

***Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi¹**

Nihal Ediz², Yavuz Beyatlı³

Giriş

Plastikler, ekonomiklikleri, uygulama kolaylıkları ve özelliklerinin her geçen gün geliştirilmeleri nedeniyle kullanım alanlarını ve miktarlarını giderek arttırmaktadırlar. Elektrikli ev aletlerinde, otomobil sektöründe, mutfak eşyası, park-bahçe alanlarında, plastiğe dayalı inşaat malzemesi, gıda malzemesi ambalajı, kozmetik, temizlik malzemesi, narenciye, tarım ürünleri, tekstil, konfeksiyon ambalajı ve sağlık alanında plastiğe dayalı araç gereç kullanımı ile günlük yaşantımızın her alanında plastik ile karşılaşmaktadır. Plastiklere olan talebin artması atık plastik miktarında da artışa yol açmakta ve uzun süre (35-40 yıl) çeşitli kirlilikler oluşturmaktadır. Plastiklerin doğada parçalanmaları için geçen ömürlerinin yüksek olması ve yeniden kullanım oranlarının düşüklüğü atık plastik miktarını hızla artırmaktadır (1).

Petrokimyasal kaynaklı plastiklerin doğada uzun sürede parçalanmadan kalmalarıyla meydana gelen çevre kirliliğinin önlenmesi amacıyla yapılan araştırmalarda mikroorganizmaların karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere stres koşullarında depoladıkları lipid granüllerinin plastik özellikte olması ve bu plastik materyalin doğada mikroorganizmalar tarafından parçalanması mikroorganizmalar kullanılarak plastik madde üretimini kapsayan bir sektörün gelişmesine neden olmuştur. PHA (polihidroksialakanat) biyolojik olarak parçalanabilmesi açısından dikkat çeken bir polimer olmuştur. Bunlar arasında en yaygın olanı ve en iyi bilineni PHB (poli-β-hidroksibütirat) (2).

Ancak üretimde kullanılan besiyerinin maliyeti yapılan çalışmaları sınırlayan bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda mikroorganizmalardan plastik üretimi üzerine yapılan çalışmalar ucuz hammadde kullanımı üzerine yoğunlaşmıştır.

***Bacillus* Cinsi Hakkında Genel Bilgiler**

Bacillus cinsi bakteriler çubuk şeklinde düz ya da düze yakın hücrelerdir. Çoğu kötü şartlara dirençlidir. Peritrik flagellalı ve flagellaları hareketlidir. Aerobik ve fakültatif

¹ Bu çalışma 2004 yılında Prof. Dr. Yavuz Beyatlı danışmanlığında tamamlanan "Bazı *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Melas Besiyerinde PHB Üretimleri, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi" adlı yüksek lisans tezinden düzenlenmiştir

² Arş. Grv., Gazi Üniv. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 06500 Teknikokullar-Ankara Yazışmalardan sorumlu yazarın E Posta adresi: nediz@gazi.edu.tr

³ Prof. Dr., Gazi. Üniv.Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü 06500 Teknikokullar-Ankara

anaerobtur. Endospor oluştururlar. Vejetatif hücresler 0.5x1.2 µm ile 2.5x10 µm çapındadır. Geneli beyaz veya krem renkli kolonilere sahiptir. Bazı türlerinde sarı, pembe, portakal rengi ve siyah renklere pigmentli kolonilere de rastlanır (3).

Bacillus 'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37 °C de ve pH 7 civarında ürerler. Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren, nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (4).

Bacillus cinsi uygun olmayan şartlarda spor oluşturma yeteneğindedir. Oluşturduğı endospor ise; silindirik, oval, yuvarlak veya böbrek şeklinde olabilir. Buna ilaveten sporlar hücre içerisinde sentral ya da subterminal olarak yerleşebilir. *Bacillus* 'ların hücre duvarı, hücre yüzeyini tamamiyle örten yüzey katmanı parakristalin oluşturur. *Bacillus* 'lar genellikle karbonhidrat kapsülü bulundururlar. Tipik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden, hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilirler (4).

Katalaz ve asit üretirler ama gaz oluşturmazlar. *Bacillus* 'ların bazı türleri yiyecekler için önemli olabilirler. Bazı *Bacillus* 'ların proteolitik enzimleri peynir yapımında kullanılabilir. Bazı türleri de böcek patojenidir (5).

Bacillus 'ların birkaç türü polipeptit sınıfından antibiyotik üretir. Antibiyotiklerin kültürlerde sporulasyon aşamasında oluştuğı bildirilmiştir (3).

Turnbell and Kramer (1991) 'in yaptıkları bir araştırmaya göre *Bacillus* türlerinin teşhisi ve türler arasındaki farklılıkların tespiti için spor ve sporangiyum morfolojileri temel alınarak 3 grupta toplanmıştır (6, 7).

Bu cins içindeki bakterilerin çoğı patojen değildir. İki adedi insan ve hayvanlarda hastalık oluşturan basillerdir. Bunlar da *B. anthracis* ve *B. cereus* 'tur.

Bacillaceae familyası spor yapan bakterileri içinde toplayan tek familyadır. Bakteri hücrelerinin devamı olarak spor denilen form ortaya çıkmaktadır.

Bu bakterilerin yağları ve proteinleri parçalama yetenekleri çok yüksektir. Bu nedenle de basiller, sürekli çürüme ve bozulma ortamında bulunurlar.

***Bacillus* 'ların önemi**

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır (8, 9). Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizmal faaliyetlerinin çeşitliliğinin, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağladığı da belirtilmektedir (8).

Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus* 'lar, ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler. *Bacillus* 'ların ürettiğı endüstriyel enzimlerden olan subtilisin,

selulaz ve amilazlar deterjan endüstrisinde; nötral proteazlar süt endüstrisinde; farklı amilaz ve pullulanazlar besin ve meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır.

Bazı *Bacillus* türleri ise proteolitik sakkarolitik ve lipolitik enzimleri nedeniyle besin endüstrisinde önem taşımaktadır (8).

Birçok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi de ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır. Bazı *Bacillus* türleri bacitracin (*B. licheniformis*), polymyxin (*B. polymyxa*), gramicidin (*B. brevis*), tyrocidine (*B. brevis*), subtilin (*B. subtilis*) ve bacilycin (*B. subtilis*) gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler. Bunların yanı sıra siklik lipoproteinlerden olan iturin (*B. subtilis*) birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır. Zwittermicin (*B. cereus*) ve antibiotik (*B. cereus*) tarafından üretilen antibiyotiklerin mantarların neden olduğu bazı bitki hastalıklarında etkili olduğu bilinmektedir (8).

Bacillus 'ların bir diğer özelliği de çeşitli böceklerle karşı etkin bakteriyel kontrol ajanı olmalarıdır. *B. thuringiensis*, *B. larvae* ve *B. popilliae* Lepidoptera larvalarına patojenik etki gösterirler (8).

***Bacillus* 'ların habitatu**

Bacillus 'lar, sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı çevreden izole edilebilirler (2, 8). Cinsin asıl habitatu, çok çeşitli topraklardır (10, 11, 12). Toprak mikroflorasında yer alan *Bacillus* 'lar besin maddeleri açısından zengin topraklarda bulunabildikleri gibi, besince fakir topraklardan da izole edilebilirler. Örneğin, *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. cereus* kompleks besin maddelerine ihtiyaç duymazken, *B. polymyxa* ve *B. azotofixans* gibi geliştirmek için bitki rizosferine ihtiyaç duyan türlerde bulunur (8, 13, 14).

Endospor yapan *Bacillus* türleri toprak, bitki rizosferi, gıda ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebilirler. Bunun yanı sıra, Mosquito, Lepidoptera, Diptera ve Coleoptera böceklerinin larvalarından da izole edilmiştir (8, 11, 15, 16).

Birçok mikroorganizma çeşidi gibi *Bacillus* 'lar içinde önemli bir habitat olan topraktaki farklı ortam şartları, mikroorganizma çeşidinin de artmasına yol açar. Genel olarak iyi havalanmış, nemli ve yüksek organik materyal içeren toprakları seçen mikroorganizmalar, toprağın ilk 10 cm'lik üst kısmında yüksek sayıda bulunurlar. Topraktaki popülasyon yoğunluğunun büyük bir kısmını bakteriler (10^6 - 10^9 bakteri/1 gr toprak) oluşturur. Mantarlar, biyokütle oluşumunda önemlidirler (17).

Bacillus türleri toprakta geniş bir yayılıma sahip oldukları gibi deniz ve tatlı sularda, buraların sedimentlerinde de bulunabilirler. Bazı *Bacillus* 'lar ise ekstrem şartlarda büyüebilme kapasitesindedirler ve üre içeren, uç pH değeri olan, asitli veya yüksek ısıli ortamlardan izole edilebilirler (8).

Bacillus türlerinin çeşitli besinlerde buldukları ve besin maddelerinin dönüşümü ve bozulmalarında rol oynadıkları bilinmektedir.

Bacillus 'ların metabolizması

Aerobik ya da fakültatif anaerobik olan *Bacillus* 'lar genelde Embden-Meyerhof izyolunu kullanırlar. Bunun yanısıra heterolaktik (fosfoketolaz) iz yolunu kullananları (*B. subtilis*) da vardır (18).

Terminal elektron alıcıları genelde oksijendir, ancak bazı türlerin elektron alıcısı NO_3 de olabilir, denitrifikasyon yapan türleri de (*B. azotoformans*, *B. licheniformis*) vardır. Bazı türler (*B. polymyxa*, *B. macerans*) ise azotu fiske ederler. O_2 - CO_2 - H_2 veya O_2 - CO ortamlarında ototrofik yaşayan türlere (*B. schlegelii*) de rastlanabilir (8, 14). Aerobik ortamlarda karbon kaynağı olarak organik asitleri (asetik asit, süksinik asit, laktik asit veya pirüvik asit) kullanarak heterotrofik olarak yaşayabilirler. Kemoorganotroftirler. Sadece bir tür fakültatif kemolitotroftur. Bazı türler aromatik veya hidroksi aromatik bileşenleri metabolize edebilirler ve bu nedenle benzin gibi meddelerin bioremediasyonunda kullanılabilirler.

Genelde prototrof oldukları halde, oksotrof türlere de rastlanır. *Bacillus* 'lar çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra, geniş fizyolojik yetenekleri ile de psikrofilikten termofiliğe; asidofilikten alkalifiliğe; halotoleranttan halofiliğe geniş bir yelpazeye sahiptir ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyelleri yüksektir (8, 14).

Bazı *Bacillus* türlerinin (deoksi) nükleozidleri veya (deoksi) ribozları karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı da bildirilmektedir (19).

Bacillus 'ların genetik yapısı

Bacillus genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan *B. subtilis* türü oldukça iyi tanımlanmış olup, genom büyüklüğünün 4,2 Mbp olduğu ve 4100 protein kodlama geni içerdiği bildirilmiştir (9).

Genel ve özel transdüksiyon, plazmid DNA aktarımı, plazmid ve bakteriyofaj vektörleri ile ilgili moleküler genetik araştırmalarda *B. subtilis* türünün yanı sıra, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans* gibi türlerde kullanılmaktadır (14).

Bacillus cinsi içindeki DNA baz kompozisyonunun dağılımı, cinsin genetik dağılımı açısından ilginç sonuçlar vermektedir. Doğal bir cinste en fazla % 10-15 aralığında olması gereken % mol G+C oranı *Bacillus* cinsi içinde % 32-69 arasında değişmektedir. Bu oranın aynı türdeki değişik suşlarda % 40-50 arasında olabildiği bildirilmektedir. Bu bilgiler belki de cinsin yeni cinslere bölünebileceğini göstermektedir (8, 14).

Bacillus türlerinin, geç logaritmik faz veya erken sabit fazda sekonder metabolit olarak antibiyotik üretme kapasitesinde olduğu bilinmektedir. Antibiyotik ve antimikrobiyal madde üreten *Bacillus* türleri arasında *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans* gibi türler almaktadır. *Bacillus* cinsi zincir oluşturan geniş Gam pozitif çubukları içerir, spor oluştururlar ve aseptikler. Bu cinsin birçok üyesi *B. subtilis* ve *B. cereus* gibi toprak, su, hava ve vejetasyon üzerinde yaygın saprofitik organizmalardır. Bazıları böcek

patojenidir. *B. cereus* gıdalarda gelişir ve *E. coli* enterotoksinine yakın bir mekanizma ile hastalığa neden olan bir enterotoksin üretir. Böyle organizmalar insanda nadiren hastalık üretir (Örneğin menenjit, endokartit, endofitalmitis, konjunktivit veya akut gastroenteritis). *Bacillus anthracis* en önemli patojendir. *Bacillaceae* familyası endospor oluşturan bakterilerin farklılığını barındırmaktadır. Obligat aeroplardan tam anaeroplara, çubuktan koka, psikrofillerden termofillere, alkalifillerden asidofillere değişirler. Familya *Bacillus* ve *Clostridium* cinslerini kapsamaktadır. *Bacillus* cinsi *Bacillus subtilis* (tip tür), *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* ve *Bacillus thuringiensis* gibi böyle çok iyi bilinen türler barındırdığı için devam etmektedir. *Bacillus* sp. doğada geniş çapta yayılmaktadır. Çünkü bu mikroplardan sporlar zıt şartlarda hep hayatta kalırlar. *Bacillus* sp. laboratuvar kültüründe yaygın kontaminantlardır (37).

Bacillus Cinsinin Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Üretimi

Poli- β-hidroksialkanat (PHA) ve poli- β-hidroksibütirat'ın (PHB) tarihçesi

Petrolden elde edilen sentetik polimerlerin (plastik) çoğu kullanımdan sonra fonksiyonunu kaybetmekte ve "plastik atık" olarak terkedilmekte ve toprakta uzun süre parçalanmadığından çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, biyolojik parçalanabilen polimerlerin (mikrobiyal termoplastik) üretimi önem kazanmıştır. Mikrobiyal plastiğin hammaddesini poly-β-hydroxybutyrate (PHB) oluşturmaktadır (20).

PHB intrasellüler depo materyali olup, birçok mikroorganizma tarafından uygun olmayan üreme koşullarında sentezlenmektedir. Örneğin besiortamında N, P, S, Mg ve/veya O'nun sınırlandırılması ile bu madde oluşmaktadır. Sentezlenen PHB, mikroorganizma için karbon ve enerji kaynağıdır. Çeşitli bakteriler tarafından sentezlenen PHA'nın hücre içi depo polimeri granüller olduğu ve bakteri için karbon ve yüksek enerji kaynağı olduğu bildirilmiştir (21). PHA oluşumu glikojenin PHA'ya transformasyonu sonucu meydana gelir ve bu oluşumun biyolojik mekanizmasında fazla fosfatın hücreden giderilmesinde önemlidir (22).

Poly-β-hidroksibütirat kimyasal özelliği açısından polipropilene benzemekte olup, değişik alanlarda kullanılabileceği bazı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (23, 24). Bu maddenin endüstriyel üretimi ilgi odağı olmuştur (25, 26).

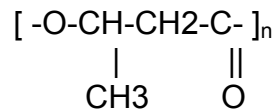
Poly-3-hidroksialkanoat (PHA) nitrojen, fosfor, oksijen veya mikroelement yetersizliği sentezlenen bakterial polyesterlerdir (20, 27). *Azotobacter* sp. PHB biyosentezler, poli-3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat (PHBV), *Azotobacter vinelandii* UWD mutantı ile üretilir (28). PHB'nin moleküler ağırlığı bu suşta çalışılmış ve $8 \cdot 10^5$ - $4 \cdot 10^6$ Da arasında bulunmuştur. PHA'nın moleküler ağırlığı türe bağlıdır. Polimerizasyon derecesinin düzeyi bakterial üretim sistemi ve fermentasyon fizyolojik parametrelerinin seçimini içeren faktörlerin sayısına çok bağlıdır

PHB biyolojik olarak degrade olan polyesterdir ve polietilen ve polipropilen benzeri petrokimyasal kaynaklı plastikler için temsilci gibi bu polimerlerin kullanımına olan ilgi gelişmektedir (25). Ticari uygulamaların olanaklılığı için Monsanto oldukça geniş skalada *Alcaligenes eutrophus* H16 kullanılarak 3-hidroksibütirik asit ve 3- hidroksi

valerik asit P(3HB-co-3HV) nin her ikisini içeren kopolimer ve PHB yaygın olarak üretilir (29). PHA 'lar ticari olarak çok ilgi çekmektedir. Çünkü onlar doğal ve biyolojik olarak parçalanabilen termoplastik gibi kullanılabilir (25). Biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin pazarlanması 2000 yılı için 1.5 milyon metrik ton civarında olduğu tahmin edilmiştir. Problem tüm biyolojik olarak parçalanma özelliğindeki polimerler polietilen veya polipropilenden daha fazla pahalıdır. Böyle yeni mikroorganizmalar ile PHA nın etkili üretiminde dünya çapında ilgi artmaktadır. PHA nın ticari üretimi Zeneca Bioproducts in Billingham, UK da ile üretilmektedir. *Alcaligenes eutrophus* bakterisinden bu amaçla yararlanılmaktadır (25). Üretimin birinci aşamasında bakteri glukozlu ortamda üretilip, biyomas artışı sağlanır. İkinci aşamada glukozun varlığında ve N sınırlaması ile polimer üretimi gerçekleştirilir. Bu şekilde PHB nin üretim maliyeti \$550/tondur. *A. eutrophus* şeker pancarında bulunan sükroz şekerini kullanmamaktadır. PHB nin hiperüretimi pancar melası kullanılarak mutant *Azotobacter vinelandii* UWD tarafından gerçekleştirilmiştir (28). Bu hücrelerin PHB içeriği çok yüksek olarak bildirilmiştir.

Petrokimyasal kaynaklı plastiklerle PHB nin üretim gideri karşılaştırıldığında, PHB nin üretim maliyetinin yüksek olduğu gözlenmiş ve bu durumda PHB nin üretimi ve ticaretini engellemektedir. Bu nedenle bunların daha düşük maliyetle endüstriyel üretimi için proseslerin geliştirilmesi amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Ekonomik PHA üretimini sınırlandıran faktörlerin biri şeker substratının maliyetidir (30): 3 ton glukoz 1 ton PHB nin üretimi için gereklidir. Bu nedenle ekonomik substratlar ve daha kolay teknik işlemler gereklidir. Melas ve peyniraltı suyu gibi tarımsal artık karbon kaynakları fermentasyon için kullanılır. Ayrıca fermentasyon şartlarının optimizasyonu birçok biyoprosesin üretim ve verimini olumlu yönde etkilemektedir (31, 32).

Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen PHB, yapısında kısa zincirli β -hidroksi yağ asitleri içeren, prokaryotların membranla çevrili hücre içi depo maddesi olup, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun bir polimerdir (33, 34). Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB in genel formülü $(C_4H_6O_2)_n$ şeklindedir (Şekil 1). (n) sayısı 35 000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabildiği gösterilmiştir (35, 36).



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

Mikroorganizmalar tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılan PHB oksijen konsantrasyonlarının düzenlenmesinde, sporulasyon için enerji sağlanmasında ve redükleyici eküvalentler için elektron havuzu olarak da görev alır. Aynı zamanda hücrede redoks düzenleyicidir (29, 36).

PHA'lar, birçok bakteri tarafından fazla karbon kaynağının olduğu diğer besin maddelerinin özellikle de azot kaynağının sınırlandırıldığı şartlar altında karbon ve enerji materyali olarak depolanır. Polimerin moleküler ağırlığı, mikroorganizma ve büyüme şartlarına bağlı olarak 2×10^5 ile 3×10^6 Dalton arasındadır. PHA depolayan mikroorganizmalar, Sudan Black veya Nile Blue A boyaları ile kolayca identifiye

edilebilir. 300 den fazla Gram negatif ve Gram pozitif bakteri türünde farklı PHA ların (PHB, PHV, PHO, ..) depolandığı rapor edilmiştir (37).

PHA 'ların bulunuşu

İlk çalışmalarda PHA, bakteri hücrelerindeki küçük yağ damlacıkları olarak tanımlanmıştır. Bakterilerdeki lipofilik granülleri çok önceden tanımlamış olmalarına rağmen ilk kez Lemoigne (1923) tarafından bu partikülün kompozisyonu teşhis edilmiştir. Doğal PHB granülleri ilk kez *Bacillus megaterium* ve *Azotobacter beijerinckii* nin hücre ekstraktından izole edilmiştir (20).

PHB 'nin morfolojisi

Bakteri hücrelerinde PHB granüllerinin varlığı faz-kontrast veya elektron mikroskobu kullanıldığında kolayca gözlenebilir (20). Yapılan çalışmalarda PHB granüllerinin 100-800 nm çapında olup, 2-4 nm kalınlığında bir zarla çevrili olduğu bulunmuştur (40,42). Granüller % 98 PHB ve % 2 protein içermektedir .

PHB düz lineer bir polimerdir. Zincir boyunca karbonil, oksijen ve metil gruplarının bulunduğu alifatik poliesterlerdir. Kristal yapıdaki PHB molekülleri sağ el heliks yapısındadır. PHB optik olarak aktif D(-)-3-hidroksiasitin makromoleküler bir polimeridir.

PHB 'nin biyosentezi

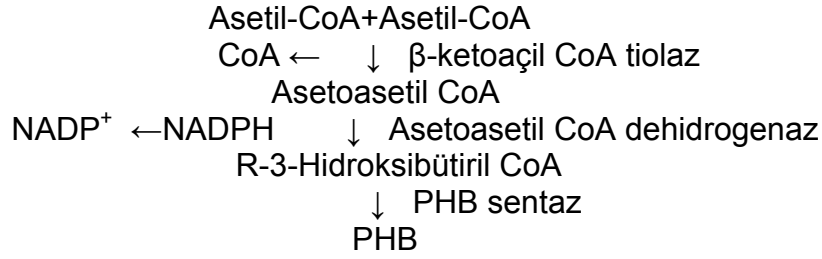
Poli- β -hidroksi bütirat (PHB), fazla karbon kaynağının varlığında, büyüme için gerekli azot kaynağı, oksijen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe vb.) gibi besleyici maddelerin eksikliğinde hücre içinde biriktirmektedir (25, 31, 36). Ancak *Rhizobium etli* (40) ve *Azotobacter vinelandii* UWD suşu (39) gibi bazı bakterilerde eksponansiyel gelişme devresinde de biriktirildiğini rapor etmişlerdir.

Yapılan araştırmalarda, büyüme ve PHB biriktirimi arasında yakın bir ilgi tespit edilmiştir. Buna göre, büyümenin eksponansiyel fazında PHB biriktirimi artmakta, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise maksimum düzeye ulaşmaktadır (35). Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir (41). Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (42, 43).

Polimerin biyosentezi, monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi, iki enzimatik aşama gerektirir. Üretim seviyesi, zincir uzunluğu ve oluşan kopolimerlerin kompozisyonu, bu enzimlerin performansına bağlıdır (17).

Prokaryot hücrelerde PHB ın hücre içi sentezi için başlangıç bileşiği, Asetil CoA dır. Substrat ve Asetil CoA nın hücre içi konsantrasyonunun artışıyla oluşan koşullar, PHB sentezinde pozitif bir etkiye sahiptir. Bu aynı zamanda PHB sentezini oldukça basitleştirmektedir. Çünkü enzimatik olarak katalizlenen reaksiyon, düzenleyici

mekanizmanın idaresi altındadır. PHB ın biyosentezi, üç değişik enzim tarafından katalize edilen, üç enzim reaksiyonundan oluşmaktadır (Şekil 2.) (34).



Şekil 2. PHB Sentezi (41).

Hücrede PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek Asetil-CoA ve düşük koenzim A olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu, mikroorganizmalara göre değişmekle birlikte azot, potasyum, sülfür veya oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır (44).

PHB nin biyolojik parçalanabilirliği

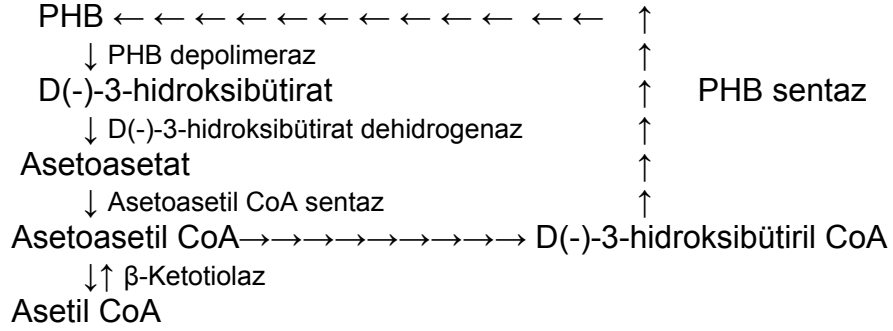
Termobiyoplastik maddenin toprakta mikroorganizma ile su ve karbondioksit parçalandığı bildirilmiştir. Parçalanma süresinin iki aya veya iki yıla kadar bazı katkı maddeleri ile kontrol edilebilir (45). PHB 'ın aerobik ortamdaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su; anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise karbondioksit ve metan gazıdır (46).

Sedimen nehir ağzından izole edilen anaerobik, çomak ve spor oluşturmeyen çubuk şeklinde bir bakterinin PHB yi parçalama yeteneğini araştıran araştırmacılar, bakterinin, PHB yi hidroliz ederek 3-hidroksibütirat oluşturduğu, oluşan maddenin de asetat, bütirat ve hidrojene dönüştüğü açıklanmıştır. Araştırmacılar, bakterinin ekstra depolimeraz enzimi ile PHB yi hidrolize ettiğini ve PHB nin bakteri hücrelerine bağlanmadığını, anaerobik bakterilerin PHB yi anaerobik koşullarda hidrolize edebileceğini tespit etmişlerdir (47).

PHB doğada mikroorganizmalar tarafından parçalanabilen bir plastik olduğundan ilgi görmektedir (48, 49)

PHB ın parçalanma süresi birkaç aydan (anaerobik), birkaç yıla (denizsu) kadar, katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanmada azot oksidi oluşmaması, çevre korunması açısından önemlidir. Parçalanmış biyoplastik, bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir (36). Polimerin parçalanmasında, bakteri, mantar ve yüksek organizmalar biyolojik faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon kimyasal faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir (36). PHB ve kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında, kısa bir periyot içerisinde tamamen CO₂ ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir. Tamamen parçalanma için gereken zaman ve biyoparçalanma oranının, kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal populasyon gibi etkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir .

Bazı araştırmacılar, topraktaki P(HB-HV) biyoparçalanırlık yüzdesinin toprağın çeşidi ve içerdiği su miktarına bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir (48). PHB in bakteriler tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi için depolimerize edilmesi gereklidir . Depolimerizasyon sonucunda oluşan 3-hidroksibütirik asitin, birçok organizma tarafından kullanılabilmesi bildirilmiştir (Şekil 3.).



Şekil 3. PHB in parçalanması ve sentezi (41).

PHB 'nin tespiti

Mikroorganizma uygun substratlarda üretilir, santrifüj veya filtrasyonla biyomas elde edilir, kurutulur ve ekstraksiyon (aseton, kloroform, hegzan) işlemleri ile PHB elde edilir. Elde edilen PHB sülfürik asitle krotonik aside dönüştürülür ve 235 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede absorbans okunur . Üretilen PHB asidik yöntemle hidrolize edildikten sonra, HPLC de fraksiyonlarına ayrımları sağlanabilir (51). Ayrıca, gaz kromatografisi yöntemi de PHB nin analizinde kullanılabilmesi bildirilmiştir (44).

PHB in hücrede teşhis ve konsantrasyonunun belirlenmesinde 1H NMR ve Gaz Kromatografisi analizi ve FTIR Spektroskopisi yöntemi de kullanılabilir (52). Canlı bakteri hücresinde PHB depo granüllerinin tespitinde kullanılan metodlardan biri de lipofilik boyalarla boyamadır. Bu amaçla Nile Blue A, Sudan Black B ve Sudan III gibi bazı floresan boyalar kullanılabilir (53).

PHB 'nin yenilenebilir özelliği

PHB in biyolojik yapısı ve biyolojik yıkıma uğraması kadar önemli olan, onun yenilenebilir kaynaklara dayalı üretilmesi gerçeğidir. Birçok mikroorganizma, doğal bir materyal olan bu polyesteri parçalama yeteneğindedirler ve polimer geri dönüştürülebilir bir biyoparçalanma gösterir (36).

PHB 'ın fermentatif üretimi, karbonhidrat ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır. Bu, tarımsal kaynaklı karbondioksit ve sudan meydana gelmektedir ve bunların biyoparçalanabilir PHB 'a çevriminden sonra, yıkım ürünleri yine karbondioksit ve sudur (40). Biyoplastiklerin yeniden oluşum devresi, sentez-parçalanma-sentez olarak gösterilmiştir. Bu devrede tabiatta gerçekleşebileceğinden çevre korunması açısından önemlidir (54).

Mikroorganizmalarda PHB üretimi

Günümüzde PHB depo eden 300 den fazla Gram negatif ve Gram pozitif bakteri tespit edilmiştir. *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* 'nin mutant suşları ve diğer birçok bakterinin PHB 'yi depoladığı bilinmektedir. Polimerin endüstriyel üretimi, uygun mikroorganizmanın seçimine, seçilen bakterinin gelişim oranı, polimer sentezi, depolamadaki maksimum oran ve ekonomik olmayan karbon kaynaklarının seçimi gibi birçok faktöre bağlıdır (41).

Alcaligenes eutrophus, endüstriyel PHB üretiminde en fazla kullanılan bakteri olup, hücre içinde yüksek miktarda PHB depoladığı (hücre kuru ağırlığının % 80 'i) tespit edilmiştir. İngilterede (Imperial Chemical Industries), *A. eutrophus* un endüstriyel biyoplastik üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (23).

A. eutrophus suşunun PHB biyosentez geninin *E. coli* 'ye klonlandığı ve alıcı bakteride gen ekspresyonunun gerçekleştiği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (31, 52).

Avustralya da Biyoteknoloji Araştırma Ünitesinde parçalanabilen biyoplastik üretimi ile ilgili teknik yöntemler geliştirilmiştir. Üretimde *Alcaligenes latus* 'un mutant tipleri kullanılmıştır. Adı geçen bakterinin normal koşullarda üretildiğinde hücre içi PHB depoladığı bildirilirken, bakteri pancar şekeri besi ortamındaki üretildiğinde PHB miktarının hücre kuru ağırlığının % 80'den fazla olduğu ve PHB ekstraksiyonundan sonra uygulanan çöktürme de PHB in saflığının % 99'dan fazla olduğu açıklanmıştır (38).

A. latus bakterisinin kopolimer (R) -3-hidroksibütirat ve 4-hidroksibütirat üretimleri de incelenmiştir. Bakteri % 1 sakkaroz ve % 0,02 gammabütirolakton besi ortamında 30 °C de 2 gün üretilmiştir. Sakkarozun 3HB ye dönüştüğünü ve bu maddenin bakteri hücre kuru ağırlığının % 58 kadar olduğunu ve (4HB) kopolimerin gammabütiro-laktondan meydana geldiğini, bu madde ile toplam polimerin % 60 a yükseldiğinin bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bakteri yalnız bütirolakton substratlarda üretildiğinde, bakterinin üremediği ve polimerin oluşmadığını bildirirken, 2 maddeyi içeren besiyortamına fruktoz şekeri ilave edildiğinde, bakteri üremesini sitümlü ettiği tespit edilmiştir (55).

Azotobacter vinelandii UWD mutant suşunun, eksponansiyel gelişme fazında hücre kuru ağırlığının % 75 i PHB dir (82). Şeker pancarı melasında, yüksek miktarda PHB depo edildiği de gösterilmiştir.

Brandl et al. (1988), *Pseudomonas oleovorans* bakterisinin hücre kuru ağırlığının % 49'u kadar polimer ürettiğini rapor etmişlerdir (56).

Metilotrofik bir bakteri olan *Pseudomonas extorquens* in PHB üretim yeteneği değişik karbon kaynakları içeren substratlarda araştırılmıştır. Bakterinin en yüksek PHB üretimi % 0.5 metanol içeren substratla hücre kuru ağırlığında % 27 olarak saptanmıştır (57) .

PHB üreten mikroorganizmalar

PHB özellikle *Alcaligenes sp.*, *Azotobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* ve çeşitli toprak mikroorganizmaları tarafından oluşturulmaktadır (39).

Yapılan çalışmalarda, *Alcaligenes eutrophus* bakterisinin fruktozu karbon kaynağı olarak kullanarak hücre kuru ağırlığının % 80 ininden fazlasını PHB olarak biriktirebildiği (36) ve *Alcaligenes eutrophus* un glikozu kullanabilen mutantlarının da PHB üretiminde kullanılabileceği bildirilmektedir.

Beaulieu ve arkadaşları (1995), *Alcaligenes DSM 545* suşunda % 3 glukoz ve farklı amonyum kaynakları ile şeker kamışı melasında PHB verimini araştırdıkları çalışmalarında, en iyi büyüme ve PHB üretiminin amonyum sülfat içeren besiyerinde olduğunu bildirmişlerdir (60). Araştırmada bakteri tarafından metabolize edilemeyen melas, karbon kaynağı olarak değil, sadece büyüme aktivatörü olarak kullanılmıştır. Optimal büyüme ve PHB üretiminin % 0,3 melas oranında sağlandığı rapor edilmiştir. Çalışmada ulaşılan en yüksek PHB verimi ise % 26 olarak tespit edilmiştir.

Nişasta gibi ucuz substratlardan PHB üretiminin araştırıldığı bir çalışmada *Azotobacter chroococcum* kullanılmış ve farklı oksijen konsantrasyonları altındaki PHB verimleri araştırılmıştır. Oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığını ve PHB veriminin % 20 den % 46 ya ulaştığı bildirilmiştir (59).

Metilotrofik organizmalardan olan bazı *Pseudomonas* ların da PHB üretimi araştırılmış ve bakterilerinde yüksek PHB verimi gözlenmiştir. *Ps. oleovorans*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* ve *Ps. testotereni*, n-alkoller ve n-alkanoik asitler kullanılarak PHB üretimi gözlenmiştir (20, 23).

Fakültatif metilotrof *Pseudomonas sp. 135* suşu üzerinde yapılan bir çalışmada metanol varlığında NH_4 ün sınırlı tutulduğu ortamda % 55, Mg^{+2} eksikliğinde % 42,5 ve PO^{3-} eksikliğinde ise % 34,5 oranında PHB verimi sağlandığı tespit edilmiştir (60).

Manna ve arkadaşları (1999), topraktan izole ettikleri 55 adet toprak *Streptomyces* üzerinde yaptıkları çalışmada, *Streptomyces griseorubiginosus* olarak tanımlanan izolatanın, % 2 glukoz varlığında durgun fazda bakterinin hücre kuru ağırlığının % 9,5i kadar PHB ürettiğini tespit etmişlerdir (61).

Uğur ve arkadaşları (2002), 27 adet *Streptomyces* izolatanının % 80 inin PHB ı % 0,3-7,6 oranında sentezlediğini tespit etmişlerdir (62).

Ayrıca bazı mezofilik ve termofilik laktik asit bakterilerinin PHB üretiminin % 0,52-25,55 oranları arasında olduğu tespit edilmiştir (63).

Rekombinant *E. coli*

Maksimum polimer üretimi için rekombinant organizmaların oluşturulması, PHA biyosentez genlerin transferi ile mümkün olmaktadır. Rekombinant sistemlerde polimerlerin yüksek konsantrasyonlarda üretimi, hiç kuşkusuz konukçu-plazmid sistemlerin ve üretim stratejilerinin gelişimine de bağlıdır. Buna ilaveten, etkili bir

Üretim için, yüksek kopya sayılı stabil plazmidlere gereksinim duyulduğu gibi test edilen farklı suşlar arasında uygun bir *E. coli* suşunun da seçiminin önemli olduğu bildirilmiştir (36, 41).

Ralstonia eutropha, önemli bir PHB reticisi olmasına rağmen, bakterinin , besiortamında yavaş gelişmesi, kolay lize olması ve genetik yönden tam olarak karakterize edilmemesi gibi problemler, PHB nin ticari gelişimini engellemektedir (36).

PHB nin üretimindeki bu tür engeller, rekombinant sistemlerle aşılmaya çalışılmaktadır. Bu tür çalışmalar için PHB yi doğal olarak sentezleyemeyen *E.coli* suşları kullanılmaktadır (41).

E.coli de ilk kez PHB genleri eksprese olmasına rağmen, birçok araştırıcı PHB dışında PHB-co-PHV gibi diğer kopolimerlerde sentezlediklerini açıklamışlardır (20).

Rekombinant *E.coli* de depo edilen PHB, fermentasyon sonunda hücre kuru ağırlığının %80-90 ını oluşturmaktadır (36).

Peyniraltı suyu gibi ucuz substratlardan PHB üretiminin, bir rekombinant *E. coli* suşu kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada farklı oksijen konsantrasyonları altındaki PHB verimleri araştırılmıştır. Oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığı tespit edilen araştırmada, yüzde PHB verimi % 80 e varmıştır. Araştırmacılar, rekombinant biyosentez *E. coli* de PHB biyosentez ve oksijen sınırlandırılma sürelerinin PHB verimi için önemli olduğunu belirtmişlerdir (59).

Klinke ve arkadaşları (1999) da şeker veya melas gibi ucuz karbon kaynaklarından, rekombinant *E. coli* yardımıyla PHA retimi için alternatif stratejiler yapılabileceğini ve *E. coli* nin kısa sürede reme, PHA ın kolayca saflaştırılabilmesi, polimeri parçalayıcı enzim sisteminin yokluğu nedeniyle dikkat çektiğini açıklamışlardır (64).

Ahn ve arkadaşlarının (2000), *Alcaligenes latus* PHA biyosentez genlerini kopyaladıkları *E.coli* CGSC 4501 suşunun, peynir altı suyundan ürettiği PHB miktarını tespit ettikleri çalışmalarında, yüzde PHB veriminin yaklaşık % 60 civarında olduğunu tespit etmişlerdir (32).

Bitkiler birer PHB reticisi olmamalarına karşın, PHB genlerinin taşıyıcısı olabildiklerinden, PHB üretebildikleri ve bu nedenle, transgenik bitkilerin çok miktarda ve ucuz PHB retimi için potansiyel organizmalar olduğu bildirilmiştir (34, 64). Yapılan çalışmalarda bunlardan, kuru ağırlıklarının % 20-40 arasında PHB elde edildiği bildirilmiştir (64).

***Bacillus* cinsinde PHB retimi**

Çeşitli araştırıcılar, biyoplastik retiminde *Bacillus* biyopolimerlerinin potansiyel gelecek uygulamalar için kullanılabileceğini bildirmektedirler (55, 65). Lemoigne (1927), 1920 li yıllarda, topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu 3-hidroksi btirikaside rastlamış ve bunu rezerv maddesi olan poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri olarak tanımlamıştır (44). Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae

ve Wilkinson (1958), *Bacillus* hücrelerinde PHB sentezi ve parçalanmasını sağlayan hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır (66). PHB biyosentez genlerinin kromozomda veya plazmid DNA da kodlu oldukları bildirilmiştir.

Savenkova ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, toprak mikroorganizmaların PHB i parçalayan başlıca mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bu mikroorganizmalar arasında en önemli bakteri cinsleri *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus* ve *Streptomyces* ile funguslar arasında ise *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Paecilomyces* ve *Trichoderma* olduğunu bildirmişlerdir (67). Ekonomik biyoplastik üretimi için ucuz substratlar olarak melas, arpa, soya gibi atık sular ve peynir altı suları kullanılmaktadır (32). Yapılan bir araştırmada; *Bacillus* cinsi bakterilerin melas da hızlı gelişerek, PHB ürettikleri anlaşılmıştır (68).

Azotobacter beijerinckii bakterisinin kasein pepton, maya özütü, kasamino asit ve üre gibi azot kaynakları ile birlikte glukoz veya sükröz gibi karbon kaynaklarının kombine edildiği besiyerlerindeki PHB üretiminin % 50 olduğu bulunmuştur (69). Diğer bir çalışmada ise *Pseudomonas extorquens* DMS 1337 ün % 22,98 oranında ve *Azotobacter chroococcum* (TEM) in % 12,10 oranında pancar içeren besiyerindeki PHB üretimleri belirlenmiştir (70).

Başka bir çalışmada ise *A. eutrophus* DSM 545 suşunun % 3 glukoz ve farklı amonyum kaynakları ile şeker kamışı melasındaki PHB üretimine bakılmış ve en iyi PHB ürtimini amonyum sülfat içeren besiyerinde olduğu gözlenmiştir (58).

Macrae ve Wilkinson (1958), *B. megaterium* un özellikle glukozun azota olan oranının yüksek olması durumunda PHB in, hızlı bir şekilde sentezlendiğini ve ortamda karbon ve enerji kaynağı azaldığında hızla parçalandığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, PHB in sentez aşamasında asetat ve Koenzim A kompleksi varlığına bağlı olduğunu da bildirmişlerdir (66).

Daha sonraları yapılan araştırmalarda, *Bacillus 'lann* melas gibi ucuz substratlarda hızlı bir şekilde geliştiği, yüksek sıcaklık ve osmotik basınca dayanıklı oldukları ancak hücre duvarı yapılarının kalın oluşu nedeniyle PHB ekstraksiyonun kolay olmadığı bildirilmiştir. Yine de avantajlı özelliklerinden yararlanılarak ve endüstriyel PHB üretimini gerçekleştirmek amacıyla uygun suşların tespiti araştırmaları devam etmektedir .

Bacillus türlerinde PHB sporulasyon için enerji rezervi olarak işlev göstermektedir. Örneğin, *B. cereus* da spor oluşumundan hemen önce PHB birikiminin maksimum oranda olduğu ve bakterinin sporulasyon döneminde PHB in kullanıldığı bildirilmektedir (42).

Benoit ve arkadaşları (1990), *B. thuringiensis* üzerinde yaptıkları çalışmada, durgun fazdaki sporulasyon sırasında PHB in tüketilmeye başladığını ve PHB in spor şekillenmesi sırasında enerji kaynağı olarak kullanıldığını bildirmişlerdir (43).

Kato ve arkadaşları (1992), yaptıkları çalışmada, *B. megaterium* da 3-hidroksibütirik asit trimer yapılarının geç ekspanansiyel fazda biriktirildiğini bildirmişlerdir (71).

B. megaterium 11561 suşunda gelişimin lag fazında PHA yıkımı, eksponansiyel fazda ise sentezin arttığı, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise PHA birikiminin maksimum düzeye ulaştığı ve bu oranın durgun fazın devamı boyunca gittikçe azaldığı bildirilmiştir (35). Araştırmalarda, bazı *Bacillus* suşlarının PHB ı hücre kuru ağırlıklarının % 50 sinden fazla biriktirebildiği bildirilmektedir (55, 72, 73).

Chen ve arkadaşları (1991), zenginleştirilmiş besiyerinde geliştirilen *Bacillus* bakterilerinde hücre kuru ağırlıklarına göre % 5-20 arasında PHB biriktirebildiği bildirmektedirler (72).

Bacillus 'lar genel olarak 0,2-0,5 µm çapında olan inklüzyon cisimciklerinin dış membranının 2 nm olduğu ve cisimciklerin % 97 sinin PHA, % 1,87 sinin protein ve % 0,46 sinin ise lipid içerdiği gösterilmiştir (35), Dunlop ve Robards (1973) ise, *B. cereus* ile yaptıkları çalışma sonucunda 240-720 nm büyüklüğünde olan PHB granüllerinin iç kısımda 140-270 nm çapında bir çekirdek ve onu saran bir kılıf ve en üst kısımda ise bir zarla çevrili olduğunu belirtmişlerdir (80).

PHB 'nin Kullanım Alanları

PHB ın biyolojik parçalanabilirliği, biyolojik uyum yeteneği ve toksik olmayışı sayesinde endüstriyel uygulamalarda kolayca kullanılabileceği bildirilmektedir (27). Kolay şekil alma ve parçalanabilme özellikleri nedeniyle PHB, daha çok paketleme malzemesi olarak kullanılmaktadır (36). Ancak biyoyuym yeteneklerinin de olması, implantasyon maddesi olarak kullanımını da her geçen gün arttırmaktadır (81).

Biyobozunur plastiklerin paketleme, gıda, tıp, eczacılık ve tarımdaki kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır (41);

- Paket filmleri, poşetler, torbalar, gıda korunmasında kullanılmak üzere tepsiler ve çeşitli kaplar,
- Şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamaları,
- İlaç, tablet, insektisit, herbisit ve gübrenin uzun sürede, belli hızda saliverilmesi için biyoparçalanır taşıyıcılar,
- Bir defa kullanılan tıraş bıçağı, çatal, bıçak, tabak gibi mutfak kapları ve bebek bezleri,
- Cerrahi pens, eldiven, önlük ve maske,
- Kemik değiştirilmesi ve Cerrahi plakalar,
- Pansuman sargısı,
- Kan damarı değiştirilmesi,
- Bitki sulama boruları, bitki yapraklarının kaplanması,
- Kemik büyütülmesi ve tedavisi,
- Kiral bileşenler üretimi için başlatıcı materyaller,
- Taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı koruma veya parlaklık sağlama, aroma kaybını önleme amacıyla kullanım,
- Bazı kimyasal maddelerin eldesi.

PHB 'nin Ucuz Üretimi

PHB üretiminin ticari üretimini ve pazarlanmasını sınırlandıran başlıca faktörlerden biri üretimde kullanılan karbon substratının özellikle de şeker substratının fiyatıdır. Polimer üretiminin her bir tonu için 3 ton glukoz kullanılması gerektiği bildirilmektedir (21). Maliyet fiyatını düşürmek amacıyla rekombinant türler üzerinde çalışılmasının yanı sıra, farklı ve ucuz karbon kaynakları kullanarak yüksek PHB üreten suşların tespiti üzerinde de çalışılmaktadır (82).

Ekonomik biyoplastik üretimi için melas (21, 28, 68, 83), ksiloz, arpa ve soya atık suları (84) ve peynir altı suyunun (32) kullanılması araştırılmaktadır. Özellikle melas, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır (58). Ucuz karbon kaynakları ve hatta peyniraltı suyu gibi atıklardan PHB üretimi yapılarak verimin artırılması amaçlanmaktadır. Ahn ve arkadaşları (2000), rekombinant *E. coli* kullanarak peynir altı suyundan yüksek PHB verimi alındığını bildirmişlerdir (32). Kim (2000) ise çalışmasında, rekombinant *E.coli* yi peynir altı suyunda geliştirmiş ve %20 oranında PHB verimi; *Azotobacter chroococcum* u ise nişasta içeren besi ortamında geliştirerek, oksijeni sınırlandırılmış şartlar altında %46 oranında PHB verimi elde etmiştir (59).

Melas

Şeker endüstrisinin bir yan ürünü olan melas, kristalize şekerin eldesinden sonra şeker imali ve rafinesinin son ürünü olarak da tanımlanabilir. Dünyadaki melas üretiminin % 75 i şeker kamışından (*Saccharum officinarum*), geri kalanının en büyük kısmı ise şeker pancarından (*Beta vulgaris*) elde edilmektedir. Dünyadaki melas üretimi 1990 lı yılların sonunda 46 milyon ton olduğu bildirilmektedir. Şeker teknolojisinde işlenen pancara göre yaklaşık % 4-5 oranında melas elde edilir. Melasın bileşimi bitki türüne, mevsim ve toprak şartlarına, hasata, şeker rafinasyon işlemlerine ve melas depolama koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Dünya melas üretiminin yaklaşık üçte biri şeker üretiminden gelmektedir. 100 ton şeker kamışının işlenmesi sonucu 3-4 ton; 100 ton şeker pancarının işlenmesinden ise 4-6 ton melas elde edilmektedir (17).

Melasın esas içeriği, glukoz ve fruktoz monosakkaritlerinin bir araya gelmesiyle oluşan sükroz disakkaritidir. Burrows (1970), şeker pancarı melasının yoğun miktarda sükrozun yanı sıra, rafinoz şekeri de bulundurduğunu, bunların yanı sıra birçok mineral ve vitamin içerdiğini de bildirmiştir (85). İndirgen şeker olarak kamış melasında %12-35 oranında glukoz ve fruktoz vardır. Trisakkarit olan rafinoz, pancar melasında %2 konsantrasyona kadar bulunabilir. Melasta bulunan şeker dışındaki organik maddelerin başlıcaları; azotlu maddeler, organik asitler, nişasta ve pentozanlar gibi kompleks karbohidratlardır. Ayrıca mumsu maddeler, steroller ve pigmentler de az miktarda bulunur. Melasta bulunan azotlu maddeler aminoasitler, amidler ve diğer basit azotlu maddelerdir. Şeker pancarı melasında baskın halde bulunan azotlu maddeler betain ve glutamik asittir ve bu bileşikler melasın karakteristik koku ve lezzetinin büyük bir kısmını oluştururlar. Melasta bulunan azotun ancak %40-60 kadarı mikroorganizmalar tarafından kullanılır, bu nedenle amonyum tuzları, sıvı amonyak veya üre ortama katılarak azot zenginleştirilmesi yapılır (86,87).

Asetik asit, bütirik asit, formik asit ve propiyonik asit, melasta bulunan organik asitlerdir. Melasta % 4-11 arasında inorganik bileşikler vardır. Bunlar potasyum, sodyum, demir, sülfat, magnezyum, kalsiyum, klorür ve fosfatlardır. Pancar melasında genellikle potasyum oranı yüksektir. Melasta biyotin, pantotenik asit, inositol, tiyamin, riboflavin, nikotinik asit, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler vardır (85).

Melasın endüstriyel fermentasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır ancak kompleks bir substrat olduğu için bazı toksik maddeler ve mineral maddeler de içerir. Bu maddelerin yüksek konsantrasyonları da inhibitör etki yapar (85).

Melasın Bileşimi

Pancar melasının ortalama bileşenleri, kuru madde- %78-85; Toplam Şeker-%48-58; Sakaroz- %51; Glukoz--; Fruktoz--; Rafinoz-%>1; Toplam Azot-%0-2,8; α -Amino azot-%0,36; Fosfor, P_2O_5 -%0,02-0,07; Kalsiyum, CaO- %0,15-0,7; Magnezyum, MgO- %0,01-0,1; Potasyum, K_2O - %2,2-5,0; Çinko, Zn-30-50 $\mu\text{g/g}$; Toplam Karbon, C-%28-34; Toplam inorganik madde-%4-11; Kükürt, SO_3 -%0,3-0,4; Biyotin-0,01-0,13 $\mu\text{g/g}$; Kalsiyum pantotenat-40-100 $\mu\text{g/g}$; İnositol-5000-8000 $\mu\text{g/g}$; Tiamin-1-4 $\mu\text{g/g}$; Pridoksin-2,3-5,6 $\mu\text{g/g}$; Riboflavin-0-0,75 $\mu\text{g/g}$; Nikotinamid-37-51 $\mu\text{g/g}$; Folik asit-0,21 $\mu\text{g/g}$ (83).

Melasın PHB üretiminde kullanılması

Ticari bir ürün olan melas, glukozdan daha ucuzdur ve maya fermentasyonunda karbon kaynağı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Melas besi ortamında *A. eutrophus*, *Azotobacter vinelandii* ve rekombinant *E.coli* nin PHA üretimi de son yıllarda çalışılmaya başlanmıştır (21, 28, 31, 58).

Şeker pancarı melası, *Azotobacter vinelandii* UWD suşunda PHA üretimi için besiyortamı olarak kullanılmış ve rafine edilmemiş şeker kaynaklarının en iyisi olduğu açıklanmıştır (21, 28). Bakteride % 10 melas konsantrasyonunda polimer üretimi gerçekleşmezken, ortama ekstra nutrientlerin ilavesi UWD suşunun gelişimine uyarıcı etki yapmış ve hücrede PHA biriktirdiği görülmüştür. Bakteri % 2 sükröz içeren % 5 melasta 1g/l PHA sentezlemiştir. Kültür ortamında ilk 10 saatte polimer üretimi oldukça azken, 35 saat ve sonrasında PHA miktarında artış olduğu açıklanmıştır. Melasa öncü olarak valerat ilave edildiğinde β -hidroksivalerat içeren kopolimerlerin üretildiği de tespit edilmiştir. Sonuç olarak PHA/PHB üretimi üzerine saf olmayan şeker kaynaklarının arttırıcı bir etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (21).

A.eutrophus DSM 545 suşu, % 3 glukoz, çok sayıda amonyum substratları ve şeker pancarı melasında pH 7,0 de geliştirilmiş ve bakterideki PHB içeriği gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. En iyi hücre gelişimi ve PHB üretimi amonyum sülfatlı ortamda elde edilmiştir. Gelişme faktörü olarak melasa amonyum sülfat ilave edildiğinde % 0,3 melas konsantrasyonunda optimal PHB (% 17-26) depolandığı bildirilmiştir (58).

Liu et al. (1998), rekombinant *E.coli* nin tek karbon kaynağı olarak melastaki PHB üretim yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, yüksek melas konsantrasyonlarında PHB üretiminin arttığını açıklamışlardır. 35 saat sonra bakteri kuru ağırlığının % 80 inin PHB olduğunu rapor etmişlerdir. Glukoz yerine melas kullanımının daha ucuz ve ekonomik olacağı sonucuna varmışlardır (31).

Page (1992a), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun şeker pancarı melasında yüksek PHB verimine sahip olduğunu saptamıştır (17). Ayrıca *Bacillus* cinsi bakterilerin de melasda hızlı bir şekilde geliştiği ve PHB ürettiği bildirilmektedir (68).

PHB üretimi, bakteriler için uygun üreme ortamı sağlandığında artmaktadır. Araştırmalarda, PHB seviyesinin, besiyeri içeriği ve kullanılan substratlar gibi bazı faktörler tarafından sınırlandırılabilceği bildirilmektedir (38, 72).

Wu ve arkadaşları (2001), melaslı besiyerindeki oksijen şartlarını değiştirerek yaptıkları çalışmada, oksijen miktarındaki azalmanın sporulasyona neden olduğunu ve PHB üretiminin düştüğünü; azot ve fosfor oranının karbona göre düşük olduğu besiyerlerinde ise PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. Jma5 suşunun, PHB verimini % 25-35 olarak tespit etmişlerdir (68).

Gouda ve arkadaşları (2001), şeker kamışı melası ve mısır suyunu karbon ve azot kaynağı olarak kullanarak *B. megaterium* da PHB üretimini incelemişler ve en yüksek PHB miktarının melas ve glukoz içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hücre gelişiminin en iyi olduğu melas yüzdesinin %3 olmasına rağmen, en yüksek PHB verimi olan % 46,2 lik oranın % 2 melas içeren besiyerinden elde edildiğini bildirmişlerdir (83).

Kaynaklar

1. Ren, Q., Kessler, B., vander Leij, F. and Witholt, B., (1998) "Mutants of *Pseudomonas putida* affected in poly-3-hydroxyalkanoate synthesis" , Applied of Microbiology and Biotechnology, 49: 743-750.
2. Zinn, M., Wiltholt, B. and Egli, T., (2001) "Occurence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate" , Advanced Drug Reviews, 53: 5-21.
3. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., (1974) "Bergeys manual of determinative bacteriology, 8th edition" , The Williams Company, Baltimore, 12146.
4. Taubman, S., (1992) "Genus *Bacillus*", Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356..
5. Bonwart, G. J., (1989) "Basic Food Microbiology", Van Nostrand Reinhold, New York, 773.
6. Turnbull, P. C. B. and Kramer, J. M., (1991) "*Bacillus*: Manual of Clinical Microbiology, Fifth Edition" , Balows, A., Hauster, J. R., Herman, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J., American Society of Microbiology, Washington D.C., 296-303.
7. <http://www.sgmbiotech.com/Technical/Spore Photos/megaterium.htm>
8. Rosovitz, M., J., Voskuil, M., I., Chambliss, G., H., (1998) "*Bacillus*, Topley and Wilson s Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, Ninth Edition, Volume 2", by edited L. Collier, A. Balows and M. Susman, Oxford University Pres, New York, 1152-1162.
9. Wipat, A. and Harwood, C. R., (1999) "The *Bacillus* genome sequece: the molecular blueprint of a soil bacterium" , FEMS Microbiology Ecology, 28: 1-9.

10. Ishib, T. and Ohba, M., (1993) "Characterization of mosquito specific *Bacillus thuringiensis* strains coisolated from a soil population" , Systematic Applied Microbiology, 16 (3): 494-499.
11. Young, C. S., Lethbridge, G., Shaw, L. J. and Burns, R. G., (1995) "Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in nonplanted and rhizosphere soil" , Soil Biol. Biochem., 27 (8): 1017-1026.
12. Nicholson, W. L. and Law, J. F., (1999) "Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural Sonoran desert soil populations of *Bacillus* spp. with reference to *B.subtilis* strain 168" , Journal of Microbiological Methods, 35: 13-21.
13. Massle, J., Roberts, G. and White, P. J., (1985) "Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from soil by use of acetate as the only major source of carbon" , Applied and Environmental Microbiology, June: 1478-1481.
14. Sneath, P. H. A., (1986) "Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2", edited by P. H. A Sneath, N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G. Holt, Williams and Wilkins, Baltimore, 1104-1139, Baltimore.
15. Burke, W. F., McDonald, K. O. and Davidson, E. W., (1983) "Effect of UV light on spore viability and Mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593" , Applied and Environmental Microbiology, Oct: 954-956.
16. Chilcott, C. N. and Wigley, P. J., (1993) "Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand" , Journal of Invertebrate Pathology, 61: 244-247.
17. Yılmaz, M., (2003) "Topraktan izole edilen *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı metabolik özelliklerinin belirlenmesi, plazmid DNA ve protein profillerinin incelenmesi", Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,.
18. Mignone, C. F. and Avignone-Rossa, C., (1996) "Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*" , Appl. Microbiol. Biotechnol., 46: 78-88.
19. Sgarrella, F., Poddie, F. P. A., Meloni, A. M., Sciola, L., Pippia, P. and Tozzi, M. G., (1997) "Channelling of deoxyribose moiety of exogenous DNA into carbohydrate metabolism: role of deoxyriboaldolase" , Comp. Biochem. Physiol. , 117 B (2): 253-257.
20. Anderson, A. J. and Dawes, A. E., (1990) "Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates" , Microbiol. Rev., 54 (4): 45-472.
21. Page, W. J., (1992a) "Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD" , Biotechnol. Lett., 14 (5): 385-390.
22. Matsuo, T., Mino, T., Sato, H., (1992) "Metabolism of organic substances in anaerobic phase of biological phosphate uptake process" , Water Sci. and Technol., 25: 83-92.
23. Holmes, P. A., (1985) "Applications of PHB-A Microbially produced Biodegradable Thermoplastic" , Phys. Technol., 16: 32-36.
24. Howells, E. R., (1982) "Opportunities in biotechnology for the chemical industry" , Chem. Ind., 8: 508-511.
25. Byrom, D., (1987) "Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economics" , Trends Biotechnol., 5: 246-250.
26. Emsly, J., (1991) "Biodegradable plastic" , New Scientist, 50: 1-4.
27. Steinbüchel, A., (1991) "Recent advances in the knowledge of the metabolism of bacterial polyhydroxyalkanoic acids and potential impacts on the production of biodegradable thermoplastics" , Acta Biotechnol., 11 (5): 419-427.

28. Page, W. J., (1992b) "Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture" , FEMS Microbiology Reviews, 103: 149-158.
29. Valentin, H. E., Lee, E. Y., Choi, C. Y. and Steinbüchel, A., (1994) "Identifications of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria" , Appl. Microbiol. Biotechnol., 40: 710-716.
30. King, P. P., (1982) "Biotechnology, an industrial view" , J. Chem. Technol. Biotechnol., 32: 2-8.
31. Liu, F., Li, W., Ridgway, D. and Gu, T., (1998) "Production of poly- β -hydroxybutyrate or molasses by recombinant *Escherichia coli*" , Biotechnology Letters, 20(4): 345-348.
32. Ahn, W. S., Park, S. J. and Lee, S. Y., (2000) "Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution" , Appl. and Environ. Microbiol., 66 (8): 3324-3627.
33. Molitoris, H. P., Moss, S. T. and de Koning, G. J. M., (1996) "Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria" , Appl. Microbiol. Biotechnol., 46: 570-579.
34. Poirier, Y., (2002) "Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism" , Progress in Lipid Research, 41 (2): 131-155.
35. McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N. and Cannon, M. C., (1996) "Polyhydroxyalkanoate inclusion body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*" , FEMS Microbiol. Lett., 138: 41-48.
36. Madison, L. L., Huisman, G. W., (1999) "Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic" , Mic. Mol. Bio. Reviews, 63: 21-53.
37. Kayın, E., (2001) "Bazı atasal ve muhtemel mutant bakterilerin termobiyoplastik (PHB) üretimlerinin incelenmesi" , Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,.
38. Beyatlı, Y., (1996) "Mikrobiyal Termoplastik Üretimi", KÜKEM Dergisi, 19 (2): 23-32.
39. Jan, S., Roblot, C., Courtois, B., Barbotin, J. N. and Seguin, J. P., (1996) "¹H NMR spectroscopic determination of poly-3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass" , Enzyme and Microbial Technol., 18: 195-201.
40. Encarnacion, S., Dunn, M., Willims, K. and Mora, J., (1995) "Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*", Journal of Bacteriology, 177 (11): 3058-3066.
41. Lee, S. Y., (1996) "Bacterial Polyhydroxyalkanoates" , Biotechnology and Bioengineering, 49: 1-14.
42. Nickerson, K. W., Zarnick, W. J. and Kramer, V. C., (1981) "Poly- β -hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*" , FEMS Microbiology Letters, 12: 327-331.
43. Benoit, T. G., Wilson, G. R. and Baugh, C. L., (1990) "Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1" , Lett. in Appl. Microbiol., 10: 15-18.
44. Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. L., (1998) "Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and Engineering aspects" , Journal of Biotechnology, 65: 127-161.
45. Annon, (1994) "Biodegradable plastic using lactic acid bacteria" , Genetic Eng. and Biotechnol. Monitor, 1: 64.
46. Budwill, K., Fedorak, P. M., Page, W. J., (1996) "Anaerobic microbial degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) with various terminal electron acceptors" , Journal of Environmental Polymer Degradation, 4 (2): 91-102.

47. Janssen, P. H. and Harfoot, C. B., (1990) "Ilyibacter delafieldi sp- nov- 1, ametabolically restricted anaerobic bacterium fermenting PHB" , Arch. of Microbiol., 154: 253-259.
48. <http://www.monsterdesign.co.kr/image/bioplastic.jpg>
49. <http://www.mediaworkshop.org/techcamp/groupb/geology/bioprocess.gif>
50. Yakabe, Y., Nohara, K., Hara, T., Fujino, Y., (1992) "Factors affecting the biodegradability of biodegradable polyester in soil" , Chemosphere, 25 (12): 1879-1888.
51. Yatazaw, M., Yoshida, S., Maeda, E., (1984) "Fine structure of root nodules of *Aeschynomene indica* L" , Soil Sci. and Nut., 30: 405-416.
52. Yan, Y., Wu, Q., Zhang, R., (2000) "Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ¹³C NMR" , FEMS Microbiology Letters, 193: 269-273.
53. Bonartseva, G. A., Myskina, V. L., (1985) "Fluorescence intensity of strains of nodule bacteria (*Rhizobium melliloti*, *R.phaseoli*) differing in activity, grown in the presence lipophilic vital stain phosphine 3R" , Microbiol., 54 (4): 535-541.
54. Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J. D., (1996) "Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403" , Indian J. of Exper. Biology, 34: 216-219.
55. Hiramitsu, M., Koyaman, N. and Doi, Y., (1993) "Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*" , Biotechnology Letters, 15: 461-646.
56. Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W. and Fuller, R. C., (1998) "*Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters" , Applied and Environmental Microbiology, 54 (8): 1977-1982.
57. Karaboz, İ., Umay, F. B., (1994) "*Pseudomans extorquens* den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi" , XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Edirne, 14-17.
58. Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., Goulet, J., (1995) "Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate" , Applied and Environmental Microbiology, 61 (1): 165-169.
59. Kim, B. S., (2000) "Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates" , Enzyme and Microbial Technology, 27: 774-777.
60. Daniel, M., Choi, J. H., Kim, J. H., Lebeault, J. M., (1992) "Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly-β-hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135" , Appl. Microbiol. Biotechnol., 37: 702-706.
61. Manna, A., Banerjee, R. and Paul, A., (1999) "Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*" , Current Microbiology, 39: 153-158.
62. Uğur, A., Şahin, N., Beyatlı, Y., (2002) "Accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Streptomyces* species during growth with different nitrogen sources" , Turk. J. Biol., 26: 171-174.
63. Yüksekdağ, Z. N., Beyatlı, Y., Aslım, B., (2003) "Determination of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) production by some mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria" , Turk. J. Biol., 27: 37-42.
64. Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B., (1999) "Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from gluconate by recombinant *Escherichia coli*" , Applied and Environmental Microbiology, 65 (2): 540-548.
65. Labuzek, S., and Radecka, I., (2001) "Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85" , Journal of Applied Microbiology, 90: 353-357.

66. Macrae, R. M. and Wilkinson, J. F. (1958) "Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*" , The Journal of General Microbiology, 19: 210-222.
67. Savenkova, L., Gercberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I. and Kalnin, M., (2000) "Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB- based films" , Process Biochem., 35: 573-579.
68. Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K., Chen, G., (2001) "Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Jma5 cultivated in molasses media" , Antonie van Leeuwenhoek, 80: 111-118.
69. Bormann, E. J., Leissner, M. and Beer, B., (1998) "Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates" , Applied of Microbiology and Biotechnology, 49: 84-88.
70. Ateş, M. ve Ekmekçi, S., (2001) "Pancar melası kültüründe *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)dan PHB üretimi" , Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25: 61-70.
71. Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. Nad Sakazawa, C., (1992) "Production of 3-Hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124" , Jour. Ferment. and Bioeng., 73 (3): 246-247.
72. Chen, G.Q., König, K-H., Laffery, R.M., (1991) "Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*" , FEMS Microbiol. Lett., 84: 173-176.
73. Beyatlı, Y., Aslım, B., Mumcu, Z. N., (1999) "Doğada Parçalanabilen Termobiyoplastiklerin Üretimi" , Devlet Planlama Teşkilatı Projesi (DPT:97K121150), Ankara, 21-37.
74. http://www.toyota.co.jp/en/environmental_rep/03/special/image09.jpg
75. http://www.m-osaka.com/en/exhibitors/018/img/018_03.jpg
76. http://www.nrel.gov/clean_energy/images/09926.jpg
77. <http://www.speakeasy.org/~jessamyn/baking/MOLASSES.jpg>
78. <http://waltonfeed.com/self/pic/molasses.jpg>
79. <http://www.michigansugar.com/images/products/byprod.jpg>
80. Dunlop, W. F., Robards, A. W., (1973) "Ultrastructural Study of Poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*" , J. Bacteriol. 114 (3): 1271-1280.
81. Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K. P., Becher, B., (2001) "Laser cutting: influence on morfological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate" , Biomaterials, 22: 2447-2452.
82. Witholt, B., Kessler, B., (1999) "Perspectives of medium chain lenght poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics" , Current Opinion in Biotechnology, 10: 279-285.
83. Gouda, M. K., Swellam, A. E., Omar, S. H., (2001) "Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn step liquor as sole carbon and nitrogen sources" , Microbiological Research, 156 (3): 201-207.
84. Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W., Yu, P. H., (2001) "Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge" , Applied Biochemistry and Biotechnology, 91-93: 515-524.
- 85 Burrows, S., (1970) "Bakers yeast" , Rose, A.H. and Harrison, J.S. (Eds), Academic Pres, London and New York, 365-369.

86. Göksungur, Y., (1998) "Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu", Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bil. Enst. Gıda Müh. A.B.D., İzmir, 19-63.
87. Katırcıoğlu, H. ve Aksöz, N., (1996) "Tek hücre proteini eldesi ve bunun *Drosophila* gelişimine etkisi" , Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 16 (2): 37-44.
88. Page, W. J. and Knosp, O., "Hyperproduction of Poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD" , Appl. Environ. Microbiol., .55 (6): 1334-1339 (1989).