



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ASETAT ORTAMINDA BÜYÜTÜLEN
CEREIBACTER SPHAEROIDES O.U. 001,
RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS 7850 VE
CUPRIAVIDUS NECATOR H16 İLE
POLİHİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMİ
VE ÜRETİLEN POLİMERLERİN
KARAKTERİZASYONU

Buse Nur AKPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Temmuz-2023
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Buse Nur AKPINAR tarafından hazırlanan “Asetat Ortamında Büyütülen *Cereibacter sphaeroides* O.U. 001, *Rhodopseudomonas palustris* 7850 ve *Cupriavidus necator* H16 ile Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Üretilen Polimerlerin Karakterizasyonu” adlı tez çalışması 23/06/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

.....

Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

.....

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdagül KUMCU
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 211315008 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Buse Nur AKPINAR

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASETAT ORTAMINDA BÜYÜTÜLEN *CEREIBACTER SPHAEROIDES* O.U. 001, *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* 7850 VE *CUPRIAVIDUS NECATOR* H16 İLE POLİHİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMİ VE ÜRETİLEN POLİMERLERİN KARAKTERİZASYONU

Buse Nur AKPINAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS

2023, 97 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Gökhan KARS

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Dr. Öğretim Üyesi Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

Dünyada nüfus artışı, yenilenemeyen kaynakların azalması ve günlük hayatımızın bir parçası olan plastik ürünlerin çoğalması, petrol türevli plastiklerin doğada kalbolmaması sonucu oluşan çevre kirliliği güncel problemler arasındadır. Biyo uyumlu, parçalanabilir ve yenilenebilir özellikleriyle termoplastik bir polimer olan polihidroksibütirat (PHB) geleneksel plastiklerin birçok özelliğine sahiptir. Bu biyopolimer sentetik karbon bazlı polimerlere alternatif olarak uygundur. *Alcaligenes*, *Rhodobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* gibi farklı mikroorganizmalar tarafından sentezlenmektedir. Monomerlerin birleştirilmesi ve sentezi olarak enzimatik aşamaların gerçekleşmesi ile polimer biyosentezi gerçekleşir. Polihidroksibütirat (PHB) biyosentezini β -ketotiyolaz, asetoasetil-CoA, PHB polimeraz/sentaz enzimleri ve phbA, phbB, phbC genleri sağlar. PHB bakteriler, topraktaki mikroorganizmalar ve funguslar tarafından uygun koşullar altında parçalanarak karbondioksit, enerji ve su açığa çıkarmaktadır. Biyoparçalanabilir özelliğinden kaynaklı olarak tıp, ziraat, tekstil ve paketleme gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Üretimde kullanılması açısından uygun substrat ve besi ortamı kullanıldığında maliyet azaltılabilmektedir. *Cereibacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Cupriavidus necator* 70 mM asetat 2 mM ile sınırlandırılmış amonyum ortamında büyümeleri ve PHB üretimi incelendi. Asetat oranı 10, 25, 40, 55, 70, 85 ve 100 mM ortamlarda optik dansitelerine (OD) bakılarak karar verildi. 70 mM asetat besiyerinde *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da sırasıyla 4.3, 5.7 ve 3.0 OD değerleri aynı sıra ile 9.6, 9.8 ve 9.1 pH değerleri ölçüldü. PHB granülleri Sudan Black B ve Nile red gibi lipofilik boyalarla tespit edildi. Sudan Black B boyaması ışık mikroskopunda bakıldığında bakteriler içerisinde PHB yoğunluğuna göre mor, mavi, siyah renkler arasında renkler gözlemlendi. Nile red ile floresans mikroskopunda bakıldığında ise küçük noktalar şeklinde kırmızı bir ışığa gözlemlendi. PHB'nin en iyi çözücüsü olan kloroform ile ekstraksiyonu yapıldığında *C. sphaeroides*'in 14,6 mg, *R. palustris*'in 31,1 mg, *C. necator*'un 5,4 mg PHB kuru ağırlıkları tartıldı. PHB verimi incelendiğinde sırasıyla bakterilerde; *C. sphaeroides* %0,054, *R. palustris* % 0,11, *C. necator* % 0,034 değerlerine ulaşıldı. Asetat ortamında PHB üretimine en yüksek seviyede *R. palustris*'de ulaşılmıştır. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi yöntemi ile PHB karakterizasyonu yapılmış, *C. sphaeroides* ve *R. Palustris* bakterilerinden saf PHB elde edildiği, *C. necator*'da elde edilen PHB'nin ise diğer bakterilere kıyasla saf olmadığı ve bazı kirliliklerin de olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da asetat besiyerinde PHB üretimi ve üretim sonucunda PHB verimi incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Cereibacter sphaeroides*, *Cupriavidus necator*, Polihidroksibütirat (PHB), *Rhodopseudomonas palustris*

ABSTRACT

MS THESIS

PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) BY *CEREIBACTER SPHAEROIDES* O.U. 001, *RHODOPSEUDOMONAS PALUSTRIS* 7850 AND *CUPRIAVIDUS NECATOR* H16 GROWN IN ACETATE MEDIUM AND CHARACTERIZATION OF PRODUCED POLYMERS

Buse Nur AKPINAR

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS

2023, 97 Pages

Jury

Prof. Dr. Gökhan KARS

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Assist. Prof. Dr. Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK

The increase in population in the world, the decrease in non-renewable resources, the increase of plastic products that are a part of our daily life, and the environmental pollution caused by the fact that petroleum-derived plastics do not die in nature are among the current problems. Polyhydroxybutyrate (PHB), a thermoplastic polymer with biocompatible, degradable and renewable properties, has many of the properties of conventional plastics. This biopolymer is suitable as an alternative to synthetic carbon-based polymers. It is synthesized by different microorganisms such as *Alcaligenes*, *Rhodobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*. Polymer biosynthesis takes place with the realization of enzymatic steps as the assembly and synthesis of monomers. The biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) is provided by β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA, PHB polymerase/synthase enzymes and *phbA*, *phbB*, *phbC* genes. PHB is broken down by bacteria, microorganisms and fungi in the soil under appropriate conditions, releasing carbon dioxide, energy and water. Due to its biodegradable feature, it is used in many fields such as medicine, agriculture, textile and packaging. Costs can be reduced when appropriate substrate and nutrient medium are used in production. The growth and PHB production of *Cereibacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* and *Cupriavidus necator* in ammonium medium limited with 70 mM acetate 2 mM were examined. The acetate ratio was determined by looking at their optical densities (OD) in 10, 25, 40, 55, 70, 85 and 100 mM medium. OD values of 4.3, 5.7 and 3.0, pH values of 9.6, 9.8 and 9.1, respectively, were measured in *C. sphaeroides*, *R. palustris* and *C. necator* in 70 mM acetate medium. PHB granules were detected with lipophilic dyes such as Sudan Black B and Nile red. When the Sudan Black B staining was examined under the light microscope, colors between purple, blue and black were observed according to the PHB concentration in the bacteria. When viewed under a fluorescence microscope with Nile red, a red glow in the form of small dots was observed. When PHB was extracted with chloroform, which is the best solvent, 14.6 mg of *C. sphaeroides*, 31.1 mg of *R. palustris*, and 5.4 mg of PHB of *C. necator* were weighed. When the PHB yield was examined, respectively, in bacteria; *C. sphaeroides* 0.054%, *R. palustris* 0.11%, *C. necator* 0.034%. The highest level of PHB production in acetate medium was reached in *R. palustris*. PHB characterization was made by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy method, it was determined that pure PHB was obtained from *C. sphaeroides* and *R. palustris* bacteria, PHB obtained from *C. necator* was not pure compared to other bacteria and there were some impurities. Within the scope of this study, PHB production in acetate medium in *C. sphaeroides*, *R. palustris* and *C. necator* and PHB yield as a result of production were investigated.

Keywords: *Cereibacter sphaeroides*, *Cupriavidus necator*, Polyhydroxybutyrate (PHB), *Rhodopseudomonas palustris*

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans sürecinde ve tezin hazırlanmasında, araştırma esnasında yol gösteren danışman hocam Gökhan KARS'a, tez jüri üyeleri Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ ve Dr. Öğretim Üyesi Sündüs ERBAŞ ÇAKMAK'a , tez projemi destekleyerek araştırmalarım için maddi olanağı sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne, aynı zamanda yüksek lisans sürecini birlikte geçirdiğimiz çalışmalarımızda birbirimize yardımcı olduğumuz, zor anlarımızda birbirimize destek olduğumuz Kübra DANIŞ ve MERVE SERT'e, her zaman her konuda yanımda olan Mehmet ÇELİK, Nalan ÇELİK, Leman ÇELİK ve dedem Bünyamin ÇELİK'e, benim için en değerli ve özel olan her zaman bana destek olan annem Dilek ÇELİK ve eşim Mustafa AKPINAR'a tezimi ithaf ediyorum ve teşekkür ediyorum.

Buse Nur AKPINAR
KONYA-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	5
2.1. Polimerler.....	5
2.2. Biyobozunur Polimerler.....	6
2.3. Polihidroksibütirat (PHB)	9
2.3.1. PHB'nin biyosentezi	14
2.3.2. PHB'nin biyolojik parçalanması.....	20
2.3.3. PHB'nin yenilenebilir özelliği	22
2.4. <i>Cereibacter sphaeroides</i> O.U. 001	22
2.4.1. <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'de PHB üretimi.....	25
2.5. <i>Rhodopseudomonas palustris</i> 7850	28
2.5.1. <i>Rhodopseudomonas palustris</i> 'de PHB üretimi.....	29
2.6. <i>Cupriavidus necator</i> H16.....	31
2.6.1. <i>Cupriavidus necator</i> 'da PHB üretimi	32
2.7. PHB Görüntüleme Yöntemleri	34
2.7.1. Sudan Black B ile PHB granüllerinin boyanması.....	34
2.7.2. Nile Red ile PHB granüllerinin boyanması	34
2.8. PHB Ekstraksiyon Yöntemleri.....	35
2.9. PHB Karakterizasyon Yöntemleri	40
2.10. PHB Kullanım Alanları	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	47
3.1. Kültür Koşulları	47
3.2. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri	49
3.3. PHB'nin Görüntülenmesi	50
3.3.1. Sudan Black B ile boyama.....	51
3.3.2. Nile Red ile boyama	51
3.4. PHB Ekstraksiyonu.....	52
3.5. PHB Karakterizasyonu	54
3.5.1. NMR analizi.....	54
3.5.2. FTIR analizi	54

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	55
4.1. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri	55
4.1.1. Büyüme eğrileri	55
4.1.2. pH analizleri.....	59
4.2. PHB'nin Görüntülenmesi	64
4.2.1. Sudan Black B ile ışık mikroskopunda görüntüleme.....	64
4.2.2. Nile Red ile floresans mikroskopunda görüntüleme.....	67
4.3. PHB Ekstraksiyonu.....	70
4.4. PHB Karakterizasyonu	71
4.4.1. NMR analizi.....	72
4.4.2. FTIR analizi	72
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	77
5.1 Sonuçlar	77
5.2 Öneriler	78
6. KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	87

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

mm	Milimetre
µm	Mikrometre
m	Metre
nm	Nanometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
°C	Derece
µl	Makrolitre
ml	Mikrolitre
L	Litre
mg	Miligram
g	Gram
mbar	Milibar
mM	Milimolar
M	Molar
Da	Dalton
MHz	Megahertz

Kısaltmalar

PHA	Polihidroksialkonoat
PHB	Polihidroksibütirat
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PCL	Polikaprolakton
PU	Poliüretan
PP	Polipropilen
PE	Polietilen
HB	Hidroksibütirat
HV	Hidroksivalerat
PLGA	Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit)
PHVB	Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ATP	Adenozin Trifosfat
TCA	Tri Karboksilik Asit Döngüsü
PNS	Mor Kükürtsüz Bakteriler
UV	Ultraviyole
OD	Optik Yoğunluk
CDW	Hücre Kuru Ağırlığı
GC	Gaz Kromatografisi
FTIR	Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

İnsan nüfusunun artması ile petrolden elde edilen sentetik polimer türevli plastiklerin miktarı ve kullanım alanları artmaktadır. Bozunmadan kalmaları sayesinde yaban hayata toksik etki bırakmakta ve kullanılıp atılma özelliğinden dolayı çevre kirliliği sorununu oluşturmaktadır (Luengo vd., 2003). Plastikler yenilenemeyen kaynaklardan yapılan polimerlerdir ve atık sorunundan dolayı tehlike oluşturmaktadır. Düşük maliyeti, üretim kolaylığından dolayı tercih edilir. Mikroorganizmalar tanımadığından bozunmaları zaman alır. Plastiğe dayalı araç gereç kullanımı temizlik malzemesi, mutfak eşyası, inşaat malzemesi, narenciye, elektrikli ev aletleri, tarım ürünleri, otomobil sektörü, gıda malzemesi ambalajı, park-bahçe alanları, sağlık alanı, kozmetik, konfeksiyon ambalajı ve tekstil gibi günlük yaşantımızın her alanında bulunmaktadır (Thapa vd., 2019).

Petrol bazlı polimerlerin yanı sıra, polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) grubu, plastik üretimi için umut verici bir hammaddeyi temsil eder. Bakteriler tipik olarak dengesiz büyüme gibi stresli koşullara yanıt olarak PHA'lar üretir ve depolar. Bununla birlikte, PHA'ların piyasada kabulü geleneksel plastiklere kıyasla nispeten yüksek üretim maliyetleri nedeniyle sınırlıdır (Brown vd., 2022). Biyopolimerler çevre kirliliğine ve küresel ısınmaya yanıt vermede çok önemli malzemelerdir. PHA bazlı malzemeler biyolojik olarak parçalanabilir, toksik değildir ve biyolojik bazlıdır, çünkü bu polimerler örneğin nitrojen, fosfor veya oksijenin sınırlandırılmasından kaynaklanan çok çeşitli mikroorganizmalar tarafından birikebilir (Ranaivoarisoa vd., 2019).

Dünyada sentetik polimer üretimi 90'lı yıllarda 100 milyon ton üzerindeyken, 2000 yılından sonra 150 milyon tona yükseldiği tahmin edilmektedir. Yıllık 25 milyon ton plastik miktarı birikirken tüketimi ise yaklaşık 70 milyon tondur. Kullanılan plastiğin %20'si 1 yıldan az, %35'i 1-10 yıl arası, %45'i ise 10 yıldan fazla ömürlü malzemelerde kullanılmaktadır (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017). Bu nedenle, petrol kökenli polimerlerin yerine biyolojik olarak parçalanabilen polimerler tercih edilmeye başlanmıştır. Biyoplastik üretimi önem kazanmıştır. Tohumlar, ağaçlar, meyveler, yapraklar, kemikler ve hayvan derisi gibi doğada çok sayıda doğal maddenin yapısında polimer bulunur. Bu polimerlerin avantajı çevre kirliliğine sebep olmamasıyla birlikte çoğunun suda

çözünmesidir, bundan dolayı çabuk bozunmaları uzun süreli uygulamalar için dezavantajdır.

Endüstriyel uygulamalar için en yaygın olarak kullanılan mikrobiyal PHA polihidroksibütirat (PHB)dir. PHB endüstriyel ölçekte üretilen ve aynı zamanda en çok çalışılan bu geniş ailenin tek homopolimeridir (Nygaard vd., 2021). Polihidroksialkanoatlar (PHA) mikroorganizmalar tarafından üretilen bir biyojenik poliester ailesine verilen bir terimdir. Plastiklere göre yüksek molekül ağırlığının ve inert (etkisiz) olmasının saptanması parçalanmayan yeni materyallerin sentezlenmesini mümkün kılmıştır. Muhtemelen PHA sınıfından en iyi çalışılan temsilci PHB'dir. PHB, çeşitli mikroorganizmalar tarafından organik malzemeden üretilen kısa zincirli yağ asidi (scl yağ asidi) hidroksibütiratın (HB) bir homopolimeridir (Duvigneau vd., 2020). PHA'ların moleküler ağırlıkları (MW) bakteri suşlarına, büyüme koşullarına ve karbon kaynağına bağlı olarak 10 ila birkaç bin arasında değişebilir.

PHB gibi biyoparçalanabilir, biyoyumlu ve doğaya zarar vermeyen plastiklerin sentezlenmesi ve polimer kimyasındaki uyumluluk biyoplastiklerin üretimini arttırmıştır. İlk olarak bakteriyel fermantasyonla 1976 yılında, poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretilerek araştırmalara İngiltere'deki Imperial Kimya Endüstrisi (Imperial Chemical Industries, ICI) başlamıştır (Madison & Huisman, 1999). Mor kükürtsüz bir bakteri olan *Cereibacter sphaeroides* gram negatif ve proteobakterilerin α -altbölümünde bulunmaktadır. İki adet kromozoma sahiptir. Kromozom I (2973 kb), kromozom II (911 kb) ve beş adet ekstra kromozomal replikonlar pRS241a (113.6 kb), pRS241b (104 kb), pRS241c (100 kb), pRS241d (99 kb), pRS241e (42 kb) sahiptir. Oksijenli ve oksijensiz ortamda büyüebilmesi çalışmalar açısından çok çeşitliliğe sebep olmaktadır. Durgun sulardan ve derin göllerden izole edilebilir. Fermantasyon, fotoheterotrof, fotoototrof, oksijenli ve oksijensiz solunum gibi metabolik özellikleri açısından farklı mekanizmalarla enerji elde edebilir. *C. sphaeroides* suşları %60-80 oranında PHB üretebilir. Özellikle karbon kaynağı olarak asetatta büyütüldüğünde yüksek oranlarda PHB üretimi gözlemlenmiştir (Kars & Gündüz, 2010). *C.sphaeroides*, PHB üretimi için oldukça uygun bir mikroorganizmadır. Çeşitli karbon kaynakları arasında asetat en yüksek PHB üretimini sağlamıştır (Sangkharak & Prasertsan, 2007). PHB sabit büyüme fazı sırasında üretilir. *C.sphaeroides* de PHB birikmesi anaerobik olarak ışıktan veya aerobik olarak karanlıkta büyüyen hücrelerde meydana gelir (Krasil'nikova vd., 2015). PHB üretimi,

meydana gelen çeşitli metabolik olaylar nedeniyle toplam hidrojen üretimi sınırlandırılarak yolaklar PHB üretimine yönlendirilir.

Rhodospseudomonas palustris CO₂ ve nitrojeni sabitleyebilen veya karbon ile nitrojen gereksinimleri için organik bileşikleri parçalayabilen, biyoplastikler ve biyohidrojen gibi birkaç yüksek değerli ürün üretebilen mor kükürtsüz bir bakteridir (Brown vd., 2020). Mor kükürtsüz bakteriler grubu normalde fotoheterotrofik davranmalarına rağmen *R. palustris* fotoototrofik, fotoheterotrofik, kemoautotrofik veya kemoheterotrofik metabolizma grupları arasında geçiş yapabilmektedir. Bu, *R. palustris*'i endüstriyel üretime yönelik mühendislik için mükemmel bir aday yapar. Metabolik olarak sağlam bir bakteri olan, *R. palustris*'in genomu, hem aerobik hem de anerobik fotosentetik katabolizmaya uygundur (Brown vd., 2022). Göl sularından veya deniz kıyısı çöktülerinden izole edilebilmektedir. Oksijenli ve oksijensiz büyüebilmektedir. Organik veya inorganik bileşenleri enerji için kullanabilmektedir. *R. palustris* CGA009 suşunun tüm genomu 2004 yılında sekanslanmıştır. Bu durumda metabolik yollarının nasıl düzenlendiği hakkında daha fazla bilgi vermektedir. *R. palustris* de en yüksek PHB üretimi asetat ortamında gözlemlenmiştir. PHB üretimi organik karbon kaynağından ve büyüme ortamındaki C/N oranından, pH değerinden, kültürün geçmiş büyüme ortamından etkilenir. Karbon kaynağının bakteriyel biyokütlenin metabolik aktivitesini etkilediği görülmüştür (Touloupakis vd., 2021).

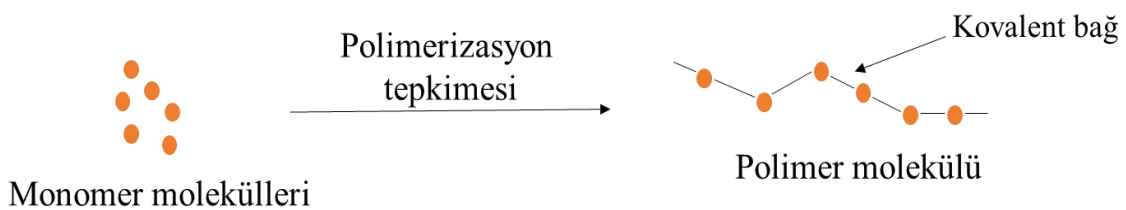
Gram negatif grubunda bulunan *Cupriavidus necator* (eski adıyla *Wautersia eutropha*, *Ralstonia eutropha* ve *Alcaligenes eutrophus*) bir toprak bakterisidir. Aerobik ve anaerobik ortamda büyüeyebilen *C. necator* heterotrofik ve ototrofik yaşam koşullarına hızlı bir şekilde uyum sağlayabilmektedir. Hidrojeni ve organik bileşikleri enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Fazla miktarda glikoz bulunduğu ortamda PHA üretimine başladığı bilinmektedir. *C. necator* PHA üreten mikroorganizmalar arasında en iyi bilinen bakterilerden birisidir (Baei vd., 2009). Heterotrofik ve ototrofik ortamda hücre kuru ağırlığının %90'ı kadar PHB üretebilmektedir (Nygaard vd., 2021). Mor kükürtsüz bakteriler (PNSB) büyüeyi sınırlayan koşullar altında önemli miktarda biyopolimer üretebilir (Touloupakis vd., 2021). Bakterilerde PHB üretiminin 48 saatte maksimum verime ulaştığı sonrasında karbon kaynağının tükenmesinin üzerine enerji için PHB kullanımına geçiş yapıldığı gözlemlenmiştir (Y. R. Lee vd., 2020). PNS bakterilerinde PHB ve H₂ üretimi arasında yakın bir ilişki vardır; her iki süreç de aşırı indirgeme gücünü

dağıtmanın bir yolu olarak işlev görmektedir. H₂ ve PHB üretimine yönelik metabolizma, substratın ortamına ve büyüme koşullarına bağlıdır (Touloupakis vd., 2021).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Polimerler

Polimerler plastik, kauçuk, sentetik lif, bazı boyalar, yapıştırıcılar ve ambalajlar gibi günlük hayatımızda yaygın olarak kullanılan ürünlerin temel maddesidir. İnsan hayatında önem teşkil eden birçok uygulama alanına sahiptir (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017). Polimerler kimyalarında, yapılarında ve uygulamalarında olağanüstü çeşitlilik gösterirler. “Poli” sözcüğü Latince de çok sayıda anlamına gelmektedir. Polimer monomer adı verilen birçok sayıda küçük molekülün uygun koşullar altında polimerizasyon tepkimesi sonucu kimyasal bir bağ olan kovalent bağlar ile birbirine bağlanarak oluşturduğu makromoleküldür (Şekil 2.1.1) (Sabancı vd., 2017). Örneğin etilen molekülü polimerleşerek polietileni oluşturur. Polimerler davranış ve özellikleri nedeniyle katı hal durumunun bir alt grubunun oluştururlar. Polimerlerin sentezi; serbest radikal polimerleşmesi, iyonik polimerizasyon ve kondenzasyon polimerizasyonu şeklinde gerçekleşir. Küçük moleküllerin polimer zincirini oluşturabilmesi için iki veya daha fazla bağlanma noktası içermesi gerekmektedir (Kuenneth vd., 2021). Polimerler inşaat, otomobil sektöründe, spor, rekreasyon alanında, giyim malzemeleri üzerine tekstil endüstrisinde, gıda, uzay ve havacılık sektöründe, teflon, silikon, PVC pencere gibi hayatımızın her alanında kullanılmaktadırlar.



Şekil 2.1.1. Monomerlerden polimerizasyon tepkimesi ile polimer oluşumu (Kuenneth vd., 2021)

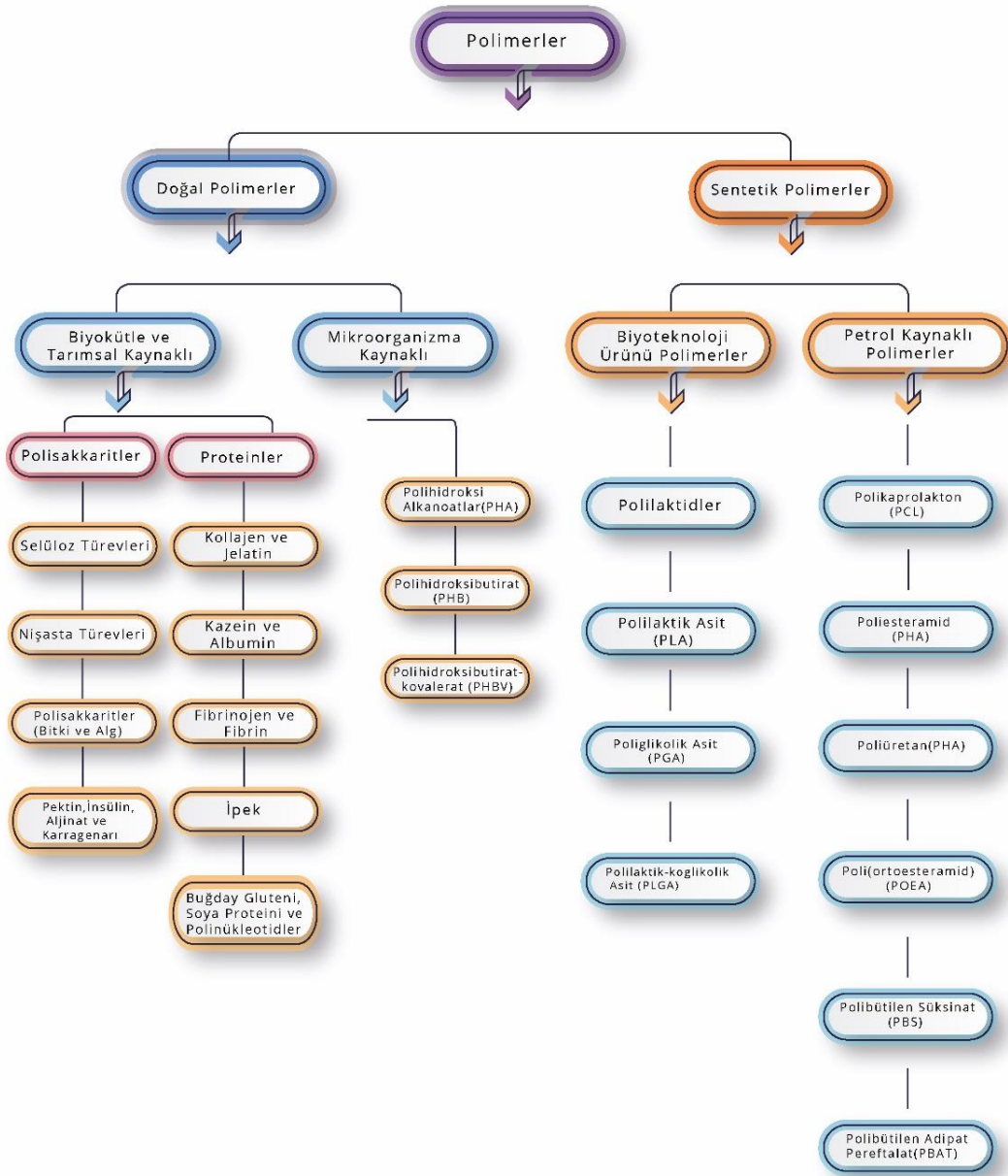
Şu anda, dünya çapında yılda üretilen 350 milyon ton plastikten sadece %2'si geri dönüştürülmekte ve %32'si ekosistemlerden kaybolmaktadır. Ek olarak, plastik atıkların %70'i ya çöplüklere gidiyor ya da yakma fırınlarında yakılarak çevre kirliliğine neden oluyor (Kalia vd., 2021). Buna göre, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler yalnızca iklim değişikliğiyle başa çıkmak için önemli bir araştırma gündemi olarak vurgulanmakla

kalmıyor, aynı zamanda plastik tabanlı doğrusal ekonomiyi dairesel bir modele kaydırmak için büyük bir potansiyel olabilir (J. Lee vd., 2021).

2.2. Biyobozunur Polimerler

Polimer bozunması hidroliz, ozon etkisi, oksijen, ısı ve radyasyon gibi işlemler sonucu gerçekleşebilir. Bozunma işlemi ise fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların (bakteri, mantar veya alg gibi) etkinliğinde çeşitli süreçler ile polimerlerin doğadaki döngüye katılmalarıdır. Nem, oksijen ve sıcaklık açısından uygun koşullarda biyolojik ajanların daha küçük molekül ağırlıklı maddelere parçalaması ile karbondioksit, metan, su ve inorganik bileşikler ortaya çıkaran polimerlere biyobozunur denir (Nilhan KAYAMAN APOHAN, t.y.). Bu bozunma ana zincirde olabileceği gibi aynı zamanda yan gruplarda da olabilir. Biyobozunur polimerler Şekil 2.2.1’de gösterildiği gibi biyotürevli monomerlerden, doğrudan organizmadan ve biyokütleden elde edilenler olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır (Biyopolimer Bazlı Nanokompozit Filmler ve Su Ürünlerindeki Uygulamaları & Oğur, 2009). Araştırmacılar tarafından “biyobozunur” kelimesi aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır:

1. Doğal yollarla yaşam döngüsünü sürdürdüğü sürece birçok organizmanın oluşturduğu polimerlerdir (Rao vd., 2014).
2. Bakterilerin, hayvanların, mantarların ve yeşil bitkilerin canlılığı boyunca doğal olarak ürettikleri polimerlerdir (Singh, 2011).
3. Doğal ortamda var olan mikroorganizmaların parçaladığı ve çevreye karşı zarar oluşturmayan malzemeler olarak tanımlanmaktadır (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017).
4. Enzimatik reaksiyon sonucu mikroorganizmalar tarafından doğal ortamda karbondioksit, su ve biyokütleyle dönüşen malzemelerdir (Armentano vd., 2013).



Şekil 2.2.1. Biyobozunur polimerlerin sınıflandırılması (Biyopolimer Bazlı Nanokompozit Filmler ve Su Ürünlerindeki Uygulamaları & Oğur, 2009)

Günümüzde plastiklerin çevreye verdiği zarar dikkate alındığı zaman sentetik polimerlerin yerini biyobozunur polimerler almaya başlamıştır. Bu amaca yönelik olarak, elde edildiği kaynağa göre biyobozunur polimerler doğal ve sentetik olarak sınıflandırılmıştır. Doğal polimerler biyokütle, tarımsal veya mikroorganizma kaynaklı olabilir. Örneğin; gluten, aljinat, jelatin, kitin, fibrin, fibrinojen, selüloz, nişasta, kollajen ve ipek. Sentetik biyobozunur polimerlerin parçalanması hidroliz yoluyla olur aynı zamanda vücutta oluşan enzimatik yollara duyarsızdır. Bu sayede biyomedikal alanında

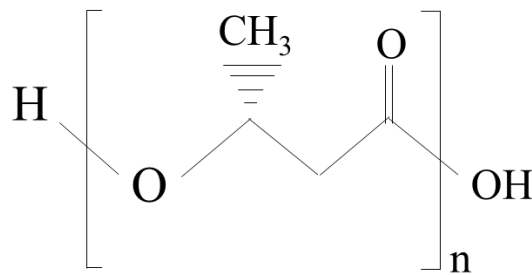
da uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin; Poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polikaprolakton (PCL), poliesteramid, poliüretan (Çelebi, 2021). PU ve PCL polimerleri petrol kaynaklı, PGA ve PLA ise biyo kaynaklı olarak elde edilen ürünlerdir. Genel olarak kullanılan polimerlere göre biyobozunur polimerler daha avantajlı olduğu için kullanım alanları yaygınlaşmaktadır.

Biyomateryaller, çeşitli organizmalar tarafından katabolize edilen ve sentezlenen doğal ürünlerdir. Biyoplastikler ise biyoyumlu olan aynı zamanda biyolojik olarak parçalanabilen biyomateryallerdir. Farklı besin ve çevre koşullarında mikroorganizmalar tarafından, stres altında organizmanın canlılığını devam ettirebilmesi için hücre içi depo granülleri halinde biriken polimerlerdir. Aynı zamanda yenilenebilir ya da biyolojik esaslı polimer kaynaklarından ve çeşitli bitkisel malzemelerden üretilir. Biyoplastikleri petrol kökenli plastiklerden üstün kılan özellikleri;

- Toksik etki bırakmamaları,
- Üretimlerinde enerji ihtiyacının az olması,
- Kolay bir şekilde bozunmaları,
- Geri dönüşümlerinin olması,
- Fosil yakıt kullanımını azaltmaları,
- Yenilenebilir ve çevre kirliliğine sebep olmamalarıdır (Luengo vd., 2003).

Biyoplastiklerin biyobozunur özellikleri yenilenebilir polimerlerin kimyasal yapılarına bağlı olarak değişim gösterebilmektedir (Uzun, 2016). Biyobozunurluk özelliğini PLA, PHA ve PHB gösterir iken PP ve PE bu özelliği göstermemektedir. Biyoparçalanır plastikler kimyasal olarak sentezlenenler, nişasta bazlı biyoparçalanırlar ve PHA olmak üzere 3 kategoriye ayrılmaktadır. PHA'lar, monomerleri β -hidroksi yağ asiti olan kısa zincili hücre içerisinde depo görevi gören uzun, doğrusal ve plastik özelliğe sahip mikrobiyal olarak elde edilen bir polimerdir (Price-Whelan vd., 2007). Poliester yapısına sahip PHA'lar doğada %100 çözünebilirler. Bitkilerde nişasta, mikroorganizmalarda ise insandaki yağ gibi özellik gösterir. Çok sayıda türü olan PHA'ların en yaygın olanı PHB'dir. PHA sınıfının bir üyesi olan PHB polipropilenin özelliklerine benzerlik göstermesi, üretim ve kullanım açısından kolaylık sağlaması sebebiyle biyoplastik türleri arasında en çok tercih edilen doğal bir polimer olarak kullanılmaktadır.

PHA granülleri 100-800 nm arasında bir çapa sahiptir ve bu granüllerin dışında bulunan zarın kalınlığı 2-4 nm'dir. PHA'nın Şekil 2.2.2'de görülen monomer yapısıdır (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017). PHA'ların fizikokimyasal özellikleri buldukları mikroorganizmalara göre değişiklik göstermektedir. PHA granülleri yüksek derecede kırıcılıklı özellik gösterir. PHA'ları değişik kriterlere göre sınıflandırmak mümkündür (Luengo vd., 2003).



Şekil 2.2.2. PHA' nın genel yapısı

2.3. Polihidroksibütirat (PHB)

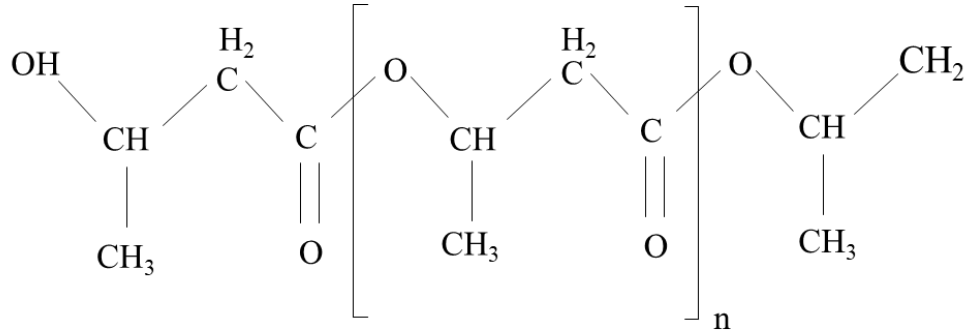
PHB bakterilerde, arkelerde ve birkaç ökaryot gibi farklı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen karbon ve enerji kaynağıdır. Karbon kaynağı bol olduğunda nitrojen, fosfor, oksijen veya sülfür gibi besinler sınırlı iken uygun olmayan üreme koşulları altında büyüme evresinde üretilen granüllü depo materyalidir. Ayrıca redükleyici eküvalentler için elektron havuzu olarak ve hücrede redoks düzenleyicisi görevinde rol almaktadır. Karbonca zengin, lineer, karbonil, oksijen ve metil gruplarının olduğu alifatik bir poliesterdir. Biyolojik parçalanabilir, termoplastik, elastomerik, yenilenebilir, biyoçözünür ve bakteriyel kaynaklı olduğu için en çok çalışılan ve biyoplastiklerin üretiminde en yaygın olarak kullanılan polimerdir. Doğal olarak PHB üreten bazı bakteri türleri *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Rhodococcus*, *Ralstonia eutrophes*, *Staphylococcus* ve *Micrococcus*'tur. Üç önemli özelliği vardır;

1. Termoplastik işlenebilirliği
2. Suya %100 dirençliliği
3. %100 biyoparçalanabilirliğidir (Dombayci vd., t.y.)

İlk kez 1923'de Lemoigne tarafından topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisindeki küçük yağ damlacıkları olarak tanımlanan materyalin parçalanması sonucu bir asit oluşumu ile pH'ın azaldığı gözlemlenmiştir (Sudesh vd., 2000). Sonrasında 3-hidroksibütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopoliyesteri (PHB) olarak tanımlanmıştır. 1950-1960 yıllarında *Bacillus* cinsi bakterilerde PHB ticari olarak üretim çalışmaları başlamıştır. Bu yıllarda kloroformla PHB ekstraksiyonu, dietil eter veya aseton ile presipitasyon metodu yaygın olarak kullanılmaktadır (Maciej Serda vd., 2007). 1958' de gram negatif bakterilerde PHB sentezi ilk kez gösterilmiştir. Endüstriyel alanda 1970'li yıllarda ilk malzeme üretilmiştir. Granüllerin fibriler yapıya sahip ve 10-15 nm uzunluğunda polimerik zincir olduğu 1968 yılında saptanmıştır.

1973'de granül hacminin %50'sini merkezi çekirdeğin oluşturduğu bulunmuştur (Dombayci vd., t.y.). Almanya'da Wella tarafından 1992 yılında ilk ticari ürün olan biyobozunur şampuan şişesi, BIOPOL adıyla patentlenmiştir (Uzun, 2016). Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) hücre kuru ağırlığının %90'ından fazlasında PHB biriktiren *Alcaligenes eutrophus* bakterisini PHB üretimi için endüstriyel alanda kullanmıştır ve sonraki yıllarda bir çok bakteri cinsleriyle çalışmalara devam etmiştir (Yılmaz & Beyatlı, t.y.). *A. eutrophus* ve *A. lotus* bakterileri kullanılarak PHB-PHV kopolimeri üretilmiştir. PHB partiküllerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, metabolizması, ekstraksiyon işlemleri, molekül ağırlığı, hücre içi ve parçalanmaları gibi çeşitli özelliklere karşı etkileri araştırılmıştır (Uzun, 2016).

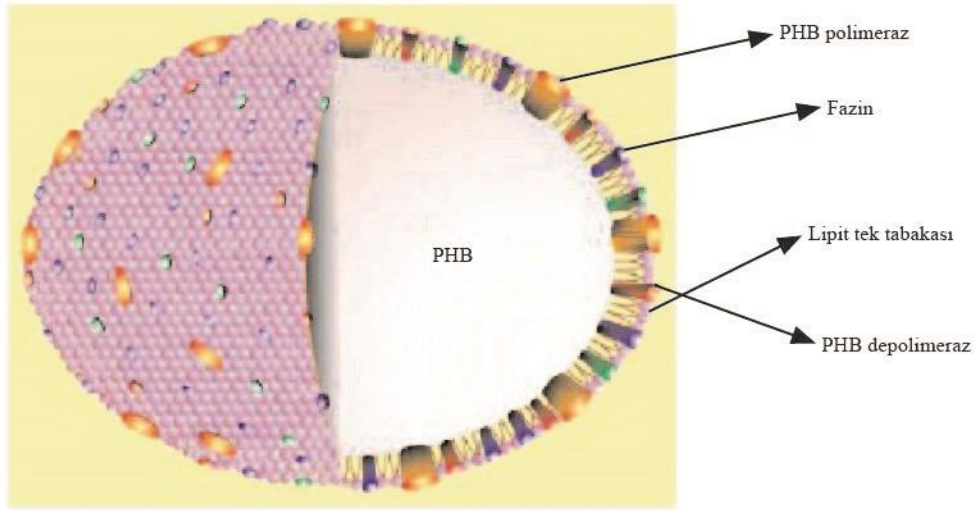
PHB; 91 çeşitte tekrarlanan monomer birimlerine sahip farklı türleri bulunan ve PHA poliester ailesinin en yaygın olarak kullanılan türüdür. Monomer yapısı Şekil 2.3.1'deki gibidir (Dombayci vd., t.y.). β -hidroksi yağ asitleri içeren kısa zincirli yapıda olan PHB, dış kısmı membranla çevrili hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun bir polimerdir. Optik olarak aktif olan PHB, D(-) konfigürasyonundadır. D(-)-3-hidroksibütirik asitin makromoleküler halidir. PHB anaerobik, mikroaerobik koşulda TCA inaktif iken karbonhidrat metabolizmasında rol alır. Ayrıca simbiyotik azot fiksasyonunda da enerji kaynağıdır.



Şekil 2.3.1. PHB'nin primer yapısı (Dombayci vd., t.y.)

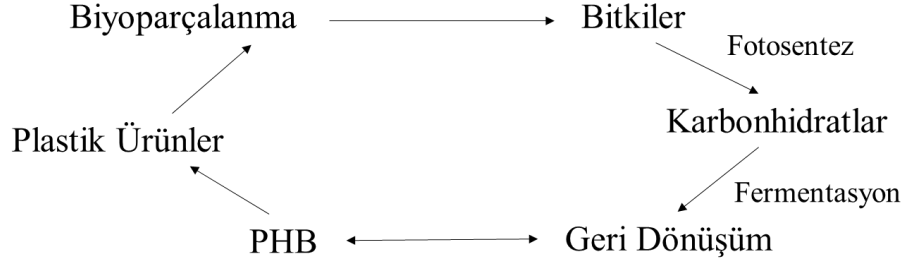
PHB granülleri bakteri hücrelerinde faz-kontrast veya elektron mikroskop altında kolayca gözlemlenebilmektedir. PHB polimeri hücre içerisinde sıvı, atmosfer koşullarında katı haldeyken organik çözücüler (kloroform, klorlanmış hidrokarbonlar vb.) ile hücreden özütlendiğinde kristalize bir yapıya sahip olmaktadır. Kristalizasyon işlemi maksimum 110-120 °C arasında olmaktadır. Bu kristalize olma özelliği sert ve kırılğan bir yapıda olmasını sağlamaktadır. Hücre içerisindeki PHB'nin %80 oranında yüksek bir kristallenme yüzdesiyle fibriler bir yapı oluşmaktadır. SEM analizlerinde PHB'lerde kristalin yapısından kaynaklı olarak düzensiz kırılmalar gözlemlenmiştir (Khanna & Srivastava, 2005). PHB birikimi bakterinin geç eksponansiyel fazında maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Ayrıca bölünme görülmeyen hücrelerde PHB miktarı yüksek derecede artmaktadır. Sporlu bakterilerde PHB sporulizasyon aşamasında enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Serbest CoA seviyesi düşük, asetil CoA ve NAD(P)H seviyesi yüksek olduğu düzeyde PHB birikimi artmaktadır (Uzun, 2016).

Granül içi bir merkezi kısım ve tabakalı membranla çevrilmiş kabuktan oluşmaktadır. Fibriler yapıda olan PHB granülleri küre şeklinde olup 100-800 nm arasında ortalama bir çapa sahiptir. Granülleri, çevreleyen membran ise ortalama 2-4 nm kalınlığında ve yaklaşık olarak %98 PHB, %2 protein içermektedir (Şekil 2.3.2) (Maciej Serda vd., 2007). Her bir granül minimum 1000 polimer zincirine sahiptir, molekül ağırlıkları ise 5×10^9 civarındadır. *C. necator* bakterisindeki PHB granüllerinin su içeriği %40 olarak tespit edilmiştir (Uzun, 2016). PHB miktarı ayrıca granül yoğunluğuyla da bağlantılıdır.



Şekil 2.3.2. PHB granülü (Özsoy, 2012)

Mikroorganizmadaki üretimine ve molekül ağırlığına bağlı olarak fizikokimyasal özellikleri değişiklik göstermektedir. PHB'nin molekül ağırlığı bakterinin türüne, büyüme koşullarına ve yaşam döngüsündeki yerine göre farklılık gösterebilir (Taidi vd., 1994). Kopolimerin monomer kompozisyonu ve molekül ağırlığı besi ortamında farklılıklar yapılarak kontrol edilebilir. PHB mikroorganizmanın, substratın türünden, konsantrasyondan, pH'dan, zamandan ve sıcaklık gibi büyüme koşullarından etkilenir. Preperasyon yöntemi de PHB'nin hem fiziksel özelliklerini hem de morfolojisini belirlemektedir. Bakteri metabolizmasında asetil-ko-enzim A, β -ketotiyolaz, asetoasetil-CoA redüktaz enzimlerinin yardımıyla üretilmektedir (Suriyamongkol vd., 2007). PHB polimeri, mayalanma ve çeşitli enzimler ile karbondioksit (CO_2) ve suyun (H_2O) çözünmesiyle elde edilmektedir. Bu şekilde parçalanması gerçekleşerek doğaya katılmakta ve bitkiler fotosentez yoluyla parçalanma sonucu oluşan ürünleri tekrar kazanmaktadır (Şekil 2.3.3). PHB'nin suda çözünmeyen ve hava geçirmeyen olması hidrolitik parçalanmaya karşı direnç göstermesi kullanım olanaklarını çoğaltmaktadır. UV ışınlarına karşı dayanıklı ancak, asit ve bazı kimyasallara karşı zayıf direnç göstermektedir fakat oksijene karşı oldukça dayanıklıdır. PHB'nin kırılabilirliği 3-hidroksivalerat monomeri ile kopolimer oluşturulmasıyla ya da başka polimerlerle karıştırılarak azaltılabilir. Kromozomda veya plasmid DNA'da PHB biyosentez genlerinin lokalize olduğu bilinmektedir (Yılmaz & Beyatlı, t.y.).



Şekil 2.3.3. PHB'nin karbon döngüsü (Yılmaz & Beyatlı, t.y.)

PHB'nin erime sıcaklığı 157-188 °C termal olarak çözünerek eridiği sıcaklıktır. 283 °C'den fazla sıcaklıklarda hızlı bozulma göstermektedir. Termoplastik olduğunda kolayca preslenip şekil verilmektedir. Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ise 1-5 °C olduğu bilinmektedir. Molekül ağırlığı 60.000-2.000.000 Da arasında değişiklik göstermektedir. İzole edilen PHB'nin yoğunluğu 1,2-1,4 g.cm⁻³ arasında değişiklik gösterir. PHB özelliklerinin değerleri Çizelge 2.3.1'de görülmektedir (Uzun, 2016). PHB'nin formülü (C₄H₆O₂)_n şeklinde ve (n) sayısında 35.000'e kadar ulaşabilmektedir. n değerini etkileyen faktörler;

1. Seçilen bakteriyel suş
2. Kullanılan substrat tipi
3. Büyüme sınırlayan faktörler
4. İzolasyon yöntemi
5. Hücrelerin fermentasyon süresi
6. Sıcaklık ve oksijen kısmi basıncı (Dombayci vd., t.y.).

Çizelge 2.3.1. PHB'nin fiziksel ve mekaniksel özellikleri (Uzun, 2016)

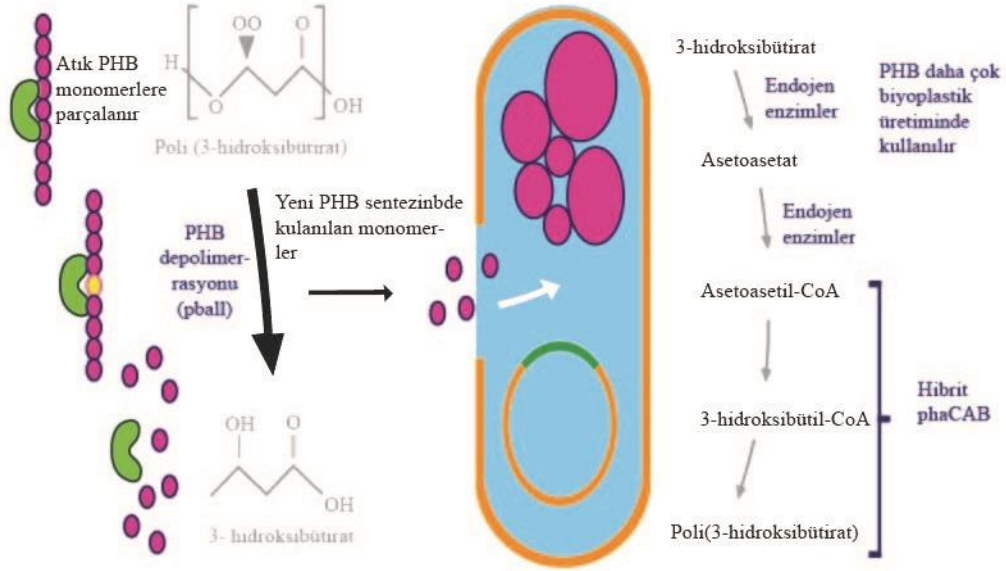
ÖZELLİKLER	DEĞER
Erime sıcaklığı (T _m , °C)	180
Çekme direnci (MPa)	40
Çekmede elastikiyet modülü (MPa)	2500
Yoğunluğu (g/cc)	1,2-1,4
Termal ayrışma sıcaklığı (°C)	2
Kristallik (%)	60-80
Kırılma uzama (%)	6
Camsı geçiş sıcaklığı (T _g , °C)	1-5
Elastikiyet katsayısı (GPa)	3,5

PHB'nin çözücü özelliklerinde ise kloroform, trifloroetanol, diklorometan, di-, tri-, tetra- kloroetan, dikloroasetat, etilen karbonat, dimetilformamid, etilasetoasetat, propilen karbonat, triolein, asetik anhidrit, 1N sodyum hidroksit, asetik asit, alkoller gibi çözücüler içinde yüksek çözünürlük gösterir, tolüen, dioksan, piridin, oktanol gibi çözücülerde çözünürler, tetrahidrofur, dilute mineral asitler, metanol, H₂O, etil asetat, etilmetilketon, alkalın hipoklorit, dietileter, etanol, hekzan, benzen, 1-, 2-propanol, bütül asetat, tribütül sitrat, sikloheksanol gibi çözücülerde ise çözünmediğini gösterir (Dombayci vd., t.y.). PHB'nin dezavantajları;

- Substratlarının maliyetinin yüksek olmasıdır. Örneğin, substrat olarak glukoz kullanılması durumunda 3 ton glukozdan 1 ton PHB üretimi elde edilir.
- Şekillendirme ve mekanik kabiliyetleri bakımından zayıftır. Çekirdek yoğunluğu düşüktür. Bu yüzden bölünmeler ve çatlaklar mekanik özellikleri olumsuz etkiler.
- Ekstraksiyon, fermentasyon işlemi pahalı ve verimsiz olabilir.
- Erime sıcaklığında zincir kırılmaları hızlı meydana geldiği için özen gösterilmelidir (Ye vd., 2013a).

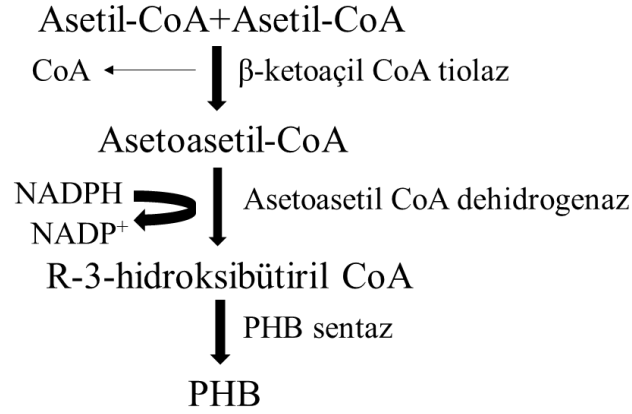
2.3.1. PHB'nin biyosentezi

PHB sentezinde görev alan enzimler farklı hücre içi şartlarına adaptasyon sağlamaları, PHB sentezleyen mikroorganizmaların çeşitliliğine sebep olmaktadır. *Ralstonia eutropha* bakterisinde PHB sentezini sağlayan (pha CBA) genler üç proteini sentezlemektedir. PhbA geni β -ketotiolaz enzimini, phbB geni NADPH-oksidoredüktazı, phbC geni ise PHB polimeraz/sentaz enzimini kodlamaktadır (Luengo vd., 2003). PHB bu enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlar ile Asetil CoA'dan sentezlenmektedir. Substrat ve asetil CoA'nın konsantrasyonlarının artışı PHB sentezinde pozitif etki oluşturmaktadır. İlk ürün olarak glukoz substratı PHB'yi oluşana kadar ara ürünler pirüvat, asetat, asetoasetat ve β -hidroksibütirattır (Şekil 2.3.1.1) (Uzun, 2016). Birçok mikroorganizmanın PHB sentezinde ara bileşik asetattır. Birçok mikroorganizmada ilk bileşik asetil CoA'dır ve asıl reaksiyon asetil CoA'nın asetoasetil CoA'ya dönüşümüdür. β -ketoaçil CoA tiolaz ilk basamağı katalizler, açıl-CoA+asetil-CoA'daki substratların tiolitik ayrılmasını sağlayan enzimdir. Prokaryotlarda, ökaryotlarda ve mayalarda doğal olarak bulunmaktadırlar (Madison & Huisman, 1999).



Şekil 2.3.1.1. PHB sentezi (Uzun, 2016)

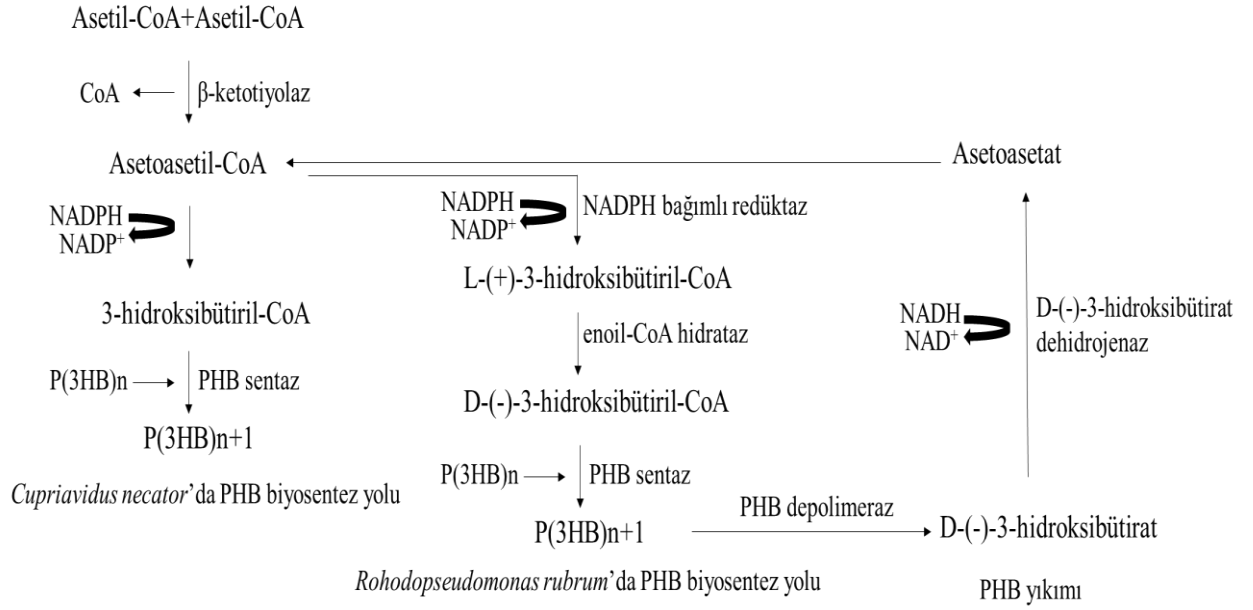
Polimeraz enzimi ayrıca PHB'nin tekrar kullanılmasında görev almaktadır. Ortamda karbon konsantrasyonu sınırlı olduğunda sentaz enzimi çözünmüş formda bulunmaktadır. Bu formda bulunan sentaz enzimin hızla tükenmesi PHB ile ilgilidir. Polimerizasyonu sağlayan sentaz enzimleri üç gruba ayrılmış şekilde 54 farklı çeşidi bulunmaktadır. Şekil 2.3.1.2'de PHB sentezinden görevli üç enzim ve ürünleri görülmektedir (Yılmaz & Beyatlı, t.y.). I.grup *Alcaligenes eutrophus*'dan, II.grup *Allochromatium virosun* ve III.grup ise *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan PHB sentaz enzimleridir. En büyük PHB sentaz enzimi *Caulobacter crescentus*'dan elde edilen 2019 nükleotid içeren 673 aminoasidi kodlayan molekül ağırlığı yaklaşık 73 kDa olan sentaz enzimidir (Rehm vd., 2002). Dehidrogenaz ve tiolaz enzimleri PHB biyosentez yolunda monomeri polimerizasyon için sağlar. Asetil CoA'nın asetilfosfata dönüşümünü sağlayan fosfotransasetilaz enziminin açığa çıkardığı asetil fosfatın PHB sentezini aktive ettiği bilinmektedir. Ayrıca, üç tip PHB sentaz enzimi rapor edilmiştir: I, II ve III (Rehm & Steinbüchel, 1999). Sentaz tip I, en yüksek moleküler ağırlıklara (500.000 ila birkaç milyon kDa) sahip polimerleri sentezlerken, sentaz tip II, yaklaşık 50.000-500.000 arasında değişen moleküler ağırlıklara sahip PHB'yi sentezler. Tip III, PHB'yi Tip I ve II sentazlar arasındaki moleküler ağırlıklarla sentezliyor gibi görünmektedir (Monroy & Buitrón, 2020).



Şekil 2.3.1.2. PHB sentezini sağlayan enzimlerin reaksiyonda gösterimi (Yılmaz & Beyatlı, t.y.)

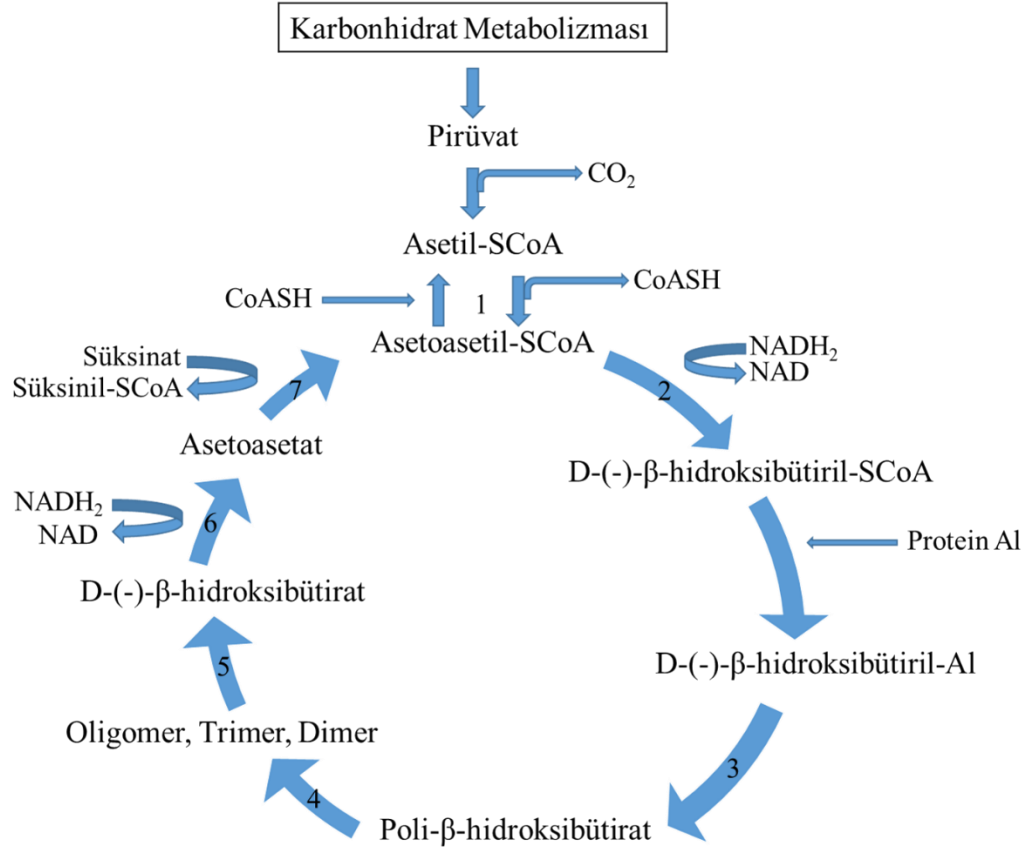
Bakterilerde PHB sentezinin birkaç farklı yolu bilinmektedir (Şekil 2.3.1.3) (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017). Tüm bileşiklerin sentezi ve birleştirilmesi için dört farklı yol tanımlanmaktadır; birinci yol; *Alcaligenes eutrophus* için tanımlanmış PHB biyosentezidir. PHB sentezi iki molekül asetil koenzim A' nın (asetil CoA) β -ketotiolaz enzimiyle katalizlenerek Asetoasetil CoA'ya dönüştürülmesidir. Asetoasetil CoA'nın NADPH bağımlı Asetoasetil CoA redüktaz ile 3-hidroksibütiril CoA'ya indirgenmesidir. Daha sonra 3-hidroksibütiril CoA monomerinin polimeraz enzimi ile polimerizasyon yapılarak PHB'nin sentezlenmesidir (Dombaycı vd., t.y.). İkinci yol; fotosentetik bakteri olan *Rhodospirillum rubrum*'da beş adımda sentezlenen fakat birinci yola göre ikinci basamakta farklılık gösteren yoldur. β -ketotiolaz enziminin oluşturduğu Asetoasetil CoA, NADPH bağımlı Asetoasetil CoA redüktaz tarafından L(+)-3-hidroksibütiril CoA'ya indirgenmektedir. Bu molekül enoil-CoA hidrataz ile D(-)-3-hidroksibütiril CoA'ya dönüştürülmektedir. Son basamakta sentaz enzimi polimerizasyonu gerçekleştirir (Maciej Serda vd., 2007). Üçüncü yol; bu sentez rRNA homoloji grup I'in sınıfından olan *Pseudomonas* türünde aktif olduğu görülmektedir. Alkanlar, alkonotlar veya alkanollerden çıkarılan aktive edilmiş yağ asitlerinin β -oksidasyonundan aracılı olarak 3-hidroksialkanoik asit birikiminin PHB biyosentezine yönlendirilmesidir. 3-hidroksialkanoik asit, 3-hidroksioktanat ve 3-hidroksihekzonat molekülleri *Pseudomonas oleovorans*'ın oktan, oktanol, oktanatta kültür edildiği zaman birikmektedirler. Dördüncü yol; *P. oleovorans* hariç, rRNA homoloji grup I'in sınıfından olan yaklaşık olarak tüm *Pseudomonas* bakterilerinde bulunmaktadır. Asetil CoA'dan orta uzunlukta zincirli 3HA içeren kopolimer sentezini gerçekleştirmektedir. Sentez için öncüler, de novo yağ asit

sentetik yollarından çıkarılmaktadır. Aslında *Pseudomonas aeruginosa* 3-hidroksidekonat içeren PHB sentezi bu yolu takip etmektedir.



Şekil 2.3.1.3. *Cupriavidus necator*'da PHB sentezi ve yıkımı (Maciej Serda vd., 2007)

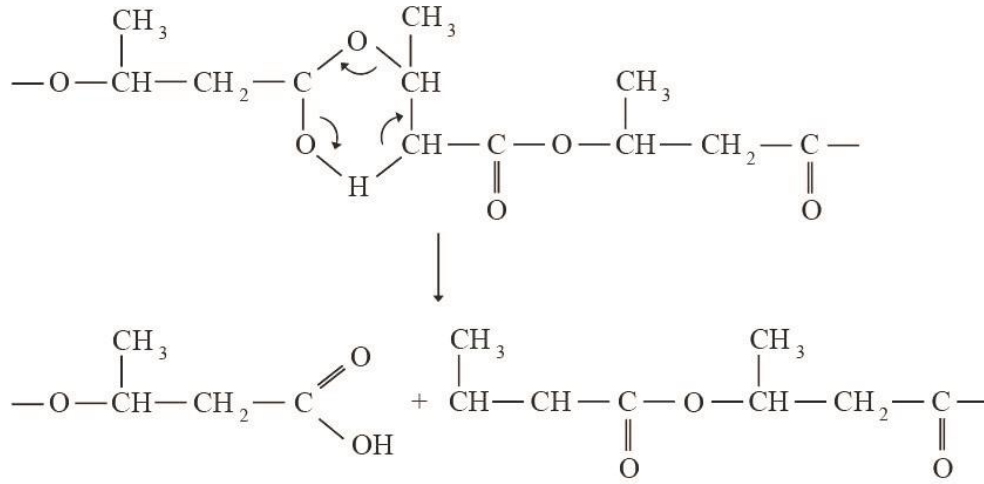
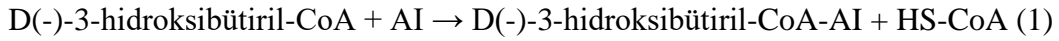
Schlegel ve Oeding'in belirttiği PHB sentezinde piruvat ve oksalasetat düzenleyici olarak görev almaktadır. Bu reaksiyonda NAD/NADH oranı redoks potansiyeli ve CoA-SH (serbest koenzim A)'ın intraselular konsantrasyonu etkilemektedir (Şekil 2.3.1.4) (Dombayci vd., t.y.).



Şekil 2.3.1.4. Schlega ve Oeding'in belirttiği PHB biyosentezi ve parçalanma yol izi. (1) β -ketotiyolaz (β -ketoaçiltiyolaz, asetasetil-CoA tiolaz), (2) Asetasetil-CoA redüktaz, (3) PHB polimeraz (PHB sentetaz), (4) PHB hidrolaz, (5) Dimer hidrolaz, (6) β -hidroksibütirat dehidrojenaz, (7) Tioforaz (Dombayci vd., t.y.)

Kemoorganotrafik olan mikroorganizmalarda, asetil-CoA'nın konsantrasyonunu etkileyen tüm etmenler PHB sentezinde etkilemektedir. Bu tür mikroorganizmlar pentoz fosfat, glikoz ve Entner-Doudoroff şeklinde hekzoz parçalanma yollarını kullanmaktadır. Asetil-CoA'nın konsantrasyonunu özellikle sitrik asit çemberi ile bağlantılıdır. Bu çemberi etkileyen faktörler dolaylı yoldan PHB sentezini de etkilemiş olmaktadır. Yüksek miktarda NADH_2 düzeyi izositrat dehidrojenazı ve sitrat sentazı inhibe etmektedir. Fakat NADH seviyesinin artışı PHB sentezini tetiklemektedir. En çok oksijenin olmadığı durumda PHB sentezi artar (B. S. Kim, 2000). Sitrat sentaz aktivitesinin azalması PHB sentezinde birincil olarak sorumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin yanı sıra trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün enzimlerinin aktivitelerinde farklılık göstermektedir (Krasil'nikova vd., 2015).

Termal degradasyonlar sonucu PHB zincirinde kırılmalar olur (Şekil 2.3.1.5) (Uzun, 2016). D(-)-3-hidroksibütiril-CoA'dan direk olarak PHB polimerizasyonu yapılamaz. Bu durum membranda özel bir protein fraksiyonu istemektedir. AI ve AII proteini bu fraksiyonu gerçekleştirmektedir. Polimeraz aktivitesiyle AI protein fraksiyonu bağlantılı, PHB depolimeraz varlığında AII fraksiyonu PHB'nin hidrolizini engellemektedir. AI, açilprotein kompleksi formunda iken β -hidroksibütiril içerisinde taşıyıcı olarak fonksiyonel görevini yapmaktadır. İkinci reaksiyonda ise PHB primeri hidroksibütiril olarak uzatılmaktadır. Membrana bağlı polimeraz ile katalizlenen reaksiyon (Dombayci vd., t.y.);



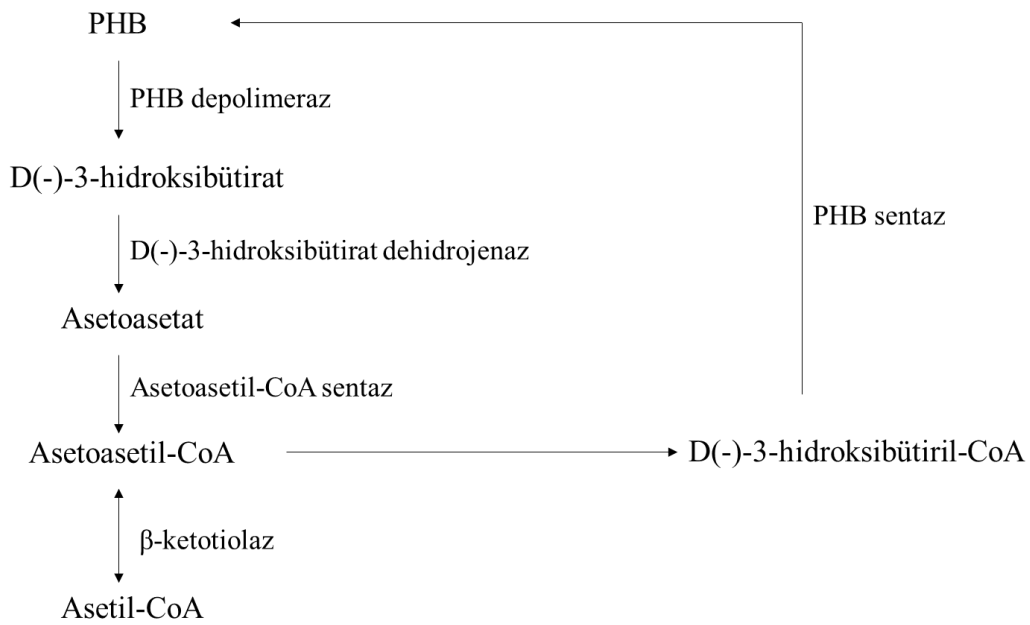
Şekil 2.3.1.5. PHB polimerinin zincir kırılma şeması (Uzun, 2016)

PHB üreten bakteriler, hücre büyümesi, PHB üretimi ve diğer işlevlerdeki metabolik değişimleri dengelemeye yardımcı olan granülle ilişkili proteinlerin (GAP'lar) bir grubunu kullanır. Bu GAP sistemi, polimerazları, depolimerazları, sentazları (PhaC), fazin düzenleyicileri (PhaR) ve fazinleri içerir (Choi vd., 2020). Bu proteinlerden fazinler, hücre için birden fazla işlevi yerine getiren iyi bir küçük moleküler ağırlıklı protein sınıfıdır. Fazlar, tüm PHB üreten bakteriler tarafından kullanılır ve PHB granüllerini çevreleyen baskın proteindir (Mezzina & Pettinari, 2016). Başlangıçta granül ve

sitoplazma arasında basitçe bir sınır tabakası oluşturduğu düşünülse de, faziinlerin hücredeki granüllerin boyutunu, şeklini ve bolluğunu kontrol etmek gibi bir dizi ek işlevi yerine getirdiği ortaya çıkmıştır (Brown vd., 2022).

2.3.2. PHB'nin biyolojik parçalanması

Plastiklere biyoteknolojik bir alternatif olan PHB ve kopolimerleri topraktaki mikroorganizmalar, bakteriler, algler ve funguslar tarafından belirli çevre koşullarında karbondioksit, su ve enerjiye dönüştürerek parçalanabilmektedir. Karbon ve enerji birikiminin ortaya çıkıp kullanılması için depolimerize edilmesi gereklidir. Zaman ve biyoparçalanma oranı ısı ve çevredeki mikrobiyal popülasyona, yüzey özelliklerine ve kalınlık gibi etkenlerde değişiklik gösterebilmektedir. Parçalanmada azot ve nitrojen oksidinin oluşmaması çevre korunması için önemlidir (Akdoğan & Çelik, 2018). Ayrıca bu parçalanma bitkilerin gelişimi için olumlu bir etkidir. Degredasyona etki eden fiziksel faktörler; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma iken biyolojik faktörler; fungus, bakteri ve yüksek yapılı organizmalardır. Yıkım hızı anaerobik ortamda birkaç ay iken deniz suyunda birkaç yıl kadar olabilmektedir. Parçalanmada aerobik ortamda karbondioksit, su ve biyokütle, anaerobik ortamda metan gazı ve karbondioksit ürünleri oluşmaktadır (Madison & Huisman, 1999). P(HB-HV)'nin biyoparçalanılığı toprakta oluşurken parçalanma yüzdesi toprağın içerdiği su miktarına ve toprağın çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. PHB parçalanmasında insan vücudu, toprak vb. gibi yerlerde toksik ürünler meydana getirmemektedir. İnsan vücudunda PHB depolimeraz enzimi bulunmamaktadır. Bu yüzden insan vücudu içerisinde yavaş bir biyolojik parçalanma gerçekleşir. Bu özelliği sayesinde tıp alanında protezler, iğneler ve dikişler gibi malzemelerinde kullanılmaktadır. Depolimeraz enzimi bakterilerde hücreye bağlanmadan ekstra miktara ulaşarak PHB'yi hidroliz ettiği tespit edilmiştir. Depolimerizasyonda hem hücre içi hem de hücre dışı enzimleri görev almaktadır. Hücre içerisinde genellikle *Bacillus megaterium* ve *Alcaligenes eutrophus* bakterilerinin enzim türleri etkili olmaktadır. Depolimerizasyon işemi ilk olarak PHB depolimeraz enzimlerinin PHB hidrolizi ile başlamaktadır. Hücre dışı enzimlerinin aktiviteleri sonucu meydana gelen monomer 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapısı substrat olarak birçok mikroorganizmada kullanılmaktadır. R-3-hidroksibütiratmonomer ve di-monomer birimlerinin sentezinde asetil-CoA sentez ve R-3-hidroksibütirat dehidrogenaz enzimleri etkilidir (Şekil 2.3.2.1) (Maciej Serda vd., 2007).



Şekil 2.3.2.1. PHB'nin parçalanması ve sentezi (Maciej Serda vd., 2007)

Topraktan *Alcidovorax facilis*, *Aspergillus fumigatus* ve *Pseudomonas lemoignei*; aktiflenmiş çamurdan *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas fluorescens*; deniz suyundan *Comamonas testosteroni*; göl suyundan *Pseudomonas stutzeri* ve anaerobik çamurdan *Hyobacter delafieldii* gibi doğadan PHB'yi parçalayan çok sayıda bakteri ve fungus izole edilmiştir (Maciej Serda vd., 2007). Birçok mikroorganizma PHB depolimeraz ve PHB hidroliz enzimlerini kullanarak PHB'yi parçalamaktadır. Bu enzimlerin aktiviteleri çevresel koşullara, polimerin kompozisyonuna, kristalin veya amorf olmasına, büyümelerine ve polimerin fiziksel özelliklerine göre değişmektedir. Mikroorganizmalar PHB'yi hızlı bir şekilde polimerlerine ayıran hücre dışı depolimeraz enzimlerini salgılamaktadır. PHB depolimeraz enzimi *Penicillium pinophilum*, *Alcaligenes faecalis* ve *Pseudomonas lemoignei* bakterilerinden izole edilmiştir. Depolimeraz enziminin katalizlendiği hidroliz reaksiyonunun ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirat monomerinin dimeridir. Monomerler ve dimerler hücre tarafından içeri alınır. Hücre içi enzimi olan β -hidroksibütirat hidrolaz ile dimer katalizlenir ve ortaya çıkan monomerler metabolik yollara dahil edilmektedir (Dombayci vd., t.y.). Hücre dışı ve hücre içi depolimerazların farklı fonksiyonları vardır. Hücre içerisinde hareketli ve kristalize olmayan PHB elastomerlerini hücre içi depolimerazları parçalamaktadır. Kristalize,

denatüre olmuş PHB ise hücre dışı depolimerazlar hidroliz etmektedir (Yılmaz & Beyatlı, t.y.).

Depolimeraz aktivitesini dış membranın bir proteini engellemektedir. Polimer hidrolizindeki artış çözücü ile granül yapısının tahrip olması açıklamaktadır. Isı etkisiyle PHB parçalanması hızlanır, bunun sebebi olarak ısı reaksiyonunun birkaç saatinde tabakalaşmayı erittiği bilinmektedir. PHB'nin steril tampon çözeltide ve toprakta parçalanmasına bakıldığında, iki ortamda da molekül ağırlığının düşmektedir. Sadece toprakta ise kütle miktarının azaldığı görülür, bunun toprak çeşidine göre değiştiği bilinmektedir. Killi toprakta özellikle kütle azalması en yüksek seviyede olmaktadır. Depolimeraz enzimi *Alcaligenes faecalis* bakterisinde kristal yapının kalınlaşması ile etkinliği azalmaktadır (Arıkan vd., 2016). *Rhizobium meliloti* bakterisinde PHB'yi parçalanmasını etkileyen genler kromozom ve mega plazmitinde yerleştiği tespit edilmiştir (Charles vd., 1997).

2.3.3. PHB'nin yenilenebilir özelliği

PHB petrokimyasal termoplastlar gibi, geri dönüştürülebilir bir parçalanması gerçekleşmektedir. Bazı uygulamalarda biyoparçalanmanın kritik olmasına rağmen PHB'ler yenilenebilen bileşikler olarak azalan fosil yakıtların yerini alabilir. Bu süreç sentez, parçalanma ve tekrar sentez şeklindedir. Bu sayede çevre korunması açısından önem taşımaktadır. PHB'nin bir diğer önemli özelliği de biyolojik yapısı ve yıkımı sayesinde yenilenebilen kaynaklara dayalı üretilebilmesidir. Doğal bir materyal olan PHB bakteriyel orjinlidir. Polimerin geri dönüştürülebilir olmasını biyoparçalanması sağlamaktadır. Karbonhidrat, yağ asitleri ve şekerler tarımsal ürünlerde karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi PHB'nin fermentatif üretimine bağlıdır.

2.4. *Cereibacter sphaeroides* O.U. 001

Fotosentetik bakteriler olan *Rhodospirillum* ve *Rhodobacter* cinsleri n-alkanoik asitleri kullanarak polimeri depo etmektedir. Ayrıca nitrojen sınırlandırılmasında PHB verimi hücre kuru ağırlığının %60-70'i kadar olabildiği tespit edilmiştir (Chen vd., 2006). Çeşitli mikroorganizmalar arasında, fototrofik bakterilerin, genellikle poli(3-hidroksibütirat), PHB yüksek miktarda depolama ürünleridir. Fotosentetik bakterilerin

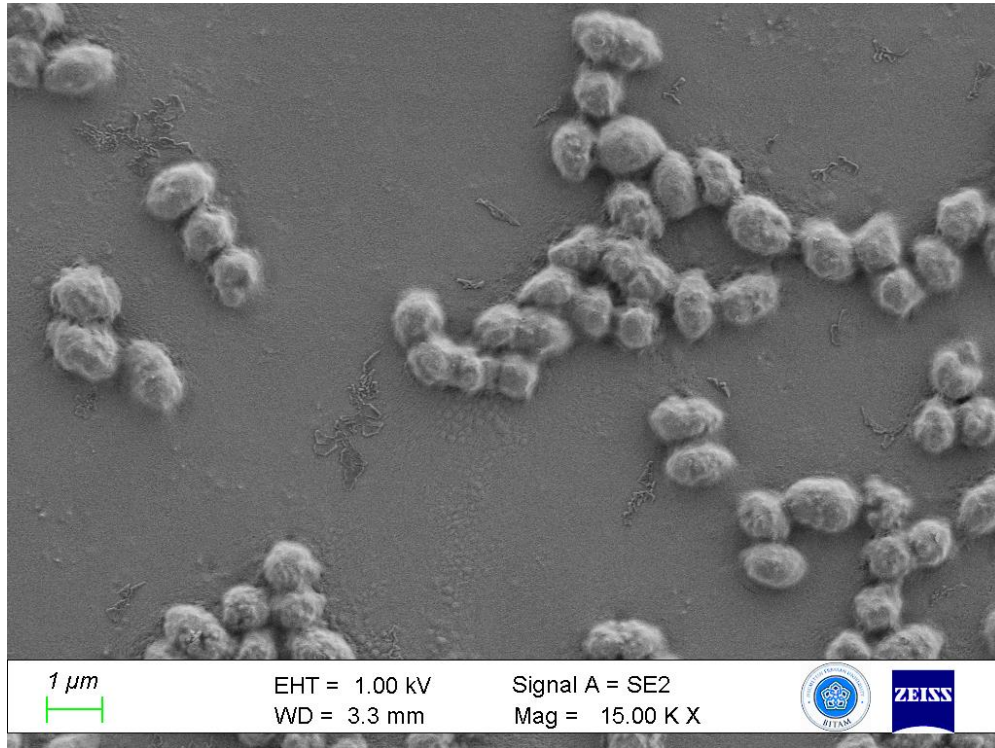
kullanımı enerji kaynağı olarak güneş ışığının kullanılması üretim açısından avantajdır (Brandl vd., 1991a). Karbon ve enerji rezerve görevi gören PHB, dengesiz büyüme koşulları altında sitoplazmada birikir. Fotosentetik bakterilerde biriken PHB miktarı, pH ve substrat tipi gibi fizyolojik koşullara bağlıdır. Hidrojen üretimi ve PHB birikimi, *Cereibacter sphaeroides*'in (eski adıyla *Rhodobacter sphaeroides*) önemli bir fizyolojik davranışdır. *Rhodobacter* türlerinde PHB birikimi ve hidrojen üretimi arasında sinyal iletim yolları rol almaktadır. *C. sphaeroides*'te hidrojen salınımı ve PHB birikimi, indirgeme gücünün harcanması için iki alternatif yolu temsil etmektedir (Kars vd., 2008). Gaz üretimleri kısmen PHB sentaz aktivitelerini etkilediğinden PHB içeriğinde de hafif düşüşler olabilmektedir. Non-sülfür ve fototrofik bir bakteri olan *C. sphaeroides* azotun sınırlandırıldığı bir ortamda %60-70 arasında PHB biriktirirken, bu polimerin %98'i 3HB ve %2'sinin 3HV monomerlerinden oluştuğu tespit edilmiştir (Madison & Huisman, 1999). Organik asitler arasında asetatın *C. sphaeroides* tarafından PHB üretimi için uygun substrat olduğu belirlenmiştir. Asetat asimilasyonu için önerilen bir Etilmalonil-CoA yolu, PHB biyosentetik yolu ile ortak unsurları paylaşır. Hem PHB sentezi hem de asetat asimilasyonu için ilk reaksiyonlar aynıdır ve bunlar sadece PHB polimerizasyonu ve krotonil-CoA oluşumu esnasında dallanır (M. S. Kim vd., 2011).

C. sphaeroides PHB sentezi yaparken PHB biyosentezi başlığı altında anlatılan iki molekül asetil koenzim A' nın (asetil CoA) β -ketotiolaz enzimi ile katalizlenerek asetoasetil CoA'ya dönüşümünün olduğu birinci yolu kullanmaktadır. *C. sphaeroides*'teki PHB sentazını kodlayan phbC (RSP_1257) geni, iki kurucu enzim olan β -ketotiyolazı ve asetoasetil-CoA redüktazı kodlayan phbAB genleri ile bağlantılı değildir (A. L. Xu vd., 2001). Hem β -ketotiyolaz (phbA) hem de asetoasetil-CoA redüktaz (phbB), *C. sphaeroides* içindeki yapısal enzimler olduğundan PHB sentaz (phbC) PHB içeriğini kontrol eden anahtar enzimdir (Kranz vd., 1997). PHB sentazı kodlayan phbC transkripsiyonu üzerinde cerR geni düzenleyici bir etkiye sahiptir. CerR ve cerI delesyonunun kusuru veya cerI'nın insersiyonel olarak kesintiye uğraması, aerobik büyüme koşulu altında PHB içeriğini ikiye katlamaktadır. PHB birikiminin modülasyonunda cerR/cerI aktivitesi phbC transkripsiyon seviyesinin önüne geçebilmektedir. Sekans temel alındığında *C. sphaeroides*'de RSP1256 fabI'nın kabul edilen genidir ve PHB sentaz enzimini kodlayan phbC geni de RSP1256'nın komşusu olan RSP1257'nin kabul edilen genidir (Ye vd., 2013a).

Hidrojen üretimi ve nitrojenaz aktivitesi PHB birikimini etkilememektedir. *C. sphaeroides* KD131 suşu iki farklı nitrojen kaynağı (amonyum sülfat ve glutamat) ile iki farklı karbon kaynağı (süksinat ve asetat) kullanılarak büyütüldüğünde süksinat ortamına göre asetat ortamında PHB birikiminin 7 kat daha yüksek olduğu görülmüştür. Karbon kaynağı olarak süksinat kullanıldığında %0-13 arasında, asetat kullanıldığında ise %31-46 arasında substrat dönüşüm verimliliği görülmüştür. Ortamda süksinat kullanıldığında bu verimliliğin bakteriyel büyümeye kullanıldığı düşünülmektedir. *C. sphaeroides*'de karbon kaynağı olarak süksinat kullanıldığında azot kaynağı amonyum sülfat olduğunda %6.9, azot kaynağı glutamat iken %5.6 PHB birikimi görülmüştür. Asetat karbon kaynağı olduğunda PHB içeriği %15,5'ten %54,1 ve %10,2'den %51'e yükselmiştir. Buna göre PHB birikimi karbon kaynağından fazlaca etkilenmektedir (M. S. Kim vd., 2012). *C. sphaeroides* ATCC 17023 suşu karbon kaynağı olarak 122 mM asetat kullanıldığında polimer çoğunluğu durağan fazda oluşur. Çok geç büyüme fazında ise PHB birikimi yüksek oranda ilerlemektedir. Hücre kuru ağırlığını %65'i kadar maksimum bir PHB içeriği elde edilmiştir. Bu suşta ışık yoğunluğunu büyümeyi azalttığı fakat PHB içeriğinde çok düşük miktarda bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Brandl vd., 1991a).

C. sphaeroides ES16 ve mutant suşlar olan *C. sphaeroides* N2O, *C. sphaeroides* U7'ye bakıldığında PHB üretiminin mutant suşlarda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu suşlarda karbon konsantrasyonu arttığında PHB'nin arttığı ancak nitrojen konsantrasyonunun PHB birikimi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. *C. sphaeroides*'in üç türünün büyüme ve PHB üretimi için etkili bir karbon kaynağı olan asetat, malattan daha ucuzdur. Üç suşun büyümesi ve PHB üretimi için uygun sıcaklık 35 °C olduğu belirlenmiştir. 25 °C büyümeleri için uygun değildir, 45°C'de ise PHB üretimi düşüktür. Optimum asetat konsantrasyonunda *C. sphaeroides* ES16 hücre kuru ağırlığının %47.04'ü kadar PHB üretimi görülmüştür. ES16 suşu çeşitli parametrelerde %20-47 arasında PHB üretmiştir. *C. sphaeroides* N2O mutant suşunun hücre kuru ağırlığının %95'i PHB iken U7 mutantının PHB içeriği %54.04'dür. Glutamat/Asetat besiyerinde 37°C'de 60 saat inkübasyon sonucu *C. sphaeroides* ES16 suşu %22,21, *C. sphaeroides* N2O suşu %72,98 ve *C. sphaeroides* U7 suşu ise %50,03 kadar PHB verimi gözlemlenmiştir (Sangkharak & Prasertsan, 2007).

C. sphaeroides N₂O suşunda optimal besiyerinde kontrolsüz pH durumuna göre kontrollü pH koşulları altında hücre kuru ağırlığının %96,13'ü kadar PHB içeriği gözlemlenmiştir. N₂O suşunda havalandırma oranı 0, 0.5, 1.0, 2.0 vvm olduğunda PHB üretimi sırasıyla %65,1, %76,5, %95,4 ve %89.9 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu mutant suşunda hücre büyümesi ve PHB üretimi için optimal havalandırma oranı 1.0 vvm olarak belirlenmiştir. *C. sphaeroides* N₂O suşundan elde edilen hücre kuru ağırlığının %95'nin PHB içermesi, fotosentetik bakterilerden şimdiye kadar bildirilen en yüksek değerdir (Sangkharak & Prasertsan, 2007). Organik maddelerin belirli koşullar altında PHB gibi rezerv materyallerin birikimine gittiği bilinmektedir. PHB'yi doğal olarak biriktirme kapasitesi düşük olan *Rhodobacter capsulatus* bakterisinde asetat asimilasyon yolundan sitramalat döngüsüne geçtiği zaman hücre kuru ağırlığının %70'i kadar PHB görülür. *C. sphaeroides*'in BP minimal besiyerinde büyütülmüş hali Şekil 2.4.1'de taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntüsü görülmektedir (Sert, 2022).



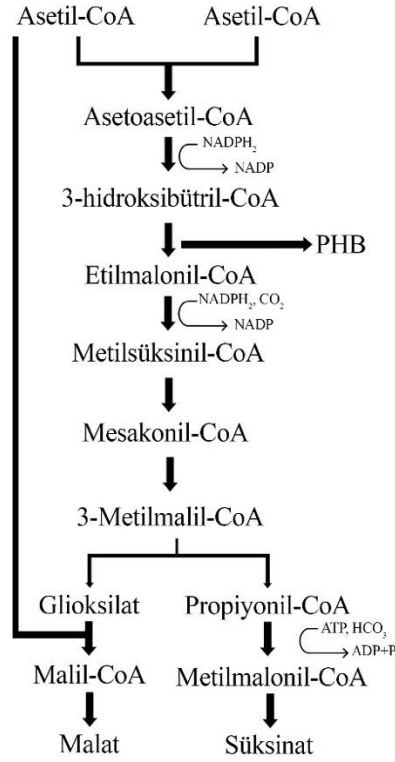
Şekil 2.4.1. *Cereibacter sphaeroides*'in SEM görüntüsü (Sert, 2022)

2.4.1. *Cereibacter sphaeroides*'de PHB üretimi

C. sphaeroides, koşullara bağlı olarak bir durumdan diğerine geçerek fotoheterotrof, fotoototrof veya kemoheterotrof olarak büyüebilir. Örneğin organik

asitlerin varlığında, anaerobik koşullar ve aydınlatma altında fotoheterofik olarak büyüebilir ve hidrojen üretebilir (Basak & Das, 2007). Karanlık ortamda aerobik olarak büyüdüğünde yüksek bir miktarda PHB üretebilir. PNS bakteri kültürleri, aydınlatma altında anaerobik olarak büyütüldüklerinde sarımsı ila yeşilimsi ve koyu kahverengi renktedir, ancak oksijen varlığında renkleri kırmızıya döner (Özsoy, 2012).

PHB hücre içi depolama malzemesi olarak yüksek karbon / düşük nitrojen oranında *C. sphaeroides* tarafından polimer olarak birikir. Özellikle karbon kaynağı olarak asetatta büyütüldüğünde hücre kuru ağırlığının %45'i kadar üretebilir. Bu sonuçtan anlaşıldığı üzere bakteri enerjisinin çoğunu PHB üretimi için harcamaktadır (Kars & Gündüz, 2010). Karbon kaynağı olarak asetat kullanıldığında *C. sphaeroides* etilmalonil-CoA yolağını tercih eder. Bu yolağın bazı dezavantajları vardır. İlk yol NADPH₂ çıkışı enerjiyi ve elektronu azaltarak ATP gerektirir bu gereksinimde de güç azalmaktadır (Şekil 2.4.1.1). İkincisi, asetat asimilasyon yolu, PHB biyosentetik yolla ortak unsurları paylaşır. Yani, her iki yolun ilk adımları aynıdır, yalnızca PHB polimerizasyonu/krotonil-CoA oluşumu adımlarında dallanırlar. Bu nedenle, asetat asimilasyonu sırasında eşzamanlı PHB sentezi meydana gelir ve bu da hidrojen üretiminin etkinliğini azaltır. Nitrojenaz enzimi hidrojen üretiminde etkili olmaktadır ortamda kullanılan amonyum nitrojenaz enzimini baskılayarak yolak değişimini sağlamaktadır ve bakteri böylece PHB üremine yönelmektedir. Ortamda nitrojen miktarının artması durumunda hücre büyümesi, karbon miktarının artması durumunda PHB birikimi artmaktadır (Y. R. Lee vd., 2020).

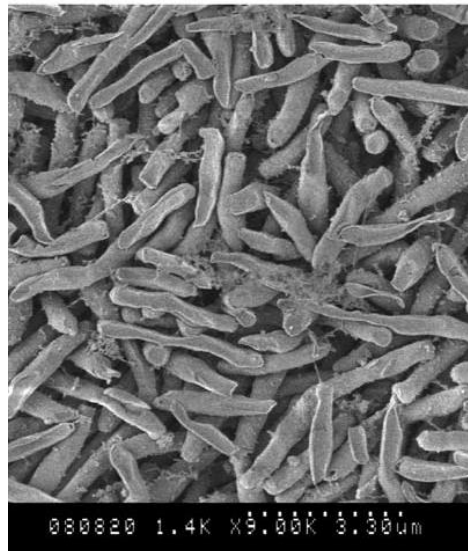


Şekil 2.4.1.1. *C. sphaeroides* etilmalonil-CoA yolu (Kars & Gündüz, 2010)

C. sphaeroides aydınlık-karanlık / aerobik-anaerobik koşullarda zamana bağlı olarak farklı sıcaklıklarda ve C/N oranına göre bakıldığı durumda aerobik karanlık ortamda 30 °C’de 150 rpm’de çalkalanarak kültürlenmesinin PHB üretimi için en verimli ortam olduğu belirlenmiştir. Hücre büyümesi ve PHB içeriği karanlık aerobik koşullar altında ışığa göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Asetil-CoA asetiltransferazı kodlayan PhaA ve asetoasetil-CoA redüktazı kodlayan PhaB genleri karanlık aerobik ve aydınlık anaerobik koşullar altında 1.5 kattan biraz daha fazla indüklenmiştir. Bununla birlikte PHB polimerazı kodlayan PhaC ve PHB depolimerazını kodlayan PhaZ genlerinin karanlık anaerobik koşullar altında ifade edilmediği gözlemlenmiştir. Karanlık-aerobik koşulun hücre büyümesi ve PHB üretimi için en uygun koşul olduğu sonuçlanmıştır (Y. R. Lee vd., 2020). PhaA geni, asetil-CoA yoğunlaşması ile PHB üretimini başlatmak için önemlidir ve PhaB geni PHB üretkenliği için en kritik bileşendir.

2.5. *Rhodopseudomonas palustris* 7850

R. palustris metabolik olarak en çok yönlü organizmalardan birisidir ve çeşitli ortamlarda çok çeşitli karbon kaynaklarından yararlanarak PHB üretim maliyetlerini azaltabilir. *R. palustris* anaerobik koşullar altında malat, asetat ve laktat gibi organik asitleri enerji ve elektron kaynağı olarak kullanabilir. PHB üretimi için nitrojen fiksasyonunun da kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Brown vd., 2020). Ancak nitrojen sınırlamasının PHB birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Ranaivoarisoa vd., 2019). *R. palustris* sürdürülebilir ham maddeleri çeşitli katma değerli ürünlere (PHVB, hidrojen, n-butanol) dönüştürme kabiliyetine sahip metabolik olarak çok sağlam bir bakteridir. Metabolik olaylarda çok yönlülük sergilediği için PHB üretiminde tercih edilmiştir. Büyüme hızı ve PHVB üretimi arasındaki ilişki doğrusaldır ve doğrudan negatif bir korelasyonu yansıtır (Brown vd., 2022). *R. palustris*'in bir çalışmada SEM görüntüsü Şekil 2.5.1' de görülmektedir (Gosse vd., 2010).



Şekil 2.5.1. *Rhodopseudomonas palustris*'in SEM görüntüsü (Gosse vd., 2010)

C. sphaeroides ve *R. palustris* bakterilerinde PHB birikimi görülür. PNSB tarafından PHB birikimi suşa, substrata, pH, aydınlatma ve metabolik yollara bağlıdır. Bakterideki karbon kaynağının ve substrat asimilasyon yolunun türüne bağlı olarak, hücre metabolizmasının sürdürülmesi, hidrojen üretimi ve PHB sentezi için protonlar ve ATP'ler üretilir. Az miktarda nitrojen ve yüksek miktarda karbon kaynağı bulunması hem hidrojen oluşumunu hem de PHB üretimini teşvik eder. Ancak, hidrojen üretimi ve PHB

sentezi arasında elektron ve gücü azaltmak için bir rekabet vardır. *R. capsulatus*, asetat kullanarak PHB üretimi için potansiyel bir adaydır (Özsoy Demiriz vd., 2019). Karanlıkta meydana gelen nitrojenaz aktivitesi inhibe edilmesi, TCA döngüsünün aktivitesinin sınırlandırılması gibi PHB sentezini etkileyebilecek alternatif yollar bilinmektedir. *R. capsulatus*'da aydınlık-karanlık döngüleri oluşturulduğunda PHB üretiminde artış, hidrojen üretiminde azalış görülmüştür (Sargsyan vd., 2015). *R. palustris* zengin ortamda kemoheterotrofik olarak ve çeşitli karbon kaynakları kullanılarak fotoheterotrofik olarak büyüebilir. *R. palustris* WP3-5, substrat asetat ve propiyonat olduğunda hidrojen üretimi yerine PHB sentezi için indirgeme gücü kullanmayı tercih eder (Özsoy Demiriz vd., 2019). Bu bakterini maksimum %10 PHB biriktirdiği görülmüştür. *R. palustris* 42OL suşunda maksimum PHB hücre kuru ağırlığının %4'ü iken substrat olarak zeytinyağı değirmeninden gelen atık suyu kullanıldığında hücre kuru ağırlığının %9'u kadar PHB verimi olmuştur (Montiel Corona vd., 2017).

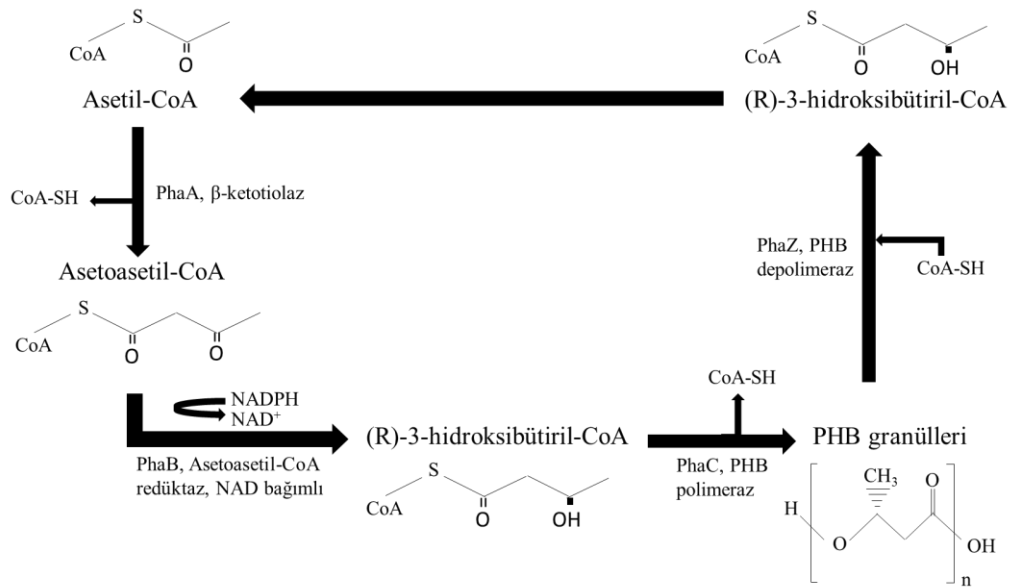
Daha önceki bir raporda asetat üzerinde yetiştirilen *R. palustris*'in karbonunun %93'ünü biyokütleyle dönüştürdüğünü göstermiştir (McKinlay & Harwood, 2010). Başka bir çalışmada, *R. palustris* de PHB üretimi için aerobik ve karanlık koşulda 30 °C'de 250 rpm'de çalkalanarak en uygun ortam olduğu belirlenmiştir. Amonyum kaynağı olarak amonyum klorür kullanılması verimli olduğu görülmüştür (Ranaivoarisoa vd., 2019). Sabit fazlı kültürlerin yüksek hücre yoğunluğu genellikle oksijeni sınırlayan koşullarla sonuçlanmaktadır (Price-Whelan vd., 2007). Oksijen sınırlamasının *R. palustris* de aerobik kemoheterotrofik büyümeden anerobik fototrofik büyümeye geçişi uyardığı göz önüne alındığında sabit fazda kemoheterotrofik olarak büyütülen hücrelerin oksik büyümeden anoksik büyümeye geçiş yapması muhtemel görüldüğü anlaşılmıştır (Welande vd., 2009).

2.5.1. *Rhodospseudomonas palustris*'de PHB üretimi

PHB üretimi daha önce birkaç *R. palustris* suşu tarafından rapor edilmiştir (McKinlay & Harwood, 2010). Bununla birlikte, PHB döngüsü genleri şimdiye kadar araştırılmamıştır. Bu bilgi eksikliği, PHB biyolojik üretimi için gelecekteki biyomühendislik çabalarına yönelik potansiyel beklentileri kritik bir şekilde sınırlandırmaktadır. Kısaca, PHB üretimi iki asetil-CoA'nın, β -ketotiyolaz enzimi PhaA tarafından yürütülen bir reaksiyon olan asetoasetil-CoA'ya yoğunlaştırılmasıyla başlar.

Asetoasetil-CoA, asetoasetil-CoA redüktaz enzimi PhaB tarafından (R)-3-hidroksibütiril-CoA'ya indirgenir. Sonunda, PHB polimerizasyonu, PHB polimeraz, PhaC tarafından sağlanır (Şekil 2.5.1.1). PHB, PHB moleküllerinin PHB depolimeraz, PhaZ tarafından katabolize edildiği çevresel stres sırasında önemli bir karbon ve enerji kaynağı olarak da hizmet edebilir. PhaR geni ise PHB granüllerinin sayısını ve boyutunu kontrol eden ve bunlara bağlanan fazin proteini olan PhaP'yi düzenlemektedir. PhaR ayrıca PHB granüllerine bağlanır ve granül boyutu büyüdükçe ondan ayrılmaktadır (Ranaivoarisoa vd., 2019).

İlk olarak, bir dizi çalışma PHB sentezi hızının asetil-CoA havuz boyutuna veya asetil-CoA/CoA oranına (Kocharin vd., 2012) bağlı olduğunu göstermiştir. Asetil-CoA, yoldaki ilk substrat olduğundan, hücre içi konsantrasyonunun artmasının PHB sentezi hızında bir artışa yol açacağını varsaymak olası bir durumdur. İkincisi, diğer çalışmalar PHB sentezi hızının NADPH'nin ($[NADPH]/[NADP]$) redoks durumuyla ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu gözlem, yolun bir elektron alıcısı olarak oynadığı role bağlanabilmektedir. Ayrıca, NADPH'nin NADP'ye oranındaki bir artış, yoldaki ikinci reaksiyonun (redüktaz) termodinamik itici gücünü arttırmaktadır. Üçüncüsü, yolda farklı enzimleri aşırı ifade etmenin etkisini araştıran bir çalışma, redüktazın ifadesinin PHB sentezinde sınırlayıcı faktör olduğunu bulmuştur (Alsiyabi vd., 2021).

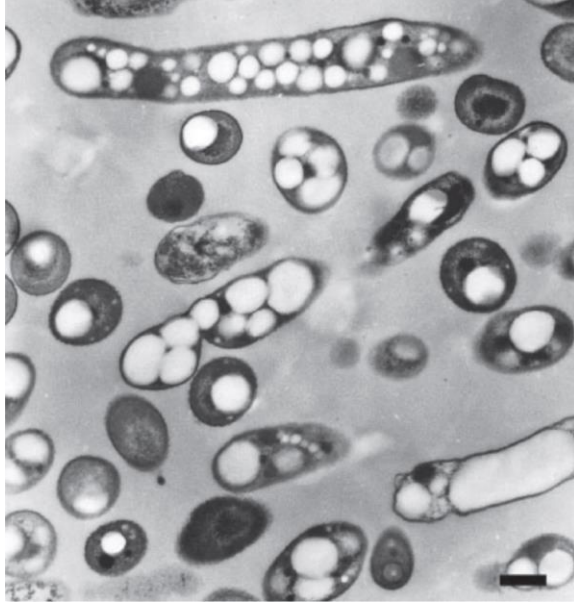


Şekil 2.5.1.1. *Rhodospseudomonas palustris*'de PHB döğüsü (Ranaivoarisoa vd., 2019)

Ayrıca *R. palustris*'in 3-hidroksibütirat (3HB) ve 3-hidroksivalerat (3HV) monomerlerinin bir kopolimeri olan poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHVB) adı verilen bir PHB kopolimeri oluşturabildiği ortaya çıkmıştır. Karbon kaynağı olarak p-kumarat, 10 mM sodyum asetat kullanılarak amonyağa aç bırakılan ve *C. necator*'dan phaP1 fazini entegre edilen *R. palustris* aerobik, anaerobik koşullarda 3HB, 3HV üretimi incelendiğinde; phaP1 ekspresyonu aerobik (0.7 g/L) koşulda anaerobik (0.4 g/L) koşula göre daha yüksek ölçüde PHVB üretimi sağlamıştır (Brown vd., 2022). PHVB PHB'ye kıyasla daha ideal termomekanik özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, monomer ürünleri aynı enzimler tarafından üretilmesinden kaynaklı olarak PHB ve PHVB çok benzer olması muhtemel bir olasıdır.

2.6. *Cupriavidus necator* H16

C. necator toprakta ve suda bulunan gram negatif, spor oluşturmeyen bir bakteridir. Bu türe ait suşlar aerobik heterotroflarda PHA'ların mikrobiyal üretiminin ve kemolitototrofik metabolizmasının araştırılması için en iyi modellerdir. PHB üreten mikroorganizmalar arasında en iyi bilinen bakterilerden birisidir. *C. necator* büyüme ile ilişkili olmayan bir şekilde PHB üretme konusunda güçlü bir yeteneğe sahip model organizmadır. PHB birikimi ilk üstel fazda başlar ve kültür durağan faza ulaşana kadar artmaya devam eder. Karbon ve azot tüketimleri, bakteri büyümesi ve bunun sonucunda polimer birikimi ile ilişkilidir (Nygaard vd., 2021). *C. necator* heterotrofik veya ototrofik bir ortamda çok çeşitli substratları kullanarak hücresel kuru ağırlığının %90'ına kadar PHB biriktirme kapasitesine sahiptir. *C. necator*'da PHB granüllerinin SEM görüntüsü Şekil 2.6.1'de mevcuttur (Panich vd., 2021). PHB üretimi için substrat olarak birkaç karbon kaynağı test edilmiştir: fruktoz, glikoz, laktik asit, ksiloz, sükroz, melas, sorboz, asetik asit, nişasta, sodyum asetat, gliserol, laktoz, propiyonik asit ve farklı lignoselülozik biyokütle hidrolizatları; fruktoz, en yüksek PHB üretkenliğine izin veren substrat olmuştur (H. R. Jung vd., 2020).



Şekil 2.6.1. *Cupriavidus necator*'da PHB granüllerinin SEM görüntüsü (Panich vd., 2021)

Baei ve ark. araştırmalarında, *C. necator*'u melas üzerine ek substrat olarak sodyum asetat eklemesi yaparak 30 °C'de 250 rpm'de çalkalamalı ortamda PHB üretimini incelemiştir. Maksimum hücre büyümesi ve PHB birikimi 24 saatte sonuçlanmıştır. Asetat eklenmesiyle biyopolimer konsantrasyonu yükselmiştir. Bu durumda, %20 asetat eklenen ortamda üretilen PHB miktarı asetatsız bir ortama göre 2 katından fazla olduğu görülmüştür. Asetat ilavesi aynı zamanda hücre kuru ağırlığının %25 arttırmıştır (Baei vd., 2009). Çalkalamalı ortamın oluşturulması biyokütle düzeyinde süresinin kısılmasını sağlamıştır.

2.6.1. *Cupriavidus necator*'da PHB üretimi

C. necator H16 da keşfedilen yedi farklı fazinle birlikte fazinlerin en fazla karakterizasyonuna sahip olan PHB üretimi için model bir bakteridir (Brown vd., 2022). PHB granüllerinin sentezinde ve büyümesinde yer alan proteinleri kodlayan PhaP ve PhaR genleri. Fazinler (PhaP), PHB granülleri üzerinde bulunan başlıca proteinlerdir ve sentezlerinde önemli bir rol oynadığı tahmin edilmektedir. Onların yokluğunda, hücrenin hemen hemen tüm sitoplazmayı kaplayan tek bir granül sentezlediği, bu proteinler mevcut olduğunda daha fazla sayıda küçük granül sentezlendiği gösterilmiştir (Wieczorek vd., 1995). Ayrıca, düzenleyici proteinlerin (PhaR), PHB ve DNA moleküllerini bağlayabildikleri göz önüne alındığında, PHB biyosentezinde fazinlerin düzenleyicileri olarak hizmet ettiği düşünülmektedir (Maehara vd., 2002). PHB'nin yokluğunda,

PhaR'nin granülle ilişkili protein PhaP'nin üretimini baskılayan düzenleyici bir mekanizmaya aracılık ettiğini bulmuştur. Öte yandan, hücreler PHB biriktirmeye başladığında, PhaR, PhaP promotör bölgesinden ayrılması yoluyla PhaP ekspresyonunu düzenleyebilir. Böylece, bu son protein, daha önce belirtildiği gibi, PHB granüllerinin sentezini aktive eder (Monroy & Buitrón, 2020).

Mikrobiyal PHB üretimi asetil-CoA'dan başlar ve 3 aşamada ilerler: *C. necator* için tanımlanmış PHB sentezi iki molekül asetil koenzim A' nın (asetil CoA) β -ketotiolaz enzimiyle katalizlenerek Asetoasetil CoA'ya dönüştürülmesidir. Asetoasetil CoA'nın NADPH bağımlı asetasetil CoA redüktaz ile 3-hidroksibütiril CoA'ya indirgenmesidir. Daha sonra 3-hidroksibütiril CoA monomerinin polimeraz enzimi ile polimerizasyon yapılarak PHB'nin sentezlenmesidir (Dombayci vd., t.y.). Ayrıca, karbon kaynağının artırılması ile aerobik beslenme ortamı PHB içeriğinin artmasını sağlamaktadır (Nygaard vd., 2021).

R. palustris TIE-1 genomunun mevcudiyeti, hücre içinde PHA'ları ürettiği bilinen H₂-oksitleyici bir betaproteobakteri olan *C. necator*'un PHB döngüsü genlerine homolog olan genlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır (Ranaivoarisoa vd., 2019). *C. necator* tarafından kullanılan baskın fazin olarak PhaP1'in hücredeki granüllerin boyutunu ve sayısını kontrol ettiği, PHB birikimini ve bozunma oranlarını etkilediği granüllerin lokalizasyonunu desteklediği ve PHA'ların kopolimer bileşimlerini manipüle ettiği gösterilmiştir (Brown vd., 2022). Bugüne kadar *C. necator* gibi belirli proteobakterilerin, besinle sınırlı koşullar altında bir enerji depolama malzemesi olarak işlev gören PHB'yi CO₂'den biriktirdiği de bilinmektedir. Bununla birlikte, nitrojenle sınırlı bir ortam, karbonun CO₂'den PHB'ye metabolik akışını olumlu yönde etkileyerek %67'ye kadar PHB birikimine sebep olduğu görülmüştür. CO₂ metabolize eden bakteriler ise genellikle sınırlı PHB üretimi göstermiştir (J. Lee vd., 2021). Bununla birlikte, karbon kaynağı asetat alınımının metabolizmayı hızlandırdığı bilinmektedir. Karbon kaynağı olarak fruktoz ile asetat kullanımı incelendiğinde; 1/10 asetat/fruktoz oranı yerine 1/1 asetat/fruktoz oranında PHB üretimi daha fazla görülmüştür (Duvigneau vd., 2020).

2.7. PHB Görüntüleme Yöntemleri

Bakteri hücrelerinde PHB granüllerinin tespitinde en sık kullanılan yöntemlerden birisi de lipofilik boyalar kullanılarak boyanmasıdır. Bu yöntemde genellikle Nile Blue A, Nile Red, Sudan Black B ve Sudan III gibi floresan boya ları kullanılmaktadır. PHB üreten ve üretmeyen bakterileri ayırt etmek amacıyla bu boyalar kullanılır. Yüksek derecede kırıcılık özelliklerinden dolayı PHB granülleri elektron mikroskobu, floresan mikroskobu veya faz-kontrast mikroskobu ile kolaylıkla gözlenebilmektedir. Görüntülemek için en sık kullanılan yöntem elektron mikroskobudur. PHB granüllerini ve hücre morfolojisini belirlemek için ışık mikroskobu da (Örneğin; Olympus CX21 markalı ışık mikroskobu) kullanılmaktadır (Maciej Serda vd., 2007).

2.7.1. Sudan Black B ile PHB granüllerinin boyanması

Genellikle lipitler ve sudanofilik maddelerin boyanması için Sudan boya ları tercih edilmektedir. PHB'nin bazı özellikleri lipitlere benzerdir, buda hidrofobisitesi ile bağlantılı olmasındandır. PHB'lerin saptanmasında Sudan Black B boyası sıklıkla kullanılmaktadır (Yasin & Al-Mayaly, 2020). Sudan Black B lipit yapılarını belirlemesi ile doğal PHA cisimcikleri boyanır. Bu yüzden lipofilik boyalar ile PHB granüllerinin bulunduğu inklüzyon cisimcikleri kolayca boyanabilmektedir. Bu yöntemde öncelikle koloniler lam üzerine yayma yapılarak hazırlanır. %70'lik etil alkolde %0.3 oranında seyreltilmiş Sudan Black B çözeltisi lamdaki yaymanın üzerine birkaç damla damlatılır ve 15 dakika bekletilir. Dekolorizasyon işlemi için ksilene daldırılır. Zıt bir boyama yapmak için %0.5 konsantrasyonda sulu çözeltide hazırlanmış safranin boyası eklenir 10 saniye gibi kısa bir süre bekletilerek yıkanır. Son olarak preparata immersiyon yağ damlatılarak mikroskop altında incelenir. PHB içeren hücreler koyu mavi-siyah renk alırken, az miktarda PHB içerenler renksiz ya da belirsiz gri olarak görülmektedir (Thapa vd., 2019).

2.7.2. Nile Red ile PHB granüllerinin boyanması

Membranlar veya lipit benzeri inklüzyonlar (PHB, triaçil-gliseritler) gibi hidrofobik hücre yapılarını görselleştirmek, belirlemek için kullanılan Nile Blue ve Nile Red olarak bilinen lipofilik floresan boya larıdır. PHB granüllerinin saptanmasında bir

diğer kolay yol ise Nile Red boyasının kullanılmasıdır. Nile Red boyası PHB granüllerine bağlanır ve floresan mikroskobu ile kolayca tespit edilir. Nile Red hidrofobik bileşik eklentilerinin karakteristik özelliği olan emisyon (>590 nm) ve uyarım (560 nm) dalga boylarının solvent polaritesine bağlıdır. İlk olarak ön kültürden kalan hücreler negatif kontrol amaçlı kullanılır. Bu hücrelerde ($> \%95$) birikmiş PHB olmamalıdır. Daha sonra ana kültürden alınan numuneden hücre elde edilmesi için santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılır. Elde edilen pellet süspanse edildikten sonra 5:1 oranında Nile Red boyası eklenir. Agaroz ped üzerine boyalı hücreler damlatılır ve kuruduktan sonra görüntüleme için hazırdır. Koyu kırmızı renkte floresan görüntü elde edilir (Juengert vd., 2018).

Nile Red, lipidler için yüksek afiniteye, 528 nm'nin üzerinde bir uyarma dalga boyuna, 570 ile 630 nm arasında emisyon dalga boylarına sahip olan, mayalardan hayvan hücrelerine kadar çeşitli organizmalarda kullanılmış olan bir lipofilik floresan boyadır (Wang vd., 2018). Nile Red polariteye karşı daha yüksek bir duyarlılığa, adsorpsiyon ve emisyon için geniş spektrumlara, düşük nispi floresan stabilitesine ve diğer floresan boyalara kıyasla sınırlı geçirgenlik kapasitesine sahiptir. Çalışmalar, Nile Red bazı lipidleri değerlendirmek için ideal olduğunu gösterse de, etkinliği türlere ve deneysel parametrelere göre değişmektedir (Brown vd., 2020). Boyama prosedüründe etanol eklenmesi, diğer çalışmalara kıyasla Nile Red'in genel absorpsiyon verimliliğini arttırabilecek polariteyi azalttığı görülmüştür (Li & Wilkins, 2020). Nile Red için biraz daha uzun bir kuluçka süresi kullanmak faydalı olabilmektedir (Wang vd., 2018). Boyanın miktarının az veya çok kullanılması durumunda bir fark olduğu görülmemiştir (Brown vd., 2020).

2.8. PHB Ekstraksiyon Yöntemleri

Ye ve ark. göre; kültürasyon işleminden sonra, farklı fazlardaki hücreler santrifüj ile ayrıştırılır. Fransız presi kullanılarak hücreler parçalanır. pH 7.5 olan NaCl, KCl, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ içeren Tris-HCl, içerisinde süspanse edilir. Hücreleri ve hücre kalıntılarını ayırmak için 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanır. PHB granülleri daha sonra ultrasantrifüj (100.000 rpm, 60 dk) ile çöktürülür. Saflığın artması için PHB granülleri aynı tampon içerisinde yıkanır ve tekrar santrifüjlenir (100.000 rpm, 30 dk). Daha fazla kullanım için granüller, aynı tampon içerisinde süspanse edilir (Ye vd., 2013b).

Brandl ve ark. göre; bir diğer yöntem, PHB granüllerinin Soxhlet ekstraktörü kullanılarak liyofilize hücrelerden kloroform ile ekstrakte edilir. Döner bir buharlaştırıcı ile kloroform çözeltisi konsantre edilir. Pamuklu tıpa içeren sıcak bir cam hunide karışan metanolün üzerine çözelti aktarılır. Ayrıca metanolün kloroforma oranı 10:1 olmalıdır. Çöken polimer santrifüj işlemiyle ayrılır ve iki kez metanol ile yıkanır. Oda sıcaklığında 16 saat vakumla kurutulur. Daha sonra kloroform içinde yeniden çözdürülür ve tekrar süzdürülür. Ardından karıştırılan dietil etere damla damla ilave edilir. Polimer tekrar santrifüj ile ayrılır ve kurutulur (Brandl vd., 1991b).

Valappil ve ark. göre; öncelikle 5000 rpm'de santrifüj işlemi ile hücreler toplanır ve liyofilize edilir. Soxhlet ekstraksiyonunda; hücreler 37 °C'de sodyum hipoklorit içerisinde 12 saat boyunca lize edilir. 10.000 rpm'de tekrar santrifüjlenir ve elde edilen pellet iki kez su, aseton, etanol ve dietil eterle yıkanır. Kurutulduktan sonra kloroform ile 24 saat boyunca çözdürülür. Vakumlu döner buharlaştırıcı ile PHB içeren kloroform konsantre edilir. Soğuk metanol kullanılarak çöktürülür, çökelti santrifüjlenir ve havada kurutulur. Kloroform ekstraksiyonu; dondurularak kurutulmuş hücreler 37 °C'de kloroform içerisinde 48 saat çalkalanır. Son olarak aynı şekilde soğuk metanolla saflaştırılır. Kloroform-Hipoklorit dispersiyon ekstraksiyonu; dondurularak kurutulmuş hücreler kloroform ve su içerisinde %30 seyreltilmiş sodyum hipoklorit solüsyonunda özümlemesi için 100 rpm'de 1 saat çalkalanır. Elde edilen karışım 4000 rpm'de 10 dk santrifüjlenir ve üç ayrı faz oluşur (Arıkan vd., 2016). Alt fazda kalan PHB granülleri soğuk metanol ile çöktürülerek kloroformdan ayrılır ve kurutulur (Valappil vd., 2007).

Xu ve ark. göre; hücreler 10.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek toplanır. PHB çıkarma işleminde dört yol kullanılır. Dodesil sülfonik asit sodyum tuzu-sodyum hipoklorit (SDS-NaClO); SDS, lipoprotein üzerinde ekti eder ve zarı yok ederken, NaClO hücre duvarının ağ yapısını tahrip etmektedir. Distile su içerisinde süspanse edilen hücreler üzerine SDS ilave edilir. Karışım 10 dk 60 °C'de sonra NaClO solüsyonun eklenmesiyle 5 dk daha inkübe edilir. 6000 rpm'de 20 dk santrifüj sonrası çökelti damıtılmış su ve etanol ile yıkanır. Kloroform eklenir 60 °C'de 60 dk boyunca inkübasyon gerçekleştirilir. Santrifüjden sonra, PHB içeren kloroform çözeltisi transfer edilir ve kloroform buharlaştırılır. PHB etanol ile yıkanır, 60 °C'de kurutulur. Lizozim; hücre duvarının polisakkaritinin glikozidik bağlarını kırar. pH 7.4 olan fosfat tampon

çözeltisi içerisinde süspansiyon edilen hücrelerin üzerine Tris-HCl ilave edilir. Ardından karışıma lizozim eklenir ve 37.5 °C'de 60 dk inkübe edilir. 20 dk 6000 rpm'de santrifüjlendikten sonra yıkanır ve kloroform işlemi uygulanır. Ultrasonikasyon; distile su içerisinde süspansiyon edilen hücre karışımı sonikasyon cihazında ultrasonik dalgalar ile 5 dk boyunca hücreler parçalanır. Bu işlem 1 dk arayla 3 kez uygulanır. Son olarak diğer işlemlerde olduğu gibi santrifüj, yıkama ve kloroform işlemleri uygulanır. Ultrasonik yöntem membranı yok etmede etkilidir ve ekstraksiyon hızı yüksektir. Ancak uzun PHB zinciri yok edilir. Bu işlemde PHB'nin çıkarılması zordur. Kloroform-hipoklorit; hücreler pH 10 olan kloroform-sodyum hipoklorit çözeltisine ilave edilir. Hücreler parçalanır ve PHB çözelti içerisinde dağılır. Karışımın 90 dk 30 °C'de inkübasyonu gerçekleştirilir. 8000 rpm'de 15 dk santrifüj sonrası süpernatant soğuk etanol içine aktarılır ve 30 dakika boyunca 0 °C'de tutulur. Üç fazda PHB'li kloroform çözeltisinden kloroform uzaklaştırılır, yıkanır ve kurutulur. *Acidiphilium cryptum* DX1-1 bakterisinin PHB ekstraksiyonu için kloroform-sodyum hipoklorit yönteminin en iyisi olduğu görülmüştür (A. Xu vd., 2010).

Wendlandt ve ark. göre; santrifüjden sonra dondurularak kurutulan hücrelerin lipitleri daha sonra metanol/su içerisinde 1 saat inkübe edilerek uzaklaştırılır. İkinci aşamada, 1,2-dikloroetan ile 80 °C'de 1 saat inkübe edilerek PHB içermeyen hücreler uzaklaştırılır. PHB iki kez metanol ile yıkanır, metanol süzdürülür ve 2 saat 60 °C'de kurutulur (Wendlandt vd., 2005).

Fiorese ve ark. göre; bu bakterilerde birinci yöntem; standart ekstraksiyon tekniği olarak hücrelerin kloroform içerisinde 60 °C'de 2 saat çalkalanarak bekletilmesidir. Sonrasında ise hücre atıkları santrifüj ele uzaklaştırılır. İkinci yöntem; 1,2-propilen karbonat ile ekstrakte edilmesidir. Burada hücreler 1,2-propilen karbonat içerisinde yoğunlaştırıcı ve manyetik karıştırıcı ile ayarlanmış flask içinde termostatik yağ banyosuna daldırılmış şekilde süspansiyon edilir. Süspansiyon homojenleştirildikten sonra 130 °C'de 30 dakika tutulması en yüksek verimi ve saflığı vermektedir (Fiorese ve ark., 2009). Sıcak karışım 0.45 mm gözenekli hidrofilik polipropilen membran filtreleri ile vakum altında süzülür. 1,2-propilen karbonat kullanılması yüksek kaynama noktası, saflaştırılmadan birkaç kez tekrar kullanılabilirliği ve düşük toksisitesi açısından avantajlıdır (Fiorese vd., 2009).

Brandl ve ark. göre; kültür toplandıktan sonra 15 dk boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlenir ve liyofilize edilir. Liyofilize edilmiş pellet 37 °C'de 20 dk sodyum hipoklorit çözeltisi ile inkübe edilir. Bu çözelti tekrar 10.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek toparlanır. Yıkama ve ekstraksiyon için sırasıyla su, aseton ve etanolden geçirilir. Polimer kloroform içerisinde çözdürülür ve buharlaştırılır (Brandl vd., 1991b).

Thapa ve ark. göre; PHB üretimi 48 saat sonra görülmektedir. Bu yüzden 48 saat sonra alınan hücreler 5000 rpm'de 25 dk santrifüjlenir ve pellet elde edilir. Pellet arka arkaya aseton ve etanol ile yıkanır. PHB'nin geri kazanılması için pellet sodyum hipoklorit de yeniden süspanse edilir. 37 °C'de 10 dk inkübe ettikten sonra lipid granüllerini çöktürmek için 5000 rpm'de 30 dk santrifüjlenir. Elde edilen pellet tekrar aseton ve etanolla yıkanır ve sıcak kloroform işlemi uygulanır. Pellet kloroform içinde çözüldükten sonra hücre kalıntılarını filtrelemek için Whatman filtre kâğıdı kullanılır. Böylece kloroform çözeltisinde sadece PHB kalmış olur. 40 °C'de sıcak hava fırınında kloroform buharlaştırılarak PHB elde edilmiş olur (Thapa vd., 2019).

Brown ve ark. göre; 14 mL kültür tüpü pellet için santrifüjlenir. İki kez %0,89 NaCl ile yıkanır ve dondurulur. Sodyum 3-hidroksibütiratın seri dilüsyonlarından harici standartlar oluşturulur. Hücre pelleti ve standartlar 1 mL asidik metanol, 1 mL kloroform ile vortekstenir ve 105 °C'de 2,5 saat metanolize edilir. Oda sıcaklığında 1 mL deiyonize su ilave edilir, vortekslenir. Faz ayırımından sonra metil-ester türevleri alt organik fazdan özütlenir (Brown vd., 2020).

Doi ve ark. göre; hücreler santrifüj ile toplanır. Aseton ile yıkanır ve oda sıcaklığında vakum altında kurutulur. Soxhlet cihazında sıcak kloroform ile kurutulmuş hücreler ekstrakte edilir. Hekzan ile yeniden çökeltme yoluyla saflaştırılır (Doi vd., 1987).

Nygaard ve ark. göre; biyoreaktör fermentasyonundan elde edilen biyokütle 3500 rpm'de 30 dk santrifüj yapılır ve süpernatant uzaklaştırılır. Hücre pelleti dondurularak kurutulur ve -83 °C'de 103 mbar'da 24 saat süreyle liyofilize edilir. PHB polimeri, bir soxhlet ekstraktörü kullanılarak 24 saat boyunca 70 °C'de kloroform ile liyoflize biyoreaktöründen özütlenir. Ekstrakt döner buharlaştırma ile konsantre edilir. Biyopolimer 10 hacim buz gibi soğuk metanol içinde 4 °C'de çöktürülür. Çöken PHB

seramik filtre kullanılarak vakum altında süzülür. Beyaz toz halinde saf PHB verecek şekilde kloroform ve hekzan içinde yeniden çökeltilir (Nygaard vd., 2021).

Aramvash ve ark. göre; 1 gram hücre pelleti 50 mL kloroform ve 50 mL hipoklorit %10 çözeltisinden oluşan dispersiyonlarla işlenir. 37 °C'de 1 saat muamele sonrasında dispersiyon santrifüjlenir. Üç ayrı faz elde edilir. Üst faz hipoklorit çözeltisi, orta faz bozulmamış hücreler içerir, alt faz PHB içeren kloroformdur. Hipoklorit fazı çıkarılır. Süzme yoluyla kloroform fazı elde edilir. Filtrasyon sonrası PHB aseton ile çöktirme yoluyla geri kazanılır (Aramvash vd., 2015).

Baei ve ark. göre; 5 mL kültür 20 dk 3600 rpm'de santrifüjlenir. 2 mL kloroform çözeltisi ve 2 mL asitleştirilmiş metanol (%3 sülfirik asit) vida kapaklı şişe içinde hücre pelletine ilave edilir. 100 °C'de 3,5 saat ısıtılır (Baei vd., 2009).

Lee ve ark. göre; 10 mg liyofilize hücre vida kapaklı test tüpüne 2 mL'lik çözeltide %85 metanol, %15 konsantre sülfirik asit ve 250 mg/L benzoik asit reaksiyona girer. 2 mL kloroform eklendikten sonra karışım 100 °C'de ısıtma bloğunda 3,5 saat inkübasyona bırakılır. Tüpler oda sıcaklığında soğutulur. Her tüpe 1 mL 1 M NaCl eklenir 1 dk çalkalanır ve 4200 rpm'de 10 dk santrifüjlenir. PHB içeren alt katman sodyum sülfat üzerinde kurutulur (J. Lee vd., 2021).

Krasil'nikova ve ark. göre; hücre süspansiyonu (2-4 mL) santrifüj ile toplanır. İki kez deiyonize su ile yıkanır. Pellet distile su (1 mL) ve 7:2 aseton-metanol karışımı (9 mL) homojenleştirilir. Pigment ekstraksiyonu için oda sıcaklığında 10-20 inkübe edilir. Pellet etanol (10 mL) ile işlenir ve 20 dk 50 °C'de inkübe edilir. Pellet kloroform (10 mL) ile desteklenir. PHB ekstraksiyonu için gece boyunca 30 °C'de inkübe edilir. Süspansiyon bir cam filtreden süzülür, süzüntü kuruyana kadar buharlaştırılır konsantre H₂SO₄ (10-50 mL) ile desteklenir ve 10 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir (Krasil'nikova vd., 2015).

Dhingra ve Priya göre; hücreler oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek toplanır. Pellet fosfat tamponlu tuzlu su (pH 7.4) ile yıkanır. Pelletleri 1-2 saat havayla kurutulur ve ağırlıkları alınır. Kloroform ve %4 sodyum hipoklorit, hücre pelletine mg pellet ağırlığı başına 12,5 µl kloroform ila 12,5 µl %4 sodyum hipoklorit

oranında ilave edilir. Karışım gece boyunca 30 °C'de tutulur. Dispersiyon daha sonra oda sıcaklığında 8000 rpm'de 10 santrifüjlenir ve farklı fazların oluşumuna neden olur. Kloroform alt fazı PHB içerir. Bu faz başka bir yeni tüpe aktarılır ve hacmi ölçülür. Kloroform çözeltisine 5X havminde metanol ve su karışımı (7:3 v/v) ilave edilir. Karışım 10.000 rpm'de 15 dk santrifüjlenir ve PHB çözeltisi ölüşür (Kumari & Dhingra, 2013).

Belal göre; hücreler 10 mL sodyum hipoklorit reaktifi (pH 10.0-10.5 NaCl içeriği %5,25-5,5) içinde süspanse edilen kültürün 1 ila 5 mL örneklerinden 10.000 rpm'de santrifüjleme yoluyla toplanır. 37 °C'de 1 saat sonra reaksiyon karışımı 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlenir ve katı pellet ard arda su, alkol ve aseton ile yıkanır. Pellet kloroform içinde çözülür, çözünmeyen tortu atılır. Kloroform oda sıcaklığında buharlaştırılır. Polimer ağırlık ölçülene kadar 2 saat 105 °C'de kurutulur (Belal, 2013).

2.9. PHB Karakterizasyon Yöntemleri

Hücre Kuru Ağırlığının (CDW) Belirlenmesi: Bir biyopolimerin moleküler ağırlığı, endüstriyel kullanılabilirliği söz konusu olduğunda önemli bir faktördür. Çoğu uygulama için, moleküler ağırlığı 5×10^4 Da'dan büyük olan PHB'ye sahip olmak arzu edilir. PHB'nin geri kazanılması için uygun bir çözücü ve işlem, biyopolimerin moleküler ağırlığında önemli bir değişkenliğe neden olmamaktadır (Liu vd., 2005). Aramvash ve ark. göre; numuneler (10 mL kültür süspansiyonu) önceden kurutulmuş ve önceden ağırlıkları ölçülmüş tüplerde 10.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenir. Pellet (ıslak hücreler) damıtılmış su içinde yeniden süspanse edilir ve santrifüjlenir. Yıkanan hücreler, CDW ölçüldükten sonra minimum 24 saat süreyle 90 °C'de sıcak havada kurutulur (Aramvash vd., 2015, 2018).

Molekül ağırlığı, biyopolimerin belirli bir uygulama için uygunluğunu belirleyecek önemli bir parametredir. Genel olarak, yüksek moleküler ağırlıklı biyopolimerler, termal bozunmaya karşı daha az hassastır. Çoğu işleme yöntemi, biyopolimerin bozulmasına neden olan bir ısıl işlem kullanır. Bu nedenle, herhangi bir uygulamada, yüksek moleküler ağırlıklı bir PHB ile başlayarak, işleme sırasında moleküler ağırlıkta (Mw) önemli bir azalmadan sonra bile, kabul edilebilir özelliklere sahip bir madde yapmak için yeterli Mw ile PHB'yi dahil etmek hala mümkündür (Y. M. Jung vd., 2000). Geri kazanılan PHB yüzdesi, geri kazanılan numunelerin toplam

kütlesinin saflığına dayalı olarak biyokütledeki bilinen bir PHB miktarına göre hesaplanmıştır. Saflık (%) şu şekilde hesaplandı: saflık = (polimerin kütlesi / numunenin kütlesi) x 100 (Martino vd., 2014).

Belal göre; kültür ortamı santrifüjlenir sonra süpernatant atılır ve pellet distile su ile yıkanır. Yıkanan pellet 1 mL distile su içinde yeniden süspansiyon edilir, önceden tartılmış plakalara aktarılır ve 60 °C’de sabit ağırlığa kadar kurutulur (Belal, 2013).

Duvigneau ve ark. göre; toplam hücre kuru ağırlığının belirlenmesi için 1 mL kültür, önceden tartılmış plastik tüplerde 13.000 x g ve 4 °C’de 10 dk santrifüj yapılır. Daha sonra hücre pelleti 1 saat 99 °C’de kurutulur ve tartılır (Duvigneau vd., 2020).

PHB Spektrofotometre Ölçümü: Polimer hücreleri spektrofotometre deneyi için 10.000 rpm’de santrifüj yoluyla toplanır, daha sonra PHB ekstrakte edilir, kloroform içinde polimer içeren bir numune temiz bir test tüpüne aktarılır, kloroform buharlaştırılır ve 10 mL konsantre H₂SO₄ eklenir tüpün ağzı kapatılarak su banyosunda 100 °C’de 10 dk ısıtılır. Çözelti soğutulur ve iyice karıştırıldıktan sonra bir numune silika küvete aktarılır. Bir UV spektrofotometresinde 235 nm’de absorbans ölçülür (Belal, 2013).

Gaz kromatografisi (GC) Analizi: Alev iyonizasyon dedektörü (FID) ile donatılmış bir gaz kromatografisi ve bilgisayar yazılımı ile veri toplama sistemi kullanılarak yapılır. GC, kapiller kolon 0,33 mm iç çap ve 25 m uzunluk ile donatılır. Kolon sıcaklığı başlangıçta 4 dk boyunca 80 °C’de tutulur, ardından 160 °C’ye ulaşana kadar 8 °C/dk hızında, 3 dk süreyle ve daha sonra 30°C/dk hızında sıcaklık programlaması yapılır, minimum 200 °C’ye yükseltilir. Dedektör ve enjektör sıcaklıkları sırasıyla 280 ve 250 °C idi. Kullanılan taşıyıcı gaz, akış hızı 1,5 mL/dk olan helyum iken hidrojen ve hava akış hızları sırasıyla 30 ve 300 mL/dk (Baei vd., 2009). Kurutulmuş hücreler, sülfürik asit/metanol (1:5 v/v) ve kloroform (1:1 v/v) ile karıştırılır ve metil ester monomerleri oluşturmak üzere 140 dk boyunca 100 °C’ye ısıtılır. 0,5 mL metil ester numuneleri, bir alev iyonizasyon dedektörü (FID) ve bir kapiller kolonu ile donatılmış bir GC’ye enjekte edilir. Enjeksiyon kısmı 280 °C’de tutulur. Metil esterleri ayırmak için fırın sıcaklığı 10 °C/dk’ya yükseltilmeden önce 100 °C’de 3 dk sabit tutulur. FID dedektör sıcaklığı 300 °C’ye yükseltilir (Aramvash vd., 2018).

Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR): CH₃, CH₂, C=O, CH ve OH gibi öne çıkan fonksiyonel grupların varlığı, PHB'nin varlığının kritik bir belirleyicisidir. Zayıflatılmış toplam yansıma modunda (ATR) FTIR kalitatif tanımlama ve ekstrakte edilen bileşiklerde bu tür grupların varlığını kontrol etmek için kullanılır (Thapa vd., 2019). ZnSe kristali üzerinde PHB tozunun doğrudan analizi ile gerçekleştirilir. Spektrofotometre üzerinde 400-4000 cm⁻¹'de 32 tarama, 4 cm⁻¹ çözünürlük ve 2 cm⁻¹ aralık ile elde edilir. Kızılötesi spektrumlar, yan zincir ve fonksiyonel grupları belirlemek için analiz edilir (Nygaard vd., 2021). PHB karakteristik ester karbonil grubuna karşılık gelen C=O bağ gerilmesi ile bağlantılı 1720 cm⁻¹'de yoğun bant olur. 1181 cm⁻¹'de C-O-C grubunun asimetrik gerilme titreşiminden dolayı PHB'nin FTIR spektrumlarında iyi bilinen bir bant vardır. Metil ve etil gruplarından uzanan C-H, 2900 cm⁻¹ civarında spektral bölgede bulunan bantlara atanmıştır (Bayari & Severcan, 2005).

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi: Molekülün kuvvetli manyetik bir alana yerleştirilmesi ve bu moleküldeki bazı atom çekirdeklerinin bu alanda bulunan elektromanyetik ışınları absorblaması ile kurulmuş bir yöntemdir. Birçok molekülün yapısının belirlenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir. Bu yöntem ile hidrojen içeren gruplar, grupların hidrojen sayıları ve bu gruplara bağlı komşu gruplarda belirlenebilmektedir. NMR spektroskopisi, ayırma veya saflaştırma adımları gerektirmeden karışımları moleküler düzeyde hızlı bir şekilde analiz edebilen sağlam bir yöntemdir (Hatzakis, 2019). NMR spektroskopisinin polimerlerin yapısının belirlenmesi için güçlü bir araç olduğu kanıtlanmıştır (Aramvash vd., 2018). Kurutulmuş biyopolimer, PHB'nin moleküler yapılarını belirlemek için döteryumlu kloroform (15 mg/mL çözücü) içinde süspanse edilir. Bir araştırmada ¹H ve ¹³C NMR spektrumları, sırasıyla 500 MHz (¹H) ve 126 MHz'de (¹³C) kaydedilmiştir (Nygaard vd., 2021). Bir başka çalışmada, etilen karbonat ve DMSO kullanılarak ekstrakte edilen PHB, PHB'nin yapısını belirlemek için DMSO-d₆ (Döteryumlu DMSO) (10 mg/mL) içinde süspanse edilir. Bu kadar düşük bir konsantrasyon, daha fazla sayıda taramanın kullanılmasını gerektirebilir. ¹H NMR spektrumları, 25 °C'de 400 MHz'de kaydedilir (Aramvash vd., 2018).

2.10. PHB Kullanım Alanları

PHB'nin fiziksel özelliklerinin, UV'ye dirençliliği, kristal yapıda olması ve özgül ağırlığının yüksek olması polipropilene benzerliğinden dolayı üretimde kullanılması iyi bir seçenektir. Biyoplastiklerin polietilene oranla dört kat daha fazla sertlik sağlaması endüstriyel alanda kullanım alanını çoğaltmaktadır. Doğaya atıldığında parçalanabilmesi ve çevre kirliliği oluşturmaması kullanımında ayrı bir önem oluşturmaktadır. Biyoyumluluğu, doğal kaynaklardan elde edilebilmesi, biyolojik parçalanabilirliği, monomerinin D(-)-3-hidroksibütirik asit oluşu, toksik olmayışı, kolay şekil alması, termoplastik ve piezoelektrik özelliği sayesinde paketleme, ziraat, tıp, gıda, veterinerlik, eczacılık, tek kullanımlık malzemeler, kozmetik, tekstil ve kimyasalların elde edilmesi gibi birçok alanda kullanımına imkan sağlamaktadır. Ayrıca PHB ve PHBV kopolimerlerinin PHB homopolimerlerinden üstün olması ile biçimlendirilmekte, preslenebilmekte, lif formuna dönüştürülmekte, filmleri yapılmakta ve heteropolimerlerle sentetik polimerler yapımında kullanılmaktadır.

Hem PHB hem de kopolimerleri funguslar, algler ve bakteriler, toprak mikroorganizmaları tarafından parçalanabilmesi ziraat alanında biyodegradasyon gerektiren uygulamalar açısından önem taşımaktadır. Özellikle kaplama folyoları ve filmler şeklinde azazi denemelerinde kullanılmaktadır. Bu sayede ekin sezonuna kadar folyolar kaldırılmak zorunda kalmamaktadır. Ekin sulama borularında, tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında, gübrelerin veya pestisidlerin kontrollü salınımında ve bitki ilaçlarında PHB kullanılmaktadır. Ayrıca insektist salınımında kullanılır. Böylece tarımda topraktaki zararlıların aktivitesi düşer ve biyolojik bir geri besleme mekanizması sağlar (Yılmaz & Beyatlı, t.y.). Biyolojik parçalanabilen bir matriks olan PHB ilaçların kontrollü salınımında kullanılmaktadır. Bu özelliği sayesinde polimer sığırların rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir (Madison & Huisman, 1999). Hayvanların kurtlanması önlemek için antihelmitik ilaç içeren PHB kapsülleri kullanılmıştır (Uzun, 2016). Hayvan dokularında toksik etki yaratmaması tıp alanında da daha çok gelişebileceğini kanıtlamıştır.

PHB ve kopolimerleri biyouyumluluğu ve düşük maliyetinden dolayı tıp ve eczacılık alanlarında kullanımına geçilmiştir. PHB monomerinin insan vücudunda doğal bir metabolit olması vücutta hafif bir immünolojik cevap olmasına neden olur. İnsan vücudunda depolimeraz olmaması parçalanmayı yavaşlatır. Bu sayede cerrahi dikişler, eldiven, önlük, maske, pansuman sargısı, proteazlar, vida, iğne, ortopedik plaka gibi cerrahi malzemelerinin yapımında kullanılmaktadır (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017). Bu malzemelerin PHB'den yapılmasının bir diğer avantajıda hukuki alanda ameliyat sonrası hastalarda sargı bezlerinin kalmasıdır. PHB'den yapıldığı takdirde vücut içerisinde parçalanacağı için bu tarz sorunlarda ortadan kalkmaktadır. İleriki zamanlarda PHB su geçirmez tüp şeklinde ince fibriler formda vasküler aşı veya kan damarı gibi alanlarda kullanılabilir. Aynı zamanda dokular için parçalanabilir bir yapı iskelesi olarak kullanılabilir.

PHB'nin depolimerizasyonu sonucu oluşan ürün D(-)-3-hidroksibütirik asit monomeri organizmalarda bir ara metabolit bileşimidir. İnsan kanının normal bir ögesidir ve lipit metabolizmasının ürünü olarak bulunur. Özellikle kalp dokusu ve beyin için enerji kaynağı olarak görev alır. Beyin gelişiminde rol alan amino asitlerin öncüsüdür. Diyabet hastalarının kan serumunda anormal konsantrasyonlarda olan keton yapılarından birisi D(-)-3-hidroksi bütirik asit olarak rol alır (Madison & Huisman, 1999). Damar içi ve damar ağzından karbon sağlanmasında glukoz yerine D(-)-3-hidroksibütirik asit kullanılması klinik açıdan daha avantajlıdır. Doğada yaygın formda bulunan D(-)-konfigürasyonuna sahip D(-)-3-hidroksibütirik asit optik izomerlerinin, kristal merkezleri daha kuvvetli bir bağlanma göstermesinden kromatografide de kullanılabilir. Ayrıca bunlar emülsifikasyon ajanı olarak kullanılması da mümkündür (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017).

PHB'nin diğer bir önemli özelliği de piezoelektrik polimer olup kesikli piezoelektrisite göstermektedir. Polivinilidon florid polimerin filmler kemiği elektriksel stimülasyon ile kuvvetlendirmekte, kemik büyümesini, oluşumunu, iyileşmesini desteklemekte ve kemiği onarmaktadır. Bu süreçlerde kemiğin etrafına PHB karışımından yapılan plakalar kemiği düzeltebilir ve biyolojik olarak parçalanarak

vücuttan yavaşça resorbe edilebilir. Böylece plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir ameliyata gerek kalmamaktadır (Madison & Huisman, 1999).

Doğal polimerler ayrıca biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, ekstraselüler matrikse benzerliği, elektrostatik eğrilebilirliği ve toksisite göstermemesi sebebiyle rejeneratif tıp alanında özellikle deri rejenerasyonunda, yaralı dokunun onarılmasında ve doku iskelelerinde kullanılmaktadır (Mogoşanu & Grumezescu, 2014). Bu alanda ilaç taşınımı yaparak yara çevresine kontrollü ilaç salınımı yapabilen polimerik yara örtüleride mevcuttur (Augustine vd., 2016). Yara-yanık örtü materyali olarak PHBV nanofibriler yapıları yeni zamanda önemli bir potansiyele sahiptir. Örtü materyalleri yapılırken yara tipi, örtü tekniği ve malzeme kompozisyonu gibi unsurlara dikkat edilmesi gerekmektedir. Bir çalışmada PHBV/m-keratin nanofibröz malzemenin deri yaralarında üzerine örtü olarak iyi bir potansiyelde olduğu bildirilmektedir. PHBV m-keratin ile hekzafloroizopropanol (HFIP) çözücüsü kullanılarak karıştırılmıştır. PHB depolimeraz ve tripsin içeren sulu çözelti içerisinde PHBV/m-keratin'nin degrades olduğu görülmüştür. Hücrelerin PHBV/m-keratin kompozit nanofiberlerine tutunması ile fibroblast hücrelerinin proliferasyonunun arttığı tespit edilmiştir (Choi vd., 2020).

Başka bir çalışmada ise homojen morfolojiye sahip nanofibriler yapılar %10 konsantrasyonunda PHBV ile *Curcuma longa* L. bitkisinden izole edilerek kullanılan kurkumin elektrostatik eğirme yöntemiyle kurkumin yüklü PHBV nanofibriler yapılar elde edilmiştir. Normal PHBV nanofibrilleri ile kurkumin yüklü PHBV nanofibriler yapılar karşılaştırılmasının sonucunda kurkuminin yapıya ilave edilmesiyle nanofiber yapılarının mekanik özelliğinde azalma gözlemlenmiştir. PHB'nin tekstil sanayisinde de kullanılabileceği görülmüştür. *Alcaligenes eutrophus* bakterisinden elde edilen genler pamuk bitkisi olan *Gossypium hirsutum* L.Cv DP50'ye entegre edilmesi ile lif lümenleri içerisinde PHB üretimi olduğu görülmüştür. Bu sayede düşük termal geçirgenliğine ve yüksek ısı kapasitesine sahip olan transgenik lifler tekstil sanayisinde bir avantaj olmuştur (Yılmaz & Beyatlı, t.y.).

PHB ve kopolimerleri paketlenme filmlerinde, tek kullanımlık malzemelerde (hijyenik ürünler, çocuk beşleri, mutfak malzemeleri vb.) kullanılmaktadır. Kopolimerle düşük erime sıcaklığına ve esnek yapıya sahip olmasından dolayı preslenmiş ürünlerin imalatında da kullanışlıdır. Şampuan kutuları, meşrubat şişeleri, tek seferlik kullanılan tıraş bıçakları, karton süt kutuları, plastik çatal, bıçak, tabak malzemeleri, poşetler, tepsi ve mutfak kapları gibi geniş bir aralığa sahip kullanımı mevcuttur (Binnaz Hazar Yoruç vd., 2017). PHB filmlerinin önemli bir diğer özelliği ise düşük miktarda oksijen sızdırabilirliği açısından gıda paketlenmesinde rol almaktadır. PHB'den oluşan 25 µm'lik bir film günde 45 cm³/m²'lik oksijen geçirgenliğine sahiptir (Dombayci vd., t.y.). Bu oksijeni ve nemi koruma özelliği sayesinde et ürünleri, taze balık, orta nemli gıdalar, kurutulmuş ürünler, pastacılık ürünleri, şekerlemeler, cipsler, yağlı tohumlar ve peynir gibi ürünlerin paketlenip saklanmasında kullanılmaktadır. Tüm parçalanma numunenin yüzey özelliğine ve kalınlığına göre değişse bile bu biyoparçalanabilirlik tek kullanımlık malzemelerin üretimi için büyük avantaj sağlamaktadır.

Vitaminler, aromatikler, feromonlar ve antibiyotikler gibi kimyasalların sentezinde kiral bileşenlerin üretiminde (R)-(-)-hidroksi karboksilik asitler başlatıcı bir materyaldir. Yeni bileşenlerde kiral merkezli özelliği olan bileşikler COOH ve OH olmak üzere iki fonksiyonel grup içerirler. Enantiomerik saf bir bileşik olan D-(-)-3-hidroksibütirik asit saf maddelerin geniş miktarlarda eldesin de PHB'nin kullanılması önem taşımaktadır. İlaçların aktifliği kiral formdadır ve D-(-)-3-hidroksibütirat bileşiklerin sentezlenmesinde yapıstırıcı gibi rol alarak kullanılmaktadır (Yılmaz & Beyatlı, t.y.).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kültür Koşulları

Bu çalışmada *Cereibacter sphaeroides* O.U. 001 (DSM5864), *Rhodospseudomonas palustris* 7850 (DSM 127) ve *Cupriavidus necator* H16 (DSM 428) kullanıldı. Bu üç bakteride gram negatif grubunda olup *C. sphaeroides* ve *R. palustris* mor kükürtsüz fotoheterotrofik bakteridir. Çalışmanın amacı üç bakteri türünde kullanıma yönelik olarak yeterli miktarda PHB üretmek ve üretim miktarını tespit etmektir.

Bakterilerin aktifleştirilmesi için asetat besiyeri kullanıldı. Besiyeri karbon kaynağı olarak asetik asit ve azot kaynağı olarak amonyum klorür (70 mM / 2 mM) içerir. Tablo 3.1.1’de besiyerinin genel içeriği verilmektedir. Hangi konsantrasyonlarda daha çok hücre büyümesi olduğunu görmek için yedi farklı konsantrasyonda deney tasarımı yapıldı. Hücre büyümesi ile PHB üretimi doğru orantılı bir artış gösterdiğinden dolayı hücre büyümesinin fazla olduğu konsantrasyonun tercih edilmesi için denendi. Asetik asit için yedi farklı konsantrasyon miktarı denendi, konsantrasyon miktarları Tablo 3.1.2’de verildiği gibidir. Tablo 3.1.1’de verilen içerik hazırlandıktan sonra ortam sterilizasyonu 15 dakika boyunca 121 °C’de otoklavlama ile gerçekleştirildi. Vitaminlerin yapısı yüksek sıcaklıkta bozulacağından dolayı vitamin çözeltilisinin sterilizasyonu 0.22 µm gözenekli filtreden geçirilerek sağlandı. Otoklavdan sonra Asetat besiyerine eser element ve demir sülfat çözeltisi eklendi. Asetat besiyerinin 30 °C’ye kadar soğumasından sonra ise vitamin çözeltisi eklendi.

Çizelge 3.1.1. Asetat besiyeri (70 mM asetat/2mM amonyum klorür) içeriği

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl (2 mM)	0.1069
NaCl	0.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05
(Asetik asit, 70 mM) C ₂ H ₄ O ₂	4003 µl
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

Çizelge 3.1.2. Asetik asit konsantrasyonları

Asetik Asit Konsantrasyonu	g/L
10 mM	572 µl
25 mM	1430 µl
40 mM	2287 µl
55 mM	3145 µl
70 mM	4003 µl
85 mM	4861 µl
100 mM	5719 µl

Eser element çözeltisi (20X): Tablo 3.1.3.'de besiyeri için gerekli kimyasallar verilen miktarda tartıldı. 50 mL distile suda çözdürülerek 20X eser element çözeltisi hazırlandı.

Çizelge 3.1.3. Eser element çözeltisi

İçerik	mg/L
ZnCl ₂	70
MnCl ₂ .4H ₂ O	100
H ₃ BO ₃	60
CoCl ₂ .6H ₂ O	200
CuCl ₂ .2H ₂ O	20
NiCl ₂ .6H ₂ O	20
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	40
HCl (% 25 v/v)	1 mL

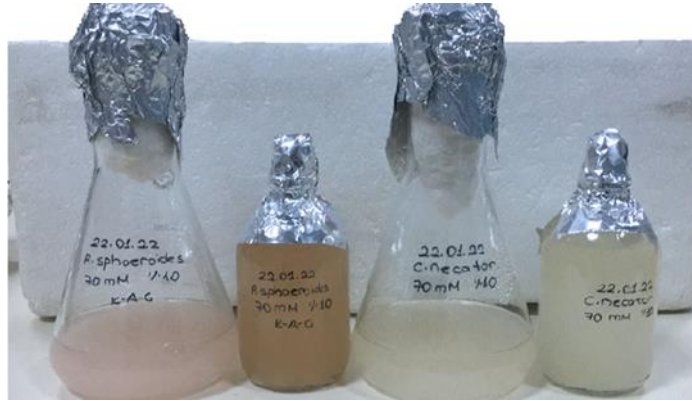
Vitamin çözeltisi: Tablo 3.1.4'de ifade edilen vitamin çözeltisinin içeriği Tablo 3'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1.4. Vitamin çözeltisi

Vitamin	mg/L
Thiamine	500
Niacin	500
Biotin	15

Demir çözeltisi: 0.5 gram Fe (III) Citrate.Hydrate 100 ml suda çözdürülüp otoklav ile steril edildi.

C. necator, *C. sphaeroides* ve *R. palustris*'in çoğaltılmasında kullanılan katı besiyeri, Asetat besiyerine otoklavdan önce agar (% 1.5) eklenerek hazırlandı. Otoklavdan sonra eser element, demir ve vitamin çözeltileri eklenerek karıştırıldı. Besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaşması bekledi. *C. sphaeroides* asetat besi ortamında kültürlendiği ortam 3 dk argon gazından geçirilerek anaerobik koşullarda büyümesi sağlandı. Literatür taramalarından yola çıkarak aerobik ve anaerobik koşullarda hücre büyümesi incelenmesi için aerobik/karanlık ve anaerobik/aydınlık olarak iki farklı parametrede inceleme yapıldı. Karanlık ortam sağlanarak çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de aerobik koşullarda büyütüldü. Bir başka parametre olarak penisilin şişelerinde aerobik koşulda yeterli oranda ortamdaki O₂ miktarını arttırmak için aynı koşullar sağlanarak erlenmayere ekim yapıldı. Büyümlerinde gözle görülür farklılıklar gözlemlendi (Şekil 3.1.1). *C. necator* asetat besi ortamında aerobik koşullarda 150 rpm'de büyütüldü.



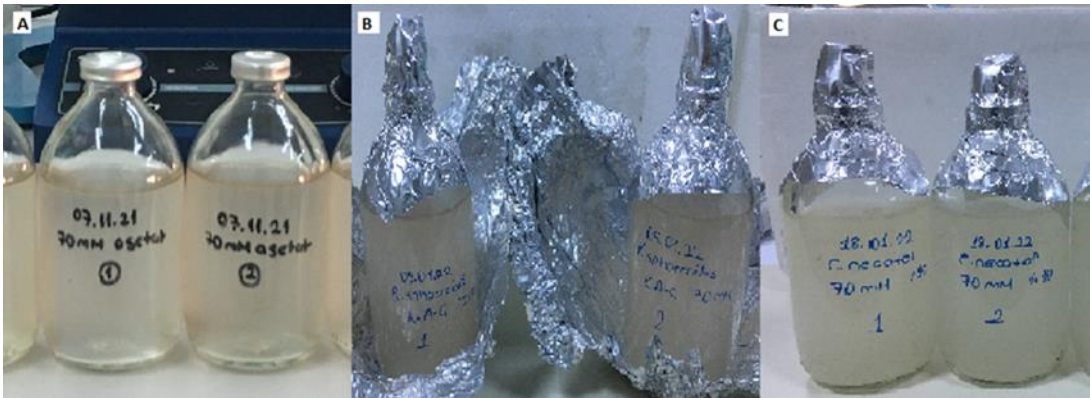
Şekil 3.1.1. Asetat besiyerinde bakterilerin büyütülmesi

3.2. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri

Asetat besiyerinde azot kaynağı olarak amonyum ve karbon kaynağı olarak asetik asit kullanımında bakteriler asetik asidi PHB'nin oluşumunu sağlayan asetil-CoA sentezinde kullanabileceklerdir. Tez çalışmasında kültür kabı olarak 250 mL'lik erlenmayer şişeleri kullanıldı. Kültür ortamı bakterilere aerobik, karanlık olarak 150 rpm'de çalkalanarak ve anerobik koşullarda ışık altında inkübe edilerek sağlandı. Işık kaynağı olarak 100 Watt veya 60 Watt tungsten filamentli akkor lambalarla sağlandı. Böylece büyümenin ışık altında gerçekleşmesi sağlanacaktır. Kültürler kullanılan bakteri için optimum sıcaklık olan 30 °C de inkübe edildi.

Yukarıda verilen ölçülerde hazırlanan Asetat besiyeri (100 mL, pH:6.8) steril şartlar altında (steril kabinde çalışarak) erlenmayer şişelerine aktarıldı ve üzerine %10 bakteri kültürü ilave edilerek ekim gerçekleştirildi (Şekil 3.2.1). İstatiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edebilmek için deneyler iki tekrarlı olarak yapıldı. *C. sphaeroides* aerobik ve anaerobik koşulda büyüme gösterdiği için iki farklı koşul da bakıldı. Birinci; anaerobik koşulu oluşturularak ışık altında gerçekleştirildi, ikinci olarak aerobik koşulda çalkalamalı inkübatör kullanılarak 150 rpm’de karanlık ortam oluşturuldu. *C. necator* için 150 rpm’de inkübasyon sağlandı.

Büyüme koşullarında hücre yoğunluğunu ölçmek için yaklaşık 24 saat aralıklarla örnekler alınarak spektrofotometre ile *C. sphaeroides* ve *R. palustris* 660nm’de (OD660nm), *C. necator* 600nm’de (OD600nm) optik yoğunluk ölçüldü. Çalışma başlangıcında bakteri kültürünün pH’sı 6.8’e ayarlandı, ancak bakteri çoğalma süreci boyunca 24 saat aralıklarla örnekler alınarak pH değişimleri takip edildi.



Şekil 3.2.1. Asetat besiyerinde bakterilerin büyütülmesi. (A) Anaerobik olarak büyütülen *Cereibacter sphaeroides* (B) aerobik ve karanlık olarak büyütülen *Cereibacter sphaeroides* (C) aerobik olarak büyütülen *Cupriavidus necator*

3.3. PHB'nin Görüntülenmesi

Maksimum PHB üretimi 48 saate gerçekleştiğinden dolayı 100 mL penisilin şişelerinde aerobik koşul da 30 °C'de bakteriler PHB üretimi için optimize edilmiş inkübasyon süresi olarak kabul edilen 48 saat boyunca inkübe edildi. Karbon ve enerji rezevi görevi gören PHB, asetik asitten sağladığı karbon kaynağı ile dengesiz büyüme

koşulları altında sitoplazmada birikmektedir ve bakteriler durağan faza geçiş döneminde enerji olarak PHB granüllerini kullanmaya başlamaktadır.

PHB granüllerinin bazı özellikleri lipitlere benzerdir, buda hidrofobisitesi ile bağlantılı olmasından kaynaklanır. Membranlar veya lipit benzeri inklüzyonlar (PHB, triaçil-gliseritler) gibi hidrofobik hücre yapılarını görselleştirmek, belirlemek için kullanılan Nile Red olarak bilinen lipofilik floresan boya veya lipitler ve sudanofilik maddelerin boyanması için Sudan boyaları tercih edilmektedir.

3.3.1. Sudan Black B ile boyama

Maksimum PHB üretimi 48 saatte gerçekleştiğinden dolayı 48 saat inkübasyon sonrasında bakteriler Sudan Black B (Isolab, 970.D01.0050) boyası kullanılarak PHB birikimi açısından incelendi. Lipit yapılı granül olan PHB'nin görüntülenmesin kullanılan hassas yöntemlerden biri Sudan Black B boyası ile boyamadır. Bakteri izolatları, Sudan Black B boyaması kullanılarak PHB birikimi açısından incelendi. 50 mL %70'lik etanolde 0,15 gram Sudan Black B boyası çözdürüldü. 10 mL %96'lık etanolde 0,25 g safranin boyası çözdürüldü ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek stok safranin çözeltisi elde edildi. 22,5 mL distile suya 5 mL stok safranin çözeltisinden ilave edilerek seyreltildi. Filtreden geçirildi böylece %0,5'lik safranin çözeltisi elde edildi. Preparatlara etiketleme yapılarak üzerine 1-2 damla distile su damlatıldı ve 2 kat seyreltme yapılan bakteri örnekleri öze yardımı ile preparat üzerinde yayma yapıldı. Fiksasyon işlemi yapılarak bakteriler preparat üzerine sabitlendi. Preparat üzerine Sudan Black B boyası damlatılarak 20 dakika inkübasyon süresine bırakıldı. Boyanın uzaklaştırılması için çok kısa bir süre preparat ksilene daldırılıp çıkarıldı. Dekolorizasyon işleminde %0,5'lik safranin çözeltisi preparat üzerine damlatıldı ve 10 saniye beklendi. Distile su ile yıkama yapılarak preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra preparat üzerine immersiyon yağı damlatılarak lamel kapatıldı, ışık mikroskopunda 40X ve 100X okülerde görüntüleme yapıldı.

3.3.2. Nile Red ile boyama

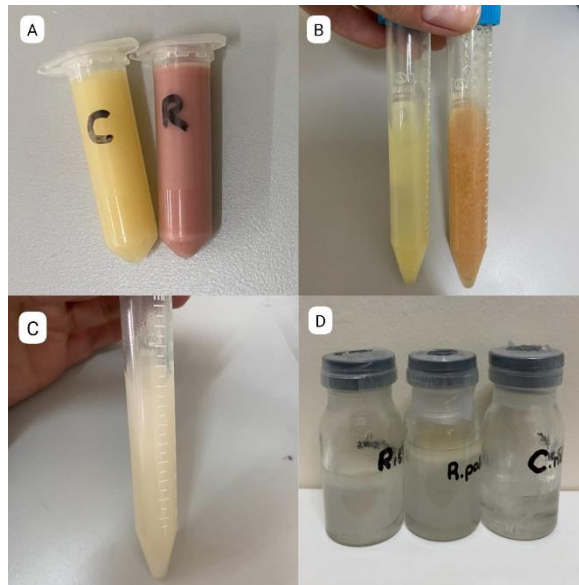
Maksimum PHB üretimi 48 saatte gerçekleştiğinden dolayı 48 saat inkübasyon sonrasında Nile Red (Sigma Aldrich, 72485-100MG) boyaması, PHB birikiminin

doğrulanması için daha etkili ve spesifik bir boyama yöntemidir. Floresans görüntüleme tekniği olarak Nile Red en sık tercih edilen boya türüdür. %1'lik agaroz için 0,1 gram agaroz tartıldı ve 10 mL Tae Buffer ilave edildi. 55 °C'de su banyosuna bırakıldı böylece agaroz çözdürüldü. 0,5 mg Nile Red boyası hassas terazide tartılar 5 mL asetonda çözdürüldü, stok çözelti elde edildi. 9900 µl aseton üzerine 100 µl stok Nile Red çözeltisinden ilave edilerek pipetaj yapıldı. 2 mL bakteri çözeltisi 7500 rpm'de santrifüjlendi ve ortamın uzaklaştırılması için süpernatant atıldı. Pellet 500 µl distile suda çözdürüldü. Tüpte 100 µl bakteri çözeltisi üzerine 10 µl seyreltilmiş Nile Red boyası ilave edilerek pipetaj yapıldı ve floresans boyanın ışıktan etkilenmemesi için folyo ile sarıldı. 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Tekrar 7500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl distile suda çözdürüldü. Kültür kapları etiketlendi. İki ayrı örnek olmaz üzere; 7 µl bakteri/boya çözeltisi üzerine 7 µl %1'lik agaroz ilave edildi pipetaj yapıldı, cam tabanlı hücre kültürü kabı (35 mm) üzerine 15 µl bakteri/boya çözeltisi koyuldu ve üzerlerine kapağı kapatıldı. Bu işlemin hızlı yapılarak agarozun donmamasına dikkat edildi. Floresans mikroskopunda 60X okülerde görüntüleme yapıldı. Floresnas mikroskopunda 540-620 nm aralığında bulunan (39005_Un-Mounted AT-TRITC-red shifted AT540/25x AT620/60m AT565DC) filtresi kullanıldı. Aynı işlemler hem agarozlu hem de agaroz kullanmadan yapılarak görüntüleme açısından daha verimli olan kullanılmak üzere devam edildi.

3.4. PHB Ekstraksiyonu

Maksimum PHB üretimi 48 saatte gerçekleştiğinden dolayı Asetat/Amonyum ortamında bakteriler 48 saat kültüre edildi. Ekstraksiyon işlemine başlanmadan önce bakterilerden 2 mL ependorfa alındı ve OD ölçümü yapıldı. 100 mL hücre kültürü ile ekstraksiyon işlemine başlandı. Hücre kültürü 50 mL'lik falkonlara eşit şekilde bölünerek 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Bütün santrifüj işlemleri 30 °C'de gerçekleştirildi. Sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre kuru ağırlığının ölçülmesi için etiketlenen ependorflar tartıldı. Falkonda bulunan pellet 1 mL distile suda çözdürülerek ependorfa aktarıldı. Üzerine 1 mL daha distile su ilave edilerek pipetaj işlemi yapıldı, ardından 13.000 rpm'de 15 dk yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı (Şekil 3.4.1.A). Kuru ağırlığın ölçülmesi için 80 °C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı ve kurutma işlemi tamamlandıktan sonra tartıldı. Pellet tekrardan 1 mL distile suda çözdürülerek 15 mL'lik falkonlara aktarıldı. Pigment ekstraksiyonu için üzerine 7:2 aseton-metanol karışımı (9 mL)

homojenleştirilerek ilave edildi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.4.1.B). Bu prosedür bakteri hücrelerinin rengi tamamen değişene kadar birkaç kez tekrarlandı (Krasil'nikova vd., 2015) (Şekil 3.4.1.C). Sonrasında 5000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu aşamada her santrifüjde falkon değişikliği yapılmasına dikkat edildi. Kalan suyun çıkarılması için pellet üzerine 10 mL etanol ilave edildi ve 50 °C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı. Ardından 5000 rpm'de 15 dk santrifüj, süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre duvarının parçalanıp PHB'nin geri kazanılması için pellet üzerine %6 sodyum hipoklorit (NaClO) eklendi ve 2 dk vorteks yapıldı. Sonrasında 37 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Lipid granüllerini çöktürmek için 5000 rpm'de 15 santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırıldı. PHB'nin elde edilmesi için pellet 1 ml kloroformda çözdürüldü, 10 mL'lik cam penisilin şişesine aktarıldı ve 5 mL'ye tamamlandı. Şişenin ağzı kapağı ile kapatıldı ve herhangi bir buharlaşma olasılığına karşı kapak kısmı parafilm ile sarıldı (Şekil 3.4.1.D). 30 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonrasında Şekil 3.4.1.D'de görüldüğü gibi kloroformun alt faza PHB'nin üst faza ayrıldığı görüldü. Şırınganın iğne ucu yardımı ile alt fazda olan kloroform PHB'ye yaklaşıp kadar çekildi ve uzaklaştırıldı. Ependorflara etiketlemeler yapılarak PHB'nin tartılması için boş iken tartıldı. Ardından kalan PHB ve kloroform karışımı ependorfa alındı ve 10.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı, süpernatant uzaklaştırıldı. Tekrar 30°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. 24 saatin sonunda katı PHB eldesi elde edildi.



Şekil 3.4.1. PHB ekstraksiyon aşamaları (A) 100 mL'den toplanan hücreler (B) Aseton-metanol karışımı (C) Pigmentlerin uzaklaştırılması (D) Kloroform ve PHB karışımı

3.5. PHB Karakterizasyonu

Hücre kuru ağırlığının (CDW) belirlenmesi elde edilen kuru hücre kütlesinin ekstraksiyon işleminde tartılması ile yapıldı. PHB birikiminin yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Thapa vd., 2019).

$$\text{PHB Birikimi (\%)} = \frac{\text{Ekstrakte edilen PHB'nin Kuru Ağırlığı (g)}}{\text{Biyokütlenin Kuru Ağırlığı (g)}} \times 100$$

3.5.1. NMR analizi

PHB'nin moleküler yapılarını belirlemek için kurutulmuş örnekler 1 mL döteryumlu kloroform (CDCl_3) içerisinde süspansiyon edildi. Çözülen örneklerin $^1\text{H-NMR}$ analizleri Bruker avance neo (400 MHz) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak PHB standardı (Merck, 363502-10G) kullanıldı.

3.5.2. FTIR analizi

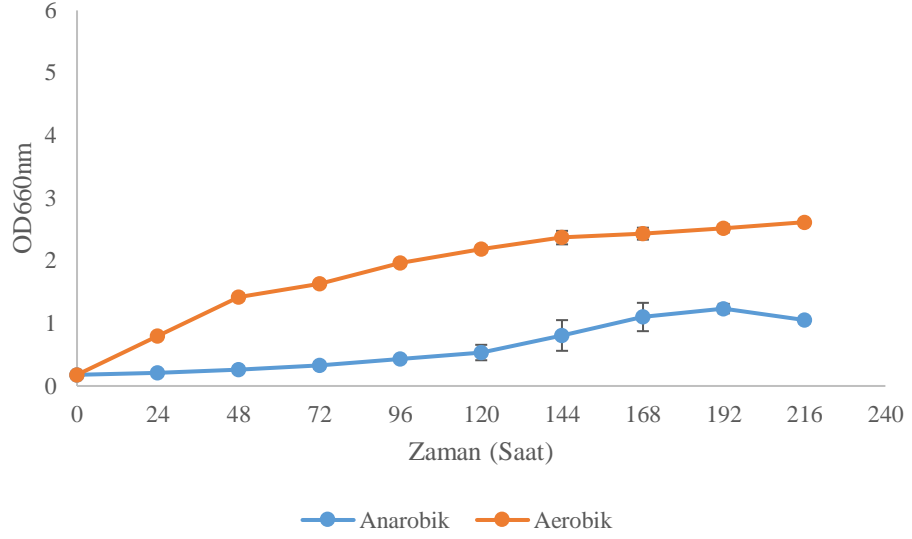
ZnSe kristali üzerinde PHB'nin doğrudan analizi yapıldı. Kızılötesi spektrumlar $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 'de ve FT-IR Thermo Scientific – Nicolet iS20 spektrofotometre ile 32 tarama, 4 cm^{-1} çözünürlükte analiz yapıldı. Yan zincir ve fonksiyonel grupları belirlemek için kızılötesi spektrumlar kullanıldı. Standart olarak NMR da kullanılan aynı PHB standardı kullanıldı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

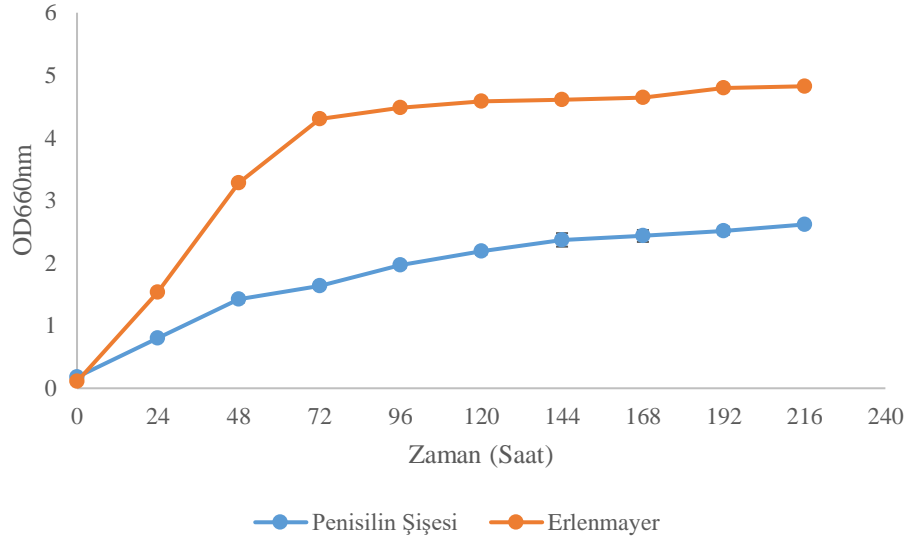
4.1. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri

4.1.1. Büyüme eğrileri

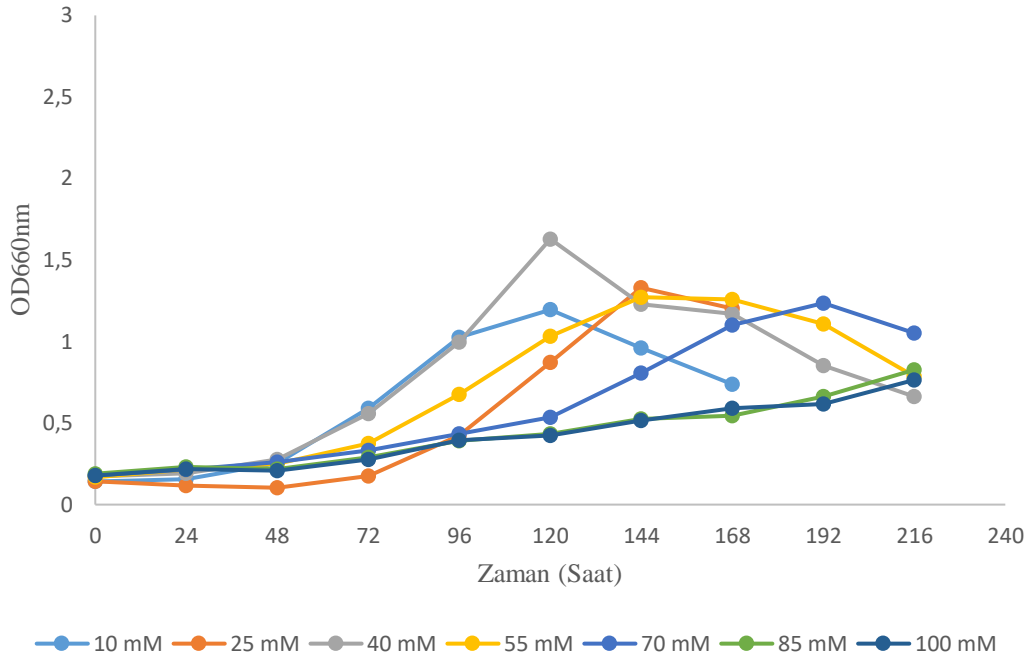
Asetat besiyerinde üreme sırasında hücre yoğunluğunu ölçmek için yaklaşık 24 saat aralıklarla 2 mL örnekler alınarak spektro yöntemi ile *C. sphaeroides* ve *R. palustris* 660nm’de (OD660nm), *C. necator* 600nm’de (OD600nm) optik yoğunlukları ölçüldü. Saf kültürlerde PHB verimlerinin karışık kültürlerle göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Monroy & Buitrón, 2020). *C. sphaeroides* asetat ortamında anaerobik ve aerobik olarak incelendiğinde anaerobik koşulda maksimum OD değeri 1,2 iken aerobik ortamda 2,6 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.1.1). *C. sphaeroides*’in anaerobik aydınlık ortama göre aerobik karanlık ortamda daha iyi bir PHB üretimi sağladığı görülmüştür (Y. R. Lee vd., 2020). Bakteri çoğalması ile PHB üretimi doğru orantılı olduğundan aerobik ortam koşulu amacımız doğrultusunda daha verimli olacağına karar verildi. Diğer bir parametre olan penisilin şişesi ve erlenmayer olarak incelendiğinde; *C. sphaeroides* penisilin şişesinde maksimum OD değeri 2,6 iken erlenmayerde 4,3 olduğu ölçüldü (Şekil 4.1.1.2). *C. sphaeroides* için O₂’nin bakteri üremesine olan etkisini belirlemek için 100 mL’lik penisilin şişesine ve 250 mL’lik erlenmayere 100 mL’lik ekim yapıldı ve bu durumda şişe üzerinde kalan O₂’nin bolluğunun büyüme için etkili bir faktör olduğu gözlemlendi. Bu durumda penisilin şişelerinde kalan hava boşluğundaki O₂’in erlenmayere göre yetersiz kaldığı görüldü. Maksimum PHB üretimi O₂’nin ve N₂’ninde sınırlı olduğu koşullar altında gerçekleşmektedir (J. Lee vd., 2021). Farklı konsantrasyonlara bakıldığında düşük karbon kaynağında hızlı bir tüketim olduğu ve yetersiz kaldığı fazla yüksek karbon kaynağının olması durumunda bakterinin büyüme sürecinin fazla zaman aldığı bunun için ortalama bir konsantrasyonun bakteri için olumlu sonuçlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.1.3). *C. sphaeroides* 65 mM asetat içeren bir ortamda büyütüldüğünde hücrelerde artan bir PHB sentezini sağlayan phaC gen ekspresyonunu ortaya çıkarmıştır (Monroy & Buitrón, 2020).



Şekil 4.1.1.1. *Cereibacter sphaeroides*'in asetat besiyerinde anaerobik ve aerobik koşullarda üreme eğrisi

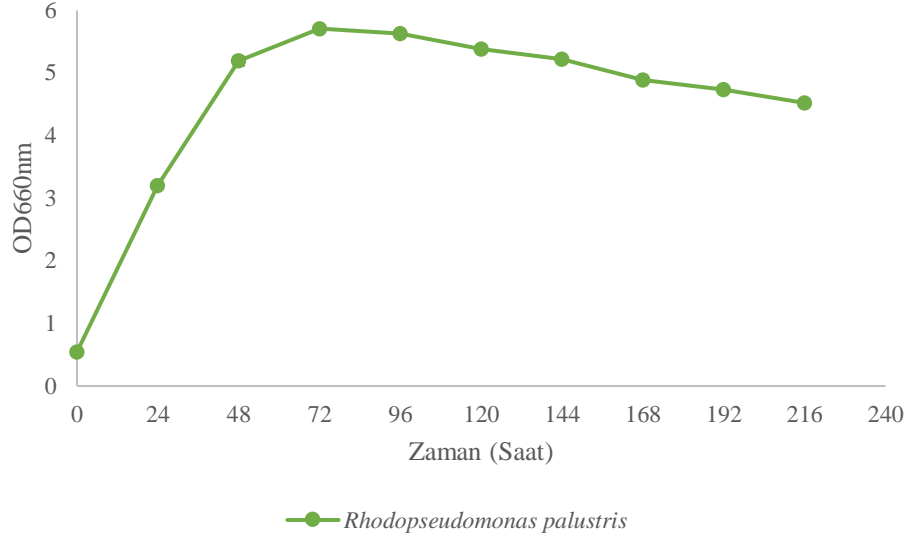


Şekil 4.1.1.2. Asetat besiyerinde çoğaltılan *Cereibacter sphaeroides*'in penisilin şişesi ve erlenmayerde üreme eğrisi

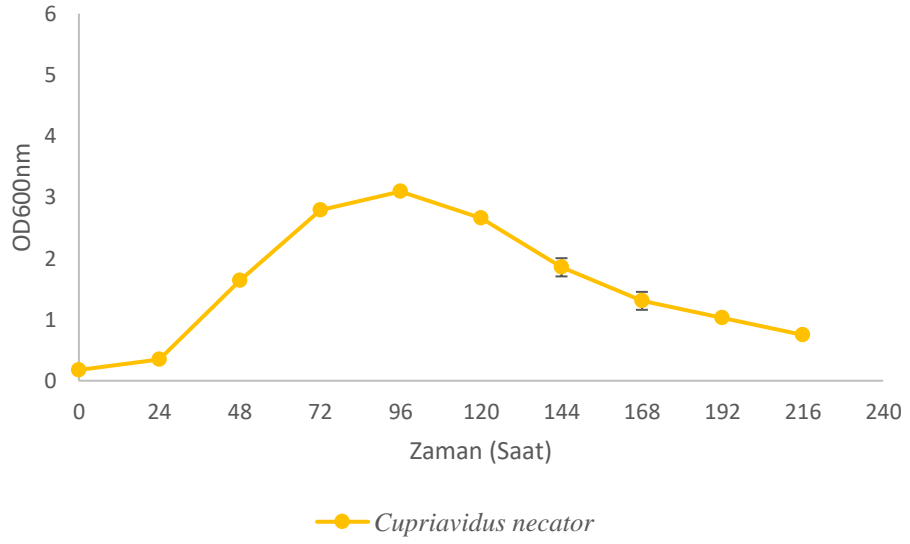


Şekil 4.1.1.3. *Cereibacter sphaeroides*'in farklı asetat konsantrasyonlarında (10,25,40,55,70,85 ve 100 mM) ve anaerobik koşullarda üreme eğrisi

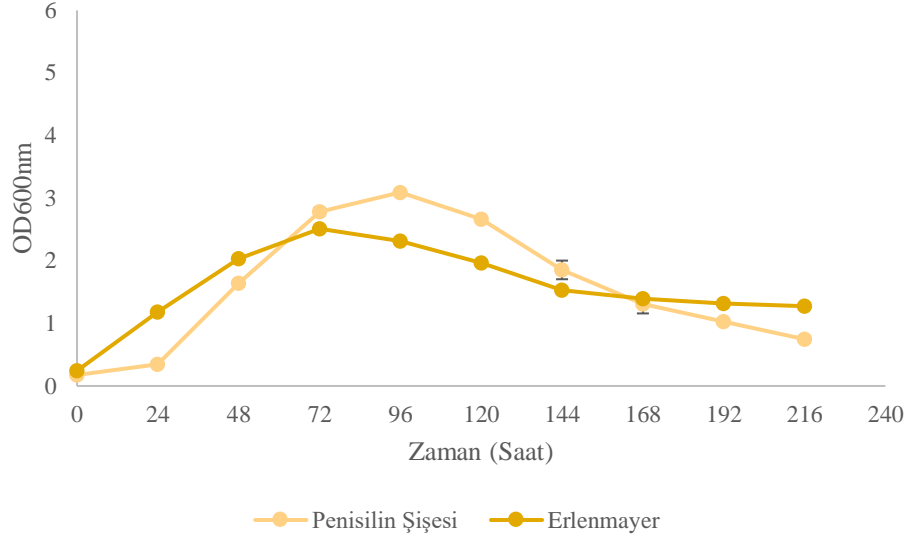
Asetat ortamında *R. palustris* anaerobik ve aerobik koşullarda incelendiğinde anaerobik ortamda büyüme gözlemlenmez iken aerobik ortamda OD değeri 5,7 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.1.4). Anaerobik ortama göre aerobik ortam PHB üretimini daha iyi desteklemiştir (Brown vd., 2022). Asetat ortamında *C. necator* bakterisinin maksimum OD değeri ise 3,0 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.1.5). Penisilin şişesi ve erlenmayer parametresi için *C. necator* bakterisinde bakıldığında ise maksimum OD değeri penisilin şişesinde 3,0 iken erlenmayerde 2,5 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.1.6). *C. necator* bakterisinde bu parametrenin fazla bir fark ortaya çıkarmadığı görüldü. Bakteriler arası fark olmaması için *C. necator*'da da erlenmayer kullanımı tercih edildi. *C. necator* genel olarak fruktoz, glukoz, melas gibi zengin besiyerlerinde büyüme tercih ettiği, asetatın bunlara ek bir karbon kaynağı olarak kullanılmasından dolayı beklenen büyümenin altında bir değer gözlemlendi (Aramvash vd., 2015, 2018; Baei vd., 2009; Duvigneau vd., 2020; Nygaard vd., 2021). Yedi farklı konsantrasyona bakıldığında *C. necator* için 55,70 ve 85 mM konsantrasyonlarda beklenen zaman diliminde ortalama aynı değerler çıktı. Diğer bakterilerinde durumu göz önünde bulundurularak 70 mM konsantrasyon ile devam edilme kararı alındı (Şekil 4.1.1.7).



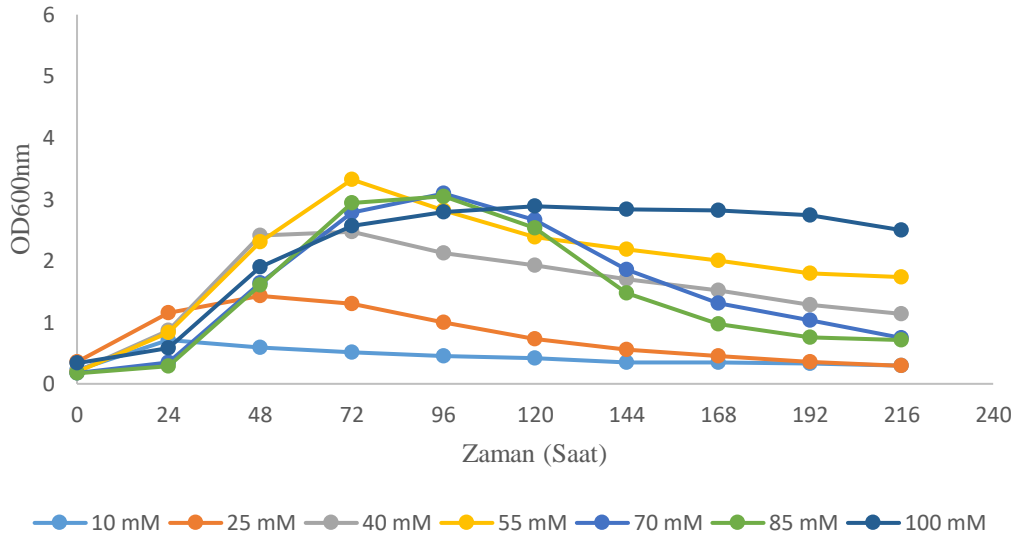
Şekil 4.1.1.4. *Rhodospseudomonas palustris*'in asetat besiyerinde aerobik koşullarda üreme eğrisi



Şekil 4.1.1.5. *Cupriavidus necator*'un asetat besiyerinde üreme eğrisi



Şekil 4.1.1.6. Asetat besiyerinde çoğaltılan *Cupriavidus necator*'un penisilin şişesi ve erlenmayerde üreme eğrisi

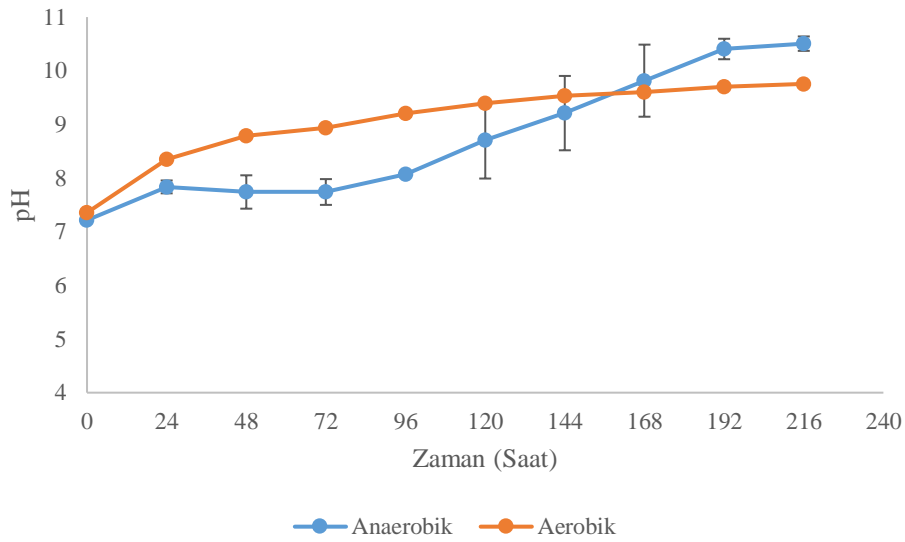


Şekil 4.1.1.7. *Cupriavidus necator*'un farklı asetat konsantrasyonlarında (10,25,40,55,70,85 ve 100 mM) üreme eğrisi

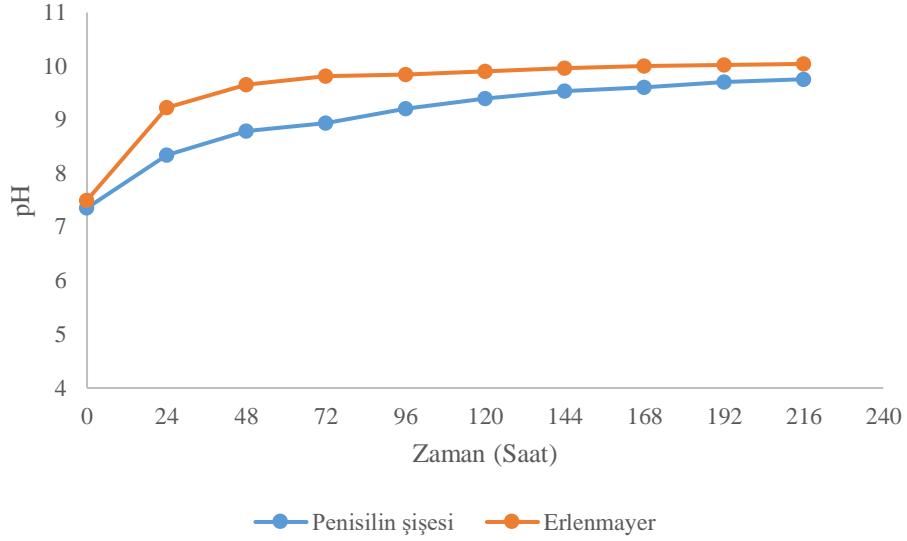
4.1.2. pH analizleri

Çalışma başlangıcında bakteri kültürünün pH'sı 6.8'e ayarlandı, ancak bakteri çoğalma süreci boyunca pH değişimleri takip edildi. Bunun için kültürden 24 saat aralıklarla

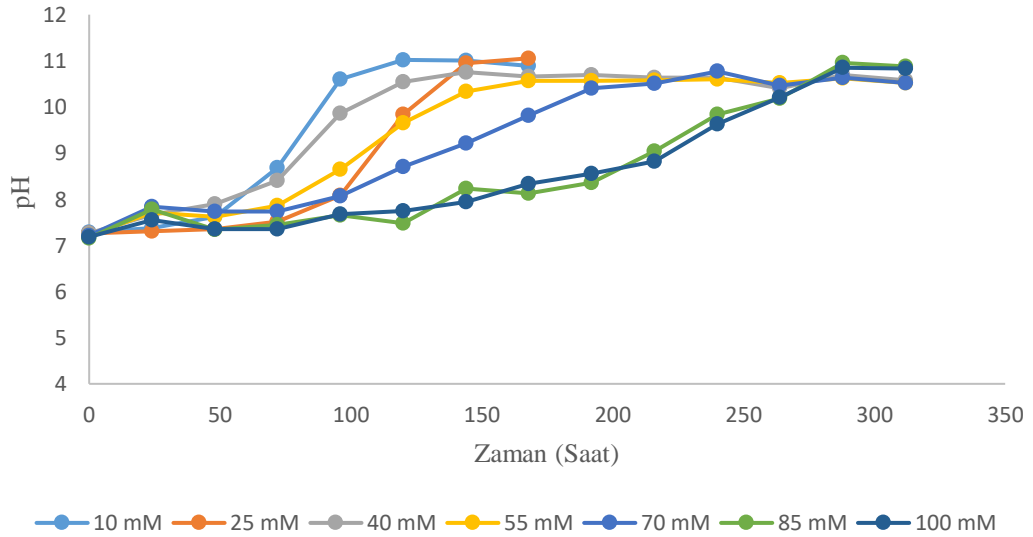
örnekler alınıp pH metrede ölçümler yapılarak takip edildi. Asetat besi ortamında *C. sphaeroides* bakterisinin anaerobik koşullarda maksimum pH'nın 10,5 değerine kadar yükseldiği görüldü (Şekil 4.1.2.1). Böyle bir pH değeri bakteri için bazik bir değerdir. Bir diğer parametre olan penisilin şişesi ve erlenmayer ekim farklarına bakıldığında; *C. sphaeroides* bakterisinde penisilin şişesinde maksimum pH değeri 9,7 iken erlenmayerde 10,04 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.2.2). Karbon kaynağı olarak asetat kullanıldığında, 16 saatlik kültivasyon içinde pH seviyesinin keskin bir şekilde 9.0 üzerine çıktığı görülmüş (M. S. Kim vd., 2012). Aerobik koşullarda ise maksimum pH değeri 9,7 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.2.1).



Şekil 4.1.2.1. *Cereibacter sphaeroides*'in asetat besiyerinde anaerobik ve aerobik koşullarda pH grafiği



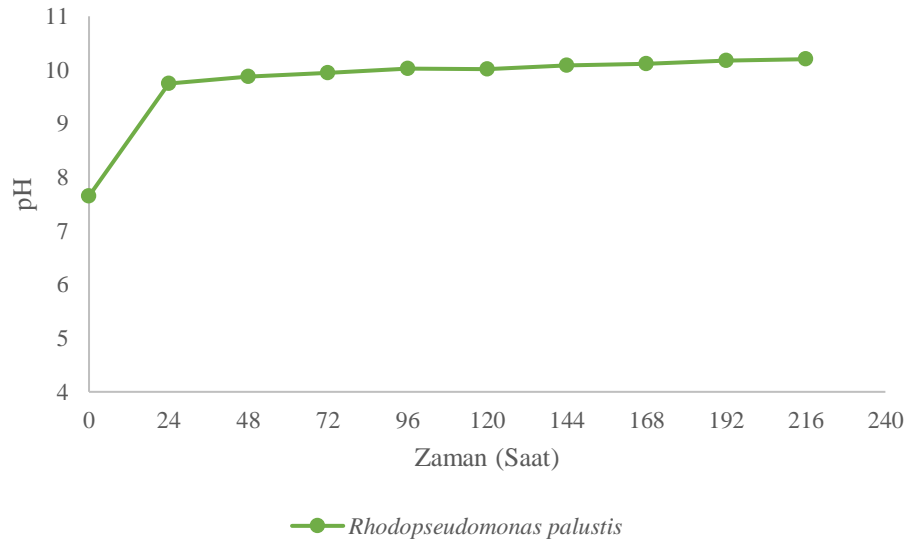
Şekil 4.1.2.2. Asetat besiyerinde çoğaltılan *Cereibacter sphaeroides*'in penisilin şişesinde ve erlenmayerde pH değişim eğrisi



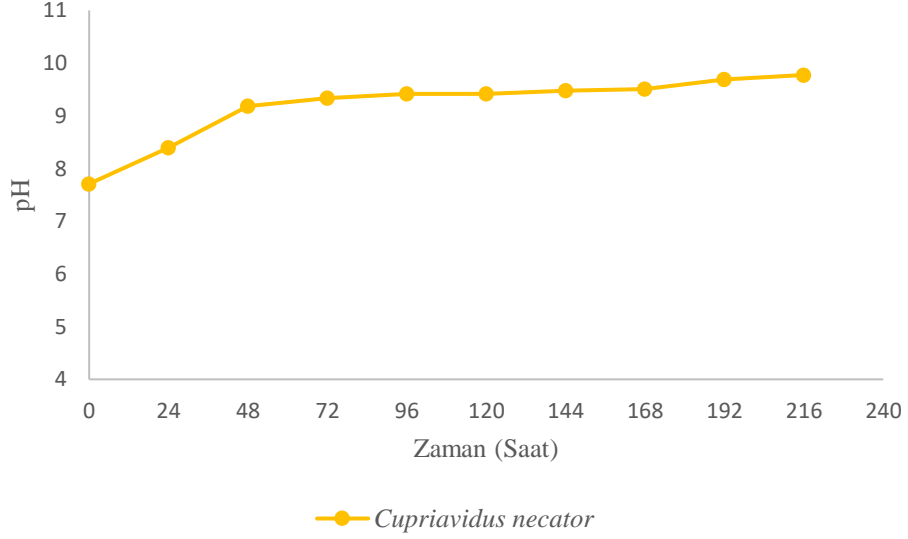
Şekil 4.1.2.3. *Cereibacter sphaeroides*'in asetat besiyerinde anaerobik koşullarda 10,25,40,55,70,85 ve 100 mM konsantrasyonlarda pH grafiği

Asetat ortamında *R. palustris* aerobik koşullarda durağan fazın sonlarında maksimum pH değeri 10,2 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.2.4). Fotosentetik bakteriler için optimum pH seviyesinin 7,1 ile 7,3 arasında olduğu bildirilmiştir (Koku vd., 2002). *C.*

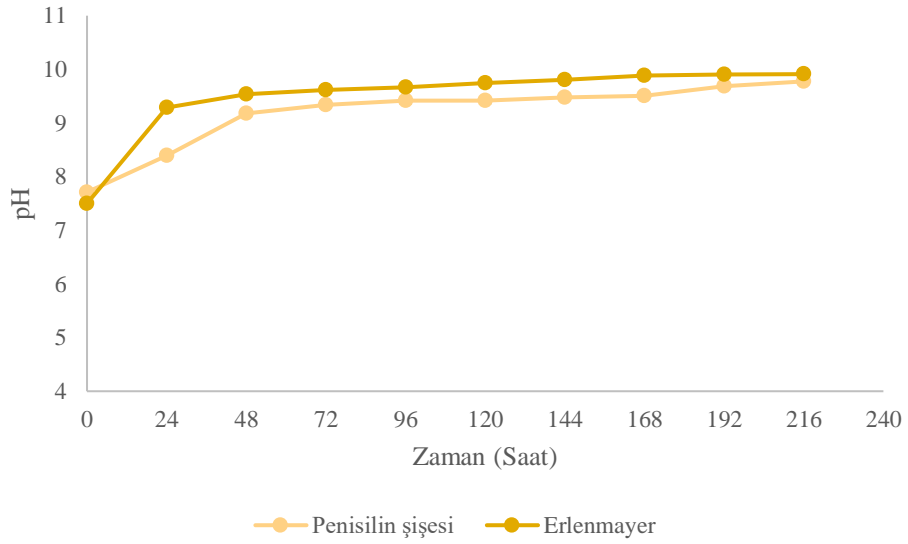
necator bakterisinde asetat besi ortamında ise aerobik koşullarda çoğaltılan *C. sphaeroides* ile yaklaşık pH değerlerine sahip olmaktadır. Maksimum pH değeri 9,7 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.2.5). *C. necator* da penisilin şişesi ve erlenmayer parametresine bakıldığında maksimum pH değeri penisilin şişesinde 9,7 erlenmayerde ise 9,9 olarak ölçüldü (Şekil 4.1.2.6). OD ile pH değerlerine bakıldığında pH seviyesinin 5,5 ve 9,5’de büyümenin olmadığı değerlendirilir (Welander vd., 2009). Maksimum değerlere bakıldığında ve OD değerleri ile karşılaştırıldığında genelde bakterilerin durağan fazda veya plato fazında oldukları görüldü. Fotobakterilerde biriken PHB miktarının, pH ve substrat türü gibi fizyolojik koşullara bağlı olduğunu göstermektedir (Monroy & Buitrón, 2020).



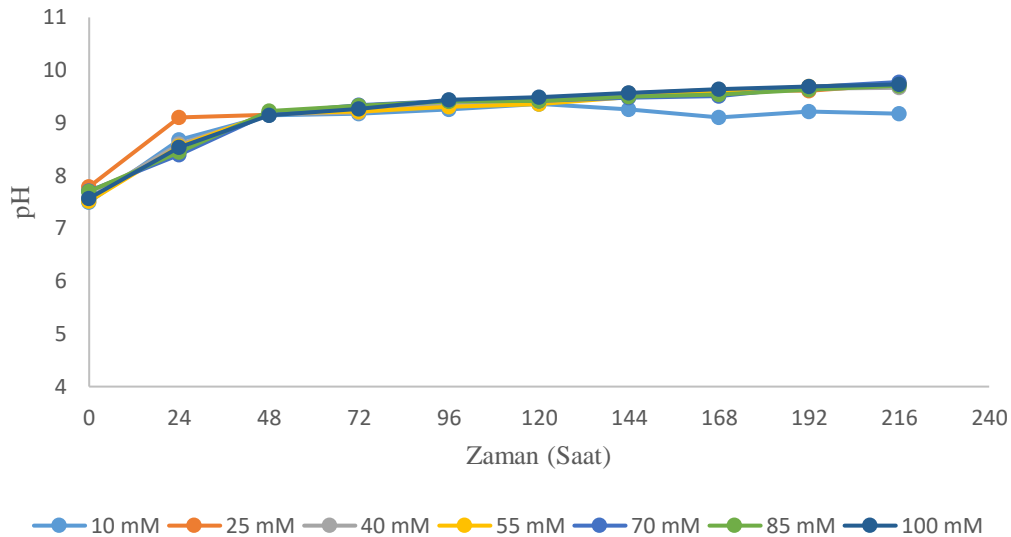
Şekil 4.1.2.4. *Rhodospseudomonas palustris* bakterisinin aerobik koşullarda pH değişim eğrisi



Şekil 4.1.2.5. *Cupriavidus necator*'un asetat besiyerinde pH grafiği



Şekil 4.1.2.6. Asetat besiyerinde *Cupriavidus necator*'un penisilin şişesi ve erlenmayerde büyümesinin pH grafiği

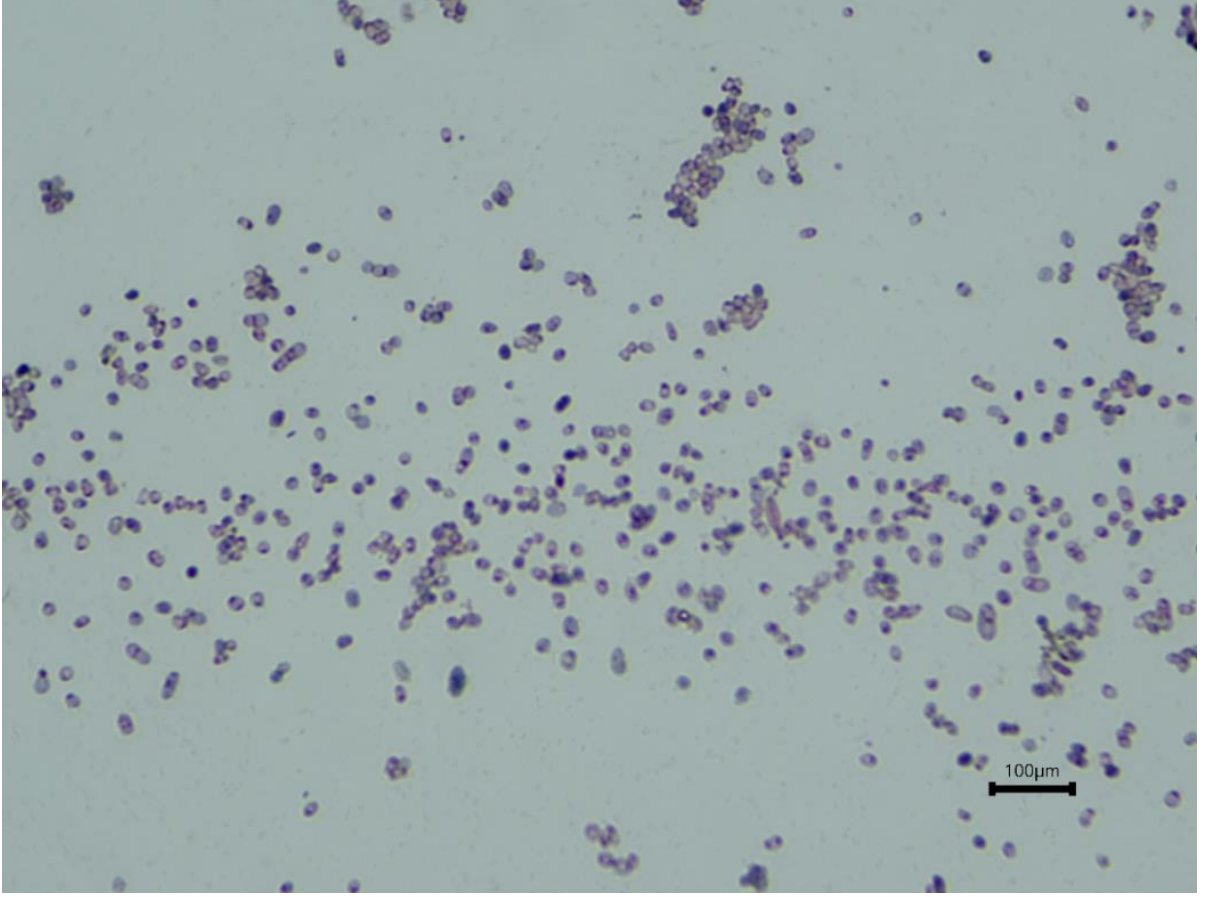


Şekil 4.1.2.7. *Cupriavidus necator*'un asetat besiyerinde 10,25,40,55,70,85 ve 100 mM konsantrasyonlarda pH grafiği

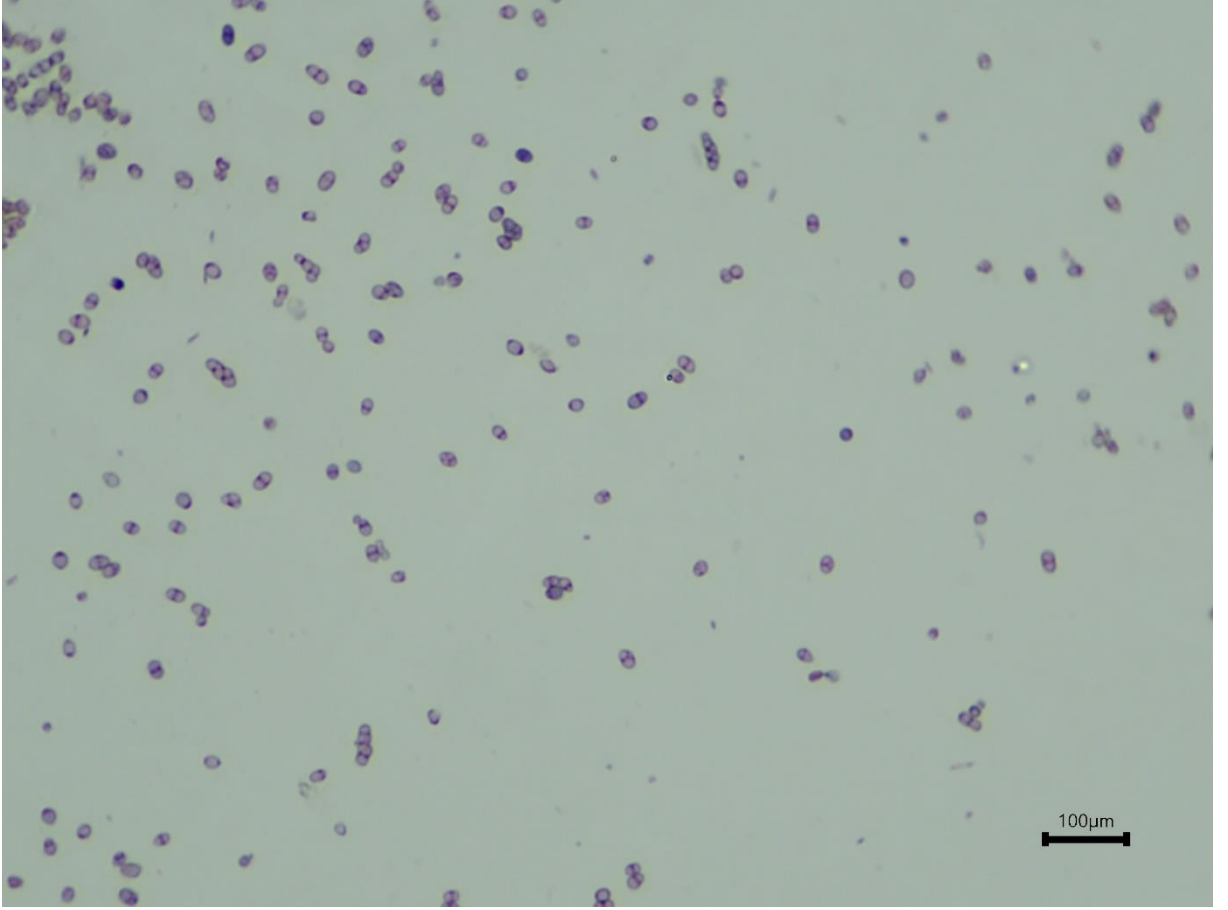
4.2. PHB'nin Görüntülenmesi

4.2.1. Sudan Black B ile ışık mikroskopunda görüntüleme

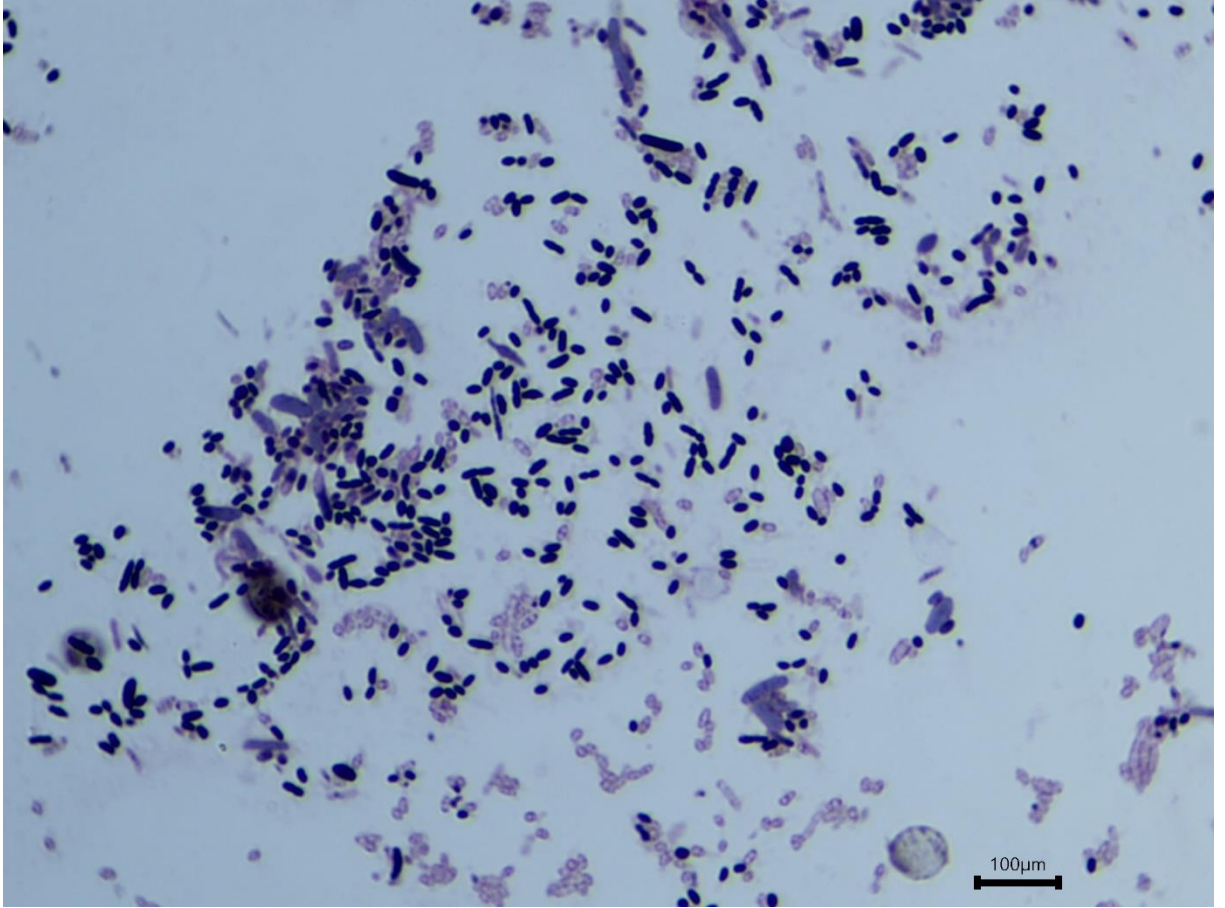
Maksimum PHB üretimi 48 saatte görülmektedir. Bu yüzden 48 saate lipofilik boya özelliği taşıyan Sudan Black B ile bakteriler boyandı. Bakteriler koyu boyama ile dolu granüller gösterdi, çünkü PHB granülleri mikroskop altında karanlık nokta olarak gözlemlenebilir (Yasin & Al-Mayaly, 2020). Boyama prosedürün de ksilene daldırılma süresinin kısa olmasına, boyayı ve bakteriyi olumsuz etkilediğinden dolayı dikkat edildi. Safranin ile zıt boyama yapıldığında hücre içinde pembe arka plana sahip koyu siyah ile mor granüller görüldü (Kumari & Dhingra, 2013). Bakteri içerisinde bulunan PHB granülleri 40X ve 100X okülerde gözlemlendi. Şekil 4.2.1.1'de *C. sphaeroides*, Şekil 4.2.1.2'de *R. palustris* ve Şekil 4.2.1.3'da *C. necator* bakterilerinin Sudan Black B ile boyanmış görüntüleri görülmektedir.



Şekil 4.2.1.1. *Cereibacter sphaeroides* bakterisinin Sudan Black B ile boyanmış PHB granüllerinin ışık mikroskopunda 100X oküler görüntüsü



Şekil 4.2.1.2. *Rhodospseudomonas palustris* bakterisinin Sudan Black B ile boyanmış PHB granüllerinin ışık mikroskopunda 100X oküler görüntüsü

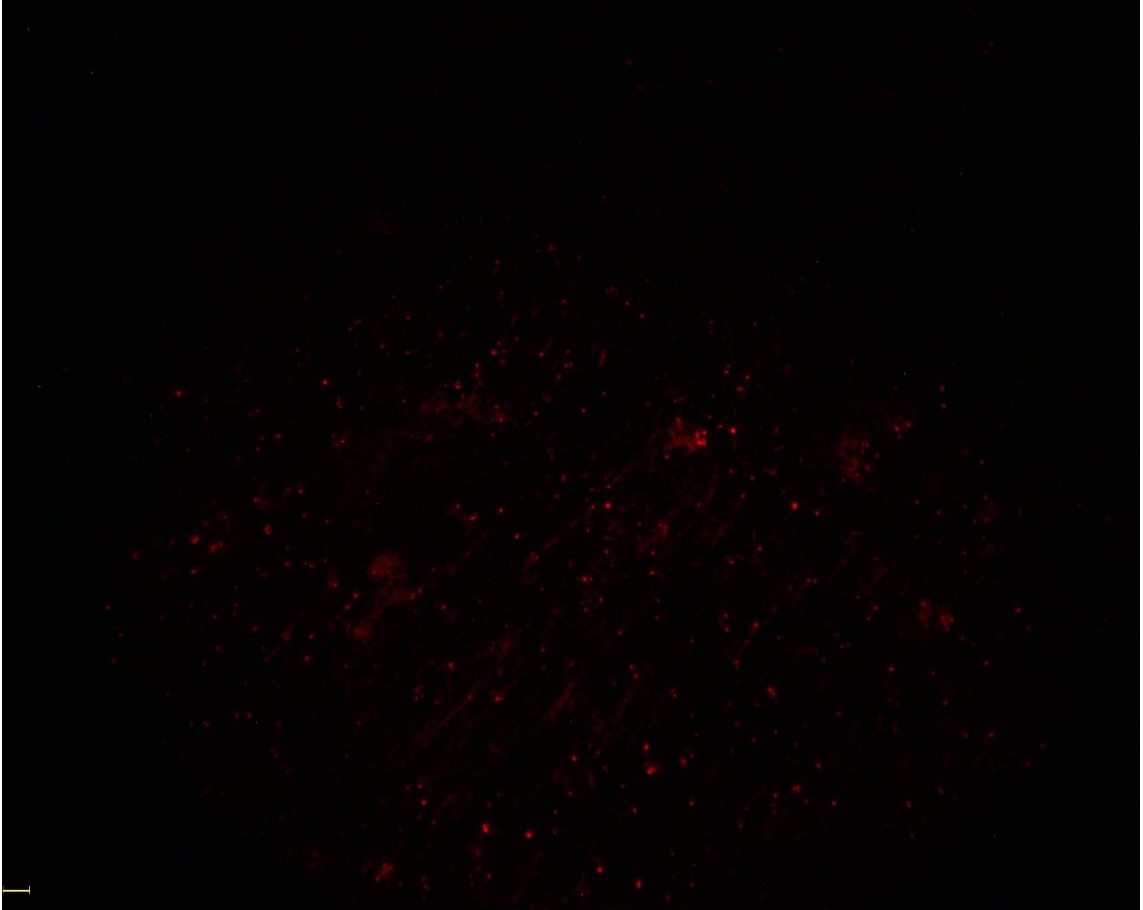


Şekil 4.2.1.3. *Cupriavidus necator* bakterisinin Sudan Black B ile boyanmış PHB granüllerinin ışık mikroskopunda 100X oküler görüntüsü

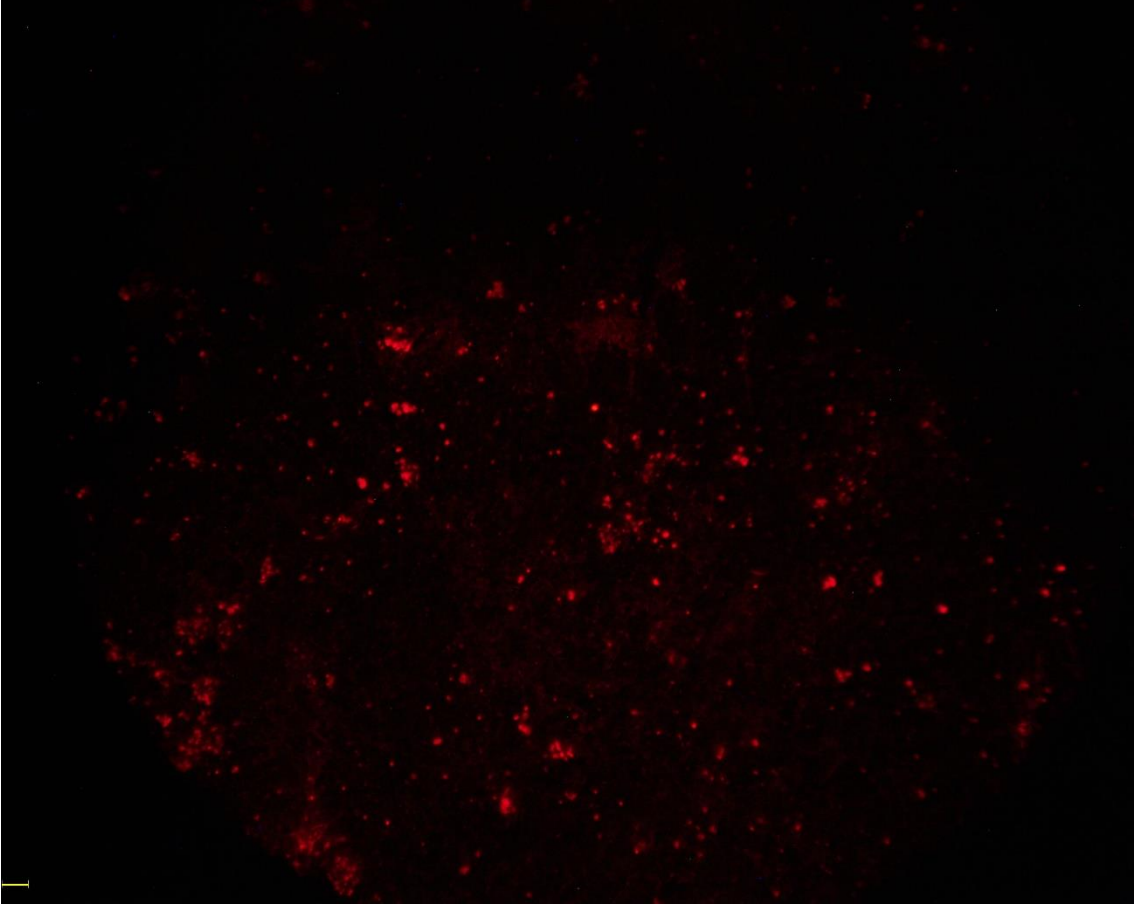
4.2.2. Nile Red ile floresans mikroskopunda görüntüleme

PHB üretiminin hızlı bir şekilde izlenmesine olanak tanıyan bir yöntemdir. Nile Red boyama prosedüründe inkübasyon süresine, boya konsantrasyonuna ve boyama esnasında boyanın ve boyanmış hücrelerin, preparatların folyo ile sarılarak ışık almamasına dikkat edildi. PHB granülleri, floresans görüntünün üzerine yerleştirilmiş bir iletilen ışık görüntüsü ile görülebilir ve hücrelerin çoğu, granüllere polarite gösterir. Parlaklıktaki varyasyonların, ya hücre içindeki tek bir PHB granülünün farklı boyutlarına ya da sitoplazma içindeki birkaç PHB granülüne bağlı olduğu düşünülür, oysaki bunlar daha fazla boya alır ve daha parlak görünürler (Brown vd., 2020). Eksitasyon 563/40 nm emisyon 594 nm dalga boyları literatüre ve floresans mikroskopun filtresine göre belirlendi. Floresans mikroskopunda 60X'lik objektifte PHB granüllerinin içerisinde bulunan Nile Red boyasının kırmızı bir floresans ışığına yaptığı gözlemlendi (Şekil 4.2.2.1, 4.2.2.2 ve 4.2.2.3). Görüntüleme açısından lam/lamel ve cam tabanlı hücre kültür kabında

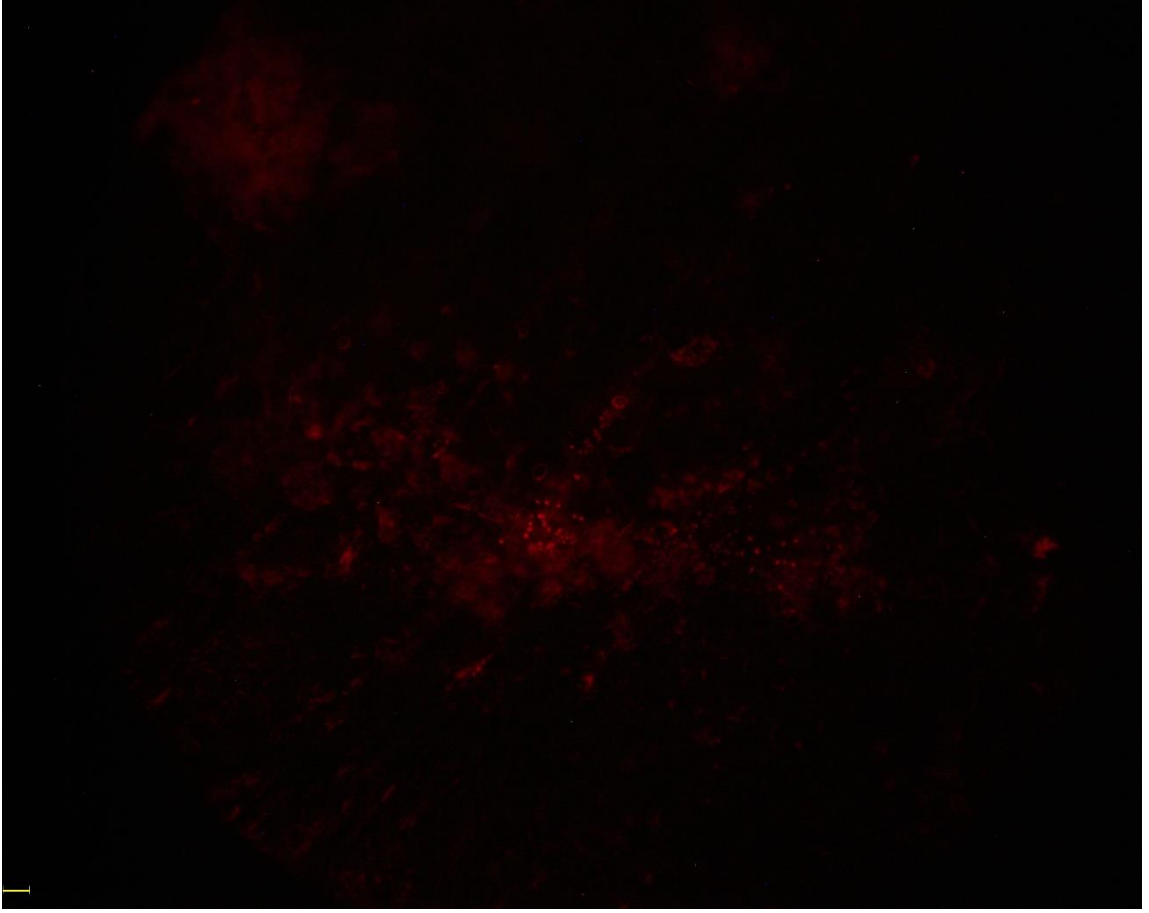
(35 mm) bakıldığında cam tabanlı hücre kültür kabının daha net bir görüntü verdiği sonucuna varıldı. Agarozlu plakalarda bakterilerin tane tane görüntüsü oluşmadığından dolayı agarozsuz prosedürün çalışmamız için daha uygun olduğuna karar verildi. Etanol, metanol, sodyum hipoklorit ve DMSO çözücülerin eklenmesi hücre zarının geçirgenliğini etkilediğine ve ayrıca boyanın hücreye nüfuz etmesini kolaylaştırabileceğine inanılmaktadır, bu yüzden bir sonraki çalışmalarda prosedüre eklenebilir (Zuriani vd., 2013). Etanol bir geçirgenleştiricidir ve geçirgenleştirme yanlış pozitifleri azaltır ve boyama için ünkübasyon süresinide azaltmaktadır (Brown vd., 2020).



Şekil 4.2.2.1. *Cereibacter sphaeroides* O.U.001'in Nile Red ile boyanmış PHB granüllerinin floresans mikroskopunda 60X oküler görüntüsü



Şekil 4.2.2.2. *Rhodospseudomonas palustris* 7850'nin Nile Red ile boyanmış PHB granüllerinin floresans mikroskopunda 60X oküler görüntüsü

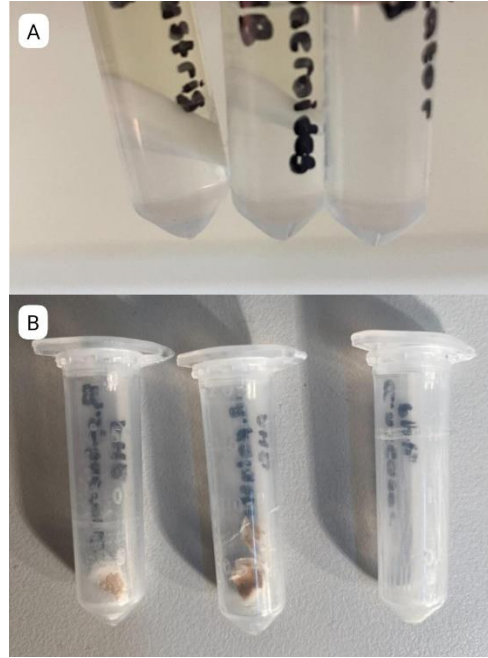


Şekil 4.2.2.3. *Cupriavidus necator* H16'nin Nile Red ile boyanmış PHB granüllerinin floresans mikroskopunda 60X oküler görüntüsü

4.3. PHB Ekstraksiyonu

PHB birikimine ilişkin bir çalışmada, asetat ve amonyum ile en yüksek PHB içeriğini (kuru hücre ağırlığının %40'ı) bulunmuş ve asetat üretim için en avantajlı substrat olarak bildirilmiştir (Monroy & Buitrón, 2020). Bu nedenle bu tez çalışmasında da asetat karbon kaynağı olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyonun bazı aşamalarında falkon tüplerin materyali yüksek rpm'de materyal olarak uygun olmadığı için bu duruma özellikle dikkat edildi. Kloroform uzaklaştırılmasında ilk olarak whatman filtre kâğıdı denendi (Thapa vd., 2019), fakat PHB'nin elde edilmesi için uygun olmadığının çalışmamız açısından kloroformun buharlaştırılarak uzaklaştırılmasına karar verildi. 24 saat içerisinde canlı hücrelerin kullanılması PHB'nin belirlenmesi için iyi bir avantajdır çünkü canlı hücrelere göre donmuş hücreler büyüme açısından daha fazla standart sapmaya neden olmaktadır (Brown vd., 2020). Şekil 4.3.1.A'da ekstraksiyon sonrası kloroform ve PHB karışımı, Şekil 4.3.1.B'de kloroformu uzaklaştırılmış saf PHB

görülmektedir. Ekstrakte edilen PHB ağırlıkları *C. sphaeroides*'in 14,6 mg (0,0146 g), *R. palustris*'in 31,1 mg (0,0311 g), *C. necator*'un 5,4 mg (0,0054 g) olarak tartıldı. *C. sphaeroides* ve *C. necator*'a göre *R. palustris*'in daha çok PHB ürettiği sonucuna varıldı. Nitrojen bakımından yeterli veya azot bakımından yoksun koşullarda asetat üzerinde mor kükrüksüz bakterilerde PHB içeriği en yüksek seviyelere *R. palustris*'de ulaşılmıştır (Monroy & Buitrón, 2020).



Şekil 4.3.1. Ekstrakte edilen PHB (A) Klorofrm ve PHB karışımı (B) Saf PHB

4.4. PHB Karakterizasyonu

Karbon ve azot kaynakları nitrojenaz aktivitesi ve H₂ üretimini ayrıca PHB birikiminde bağlantılı olarak etkilemektedir. Asetat/Amonyum ortamında nitrojenaz aktivitesi düşüktür, H₂ üretimi ciddi şekilde az ve sınırlıdır. Amonyum ilavesi yüksek amonyum konsantrasyonu nedeniyle nitrojenaz aktivitesinin inhibisyonuna neden oldu ve H₂ oluşumu duraksadı, buda fotosentetik bakterilerin yolak tercihini etkileyerek PHB üretimine yönlendirdi (M. S. Kim vd., 2012). Bakterilerin yüksekte düşüğe sıralandığında sırasıyla *R. palustris*, *C. sphaeroides* ve *C. necator*'dur. Hücre kuru ağırlıklarına baktığımızda *C. sphaeroides* 0,2673 g, *R. palustris* 0,2794 g, *C. necator* 0,1569 g. PHB verimi hesaplandığında; *C. sphaeroides* % 0,054, *R. palustris* % 0,11, *C. necator* % 0,034. Genellikle termoplastiklerin üretimi için moleküler ağırlığı 6×10^5 Da ($\approx 9,96 \times 10^{-19}$ g) olan bir PHB kabul edilebilir (Aramvash vd., 2018). Çizelge 4.4.1'de

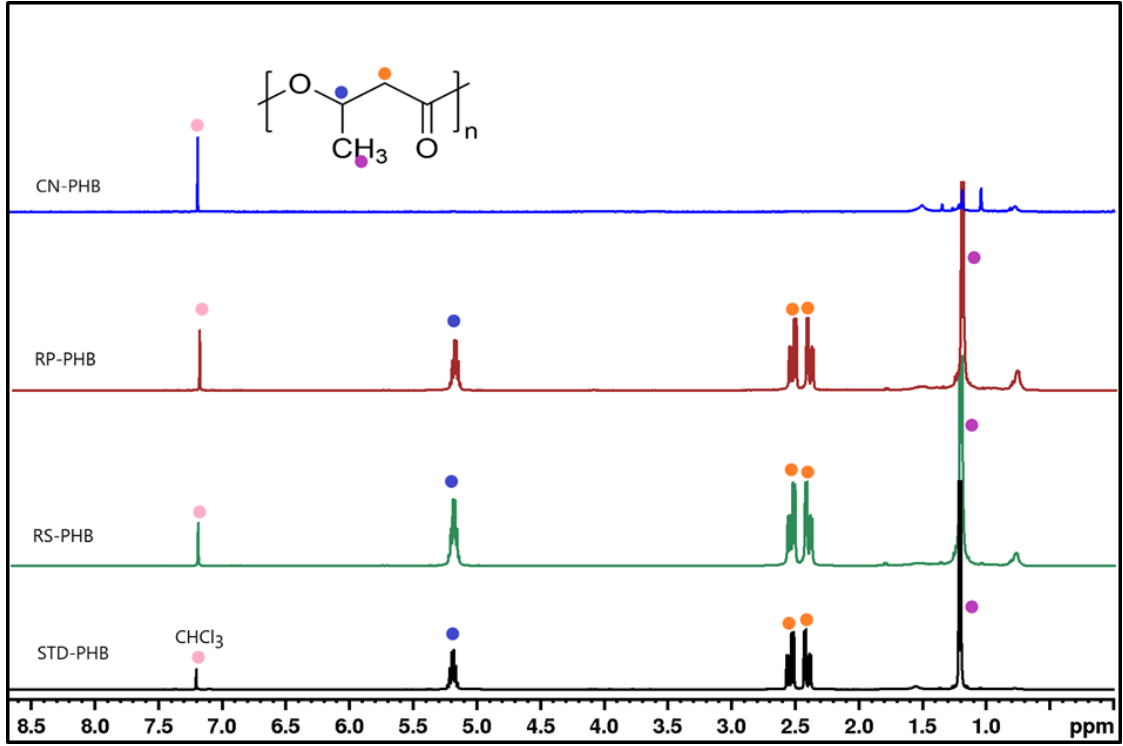
görüldüğü üzere PHB verimliliği ekstraksiyon prosedüründe değişen farklılıklardan, büyüme ortamındaki değişikliklerden, C/N oranındaki değişiminden, besiyer içeriğinin farklılığından, azot kaynağının farklılığından, besiyer konsantrasyonunun farklılığından, gen aktarımlarının etkisinden, biyoreaktör üretiminden kaynaklı olarak değişim göstermektedir.

Çizelge 4.4.1. *Cereibacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Cupriavidus necator*'un PHB verimlerinin karşılaştırılması

Bakteri	Besiyer	PHB Verimi g/L	Referans
<i>Cereibacter sphaeroides</i>	Asetat	%29.0	(M. S. Kim vd., 2012)
	Sistrom	%51.5	(Y. R. Lee vd., 2020)
	Asetat	%60.0	(Krasil'nikova vd., 2015)
	Süksinat	%7.6	(Monroy & Buitrón, 2020)
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Asetat	%93	(Ranaivoarisoa vd., 2019)
	Malat	%46.8	(Monroy & Buitrón, 2020)
	Asetat	%10.5	(Monroy & Buitrón, 2020)
	Asetat	%30.0	(Monroy & Buitrón, 2020)
	Bütirat	%44	(Monroy & Buitrón, 2020)
	Asetat	%18.28	(Touloupakis vd., 2021)
<i>Cupriavidus necator</i>	Sodyum Asetat	%68.4	(Brown vd., 2020)
	Fruktoz	%2.3-98.6	(Aramvash vd., 2018)
	Melas	21.8	(Baei vd., 2009)
	Fruktoz	14.4	(Nygaard vd., 2021)
	Fruktoz+Asetat	%45	(Duvigneau vd., 2020)
	Fruktoz	%60-97	(Aramvash vd., 2015)
	CO ₂	%67	(J. Lee vd., 2021)
	Gliserol	%61	(J. Lee vd., 2021)

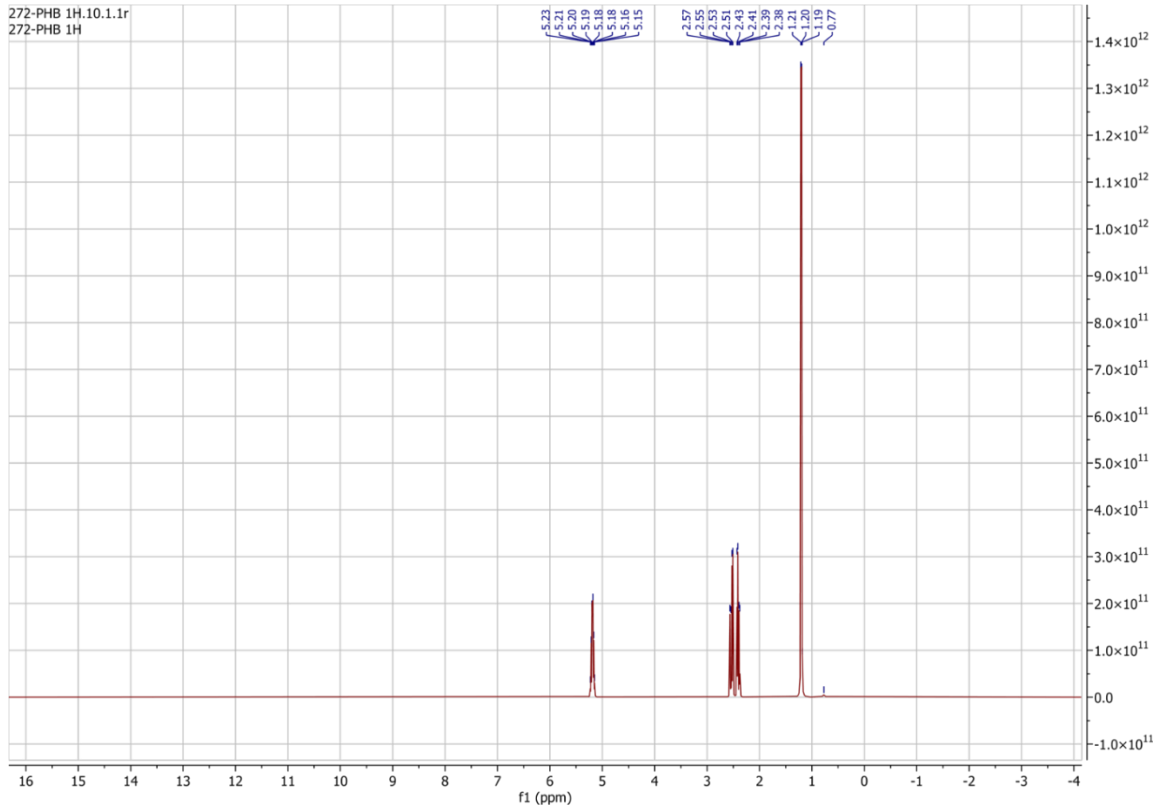
4.4.1. NMR analizi

Şekil 4.4.1.1'de görüldüğü üzere H-NMR spektrumunda 1.21 ppm'de gözlemlenen dublet PHB yapısındaki -CH₃ grubunun hidrojenlerine aittir. 2.41 ve 2.54 ppm'de gözlenen dörtlü dublet pikler ana zincirdeki -CH₂ grubunda bulunan H'lere ve 5.18 ppm'deki multipler ise yine ana zincir üzerindeki -CH- grubunun tek hidrojenine aittir. Grafikte en altta siyah renkle gösterilen standart PHB (STD-PHB) ile RS-PHB ve RP-PHB arasında çok yüksek oranda örtüşme gözlenmiştir. Ancak CN-PHB spektrumunda PHB'a ait standart pikler gözlenmemektedir. Spektrumda yüksek manyetik alan bölgesinde görünen küçük pikler kontaminasyon olarak kabul edilebilir.

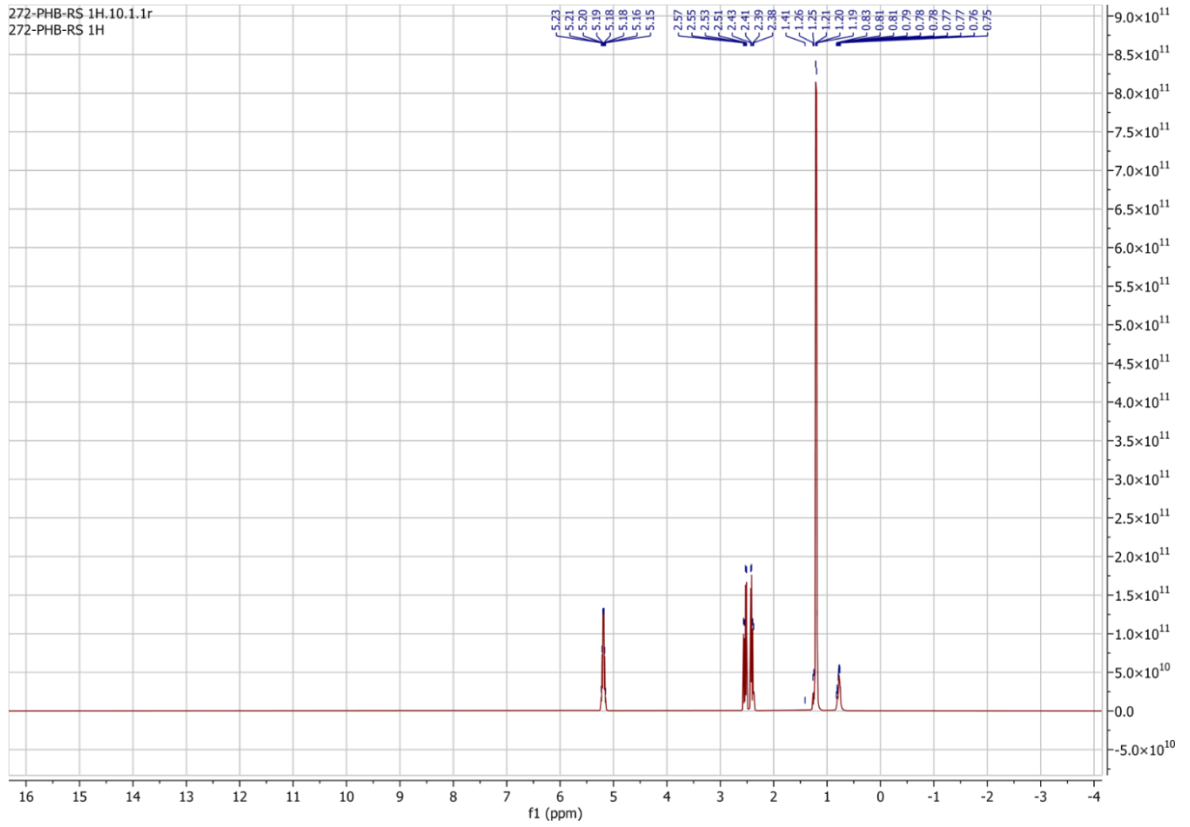


Şekil 4.4.1.1. Standart ve üç farklı bakteri tarafından üretilen PHB'lere ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

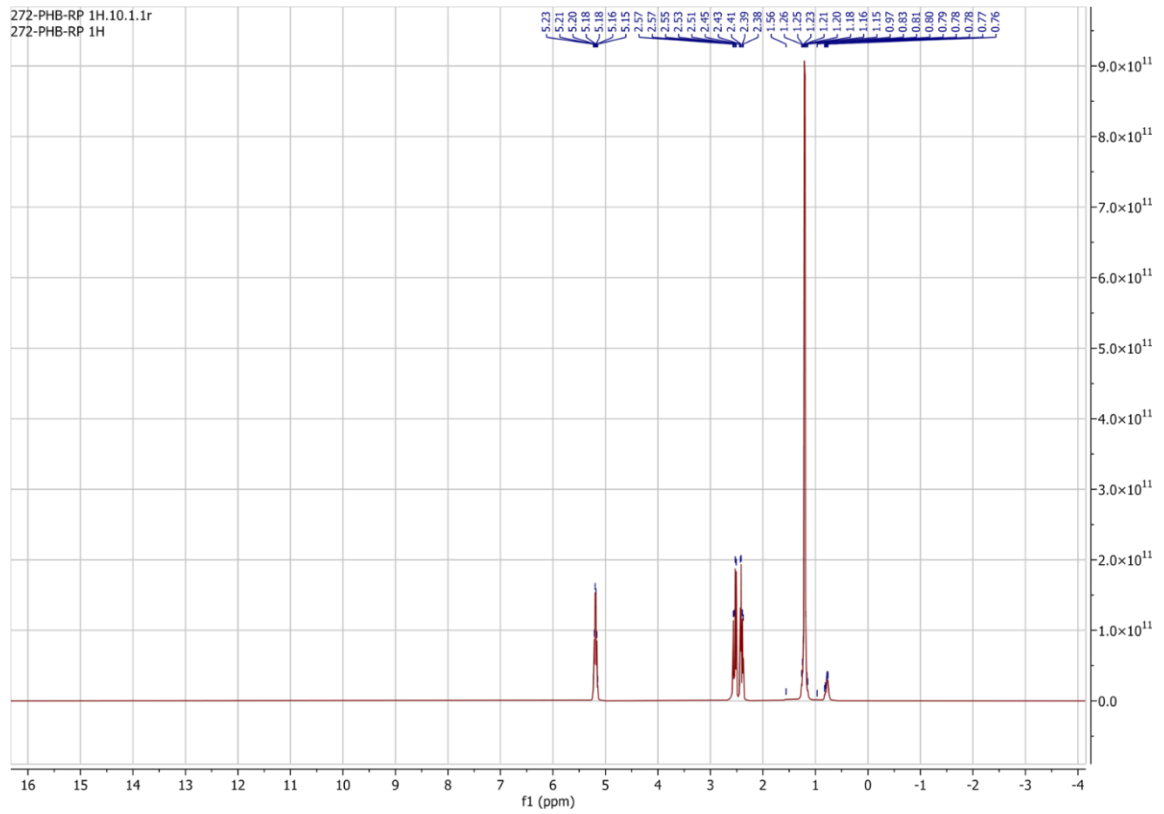
Şekil 4.4.1.2, 4.4.1.3 ve 4.4.1.4'de görüldüğü üzere metin (-CH), metilen (-CH₂) ve metil (-CH₃)'e karşılık gelen bir dizi karakteristik PHB tepe noktası görülmektedir (Aramvash vd., 2018). *C. sphaeroides* ve *R. palustris* $^1\text{H-NMR}$ sonuçları Şekil 4.4.1.1'de görülen PHB standırdı ile 1.20 de oluşan pik haricinde aynı bulunmaktadır. Buradan bu bakterilerden elde edilen PHB'nin saf ve temiz bir PHB elde edildiğinin göstergesidir. Fakat *C. necator*'da bulunan 2.51, 3.64 ve 3.88'de gözlemlenen nispeten üç küçük tepe noktası safsızlıklardan kaynaklanabilir. Gözlenen pikler, daha önce PHB yapısı için bildirilenlere karşılık gelir. 1,27 ppm'deki ikili rezonans sinyali, PHB molekülündeki asılı zincirin metil -CH₃ protonlarına atfedilir. Sırasıyla omurga zincirinin metilen -CH₂- ve metin -OCH- protonlarına karşılık gelen, 2,45-2,63 ppm'de dörtlü rezonans sinyalinin ikilisi ve 5,26 ppm'de çoklu rezonans sinyalidir (Nygaard vd., 2021). $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisi kullanılarak elde edilen sonuçlar üretilen biyopolimerin homopolimer PHB olduğunu doğruladı.



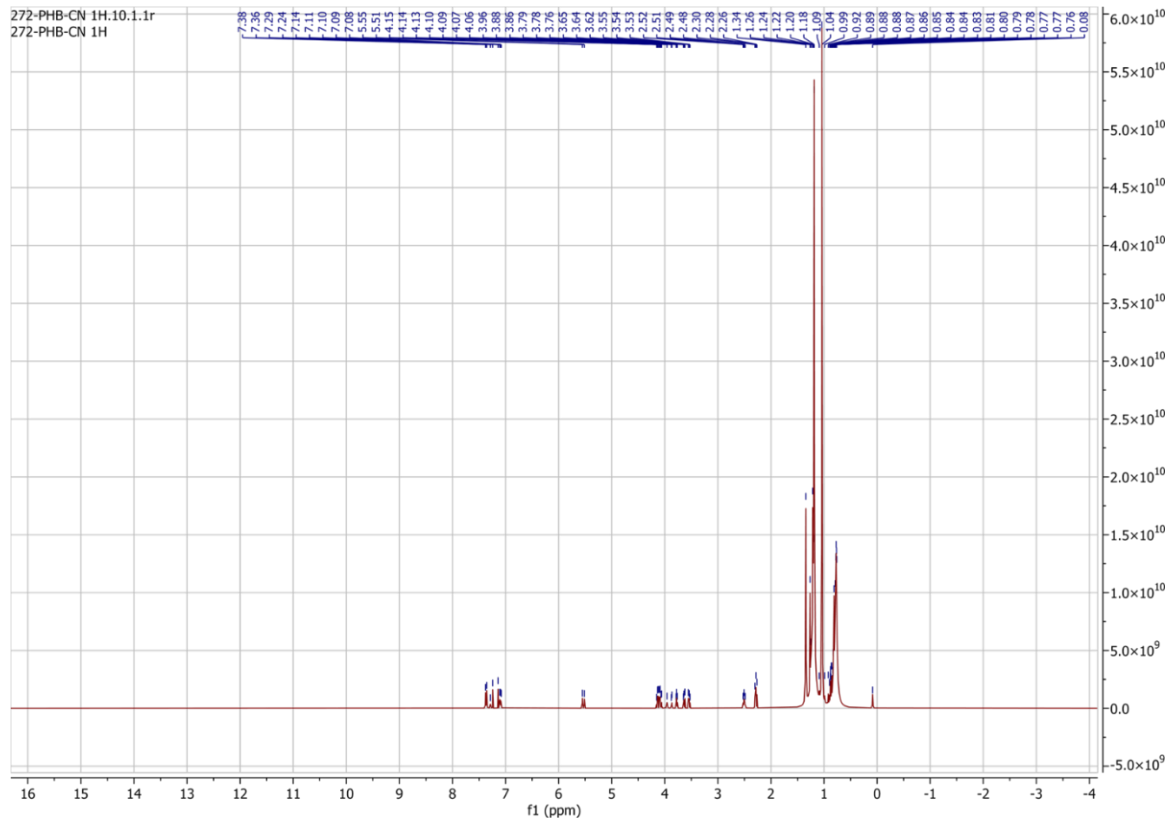
Şekil 4.4.1.2. PHB standardının ^1H -NMR spektrumu



Şekil 4.4.1.3. *C. sphaeroides*'in ^1H -NMR spektrumu



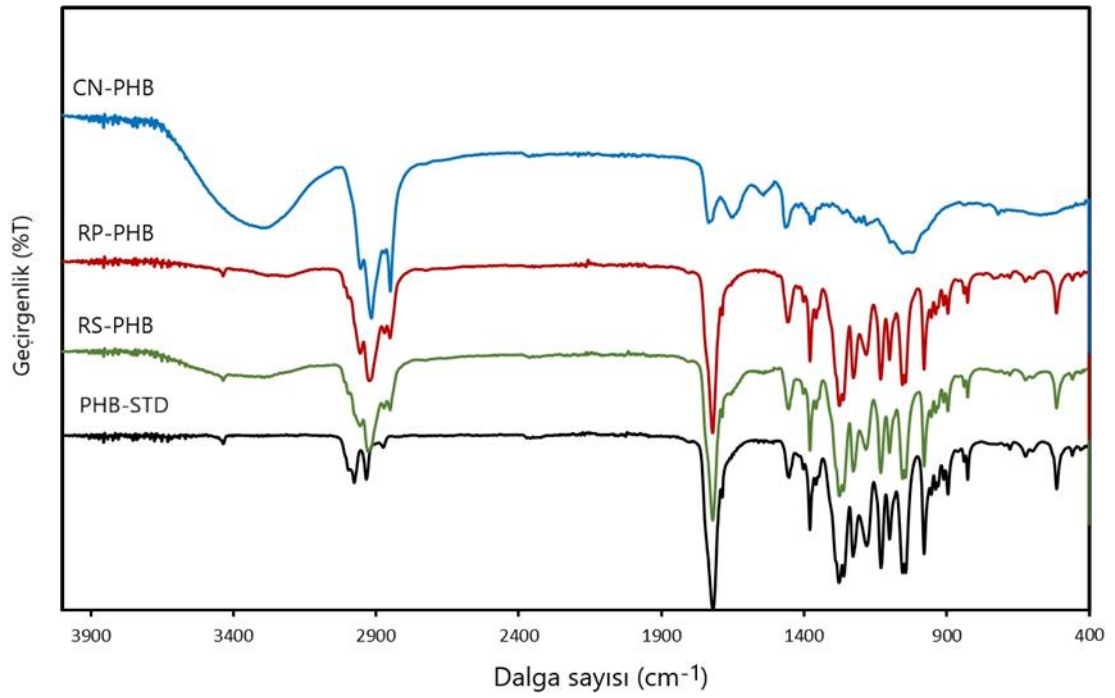
Şekil 4.4.1.4. *R. palustris*'in ^1H -NMR spektrumu



Şekil 4.4.1.5. *C. necator*'un ^1H -NMR spektrumu

4.4.2. FTIR analizi

FTIR spektrumunda 1720 cm^{-1} civarında gözlenen güçlü pik PHB yapısındaki $\text{C}=\text{O}$, karbonil grubuna ait piktir. Bu pik aynı zamanda polihidroksialkonatlarda karakteristik ester karboniline ait piktir. 2900 cm^{-1} civarında gözlenen bantlar ise $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ grubuna ait asimetrik gerilme pikidir. Spektrumdaki diğer önemli pik ise 1179 cm^{-1} civarında gözlenen ve metil/etil gruplarına ait $\text{C}-\text{H}$ gerilmesidir. Spektrumda bant şeklinde gözlenmektedir. Yukarıda bahsedilen pikler H-NMR verileriyle örtüşmektedir. CN-PHB yapısı ait spektrumda ise polimer ana zinciri üzerinde bulunan $\text{C}=\text{O}$ bandı gözlenmemektedir.



Şekil 4.4.2.1. Standart ve üç farklı bakteri tarafından üretilen PHB'lere ait FTIR spektrumu

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Cereibacter sphaeroides, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Cupriavidus necator* PHB üretimi açısından çok yönlü ve farklı metabolizmalara sahip olması çalışma moleküler biyoloji çalışmalarında sıkça kullanılan mikroorganizmalardır. Literatürde bu çalışma üzerine yoğunlaşmış fakat üç mikroorganizma aynı çalışmada ve kültür koşullarında kullanılmamış olmasından dolayı asetat ortamında PHB üretimi araştırılmıştır. 10, 25, 40, 55, 70, 85 ve 100 mM asetat konsantrasyonlarında bakterilerin optik dansite (OD) bakılarak 70 mM asetat konsantrasyonuna, amonyum sınırlandırılarak 2 mM konsantrasyon besiyeri kullanıldı. En yüksek OD değeri 70 mM konsantrasyonunda belirlendiği için 70 mM tercih edildi. *C. sphaeroides* ve *R. palustris* için anaerobik/aydınlık ortamda *C. sphaeroides*'in OD 1,23, *R. palustris*'in büyümediği görüldü, aerobik/karanlık ortamda aynı sırasıyla OD 4,3 ve 5,7 ölçülmesinden kaynaklı olarak aerobik/karanlık ortamdan ilerlendi.

Sudan Black B ve Nile red boyamalarda PHB granülleri görüntülendi. Sudan Black B boyasında PHB granülün yoğunluğuna göre bakteri içerisinde granüller mor ve siyah renkte gözlemlendi. Nile red boyasında ise nokta halinde kırmızı renkte ışımalar görüldü. Ekstraksiyon sonunda 100 mL ile başlanılan bakteri kültürlerinde *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da sırasıyla 0.2673, 0.2794 ve 0.1569 g hücre kuru ağırlıkları tespit edildi, aynı sıra ile 14.6, 31.1 ve 5.4 mg PHB kuru ağırlıkları tartıldı. Karbon kaynağının bol, amonyum kaynağının sınırlı olduğu miktarlarda *C. sphaeroides*, *R. palustris*'in sırasıyla % 0,054 ve % 0,11 PHB üretimi sağladı. *C. necator* hücre büyümesinde zengin besiyeri tercih ettiği için asetat ortamında karbon kaynağı yeterli gelmediğinden % 0,034 ile beklenen PHB üretimi alınamadı. NMR için kontrol grubu olarak PHB standardına bakıldığında *C. sphaeroides* ve *R. palustris* için verimli bir PHB elde edildi. Petrol bazlı plastiklerin kullanımının oluşturduğu zararlardan dolayı artık biyoparçalanır plastiklere yönelim başlamıştır. Bu yüzden mikroorganizmalar tarafından parçalanabilen ve plastik ürünlerde kullanılabilen PHB üretiminin artırılabilmesi için literatür çalışmalarında büyük bir önem taşımaktadır. *C. sphaeroides*, *R. palustris*, *C. necator*'un asetat besiyerinde PHB üretimi ve üretim sonucunda PHB verimi incelendi.

5.2 Öneriler

Aşağıda maddeler halinde öneriler sıralamaktadır.

- PHB üretimini arttırmak için besiyer olarak zengin besiyer içerikleri kullanılarak asetat ekstra kaynak eklmesi olarak kullanılabilir. Kültür koşullarında ki değişiklikler incelenebilir.
- PHB'leri görüntüleme açısından ise Sudan Black B boyası için granüllerin net görünmesi için seyreltme daha fazla yapılarak bir prosedür güncellemesi gerçekleştirilebilir ve Nile red ile boyamada floresans mikroskop konfokal mikroskop kullanılarak daha belirgin görüntü elde edilebilir.
- Nile red boyama prosedürüne etanol, metanol, sodyum hipoklorit ve DMSO çözücülerin eklenmesi hücre zarının geçirgenliğini etkilediğine ve ayrıca boyanın hücreye nüfuz etmesini kolaylaştırabileceği göz önüne alındığından ekleme yapılabilir.
- PHB üreiminde safsızlık kontrol edilebilir. Böylece kesin bir PHB üretimi olarak kirlilik ortadan tamamen kaldırılmış olur.

6. KAYNAKLAR

- Akdoğan, M. & Çelik, E. (2018). Purification and characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) from a *Bacillus megaterium* strain using various dehydration techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(8), 2292-2298. <https://doi.org/10.1002/JCTB.5572>
- Alsiyabi, A., Brown, B., Immethun, C., Long, D., Wilkins, M. & Saha, R. (2021). Synergistic experimental and computational approach identifies novel strategies for polyhydroxybutyrate overproduction. *Metabolic Engineering*, 68, 1-13. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2021.08.008>
- Aramvash, A., Gholami-Banadkuki, N., Moazzeni-Zavareh, F. & Hajizadeh-Turchi, S. (2015). An environmentally friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer with non-halogenated solvents. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1936-1943. <https://doi.org/10.4014/jmb.1505.05053>
- Aramvash, A., Moazzeni Zavareh, F. & Gholami Banadkuki, N. (2018). Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Engineering in Life Sciences*, 18(1), 20-28. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700102>
- Arıkan, E. B., Özsoy, H. D., Erol, A., İslamoğlu, A., Kaya, D. N. & Çakmak, S. (2016). Meyve Suyu Endüstrisi Atıksuyundan Mikrobiyal Biyopolimer Üretiminin Araştırılması. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 31(ÖS2), 205-210. <https://doi.org/10.21605/CUKUROVAUMMFD.316768>
- Armentano, I., Bitinis, N., Fortunati, E., Mattioli, S., Rescignano, N., Verdejo, R., Lopez-Manchado, M. A. & Kenny, J. M. (2013). Multifunctional nanostructured PLA materials for packaging and tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11), 1720-1747. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2013.05.010>
- Augustine, R., Kalarikkal, N. & Thomas, S. (2016). Electrospun PCL membranes incorporated with biosynthesized silver nanoparticles as antibacterial wound dressings. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 6(3), 337-344. <https://doi.org/10.1007/S13204-015-0439-1>
- Baei, M. S., Najafpour, G. D., Younesi, H., Tabandeh, F. & Eisazadeh, H. (2009). Poly (3-hydroxybutyrate) Synthesis by *Cupriavidus necator* DSMZ 545 Utilizing Various Carbon Sources. *World Applied Sciences Journal*, 7(2), 157-161.
- Basak, N. & Das, D. (2007). The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: The present state of the art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 31-42. <https://doi.org/10.1007/S11274-006-9190-9/METRICS>
- Bayari, S. & Severcan, F. (2005). FTIR study of biodegradable biopolymers: P(3HB), P(3HB-co-4HB) and P(3HB-co-3HV). *Journal of Molecular Structure*, 744-747(SPEC. ISS.), 529-534. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2004.12.029>
- Belal, E. B. (2013). Production of Poly-β-Hydroxybutyric Acid (PHB) by *Rhizobium elti* and *Pseudomonas stutzeri*. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 5(6), 273-284. <https://doi.org/10.19026/crjbs.5.5429>
- Yoruç, A. B. H., & Uğraşkan, V. (2017). Yeşil Polimerler ve Uygulamaları. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17(1), 318-337.

- Biyopolimer Bazlı Nanokompozit Filmler ve Su Ürünlerindeki Uygulamaları, D. & Oğur, S. (2009). *Antimikrobiyal Katkılı Yenilebilir Protein Filmlerin Dumanlanmış Balıkta Kalite ve Dayanım Ömrüne Etkisi View project Ekmek Zenginleştirmede Protein Kaynağı Olarak Balık Etinin Kullanımı View project*. <https://doi.org/10.3153/jfsc.com.201006>
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. & Fuller, R. C. (1991a). The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Archives of Microbiology*, *155*(4), 337-340. <https://doi.org/10.1007/BF00243452>
- Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., Lloyd, R. & Fuller, R. C. (1991b). The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*. *Archives of Microbiology*, *155*(4), 337-340. <https://doi.org/10.1007/BF00243452/METRICKS>
- Brown, B., Immethun, C., Alsiyabi, A., Long, D., Wilkins, M. & Saha, R. (2022). Heterologous phasin expression in *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 for bioplastic production from lignocellulosic biomass. *Metabolic Engineering Communications*, *14*, e00191. <https://doi.org/10.1016/J.MEC.2021.E00191>
- Brown, B., Immethun, C., Wilkins, M. & Saha, R. (2020). *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 polyhydroxybutyrate production from a lignin aromatic and quantification via flow cytometry. *Bioresource Technology Reports*, *11*(June), 100474. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100474>
- Charles, T. C., Cai, G. Q. & Aneja, P. (1997). Megaplasmid and Chromosomal Loci for the PHB Degradation Pathway in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Genetics*, *146*(4), 1211-1220. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/146.4.1211>
- Chen, D., Han, Y. & Gu, Z. (2006). Application of statistical methodology to the optimization of fermentative medium for carotenoids production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Process Biochemistry*, *41*(8), 1773-1778. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2006.03.023>
- Choi, S. Y., Rhie, M. N., Kim, H. T., Joo, J. C., Cho, I. J., Son, J., Jo, S. Y., Sohn, Y. J., Baritugo, K. A., Pyo, J., Lee, Y., Lee, S. Y. & Park, S. J. (2020). Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metabolic Engineering*, *58*, 47-81. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2019.05.009>
- Çelebi, M. (2021). Polymeric Nanoparticle Preparation Methods. *Synthetic Peptide Vaccine Models*, 82-93. <https://doi.org/10.1201/9781003144533-8>
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y. & Soga, K. (1987). Biosynthesis of Copolyesters in *Alcaligenes eutrophus* H16 from ¹³C-Labeled Acetate and Propionate. *Macromolecules*, *20*(12), 2988-2991. https://doi.org/10.1021/MA00178A006/ASSET/MA00178A006.FP.PNG_V03
- Dombayci, N., Lisans, Y., Fen, T., Enstitüsü, B., Anabilim, B., Eylül, D., Tez, B., Üniversitesi, Ç. A. & Fonunca, A. (t.y.). *RHİZOBİUM BAKTERİLERİ İLE POLİ-β-HİDROKSİBÜTİRİK ASİT ÜRETİMİ*. <https://doi.org/10.44>
- Duvigneau, S., Dürr, R., Carius, L. & Kienle, A. (2020). Hybrid cybernetic modeling of polyhydroxyalkanoate production in *Cupriavidus necator* using fructose and acetate as substrates. *IFAC-PapersOnLine*, *53*(2), 16872-16877. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2020.12.1211>

- Fiorese, M. L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A. M., De Aragão, G. M. F. & Reis, M. A. M. (2009). Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 454-461. <https://doi.org/10.1002/ELSC.200900034>
- Gosse, J. L., Engel, B. J., Hui, J. C. H., Harwood, C. S. & Flickinger, M. C. (2010). Progress toward a biomimetic leaf: 4,000 h of hydrogen production by coating-stabilized nongrowing photosynthetic *Rhodospseudomonas palustris*. *Biotechnology Progress*, 26(4), 907-918. <https://doi.org/10.1002/BTPR.406>
- Hatzakis, E. (2019). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(1), 189-220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>
- Juengert, J., Bresan, S. & Jendrossek, D. (2018). Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) Content in *Ralstonia eutropha* Using Gas Chromatography and Nile Red Staining. *Bio-protocol*, 8(5). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOC.2748>
- Jung, H. R., Choi, T. R., Han, Y. H., Park, Y. L., Park, J. Y., Song, H. S., Yang, S. Y., Bhatia, S. K., Gurav, R., Park, H. A., Namgung, S., Choi, K. Y. & Yang, Y. H. (2020). Production of blue-colored polyhydroxybutyrate (PHB) by one-pot production and coextraction of indigo and PHB from recombinant *Escherichia coli*. *Dyes and Pigments*, 173, 107889. <https://doi.org/10.1016/J.DYEPIG.2019.107889>
- Jung, Y. M., Park, J. S. & Lee, Y. H. (2000). Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phbCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 201-208. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00156-8)
- Kalia, V. C., Singh Patel, S. K., Shanmugam, R. & Lee, J. K. (2021). Polyhydroxyalkanoates: Trends and advances toward biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 326, 124737. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.124737>
- Kars, G. & Gündüz, U. (2010). Towards a super H₂ producer: Improvements in photofermentative biohydrogen production by genetic manipulations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(13), 6646-6656. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.037>
- Kars, G., Gündüz, U., Rakhely, G., Yücel, M., Eroğlu, I. & Kovacs, K. L. (2008). Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 3056-3060. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.01.037>
- Khanna, S. & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2004.01.053>
- Kim, B. S. (2000). Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(10), 774-777. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00299-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00299-4)
- Kim, M. S., Kim, D. H., Cha, J. & Lee, J. K. (2012). Effect of carbon and nitrogen sources on photo-fermentative H₂ production associated with nitrogenase, uptake hydrogenase activity, and PHB accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* KD131.

- Bioresource Technology*, 116, 179-183.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.04.011>
- Kim, M. S., Kim, D. H., Son, H. N., Ten, L. N. & Lee, J. K. (2011). Enhancing photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its PHB synthase deleted-mutant from acetate and butyrate. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13964-13971.
<https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2011.03.099>
- Kocharin, K., Chen, Y., Siewers, V. & Nielsen, J. (2012). Engineering of acetyl-CoA metabolism for the improved production of polyhydroxybutyrate in *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 2(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-52/FIGURES/5>
- Koku, H., Erolu, I., Gündüz, U., Yücel, M. & Türker, L. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1315-1329. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1)
- Kranz, R. G., Gabbert, K. K., Locke, T. A. & Madigan, M. T. (1997). Polyhydroxyalkanoate production in *Rhodobacter capsulatus*: genes, mutants, expression, and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3003-3009. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.8.3003-3009.1997>
- Krasil'nikova, E. N., Mil'ko, E. S., Keppen, O. I., Lebedeva, N. V. & Ivanovskii, R. N. (2015). Poly- β -hydroxybutyrate accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* phase variants. *Microbiology (Russian Federation)*, 84(3), 347-350.
<https://doi.org/10.1134/S002626171503011X>
- Kuenneth, C., Rajan, A. C., Tran, H., Chen, L., Kim, C. & Ramprasad, R. (2021). Polymer informatics with multi-task learning. *Patterns*, 2(4), 100238.
<https://doi.org/10.1016/J.PATTER.2021.100238>
- Kumari, P. & Dhingra, H. K. (2013). Isolation and Characterization of PHB Producing Micro-Organisms Isolated from Root Nodules of Leguminous Plants. *The Bioscan*, 8(1), 109-113. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.2054>
- Lee, J., Park, H. J., Moon, M., Lee, J. S. & Min, K. (2021). Recent progress and challenges in microbial polyhydroxybutyrate (PHB) production from CO₂ as a sustainable feedstock: A state-of-the-art review. *Bioresource Technology*, 339(June), 125616.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125616>
- Lee, Y. R., Nur Fitriana, H., Lee, S. Y., Kim, M. S., Moon, M., Lee, W. H., Lee, J. S. & Lee, S. (2020). Molecular profiling and optimization studies for growth and phb production conditions in *rhodobacter sphaeroides*. *Energies*, 13(23), 1-14.
<https://doi.org/10.3390/en13236471>
- Li, M. & Wilkins, M. (2020). Flow cytometry for quantitation of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using alkaline pretreated liquor from corn stover. *Bioresource technology*, 295. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.122254>
- Liu, J., Qiu, Z. & Jungnickel, B. J. (2005). Crystallization and morphology of poly(vinylidene fluoride)/poly(3-hydroxybutyrate) blends. III. Crystallization and phase diagram by differential scanning calorimetry. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 43(3), 287-295. <https://doi.org/10.1002/POLB.20274>

- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 251-260. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00040-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00040-7)
- Maciej Serda, Becker, F. G., Cleary, M., Team, R. M., Holtermann, H., The, D., Agenda, N., Science, P., Sk, S. K., Hinnebusch, R., Hinnebusch A, R., Rabinovich, I., Olmert, 2007. Türkiye'den PHB üreticisi halofilik bakterilerin izolasyonu. *Uniwersytet śląski*, 7(1), 343-354. <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Madison, L. L. & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21-53. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999/ASSET/7934B841-7AFA-46F9-9847-33D7DEB8DB19/ASSETS/GRAPHIC/MR0190002016.JPEG>
- Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T. & Doi, Y. (2002). A Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA. *Journal of Bacteriology*, 184(14), 3992. <https://doi.org/10.1128/JB.184.14.3992-4002.2002>
- Martino, L., Cruz, M. V., Scoma, A., Freitas, F., Bertin, L., Scandola, M. & Reis, M. A. M. (2014). Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil. *International journal of biological macromolecules*, 71, 117-123. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2014.04.016>
- McKinlay, J. B. & Harwood, C. S. (2010). Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), 11669-11675. https://doi.org/10.1073/PNAS.1006175107/SUPPL_FILE/ST07.DOC
- Mezzina, M. P. & Pettinari, M. J. (2016). Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(17), 5060-5067. <https://doi.org/10.1128/AEM.01161-16/ASSET/975C9F99-5278-4EE1-A425-C18CFA9EAD82/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991173490001.JPEG>
- Mogoşanu, G. D. & Grumezescu, A. M. (2014). Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 463(2), 127-136. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.12.015>
- Monroy, I. & Buitrón, G. (2020). Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. *Journal of Biotechnology*, 317(December 2019), 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.012>
- Montiel Corona, V., Le Borgne, S., Revah, S. & Morales, M. (2017). Effect of light-dark cycles on hydrogen and poly- β -hydroxybutyrate production by a photoheterotrophic culture and *Rhodobacter capsulatus* using a dark fermentation effluent as substrate. *Bioresource Technology*, 226, 238-246. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.12.021>
- Nilhan Kayaman Apohan, D. (T.Y.). *Tc Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Poli(A-Hidroksi Ester Üretan) Esaslı Biyobozunur Polimerlerin Sentezi Ve Karakterizasyonu Çiğdem Çiçek Yüksek Lisans Tezi Kimya Ana Bilimdalı Organik Kimya Programı.*
- Nygaard, D., Yashchuk, O., Nosedá, D. G., Araoz, B. & Hermida, É. B. (2021). Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate)

- (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose. *Heliyon*, 7(1). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05979>
- Özsoy, B. (2012). *Hydrogen and poly-beta hydroxy butyric acid production and expression analyses of related genes in rhodobacter capsulatus at different acetate concentrations*.
- Özsoy Demiriz, B., Kars, G., Yücel, M., Eroğlu, İ. & Gündüz, U. (2019). Hydrogen and poly- β -hydroxybutyric acid production at various acetate concentrations using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(32), 17269-17277. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2019.02.036>
- Panich, J., Fong, B. & Singer, S. W. (2021). Metabolic Engineering of *Cupriavidus necator* H16 for Sustainable Biofuels from CO₂. *Trends in Biotechnology*, 39(4), 412-424. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2021.01.001>
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. P. & Newman, D. K. (2007). Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189(17), 6372-6381. https://doi.org/10.1128/JB.00505-07/SUPPL_FILE/PRICE_WHELAN2007_JB00505_07_SUPP_TEXT.ZIP
- Ranaivoarisoa, T. O., Singh, R., Rengasamy, K., Guzman, M. S. & Bose, A. (2019). Towards sustainable bioplastic production using the photoautotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9-10), 1401-1417. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02165-7>
- Rao, M. G., Bharathi, P. & Akila, R. M. (2014). A COMPREHENSIVE REVIEW ON BIOPOLYMERS. *Sci. Revs. Chem. Commun*, 4(2), 61-68.
- Rehm, B. H. A., Antonio, R. V., Spiekermann, P., Amara, A. A. & Steinbüchel, A. (2002). Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1594(1), 178-190. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00299-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00299-0)
- Rehm, B. H. A. & Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1-3), 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00010-0)
- Sabancı, Ş., Allahverdiyev, S., Çabuk, A. & Gündüz, G. (2017). *Mikrokristalin Selüloz ve Odun Unu İlaveli Polihidroksibütirat (PHB) Kompozitlerinin Solvent Yöntemiyle Hazırlanması ve Karakterizasyonu Preparation and Characterization of Microcrystalline Cellulose and Wood Flour Added Polyhydroxybutyrate (PHB) Comp.* 19(1), 123-131. <https://doi.org/10.24011/barofd.295497>
- Sangkharak, K. & Prasertsan, P. (2007). Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *Journal of Biotechnology*, 132(3), 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.721>
- Sargsyan, H., Gabrielyan, L., Hakobyan, L. & Trchounian, A. (2015). Light–dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture. *International Journal of*

- Hydrogen Energy*, 40(11), 4084-4091.
<https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2015.01.163>
- Sert, M. (2022). *Diazotrofik Koşullarda Çoğaltılan Rhodobacter Sphaeroides O.U.001 ile Hidrojen Üretimi ie nifH Gen İfade Analizi.*
- Singh, A. V. (2011). Biopolymers in Drug Delivery: A Review. *Pharmacologyonline*, 1, 666-674.
- Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. *Biotechnology Advances*, 25(2), 148-175. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2006.11.007>
- Taidi, B., Anderson, A. J., Dawes, E. A. & Byrom, D. (1994). Effect of carbon source and concentration on the molecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(6), 786-790. <https://doi.org/10.1007/BF00173975/METRICS>
- Thapa, C., Shakya, P., Shrestha, R., Pal, S. & Manandhar, P. (2019). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. *Nepal Journal of Biotechnology*, 6(1), 62-68. <https://doi.org/10.3126/njb.v6i1.22339>
- Touloupakis, E., Poloniataki, E. G., Casciana, M., Ghanotakis, D. F. & Carlozzi, P. (2021). Poly- β -hydroxybutyrate production by *rhodospseudomonas* sp. Grown in semi-continuous mode in a 4 l photobioreactor. *Symmetry*, 13(9), 1-9. <https://doi.org/10.3390/sym13091609>
- Uzun, G. (2016). *Biyo partikül katkı PHB biyo kompozitlerinin bazı özelliklerinin belirlenmesi.*
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C. & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/S10482-006-9095-5>
- Wang, J., Guo, X., Li, L., Qiu, H., Zhang, Z., Wang, Y. & Sun, G. (2018). Application of the Fluorescent Dye BODIPY in the Study of Lipid Dynamics of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23071594>
- Welander, P. V., Hunter, R. C., Zhang, L., Sessions, A. L., Summons, R. E. & Newman, D. K. (2009). Hopanoids play a role in membrane integrity and pH homeostasis in *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1. *Journal of Bacteriology*, 191(19), 6145-6156. https://doi.org/10.1128/JB.00460-09/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL_MATERIAL460.DOC
- Wendlandt, K. D., Geyer, W., Mirschel, G. & Al-Haj Hemidi, F. (2005). Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *Journal of biotechnology*, 117(1), 119-129. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2005.01.007>
- Wieczorek, R., Pries, A., Steinbuchel, A. & Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes*

- eutrophus. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2425-2435. <https://doi.org/10.1128/JB.177.9.2425-2435.1995>
- Xu, A. L., Xia, J. L., Liu, K. K., Li, L., Yang, Y., Nie, Z. Y. & Qiu, G. Z. (2001). Expression Analysis of β - Ketothiolase and Acetoacetyl - CoA Reductase of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11(6), 1031-1037. <https://doi.org/10.4014/JMB.0906.06054>
- Xu, A., Lao, Y., Zhang, Q., Li, J. & Xia, J. (2010). Extraction and characterization of PHB from *Acidiphilium cryptum* DX1-1. *Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition*, 25(6), 938-943. <https://doi.org/10.1007/S11595-010-0124-X/METRICS>
- Yasin, A. R. & Al-Mayaly, I. K. (2020). Isolation and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from biopolymers waste in soil. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 928(6). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/928/6/062014>
- Ye, J. Y., Liu, T., Chen, Y., Liao, Q., Wang, Z. K. & Chen, G. C. (2013a). Effect of AI crude extract on PHB accumulation and hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(35), 15770-15776. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2013.03.141>
- Ye, J. Y., Liu, T., Chen, Y., Liao, Q., Wang, Z. K. & Chen, G. C. (2013b). Effect of AI crude extract on PHB accumulation and hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(38), 15770-15776. <https://doi.org/10.1016/J.IJHYDENE.2013.03.141>
- Yılmaz, M. & Beyatlı, Y. (t.y.). *Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB) 1*.
- Zuriani, R., Vigneswari, S., Azizan, M. N. M., Majid, M. I. A. & Amirul, A. A. (2013). A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), 472-478. <https://doi.org/10.1007/S12257-012-0607-Z/METRICS>