraz bağlanmış formları esasen tıbbi uygulamalarda da kullanılır. Jelatin ise hayvansal bir yan ürün olup büyük oranda protein yapılıdır ve biyobozunur bir polimerdir. Besin, ilaç ve fotoğraf endüstrilerinde sıkça kullanılmaktadır. Bu kullanımları yanında lastikleştirici bazı katkı maddeleri ile beraber lif oluşturmada da kullanılabilirler. Proteazlarla parçalanabilmelerinden dolayı diğer bir çok protein esaslı polimerler çeşitli uygulama alanlarına sahiptirler. Kazein, albumin, fibrinojen, ipek (fibroin) ve elastin bunlardan birkaçıdır. Bu proteinlerin bir çoğu özellikle ilaç endüstrilerinde ilaçların kapsüllenmesi ve kolay salınımın sağlanması amacıyla kullanılmaktadırlar (Booma vd., 1994).

Endüstriyel önemi olan lignin, doğal kauçuk, poliglutamik asit gibi birkaç biyopolimer de çeşitli uygulama alanlarında kullanılırlar. Lignin odunun temel bileşenlerinden biri olup oldukça kompleks ve değişken bir makromoleküler yapıya sahiptir. Aromatik sistemler ve eterik köprüler içeren kompleks bir heteropolimerdir ve temel yapı elemanları olan kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolün enzimlerle katalizlenen serbest radikalik polimerizasyonundan üretilir (Brown, 1994). Bu biyopolimerler bitkiler tarafından sentezlenir ve mantarların da içinde bulunduğu çeşitli mikroorganizmalar tarafından parçalanabilirler. Bu işlemlerde ligninin parçalanmasında ekstraselüler bir enzim olan ligninazın rol oynadığı tespit edilmiştir (Tien, Kirk, 1983). Lignin özellikle kağıt endüstrisinde büyük oranlarda kullanılır. Ayrıca potansiyel mekanik özelliklerinden dolayı kompozit olarak kullanılmaktadır.

Biyobozunur polimerlere karşı artan talebi karşılamak için doğal biyopolimerlerin üretimi yeterli olamamıştır. Bu ihtiyacı karşılamak üzere çok çeşitli fonksiyonel gruplara sahip ve çeşitli özelliklerde sentetik eşdeğerleri tasarlanmış, üretilmiş ve ticari olarak kullanıma sunulmuştur. Bu polimerlerin biyobozunma karakterleri doğal olanlara göre daha zayıf olmasına rağmen gıda, tekstil ve boya endüstrileri gibi pek çok uygulama

alanları ve genellikle kopolimerleri şeklinde kullanılan ve bazı amino asitlerle aminokapronik asitten oluşturulan poliamitlerin biyobozunma hızlarını iyileştirmek için çeşitli fonksiyonel gruplarla modifiye edilmişlerdir. Böylece bu tür biyopolimerlerin genellikle proteazlarla depolimerizasyonları sağlanmıştır. Poliamit türü biyobozunur polimerler boya ve deterjan endüstrilerinde, çocuk bezlerinde absorban olarak ve tıbbi ürünlerde kullanılan poliakrilik asidin yerini alabilmektedir (Booma vd., 1994).

PVA lif, film, kağıt ve yapıştırıcı yapımında yoğun olarak kullanılan ve üstün film oluşturma yeteneklerine sahip suda çözünebilen sentetik bir polimerdir. Bu homopolimerin etilen monomeri ile oluşturduğu kopolimerin (PE/VA) biyobozunur özellikleri vardır. PE/VA kopolimerinin mükemmel film oluşturma ve oksijen geçirmeme kabiliyetlerinden dolayı besin endüstrisinde lamine edici olarak yaygın bir şekilde kullanılan bir termoplastiktir (Booma vd., 1994). Bu kopolimerde etilen bloklarının molekülde dağılımı ve hacmi kopolimerin biyobozunur karakterini ortaya koyan önemli bir faktördür.

Polilaktik asit (PLA) organizmaların karbohidratların fermantasyonu ile ürettiği laktik asidin kondenzasyon polimerizasyonu veya katalitik halka kapanması reaksiyonu ile kimyasal olarak sentezlenir. Oldukça kristalin ve rijit bir polimer olmasına rağmen neme karşı direnci ve hidrolitik kararlılığı düşüktür. Glisin ve laktatın oluşturduğu kopolimerler sentezlenmiş olup biyobozunur özellik taşırlar. PLA özellikle tıbbi amaçlarla ve ilaç endüstrisinde kullanılabilmesi yanında paketlenme endüstrilerinde de kullanım alanları vardır. Oldukça yaygın kullanım alanlarının olması, monomerinin düşük maliyetle ve fermantasyonla biyokütlelerden, kömürden, petrol ve doğal gazdan üretilmesinden kaynaklanır (Booma vd., 1994).

Biyobozunur sentetik polimerlere endüstride çeşitli uygulama alanlarına sahip olan polianhidritler, polikaprolakton (PCL) ve poliglikolik asit (PGA) ilave edilebilir. Polianhidritler aminoasitlerden türeyen biyobozunur polimerlerdir. Bu polimerlerde, anhidrit köprüsü malzemenin yüzeyinde çabucak hidrolizlenebilecek ve merkeze doğru ise daha yavaş hidrolizlenecek şekilde dizayn edilmişlerdir. Bu polimerlerin depolimerizasyonundaki temel mekanizma enzimatik depolimerizasyon ile değil bir kimyasal hidroliz yoluyla yüzeyin kaybı şeklinde oluşur. Diğer sentetik bir biyobozunur polimer olan PCL ise ϵ -kaprolaktonun halka açılması polimerizasyonu ile sentezlenen lineer alifatik poliesterdir. Bu polimerin mantarlar tarafından biyobozunması ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Düşük kristallik derecesine sahip PL filmlerinin de biyobozunur olduğu gösterilmiştir. PGA temel olarak ameliyat ipliği üretiminde kullanılan lineer alifatik

bir poliesterdir. Termoplastik bir polimer olan bu madde glikolidin kondenzasyon polimerizasyonu veya katalitik halka kapanması polimerizasyonu ile kimyasal olarak sentezlenmektedir. Glikolid ve laktidin oluşturduğu kopolimerler ticari olarak üretilmektedir ve bu polimerik malzemenin oldukça yüksek biyobozunur termoplastik özellikleri vardır. Bütün bu biyobozunur sentetik polimerlere, çeşitli fiziksel ve mekanik özellikleri yanında değişen biyobozunur karakterleri ile beraber poliesterler, polietilen oksit, poliüretanlar, polifosfazanlar ve polikarbonatlar ilave edilebilir (Booma vd., 1994).

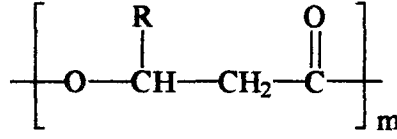
1.4. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Bütün organizmalar suda veya lipid ortamda çözünebilen monomerik moleküllerin polinükleotit, polisakkarit, polipeptit, poliizoprenoid ve polihidroksialkanoat (PHA) gibi polimerizasyon ürünlerini içerirler. Bu biyopolimerler 100 bin-1.5 milyon gibi geniş bir aralıkta oldukça yüksek moleküler ağırlıklara sahiptirler. Biyobozunur özelliklerinden dolayı oldukça ilgi toplayan bu polimerlerin kararlı bir çoğu veya türevleri plastik malzeme amaçlı endüstrilerde uygulama alanları bulmuşlardır.

Son yıllarda, plastik atıkların oluşturduğu çevre problemlerine bir çözüm olarak ortaya çıkan en önemli gelişmelerden birisi mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilen PHA olarak tanımlanan biyopoliesterlerin endüstriyel kullanıma sunulmasıdır (Anderson, Dawes, 1990; Brandl vd., 1990; Lee vd., 1991; Müller, Seebach, 1993; Brown, 1994; Poirier vd., 1995; Fuller, 1995; Braunegg vd., 1998). PHA ve türevleri, bugün sınırlı endüstriyel üretimi nedeniyle günlük kullanıma yaygın olarak girmemekle beraber biyobozunabilir ve biyoyumlu olmaları sebebiyle oldukça ilgi çekmişlerdir. Bu poliesterlerin petrol gibi gittikçe tükenen bir ham madde yerine yenilenebilir kaynaklardan elde edilen kimyasalların kullanılması ile üretilmesi ayrı bir stratejik önem de taşımaktadır. Ayrıca, PHA'ların ekonomik üretilmesini sağlayacak işlemlerin geliştirilmesi için pek çok ülke olağanüstü gayret sarfetmektedir.

Aşağıda kimyasal yapısı verilen (Şekil 1) PHA'lar ilk defa Lemoigne tarafından *Bacillus megaterium*'da gözlenmiş ve karakterize edilmişlerdir (Lemoigne, 1926). Günümüze kadar, PHA'lar ve daha çok polihidroksibutirat (PHB) hücre içi birer karbon ve enerji stoğu olarak çok çeşitli mikroorganizmada tanımlanmışlardır (Tablo 3) (Byrom, 1987; Brandl vd., 1990). Bu türden polimerlerin oluşumu sadece prokaryotik

organizmalarla sınırlı değildir ve ökaryotik bazı hücrelerin PHB ürettiği ile ilgili bilgiler de mevcuttur (Reusch, 1989; Fuller, 1995).



Şekil 1. Polihidroksialkanoatların genel kimyasal yapısı. R çeşitli zincir uzunluğunda *n*-alkil grubunu temsil etmektedir

- R= metil ise 3-hidroksibutirat, HB
- R= etil ise 3-hidroksivalerat, HV
- R= *n*-propil ise 3-hidroksikaproat, HC
- R= *n*-butil ise 3-hidroksiheptanoat, HH
- R= *n*-pentil ise 3-hidroksioktanoat, HO
- R= *n*-hekzil ise 3-hidroksinonanoat, HN
- R= *n*-heptil ise 3-hidroksidekanoat, HD
- R= *n*-oktil ise 3-hidroksiundekanoat, HUD
- R= *n*-nonil ise 3-hidroksidodekanoat, HDD

PHA'lar genellikle stresi içeren büyüme şartlarında hücre içi birer depo maddesi olarak oluşturulurlar. Böyle bir stres durumu aşırı miktarda bir karbon ve enerji kaynağı varlığında ve sınırlı besin durumunda sağlanabilir (Suzuki vd., 1987; Byrom, 1987; Lageveen vd., 1988; Brandl vd., 1990). Bu dengesiz büyüme şartlarından dolayı, metabolik oksidasyon işlemlerinden kaynaklanan PHA'ların suda çözünmeyen, kimyasal ve ozmotik olarak inert indirgenmiş eşdeğerleri üretilmiş ve depolanmış olur. PHB homopolimerinin ilk keşfinden sonra çamur ortamından izole edilen bazı mikroorganizmaların hidroksivalerat (HV) gibi birimlere de sahip kopolimerler içerdiği tespit edilmiştir (Wallen ve Rohwedder, 1974).

1.4.1. Polihidroksialkanoatların Genel Özellikleri

PHA'ların en geniş şekilde karakterize edilen üyesi olan PHB, D(-)-3-hidroksibutirik asidin bir alifatik lineer poliesteri olup termoplastik bir polimerdir (Anderson, Dawes, 1990; Brandl vd., 1990; Lee vd., 1991; Müller, Seebach, 1993; Fuller, 1995; Braunneg vd., 1998). Bu özelliği ile film ya da fiber haline getirilebileceği gibi değişik metodlarla da şekillendirilebilir ve dolayısıyla PHB hem sentetik hem de doğal

polimerlerin avantajlarını içerir. PHB'nin bir dezavantajı, bugünkü teknoloji ile endüstriyel anlamda üretim maliyetinin sentetik polimerlerinkinden daha yüksek olmasıdır. Bundan dolayı, günümüzde PHB'yi veya PHA sınıfı polimerleri endüstriyel miktarda genel bir plastik olarak üretmek pek uygun değildir. PHA'ların endüstriyel üretim teknolojilerinin geliştirilmesi ve uygun yenilenebilir kaynakların bulunması amacıyla çok çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunun en önemli sebebi PHB'nin petrol kaynaklı bir polimer olmamasıdır. Petrol kaynaklarının gittikçe tükendiği veya petrol fiyatlarının günden güne arttığı düşünüldüğünde PHB'nin en azından böyle bir dezavantajı taşımayacağı dikkat çekicidir.

Tablo 3. Hücre içi depo maddesi olarak PHA'ları ürettiği bilinen çeşitli mikroorganizmalar

Mikroorganizma cinsi	Maksimum PHA içeriği	PHA üretebilen substrat	Mikroorganizma cinsi	Maksimum PHA içeriği	PHA üretebilen substrat
<i>Acinetobacter</i>	<1	Glukoz	<i>Methylocystis</i>	70	Metan
<i>Alcaligenes</i>	96	Fruktoz	<i>Methylosinus</i>	25	Metan
<i>Aphanothece</i>	<1	SB	<i>Micrococcus</i>	28	Pepton/tripton
<i>Azopirillum</i>	75	Malat	<i>Microcoleus</i>	<1	SB
<i>Azotobacter</i>	73	Glukoz	<i>Microcystis</i>	TE	SB
<i>Bacillus</i>	25	Glukoz	<i>Moraxella</i>	TE	SB
<i>Beggiatoa</i>	57	Asetat	<i>Mycoplana</i>	TE	Metanol
<i>Beijeriackia</i>	38	Glukoz	<i>Nitrobacter</i>	TE	SB
<i>Caulobacter</i>	36	Glukoz	<i>Nitrococcus</i>	TE	SB
<i>Chloroflexus</i>	<1	Maya ekstrağı	<i>Nocardia</i>	14	Butan
<i>Chlorogloea</i>	10	Asetat	<i>Oceanospirillum</i>	TE	SB
<i>Chromatium</i>	20	Asetat	<i>Paracoccus</i>	TE	SB
<i>Chromobacterium</i>	37	Glukoz	<i>Photobacterium</i>	TE	SB
<i>Clostridium</i>	13	Tripton/pepton	<i>Pseudomonas</i>	67	Metanol
<i>Derxia</i>	26	Glukoz	<i>Rhizobium</i>	57	Mannitol
<i>Ectothiorhodospira</i>	TE	SB	<i>Rhodobacter</i>	80	Asetat
<i>Escherichia</i>	TE	Tripton/glukoz	<i>Rhodospirillum</i>	47	Asetat
<i>Gamphosphaeria</i>	TE	SB	<i>Sphaerotilus</i>	45	Glukoz/pepton
<i>Haemophilus</i>	TE	SB	<i>Spirillum</i>	40	Laktat
<i>Halobacterium</i>	38	Glukoz	<i>Spirulina</i>	6	CO ₂
<i>Hyphomicrobium</i>	TE	Metanol/glukoz	<i>Streptomyces</i>	4	Glukoz
<i>Lamprocystis</i>	TE	SB	<i>Synthrophomonas</i>	30	Krotonat
<i>Lampropedia</i>	TE	SB	<i>Thiobacillus</i>	TE	Glukoz

SB: substrat belirsiz, TE: tayin edilmedi

PHA'ları ilginç yapan ve gelecekte günlük hayata girebilecek potansiyel bir polimer olmasını sağlayabilecek iki önemli özelliği vardır. Çoğu sentetik polimerin sahip olmadığı bu özellikler biyoparçalanabilirlik (biyodegradasyon) ve biyouyumluluk (biyokompatibilite) tür (Anderson, Dawes, 1990; Brandl vd., 1990; Lee vd., 1991; Müller, Seebach, 1993; Braunegg vd., 1998). Bu biyoparçalanabilir polimerlerin üretilmesinin bir başka sebebi de gittikçe artan uzun ömürlü atık plastiklerin yarattığı çevre kirliliği problemine toplumların oldukça duyarlı olması ve pek çok yasal düzenlemelerin bunların kullanımlarını sınırlandırmasından kaynaklanmaktadır. Zira, 1995'li yıllarda çevreye bırakılan ve katı atık oluşturan sentetik plastikler yılda 25 milyon ton gibi çok büyük bir rakamı teşkil etmektedir. Günümüzde bu kirliliğin ne derece ürkütücü boyutta olduğu aşikârdır.

Sınırsız sayıda kullanım alanına sahip olan çevreci, parçalanabilir malzemelerin büyük bir kısmını PHB homopolimeri ve PHB kopolimerleri oluşturmaktadır. PHA'lar tamamen biyobozunurdurlar ve PHB veya kopolimerlerinden hazırlanan filmlerin çeşitli çevre ortamlarında karbondioksit, su ve enerjiye dönüştürüldüğü bilinmektedir. PHB homopolimer filmlerinin parçalanması 30°C'de ve toprakta 10 haftalık bir süreç gerektiriyorken PHB-co-HV kopolimerinin ise 2 haftada tamamen parçalandığı bildirilmiştir. Çeşitli *in vivo* çalışmalardan PHB'nin biyoparçalanmasının çevresel şartlar kadar polimerin karakterine de bağlı olduğu tespit edilmiştir (Inoue, Yoshie, 1992).

PHA'ların; termal, mekanik, piezoelektrik ve çözelti özellikleri oldukça ilginçtir ve bu özellikleri sentetik eşdeğerlerine göre bu polimerleri avantajlı yapar (Howells, 1982). PHB, D(-) konfigürasyonundaki bütün asimetrik karbon atomlarından dolayı %100 stereospesifik olup yüksek derecede kristallik gösterir. Bu kristal özellik %55-80 oranında olup polimer malzemeye nispeten sertlik kazandırır ve PHA'larda kristallik bu termal özellikleri etkiler. PHB veya diğer bir adla poli(3-hidroksibutirat) [P(3HB)]'nin camsı geçiş noktası 15 °C ve erime noktası ise yaklaşık 175°C'dir. Termal özellikleri monomerin türüne ve homo- ya da heteropolimer olmasına göre değişiklik göstermektedir ve bu polimerler kendi içerisinde karşılaştırıldığında polihidroksivaleratın, P(3HV) erime sıcaklığı P(3HB)'nin sahip olduğundan daha düşük olmak üzere 112°C olarak bildirilmiştir. P(3HB-co-3HV) kopolimeri durumunda ise hidroksibutirat içeriğine bağlı olarak erime sıcaklığı 175°C'den 150°C'ye kadar düşebilir. Uzun yan zincirleri içeren PHA'ların erime sıcaklıkları ise yukarıdaki değerlere göre oldukça düşük olup 35-65 °C aralığında değişir (Inoue, Yoshie, 1992). PHA'ların en ilgi çekici yanı, sentetik plastikler

olarak bilinen polipropilen (PP) ve polietilentereftalat ile bir çok benzerliklere sahip olmasıdır. PHB'nin erime noktası ve kristalite derecesi gibi bir takım fiziksel özellikleri PP ile benzer olması ile birlikte PHB, PP'ne göre daha sert ve daha kırılımandır (Tablo 4) (King, 1982).

Tablo 4. Polipropilen (PP) ve PHB'nin bazı fiziksel özellikleri açısından kıyaslanması

Özellik	PHB	PP
Kristal erime noktası (°C)	175	176
Camsı geçiş sıcaklığı, T_g (°C)	5-10	-15
Kristalite (%)	80	70
Molekül ağırlığı (Da)	$1-8 \times 10^5$	$2-7 \times 10^5$
Yoğunluk (g/cm^3)	1.250	0.905
Kırmaya karşı uzama (%)	6-8	400
Cam-kauçuk geçiş noktası (°C)	15	-10
UV direnci	İyi	Zayıf
Çözücü direnci	Zayıf	İyi
Elastiklik (%)	6	400
Oksijen geçirgenliği ($cm^3/m^2 \cdot atm \cdot d$)	45	1700
Biyobozunurluk	+	-

P(3HB)'nin nem direnci, piezoelektriklik ve optik saflık gibi bir çok faydalı özellikleri de vardır (Howells, 1982). Sentetik eşdeğerlerine göre PHB'nin bu sayısız avantajlarından birisi, PHB'nin optikçe aktif bir polimer olmasıdır. PHB çözeltisi veya filmi, içerisinden geçirilen polarizlenmiş ışığın yönünü değiştirebilmektedir. Bu nedenle bu polimer, optik izomerlerin kromatografik olarak birbirinden ayrılmasını sağlayabildiğinden bir kromatografik matriks olarak kullanılabilir. Fakat böyle bir işlemde ayrılacak izomerlerden birinin diğerine göre polimerin kiral merkezi ile daha güçlü etkileşebilir olması gerekmektedir.

PHB'nin doğal kemiğe benzer şekilde piezoelektrik özelliklere sahip olması da diğer bir önemli özelliğidir (Howells, 1982). Bir elektrik alanı etkisi altında PHB kristalleri bir yönde genişirken diğer yönlerde ise daralır. Ayrıca, bu maddeler bir baskı altında kaldıklarında kristaller boyunca bir elektrostatik potansiyel üretirler. Kemiğin elektriksel stimülasyon ile güçlendirilip tamir edilebileceği bilindiğinden PHB'den imal edilecek

kemik projesinin böyle doğal kemik içerisine konması ve daha sonra da bir elektrik akımı uygulanmasıyla kemiğin gelişimi stimüle edilebilecektir.

PHB'nin çok çeşitli uygulama alanları vardır. PHB'nin monomeri olan D-3-hidroksibutirat insan kanının normal bir bileşenidir. Dolayısıyla, PHB parçalandığında oluşabilecek bu monomer organizmaya sadece ılımlı bir cevap verdiğiinden biyouyumluluğu oldukça yüksektir. Bu özelliği ile PHB tıbbi tampon, vida, yara bezi, ameliyat ipliği ve toz halinde de tıbbi eldivenleri kayganlaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca zirai amaçlı da olmak üzere pek çok ilaç için biyobozunur bir taşıyıcı olarak, hijyenik ürünlerde, çocuk bezlerinin imalinde ve plastik torba ve film endüstrilerinde kullanım alanları söz konusudur.

1.4.2. Polihidroksialkanoatların Biyosentezi

B. megaterium'da keşfinden sonra PHB'nin hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakteriler tarafından bir depo maddesi olarak biriktirildiği tespit edilmiştir. PHA üreten mikroorganizmalar taksonomik olarak oldukça geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu organizmaların çoğu kuru hücre ağırlıklarının %30-80'i kadar PHA biriktirebilirler. Bu polimer düşük oranlarda olsa bile siyanobakteriler de dahil olmak üzere fototrofik, kemotrofik, fakültatif, aerobik ve anaerobik bakteriler tarafından hücre içi bir enerji kaynağı ve karbon depolama ürünü olarak üretilirler ve hücrenin sitoplazmasında granül olarak biriktirilirler (Tablo 3) (Senior, Dawes, 1971; Oeding, Schlegel, 1973; Brandl vd., 1990).

PHA'ların bu mikroorganizmalar tarafından sentezlenmesi bir ana karbon ve enerji kaynağı mevcudiyetinde sınırlı beslenme şartları altında olur. PHA'ların düşük çözünürlükte olması ve osmotik basınçta bir artışa sebep olmaması bunların ideal bir depo bileşiği olmalarına imkân sağlar. Şartlar dikkatli bir şekilde kontrol edildiğinde pek çok mikroorganizma hücre kuru ağırlığının büyük bir kısmını oluşturacak oranlarda PHB üretilir. *Escherichia coli* ve *Ralstonia eutropha*'nın hücre kuru ağırlığının %90'ı kadar oldukça büyük miktarda PHB'yi biriktirebileceği ve PHA'ların bu organizmalar için hücre membranlarının yapısal bir bileşeni olduğu bilinmektedir. Yine *Pseudomonas oleovorans* ve *Rhodospirillum rubrum* tarafından yüksek oranlarda biriktirilen PHB'nin varlığı elektron mikroskopuyla tespit edilmiştir (Şekil 2).

Çevre şartları ve bakterilerin fizyolojik yetenekleri genellikle PHA'ların kantitatif oluşumunu kontrol eder. Farklı besinlerin bol olmayışı ya da düşük konsantrasyonda olması PHA oluşumunu artırır ya da azaltır. Deneysel çalışmalarda daima azot sınırlı şartlar tercih edilir. Çünkü böyle bir ortam, bakterinin büyüme ortamında oluşan amonyanın ihmal edilmesi ile kolaylıkla sağlanabilir. Bütün bunlar hesaba katıldığında PHA'nın oluşumu bakteriyel popülasyonun besinsel durumu hakkında bir işaret olarak dikkate alınabilir. *Pseudomonas* gibi organizmalar tarafından PHA'nın oluşumu üzerine sınırlı konsantrasyondaki kalsiyum, kobalt, bakır, molibden, sodyum ve çinkonun herhangi bir etkisinin olmadığı bilinmektedir.

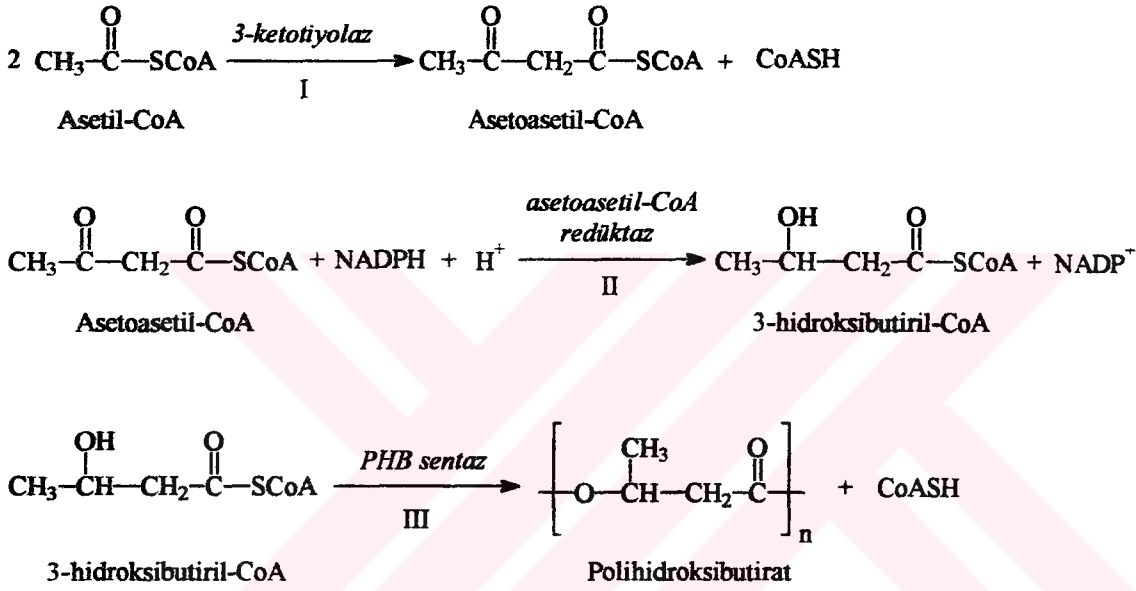


Şekil 2. Hücrenin %70-90'ını dolduran granül PHA birikimini gösteren *R. rubrum*'un elektron mikrografi (Fuller, 1995)

Organizmanın açlığı durumunda hücre içi PHA'nın enerji ve karbon kaynağı olarak bulunmasının, mikroorganizmanın yaşamsal rolü açısından osmotik basınç, uv etkisi gibi bazı çevresel etkilerden daha önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Genellikle PHA biriktiren bakterilerin biriktirmeyenlerden daha fazla yaşama şansı olduğu kaydedilmiştir.

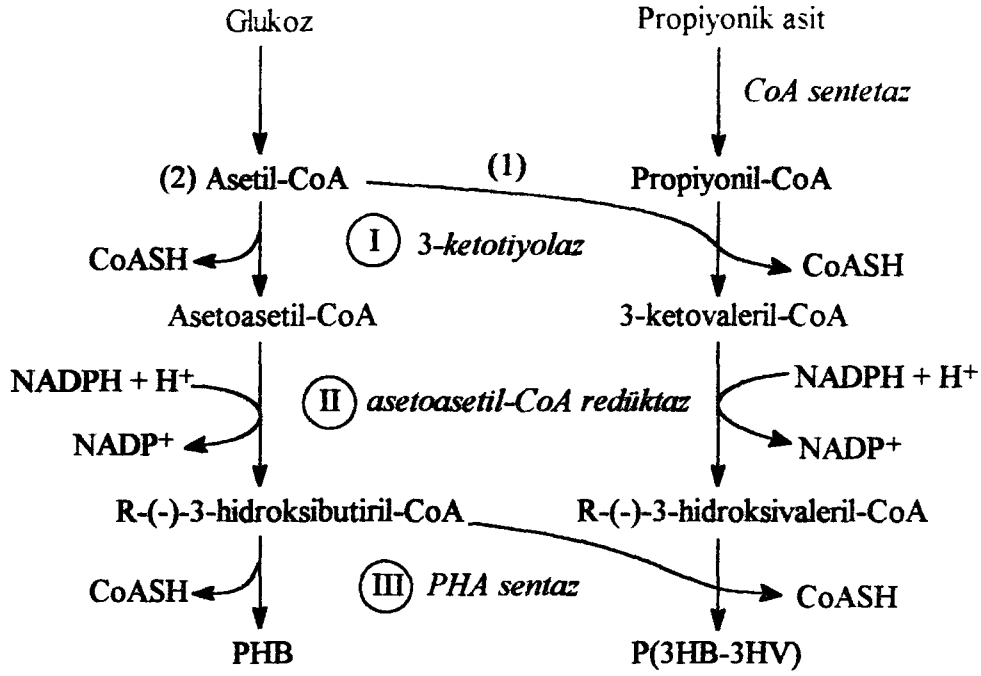
PHA'lar içerisinde en yaygın çalışılan ve en detaylı karakterize edileni PHB'dir. PHB biyosentezi konusunda en geniş bilgi *R. eutropha*'da elde edilmiştir. Bu bakteride, PHB asetil-CoA'dan üç farklı enzim ile basamaklı bir şekilde katalizlenen bir işlemle sentezlenir (Şekil 3). Bu yoldaki ilk enzim 3-ketotiyolaz (asetil-CoA açıl transferaz, EC 2.3.1.9) iki asetil-CoA molekülünün asetoasetil-CoA oluşturmak üzere dönüşümlü kondenzasyonunu katalizler. İkinci enzim olan asetoasetil-CoA redüktaz (EC 1.1.1.36) ise oluşan asetoasetil-CoA molekülünü 3-hidroksibutiril-CoA'ya indirger. Bu molekül takiben PHB oluşturmak üzere PHB sentazın etkisiyle polimerleştirilir (Poirier vd., 1995). Böyle

bir işlem ile oluşturulan PHA genellikle 10^3 - 10^4 monomerden oluşan bir polimer şeklinde üretilir ve 0.2-0.5 μm çapında granüller halinde bulunur. *R. eutropha*'nın besin ortamı glukoz gibi bir karbon kaynağının aşırı olduğu ancak azot ve fosfat gibi gerekli bir besin kaynağının sınırlı olduğu ortamda büyütüldüğünde PHB granülleri hücre kuru ağırlığının yaklaşık %80'ini doldurabilir. Bu şartlar altında, PHB sentezi bir karbon stoğu olarak görev yapar. Büyüme sınırlı şartları kaldırıldığında ise PHB asetil-CoA'ya katabolize edilir (Anderson, Dawes, 1990).



Şekil 3. *R. eutropha*'da asetil-CoA'dan PHB sentezindeki reaksiyon basamakları

R. eutropha'da farklı karbon sayılı monomerler üzerinden çeşitli PHA'lar üretilmiştir. Bu monomerlerin polimerdeki oranı büyüme ortamına ilave edilen karbon kaynaklarının türüne ve bağlı miktarına bağlı olarak değişmiştir. Mesela glukoz içeren büyüme ortamına propiyonik veya valerik asit ilavesi 3-hidroksibutirat ve 3-hidroksivaleratın oluşturduğu gelişigüzel bir kopolimerin oluşumu ile sonuçlanmıştır (Brandl vd., 1989; Fuller, 1995). Propiyonik asitten oluşan kopolimerin sentezi mekanizması Şekil 4'de verilmiştir.



Şekil 4. *R. eutropha*'da polihidroksialkanoatların sentez yolu

1.4.3. Polihidroksialkanoatların Biyobozunması

PHA'ların ticari olarak ilgi çeken en önemli özelliklerinden biri doğal ortamlarda bozunur olmalarıdır ve bu özellik sadece mikroorganizmaların enzim aktivitelerinden etkilenir. Biyobozunmayı ve işlemin enzimolojisini etkileyen çevre faktörleri konusunda çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. PHA'lar bu polimerlerin üretildiği türlerdeki ya intraselüler depolimerazlar tarafından hücre içinde veya ekstraselüler depolimerazlar tarafından hücre dışında parçalanabilirler. İntraselüler PHA depolimerazlar ekstraselüler PHA'ları parçalayamazlar ve ekstraselüler depolimerazların da intraselüler PHA parçalama yetenekleri yoktur. Bu her iki PHA'ın fiziksel yapılarındaki farklılıktan kaynaklanır (Hocking, Marchessault, 1994; Amor vd., 1991).

İlk PHA-parçalayan mikroorganizmalar yaklaşık 30 yıl önce *Alcaligenes*, *Pseudomonas* ve *Comamonas*'tan izole edilmişlerdir (Delafield vd., 1965). PHB homopolimeri ve PHB-co-PHV kopolimeri hem aerobik ve hem de anaerobik ortamlardaki bazı bakterilerin ekstraselüler enzimleri tarafından parçalanırlar. Dolayısıyla bu bakteriler, tek karbon kaynağı olarak PHB ile büyüme yeteneğine sahiptirler (Luzier, 1992). PHB ve bu polimerden türeyen oligomerleri depolimerize etme yeteneğine sahip olan ekstraselüler

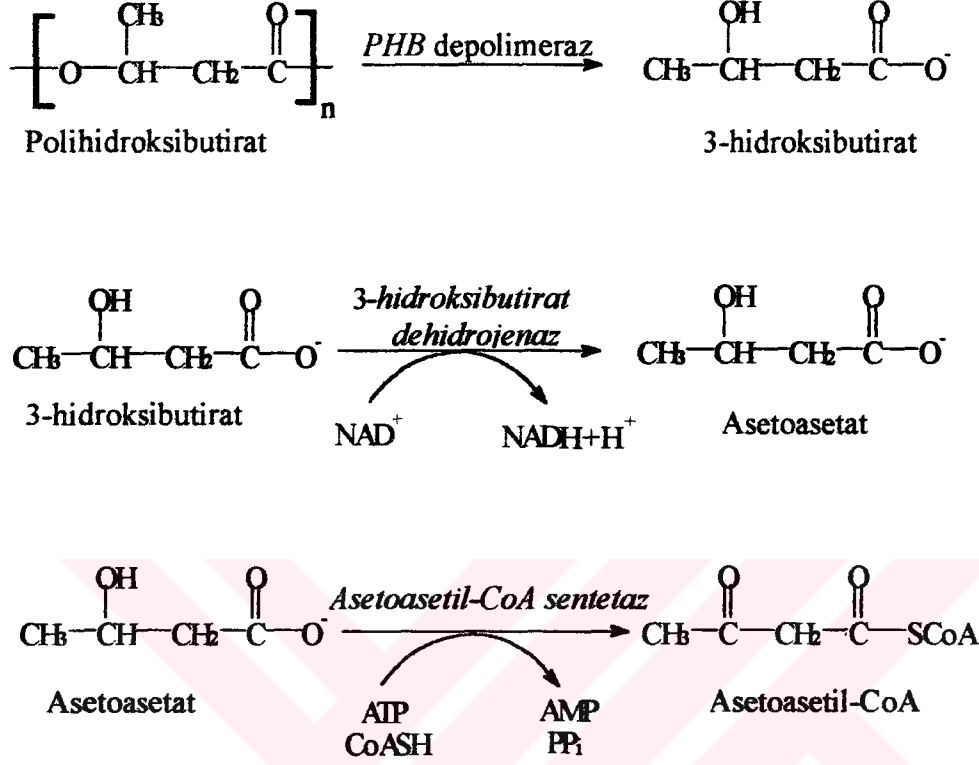
enzimler birkaç organizmada bulunmuş olmasına rağmen pek çok çalışma *A. faecalis* ve *P. lemoignei* tarafından salıverilen ekstraselüler depolimeraz üzerinde yoğunlaşmıştır ve elektroforetik homojenlikte bu enzim saflaştırılmıştır (Tanio vd., 1982). Enzimin oligomerleri de parçaladığı gözlenmiş olmasına rağmen oligomerler bu enzim için zayıf substratlar olarak değerlendirilmiştir. Depolimerizasyon sırasında salıverilen hidroksibutirat monomerlerinin tayini ve oligomerlerin hidroliz sırasında ester bağlarındaki azalma polimer zincirin serbest hidroksil ucundan her defasında bir dimer şeklinde ayrıldığı sonucunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte daha detaylı çalışmalar depolimerazın substrat parçalayan bir bölgeden ayrı bir hidrofobik bölgeye sahip bir endo-tip hidrolaz olduğunu göstermiştir.

PHB homo- ve heteropolimerlerinden hazırlanan filmlerin çeşitli ortamlarda hidrolitik ve enzimatik parçalanmasının polimerlerin kristallik derecesine bağlı olduğunu ortaya koymuştur. Belirli kristallik derecesine sahip polimerler durumunda parçalayıcı enzimlerin polimer zincirlerine daha kolay etki edebildiği tespit edilmiştir (Doi, vd, 1990; Nakamura vd., 1991; Nishida, Tokiwa, 1993). Yine PHB ve çeşitli oranlarda hazırlanan PHB-co-HV kopolimerlerinin ev atıklarında parçalanması incelenmiş ve yaklaşık 20 hafta sonra bu polimerlerde önemli düzeylerde kütle kaybı gözlenmiştir. Bu sistemlerdeki parçalanmanın önemli oranda ortamdaki mikrobiyal popülasyona, ekstraselüler enzimlerin özgünlüğüne ve sıcaklığa bağlı olduğu bildirilmiştir (Nishida, Tokiwa, 1993; Mergaert vd., 1994). Benzer sonuçlar aktive edilmiş çamurda da gözlenmiş ve polimer parçalanma işleminin pH-bağımlı olduğu tespit edilmiştir (Briese vd., 1994).

PHA'ların intraselüler parçalanması sentezinden farklı bir mekanizma ve üç farklı enzim tarafından katalizlenen yollarla gerçekleşmektedir. *A. beijerickii*'de PHB granülüne bağlı bir depolimeraz D(-)3-hidroksibutirik asidin hidrolizini sağlar ve bu moleküller de bir NAD-spesifik dehidrojenaz ile asetoasetata yükseltgenirler. Bir asetat-süksinil-CoA transferaz daha sonra asetoasetat moleküllerinin süksinil-CoA ile reaksiyonunu katalizleyerek asetoasetil-CoA'nın oluşumunu sağlar (Senior, Dawes, 1973) (Şekil 5).

Biyolojik parçalanmanın hızı çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Bunlar söz konusu çevredeki mikrobiyal popülasyon, sıcaklık ve parçalanacak plastik materyalin özellikleri şeklinde sıralanabilir. Aerobik şartlarda PHA'nın parçalanmasındaki son ürünler CO₂ ve H₂O iken anaerobik şartlarda ki son parçalanma ürünü ise metandır. Farklı ortamlarda P(3HB) ve P(3HB-co-3HV) kopolimerinin sırayla anaerobik çamurda, toprakta

ve deniz suyunda tamamen parçalanma sürelerinin 60, 75, 350 hafta olduğu görülmüştür (Brandl vd., 1990).



Şekil 5. *R. eutropha*'da PHB parçalanmasındaki reaksiyon basamakları

Değişik kompozisyon, stereokimya ve molekül ağırlığındaki PHA'lar değişik biyolojik parçalanma eğilimleri gösterirler. Genellikle başlangıç molekül ağırlığının, polimerin biyolojik parçalanması üzerine çok önemli bir etkiye sahip olmadığı ve yüksek molekül ağırlıklı bir PHB homopolimerinin düşük molekül ağırlıklı bir polimer kadar çabuk parçalandığı bilinmektedir. Ayrıca depolimeraz enziminin stereoseçiciliğinden dolayı polimeri oluşturan birimlerin, yapı içerisinde farklı bir konfigürasyonda bulunması da parçalanmayı engellemektedir. P(3HB-co-3HV) kopolimeri, polimerdeki 3HV miktarından bağımsız olarak parçalanır. Yapılan çalışmalar 4HB monomer birimi içeren kopolimerlerin bütün şartlar altında yapılan testlerde PHB ya da 3HB-co-3HV kopolimerlerine göre çok daha çabuk parçalandığını göstermiştir. Aktive edilmiş çamurda, 30 °C'de 3HB-co-%94 HB filminin 14 günde tamamıyla parçalandığı gözlenmiştir. Bir başka çalışmada ise 3HB-co-%17 4HB filminin ise 2 haftada tamamıyla parçalandığı

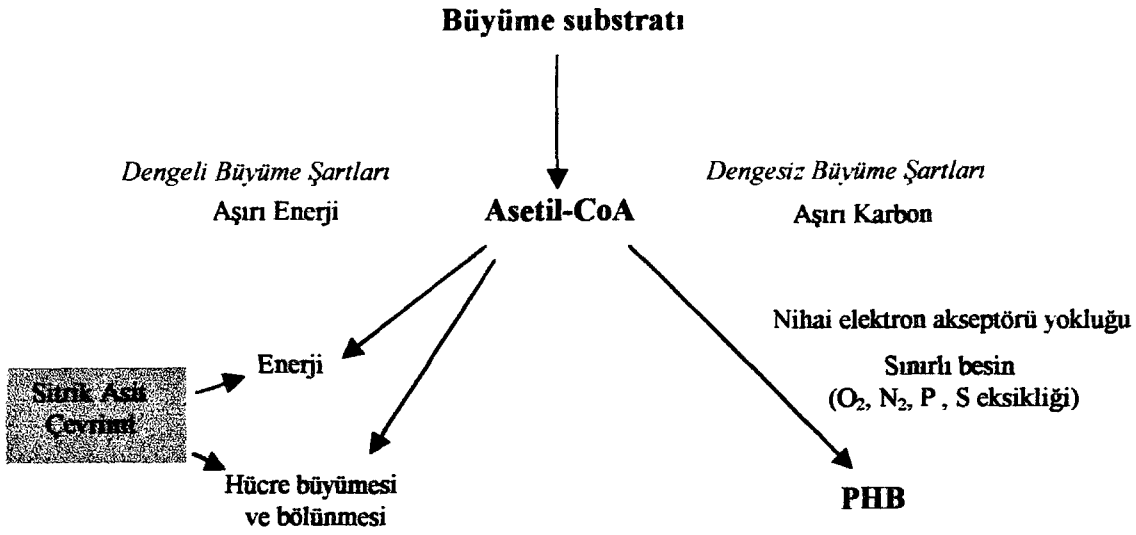
ancak aydınlatılarda PHB'nin tamamen parçalanmasının ise 10 haftadan fazla sürdüğü tespit edilmiştir (Kunioka vd., 1989; Doi vd., 1989).

1.4.4. Polihidroksialkanoat Metabolizmasının Düzenlenmesi (Regülasyonu)

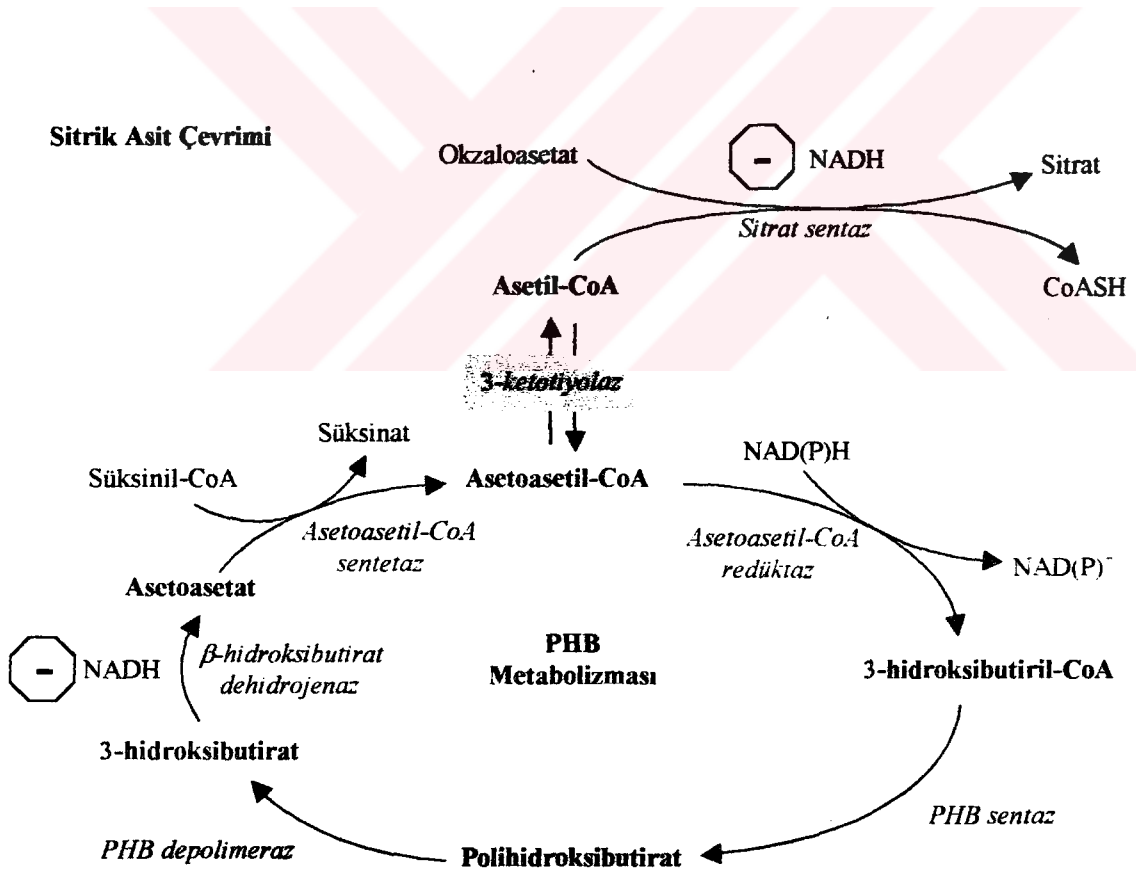
Kinetik veriler PHB sentezindeki ilk enzim olan 3-ketotiyolazın PHB metabolizmasının regülasyonunda önemli bir rol oynadığını ve hem PHB biyosentezi hem de PHB parçalanmasında giriş-çıkış noktası olarak görev yaptığını göstermiştir. *R. eutropha* ve *A. beijerinckii* üzerinde yapılan çalışmalar PHB yolunun sınırlı oksijen ve azot şartlarına bağlı olarak regüle edildiğini göstermiştir. Sınırlı çevre şartları altında, PHB genellikle kuru hücre ağırlığının %80'lik kadar bir kısmını oluşturabilir. Sınırlı şartlar kaldırıldığında ise PHB miktarı indüklenmemiş düzeylerine yaklaşır. Pek çok bakteride PHB biyosentez ve parçalanma işlemleri genelde aynı veya benzer mekanizmalarla gerçekleşirler (Senior, Dawes, 1971; Senior, Dawes, 1973; Jackson, Dawes, 1976).

PHA'lar pek çok mikroorganizmada hücre büyümesi sırasında düşük düzeylerde üretilir ve parçalanırlar. Bununla birlikte, bir aerob durumunda düşük oksijen gibi ya da protein sentezi sınırlandırılacak oranda ortamdaki azot ve kükürt azlığı gibi metabolik stres sırasında hücreler ortamda mevcut olan aşırı karbonu PHA'ya dönüştürürler. Enerji üreten ve büyümede etkili olan sitrik asit çevrimi işlemlerinin PHA sentezine doğru kayması mekanizmaları oldukça sıkı bir şekilde regüle edilir (Anderson, Dawes, 1990) (Şekil 6).

Dengeli bir büyüme sırasında *R. eutropha* Entner-Doudoroff yoluyla karbohidratları piruvata kadar katabolize eder ve takiben piruvat molekülleri dehidrojenasyonla asetil-CoA'ya dönüştürülür (Anderson, Dawes, 1990, Fuller, 1995). Büyüme sırasında, asetil-CoA sitrat sentaz reaksiyonuyla koenzim A salıvererek sitrik asit çevrimine girer (Şekil 7) ve daha sonra GTP halinde enerji üreterek karbondioksite kadar yükseltgenir. Dengeli büyüme şartları altında asetil-CoA'nın konsantrasyonu düşük ve aynı anda serbest CoASH'ın konsantrasyonu ise yüksek oranda bulunacaktır. Yüksek CoASH konsantrasyonu da 3-ketotiyolaz aktivitesinin inhibisyonunu sağlar (Doi vd., 1988) ve dolayısıyla PHB oluşmaz. Bu işlemler sırasında asetil-CoA molekülleri yükseltgenirken indirgenmiş eşdeğerler olan NADH, NADPH ve FADH₂ yanında biyosentetik ön moleküller olan 2-oksoglutarat ve oksaloasetat üretilir (Pranamuda vd., 1995).



Şekil 6. Bakterilerde enerji üretimi, hücre büyümesi ve PHA üretiminin regülasyonu ve kontrolü



Şekil 7. PHA polimerizasyon ve depolimerizasyon reaksiyonları için önerilen regülatör mekanizmalar

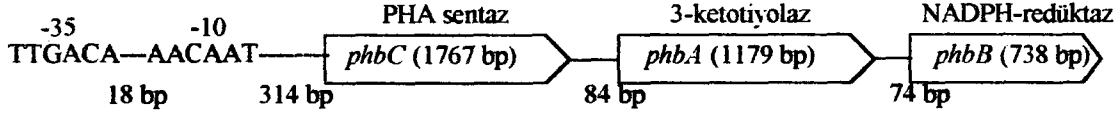
Okzaloasetatin doğrudan aminasyonu ve transaminasyonu amino asitlerin sentezine yol açar ki bu moleküller polipeptit zincirleri halinde proteinleri oluştururlar. Sitrik asit çevrimi ile üretilen indirgenmiş nükleotitlerin elektron transfer (solunum) zincirinde yükseltgenmesi ilave ATP moleküllerinin üretimini sağlar ve böylece endergonik protein sentezi için destek enerji sağlanmış olur. Dolayısıyla asetil-CoA'nın sitrik asit çevrimine girme hızı azot, fosfor ve diğer elementlerin kaynaklarının varlığına ve çevrenin yükseltgeyici potansiyeline bağlıdır.

Hücre çoğalması sırasında asetil-CoA'nın kondenzasyonundan PHB'nin sentezi çok az miktarlarda da gerçekleşmesine rağmen hücreler karbon kaynağının sınırlandırılmasından ziyade büyümeyi sınırlayıcı şartlar altında bırakıldığında PHB sentez hızı oldukça artar. *R. eutropha*'da azot, fosfor ve oksijen eksikliği gibi protein sentezini durduracak şartlar söz konusu olduğunda yüksek seviyelerde NADH ve NADPH üretilir (Schlegel vd., 1961; Byrom, 1987). Eğer büyüme oksijen-sınırlı ise, nikotinamid nükleotitleri yükseltgenemez. NADH ve NADPH konsantrasyonunda bir artış hem sitrat sentaz ve hem de izositrat dehidrojenazın aktivitelerinin ve dolayısıyla da sitrik asit çevriminin inhibisyonu ile sonuçlanır. Böylece, CoASH'ın konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak asetil-CoA'nın konsantrasyonu artacaktır. Bu şartlar altında, ketotiyolazın inhibisyonu ortadan kalkar ve PHB sentezi devam eder. Böylece oluşan asetil-CoA molekülleri PHB biyosentezi için yönlendirilmiş ve büyük miktarlarda polimer biriktirilmiş olur (Dawes, Senior, 1973). Asetil-CoA yanında valerat gibi diğer karbon kaynakları varlığında polimer zincirine hidroksibutirat birimleri yanında bu monomerler de katılmış olur (Braunegg, 1998).

1.4.5. Polihidroksialkanoat Biyosentezinin Moleküler Analizi

Çeşitli bakterilerde PHA metabolizmasında rol oynayan yirmibeşin üzerinde gen klonlanmıştır (Steinbüchel vd., 1992). Bu genler 3-ketotiyolaz (*phaA*), asetoasetil-CoA redüktaz (*phaB*), PHA sentaz (*phaC*), PHA depolimeraz (*phaZ*) ve granüle bağlı bir proteini kodlayan bir gen (GA14) dir (Steinbüchel vd., 1992; Pieper-Fürst vd., 1994). *R. eutropha*'da *phaA*, *phaB* ve *phaC* yapısal genleri promotör ve operatörün bir kombinasyonu halinde bir operonun parçasıdır (Şekil 8) (Peoples, Sinskey, 1989a; Peoples, Sinskey, 1989b; Steinbüchel vd., 1992) ve bu üç enzim sentaz-tiyolaz-redüktaz düzeninde kodlanırlar. Bu genlerin *E. coli*'de ekspresyonu ile *R. eutropha*'ya benzer hacim

ve görünümde ve %80 kuru ağırlıkta PHB granüllerinin sentezi gerçekleşmiştir (Schubert vd., 1988; Slater vd., 1988; Peoples, Sinskey, 1989a; Peoples, Sinskey, 1989b).



Şekil 8. *R. eutropha*'da polihidroksialkanoat biyosentezi operonunun organizasyonu

P. lemoignei ve *A. faecalis*'in ekstraselüler PHB depolimeraz sistemleri saflaştırılmış, karakterize edilmiş ve depolimeraz geni klonlanarak dizi analizi yapılmıştır (Tanio vd., 1982, Saito vd., 1989, Saito vd., 1993, Müller, Jendrossek, 1993; Jendrossek vd., 1995b). *A. faecalis*'de PHB parçalanmasında depolimeraz enzimin oluşturduğu temel ürün 3-hidroksibutiratın dimerik ve trimerik esterleridir. *P. lemoignei*'den beş depolimeraz geni tespit edilmiş, klonlanmış ve dizi analizi yapılmıştır. Bu enzimlerin PHB yanında PHV homopolimerinin ve PHB-co-HV kopolimerinin parçalanmasından sorumlu olduğu belirlenmiştir (Müller, Jendrossek, 1993; Jendrossek vd., 1995).

PHB biyosentezindeki her bir basamağı katalizleyen enzimler çeşitli bakterilerde detaylı çalışılmışlardır. 3-ketotiyolaz PHB sentez yeteneğine sahip değişik bakterilerden saflaştırılmıştır (Oeding, Schlegel, 1973; Senior, Dawes, 1973; Nishimura vd., 1978; Haywood vd., 1990). PHA biyosentezindeki ilk enzim olan 3-ketotiyolaz anahtar regülatör molekül olarak koenzim A ile birlikte *R. eutropha*'da PHB biyosentezini kontrol eder (Oeding, Schlegel, 1973). *R. eutropha*, *Zooglea ramigera* ve *Bradyrhizobium japonicum*'da yapılan çalışmalarda temel enzimden farklı substrat özgünlüğü olan ikinci bir 3-ketotiyolazın varlığı tespit edilmiştir (Suzuki vd., 1987). *R. eutropha*'da bu izoenzimler 3-ketotiyolaz A ve B olarak tanımlanmışlardır. 3-ketotiyolaz A, sadece dört veya beş karbonlu 3-ketoasil-CoA'lar durumunda aktiftir ve sadece *R. eutropha*'da PHA sentezinden sorumludur ki bu organizma beş karbon atomundan daha fazla hidroksiasit tekrarlayan birimli PHA'ları sentezleyemez. 3-ketotiyolaz B ise daha geniş bir substrat özgünlüğüne sahiptir ve dörtten on karbona kadar 3-ketoasil-CoA'ları kullanır. Ayrıca bu izoenzimin PHA üretilmesi dışında diğer bir fonksiyonunun da olduğu bildirilmektedir (Haywood vd., 1988). Asetil-CoA-üreten substratlar varlığında sınırlı olmayan büyüme sırasında sitrik asit çevrimi ile salıverilen büyük miktarlarda koenzim A'nın *R. eutropha*'da

PHB seviyelerinin az olmasına sebep olduğu görülmüş ve bunun, 3-ketotiyolazın katalizlediği kondenzasyon reaksiyonunun serbest koenzim A ile büyük oranda inhibe edildiği sonucuna varılmıştır.

PHB sentezi reaksiyonunun ikinci basamağını katalizleyen asetoasetil-CoA redüktaz asetoasetil CoA'yı D(-)-3-hidroksibutiril CoA 'ya indirger. *R. eutropha* ve *Z. ramigera*'da iki farklı asetoasetil-CoA redüktaz bulunmuştur. Bu enzimler hem substrat ve hem de koenzim özgünlükleri açısından farklı özellikler taşımaktadırlar. *R. eutropha*'da yapılan çalışmalar asetoasetil-CoA redüktazın bu katalizleme işleminde elektron salıcı olarak NADH ya da NADPH kullandığı tespit edilmiştir. Ancak sadece NADPH-bağımlı redüktazın PHB biyosentezine katıldığı bulunmuştur (Saito vd., 1977; Haywood vd., 1988). NADPH-bağımlı redüktaz dört-, beş- veya altı-karbonlu 3-ketoaçil-CoA'ların sadece R hidroksiaçil-CoA izomerlerine dönüşümlü indirgenmesini katalizler. NADH-bağımlı redüktaz ise hem R ve S substratların asetoasetil-CoA'ya oksidasyonunu etkilerken hem de ters yöndeki indirgenme reaksiyonu ile sadece D-3-hidroksibutiril-CoA üretir. NADPH-bağımlı redüktaz ile yapılan çalışmalarla 3-ketoaçil-CoA'nın indirgenmesinin PHA sentezinde hız tayin basamağı olabileceği önerilmiştir (Doi vd., 1992).

PHA biyosentetik yolunun anahtar enzimi olan PHA sentazlar pek çok bakteride moleküler düzeyde klonlanmış ve çalışılmışlardır. Bu enzim PHA sentezinde sadece hız tayin basamağını katalizlemekle kalmaz aynı zamanda bakterilerde üretilen PHA'nın bileşiminin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Primer dizileri ve substrat ilgileri dikkate alınarak üç PHA sentaz tanımlanmıştır (Steinbüchel vd., 1992). *R. eutropha*'da bulunan Tip I bakteriyel sentazlar kısa zincirli PHA'ları sentezlerler. *P. oleovorans* ve *P. putida*'da gibi bakterilerde bulunan Tip II sentazlar ise orta zincirli PHA'ları sentezlerler. Tip III PHA sentazlar ise *Chromatium vinosum* ve *Thiocapsa violacea* gibi bakterilerde bulunurlar ve kısa zincirli PHA'ları üretirler. Bu bakterilerde PHA sentezi ilave genleri içerir (Steinbüchel vd., 1992).

Değişik tiplerde biyoparçalanabilir plastiklerin üretimini sağlayan bir enzim olması sebebiyle PHB sentaz enzimi oldukça ilgi çekmektedir. PHA sentazın ve katalizlediği reaksiyonun detayı hakkında bilgi kararlı bir halde saflaştırılmasındaki güçlüklerden dolayı ancak *R. eutropha* PHA sentaz geninin *E. coli*'de ekspresyonu ve saflaştırılması ile gerçekleştirilmiştir (Gerngross vd., 1994). Bu genin *in vitro* mutajenezi ve takiben de sentaz aktivitesi tayini ile çeşitli sentazlar arasında korunmuş olan iki sisteinden sadece birinin enzim aktivitesi için gerekli olduğu sonucunu ortaya çıkmıştır. *R. eutropha*'da PHA

sentaz ile ilgili çalışmalarda enzimin D(-)3-hidroksiaçil-CoA'ya özgün olduğu bulunmuştur (Haywood vd., 1989). PHA sentaz 3-hidroksi, 4-hidroksi ve 5-hidroksialkanoatların polimerleşmesini sağlayan bir enzimdir (Haywood vd., 1989; Valentin vd., 1992). Bu enzim iki formda izole edilmiştir ve çözünebilir olan form hücrenin sınırlandırılmamış büyümesinde baskındır ve PHB-granüllerine bağlı diğer form ise PHB üretilebilen şartlarda baskındır (Haywood vd., 1989). PHB sentazın organizmadaki miktarı polimerin moleküler ağırlığının kontrolünde ve farklı birimleri içermesinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Sim vd., 1997).

1.4.6. Polihidroksialkanoat Bozunmasının Moleküler Analizi

Ekstraselüler PHA depolimerazlar pek çok bakteriden saflaştırılmış ve karakterize edilmişlerdir (Jendrossek vd., 1996). Günümüze kadar test edilen PHA depolimerazlar çok çeşitli ortak karakterleri paylaşırlar. Bunlar; i) pH, sıcaklık ve iyonik güç gibi çeşitli çevre faktörleri altında kararlılıkları oldukça yüksektir, ii) moleküler ağırlıkları 100 kDa dan daha azdır ve genellikle tek bir polipeptit zincirinden oluşurlar, iii) PHA depolimerazlar nötral pH'da DEAE gibi anyon değiştiricilere bağlanamazlar ve daha çok hidrofobik matrikslere karşı ilgileri yüksektir, iv) optimum pH değerleri 7.5-9.8 aralığında değişir ancak bazı *Pseudomonas* depolimerazları için daha asidik bir pH gerekir, v) pek çok depolimeraz aktif bölgedeki serin birimlerine bağlanabilen diizopropilflorofosfat gibi serin hidrolaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilir. Ancak bazı bakterilerde birden fazla depolimeraz olduğundan biyokimyasal özellikleri değişkenlik gösterir.

PHB depolimeraz, granül ve amorf PHB'nin 3-hidroksibutirik aside bozunmasını dimerler halinde gerçekleştiren bir enzimdir. Ancak *R. eutropha*'da doğrudan 3-hidroksibutirik asit oluşur. Diğer mikroorganizmalarda, dimerler monomerlere bir dimer hidrolaz aracılığıyla parçalanırlar. Depolimeraz *R. eutropha*, *A. faecalis*, *B. megaterium* ve *R. rubrum*'dan izole edilebilmiştir (Merrick, Yu, 1966; Gavard vd., 1967; Tanio vd., 1982). 3-hidroksibutirik asidin asetoasetata oksidasyonunu katalizleyen 3-hidroksibutirik asit dehidrojenaz *R. eutropha*, *A. beijerinckii* ve *Z. ramigera*'dan izole edilmiştir ve bu enzimler optimum pH değerleri, inhibitörler ve 3-hidroksibutirik asit ile bulunan K_M değerleri açısından oldukça benzerdirler. Bütün bu enzimler durumunda NAD^+ bir kofaktör olarak rol oynar (Senior, Dawes, 1973). Asetoasetatın koenzim A ile esterleşmesi işlemi için iki farklı mekanizma önerilmiştir. *R. eutropha* ve *A. beijerinckii*'de bu işlemde

sorumlu enzim 3-ketoasit-CoA transferazdır ve koenzim A birimleri süksinil-CoA ile sağlanır (Senior, Dawes, 1973). *Z. ramigera*'da ise aynı basamak bir aseasetil-CoA sentaz tarafından katalizlenir ve ATP gerektirir (Fukui vd., 1987).

Son on yıl içerisinde çeşitli bakteriyel PHA depolimeraz geni klonlanmış ve analiz edilmiştir (Tablo 5). *Streptomyces* hariç diğerleri Gram-negatif bakterilerden elde edilmiştir. Bunlardan pek çoğu kısa zincirli PHA'lara karşı özgünlüğü olan depolimerazlardır. Ancak *P. fluorescens* depolimeraz geni orta uzunluktaki PHA zincirlerini parçalayan tek gendir (Saito vd., 1989; Jendrossek vd., 1995a; Jendrossek vd., 1993; Schirmer, Jendrossek, 1994; Soliday vd., 1984; Klingbeil vd., 1996).

Tablo 5. Mikrobiyal PHA depolimeraz genlerinin karakterleri

Analiz edilen suş	Klonlanan gen	Uzunluğu (bp)	Kodlanan protein	Proteinin molekül kütlesi (M_r)
<i>A. faecalis</i> T1	<i>phaZ_{Afa}</i>	1464	PHB depolimeraz	47000
<i>Comamonas</i> sp.	<i>phaZ1_{Csp}</i>	1542	PHB depolimeraz	50100
<i>P. lemoignei</i>	<i>phaZ1_{Ple}</i>	1242	PHB depolimeraz C	39500
<i>P. fluorescens</i> GK13	<i>phaZ_{Pfl}</i>	837	PHO depolimeraz	26600
<i>Streptomyces</i> sp.	<i>phaZ_{Sax}</i>	1467	PHB depolimeraz	47900
<i>Fusarium solani</i>	<i>phaZ_{Fso}</i>	705	PCL-depolimeraz	20634

P. fluorescens GK13'dan izole edilen PHO depolimeraz saflaştırılan ve detaylı olarak karakterize edilen orta zincir uzunluğundaki PHA'ları parçalayan tek depolimerazdır (Schirmer vd., 1993). Enzim ayrıca yağ asidi grubunda altı veya daha fazla karbon uzunluğuna sahip *p*-nitrofenilaçil esterleri gibi sentetik esterler için de özgündür. PHO depolimeraz iki benzer altbirimden oluşur ve her biri 25 kDa olan molekül kütlesine sahiptir. Enzim ditiyoeritritol veya EDTA ile inhibe edilmez ve dolayısıyla önemli disülfür köprülerine sahip değildir. Ayrıca, Ca^{+2} gibi divalent katyonlara bağımlı değildir.

1.5. PHA Depolimerazların Biyoteknolojik Yönleri, Çalışmanın Amacı, Bilimsel ve Pratik Önemi

Biyoteknolojik olarak üretilen PHA'ların tıp ve ziraat gibi çeşitli potansiyel kullanım alanları içerisinde sadece bir paketleme malzemesi olarak kullanımı bu

biyopolimerin endüstriyel oranlarda üretilmesine sebep olmuştur. Ancak, paketlenme malzemesi olarak mikrobiyal sistemlerle üretilen PHA'ların sentetik olarak üretilenlere göre maliyetleri oldukça yüksektir. Tıp gibi özel alanlarda PHB'nin kullanımında ise biyoyuymuluk özelliği açısından üretim maliyeti oldukça az önem taşır.

PHA'ların en göze çarpan özelliği biyobozunurluk olduğundan en azından doğada parçalanmalarını sağlayan aktivitelerin ortaya konması ve oluşan ürünlerin tespit edilmesi açısından mutlaka biyobozunmalarının dikkatli bir şekilde incelenmesi gerekir. Böylece yeni ve biyobozunur polimerlerin dizaynı mümkün olabilecektir. Son yıllarda, biyobozunur poliesterler üzerinde yapılan çalışmalarla petrokimyasal başlangıç maddelerinden çeşitli polimerlerin sentezi mümkün olmuştur (Nishioka vd., 1994; Witt vd., 1995).

Biyolojik sistemlerle üretilen PHA'lar kiral maddelerdir ve R konfigürasyonuna sahip monomerlerden oluşurlar. Günümüze kadar analiz edilen tüm PHA depolimerazlar genellikle oldukça yüksek ve özgün aktivitelere sahiptirler. Dolayısıyla, oldukça kararlı ve çeşitli çevresel şartlarda bile uzun sürelerde oldukça aktif olduklarından PHA depolimerazlarla katalizlenen hidroliz reaksiyonuyla saf (R)-hidroksialkanoik asitlerin sentezi mümkündür. Bu biyobozunma işlemi bakterilerin polimer varlığında büyütülmesi ile veya polimerin sadece saf enzimlerle muamelesiyle sağlanabilir. Ayrıca, PHA depolimerazlar kiral maddelerin enzimatik olarak ayrılmasında da oldukça kullanışlıdır.

KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yapılan bir dizi fizibilite çalışmasında çeşitli ortamlardan *Pseudomonas* olarak karakterize edilen türler izole edilmiş ve bunların poliaromatik hidrokarbon parçalayabilme özellikleri araştırılmıştır (Demir, Demirbağ, 2000). Ancak izole edilen bu türlerin PHA biriktirme veya parçalama yetenekleri bilinmemektedir. *Pseudomonas* türlerinin çok çeşitli ortamlarda bulunabilir olması, PHB ve PHA gibi biyobozunurluluk yanında biyoyuymuluk gibi oldukça ilginç özelliklere sahip bu biyopolimerlerin bu bakteriler kullanılarak buldukları ortamlarda parçalanabilme özelliklerinin bilinmesi oldukça önem arz etmektedir. Bu yönüyle bu çalışmada yapılması düşünülen özel amaçlar; i) *Pseudomonas* izolatların büyütülmesi, büyüme karakterlerinin araştırılması ve büyüme ortamlarının optimize edilmesi, ii) izolatların genomik DNA'larının izole edilmesi, PCR yardımıyla elde edilen 16S rRNA genlerinin dizi analizi yoluyla tür tayini, iii) PHA türü polimerlerin bu *Pseudomonas* ekstraktları tarafından parçalanabilirliklerinin mikroskopik, spektroskopik, elektroforetik ve kromatografik yöntemlerle araştırılması şeklinde sıralanabilir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Cihazlar

Spektrofotometrik çalışmalarda ölçümler ATI Unicam UV2-100 model çift ışın yollu ve hücre kalınlığı 10 mm olan kuvarz hücreli ultraviyole-görünür bölge spektrofotometresi, çözeltilerin hazırlanmasında ise pH ölçümleri Jenway 3010 pH metresi ile gerçekleştirilmiştir. Elektroforetik çalışmalarda Hoffer, SE 600 model elektroforez cihazı ve Hoffer DC PS 3000 marka güç kaynağı kullanılmıştır. Polimer filmlerinin yüzey morfolojisi çalışmaları için, Jeol JSM-6400 model taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Ayrıca kültürlerin hazırlanmasında compact CO₂ serisi 5000 model inkübatör ve Nüve BM 102 model su banyolu hızı ayarlanabilir çalkalayıcı kullanılmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında, 1-10 µL ve 10-100 µL Socorex model 100-1000 µL Volac model ve 0.5-10 µL lik Biohit otomatik pipetleri, Velp model vorteks karıştırıcı ve Chilton model ısıtıcı-magnetik karıştırıcı kullanılmıştır. Santrifüj işlemleri için Heraus marka yüksek hızlı soğutmalı santrifüj ve Hoefer MC1400 model mikrosantrifüj kullanılmıştır. Ultramembran filtrasyonu çalışmaları için de Filtron marka 10k'lık membran sistemi kullanılmıştır. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) çalışmalarında ise Shimadzu model C-R4A bilgisayar ve yazıcısı, CTO-6A kolon fırını, RID-6A refraktif dedektör ve LC-9A sıvı pompasından oluşan bir sistem kullanılmıştır. 16S rRNA genlerinin çoğaltılmasında da Hybaid model PCR cihazı kullanılmıştır.

2.2. Kimyasal Maddeler

Magnezyum klorür, sodyum klorür, potasyum klorür, dipotasyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, bakır sülfat penta hidrat, amonyum persülfat, glasiyal asetik asit, metanol, gliserin, merkaptoetanol, diamonyum hidrojen fosfat, magnezyum sülfat, hidrojen klorür, demir (II) sülfat hepta hidrat, mangan (II) klorür tetra hidrat, kobalt (II) sülfat hepta hidrat, bakır (II) klorür di hidrat, çinkosülfat hepta hidrat, tetra hidrofuran (THF), potasyum siyanür, kloroform, 2-pentanol, 2- propanol, etilendiamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), amonyum asetat, agar,

etanol ve : ekstrağı kimyasalları, Merck A. G (Darmstadt, Germany)'den sağlanmıştır.

Glukoz, kalsiyum klorür di hidrat, *p*-nitro fenil butirat (PNPB), trizma baz, bovin serum albümin, sodyum potasyum tartarat, DNA polimeraz, DNA ligaz, RNaz, lizozim, ampisilin, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, sarkosil, guanidinyum tiyosiyanat, lauril sülfat sodyum tuzu (sodyum dodesil sülfat, SDS), *N,N,N',N'*-tetrametilen diamin (TEMED), akrilamid, *N,N'*-metilen bis akrilamid, glisin, bromofenol mavisi, ditiyotreitol (DTT), fenil metil sülfonilflorür (PMSF), sodyum azid ve deoksikolik asit sodyum tuzu kimyasalları, Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA)'dan temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan polimerler; polihidroksibutirat (PHB), polihidroksinonanoat (PHN), polihidroksioktanoat (PHO) homopolimerleri ve polihidroksibutirat-polihidroksivalerat kopolimeri (PHB-*co*-PHV) Aldrich-Chemie (Steinheim, Deutschland) firmasından sağlanmıştır.

Kullanılan diğer kimyasallardan baktotripton, Acumedia Manufacturers, Inc. (Maryland, USA)'dan, Comassie blue R250, Fluka Chemie A. G. (Buchs, Switzerland)'dan ve azot gazı ise Habaş (İstanbul)'dan temin edilmiştir.

2.3. Kullanılan İzolatlar

Çalışmada kullanılan izolatlar, KTÜ Biyoloji bölümündeki stok kültürlerden elde edilmiştir.

2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

2.4.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

50 mM fosfat tamponu (pH=7.9); 1 L saf suda yaklaşık 8.7 g K_2HPO_4 çözülmesiyle hazırlanan dibazik potasyum hidrojen fosfat çözeltisinin belli bir hacmi 1 L suda yaklaşık 6.8 g KH_2PO_4 'ın çözülmesiyle hazırlanan monobazik fosfat çözeltisinin belirli bir hacmi ile pH=7.9 oluncaya kadar titre edilerek hazırlandı.

1.5 M Tris.HCl (pH=8.8) tamponu için yaklaşık 18.165 g trizma-baz saf suda çözülüp 1 N HCl ile pH=8.8 oluncaya kadar titre edildi ve yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. 1.0 M Tris.HCl (pH=6.8) tamponu için yaklaşık 12.10 g trizma-baz saf suda

çözülüp 1 N HCl ile pH=6.8 oluncaya kadar titre edildi ve yine saf su ile 100 mL'ye tamamlandı. 0.1 M Tris.HCl (pH=8.5) tamponu için yaklaşık 3.03 g trizma-baz saf suda çözülüp 1 N HCl ile pH=8.5 oluncaya kadar titre edildi ve yine saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

2.4.2. Sıvı ve Katı Besiyerlerinin Hazırlanması

2.4.2.1. Lauria-Bertani Agar (LBA) Besiyerinin Hazırlanması

10 g baktotripton, 5 g maya ekstreği, 5 g NaCl bir erlene konulup üzerine yaklaşık 900 mL dd H₂O ilave edildi. Bir magnetik karıştırıcı üzerinde iyice çözüldükten sonra belli konsantrasyondaki NaOH çözeltisi ile pH 7.4 oluncaya kadar titre edildi ve yine dd H₂O ile 1 L'ye tamamlandı. Bunun içine katılmayı sağlaması için 12 g agar katılıp su banyosunda çözüldü. 121 °C'de ve 1 atm basınç altında 15 dakika bekletilmek suretiyle sterilize edildikten sonra dolaba konulup gerektiğinde kaynayan su banyosunda gevşetilip kullanıldı.

2.4.2.2. E* Besiyeri Ortamının Hazırlanması

1 L 1 N HCl'de 2.78 g FeSO₄.7H₂O, 1.98 g MnCl₂.4H₂O, 2.81 g CoSO₄.7H₂O, 1.67 g CaCl₂.2H₂O ve 0.29 g ZnSO₄.7H₂O iyice çözüldükten sonra, bu çözültiden 3 mL alındı ve bir miktar saf su içinde çözülmüş bulunan 1.1 g (NH₄)₂HPO₄, 5.8 g K₂HPO₄, 3.7 g KH₂PO₄ ve 15 mL 0.1 M MgSO₄ çözeltiye ilave edildi. 1 N HCl ile pH=7.0 olarak ayarlandı ve hacim saf su ile 1 L'ye tamamlandı. 121 °C ve 1 atm basınç altında 15 dakika bekletilerek sterilize edildikten sonra dolaba konuldu ve gerektiğinde kullanıldı (Kim vd, 1996).

Sıvı besiyeri, E* besiyeri ortamı ile nihai konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde glukoz içereceği için 200 mM glukoz stoğu da hazırlandı. Bunun için 18.02 g glukoz saf suda çözülüp hacim yine saf su ile 500 mL'ye tamamlandı ve otoklavda (121 °C ve 1 atm basınçta, 15 dakika) sterilize edildi. Bu şekilde esas karbon kaynağı olarak hazırlanan glukoz çözeltisi dolaba konuldu ve gerektiğinde kullanıldı.

2.4.3. PHB Depolimeraz Aktivitesinin Tayini ve Karakterizasyonu İçin Gerekli Çözeltiler

Uygun tampon çözeltiler yanında, enzim aktivitesinin karakterizasyonu için aşağıdaki çözeltiler hazırlandı. 200 mM'lık stok substrat *p*-nitrofenil butirat (PNPB) çözeltisi için yaklaşık 0.2092 g PNPB alkolde çözülüp yine alkolle 5 mL'ye tamamlandı. Optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları sırasında bu çözeltiden uygun hacimlerde alınıp reaksiyon karışımına konuldu.

Metal iyonlarının PHB depolimeraz aktivitesine etkisinin incelenmesi amacıyla, divalent Ca^{+2} ve Mg^{+2} , monovalent Na^{+} ve K^{+} iyonlarının klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Yaklaşık olarak 0.37 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15 g NaCl , 0.41 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve 0.19 g KCl ayrı ayrı tartılıp saf suda çözüldükten sonra yine saf su ile 25'er mL'ye tamamlandı. Daha sonra uygun hacimleri alınarak gerekli seyreltmelerle spektroskopik ölçümler yapıldı.

PHB depolimeraz aktivitesine inhibitör etkisinin incelenmesi için DTT, deoksikolik asit sodyum tuzu, potasyum siyanür, sodyum azid, EDTA-Na, PMSF gibi kimyasalların 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Yaklaşık olarak 0.154 g DTT, 0.414 g deoksikolat, 0.065 g potasyum siyanür, 0.065 g sodyum azid, 0.292 g EDTA-Na ve 0.174 g PMSF ayrı ayrı tartılıp; PMSF alkolde, diğerleri ise saf suda çözülüp 10'ar mL'ye tamamlandı. Daha sonra uygun hacimlerde alınarak gerekli seyreltmelerle spektroskopik ölçümler yapıldı.

2.4.4. Protein Elektrofrezisi İçin Gerekli Çözeltiler

Bu çalışma SDS mevcudiyetinde gerçekleştirildi. Tris-Glisin SDS-Poliakrilamid jel elektrofrezisi için gerekli olan karışım çözeltiler aşağıdaki tablolarda belirtildiği gibi hazırlandı (Tablo 6 - Tablo 9).

%30'luk akrilamid karışımı çözeltisi için 29 g akrilamid ve 1 g *N, N'*- metilen bisakrilamid dd H_2O 'da çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı. Renkli şişede saklanıp gerektiğinde kullanıldı. %10'luk amonyumpersülfat ise her kullanımdan önce taze hazırlandı. TEMED de orijinal şişesinden olduğu gibi kullanıldı.

Tris-Glisin yürütme tamponu için 1.5 g trizma-baz ve 7.2 g glisin bir miktar dd H_2O 'da çözüldü. Üzerine %10'luk SDS'den 5 mL konuldu ve yine dd H_2O ile 500 mL'ye tamamlandı.

Tablo 6. Tris-Glisin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için %12'lik ayırma jeli karışımı

Bileşen	Hacim (mL)
dd H ₂ O	3.3
%30 akrilamid karışımı	4.0
1.5 M tris (pH=8.8)	2.5
%10 SDS	0.1
%10 amonyumpersülfat	0.1
TEMED	0.004

Tablo 7. Tris-Glisin SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için %5'lik yükleme jeli karışımı

Bileşen	Hacim (mL)
dd H ₂ O	1.4
%30 akrilamid karışımı	0.33
1.0 M tris (pH=6.8)	0.25
%10 SDS	0.02
%10 amonyumpersülfat	0.02
TEMED	0.002

Tablo 8. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için boyama (staining) çözeltisi karışımı

Bileşen	Miktar
Comassie blue R250	1 g
Glasiyal asetik asit	62.5 mL
Metanol	93.75 mL

Tablo 9. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için boya uzaklaştırma (de-staining) çözeltisi karışımı

Bileşen	Hacim (mL)
dd H ₂ O	600
Glasiyal asetik asit	100
Metanol	400

2.5. İzolatların Katı ve Sıvı Besin Ortamlarında Büyütülmesi

Önceden hazırlanıp steril edilmiş LBA besiyeri, steril petrilere döküldükten sonra stok kültürlerden küçük bir kısım bir öze vasıtasıyla çizgi ekimiyle ekildi. Petriler 30 °C de etüvde bir gece bekletilerek bakterilerin büyümeleri sağlandı. Böylece büyütülen bakterilerden bir daha stok kullanmamak üzere iki üç haftada bir aynı işlemin tekrar edilmesiyle, kirlenmemiş bakteriler elde hazır tutuldu.

Sıvı besiyeri ortamında bakterilerin büyümesi ise sterilize edilmiş, E* besiyeri ortamı ve 200 mM glukoz mevcudiyetinde (Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda) yapıldı. E* besiyeri ortamı ve 200 mM glukoz çözeltisi stoğundan sıra ile 9:1 oranında birleştirilerek sıvı besiyeri hazırlandı (Brandl vd., 1988). Bunun içerisine taze hazırlanmış katı besiyeri ortamındaki bakterilerden yine bir krom öze teli vasıtasıyla küçük bir miktar bırakılarak sıvı kültüre ekim yapılmış oldu. Bu işlem, değişik hacimler için bir erlen ya da bir kültür tüpünde yapıldı. Kültürler 30 °C'de 200 rpm hızla çalkalanan sabit sıcaklık su banyolu çalkalayıcıda belirlenen sürede bekletilerek büyütüldü. Bütün sıvı besiyeri ortamındaki inkübasyonlar 30 °C ve 200 rpm'deki sabit sıcaklık su banyolu çalkalayıcıda gerçekleştirildi.

2.6. Büyüme Eğrilerinin Elde Edilmesi

9:1 oranında E* besiyeri ortamı ve 200 mM glukoz çözeltisi ihtiva eden sıvı besiyerinin 5 mL'sinde bir gece bekletilerek büyütülen bakteri kültürlerinden 2 mL alındı ve yine sıvı besiyerinin belirli bir hacmine ilave edildi. Daha sonra belli saatlerde alınan kültür örneklerinin 660 nm'de optik yoğunlukları ölçüldü. Spektrofotometrik ölçümler

1 mL hacimli 10 mm ışın yollu tek kullanımlık küvetlerde yapıldı. Her ölçümde sıvı besiyeri ortamının 1 mL'lik hacmi, kontrol olarak kullanılırken alınan kültür örnekleri 1:1 oranında sıvı besiyeriyle seyreltilerek absorbanslar okundu. Buna göre büyüme eğrisi grafiği çizildi. Bu şekilde hazırlanan büyüme eğrilerinden başka, E^{*} besiyerine PHB ilavesi ile oluşturulan ortamda, izolatların inkübe edilerek indüklenmenin de dikkate alındığı bir büyüme eğrisi grafiği de çizildi. Bütün izolatlar için aynı işlem tekrarlandı.

2.7. Polimer Filmlerinde Kütle Kaybının Tespiti

Bu işlem, polimer filmlerinin hazırlanması ve hazırlanan polimer filmlerinin bakteri kültürleriyle muamelesi olmak üzere iki kademede yapıldı (Kasuya vd., 1996). PHB, kloroformda çözüldükten sonra petrolere döküldü. Çözücü uçtuktan sonra petride film haline gelen polimerin uygun kristalliğe gelmesi için 3 hafta bekletildi. Böylece hazırlanan filminden 1x1 cm ebadında ve 120 µm kalınlığında örnekler hazırlandı. Bu filmler daha sonra kütle kaybı tespitinde ve yüzey morfolojisi ya da jel geçirgenlik kromatografisi çalışmalarında da kontrol olması amacıyla saklandı ve gerektiğinde kullanıldı.

Polimer filmlerinin kültürlerle muamelesi sonrasında kütle kaybının tespiti çalışması için kültürlerin büyütüleceği sıvı besiyeri ortamına % 0.25 (w/v) olacak şekilde polimer filmi de ilave edildi. Bu şekilde büyütülen kültürlerden 2 mL inokülüm alınarak içerisinde 10 mL E^{*} sıvı besiyeri : 200 mM glukoz çözeltisi (9:1) ile 1x 1 cm ebadında ve uygun kalınlıkta kesilmiş, uygun kristaliteye sahip polimer filmlerinin bulunduğu, sterilize edilmiş kapaklı kültür tüplerine ilave edildi ve 30 °C'deki sabit sıcaklıklı su banyosunda işlem başlatıldı. 24. saatte reaksiyon ortamından alınan filmler saf su ile iyice yıkayıp vakumlu desikatörde bekletilerek iyice kurutuldu ve kütle kaybı tespit edildi. Daha sonra bu filmler saklanıp elektron mikroskopuyla yüzey morfolojisi ve GPC çalışmalarında kullanıldı. Bu işlemler her bir izolat için ayrı ayrı gerçekleştirildi.

2.8. PHB Depolimeraz Enzim Ekstraktı Hazırlanması

%0.25 (w/v) PHB içeren sıvı besiyeri ortamına taze hazırlanmış katı besiyeri ortamında büyümüş bakteriden ekim yapıldı ve sabit sıcaklık su banyolu çalkalayıcıda belirlenen sürelerde inkübe edildi. Kültürler soğutmali santrifüjde 10.000 x g'de 0-4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Katı kısım ayrılarak berrak kısım alındı. Berrak kısım buz

içerisindeki 100 lık membrandan N₂ basıncı altında ultramembran filtrasyona tabi tutuldu. Bu şekilde yaklaşık 10 kat deriştirilen ekstrakt -34 °C’de küçük hacimler halinde saklandı ve gerektiğinde kullanıldı (Brandl vd., 1988).

2.9. Protein Tayini

Ekstraktlardaki protein miktarı Lowry metoduyla tayin edildi (Lowry vd., 1951). Bu işlemde standart olarak bovin serum albümini kullanıldı. Kalibrasyon için bir seri serum albümin çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltilere %1 CuSO₄.5H₂O ve %2 Na-K tartaratin 0.1 N NaOH içeren çözeltiye ilavesiyle hazırlanan çözeltiden 1 mL ilave edilip 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1:1 oranında seyreltilmiş folin reaktifinden 0.10 mL ilave edildi. Karanlıkta 30 dakika kadar bekletildikten sonra 660 nm’deki absorpsiyonlar, standart serum albümin ve enzim ekstraktı örnekleri için okundu. Örneklerdeki protein miktarları µg/mL olarak tayin edildi.

2.10. “Clear-Zone” Tekniğiyle Polimer Filmlerinin Parçalanmasının İncelenmesi

Bu çalışma da besiyerinin ve polimer filmlerinin hazırlanması ve ekstraktlarla muamelesi olmak üzere iki aşamada yapıldı (Schirmer vd., 1993). 0.1 M Tris-HCl tamponu için 3.03 g trizma-baz alınıp bir miktar dd H₂O’da çözüldükten sonra 1 N HCl ile pH=8.5 oluncaya kadar titre edildi ve yine dd H₂O ile 250 mL’ye tamamlandı. Bunun üzerine %1.5 (w/v) olacak şekilde agar ilave edilip kaynayan su banyosunda iyice çözüldükten sonra 121 °C’de 1 atm basınç altında 15 dakika bekletilerek sterilize edildi. Bu şekilde hazırlanan bileşim sterilize edilmiş petrilere döküldükten sonra katılaşması beklendi. Bu esnada PHB, PHO, PHN ve PHB-co-PHV polimerlerinden belli bir miktarda alınıp, belli miktardaki kloroformda çözünerek içerisine de bir miktar Sudan kırmızısı boyar madde olarak katıldı. Bu çözeltiden bir kısım katılaştıran petri içeriklerinin üzerine döküldü ve çözücü uçurulduktan sonra polimer filmleri de oluşturuldu.

Böylece hazırlanan besiyeri ortamına önceden hazırlanmış ekstraktın 200 µL’si yayılmaksızın ilave edildi. Bu çalışma, PHB için zamana bağlı olarak PHO, PHB-co-PHV ve PHN için 40 saatlik inkübasyon sonunda karşılaştırmalı olarak yapıldı. Petriler, 30 °C’deki etüvde bekletilmek suretiyle polimer filmlerinin parçalanması takip edildi.

2.11. PHB Depolimeraz Aktivitesinin Tayini

PHB depolimeraz aktivitesi spektrofotometrik olarak 400 nm'de, 30 °C'de ve 3 mL reaksiyon karışımları ile incelendi (Schirmer vd., 1993). Reaksiyon ortamı aşağıdaki gibi hazırlandı. Kontrol olarak ise 3 mL'lik PNPB ve tampon karışımı kullanıldı. 1 Ünite, PHB depolimeraz ile 1 µmol *p*-nitrofenolat'ın pH=7.9'da ve 30 °C'de PNPB'den 1 dakikada oluşan miktarı olarak alınmıştır.

Tablo 10. PHB depolimeraz aktivitesi tayini için reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim (µL)
10 mM PNPB	90
50 mM Fosfat Tamponu (pH=7.9)	2100
Ekstrakt	810
Toplam	3000

Belli zaman dilimlerinde toplanan kültürlerden küçük miktarlarda alınarak hazırlanan ekstraktlardan belirtilen reaksiyon karışımına göre PNPB'nin fenolat iyonuna dönüşme kinetiği araştırıldı ve aynı zamanda aynı ekstraktların optik yoğunlukları da okunarak, hem optik yoğunluğun hem de aktivitenin zamana bağlı olarak değişimi grafiği çizildi.

2.11.1. PHB Depolimeraz Aktivitesine Substrat Konsantrasyonu Etkisi

Protein miktarı sabit tutularak yapılan bu çalışmada, 200 mM PNPB çözeltisi stok olarak hazırlandı ve reaksiyon belirtilen şartlarda yapıldı. Her bir ölçüm için PNPB'nin değişen hacimlerine karşı tampon miktarı da değiştirilerek reaksiyon karışımı 3 mL'ye tamamlandı. Bu çalışma ile 0.2-10 mM nihai konsantrasyon olacak şekilde PNPB konsantrasyonu değiştirildi ve optimum substrat konsantrasyonu tayin edildi.

2.11.2. PHB Depolimeraz Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi

Bu çalışmada substrat konsantrasyonu sabit tutulup, protein içeriği bilinen ekstraktlardan değişik hacimlerde alınarak bir seri reaksiyon karışımı hazırlandı. Tampon çözelti ile reaksiyon karışımının hacmi yine 3 mL'ye tamamlandı. Değişen protein miktarı ile aktivite ilişkisi incelendi.

2.11.3. PHB Depolimeraz Aktivitesine Metal İyonu Etkisinin İncelenmesi

Monovalent Na^+ ve K^+ iyonlarının ve divalent Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının aktivite üzerine etkisi incelendi. Bunun için metallerin klorür tuzlarının 100 mM'lık stok çözeltileri hazırlandı. Metal iyonu ihtiva eden çözeltilerden değişik hacimlerde reaksiyon karışımına ilave edilip 5 μM - 50 mM aralığında nihai konsantrasyonlarda metal iyonu etkisi incelendi.

2.11.4. PHB Depolimeraz Aktivitesine İnhibitör Etkisinin İncelenmesi

Bu çalışmada ise DTT, deoksikolik asit sodyum tuzu, sodyum azid, KCN, Na-EDTA ve PMSF olmak üzere 6 değişik kimyasal maddenin, dört izolatin sahip olabileceği depolimeraz için, bir inhibitör olup olamayacağı denendi. Bu kimyasallardan KCN 0.005 mM, PMSF 0.05 mM, sodyum azid 0.05 mM, Na-EDTA 0.05 mM, DTT 0.05 mM, deoksikolik asit sodyum tuzu 0.5 mM nihai konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanarak bir seri reaksiyon yapıldı ve aktivite üzerine etkisi araştırıldı.

2.12. Ekstraktlarda PHB Depolimeraz Mevcudiyetinin Elektroforetik Olarak İncelenmesi

Ekstraktlarda PHB depolimeraz mevcudiyetinin elektroforetik olarak incelenmesi SDS mevcudiyetinde yapıldı (Laemmli, 1970). SDS-PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) için önceden hazırlanan ekstraktlar, aşağıdaki reaksiyon karışımına göre elektroforeze hazır hale getirildi (Tablo 11). Reaksiyon karışımı, kaynayan su banyosunda 4-5 dakika bekletildi ve yükleme jelindeki kuyucuklar dolana (yaklaşık 200 μL) kadar yükleme yapıldı. Daha sonra güç kaynağı çalıştırıldı ve 35 mA'lık akım 4-5 saat boyunca geçirildikten sonra jelin boyanması işlemi yapıldı. Fazla boya jelden uzaklaştırıldıktan

sonra, protein bantları jel üzerinde görünür hale getirildi. Standartlarla karşılaştırılarak, görünür hale getirilen bantların molekül ağırlığı tespit edildi.

Tablo 11. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için nümune hazırlama reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim (μL)
1 M Tris.HCl (pH=6.8)	32
%10 SDS	150
Gliserin	50
%0.1 Bromofenol mavisi	50
Merkaptoetanol	68
Protein Örneği (Ekstrakt)	350

2.13. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

Bu çalışma, KTÜ Makine Mühendisliği bölümü Elektron Mikroskobu Laboratuvarı'nda şu şekilde gerçekleştirildi. Kütle kaybı tayini çalışması için bakteri kültürlerine maruz bırakılan ve hiçbir işleme tabi tutulmamış polimer filmlerini öncelikle iletken hale getirmek amacıyla, 10^{-3} mmHg'lik bir vakum ortamında, spatül yöntemiyle 3-5 °A kalınlığında altın tabakası ile kaplandı. Altın kaplanan filmler SEM'deki vakumlu nümune odacığına alındı ve mikroskopla değişik büyütmelemlerle yüzey morfolojisi araştırıldı.

2.14. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile Molekül Kütlesi Tayini

Bu çalışma da önce kütle kaybı tayini çalışması için bakteri kültürlerine maruz bırakılan ve daha sonra uygun işlemlerle kurutulan PHB filmleri ve bir de kontrol olması amacıyla herhangi bir işleme tabii tutulmamış PHB filmi bir miktar destillenmiş THF'de çözüldü. Daha sonra 0.75 mL/dakika lık akış hızı ile kolondan geçirilen film çözeltilerinin kromatogramları alınarak molekül kütlesi tayin edildi. Aletin kalibrasyonu için 2500, 50.000, 90.000 ve 200.000 g/mol molekül kütlesine sahip olan polistiren örnekleri de standart olarak kullanıldı.

2.15. 16S rRNA Genlerinin Dizin Analizinin Yapılması

Pseudomonas türleri olduğu bilinen izolatların 16S rRNA genlerinin klonlanıp baz sırası tayin edildikten sonra tür tespiti yapıldı. Bu çalışmanın baz sırasının tayinine kadar olan kısmı Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında beş kademe gerçekleştirildi. Ancak örneklerin baz sırası Davis Sequencing LLC (California, USA) tarafından tespit edildi. Bu beş kademe şu işlemleri içermektedir.

- a. İzolatlardan genomik DNA'ların izolasyonu.
- b. 16S rRNA genlerinin PCR ile arttırılması.
- c. 16S rRNA genlerinin klonlanması.
- d. Plazmid transformasyonu ve plazmid DNA'ların izolasyonu.
- e. Dizin analizinin yapılması ve tür tayini.

2.15.1. Genomik DNA'nın İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu, Pitcher ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre yapıldı (Pitcher vd., 1989). Elde edilen sıvı kültürler, üremelerinin eksponansiyel fazında $1.000 \times g$ 'de 15 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Daha sonra, üstteki sıvı kısım döküldü ve katı kısım saklandı. Elde edilen bu katı kısım, 100 μ L 50 mg/mL oranında lizozim içeren TE tamponunda (10 mM Tris-HCl: 1 mmol EDTA, pH=8) çözüldü. Hücreler, 0.5 mL 5 M guanidinyum tiyosiyanat , 100 mM EDTA ve %0.5 (v/v) sarkosil ile parçalandı. Hücre süspansiyonu daha sonra iyice vorteksenerek karıştırıldı. Tüpler, hücrelerin tamamının parçalanması için 5-10 dakika buz banyosunda bekletildi. Daha sonra üzerlerine 0.5 mL 7.5 M soğuk amonyum asetat ilave edildi, karıştırıldı ve 10 dakika daha buz banyosunda bekletildi. Daha sonra, üzerine 0.5 mL kloroform:2-pentanol (24:1) ilave edildi ve karıştırıldı. Fazlar tamamen karıştırıldıktan sonra ele geçen süspansiyon bir pastör pipeti yardımıyla 1.5 mL'lik ependorf tüpe aktarıldı. $16.000 \times g$ 'de 20 dakika santrifüj edildi. Üst faz başka bir tüpe aktarıldı. Üzerine 0.54 mL soğuk 2-propanol ilave edildi. Tüpler 1 dakika ters-düz edilerek solüsyonlar karıştırıldı, $6500 \times g$ 'de 20 saniye santrifüj edilerek çöktürüldü. Çökelek 500 mL %70 lik etanolle yıkandı ve açık havada kurutuldu. Elde edilen DNA pelleti, 50-100 μ L steril dd H₂O da çözülerek $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

2.15.2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Yöntemiyle 16S rRNA Analizi

16S rRNA'yı kodlayan DNA, saflaştırılan genomik DNA'dan UNI16S-L (5'ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA) sırasına sahip forward primeri ile UNI16S-R (5'-ATGGTACCGTGTACGGGCGGTGTGTA) sırasına sahip revers primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan forward primeri, *E. coli* 16S rRNA geninin 11-26. pozisyonlarına göre düzenlenmişken, revers primeri ise yine bu genin 1411-1393. pozisyonlarına göre düzenlenmiştir (Brosius, J., 1978).

PCR reaksiyonlarının şartları, Beffa ve arkadaşlarına göre oluşturuldu (Beffa vd., 1996). 12 ng kalıp DNA, 5 µL 10XPCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH=8.3, 500 mM steril KCl), 1.5 mM MgCl₂, 1 ünite Taq DNA polimeraz, 0.25 mM forward primeri, 0.25 mM reverse primeri 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP, 170 mM dTTP karışımı steril dd H₂O ile 50 µL ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 500 µL'lik tüplerde yapıldı. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri şu şekilde ayarlandı. İlk denaturasyon basamağı 95 °C'de 2 dakika olarak gerçekleştirildikten sonra 36 döngü 94 °C'de 1 dakika (denatürasyon için), 56 °C'de 1 dakika (hibridizasyon için) ve 72 °C'de 2 dakika (polimerizasyon için) bekletilerek gerçekleştirildi.

2.15.3. 16S rRNA Genlerinin pNOT Vektörüne Klonlanması

İlk olarak, pNOT vektörü, sarkık T ucunun oluşturulabilmesi için *XcmI* restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesilmenin tam olarak gerçekleşip gerçekleşmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Agaroz jelden kesilip kullanıma hazır hale getirilen vektöre PCR ile çoğaltılan sarkık A ucuna sahip PCR ürünlerinin bağlanması için ligasyon reaksiyonu yapıldı. Bu reaksiyon şu şekilde gerçekleştirildi. 1 µL 10xligasyon tamponu, 3 µL pNOT (*XcmI* ile kesilmiş), 5 µL PCR ürünü ve 1 µL T4 DNA ligaz reaksiyon bileşenlerini oluşturacak şekilde bir tüpe konuldu ve 16 °C'de bir su banyosunda bir gece bekletildi. Böylece vektörün sarkık T ucu ile PCR ürünlerindeki sarkık A ucunun yapışması sağlandı.

2.15.4. Gece Kùltürünün Hazırlanması

E. coli JM 101 stok kùltüründen bir öze yardımıyla tek bir koloni alınıp 2 mL LB sıvı besiyerine ekim yapıldı ve bir gece 30 °C'de 200 rpm hız ile çalkalanan su banyosunda 12-16 saat kadar büyütüldü. Bu kùltürlerden 30 mL lik LB'ye OD₆₀₀=0.1 olacak şekilde taze kùltür aşılandı ve OD₆₀₀=0.45-0.50 oluncaya kadar çalkalayıcıda büyütüldü. İstenilen yoğunluğa ulaşan bu hücreler kompotent hücre hazırlamak için kullanıldı.

2.15.5. Kompetent Hücrenin Hazırlanması

Optik yoğunluğu 0.50 civarında olan hücreler buz banyosunda 10 dakika bekletildi ve 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım atıldıktan sonra çökeleğe 10 mL 100 mM'lık soğuk ve steril CaCl₂ ilave edilip, nazikçe sallanarak homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra 30 dakika buz banyosunda bekletildi. Daha sonra 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip sıvı kısım atıldı ve tekrar çökeleğin üzerine soğuk ve steril 100 mM CaCl₂'den 2 mL ilave edildi (Maniatis, T., 1982). Elde edilen kompotent hücreler taze olarak kullanıldı veya kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

2.15.6. Plazmid Transformasyonu

Çalışmanın bu bölümünde 16S rRNA genlerinin klonlandığı pNOT vektörü *E. coli* JM 101'e transfer edildi. Biri kontrol olmak üzere her bir plazmid için 2 tüp hazırlandı. Kontrol tüplerine sadece 200 µL kompotent hücre, diğer tüplere ise 200 µL kompetent hücre ve önceden hazırlanan plazmidlerden elde edilen plazmid DNA'sından 1 µL konuldu. Hazırlanan bu tüpler sırasıyla +4 °C'de 30 dakika ve 45 °C'de 2 dakika bekletildi ve 0.8 mL LB ilave edildikten sonra 30 °C'de 1 saat yavaşça sallanarak antibiyotiklere direnç kazanmaları için inkübasyona bırakıldı. Büyüyen kùltürler, 50 µg/ml ampisilin ihtiva eden agar üzerine bagetle yayıldı ve petriler 30 °C'de 24 saat inkübasyona alınarak, plazmid ihtiva eden hücrelerin büyümeleri sağlandı. İnkübasyon sonucu oluşan koloniler teker teker kürdanla alınarak, ampisilin içeren 2 mL LB'ye ekildi ve bir gece büyümeye bırakıldı.

2.15.7. Plazmid DNA İzolasyonu

Bu işlem Maniatis ve arkadaşlarının geliştirdiği yönteme göre yapıldı (Maniatis vd., 1982). Antibiyotik ve LB besiyerinde büyütülen kültürler 8000 rpm'de 1-2 dakika santrifüj edildikten sonra çökelek, belli oranlarda alınarak 50 mM glukoz, 25 mM tris-HCl (pH=8.0) ve 10 mM EDTA dan oluşan karışım çözeltinin 200 µL'sinde vortekslenip çözüldü. 4 mg/mL olacak şekilde lizozim ilave edildi ve 5 dakika buz banyosunda inkübe edildi. %1 SDS ihtiva eden taze 0.2 N NaOH çözeltisinden 400 µL ilave edilip nazikçe karıştırıldı ve tekrar 5 dakika buz banyosunda bekletildi. 300 µL 7.5 M amonyum asetat çözeltisinden ilave edildikten sonra tekrar nazikçe karıştırıldı ve buz banyosunda 10 dakika bekletildi. 11.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra berrak kısım bir ependorf tüpe aktarılıp kendi hacmi kadar 2-propanol ilave edilip 10 dakika bekletildi ve 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Çökelek %70'lik etanol ilavesi ile yıkandı, vortekslendi sonra da 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Çökelek kurutulduktan sonra 100 µL H₂O ve 1 mg/mL 'lik 1 µL RNaz ilavesi ile tekrar süspansiyeye edildi ve agaroz jele tatbik edilerek klonlanmanın gerçekleştiği gözlendi.

2.15.8. 16S rRNA Genlerinin Dizin Analizinin Yapılması ve Tür Tayini

Dizin analizi tayini için hazır hale getirilen 16S rRNA genleri uygun bir şekilde ambalajlandıktan sonra Davis Sequencing LLC (California, USA)'ya baz sırası tayini için gönderildi. Alınan baz sırası sonuçlarına göre bu izolatların yeni bir *Pseudomonas* türü olup olmadığına karar verildi.

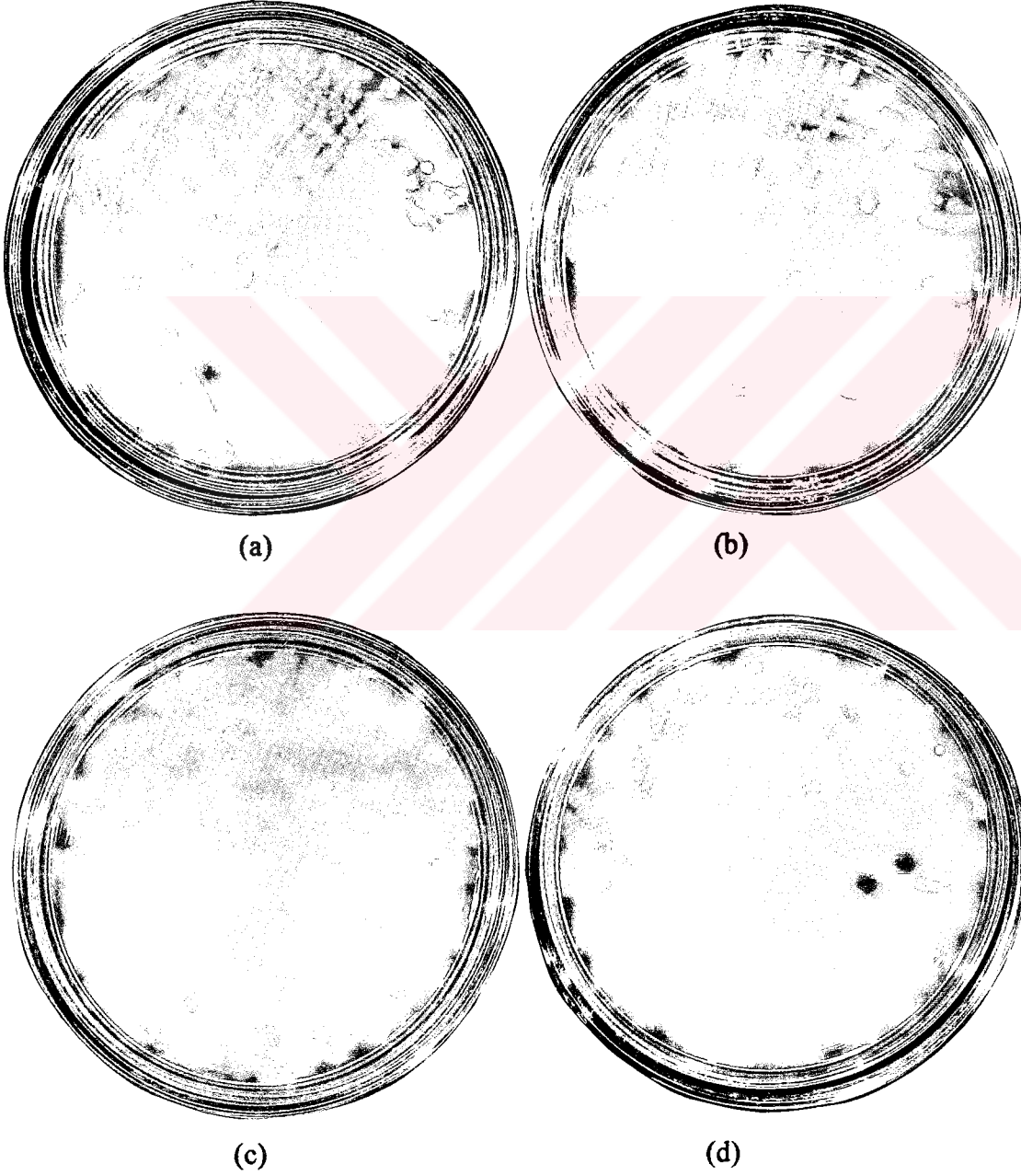
3. BULGULAR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden sağlanan ve *Pseudomonas* türleri olduğu bilinen dört izolatın polihidroksibutirat (PHB), polihidroksioktanoat (PHO), polihidroksinonanoat (PHN) homopolimerleri ile polihidroksibutirat-polihidroksivalerat kopolimerini (PHB-co-PHV) içeren filmleri parçalama yetenekleri araştırıldı. Uygun ortamlarda kristallendirilen filmlerin bu izolatlar tarafından parçalanma özellikleri, sulu ortamlarda veya katı ortamlarda çeşitli teknikler yardımıyla incelendi. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile filmlerin molekül ağırlıklarındaki azalmalar takip edildi. Kontrol filmlerle beraber işleme konulmuş filmlerin ağırlıklarında gözlenen bu azalmaların sebep olduğu yüzey morfolojisindeki değişimler taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla alınan fotoğraflar üzerinde gözlemlendi. Bu izolatların, hazırlanan filmler üzerinde yaptığı bu değişimler ayrıca "clear-zone" adı verilen katı besiyeri üzerinde gerçekleştirilen ve bakteriyal türlerin polihidroksialkanoatları (PHA) parçalama özelliklerinin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntem ile izlendi. Zamana bağlı olarak Sudan kırmızısı ile boyalı filmlerdeki değişimler kaydedildi. Bu sonuçlardan hareketle, çalışılan izolatlarda mevcut olabilecek ve polimerlerin parçalanmasını sağlayabilecek bir depolimerazın varlığı, sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile elde edilen sonuçların, daha önceki verilerle karşılaştırılması ile belirlendi. Ayrıca depolimeraz enziminin PHB polimerleri için özel olan substrat özgünlüğü, inhibitör ve metal duyarlılığı görünür bölge spektroskopisi yöntemiyle belirlendi.

Bir bakteri izolatının polimer parçalama gibi özel bir yeteneğinin olmasından dolayı bu izolatın hangi türe ait olduğunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Böyle bir karakterizasyon yaygın olarak izolatın 16S rRNA analizinin yapılması ile ortaya konmaktadır. Bu amaçla, çalışmada kullanılan bütün izolatların 16S rRNA genleri kimyasal yöntemlerle izole edilip polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla çoğaltıldı. Uygun bir vektöre klonlandıktan ve *Escherichia coli*'ye transformasyondan sonra genomik parçacıkların baz sırası tayin edildi. Baz dizileri internet yardımıyla çeşitli veri bankalarındaki dizilerle karşılaştırılarak homoloji araştırıldı. Bu veriler yanında izolatların daha önce belirlenmiş biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik özellikleri de karşılaştırılarak tür tayinleri yapıldı.

3.1. İzolatların Katı Besiyeri Ortamında Büyütülmesi

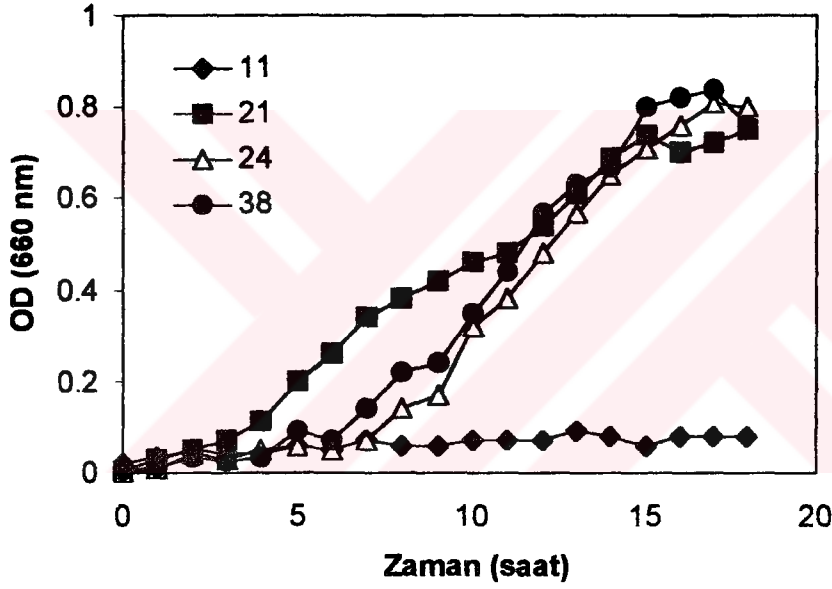
Bir öze vasıtasıyla önceden hazırlanmış ve steril edilmiş LBA besiyeri üzerine çizgi ekimle aseptik transferi yapılan izolatlar 30 °C'de 1 gece bekletilerek büyütüldü ve fotoğrafları alındı (Şekil 9). 24 izolatının koloni oluşturmaktan çok katı besiyeri üzerine yayılarak tabaka halinde büyüdüğü diğerlerinin ise koloni oluşturmaya daha meyilli oldukları gözlemlendi.



Şekil 9. LBA besiyeri ortamında 30 °C'de ve 1 gece büyütülen izolatlar. a) 11 izolatı; b) 21 izolatı; c) 24 izolatı ve d) 38 izolatı

3.2. İzolatların Sıvı Besiyeri Ortamında Büyümeleri ve Büyüme Profilleri

Sıvı kültür ortamında büyütülen izolatlardan sadece 24 nolu izolatın kahverengimsi pigment oluşturarak büyüdüğü fakat diğerlerinde pigment oluşmadığı gözlemlendi. Belirli zaman dilimlerinde sıvı besiyeri (E*) ortamında büyütülen izolatlardan alınan küçük kısımların 660 nm'deki optik yoğunluğunun zamana karşı noktalanması ile büyüme eğrileri çizildi (Şekil 10). Bu eğrilerden de görüldüğü gibi 11 izolatının E* ortamında oldukça yavaş büyüdüğü 21, 24 ve 38 izolatlarının ise bu besiyeri ortamına çok daha kolay adapte olduğu görülmüştür. Yine bu izolatların büyüme eğrilerinin birbirine oldukça benzediği ancak 24 ve 38 izolatlarının daha iyi büyüdüğü tespit edilmiştir.

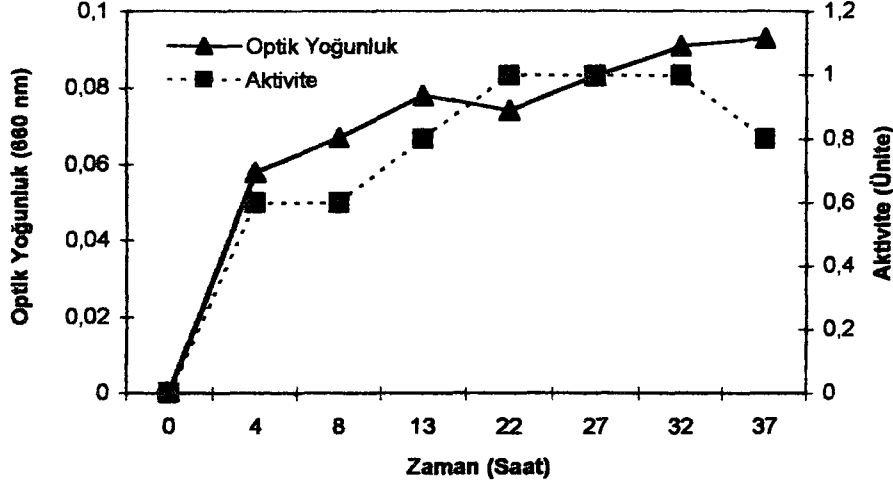


Şekil 10. E* besiyeri ortamında *Pseudomonas* izolatlarının büyüme profilleri

3.3. İzolatların Polihidroksibutiratla İndüklenmesi ve Depolimeraz Aktivitesi

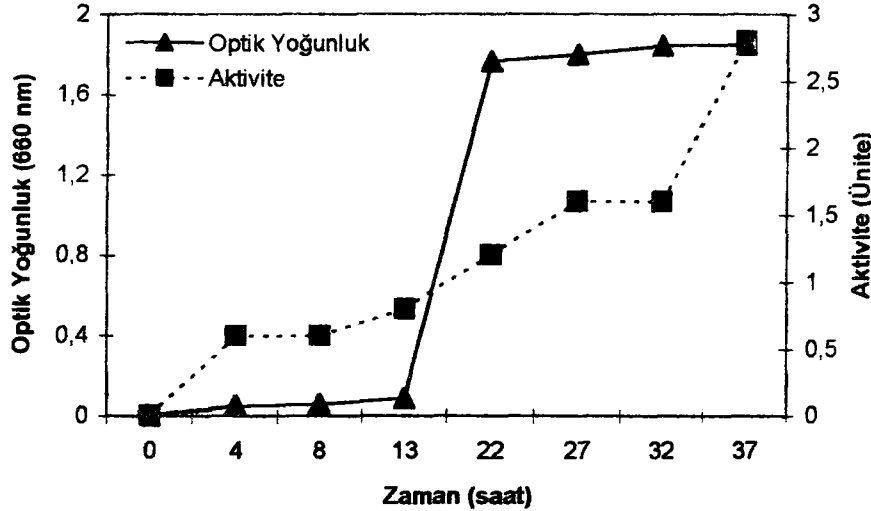
E* sıvı besiyeri ortamına PHB granülleri ilave edilerek izolatların böyle bir çevre şartında indüklenme yetenekleri incelendi. Ayrıca bu şartlar altında büyütülen kültürlerden hazırlanan ekstraktların *p*-nitrofenilbutirat substratını *p*-nitrofenolata hidrolizleme yetenekleri depolimeraz aktivitesi ölçüsü olarak her bir izolat için tespit edildi. Hem indüklenme profilleri ve hem de depolimeraz aktiviteleri büyüme zamanına bağlı olarak kaydedildi.

PHB ilave edilmemiş ortamdaki büyüme davranışı ile karşılaştırıldığında 11 izolatu polimerin ilave edilmesi ile mükemmel bir indüksiyon sağlamıştır Buna bağlı olarak 1 Ünite düzeylerine kadar bir depolimeraz aktivitesi gösterebilmiştir (Şekil 11).



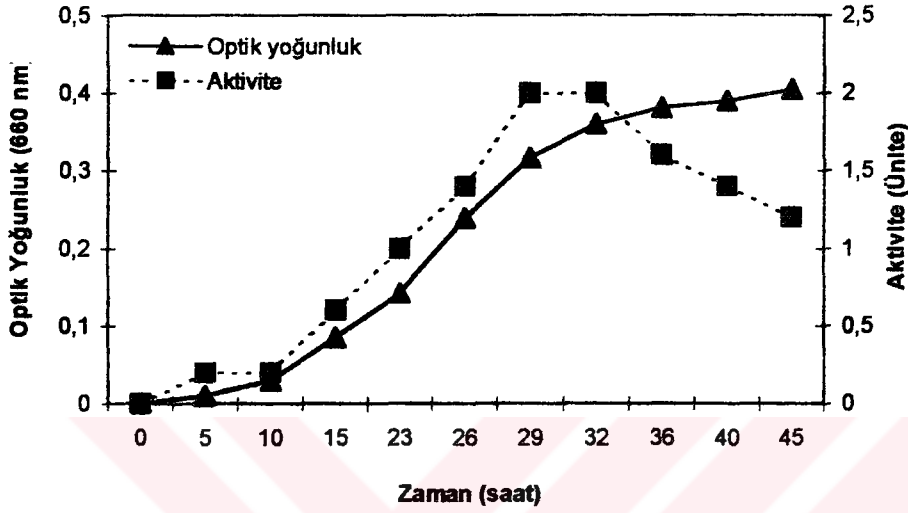
Şekil 11. 11 izolatu için PHB ile indüksiyon ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi

21, 24 ve 38 izolatu için indüksiyonla ilgili olarak depolimeraz aktivite profilleri farklılıklar göstermiştir. 21 izolatu 12 saatlik bir periyottan sonra indüklenebilmiş ve yine 12. saatten sonra artan bir depolimeraz aktivitesi ortaya çıkmıştır (Şekil 12).

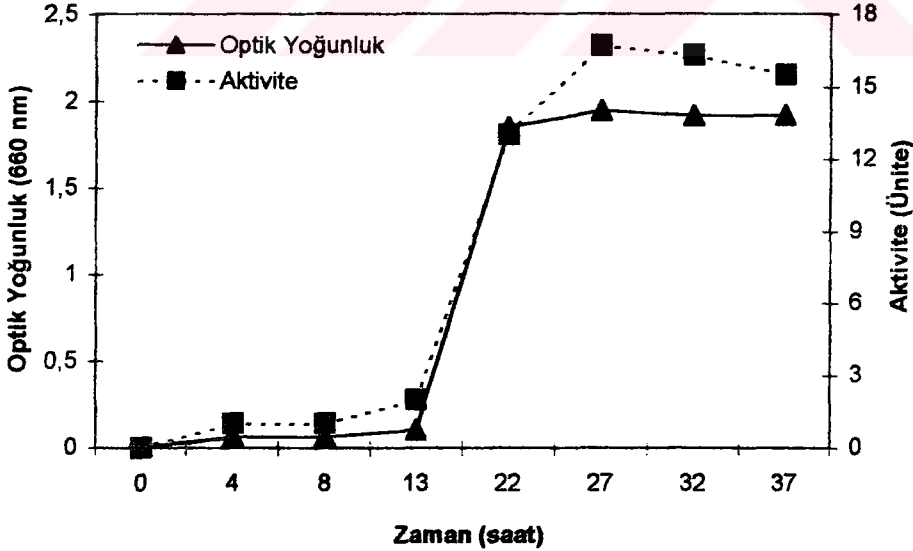


Şekil 12. 21 izolatu için PHB ile indüksiyon ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağlı olarak değişimi

24 ve 38 izolatları indüklenmeye bağı olarak oldukça uyumlu bir şekilde depolimeraz aktivitesi göstermiştir. 24 izolatu özellikle yaklaşık 29. saatte 38 izolatu ise 18. Saatte büyüme profilinde bir maksimuma ulaşmış ve aynı zamanda, depolimeraz aktivitesi de 24 izolatu durumunda yaklaşık 2 Ünite (Şekil 13) ve 38 izolatu durumunda ise 17 Ünite (Şekil 14) olarak en yüksek düzeylerine varmıştır.



Şekil 13. 24 izolatu için PHB ile indüklenmesi ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağı olarak değişimi



Şekil 14. 38 izolatu için PHB ile indüklenmesi ve depolimeraz aktivitesinin büyüme zamanına bağı olarak değişimi

3.4. Polimer Filmlerinde Kütle Kaybının Tespit Edilmesi

PHB'tan hazırlanan uygun kristallikte polimer filmlerinin *Pseudomonas* izolatları tarafından parçalandığını izlemek amacıyla uygulanan tekniklerden biri, doğrudan polimer filmlerindeki kütle kaybının tespit edilmesidir. 24 saatlik zaman dilimleri içerisinde kültür ortamına daldırılan filmlerdeki kütle kaybı, ilk ağırlıkları ile karşılaştırılarak yapıldı (Tablo 12). Bu zaman dilimi içerisinde 24 izolatının PHB filmlerinde yaklaşık %29'luk bir kütle kaybı ile diğerlerinden çok daha etkin bir şekilde filmleri parçaladığı görülmüştür. Diğer izolatlar ise birbirine oldukça yakın bağıl kayıplara sebep olmuşlardır. Sadece 24 izolatı ile 120 saate kadar yapılan inkübasyonlarda bu parçalanma miktarları önemli derecede arttığı gözlenmiştir.

Tablo 12. E* kültür ortamında *Pseudomonas* türleri tarafından 1 cm² lik PHB filmlerinin 24 saatlik bir zaman diliminde parçalanmasına bağlı olarak kütle kaybı

<i>Pseudomonas</i> türü	İzolat 11	İzolat 21	İzolat 24	İzolat 38
Filmin ilk kütlesi (mg)	2.8	2.4	4.1	2.9
Filmin son kütlesi (mg)	2.5	2.2	2.9	2.7
Kütle kaybı (mg)	0.3	0.2	1.2	0.2
Kütle kaybı %	10.7	8.3	29.2	6.9

3.5. *Pseudomonas* İzolatları ile Parçalanmış Filmlerin Jel Geçirgenlik Kromatografisi ile Molekül Kütlesinin Tayini

Pseudomonas izolatlarının PHB filmlerini parçaladığını gösteren diğer bir delil ise jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile filmlerin molekül kütlesindeki azalmanın tespit edilmesidir. GPC ile molekül kütlesinin belirlenmesi için bakteri kültürlerine maruz bırakılan filmlerle böyle bir parçalanma işlemine tabi tutulmamış filmlerin molekül kütlesindeki değişimler karşılaştırıldı. Bu amaçla polimer filmlerinde en fazla kütle kaybının gözlemlendiği 11 ve 24 izolatlarının kullanıldığı filmler GPC ile izlendi. Önce kontrol filmlerinin tetrahidrofuran (THF) çözeltileri sisteme enjekte edilerek molekül kütleleri, kromatogram yardımıyla bulundu. *Pseudomonas* izolatları ile 24 saatlik bozunmaya maruz bırakılan filmlerin molekül kütlesi bulundu ve kontrol filmleri için okunan değerlerle karşılaştırıldı (Tablo 13). Bu değerlerden her iki izolatın da filmlerin molekül kütlesinde önemli değişimlere sebep olduğu, 11 izolatının bu zaman diliminde

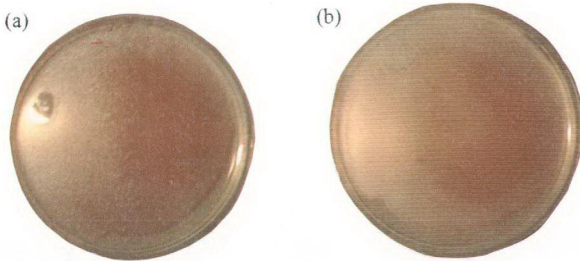
yaklaşık %30 ve 24 izolatinın ise filmlerde %17 kadar bir molekül kütlesi kaybı gerçekleştirdiği gözlenmiştir.

Tablo 13. E* kültür ortamında *Pseudomonas* türleri tarafından 24 saatlik bir zaman diliminde parçalanmış PHB filmlerinin, GPC ile molekül kütlesi değişimleri

<i>Pseudomonas</i> türü ile parçalanmış polimerik madde	Alıkonma zamanı (dk)	Molekül kütlesi (g/mol)	Molekül kütlesi azalması (%)
Kontrol PHB	8.78	266000	-
İzolât 11 ile bozulan PHB	8.95	188500	30
İzolât 24 ile bozulan PHB	8.92	221000	17

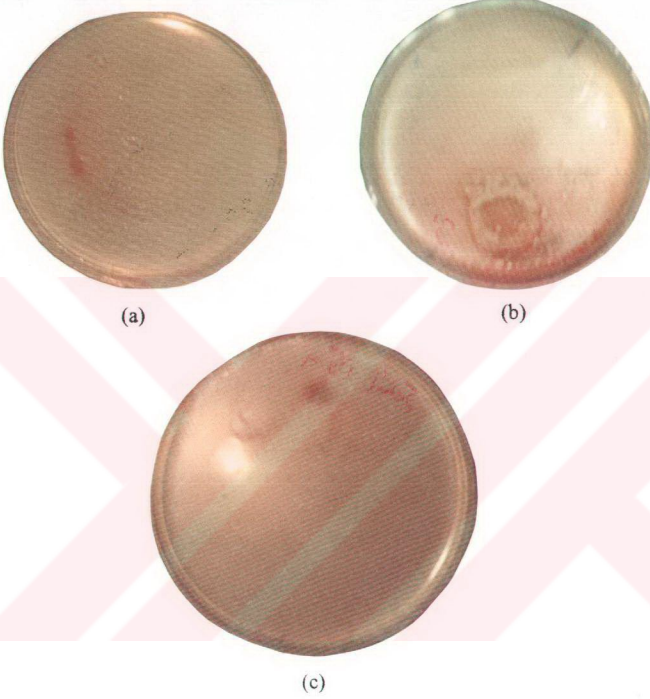
3.6. "Clear-Zone" Tekniği ile Polimer Filmlerinin Parçalanmasının İncelenmesi

"Clear-zone" tekniğinde, katı bir besiyeri üzerinde hazırlanan polihidroksialkanoat (PHA) filmi üzerine damlatılan bakteri ekstraktlarının polimer filmleri parçalamaya yetenekleri izlendi. Bakterilerin film üzerinde büyümesine bağlı olarak ilave edildikleri bölgede berrak bir halka oluşturmaları ortama ilave edilen Sudan kırmızısı boyası ile tespit edildi. Böyle bir çalışmada, *Pseudomonas* izolatlarının PHB'yi parçalamaları 10 saat aralıklarla 40 saat boyunca izlenmiş ve PHN, PHO homopolimerleri ve PHB-co-PHV kopolimeri için ise sadece 40 saatlik bir zaman dilimi sonunda filmlerdeki değişimler takip edilmiştir. PHO durumunda sadece 11 izolâtı etkinlik göstermiş ve bu polimeri parçalamıştır (Şekil 15).



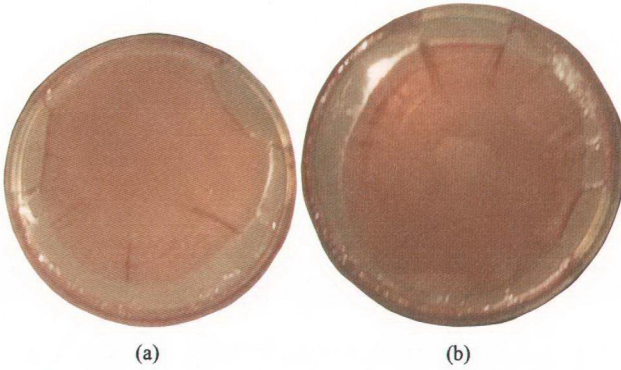
Şekil 15. PHO polimerinin 11 izolâtı ile parçalanmasının "clear zone" tekniği ile izlenmesi. a) kontrol filmi ve b) ekstrakta maruz bırakılmış film

PHN durumunda ise 21, 24 ve 38 izolatları bu polimeri tüketerek etkinlik göstermişlerdir. Çalışılan tüm PHA filmleri içerisinde PHN filmlerinin diğerlerinden farklı olarak hemen hemen bütün *Pseudomonas* türleri tarafından parçalandığı ve 24 izolatının bu parçalamada işleminde en etkin olduğu gözlenmiştir (Şekil 16).



Şekil 16. PHN polimerinin 24 ve 38 izolatları ile parçalanmasının “clear zone” tekniği ile izlenmesi. a) kontrol filmi, b) 24 izolatına maruz bırakılmış film ve c) 38 izolatına maruz bırakılmış film

PHB-co-PHV kopolimeri ise sadece 21 izolatı tarafından parçalanabilmiştir (Şekil 17). 40 saatlik bu süreç içerisinde PHN, PHO homopolimerleri ve PHB-co-PHV kopolimeri durumunda filmlerin parçalandığı gözlenirken PHB filmlerinin parçalanması ile ilgili bir değişiklik gözlenmemiştir (Tablo 14).



Şekil 17. PHB-co-PHV kopolimerinin 21 izolatu ile parçalanmasının “clear zone” tekniği ile izlenmesi. a) kontrol filmi ve b) ekstrakta maruz bırakılmış film

Tablo 14. “Clear-Zone” tekniği ile polimer filmlerinin parçalanması

	PHB				PHN	PHO	PHB-co-PHV
	Zaman (saat)						
İzolat	10	20	30	40	40	40	40
11	-	-	-	-	-	+	-
21	-	-	-	-	+	-	+
24	-	-	-	-	+	-	-
38	-	-	-	-	+	-	-

3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Parçalanmış Filmlerin Yüzey Morfolojisinin İncelenmesi

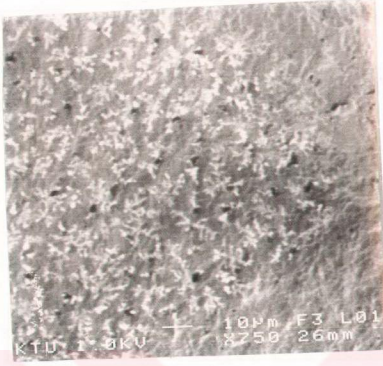
Taramalı elektron mikroskobu tekniği, polimer filmlerin yüzeylerindeki morfolojik değişimlerin kapsamlı olarak ortaya konulduğu oldukça önemli ve güçlü bir tekniktir. Bu teknik PHB filmlerinin yüzeylerinde olabilecek bozunmalar için bu çalışmada kullanılmıştır. Bu amaçla, kütle kaybı tayini çalışması için her bir izolat kültürüne 24 saat maruz bırakılan filmler ile hiçbir işleme tabi tutulmamış filmlerin elektrografileri alınarak yüzey morfolojisi incelendi. PHB filminin, parçalanma işleminden önceki taramalı

elektron mikrofrafisinde pürüzlü yüzeyler içerisinde nokta halinde çukurların olduğu kolayca görülmektedir (Şekil 18).



Şekil 18. *Pseudomonas* izolatlarına ve biyobozunmaya maruz bırakılmadan önce PHB filmi yüzeyinin taramalı elektron mikrofrafisi

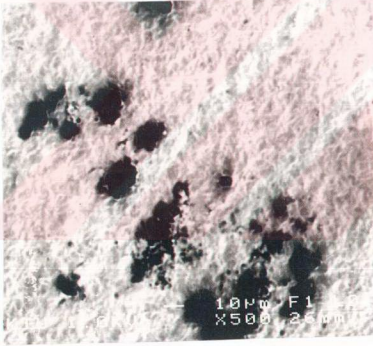
Pseudomonas izolatları ile 24 saat inkübe edilmiş PHB filmlerinin yüzeylerinde iki farklı morfolojik değişme gözlenmiştir. 11, 21 ve 38 izolatları durumunda (Şekil 19 b, c, d) kontrole göre hem filmlerin yüzeyinde pürüzlülükte bir azalma ve hem de bazı bölgelerde düzensiz çukurların oluştuğu gözlenirken 24 izolatı durumunda çukurların sayısında ve büyüklüğünde bir artış olmakla beraber daha çok filmin yüzeyinde önemli değişmeler söz konusudur (Şekil 19 a). 11, 21 ve 38 izolatları tarafından belirgin bir şekilde değişime uğratılan filmlerde de daha çok yine düzensiz çukurların varlığı gözlenmiştir. Bu çukurlar, polimerin yüzeyden iç kısımlarına doğru bir erozyonun olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Şekil 19 b, c, d). Ayrıca, 11 ve 38 varlığında polimer filmlerdeki düzensiz çukurlar bölgesellik gösterirken 21 izolatı durumunda çok sayıda birbirine oldukça yakın meknilerde bu çukurlar ortaya çıkmaktadır (Şekil 19 c).



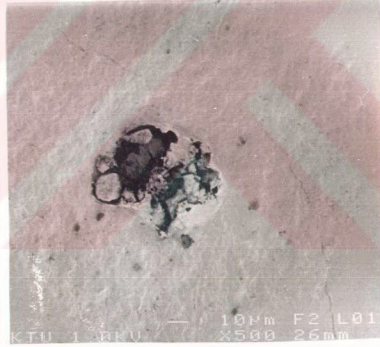
(a)



(b)



(c)

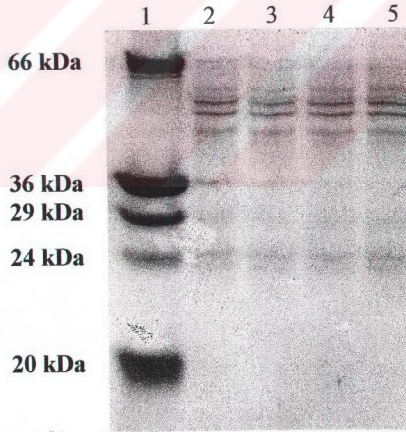


(d)

Şekil 19. E* besiyerinde *Pseudomonas* izolatlarının 24 saatlik bir süreç içerisinde parçaladığı PHB filmlerinin taramalı elektron mikrofisi. a) 24 izolatı varlığında filmin yüzeyinin mikrofisi, b) 11 izolatı varlığında filmin yüzeyinin mikrofisi c) 21 izolatı varlığında filmin yüzeyinin mikrofisi ve d) 38 izolatı varlığında filmin yüzeyinin mikrofisi

3.8. PHB Depolimeraz Varlığının Elektroforetik Olarak İncelenmesi

Hem indüklenme profilleri ve hem de depolimeraz aktiviteleri büyüme zamanına bağlı olarak kaydedilen *Pseudomonas* türlerinde mevcut olabilecek bir depolimerazın varlığının ortaya konabilmesi için kullanılan diğer bir teknik elektroforezdir. Sodyum dodesil sülfat varlığında gerçekleştirilen poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile depolimeraz aktivitesini sağlayan altbirimlerin sayısı hakkında da bilgi edinilebilir. *Pseudomonas* kültürlerinin 24-33 saatlik zaman diliminde 3 er saat ara ile alınan örneklerde PHB depolimeraz mevcudiyeti büyüme zamanına bağlı olarak çalışıldı. 20 mL kültürden alınan örneklerin protein içeriği belirlendikten sonra özellikle 24 izolatının protein içeriği elektroforeze uygulanabilecek düzeylerde bulundu. Büyütülen 24 nolu izolattan belirli inkübasyon zamanlarda alınan homojenatların elektroforetik profilleri incelendiğinde, 24. saat ve daha sonrası için 25 kDa civarında iki bandın varlığı yanında 40 kDa'un üzerinde çeşitli peptitlerin varlığı tespit edilmiştir.



Şekil 20. 24 nolu izolatın büyütülmesi sırasında çeşitli zaman dilimlerinde alınan örneklerdeki ekstraselüler karışımların SDS-PAGE profili. Jele yüklenen örnekler şu sıradadır: 1, molekül kütleleri bilinen standart proteinler; 2-5 sırasıyla 24, 27, 30 ve 33. saatlerde kültürlerden hazırlanan ekstraselüler karışımların elektroforetik profillerini göstermektedir.

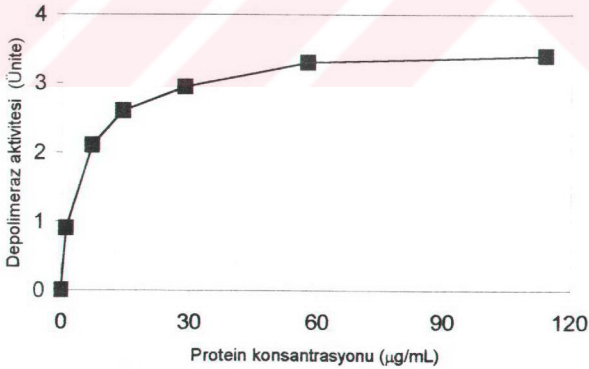
3.9. PHB Depolimeraz Aktivitesinin Karakterize Edilmesi

PHB depolimeraz aktivitesinin elektroforez yanında daha detaylı karakterize edilmesi amacıyla hazırlanan ekstrakttaki aktiviteye protein miktarının, substrat konsantrasyonunun, çeşitli metal iyonlarının ve genel inhibitörlerin etkisi incelenmiştir.

3.9.1. PHB Depolimeraz Aktivitesine Protein Miktarının Etkisi

Protein tayini, PHB depolimeraz aktivitesinin optimizasyonu ve elektroforez çalışmaları için yapıldı ve hazırlanan her yeni ekstrakt için tekrarlandı. Bu işlemlerde standart olarak sığır serum albumin kullanıldı ve 20 mL kültür ekstraktlarında protein içerikleri ortalama olarak 11 izolatu için 27 $\mu\text{g/mL}$, 21 izolatu için 48 $\mu\text{g/mL}$, 24 izolatu için 344 $\mu\text{g/mL}$ ve 38 izolatu için ise 52 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi.

PHB depolimeraz aktivitesinin ekstraktlardaki protein içeriği ile değişimi reaksiyon karışımı içerisinde nihai konsantrasyonu 1.15-114 $\mu\text{g/mL}$ protein olacak şekilde değişik protein miktarları için denendi. Substrat olarak *p*-nitrofenilbutirat (PNPB) 'ın kullanıldığı reaksiyonun hidroliz hızının protein miktarı ile değişimi bir hiperbol vermiştir (Şekil 21).

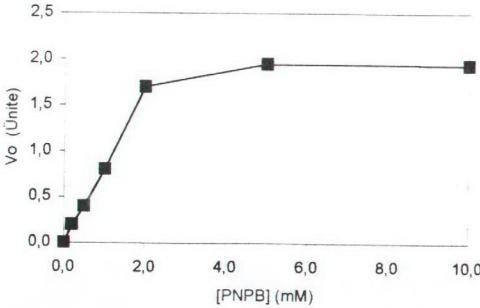


Şekil 21. 24 nolu izolatu için PHB depolimeraz aktivitesi üzerine protein miktarının etkisi

Elde edilen hiperbolde yaklaşık 28.7 $\mu\text{g/mL}$ protein içeriğine kadar bir artış gerçekleşirken 57.3 $\mu\text{g/mL}$ 'in üzerindeki protein konsantrasyonlarında ise PHB depolimeraz aktivitesinin sabit kaldığı görülmüştür. Böylece, daha detaylı depolimeraz karakterizasyonu çalışmaları için yeterli depolimeraz aktivitesi elde edilebilecek şekilde 28.7 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda protein içeren reaksiyon karışımları kullanıldı.

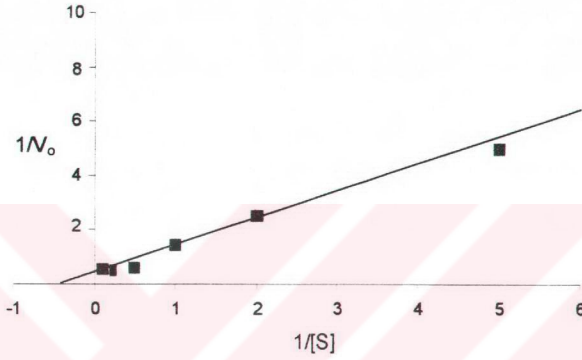
3.9.2. PHB Depolimeraz Aktivitesine Substrat Konstrasyonu Etkisi

24 izolatında mevcut olan depolimerazın çeşitli kinetik verilerle karakterize edilmesi amacıyla, 0.2-10 mM arasında değişen konsantrasyonlarda PNPB'nin hidroliz reaksiyonu hız değerleri, 400 nm'de absorbanstaki değişimler ve PNPB için $\epsilon=14.93 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ değerleri kullanılarak elde edildi. Değişik substrat konsantrasyonlarına karşı hız değerleri ile depolimerazın doygunluk eğrisi çizildi (Şekil 22). Substrat doygunluk eğrisinde 2 mM PNPB konsantrasyon değerine kadar gerçekleşen bir aktivite artışı bu değerden sonra bir limite varmakta yani enzim substrat ile doygunluğa ulaşmaktadır. Hiperbol olmasına rağmen doyma eğrisi yardımıyla 24 nolu izolatdaki bir depolimeraz için V_{maks} ve K_M için sırasıyla 2.0 Ünite ve 1.7 mM değerleri bulunmuştur. PNPB'nin *p*-nitrofenol'e hidrolizinin katalizlendiği reaksiyonda optimum substrat konsantrasyonu, substrat doygunluk eğrisinde, substrat konsantrasyonunun artmasıyla değişmeyen veya sabit kalan aktivitedeki minimum substrat miktarı 2 mM olarak belirlendi.

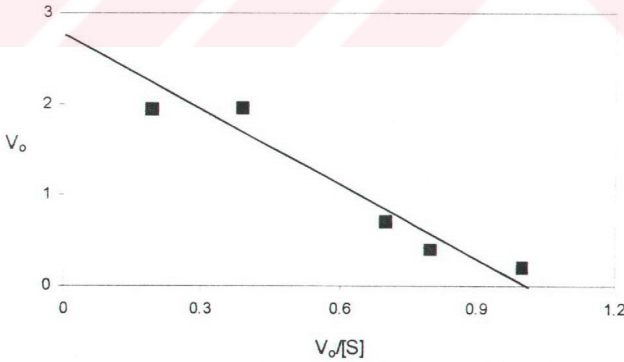


Şekil 22. 24 izolatındaki depolimeraz aktivitesi için substrat doygunluk eğrisi

Daha doğru kinetik değerlerin tespiti için lineer eğri veren Lineweaver-Burk (Şekil 23) ve Eadie-Hofstee (Şekil 24) grafikleri çizildi. Bu eğrilerden elde edilen V_{maks} ve K_M değerleri sırasıyla Lineweaver-Burk eğrisinden 2.7 Ünite ile 2.3 mM ve Eadie-Hofstee eğrisinden 2.8 Ünite ile 2.8 mM olarak tespit edildi.



Şekil 23. 24 izolatındaki depolimeraz aktivitesi için Lineweaver-Burk eğrisi



Şekil 24. 24 izolatındaki depolimeraz aktivitesi için Eadie-Hofstee eğrisi

3.9.3. PHB Depolimeraz Aktivitesine Metal İyonu Etkisi

PHB depolimeraz enzim ekstraktlarında gözlenen PNPB'nin hidrolizi reaksiyonuna metal iyonlarının herhangi bir etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^{+} ve K^{+} iyonlarının klorür tuzlarını içeren çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltileri kullanıldı ve her bir durumda bağıl aktivite değerleri hesaplandı (Tablo 15).

Tablo 15. 24 nolu izolat için çeşitli iyonların depolimeraz aktivitesi üzerine etkisi

İyon (mM)	Depolimeraz aktivitesi (Ünite)	Bağıl aktivite (%)
[Ca⁺²]		
0.005	8.24	114
0.05	8.64	120
0.5	9.44	131
1	9.64	133
[Mg⁺²]		
0.05	7.84	108
0.5	8.24	114
1	8.24	114
5	7.64	106
50	2.61	36
[Na⁺]		
0.5	7.64	106
1	8.64	120
5	8.64	120
50	3.82	53
[K⁺]		
0.05	8.24	114
0.5	8.64	120
1	8.24	114
5	7.84	108
50	4.02	56

Çalışmada, kontrol olarak yani hiçbir metal iyonu ilave etmeksizin yapılan aktivite denemesinde aktivitenin 7.23 Ünite olduğu bulunmuş ve bu değer %100 aktivite olarak dikkate alınmıştır. Her bir metal iyonu ile yapılan denemeler sonucunda bulunan aktiviteler ise bu değere göre bağıl olarak hesaplanmıştır. Buna göre, Ca^{+2} nin çalışılan her

konsantrasyonda aktiviteyi attığı ve 500 μM Ca^{+2} derişimine kadar depolimeraz aktivitesinde belirgin bir artışın olduğu gözlemlendi. Mg^{+2} , Na^+ ve K^+ iyonları varlığında ise belli bir konsantrasyona kadar aktivitede bir artışın olduğu ancak bu metal iyonlarının yüksek konsantrasyonlarında ise aktivitenin kontrol değerinin altına düştüğü tespit edildi.

3.9.4. PHB Depolimeraz Aktivitesine İnhibitör Etkisi

Bu çalışmada; potasyum siyanür (KCN), fenil metil sulfonilflorür (PMSF), sodyum azid, sodyum EDTA, ditiyotreitöl (DTT) ve deoksikolat olmak üzere 6 özel inhibitörün *Pseudomonas* izolatlarında mevcut olabilecek bir depolimeraz aktivitesine etkileri araştırıldı. 21 nolu izolat için bu maddelerden sadece DTT bir inhibisyon sağlamış, diğer izolatlar durumunda ise inhibitörlerden birkaçı aktiviteyi belirli düzeylerde inhibe edebilmiştir (Tablo 16).

Tablo 16. PHB depolimeraz aktivitesi üzerine inhibitör etkisi

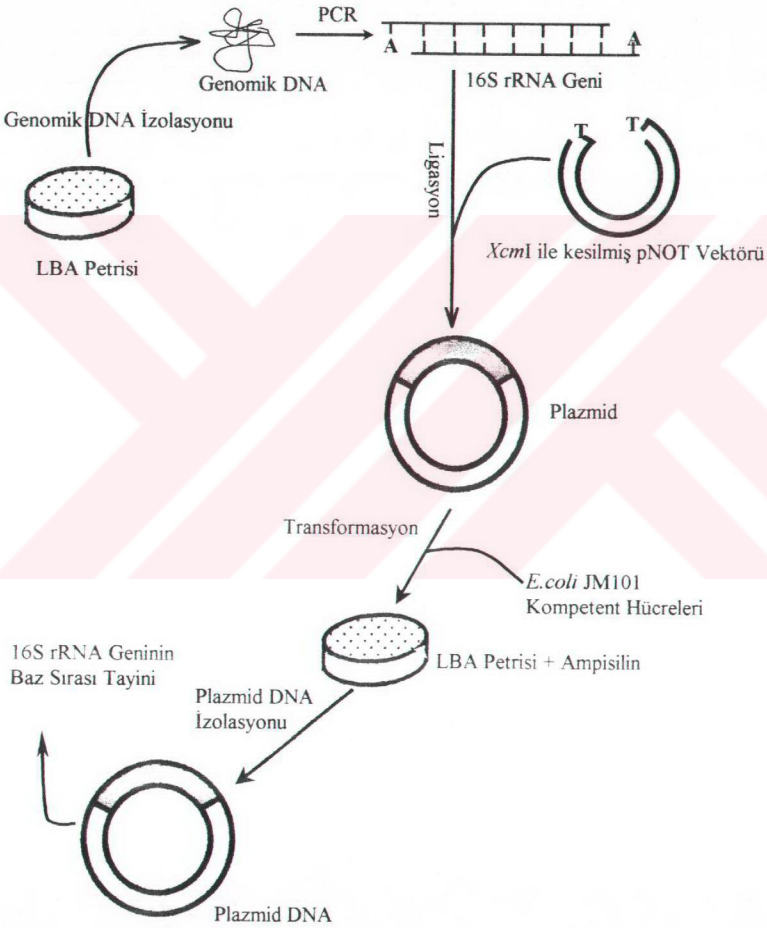
İzolat	İnhibitörler					
	KCN (5×10^{-3} mM)	PMSF (5×10^{-2} mM)	Sodyum azid (5×10^{-2} mM)	Na-EDTA (5×10^{-2} mM)	DTT (5×10^{-2} mM)	Deoksikolikasit sodyum tuzu (5×10^{-1} mM)
11	-	+	+	-	+	+
21	-	-	-	-	+	-
24	+	+	+	+	-	+
38	+	+	-	-	+	-

(+) depolimeraz aktivitesinde bir inhibisyonun gözlemlendiğini, (-) ise gözlemlenmediğini ifade eder.

3.10. 16S rRNA Genlerinin Dizin Tayini

Genomik DNA izole edilip 16S rRNA'yı kodlayan kısmı PCR ile çoğaltıldı ve bu genler pNOT vektörüne klonlandı. Klonlanmanın yapıldığı pNOT vektörü *E.coli* JM101'e transfer edildi. Böylece antibiyotiklere direnç kazanan *E.coli* hücreleri sağlanmış oldu. Bu hücreler ampisilin ihtiva eden LB agar üzerine yayıldı ve büyüyen koloniler gözlemlendi. Büyütülen her bir kültürden plazmid DNA izole edildikten sonra dizin tayini

gerçekleştirildi ve 16S rRNA genlerinin baz sırası tespit edildi (Şekil 25). İnternet aracılığıyla veri bankalarında homolojileri BLAST programı yardımıyla karşılaştırıldı ve %96-99 homoloji gösteren türler tespit edildi (Altschul vd., 1997). Buna göre her bir izolatın 16S rRNA genlerinin baz sırası aşağıdaki gibidir.



Şekil 25. İzolatların baz sırası tayininin model gösterimi

21 izolatının 16S rRNA geninin baz sırası:

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAG
 CTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTG
 GTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGG
 GAGAAAGCGAGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGAT
 TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTG
 AGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGA
 GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC
 GCGTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
 GGTTGTAGATTAATAACTGTCAATTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGG
 CTAACCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGA
 ATTACTGGCGTAAAGCGCCGCCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAT
 CCCC GGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAAACTGACTGACTAGAGTATGGTA
 GAGGGTGGTGAATTTCTGTGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGGT
 AGATATAGAAAGGAACCCCAAGTGGCGAAGGCGGCCACTTGGACTAATCTG
 AACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
 CCAGCCGTAAAACAGATGTCAACTAGCCGTTGGAAGCCTTGAGCTTTTAGTGG
 CGCAGCTTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
 ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAT
 CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAATTTCTAGA
 GATAGATTGGTGCCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCA
 GTCCTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGCTC
 TAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAGTCATCATGGCCCTTACGGCTGGGCTAC
 ACACGTGCTACAATGGTGGTACAGAGGGTTGCCAAACCGGAGGTGGAGCTA
 ATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTGACTGCGTGA
 AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCG
 GGCCTTGA

24 izolatının 16 S rRNA geninin baz sırası:

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGAGAGAAG
 CTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTG
 GTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGG
 GAGAAAGTGGGGATCTTCGGAACGGACGCTAATACCGCATAACGTCCTACGG
 TAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTG
 AGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGA
 GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCC
 GCGTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
 GGCAGTAAGTTAATACTGTCTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGG
 CTAACCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGA
 ATTACTGGCGTAAAGCGCGGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAGCCC
 CGGCTCACCTGGGAATTCATCAAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTGAAGG
 TGGTGAATTTTCTGTAGCGGTGAAATGCGTAAATAGGAAATGCGTAGA
 TATAGGAAGGAACACGAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACAT
 GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGC

TAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAA
 ATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGC
 AACGCGAAGAACCTTACTGGCCTTGACATGCAGAGAACCTTCCAGAGATGGA
 TTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGT
 TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTAC
 CAGCACTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGA
 GGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTG
 CTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCAT
 AAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGA
 ATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTG

38 izolatinin 16S rRNA geninin baz sırası:

TGGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGATGGGAGCT
 TGCTCCCGGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGT
 AGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCTTACGGGA
 GAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTTCGGATTA
 GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAG
 AGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
 AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGT
 GTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCGCTTAAAGTTGGGAGGAAGGGCAG
 TAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACC GGCTAACT
 TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
 GGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGC
 TCAACCTGGGAACTGCATCCATAAAGTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGG
 TGGAATTTCTTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGAAAAGGAACACCACT
 GGCGAAGGGGACCACTGGACTGATACTTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGG
 GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACT
 AGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTTCGACC
 GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCC
 GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATFCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC
 TGCCCTTGACATGTCCGGAACCTTGACAGAGATGCGAGGGTGCCTTCGGGAATC
 GGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTT
 AAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGG
 GCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
 AAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTA
 CAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGT
 CCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGT
 GAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCC

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, daha önce çeşitli ortamlardan izole edilen ve poliaramatik hidrokarbon parçalayabilme özellikleri ortaya konan (Demir, Demirbağ, 2000) *Pseudomonas* olarak karakterize edilmiş 4 izolatın (11, 21, 24, 38) PHA parçalama yetenekleri araştırılmıştır. Fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından benzerlikler gösteren 4 izolat Gram-negatif idi ve katalaz, oksidaz, nitrat redüktaz, indol üretimi, glukoz oksidasyonu gibi özellikleri açısından pozitif idi. Bu fenotip karakterleri açısından Gram-negatif izolatların *Pseudomonas* olabilecekleri belirtilmiştir (Demir, Demirbağ, 2000).

Pseudomonas türlerinin çok çeşitli ortamlarda bulunabilir olması ve PHA gibi biyobozunabilen polimerlerin bu bakteriler tarafından parçalanabilme özelliklerinin bilinmesi; daha ekonomik yöntemlerle, yeni ve daha mükemmel biyobozunur polimerlerin dizaynı ve üretilebilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu yönüyle bu çalışmada, *Pseudomonas* izolatlarının büyütülmesi ve büyüme ortamlarının optimize edilmesi, büyüme karakterlerinin PHA içeren ortamlarda incelenmesi, PHA türü polimerlerin bu *Pseudomonas* ekstraktları tarafından parçalanabilirliklerinin mikroskopik, spektroskopik, elektroforetik ve kromatografik yöntemlerle araştırılması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, bu potansiyellere sahip izolatların genomik DNA'larının izole edilmesi ve 16S rRNA genlerinin dizi analizi yoluyla tür tayini de yapılmıştır.

Pseudomonas izolatlarının E* sıvı besiyeri ortamında büyüme karakterleri incelendiğinde diğerlerinden farklı bir şekilde 11 izolatının oldukça düşük düzeylerde büyüebildiği gözlenmiş ancak kültür ortamına PHB ilavesi ile bütün izolatlar durumunda büyümenin indüklendiği gözlenmiştir. PHB gibi bir karbon kaynağı varlığında indüklenmenin ve dolayısıyla büyümede artışın gözlenmesi bütün izolatların bu karbon kaynağını parçalayabildiklerini göstermektedir.

Her bir izolat, ikincil karbon kaynağı olarak PHB filmlerinin bulunduğu sıvı kültürlerde ayrı ayrı büyütülmüş ve 24 saatlik inkübasyon işleminden sonra polimer filmlerindeki ağırlık kaybı yaklaşık %7-30 sınırlarında gerçekleşmiştir. Kontrollerde gözlenebilen herhangi bir ağırlık kaybı olmamış ve polimerlerin yüzeyleri başlangıçtaki parlaklıklarını korumuşlardır. Test edilen izolatlardan en yüksek parçalanmanın 24 izolatında olduğu ve en düşük olanının ise 38 izolatının olduğu gözlenmiştir (Tablo 12).

Kütle kaybının oluştuğuna benzer bir sonuç, 11 ve 24 izolatları varlığında değişime uğrayan filmlerin GPC analizi ile elde edilmiştir.

İzolatların PHB içeren ortamlardaki büyüme eğrisinin zamana bağımlılığı, büyüme ile PHA parçalanması veya depolimeraz aktivitesi arasında belirli bir ilişkinin olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. İzolatların hepsinin büyümesi, inkübasyonun hemen hemen 29. saatinden sonra en yüksek düzeylere ulaşmış ve inkübasyonun ileri süreçlerinde depolimeraz aktivitesi 24 izolatında düzgün bir şekilde düşmeye meyilli olmuştur. Buna karşın 11 ve 38 izolatları durumunda, PHB parçalanması ve PHB depolimeraz aktivitesi inkübasyonun ilerleyen sürelerinde yüksek düzeylerde kalmıştır. 21 izolatındaki PHB hidrolizi büyümenin sabit olduğu süreçlerde bile artmaya devam etmiştir. PHB varlığında 21 ve 38 izolatları durumunda büyümenin daha yavaş olması PHB filmlerinin mikroorganizma tarafından ikincil bir enerji kaynağı olarak kullanıldığını göstermektedir. Bakterilerin büyüme eğrileri ile PHB parçalayan aktiviteleri değerlendirildiğinde 21, 24 ve 38 izolatlarında zamana bağlı olarak aktivite yavaş bir hızla artmıştır.

Pseudomonas izolatları tarafından PHB polimerinin parçalanma işlemlerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde önemli derecede ağırlık kaybının olduğu filmler, inkübasyon sonunda ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmiştir. Bakteri inoküle edilmemiş sıvı ortamda bırakılan kontrol polimer filmlerinin yüzeyleri incelendiğinde filmlerin yüzeylerinde herhangi bir morfolojik etki gözlenmemiştir (Şekil 18). Bakteri kültürlerinin inokülasyonu ve 24 saat inkübasyonu sonucunda PHB yüzeylerinde çok sayıda ve düzensiz çukurların olduğu değişimler gözlenmiştir (Şekil 19). PHB filmleri 11 ve 38 izolatları ile inkübe edildiğinde yüzey yapısı yaklaşık 10-20 µm çapında yuvarlak ve düzenli olmayan bir erozyon göstermiştir. 4 izolat durumunda da filmlerde gözlenen bu morfolojik yapılar, değişiklikler göstermiştir. Ancak ortaya çıkan bu morfolojik değişmelerin belirli bölgelerde yoğunlaşması enzimatik hidrolize maruz kalan polimerin heterojenliğine atfedilebilir. PHA filmlerinin, mikroorganizmalardaki ekstraselüler PHA depolimerazların bir fonksiyonu olarak parçalandığı ve bu enzimlerin, tercihen polimer malzemelerin yüzeylerindeki amorf bölgelerden polimerleri parçalayarak bu işlemi gerçekleştirdikleri bildirilmiştir. Ayrıca, aktiflenmiş çamurda biyobozunmuş PHB filmleri için enzimatik parçalanmanın yüzey erozyonu üzerinden gerçekleştiği sonucuna varılmıştır (Doi vd., 1990). Test edilen 4 izolat tarafından PHB filmlerinin kütle kaybına bağlı biyobozunması ve PHB filmlerinin

kütlelerindeki azalmalar filmlerin zamanla ve yüzeyden başlayarak bir erozyona uğradığını göstermektedir.

Katı besiyeri üzerinde tabaka halinde oluşturulan polimer filmlerinin izolatlar tarafından parçalanma yetenekleri incelendiğinde 40 saatlik inkübasyon sürelerinde PHN filmleri üzerinde 21, 24 ve 38 izolatları tarafından berrak bölge (clear zone) oluşturulduğu, PHO ve kopolimer varlığında ise sırasıyla 11 ve 21 izolatlarının bu türden bir oluşuma sebep olduğu gözlenmiştir. PHB filmleri üzerinde ise 40 saatlik süreç boyunca herhangi bir berrak bölge oluşumuna rastlanmamıştır. Bu gözlemlerden mevcut izolatların orta zincirli (6-15 karbon atomu) monomerik birimlerden oluşan PHA'ları kısa zincirli (3-5 karbon) göre daha kolay parçalayabildiği sonucu ortaya çıkmaktadır (Jendrossek vd., 1996).

Bu sonuçlardan, test edilen bütün polimerlerin 4 izolat tarafından da bakteriyel olarak indüklenmiş yüzey erozyonu yoluyla parçalandığı söylenebilir. PHA parçalayan izolatların PHA varlığında PHA depolimeraz sentezleyip ortama salıverdiği bilinmektedir (Mukai vd., 1993; Kasuya vd., 1996). Bu işlemlerde bakteriler tarafından salverilen ekstraselüler depolimerazlar başlangıçta polimerleri oligomere hidrolizleyerek suda çözünür ürünler haline dönüştürür ve oluşan oligomerler daha sonra bakteriyel hücrelere katılıp ya karbondioksit ve suya metabolize edilerek kendileri için gerekli olan enerjiyi üretir yada biyokütle oluşumunda kullanılırlar.

PHA türü polimerlerin izolatlar tarafından biyoparçalanabilirliğinin spektroskopik araştırılması amacıyla 24 izolatı durumunda *p*-nitrofenilbutirat (PNPB) kullanılarak bir depolimeraz aktivitesinin varlığı araştırılmıştır. Protein miktarına bağlı olarak depolimeraz aktivitesi incelendiğinde düşük protein konsantrasyon değerlerinde aktivitenin arttığı ve 29 µg protein/mL civarında yavaşladığı, 57 µg protein/mL ve daha yüksek protein miktarlarında ise sabit kaldığı gözlenmiştir (Şekil 21). Bu gözlemler daha önce karakterize edilen saf depolimeraz enzimleri ile benzerlikler göstermektedir ki bu deneylerde saf enzimlerle yapılan çalışmalarda PHA depolimeraz aktivitesinin 0.5 µg protein/mL enzim konsantrasyonunda en fazla olduğu ve enzim konsantrasyonunun bu değerden daha fazla olduğu durumlarda ise enzimatik parçalanmanın yavaşladığı bildirilmiştir (Mukai vd., 1993). Bu sonuçlar maksimum parçalanmaya ulaşıldığında parçalanma hızının protein miktarından bağımsız olarak gerçekleştiğini göstermektedir (Toması vd., 1996).

24 izolatında bulunan depolimeraz aktivitesinin karakterizasyonu amacıyla PNPB substratı varlığında gözlenen esteraz aktivitelelerinden, parçalanma hızının, substrat konsantrasyonuna bağlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 22). Elde edilen gerek doyma eğrisi ve

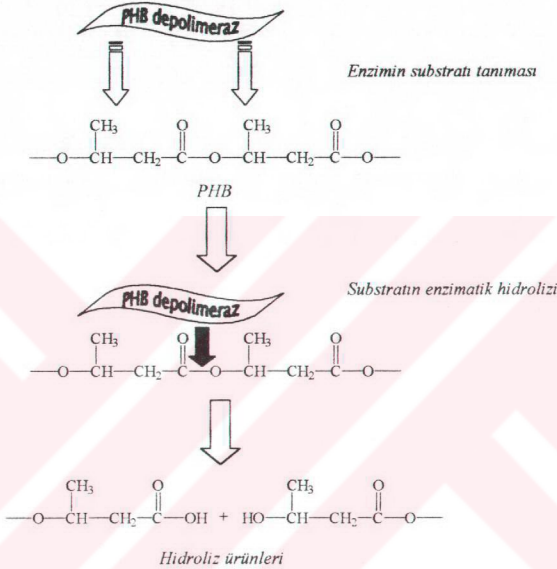
gerekse Lineweaver-Burk (Şekil 23) ve Eadie-Hofstee (Şekil 24) eğrileri birbirini destekler özellikle kinetik bazı değerler vermiştir. Bu parçalanma işlemi için K_M 2.3-2.8 mM ve V_{maks} değerleri de 2.7-2.8 Ünite aralığında tespit edilmiştir ki bu değerler de daha önce diğer depolimerazlar için bildirilen değerlerle oldukça uyumludur (Nakayama vd., 1985, Shirakura vd., 1986, Schirmer vd., 1993).

11, 24 ve 38 izolatlarında gözlenen PNPB substratına bağlı depolimeraz aktivitesinin PMSF ilavesiyle inhibe edilmesi, bu izolatlarda hidrolitik etkinliği sağlayan enzimin aktif bölgesinde serin birimleri olduğu sonucunu ortaya koymaktadır ki bu inhibitörün serin hidroksil grupları ile seçimli ve dönüşümsüz olarak etkileştiği bilinmektedir. Dolayısıyla, bu izolatlardaki depolimerazların serin hidrolaz sınıfına ait birer enzim oldukları sonucu ortaya çıkmaktadır (Nakayama vd., 1985; Yamada vd., 1993; Mukai vd., 1994). PHA depolimerazların biyokimyasal ve moleküler karakterizasyonu çalışmalarından, enzimin biri PHA yüzeyine yapışmayı sağlamak üzere hidrofobik bir bağlanma bölgesine ve diğeri de lipazlarda bulunan korunmuş bir (Gly-X₁-Ser-X₂-Gly) diziden oluşan iki katalitik bölgeye sahip oldukları sonucuna varılmıştır (Abe vd., 1995; Abe, Doi, 1999). Serin spesifik bir inhibitör olan PSMF varlığında elde edilen veriler, izolatlarda mevcut olabilecek bir depolimerazın da benzer bir bölgeye sahip olduğu sonucunu açıkça desteklemektedir. Ayrıca, PHB depolimerazlar üzerinde yapılan kinetik çalışmalarda, önce polimer substratın yüzeyine depolimeraz enziminin substrat bağlanma bölgesi üzerinden monomerik birimleri tanıyarak bağlandığı ve takiben de katalitik bölgenin etkisiyle hidroksibutirat birimleri arasındaki ester bağının hidrolizi üzerinden parçalanmanın gerçekleştiği bildirilmiştir (Abe vd., 1995; Abe, Doi, 1999) (Şekil 26).

DTT gibi bir indirgen maddenin 24 izolatu hariç diğer izolatlardaki aktivitenin azalmasına sebep olması bu izolatlardaki enzimin yapısında disülfür bağlarının varlığını ve aktivite için gerekli olduğunu göstermektedir. EDTA, deoksi kolat, potasyum siyanür veya sodyum azid gibi katyon-şelatlayıcılar tarafından sadece 24 izolatındaki enzimin aktivitesinde bir azalma gözlenmesi, bu izolattaki aktivitenin, metal iyonu bağımlılığı olduğunu ve magnezyum ile kalsiyum iyonları tarafından aktivasyonun sağlanması bu iyonların mevcut depolimeraz için bir tür aktivatör olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır (Schirmer vd., 1993; Jendrossek vd., 1996).

Günümüze kadar karakterize edilen depolimerazların çoğu tersiyer yapılarda olup moleküler ağırlıkları 40-70 kDa arasında çeşitlilik göstermektedir (Jendrossek vd., 1996). Ancak, *P. fluorescens*'tan karakterize edilen depolimerazın PHB'yi hidrolizleme

yeteneğinin olmadığı bildirilmiş ve daha çok orta zincirli yani PHO polimerlerini depolimerize ettiği tespit edilmiştir. Bu PHO depolimerazın diğer PHA parçalayan enzimlerden farklı olarak kuaterner yapıya olduğu ve biri 24 kDa ve diğeri de 25 kDa molekül kütlesine sahip iki alt birimden oluştuğu bildirilmiştir (Schirmer vd., 1993).



Şekil 26. PHB depolimerazlar için önerilen ester bağının enzimatik hidrolizinin şematik bir modeli

Test edilen izolatlarda bulunabilecek PHA depolimerazın indüklenmesi amacıyla ortama PHB ilave edildiğinden, bakteriyel kültürde mevcut olabilecek enzimin mutlaka karbon kaynağı olarak PHB'yi parçalaması beklenir. Dolayısıyla, bu izolatlarda daha önce bildirilen enzimlere yapısal olarak benzeyen bir PHB depolimerazın varlığından bahsedilebilir. 24 izolatının SDS-PAGE profillerinde 55 kDa civarlarında molekül kütlesine karşılık gelen peptidlerin varlığı benzer molekül kütlesine sahip bir depolimerazın bu PHB parçalayıcı aktiviteden sorumlu olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu depolimerazın tersiyer yapıya eşdeğerlerine yapısal olarak benzer olduğunu, inhibitörlere karşı davranışından elde edilen veriler de desteklemektedir.

PHA parçalama karakterleri belirlenen izolatları daha ileri düzeyde karakterize edebilmek için her bir izolatın 16S rRNA gen dizileri tayin edildi. Dizilerin veri bankalarındaki dizilerle homolojileri BLAST programı yardımıyla araştırıldığında izolatlarla bazı bilinen türler arasında yüksek homoloji değerleri bulunmuştur. 16S rRNA gen dizi analizi, çalışılan 4 izolattan 3'ünün *Pseudomonas* türünün aşağıdaki altsınıflarından birine ait olduğunu göstermektedir (Tablo 17).

Tablo 17. PHA parçalayan izolatların 16S rRNA gen dizileri için homolojiler. 16S rRNA gen dizi verileri BLAST programı kullanılarak veri bankalarındaki dizilerle karşılaştırılmıştır.

Izolat	Tür homolojisi
21	<i>P. fluorescens</i> (%98) <i>P. gessardii</i> (%98) <i>P. rhodesiae</i> (%98) <i>P. azotoformans</i> (%98) <i>P. tolaasii</i> (%98) <i>P. reactans</i> (%98) <i>P. synxanthal</i> (%98)
24	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 (%99) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692 (%99) <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 (%99) <i>P. aeruginosa</i> PA01 (%99)
38	<i>P. nitroreducens</i> (%97) <i>P. citronellolis</i> (%97) <i>P. putida</i> (%96) <i>P. alcaligenes</i> (%96) <i>P. stutzeri</i> (%96) <i>P. pseudoalcaligenes</i> (%96) <i>P. plecoglossicida</i> (%96)

Izolatların daha önce bildirilen morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve kemotaksonomik özellikleri (Demir, Demirbağ, 2000); belirlenen 16S rRNA gen dizilerinden homoloji gösteren türlerle karşılaştırıldıklarında 21, 24 ve 38 izolatları için en yüksek oranda benzerlik gösteren türlerin sırasıyla *P. fluorescens* (%98), *P. aeruginosa* (%99) ve *P. putida* (%96) şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Biyoteknolojik olarak üretilen PHA'ların paketleme malzemesi olarak potansiyel kullanımı endüstriyel oranda üretilmesine yol açmıştır. PHA'ların en önemli özelliklerinden biri biyobozunurlukları olduğundan bu polimerlerin biyoteknolojik kullanımı, mutlaka bunların biyobozunmalarının da araştırılmasını gerektirir. Günümüze

kadar çalışılan PHA-parçalama yeteneği olan mikroorganizmalarda bu aktiviteden sorumlu enzimin bir depolimeraz olduğu tespit edilmiştir. Suda çözünür olmayan PHA'lar bu mikroorganizmalarda ya hücre içi depolimerazlar yada hücre dışı depolimerazlar tarafından parçalanabilmektedir. Dolayısıyla, en azından doğada PHA'ların parçalanmasından sorumlu aktivitelerin ve parçalanma sonucu ortama salıverilen ürünlerin belirlenmesi ve tanımlanması gerekir. Bu enzimlerin izolasyonu, moleküler ve genetik karakterizasyonu ile yeni geliştirilecek biyobozunur polimerleri parçalayabilecek sistemlerin planlanması mümkün olabilecektir.

Bu çalışmada, 16S rRNA gen dizileri ile fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinden *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* ve *P. putida* oldukları belirlenen saf izolatların çeşitli düzeylerde PHA parçalama yetenekleri oldukları belirlenmiştir. PHA'ları biyobozabilme yeteneği olan bu mikroorganizmalar doğada yaygın olarak bulunmaktadır. Bu türlerden *P. fluorescens*'da bulunan depolimeraz sistemleri oldukça detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir (Jendrossek, vd., 1996). *P. putida*'da PHA'ların sentezi ile ilgili bilgiler bildirilmiş olmasına rağmen bu çalışmada gözlenen depolimeraz aktiviteleri hem *P. putida* ve hem de *P. aeruginosa*'da ilk kez bu ölçüde karakterize edilmişlerdir. Ancak, izole edilen ve tanımlanan, PHA-parçalama özelliği olan bu mikroorganizmalarda bulunan PHA depolimerazların bu organizmalardan izole edilerek saflaştırılması, biyokimyasal özelliklerinin tanımlanması ve PHA hidroliz mekanizmalarının ortaya konması ile bu enzimlerin moleküler biyolojisinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekir.

5. KAYNAKLAR

Abe, H., Doi, Y., 1999, Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers, *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, 185-192.

Abe, H., Doi, Y., Aoki, H., Akehata, T., Hori, Y., Yamaguchi, A., 1995, Physical properties and enzymatic degradability of copolymers of (R)-3-hydroxybutyric acid and 6-hydroxyhexanoic acids, *Macromolecules*, 28, 7630-7637.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402.

Amor, S. R., Rayment, T., Sanders, J. K. M., 1991, Poly(3-hydroxybutyrate) in vivo: NMR and X-ray characterization of the elastomeric state, *Macromolecules*, 24, 4583-4588.

Anderson, A. J., Dawes, E. A., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiol. Rev.*, 54, 450-472.

Beffa, T., Blanc, M., Lyon, P. F., Vogt, G., Marchiani, M., Fischer, J. L. ve Aragno, M., 1996, Isolation of *Thermus* Strains from Hot Composts (60 to 80 °C), *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 1723-1727.

Booma, M., Selke, S. E., Giacini, J. R., 1994, Degradable plastics, *J. Elast. Plast.*, 26, 104-142.

Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Fuller, R. C., 1988, *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(β -hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1977-1982.

Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Fuller, R. C., 1990, "Plastics from bacteria and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters" (A. Fiechter, Editör), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, 41, 77-93.

Brandl, H., Knee, E. J., Fuller, R. C., Gross, R. A., Lenz, R. W., 1989, The ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(β -hydroxyalkanoates): Potential sources for biodegradable polyesters, *Int. J. Biol. Macromol.*, 11, 49-56.

Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. F., 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects, *J. Biotechnol.*, 65, 127-161.

Briese, B. H., Jendrossek, D., Schlegel, H. G., 1994, Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge, *FEMS Microbiol. Rev.*, 117, 107-112.

Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. ve Noller, H. F., 1978, Complete Nucleotide Sequence of a 16S Ribosomal RNA Gene from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75, 4801-4805.

Brown, D., 1994, "Biotechnology: the science and the business" (V. Moses, R. E. Cape, Editörler), *New Materials*, Harwood Academic Publishers, 2. baskı, 341-353.

Byrom, D., 1987, Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics, *Tibtech*, 5, 246-250.

Byrom, D., 1991, "Biomaterials: novel materials from biological sources, Stockton, New York.

Chang, H. N., 1994, "Biodegradable plastics and biotechnology" (W. K. Teo, M. G. S. Yap, S. K. W. Oh, Editörler), *Better living through innovative biochemical engineering*, Singapore.

Chum, H. L., 1991, "Polymers from biobased materials" Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ.

Dawes, E. A., 1990, "Novel biodegradable microbial polymers" Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Dawes, E. A., Senior, P. J., 1973, The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms, *Adv. Microbiol. Physiol.*, 10, 135-266.

Delafield, F. P., Doudoroff, M., Palleroni, N. J., Lusty, C. J., Contopoulos, R., 1965, Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by pseudomonads, *J. Bacteriol.*, 90, 1455-1466.

Demir, İ., Demirbağ, Z., Beldüz, A. O., 2000, Isolation and characterization of phenanthrene decomposing *Pseudomonas sp.*, *Fresenius Environ. Bull.*, 9, 9-16.

Doi, Y., Kaneshawa, Y., Kunioka, M., Saito, T., 1990. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules*, 23, 26-31.

Doi, Y., Kawaguchi, Y., Koyama, N., Nakamura, S., Hiramitsu, M., Yoshida, Y., Kimura, H., 1992, Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 103, 103-108.

Doi, Y., Kawaguchi, Y., Nakamura, Y., Kunioka, M., 1989, Nuclear magnetic resonance studies of poly(3-hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2932-2938.

Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M., Soga, K., 1988, Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 330-334.

Fukui, T., Ito, M., Saito, T., Tomita, K., 1987, Purification and characterization of NADP-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zooglea ramigera* I-16-M, *Biochim. Biophys. Acta.*, 917, 365-371.

Fuller, R. C., 1995, "Polyesters and photosynthetic bacteria" (R.E. Blankenship, M.T., Madigan, C. E. Bauer, Editor), Anoxic photosynthetic bacteria, Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands.

Gavard, R., Dahinger, A., Hauttecoeur, B., Reynaud, C., 1967, Degradation of β -hydroxybutyric acid lipid by an enzyme extract of *Bacillus megaterium*, *C.R. Acad. Sci.*, 265, 1557-1559.

Gerngross, T. U., Snell, K. D., Peoples, O. P., Sinskey, A. J., Cshai, E., Masamune, S., Stubbe, J., 1994, Overexpression and purification of the soluble polyhydroxyalkanoate synthase from *Alcaligenes eutrophus*: evidence for a required posttranslational modification for catalytic activity, *Biochemistry*, 33, 9311-9320.

Gogolewski, S., Jovanovic, M., Perren, S. M., Dillon, J. G., Hughes, M. K., 1993, Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/VA), *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 1135-1148.

Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L., Dawes, E. A., 1988, Characterization of two 3-ketothiolases in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 52, 91-96.

- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Dawes, E. A., 1989, The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*, FEMS Microbiol. Lett., 57, 1-6.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Ewing, D. F., Dawes, E. A., 1990, Accumulation of polyhydroxyalkanoates containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135, Appl., Environ. Microbiol., 56, 3354-3359.
- Hocking, P. J., Marchessault, R. H., 1994, "Biopolyesters" (G. J. L. Griffin, Editor), Chemistry and technology of biodegradable polymers, Chapman and Hall, London.
- Holmes, P. A., 1985, Applications of PHB a microbially produced biodegradable thermoplastic, Phys. Technol., 16, 32-36.
- Howells, E. R., 1982, Opportunities in biotechnology for the chemical industry, Chem. Ind., 8, 508-511.
- Huang, J. C., Shetty, A. S., Wang, M. S., 1990, "Biodegradable plastic: A Review", Adv. Polym. Technol., 10(1), 23-30.
- Inoue, Y., Yoshie N., 1992, Structure and physical properties of bacterially synthesized polyesters., Prog. Polym. Sci., 17, 571-610.
- Jackson, F. A., Dawes, E. A., 1976, Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation, J. Gen. Microbiol., 97, 303-312.
- Jendrossek, D., Backhaus, M., Andermann, M., 1995a, Characterization of the extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase of *Comamonas* sp. and of its structural gene, Can. J. Microbiol., 41, 160-169.
- Jendrossek, D., Frisse, A., Behrends, A., Andermann, M., Kratzin, H. D., Stanislawski, T., Schlegel, H.G., 1995b, Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system, J. Bacteriol., 177, 596-607.
- Jendrossek, D., Müller, B., Schlegel, H. G., 1993, Cloning and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid)-depolymerase locus, *phaZ1*, of *Pseudomonas lemoignei* and its gene product, Eur. J. Biochem., 218, 701-710.

Jendrossek, D., Schirmer, A., Schlegel, H. G., 1996, Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 451-463.

Kasuya, K., Inoue, Y., Doi, Y., 1996, Adsorption Kinetics of Bacterial PHB Depolymerase on the Surface of Polyhydroxyalkanoate Films, *Int. J. Biol. Macromol.*, 19, 35-40.

Kim, O., Gross, A. R., Hammar, W. J., Newmark, R. A., 1996, Microbial Synthesis of Poly(β -hydroxyalkanoates) Containing Fluorinated Side-Chain Substituents, *Macromolecules*, 29, 4572-4581.

King, P. P., 1982, Biotechnology an industrial view, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 32, 2-8.

Klingbeil, B., Kroppenstedt, R., Jendrossek, D., 1996, Taxonomical identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene, *FEMS Microbiol. Lett.*, 142, 215-221.

Kunioka, M., Kawaguchi, Y., Doi, Y., 1989, Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 569-573.

Laemmli, D. K., 1970, Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of Bacteriophage T₄, *Nature*, 227, 680-685.

Lageveen, R. G., Huisman, G. W., Preusting, H., Ketelaar, P., Eggink, G., Witholt, B., 1988, Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2924-2932.

Leaversuch, R., 1987, Industry weighs the need to make polymer degradable., *Mod. Plastics*, 64, 52-55.

Lee, B., Pometto III, A. L., Fratzke, A., Bailey, T. B., 1991, Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species., *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 678-685.

Lemoigne, M., 1926, Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 8, 770-782.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Luzier, W. D., 1992. Materials derived from biomass/biodegradable materials, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 839-842.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Mergaert, J., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J., 1994, Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost, J. Environ. Polym. Degrad., 2, 177-183.

Merrick, J. M., Yu, C. I., 1966, Purification and properties of a D(-)- β -hydroxybutyric dimer hydrolase from *Rhodospirillum rubrum*, Biochemistry, 5, 3563-3568.

Mukai, K., Yamada, K., Doi, Y., 1993, Kinetics and mechanism of heterogenous hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases, Int. J. Biol. Macromol., 15, 361-366.

Mukai, K., Yamada, K., Doi, Y., 1994, Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water, Polymer Degradation and Stability, 43, 319-327.

Müller, B., Jendrossek, D., 1993, Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase *Pseudomonas lemoignei*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 487-492.

Müller, H., M., Seebach, D., 1993, Poly(hydroxyalkanoates): a fifth class of physiologically important organic biopolymers, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 32, 477-502.

Nakamura, S., Kunioka, M., Doi, Y., 1991, Biosynthesis and characterization of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate), Macromol. Rep. A., 28, 15-24.

Nakayama, K., Saito, T., Fukui, T., Shirakura, Y., Tomita, K., 1985, Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*, Biochim. Biophys. Acta, 827, 63-72.

Nishida, H., Tokiwa, Y., 1993, Effects of higher-order structure of poly(3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation, J. Environ. Polym. Degrad., 1, 65-80.

Nishimura, T., Saito, T., Tomita, K., 1978, Purification and properties of β -ketothiolase from *Zooglea ramigera*, Arch. Microbiol., 116, 21-27.

- Nishioka, M., Tuzuki, T., Wanajyo, Y., Oonami, H., Horiuchi, T., 1994, "Biodegradation of BIONOLLE" (Y. Doi, K. Fukuda, Editor), Biodegradable plastics and polymers, Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands.
- Oeding, V., Schlegel, H. G., 1973, β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism, *Biochem. J.*, 134, 239-248.
- Peoples, O. P., Sinskey, A. J., 1989a, Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alkaligenes eutrophus* H16: characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase, *J. Biol. Chem.*, 264, 15293-15297.
- Peoples, O. P., Sinskey, A. J., 1989b, Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alkaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*), *J. Biol. Chem.*, 264, 15298-15303.
- Pieper-Fürst, U., Madkour, M. H., Mayer, F., Steinbüchel, A., 1994, Purification and characterization of a 14 kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*, *J. Bacteriol.*, 176, 4328-4337.
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A. ve Owen, R. J., 1988, Rapid Extraction of Bacterial Genomic DNA with Guanidium Thiocyanate, *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 151-156.
- Poirier, Y., Nawrath, C., Sommerville, C., 1995, Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants, *Biotechnology*, 13, 142-150.
- Pranamuda, H., Tokiwa, Y., Tanaka, H., 1995, Microbial degradation of an aliphatic polyester with a high melting point, poly(tetramethylene succinate), *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 1828-1832.
- Reusch, R. N., 1989, Poly- β -hydroxybutyrate/calcium poly-phosphate complexes in eukaryotic membranes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 191, 377-381.
- Rudolph, B., 1994, Treasure from trash, *Time International*, 144, 66-67.
- Saito, T., Fukui, T., Ikeda, F., Tanaka, Y., Tomita, K., 1977, An NADP-linked acetoacetyl-CoA reductase from *Zooglea ramigera*, *Arch. Microbiol.*, 114, 184-189.

Saito, T., Iwata, A., Watanabe, T., 1993, Molecular structure of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcalineges faecalis* T1, *J. Environ. Polym. Degrad.*, 1, 99-105.

Saito, T., Suzuki, K., Yamanato, J., Fukui, T., Miwa, K., Tomita, K., Nakanishi, S., Odani, S., Suzuki, J.I., Ishikawa, K., 1989, Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, *J. Bacteriol.*, 171, 184-189.

Schirmer, A., Jendrossek, D., Schlegel, H. G., 1993, Degradation of Poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by Bacteria: Purification and Properties of a P(3HO) Depolymerase from *Pseudomonas Fluorescens* GK13, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1220-1227.

Schirmer, A., Matz, C., Jendrossek, D., 1995, Substrate specificities of PHA-degrading bacteria and active site studies on the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase of *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Can. J. Microbiol.*, 41, 170-179.

Schlegel, H. G., Gottschalk, G., von Bartha, R., 1961, Formation and utilization of poly- β -hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (*Hydrogenemenas*), *Nature*, 191, 463-465.

Schubert, P., Steinbüchel, A., Schlegel, H. G., 1988, Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and Synthesis of PHB in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 170, 5837-5847.

Senior, P. J., Dawes, E. A., 1971, Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*, *Biochem. J.*, 125, 55-66.

Senior, P. J., Dawes, E. A., 1973, The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*, *Biochem. J.*, 134, 225-238.

Shirakura, Y., Fukui, T., Saito, T., Okamoto, Y., Narikawa, T., Koide, K., Tomita, K., Takemasa, T., Masamune, S., 1986, Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) by poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1, *Biochim. Biophys. Acta*, 880, 46-53.

Sim, S. J., Snell, K. D., Hogan, S. A., Stubbe, J., Rha, C. K., Sinskey, A. J., 1997, PHA synthase activity controls the molecular-weight and polydispersity of Polyhydroxybutyrate in vivo, *Nature Biotechnol.*, 15, 63-67.

- Slater, S. C., Voigee, W. H., Dennis, D. E., 1988, Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway, *J. Bacteriol.*, 170, 4431-4436.
- Soliday, C. L., Flurkey, W. H., Okita, T. W., Kolattukudy, P. E., 1984, Cloning and structure determination of cDNA for cutinase an enzyme involved in fungal penetration of plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3939-3943.
- Stein, R. S., 1992, Polymer recycling: oppurtunities and limitations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 835-838.
- Steinbüchel, A., 1992, Biodegradable plastics, *Curr. Opinion Biotechnol*, 3, 291-297.
- Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Timm, A., Valentin, H., 1992, Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acid in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, 103, 217-230.
- Suzuki, T., Zahler, W. L., Emerich, D. W., 1987, Acetoacetyl-CoA thiolase of *Bradyrhizobium japonicum* bacterioids: purification and properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, 254, 272-281.
- Swift, G., 1993, "Directions for environmentally biodegradable polymer research", *Ac. Chem. Res.*, 26, 105-110.
- Tanio, T., Fukui, T., Saito, T., Tomita, K., Kaiho, T., Masamune, S., 1982, An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, *Eur. J. Biochem.*, 124, 71-77.
- Tien, M., Kirk, T. K., 1983, Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* birds, *Science*, 221, 661-663.
- Tomasi, G., Scandola, M., Briese, B. H., Jendrossek, D., 1996, Enzymatic degradation of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) by a depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*, *Macromolecules*, 29, 507-513.
- Valentin, H. E., Schönebaum, A., Steinbüchel, A., 1992, Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 36, 507-514.
- Wallen, L. L., Rohwedder, W. K., 1974, Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge, *Environ. Sci. Technol.*, 8, 576-579.

Witt, U., Müller, R. J., Deckwer, W. D., 1995, New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties, *J. Environ. Polym. Degrad.*, 3, 215-223.

Yamada, K., Mukai, K., Doi, Y., 1993, Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas picketti*, *Int. J. Biol. Macromol.*, 15, 215-220.



ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Trabzon'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1988 yılında KTÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Lisans öğrenimine başladı. 1992 yılında kimyager ünvanı ile yüksek onur öğrencisi olarak mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Programına girdi. 1993 yılında Kimya Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 1995 yılında Yüksek Lisans programından Yüksek Kimyager ünvanı ile mezun olduktan sonra aynı yıl KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Doktora Programına girdi. 1996 yılında TÜBİTAK Münir Birsal Vakfı bursu aldı. 1997 yılında KTÜ Kimya Bölümü'ndeki görevinden ayrılarak özel bir dershanede kimya öğretmeni olarak iki yıl hizmet verdi. 1999 yılında tekrar KTÜ, Maçka Meslek Yüksek Okulu'nda Öğretim Görevlisi olarak göreve başladı. Yabancı dili İngilizce olup halen KTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde görev yapmaktadır.