

Vicia Sativa L.'nin Kök Nodül Bakterilerinin Poli- β -Hidroksibütirik Asit (PHB) Üretimi

Çiğdem KÜÇÜK^{1*}, Cenap CEVHERİ¹, Mehmet AVCI²

¹Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

²Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 19.04.2016

Kabul Tarihi: 04.05.2016

Özet: Bu çalışmada, *Vicia sativa* L.'nin kök nodül bakterilerinde poli- β -hidroksibütirik asit (PHB) üretimleri incelenmiştir. Bu izolatların poli- β -hidroksibütirik asit (PHB) üretimi, kuru hücre ağırlığına bağlı olarak 0.100-0.428 g/l (w/v) arasında belirlenmiştir. En yüksek PHB verimi V1 izolatında (%77.3) bulunmuştur. İzolatlarda poli- β -hidroksibütirik asit döngüsünde rol oynayan iki enzim aktiviteleri incelenmiştir. En yüksek β -ketothiolaz aktivite V15 izolatında, en yüksek β -hidroksibütirat dehidrogenaz aktivite ise V3 izolatından alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kök nodül bakterileri, poli- β -hidroksibütirik asit (PHB), β -ketothiolaz aktivite, β -hidroksibütirat dehidrogenaz aktivite

Poly- β -Hydroxybutyric Acid (PHB) Production of Root Nodule Bacteria of *Vicia Sativa* L.

Abstract: In this study, the productions of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) on root nodule bacteria of *Vicia sativa* L. were examined. Poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) production by these isolates ranged from 0.100-0.428 g/l (w/v) depending on the dry cell weight. The highest PHB yield was found in V1 isolate (77.3%). The activities of two enzymes of poly- β -hydroxybutyric acid cycles were measured in isolates. The highest β -ketothiolase activity was found in V15 isolate and the highest β -hydroxybutyrate dehydrogenase activity was found in V3 isolate.

Keywords: Root nodule bacteria, poli- β -hydroxybutyric acid (PHB), β -ketothiolase activity, β -hydroxybutyrate dehydrogenase activity

Giriş

Uygun olmayan gelişme koşullarında mikroorganizmaların biyomolekülleri depoladıkları bilinmektedir (Laffery ve ark., 1998). En iyi bilinen ve en çok çalışılan metabolit; poli- β -hidroksibütirik asit (PHB) olarak adlandırılan, karbonca zengin alifatik poliesterlerdir (Laffery ve ark., 1998). Poli- β -hidroksibütirik asit (PHB) granülleri, mikroorganizmalarda karbon ve enerji kaynağı olarak rol oynamaktadır (Nair ve ark., 1993; Kim ve Copeland, 1996). Baklagil bitkileri ile *Rhizobium* bakterileri arasındaki simbiyotik moleküler azot fiksasyonunun çok fazla miktarda enerji harcanmasına yol açtığı belirlenmiştir (Bonartseva ve ark., 1985; Kim ve Copeland, 1996). PHB'nin, simbiyotik azot fiksasyonunda enerji kaynağı olarak görev yaptığı, anaerobik ve mikroaerobik koşullar altında TCA (trikarboksilik asit) döngüsü aktif olmadığı da, karbonhidrat metabolizmasında rol oynadığı tespit edilmiştir (Karr ve ark., 1984; Laffery ve ark., 1988). Bu polimerin ilaç dağıtım sistemlerinde taşıyıcı olarak, sulama sistemlerinde, tarımda pestisid formülasyonlarında kullanıldığı ve biyogübre endüstrisinde polyester, polietilen için uygun kullanımı bulunmaktadır (Lafferty ve ark., 1988).

Rhizobia'nın kuru hücre ağırlığının %55'inden daha fazla PHB ürettiği Tombolini ve Nuti (1989)

tarafından belirlenmiştir. PHB'nin azot, fosfor veya oksijence sınırlı olan ortamlarda karbon kaynağı olarak depolandığı ve iç karbon rezervi olarak hizmet ettiği açıklanmıştır (Mercan ve ark., 2002). PHB sentezi veya parçalanması toprakta açlık periyodundaki bakteriyal hücreleri etkileyebilmektedir. *Rhizobium* bakterilerinin konukçu bitkinin kök saçlarını enfeksiyonu sırasında rizosferde depolanan PHB; önemli karbon ve enerji kaynağı olabilmektedir (Charles ve ark., 1997). Çalışmamızda *Rhizobium* sp. bakterilerinin poli- β -hidroksibütirik asit (PHB) sentezlemeleri ve PHB döngüsü enzimlerinden β -ketothilaz ve β -hidroksibütirat dehidrogenaz üretimleri incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Kullanılan Mikroorganizmalar:

Çalışmada kullanılan *Rhizobium* sp. izolatları Şanlıurfa ve çevresinden toplanmış yabancı *Vicia sativa* L (fiğ) kök nodüllerinden daha önce izole edilmiş ve tanımlamaları yapılmış olan bakterilerdir (Küçük ve ark., 2011). Bakteriyal izolatlar Harran Üniversitesi Mikrobiyoloji laboratuvarından sağlanmıştır.

PHB Üretimlerinin Belirlenmesi:

Yeast ekstrakt mannitol (YEM) sıvı besiyerinde 150 rpm, 30 °C'de 3 gün geliştirilen izolatlar, 40 000 x g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantı uzaklaştırılan ve 50 °C'de kurutulup tartımı yapılan pelletlere, 5'er ml steril distile su eklenmiş, 3 dk sonike edilmiştir. Hücre süspansiyonuna 2 ml 2N HCl eklenmiş, 100 °C'lik su banyosunda 2 saat bekletilmiştir. İçerik 6000 x g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletlere 5 ml kloroform eklenmiş, vorteklenmiştir. Daha sonra içerikler 30 °C'de 150 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ise içerik, 6000 x g'de 30 dk. santrifüjlenmiştir. İçerikten 0.1 ml alınıp temiz tüpe aktarılarak 100 °C'de kloroformun uçurulması sağlanmıştır. 5 ml sülfürik asit eklenerek 100 °C'de 10-20 dk bekletilmiş, 235 dalga boyunda okuma yapılmıştır (Bonartseva ve Myshkina, 1985).

PHB Metabolizması Enzimleri:

Sıvı besiyerinde geliştirilen (160 rpm, 24 saat) izolatlar, 10.000 x g'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Kültürler 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.2) ile sonike edilmiştir. İçerik 10 000 x g'de 4 °C santrifüjlenmiş ve elde edilen çözelti enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. β -ketothilaz ve β -hidroksibütrat dehidrogenaz enzim aktiviteleri Karl ve ark. (1984)'na göre belirlenmiştir. Her bir enzim aktivitesi 4 kez ölçülmüştür.

β -ketothilaz; 30 μ M asetoasetil CoA, 275 μ M CoA, 1 mM DDT, 25 mM MgCl₂, 25 mM Tris-HCl (pH 7.8) ve enzim ekstraktı 1 ml olacak şekilde hazırlanmış, içerik 340 nm'de okunmuştur. β -hidroksibütrat dehidrogenaz; 600 μ M NAD⁺, 20 mM sodyum DL-hidroksibütrat, 50 mM TES (pH 7.9) ve enzim ekstraktı karıştırılarak hazırlanmış ve içerik 340 nm'de okuma yapılmıştır. Enzimlere ait proteinler Lowry ve ark. (1951)'e göre yapılmıştır.

Bulgular

Rhizobium izolatların PHB içerikleri Tablo 1'de verilmiştir. Test edilen 18 izolattan en yüksek kuru hücre ağırlığı sırasıyla; V3, V15, V14, V4 izolatlarından alınmıştır (Tablo 1). İzolatların kuru hücre ağırlıkları 0.26-1.90 g/l arasında değişmiştir. En düşük kuru hücre ağırlığı V1 izolatında (0.26 g/l) belirlenmiştir. En yüksek PHB miktarı V15 izolatında 0.428 g/l olarak belirlenmiştir. Bunu sırası ile 0,382 g/l ile V3, 0,268 g/l ile V8 ve 0,261 g/l ile V6 izolatı izlemiştir (Tablo 1). En düşük PHB miktarı ise 0.100 g/l ile V13 izolatından alınmıştır (Tablo 1).

PHB sentezinde anahtar bir enzim olan β -ketothilaz'ın spesifik aktivitesinde en yüksek aktivite, V3 (506 nmol/dk/mg protein) izolatından alınırken, bunu sırasıyla; V8 (458 nmol/dak/mg protein), V7 (436 nmol/dak/mg protein), V6 (421 nmol/dak/mg protein), V1 (410 nmol/dak/mg protein) izlemiştir. β -hidroksibütrat dehidrogenaz aktivitede en yüksek değer; V15 ve V7 nolu izolatlardan alınmıştır (Tablo 2). En düşük β -hidroksibütrat dehidrogenaz aktivite ise; V9 (10 nmol/dak/mg protein) izolatında belirlenmiştir. İzolatlar arasında test edilen enzim aktivitelerinin farklı olduğu görülmüştür (Tablo 2).

Tartışma ve Sonuç

PHB, kök nodül bakterilerinde, bakteroidlerinde ve prokaryotik mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunan karbon depo polimeridir (Ratcliff ve ark., 2008; Trainer ve Trevor, 2006). PHB ve PHA biyolojik olarak parçalanabilen biyoplastikler olduklarından, son yıllarda ticari olarak da değer kazanmışlardır (Gao ve ark., 2011). Polibetahidroksibütrat (PHB) granülleri birçok mikroorganizmada membranla çevrili olarak bulunan granüllerdir. Bu granüllerin mikroorganizmalarda karbon ve enerji kaynağı olarak görev yaptıkları bilinmektedir (Nair ve ark.1993). Farklı C ve N kaynaklarında; *R.meliloti*, *R.trifolii*, *R.phaseoli*'nin izolatlarının PHB ürettiği yapılan çalışmalarda açıklanmıştır (Bonartseva ve ark.1989; Mercan ve ark., 2002; Ramanov ve ark., 1996). Hızlı gelişme gösteren *Rhizobium* bakterileri ile *Rhizobium trifolii*, *R.phaseoli*, *R.meliloti* karbon depo ürünü olarak PHB sentezlemişlerdir. (Ramanov ve ark., 1996). Çalışmamızda, fiğ (*Vicia sativa* L.) kök nodül izolatlarının PHB üretimleri incelenmiş ve izolatların PHB üretimlerinin 0,100-0.428 g/l arasında değiştiği incelenmiştir. Sonuçlarımıza benzer olarak Nair ve ark. (1993) tarafından yapılan bir çalışmada; *Rhizobium* sp.'nin 45 izolatının PHB içeriğinde farklılık olduğu tespit edilmiş ve bu farklılığın izolata spesifik olduğunu, izolatlarda görülen bu farklılığın ise taksonomik bir karakter olarak kullanılabileceği açıklanmıştır. Çalışmamızda en yüksek verim %77.3 ile V1, %49.2 ile V6 ve %36.,21 ile V8 izolatlarından alınmış, en düşük verim ise %12 ile V4 izolatı ve %12.34 ile V18 nolu izolattan alınmıştır (Tablo 1).

Bonartseva ve ark (1989), *Rhizobium japonicum*'da PHB içeriği ve nitrojenaz arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, nitratsız gelişme ortamında PHB miktarı ve nitrojenaz aktivitesinin nitratlı ortamdaki 10 kat daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Ramanov ve ark. (1996), PHB metabolizması ile azot fiksasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmışlar, PHB'nin azot

fiksasyonu amacıyla kullanıldığını, *Rhizobium* sp.'de PHB'nin oksidasyonu için uygun substratlar olmadığı ve uygun olmayan çevre koşullarında da, nitrojenazı koruduğunu saptamışlardır. *Rhizobium* bakterileri ve diğer bakteriler birkaç karbon metabolik yollarına sahiptirler (Karr ve ark., 1984). Bunların içinde; sitrik asit döngüsü, pentoz fosfat yolu (PPP), Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) yolu ve Entner-Doudoroff (ED) yolu bulunmaktadır. Mikroorganizmalar olumsuz koşullarda karbon metabolizması için alternatif yolları kullanmaktadırlar (Karr ve ark., 1984; Kim ve Copeland, 1986; Lafferty ve ark., 1998). Poli- β -hidroksibütrik asit metabolizmasında β -ketothiolaz ve β -hidroksibütrat dehidrogenazın, sitrik asit

döngüsünde ise süksinat dehidrogenaz ve malat dehidrogenazın önemli olduğu açıklanmıştır (Karr ve ark., 1984). *Rhizobium* bakterilerinin bazı türlerinde; *R.meliloti*'de olduğu gibi, nodül oluşumunun ilk evresi veya bakterinin serbest döneminde PHB depolanırken, azot fikse edilen bakteroidlerde PHB'e rastlanılmamıştır (Bonartseva ve ark., 1985). Soya fasulyesi ve nohutta nodül oluşturan *Rhizobium* CB1809 ve CC1192 izolatlarının hücre ekstraktlarından PHB sentezinde rol oynayan enzim aktivitelerinden; β -ketothiolaz, β -hidroksibütrat, sitrat sentetaz ve malat dehidrogenaz enzim aktivitelerinin bakteroid ekstraktlarına göre daha yüksek olduğu yapılan bir çalışmada açıklanmıştır (Kim ve Copeland, 1996).

Tablo 1. *Rhizobium* izolatlarının Poli- β -hidroksibütrik asit (PHB) üretimleri.

İzolatlar	Kuru Hücre Ağırlığı (g/l)	PHB (g/l)	% PHB verimleri
V1	0.26 ± 0.01	0.201 ± 0.01	77.30
V2	0.72 ± 0.02	0.245 ± 0.01	34.03
V3	1.90 ± 0.01	0.382 ± 0.02	20.10
V4	1.40 ± 0.05	0.168 ± 0.01	12.00
V5	1.32 ± 0.04	0.238 ± 0.01	18.03
V6	0.53 ± 0.01	0.261 ± 0.02	49.20
V7	0.61 ± 0.00	0.107 ± 0.01	17.50
V8	0.74 ± 0.04	0.268 ± 0.03	36.21
V9	1.02 ± 0.06	0.182 ± 0.01	17.84
V10	1.14 ± 0.04	0.152 ± 0.01	13.33
V11	1.24 ± 0.03	0.189 ± 0.01	15.24
V12	0.44 ± 0.01	0.136 ± 0.01	30.90
V13	0.63 ± 0.12	0.100 ± 0.01	15.87
V14	1.56 ± 0.30	0.242 ± 0.01	15.51
V15	1.82 ± 0.06	0.428 ± 0.02	23.51
V16	1.11 ± 0.24	0.200 ± 0.02	18.01
V17	1.25 ± 0.13	0.184 ± 0.01	14.72
V18	1.15 ± 0.04	0.142 ± 0.01	12.34

Tablo 2. İzolatların β -hidroksibütrat dehidrogenaz ve β -ketothiolaz enzim aktiviteleri (nmol/dak/mg protein).

İzolatlar	β -hidroksibütrat dehidrogenaz	β -ketothiolaz
V1	52	410
V2	40	378
V3	36	506
V4	44	282
V5	58	316
V6	61	421
V7	64	436
V8	16	458
V9	10	317
V10	28	224
V11	37	186
V12	51	309
V13	42	249
V14	47	340
V15	72	374
V16	21	217
V17	18	209
V18	36	187

PHB miktarı ile azot fiksasyonu arasındaki ilişki tam olarak açıklığa kavuşturulamamakla birlikte, bakteride belirlenen yüksek PHB miktarının azot fiksasyonunda etkili olduğu, olumsuz koşullarda *Rhizobium* sp.'nin PHB'yi karbon kaynağı olarak kullanarak azot fiksasyonunu gerçekleştirdiği açıklanmıştır (Ramanov ve ark., 1996; Bonartseva ve Myshina, 1985). Bu da, izolatlarımızdan en yüksek PHB içeriğini veren sırasıyla; V15, V3, V8 ve V6 izolatlarının azot fiksasyonu yapabilmesi için olumsuz çevre koşulları altında da, hücrelerindeki PHB'den yararlanabileceğini ve azot fiksasyonunda etkili olabileceğini desteklemektedir.

Kaynaklar

- Bonartseva GA, Myshina VL, Zagreba ED, 1989: Between poly- β -hydroxybutyrate content and nitrogenase and hydrogenase activity in some strains of *Rhizobium*. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the USSR, 58, 920-922
- Bonartseva GA, Myshina VL, 1985: Fluorescence intensity of nodule bacteria (*Rhizobium meliloti*, *R. phaseoli*) differing in activity, grown in the presence of the lipophilic vital stain phosphine 3R. *Microbiology*, 54, 535-541.
- Charles TC, Cai GQ, Aneja P, 1997: Megaplasmid and chromosomal loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Genetics*, 146, 1211-1220.
- Gao X, Chen J, Wu Q, Chen G, 2011: Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 768-774.
- Karr DB, Waters JK, Suzuki F, Emerich DW, 1984: Enzymes of the poly- β -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol* 75, 1158-1162.
- Kim SA, Copeland L, 1986. Enzymes of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in soybean and chickpea bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol*, 62, 4186-4190
- Küçük Ç, Cevheri C, Çetin E, 2011: Şanlıurfa'daki doğal baklagillerin *Rhizobium* potansiyellerinin belirlenmesi, sayfa, 445-452. I. Ali Numan Kırış Tarım kongresi ve Fuarı Bildiriler Kitabı, Eskişehir.
- Lafferty RM, Korsato W, Korsato B, 1998: Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In: Rehm HJ, Reed G. (eds) *Biotechnology: a comprehensive treatise in eight volumes*. Vol. 68. New York, Usa, VCH Publishers, pp.135-176
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275
- Mercan N, Aslım B, Yüksekdağ ZN, Beyatlı Y, 2002: Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by some *Rhizobium* bacteria. *Turkish J of Biology*, 26, 215-219.
- Nair S, Jha PK, Babu CR, 1993: Variation in Poly- β -hydroxybutyrate synthesis in rhizobia reflect strain differentiation and temperature regulation. *J Basic Microbiol*, 33, 35-39.
- Ramanov VI, Gordon AJ, Minchin FR, Witty JF, Sket L, James CL, Barisov AV, Tikhonovich IA, 1996: Anatomy, physiology and biochemistry of root nodules of spink-2-Fix: a symbiotically defective mutant of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Experimental Botany*, 46, 1809-1813.
- Ratcliff WC, Kadam SV, Denison RF, 2008: Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) supports survival and reproduction in starving rhizobia. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 391-399.
- Tombolini R, Nuti MP, 1989: Poly- β -hydroxyalkanoate biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiol. Letters*, 60, 299-304.
- Trainer MA, Trevor CC, 2006: The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 377-386.

*Yazışma Adresi: Çiğdem KÜÇÜK

Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,

Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: ckucuk@harran.edu.tr