



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BESİYERİ TASARIMI İLE BAKTERİYEL
POLİHİDROKSİBÜTİRAT ÜRETİMİNİN
ARTTIRILMASI**

Tuğba BAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Nisan-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Tuğba BAŞ tarafından hazırlanan “Besiyeri Tasarımı ile Bakteriyel Polihidroksibütirat Üretiminin Arttırılması” adlı tez çalışması 18/04/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

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

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 23YL15005 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.

Tuğba BAŞ

Tarih: 18.04.2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BESİYERİ TASARIMI İLE BAKTERİYEL POLİHİDROKSİBÜTİRAT ÜRETİMİNİN ARTTIRILMASI

Tuğba BAŞ

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

Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS

2025, 119 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Gökhan KARS

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Dr. Öğr. Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Plastik ürünler günlük yaşamda yaygın olarak kullanılmakta ve ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Ancak petrol kökenli plastiklerin doğada parçalanmaması çevre için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenle doğada kolayca bozunabilen çevre dostu biyopolimerlere olan ihtiyaç artmıştır. Polihidroksibütirat (PHB), biyouyumlu, parçalanabilir ve yenilenebilir özellikleri sayesinde geleneksel plastiklere alternatif bir termoplastiktir. PHB birikimi, bakterilerde karbon kaynağının fazla, fakat azot, oksijen ve bazı minerallerin (P, S, Mg, K, Fe) sınırlı olduğu koşullarda artar. PHB biyosentezi, β -ketotiyolaz, asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sentaz enzimleri ile bu enzimleri kodlayan *phbA*, *phbB*, *phbC* genleri tarafından kontrol edilir. PHB sentezleyen başlıca bakteriler: *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Cereibacter*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* türleridir. Bu çalışmanın amacı, melas bazlı besiyerinde *Cereibacter sphaeroides* O.U. 001 (DSM5864), *Rhodopseudomonas palustris* 7850 (DSM 127) ve *Cupriavidus necator* HI6 (DSM 428) türlerinin yüksek biyokütle düzeylerine ulaşmasının ardından, azot açısından sınırlı ve 70 mM asetat içeren üretim ortamına aktarılmaları yoluyla PHB birikiminin maksimize edilmesidir. Bu doğrultuda *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator* melas ve 70 mM asetat ortamına aktarıldan sonra büyüme profilleri ve PHB üretim performansları incelendi. Melas ortamında *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da sırasıyla 4,28, 3,35, ve 3,27 maximum OD değerleri ve aynı sıra ile 8,05, 8,58 ve 8,37 maximum pH değerleri ölçüldü. Önce melas ortamında kültüre edip, sonra asetat ortamına aktarılan *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da sırasıyla 3,00, 2,94 ve 2,22 maximum OD değerleri ve aynı sıra ile 9,79, 9,87 ve 9,63 maximum pH değerleri ölçüldü. Sudan Black B ve Nile Red ile boyanan bakteriler sırasıyla ışık mikroskobu ve konfokal mikroskobu ile görüntüldü. PHB verimi incelendiğinde melas ortamında *C. sphaeroides* % 0,54, *R. palustris* % 0,29, *C. necator* % 0,23 verimlilikle PHB üretirken asetat ortamına aktarılan *C. sphaeroides* % 0,57, *R. palustris* % 0,56, *C. necator* % 0,45 verimlilikle PHB üretmiştir. Saflaştırılan PHB, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (H-NMR) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) teknikleriyle karakterize edildi. NMR pikleri 1,07-1,53, 2,40-2,85 ve 5,22-5,62 ppm aralığında kaydedildi. Fonksiyonel gruplar FTIR'da 1376-1379, 1452-1464, 2850-2921, 1647-1723, 1047-1056, 3282-3436 cm^{-1} dalga boylarında gözlemlendi. Sonuç olarak her bir bakterinin PHB veriminin besiyeri değişimi ile arttığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Asetat, *Cereibacter sphaeroides*, *Cupriavidus necator*, Melas, Polihidroksibütirat, *Rhodopseudomonas palustris*

ABSTRACT

MS THESIS

INCREASING THE PRODUCTION OF BACTERIAL POLYHYDROXYBUTYRATE WITH MEDIUM DESIGN

Tuğba BAŞ

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

2025, 119 Pages

Jury

Advisor Prof. Dr. Gökhan KARS

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Asst. Prof. Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Plastic products are widely used in daily life, and the demand for these materials continues to increase. However, the non-biodegradability of petroleum-based plastics poses a serious environmental threat. Consequently, there is a growing need for environmentally friendly biopolymers that can degrade easily in nature. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biocompatible, biodegradable, and renewable thermoplastic polymer, offering an alternative to conventional plastics. In bacteria, PHB accumulation is enhanced under conditions where carbon sources are abundant, but nitrogen, oxygen, and other essential minerals (P, S, Mg, K, Fe) are limited. PHB biosynthesis is regulated by the enzymes β -ketothiolase, acetoacetyl-CoA reductase, and PHB synthase, which are encoded by the genes *phbA*, *phbB*, and *phbC*, respectively. The primary PHB-producing bacteria include *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Cereibacter*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* species. The aim of this study was to cultivate *Cereibacter sphaeroides* O.U. 001 (DSM 5864), *Rhodopseudomonas palustris* 7850 (DSM 127), and *Cupriavidus necator* H16 (DSM 428) to high biomass levels in a molasses-based medium, followed by their transfer to a nitrogen-limited production medium containing 70 mM acetate to maximize PHB accumulation. Accordingly, the growth profiles and PHB production performances of *C. sphaeroides*, *R. palustris*, and *C. necator* were evaluated after their transfer from molasses to acetate-containing medium. In molasses medium, the maximum optical density (OD) values obtained for *C. sphaeroides*, *R. palustris*, and *C. necator* were 4.28, 3.35, and 3.27, respectively, while the corresponding maximum pH values were 8.05, 8.58, and 8.37. After transfer to the acetate medium, the maximum OD values were recorded as 3.00 for *C. sphaeroides*, 2.94 for *R. palustris*, and 2.22 for *C. necator*, with corresponding maximum pH values of 9.79, 9.87, and 9.63, respectively. Bacterial cells were stained with Sudan Black B and Nile Red and visualized using light microscopy and confocal microscopy, respectively. In terms of PHB yield, *C. sphaeroides*, *R. palustris*, and *C. necator* produced PHB with efficiencies of 0.54%, 0.29%, and 0.23%, respectively, in molasses medium, whereas in the acetate medium, the yields increased to 0.57%, 0.56%, and 0.45%, respectively. The purified PHB was characterized using nuclear magnetic resonance ($^1\text{H-NMR}$) and Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. NMR peaks were observed in the ranges of 1.07–1.53, 2.40–2.85, and 5.22–5.62 ppm, while FTIR spectra exhibited functional group signals at wavelengths of 1376–1379, 1452–1464, 2850–2921, 1647–1723, 1047–1056, and 3282–3436 cm^{-1} . In conclusion, it was determined that PHB yield increased in all strains upon transfer from molasses to acetate-based medium.

Keywords: Acetate, *Cereibacter sphaeroides*, *Cupriavidus necator*, Molasses, Polyhydroxybutyrate, *Rhodopseudomonas palustris*

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans sürecinde bilgi ve düşünceleriyle beni aydınlatan, araştırma esnasında yol gösteren, beni her zaman destekleyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Gökhan KARS'a, teşekkürlerimi sunarım. Tez savunma jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ ve Dr. Öğretim Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN'e değerli katkıları için teşekkür ederim.

Tez projemi destekleyerek araştırmalarım için maddi olanağı sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Her türlü yardımı çekinmeden gösteren, zor zamanlarımda yardıma koşan değerli laboratuvar arkadaşlarım Ayşenur ALTINKAYA, Ayşe Nur SERİN, Besna DALMIŞ, Beyza Nur SAYANER TAŞÇI, Innocent MANGA, Merve BAŞTUTAN, Sıdıka ŞENSÖZLÜLER'e teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, akademi hayalimi her daim destekleyen, sevgilerini, varlıklarını hep hissettiğim değerli ailem sizden aldığım güçle buralara gelmiş olmak kelimelerle anlatılamayacak kadar güzel. Başarılarıyla her daim beni gururlandıran canım ablam Dr. Fadimana Şahin ve kardeşim Murat Tanacı'ya her daim yanımda olduklarını hissettirdikleri için sonsuz teşekkür ederim. Her konuşmasında bana olan inancımı hissettiren, özellikle tez sürecinde motivasyonumu korumamda büyük katkısı olan bugünlere gelmeme sonsuz emek veren kıymetli annem Adife Kurt'a teşekkür etmek isterim.

Hayatıma girdiği günden beri yüzümü güldüren, tüm yorgunluğumu unutturan, kendimi bulmamı sağlayan, neşe kaynağım canım oğlum Alperen Baş'a minnettarım.

Tanıdığım günden beri hep güzellikler getiren, varlığıyla hayatı anlamlı kılan, her koşulda desteğini hissettiğim, zorlu tez yazım sürecinde bana güç veren değerli eşim İbrahim Baş'a; bana olan inancı, desteği ve vermiş olduğu cesaret, moral ve motivasyon için ne kadar teşekkür etsem az kalır.

Tuğba BAŞ
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Polimerler.....	4
2.2. Biyopolimerler	5
2.3. Polihidroksibütirat (PHB)	11
2.3.1. PHB'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri	11
2.3.2. PHB'nin Mikroorganizmalar Tarafından Biyosentezi.....	13
2.3.3. PHB'nin parçalanabilirliği.....	16
2.4. <i>Cereibacter sphaeroides</i>	19
2.4.1. <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'de PHB üretimi.....	21
2.5. <i>Cupriavidus necator</i>	22
2.5.1. <i>Cupriavidus necator</i> 'da PHB üretimi	23
2.6. <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	25
2.6.1. <i>Rhodopseudomonas palustris</i> 'te PHB üretimi.....	26
2.7. Melas.....	27
2.8. PHB Görüntüleme Yöntemleri	30
2.8.1. Sudan Black ile PHB granüllerinin boyanması	30
2.8.2. Nile Red ile PHB granüllerinin boyanması	31
2.9. PHB Ekstraksiyon Yöntemleri.....	32
2.9.1. Kloroform ile PHB ekstraksiyonu	33
2.9.2. Ultrasonik yöntemle PHB ekstraksiyonu.....	33
2.9.3. Yüksek basınçlı CO ₂ kullanarak PHB ekstraksiyonu	34
2.9.4. SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) sonikasyon ile PHB ekstraksiyonu	34
2.10. PHB Karakterizasyon Yöntemleri	35
2.10.1. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi.....	35
2.10.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	36
2.11. PHB Kullanım Alanları	37
2.11.1. Tıbbi kullanımı	37
2.11.2. Ziraatte kullanımı.....	39
2.11.3. Paketlemede ve tek kullanımlık malzemelerin yapımında kullanımı	40
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Bakteri Suşları.....	42
3.2. Ortam ve Kültür Koşulları	42
3.2.1. Melas besiyerinde bakterilerin büyütülmesi, OD ve pH analizi	42
3.2.2. Asetat besiyerinde bakterilerin büyütülmesi, OD ve pH analizi	44
3.3. Boyama ve Mikroskop ile Görüntüleme.....	45

3.3.1. Sudan Black B ile boyama.....	46
3.3.2. Nile Red ile boyama	46
3.4. Bakteri Kùltürlerinden PHB Ekstraksiyonu	47
3.5. PHB Verim Hesaplaması	48
3.6. PHB Polimerlerinin Karakterizasyonu	49
3.6.1. NMR ile PHB karakterizasyonu	49
3.6.2. FTIR ile PHB karakterizasyonu.....	49
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	50
4.1. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri	50
4.1.1. Büyüme eğrileri	50
4.1.2. pH Analizleri.....	54
4.3. PHB Ekstraksiyonu.....	65
4.4. PHB Polimerlerinin Karakterizasyonu	68
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	81
5.1. Sonuçlar	81
5.2. Öneriler	82
6. KAYNAKLAR	83
EKLER	103

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. Biyoplastiklerin radikal grupların değişmesiyle ortaya çıkan biyoplastik çeşitleri	7
Çizelge 2.2. PHB ve PP'nin kıyaslanması.....	13
Çizelge 2.3. PHB biyosentezinde yer alan genler	16
Çizelge 2.4. <i>C. sphaeroides</i> 'in taksonomik sınıflandırması.....	19
Çizelge 2.5. <i>C.necator</i> 'un taksonomik sınıflandırması	23
Çizelge 2.6. <i>R. palustris</i> 'in taksonomik sınıflandırması	25
Çizelge 2.7. Melasın genel kompozisyonu	28
Çizelge 2.8. PHB'nin medikal alanda uygulama örnekleri	39
Çizelge 3.1. Melas besiyeri içeriği (g/l)	42
Çizelge 3.2. Asetat besiyeri içeriği(g/l).....	44
Çizelge 4.1. Bakteriler tarafından üretilen % PHB verimi	66
Çizelge 4.2. Melas ortamında büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB 'nin ¹ H NMR zirveleri (ppm) ve karşılık gelen PHB yapısal grubu.....	71
Çizelge 4.3. Asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin ¹ H NMR zirveleri (ppm) ve karşılık gelen PHB yapısal grubu	73
Çizelge 4.4. Melas ortamında büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm ⁻¹).....	76
Çizelge 4.5 Asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm ⁻¹).....	80

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Monomer ve polimerin yapısı.....	4
Şekil 2.2. Plastik ‘Koordinat sistemi’	6
Şekil 2.3. 2023-2028 yılları arasında biyopolimerlerin küresel kapasiteleri	6
Şekil 2.4. Biyobozunur polimerlerin sentezlerine göre gruplandırılması.....	8
Şekil 2.5. PHA'nın beşikten beşiğe yaşam döngüsü	9
Şekil 2.6. PHA biriktiren <i>P. putida</i> KT2440'ın TEM görüntüsü	10
Şekil 2.7. PHA granül yapısının şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.8. PHB' nin kimyasal yapısı	13
Şekil 2.9. PHB biyosentezinin şematik gösterimi	15
Şekil 2.10. Biyopolimer kökenli plastiğin doğada kaybolma süreleri (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 haftalık).....	17
Şekil 2.11. Yabani tip <i>C. sphaeroides</i> 'in flagellar filamentlerinin elektron mikrografi Bar = 1 µm	20
Şekil 2.12. Biyoekonomi piramidi: <i>C. sphaeroides</i> tarafından üretilen bileşikler gösterilmektedir.	21
Şekil 2.13. <i>C. sphaeroides</i> ' te PHB biyosentez yolu	22
Şekil 2.14. <i>C. necator</i> ' e ait PHB biyosentez reaksiyonu.....	24
Şekil 2.15. PHB granülleri içeren <i>C. necator</i>	25
Şekil 2.16. <i>R. palustris</i> 'in mikroskopik görüntüsü	26
Şekil 2.17. <i>R. palustris</i> TIE-1'deki PHB döngüsü ve varsayılan genler.....	27
Şekil 2.18. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından hücre içinde depolanan PHB'nin mikroskop görüntüleri (a) <i>Bacillus sp.</i> (b) <i>Ralstonia eutropha</i> (c) mutant <i>Ralstonia eutropha</i>	30
Şekil 2.19. Sudan Black B formülü	31
Şekil 2.20. <i>Bacillus thuringiensis</i> B417-5'deki PHB granüllerinin SBB ile görüntülenmesi.....	31
Şekil 2.21. Nile red formülü	32
Şekil 2.22. <i>R. palustris</i> 7850'deki PHB granüllerinin Nile red ile boyanmış floresans mikroskop görüntüsü	32
Şekil 2.23. PHB'nin FTIR spektrumu	36
Şekil 2.24. PHB'nin farklı alanlarda uygulama örnekleri	37
Şekil 2.25. PHB'nin çeşitli tıbbi uygulamaları (A) Tabakalar (B) İmplantlar (C) Tüpler (D) Damla şişesi (E) Ürolojik stentler (F) Vida	38
Şekil 2.26. Cove şirketi tarafından geliştirilen biyoçözünür şişe	41
Şekil 3.1. Melas besiyerinde bakterilerin büyütülmesi.....	44
Şekil 3.2. 3 bakterinin 1 mM NH ₄ Cl içeren 70 mM Asetat besiyerinde büyütülmesi ...	45
Şekil 3.3. PHB ekstraksiyon aşamaları.....	47
Şekil 4.1. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864)'in büyüme eğrisi (OD660 nm).....	50
Şekil 4.2. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın büyüme eğrisi (OD600 nm).....	51
Şekil 4.3. <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in büyüme eğrisi (OD660 nm)	51
Şekil 4.4. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864)'in büyüme eğrisi (OD660nm).....	52
Şekil 4.5. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın büyüme eğrisi (OD600nm).....	53
Şekil 4.6. <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in büyüme eğrisi (OD660nm)	53
Şekil 4.7. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864) pH değerleri.....	54
Şekil 4.8. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428) pH değerleri.....	55
Şekil 4.9. <i>R. palustris</i> (DSM 128) pH değerleri	55
Şekil 4.10. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864) 'in pH değerleri.....	56
Şekil 4.11. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428) pH değerleri.....	57

Şekil 4.12. <i>R. palustris</i> (DSM 128) pH değerleri	57
Şekil 4.13. Melas besiyerinde <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	58
Şekil 4.14. Melas besiyerinde <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	59
Şekil 4.15. Melas besiyerinde <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 100x görüntüsü.....	59
Şekil 4.16. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	60
Şekil 4.17. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	60
Şekil 4.18. Asetat besiyerine aktarılan <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 100x görüntüsü.....	61
Şekil 4.19. Melas besiyerinde <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü.....	62
Şekil 4.20. Melas besiyerinde <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü.....	62
Şekil 4.21. Melas besiyerinde <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü.....	63
Şekil 4.22. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü.....	63
Şekil 4.23. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü.....	64
Şekil 4.24. Asetat besiyerine aktarılan <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü.....	64
Şekil 4.25. Ekstrakte edilen saf PHB.....	65
Şekil 4.26. Farklı inkübasyon sürelerinde üretilen PHB miktarı.....	66
Şekil 4.27. Melas besiyerinde büyütülen <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864) 'in ürettiği PHB' nin ¹ H NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.28. Melas besiyerinde büyütülen <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB' nin ¹ H-NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.29. Melas besiyerinde büyütülen <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB'nin ¹ H-NMR spektrumu	70
Şekil 4.30. Standart ticari PHB ve melas besiyerinde büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin NMR spektrumunun karşılaştırılması.....	70
Şekil 4.31. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864) 'in ürettiği PHB' nin ¹ H NMR spektrumu.....	71
Şekil 4.32. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB' nin ¹ H-NMR spektrumu.....	72
Şekil 4.33. Asetat besiyerine aktarılan <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB'nin ¹ H-NMR spektrumu.....	72
Şekil 4.34. Standart ticari PHB ve asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin NMR spektrumunun karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.35. Melas besiyerinde büyütülen <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864) 'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm ⁻¹).....	74
Şekil 4.36. Melas besiyerinde büyütülen <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm ⁻¹).....	75
Şekil 4.37. Melas besiyerinde büyütülen <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm ⁻¹).....	75

Şekil 4.38. Standart ticari PHB ve melas besiyerinde büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}) karşılaştırması.....	76
Şekil 4.39. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864) 'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}).....	77
Şekil 4.40. Asetat besiyerine aktarılan <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}).....	78
Şekil 4.41. Asetat besiyerine aktarılan <i>R. palustris</i> (DSM 128)'in ürettiği PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}).....	78
Şekil 4.42. Standart ticari PHB ve asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}) karşılaştırması.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cm	Santimetre
°C	Derece
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
g	Gram
L	Litre
m	Metre
dk	Dakika
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
g/L	Gram/Litre
M	Molar
Mb/Mbp	Megabaz
nm	Nanometre
mbar	Milibar
MHz	Megahertz
Mpa	Megapascal
Gpa	Gigapascal
mM	Milimolar

Kısaltmalar

C	Karbon
C/N	Karbon/Azot
CDW	Hücre Kuru Ağırlığı
CO ₂	Karbon dioksit
H ₂ O	Su
CH ₄	Metan
FTIR	Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
OD	Optik Yoğunluk
PHA	Polihidroksialkonoat
PHB	Polihidroksibütirat
PP	Polipropilen
PE	Poliyeten
PLA	Polilaktik Asit
PET	Poliyeten Tereftalat
PS	Polistren
SSB	Sudan Black B
UV	Ultraviyole

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TCA	Tri Aarboksilik Asit Döngüsü
PHVB	Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)
PCL	Polikaprolakton
PEA	Poliesteramid
PBSA	Fenilbenzimidazol Sülfonik Asit
PBAT	Polibütilen Adipat Tereftalat

1. GİRİŞ

Petrol bazlı ürünlerden yapılan sentetik malzemeler olan geleneksel plastikler, dayanıklılıkları, çok yönlülükleri ve düşük üretim maliyetleri nedeniyle birçok endüstride sıklıkla kullanılmaktadır. Dünya çapında plastik atık üretimi önemli bir çevre sorunudur ve her yıl üretilen plastik atık miktarı şaşırtıcıdır (Aşkın Demir, 2023). Plastikler; inşaat, ambalaj, giyim, ulaşım ve diğer pek çok alanda kullanımlarıyla günlük hayatta geniş bir ilgi görmektedir. Bu nedenle geleneksel plastiklerin 1950'lerden bu yana dayanıklı özellikleri ve çeşitli sektörlerde uygunluğu sayesinde üretiminde önemli bir artış yaşanmıştır (Ülger, 2015). Günümüzde polimerler, ticari olarak kullanılmaktadır ve petrol, doğal gaz gibi tükenen doğal kaynakların % 5'inin kullanılmasıyla oluşturulmaktadır. Bu tür polimerlerin çoğunluğu çok dayanıklı bir yapıda olmasından dolayı, doğada uzun süre bozunmadan kalmakla birlikte atık sorunu yönünden risk oluşturmaktadır (Miller, 2013). Plastikler; furanlar, antimon trioksit, bisfenol A (BPA), poliflorlu bileşikler gibi insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri olan kanserojen bileşenlere sahiptir (Halden, 2010).

Plastiklere alternatif olarak ön plana çıkan biyoplastikler, doğada kolayca çözünebilir ve biyolojik kaynaklardan elde edilen doğal polimerlerdir. Özellikle sürdürülebilirlik çalışmalarında bitki artıkları gibi materyallerin biyoplastik üretiminde hammadde olarak kullanılabilmesi, bu malzemeleri doğa dostu olarak nitelendirmektedir. Günümüzde biyoplastikler plastik kirliliğini önleyebilecek olmalarından dolayı yenilikçi bir yaklaşım olarak araştırmacıların dikkatini çeken bir malzeme haline gelmiştir (Sağdıç, 2023). Biyoplastiklerin, çeşitli yenilenebilir biyolojik kaynaklardan yapılabildiği ve biyolojik olarak parçalanabilir, kompostlanabilir veya her ikisi de olabilen bir plastik türü olmaları (Endres, 2017) fosil yakıtlardan elde edilen geleneksel plastiklerin kullanımının azaltılmasına ve doğal kaynakların daha verimli bir şekilde kullanılmasına katkı sağlayabilmektedir (Sağdıç, 2023).

Polihidroksialkanoat (PHA), polihidroksibutirat (PHB) ve bunların türevleri, yaygın olarak üretilen mikrobiyal biyoplastiklerdir (Luengo vd., 2003). PHA fizyolojik olarak karbon ve enerji için hücre içi bir depolama malzemesi olarak hücre homeostazının korunmasında önemli bir role sahiptir. PHA birikimi, azot veya fosfor kaynağı eksikliği gibi dengesiz büyüme koşulları altında uyarılır. *Azotobacter*, *Bacillus*, *Methylobacteria*, *Pseudomonas* gibi birçok bakteri grubunun PHA'yı çeşitli oranlarda sentezledikleri bulunmuştur (Phanse vd., 2010). Bakterilerin çoğu, ağırlıkça yaklaşık %

30-50 kuru hücrede PHA biriktirirken, iyi bilinen PHA üreticisi *Cupriavidus necator* (*Ralstonia eutropha*), ağırlıkça % 90'ın üzerinde kuru hücrede PHA biriktirebilir (Tsuge vd., 2015).

PHB'yi ilk kez 1925 yılında izole ve karakterize eden Fransız mikrobiyolog Maurice Lemoigne'dir (Prieto, 2007). PHB; çeşitli gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar tarafından nitrojen, fosfat, azot, oksijen, demir, magnezyum gibi elementlerin eksikliğinde ve karbon kaynağının fazla olduğu dengesiz büyüme koşulları altında hücre içinde granüller halinde biriktirilir ve hücresel kuru ağırlığın %90'ına kadar çıkabilir (Yousuf, 2018). PHB sert, kırılabilir ve oldukça kristalli olduğu için, endüstriyel uygulamaların kapsamını sınırlayan, oldukça zayıf mekanik özelliklere sahiptir. Şimdiye kadar, ticari plastiklere kıyasla daha yüksek üretim maliyeti ve yüksek kırılabilirlik sebebiyle PHB ürünlerinin önemli bir ticari sentezi yoktur (Batcha vd., 2014). PHB biyoyoumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik açısından çevre dostudur (Koller, 2018). PHB, çeşitli aerobik ve anaerobik mikroorganizmalar tarafından bozunma avantajı ile bakteri ve bitkiler gibi yenilenebilir ve sürdürülebilir kaynaklardan üretilbildiği için umut verici bir polimer olarak kabul edilmektedir (Domínguez-Díaz vd., 2015).

PHB, ambalaj, tek kullanımlık çatal, bıçak ve biyoplastik torba yapımı gibi birçok sektörde kolaylıkla kullanılabilmesi gibi biyomedikal ihtiyaçlar için de kullanılabilir (Bellini vd., 2022). PHB biyomedikal alanında kontrollü ilaç salımı için kullanılabilir (Rezaei vd., 2016). PHB'nin biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliğine ek olarak son derece biyoyoumlu olması ve memelilere toksik olmaması sayesinde doku mühendisliğinde cerrahi implantlar, yara pansumanları, biyolojik olarak parçalanabilen vida ve zimbalar için biyomateryal olarak kullanılabilir (Pleissner vd., 2014).

Melas hem düşük maliyetli PHB üretimi için faydalanılan bir karbon kaynağı hem de ihtiva ettiği mineral ve vitaminlerle büyüme faktörü kaynağıdır (Gouda vd., 2001). % 4-11 arasında inorganik bileşikler (demir sülfat, sodyum klorür, potasyum, magnezyum, fosfat ve kalsiyum) bulunmaktadır. Potasyum oranı yüksek olan şeker pancarı melasında B grubu vitaminler de yer almaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Ediz ve Beyatlı, 2005). Melasta, fazla miktarda fermente edilebilir şeker bulunduğu için birçok endüstriyel ürünün fermantasyon ile üretilmesinde hammadde olarak kullanılmaktadır (Ergene, 2015; Srikanth vd., 2014). Bu özelliği sayesinde; biyopolimer, pigment, biyohidrojen, enzim, aminoasit, etanol, polihidroksialkonat,

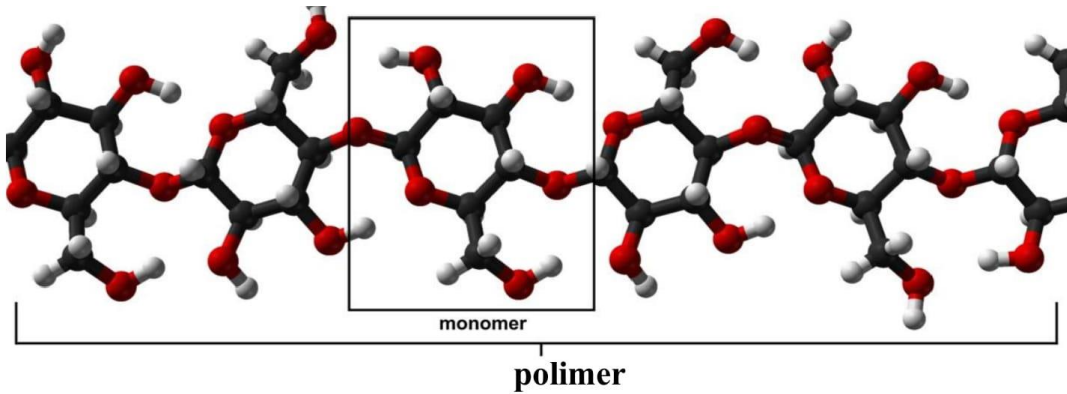
bütanol ve organik asit üretiminde düşük fiyatlı substrat olarak kullanılmaktadır (Shen vd., 2015; Hsu vd., 2014; Srikanth vd., 2014; Nakata vd., 2014; Ergene, 2015).

Bu çalışmanın amacı melas besiyerinde *Cereibacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Cupriavidus necator*'u yüksek biyokütlelere ulaştırıp azot limitasyonu ile hazırlanan 70 mM asetat besiyerine aktarıp yüksek PHB üretimini sağlamaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Polimerler

Polimer sözcüğü latince parça anlamına gelen meros ve çok anlamına gelen polis sözcüklerinden türemiş olup; yapı olarak büyük, aynı veya benzer molekül gruplarını içeren, uzun ve tekrarlayan makro molekül zincirlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Monomer adı verilen ve çok sayıdaki küçük molekül arasındaki kovalent bağların birbirleri ile bağlanması sonucu oluşan polimerler, yüzlerce veya binlerce monomer molekülünden meydana geldiği için yüksek molekül ağırlıkları olan makromoleküller olarak bilinmektedir (Oğian, 2004). Monomer ve polimerlerin düz yapı görünümü Şekil 2. 1' de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Monomer ve polimerin yapısı (Vadivelu vd., 2016)

Günümüzde polimerler, ticari olarak kullanılmaktadır ve petrol, doğal gaz gibi tükenen doğal kaynakların % 5'inin kullanılmasıyla oluşturulmaktadır. Bu tür polimerlerin çoğunluğu çok dayanıklı bir yapıda olmasından dolayı, doğada uzun süre bozunmadan kalmakla birlikte atık sorunu yönünden risk oluşturmaktadır (Miller, 2013). Plastikler; furanlar, antimon trioksit, BPA, poliflorlu bileşikler gibi insan ve çevre sağlığına olumsuz etkileri olan kanserojen bileşenlere sahiptir (Halden, 2010).

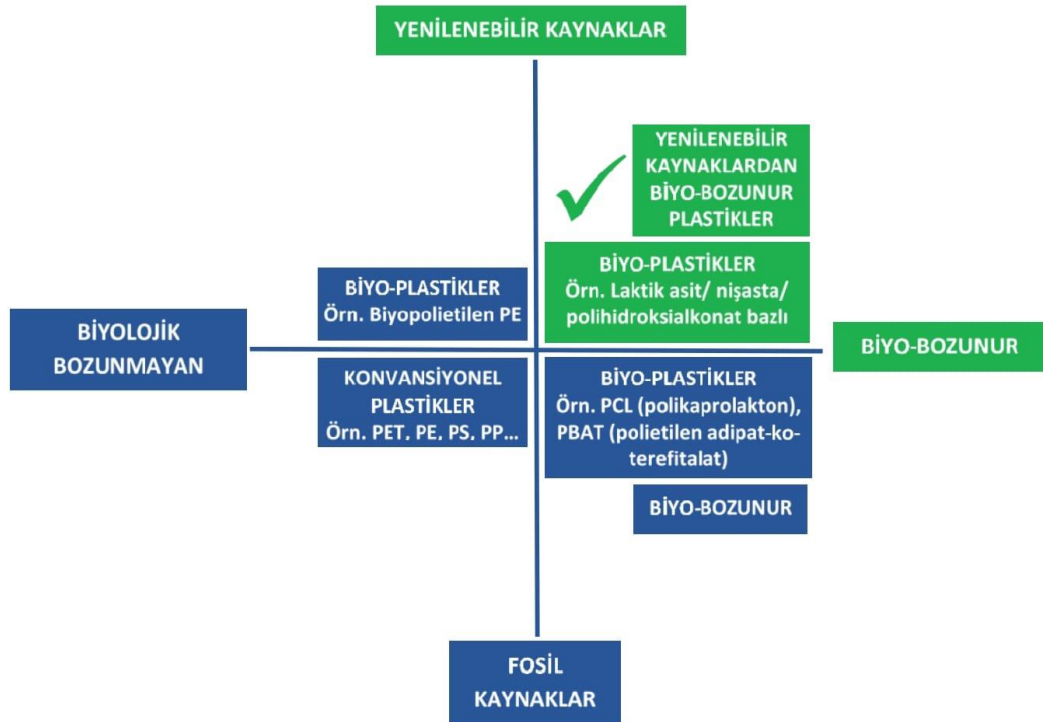
Artan dünya nüfusu ve modern hayat sebebiyle plastik malzemelere olan istek gitgide artmakla birlikte, dünya genelinde 2018 yılında ortalama 359 milyon ton olan plastik malzeme miktarının, gelecek 20 yılda 2 kat artması ön görülmektedir (Narancic vd., 2020). Ek olarak, plastik ve plastik kökenli malzemelerin atıkları önemli çevre problemlerine yol açmaktadır. Okyanuslara her yıl ortalama 10 milyon ton sentetik

plastığın karıştığı ve okyanus sistemine zarar verdiği tahmin edilmektedir (Billard vd., 2019).

Geleneksel plastikler, çoğunlukla petrol olmak üzere yenilenemeyen kaynaklardan yapılan sentetik karbon bazlı polimerlerdir. Nispeten düşük maliyetleri, üretim kolaylıkları ve esneklikleri nedeniyle plastiklere olan talep sürekli artmaktadır. Ancak insan yapımı olan plastikler mikroorganizmalar tarafından tanınmaz (Wolchover, 2011). Dolayısıyla bozunmaları çok uzun sürer; yani bir plastik şişenin bozunması ortalama 450 yıl sürmektedir (LeBlanc, 2017). Ayrıca, yüksek geri dönüşüm maliyeti nedeniyle, plastikler nadiren geri dönüştürülür ve bu da çöplüklerin tıkanmasına neden olur. Bunların ve yakma sırasında karbon emisyonu gibi çeşitli sorunların ortadan kaldırılması için plastiğin biyolojik olarak parçalanması şarttır (Thapa vd., 2018). Son yıllarda, fosil yakıtlardan meydana getirilen sentetik plastiklerin yol açtığı toksik madde birikimi, çevre kirliliği ve yenilenemeyen bir kaynak olan fosil yakıtlardaki fiyat dalgalanmalarından dolayı ortaya çıkan ekonomik sorunları çözebilmek için petrol türevli plastiklerin yerine kullanılabilir biyobozunur alternatif malzemeleri araştırma ve geliştirme çalışmaları büyük önem kazanmıştır (Akdoğan, 2021).

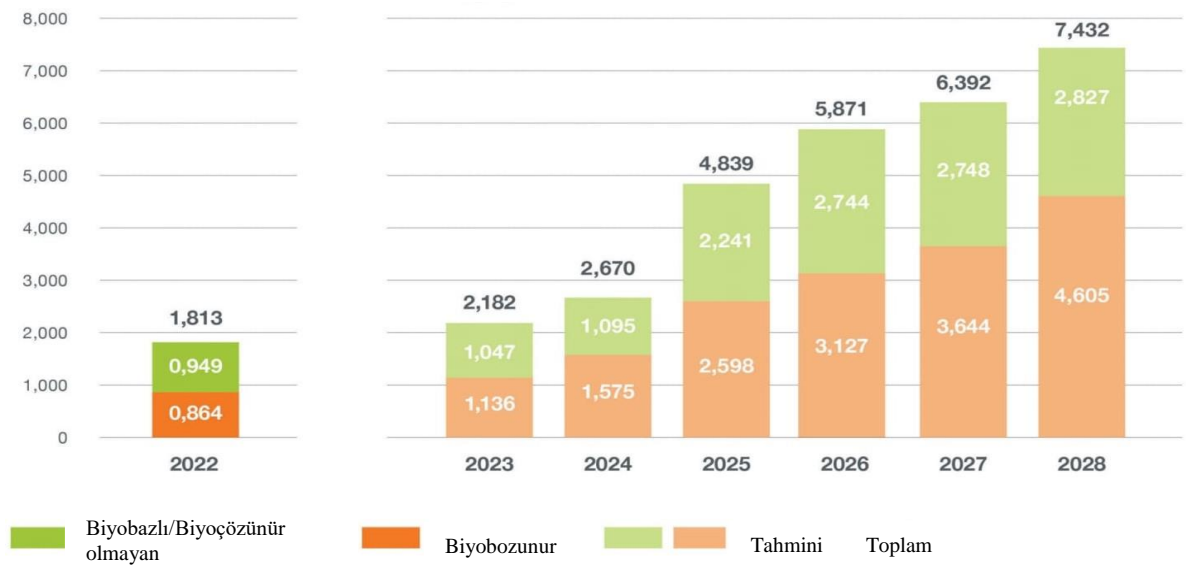
2.2. Biyopolimerler

Biyokütle tarafından doğal süreç içinde oluşturulan biyopolimerler, doğal ortamda var olan mikroorganizmalar ile parçalandığında, çevresel kirliliğe neden olmayacak şekilde bozunabilen ve bu sebeple yeşil malzeme olarak kabul edilen polimerler olarak tanımlanabilir (Hazar Yoruç ve Uğraşkan, 2017). Biyoplastikler; biyobozunur, biyobazlı veya hem biyobazlı hem biyobozunur plastikler olarak tanımlanmaktadır ve petrol kökenli plastikler gibi nitelikleri vardır. Ayrıca biyolojik kaynaklı üretim teknolojileri nedeniyle CO₂ emisyonlarının azalmasını kolaylaştırmaktadır (Sheldon ve Norton., 2020) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Plastik koordinat sistemi (Sprajcar vd., 2012)

Küresel biyopolimer üretim kapasitesi 2023'te yaklaşık 2,18 milyon ton iken 2028'de yaklaşık 7,43 milyon tona çıkması beklenmektedir (Bioplastics market Development Update 2023) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 2023-2028 yılları arasında biyopolimerlerin küresel kapasiteleri (<https://www.european-bioplastics.org/market/>)

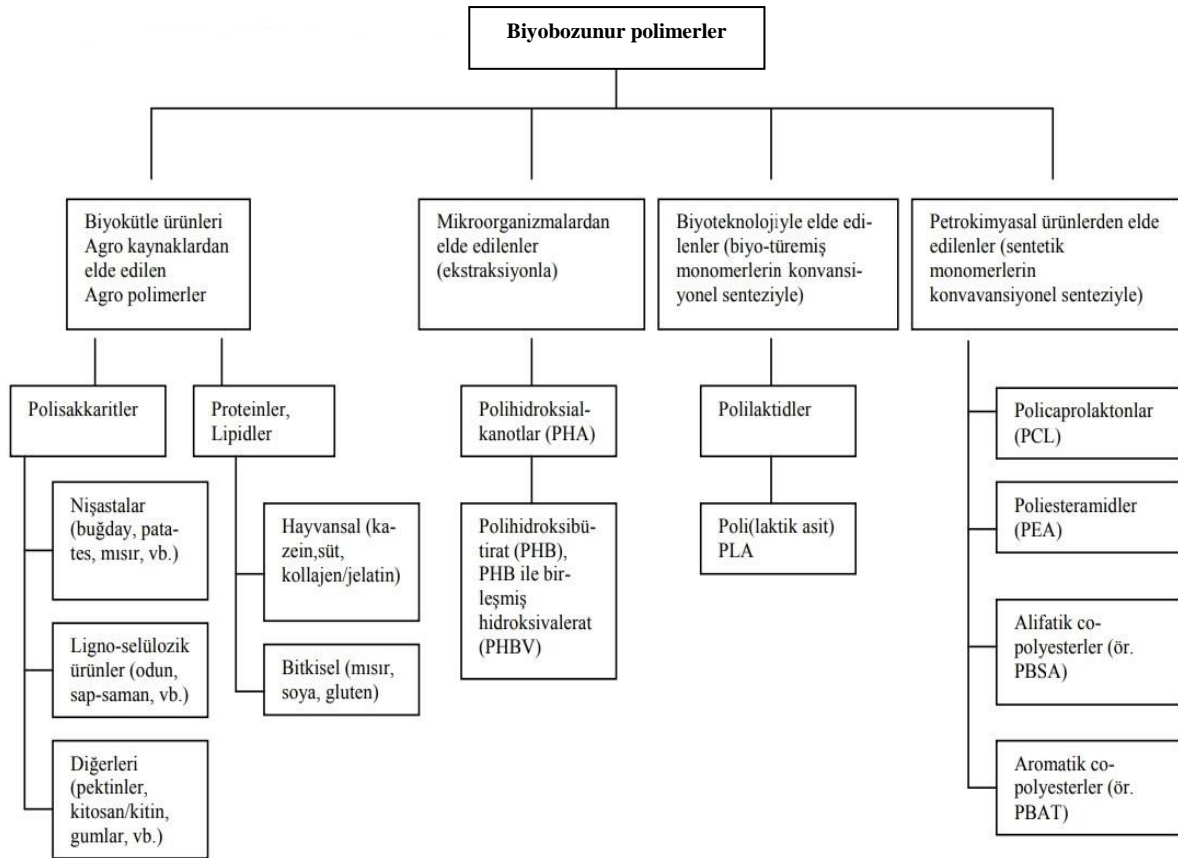
Biyoplastiklerin R (alkil grup) grubuna farklı monomerlerin bağlanması ile farklı fiziksel özelliklere sahip biyopolimerler üretilmektedir (Lee, 1996). Çizelge 2.1'de farklı monomer bağları ve oluşan biyoplastik türleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Biyoplastiklerin radikal grupların değişmesiyle ortaya çıkan biyoplastik çeşitleri (Lee, 1996)

R: (Alkali Grup)	Biyoplastik Türleri
Hidrojen	Poli- β -hidroksipropiyonat
Metil	Poli- β -hidroksibütirat
Etil	Poli- β -hidroksivalerat
Propil	Poli- β -hidroksiheksaonat
Pentil	Poli- β -hidroksioktanoat
Nonil	Poli- β -hidroksidodekanoat

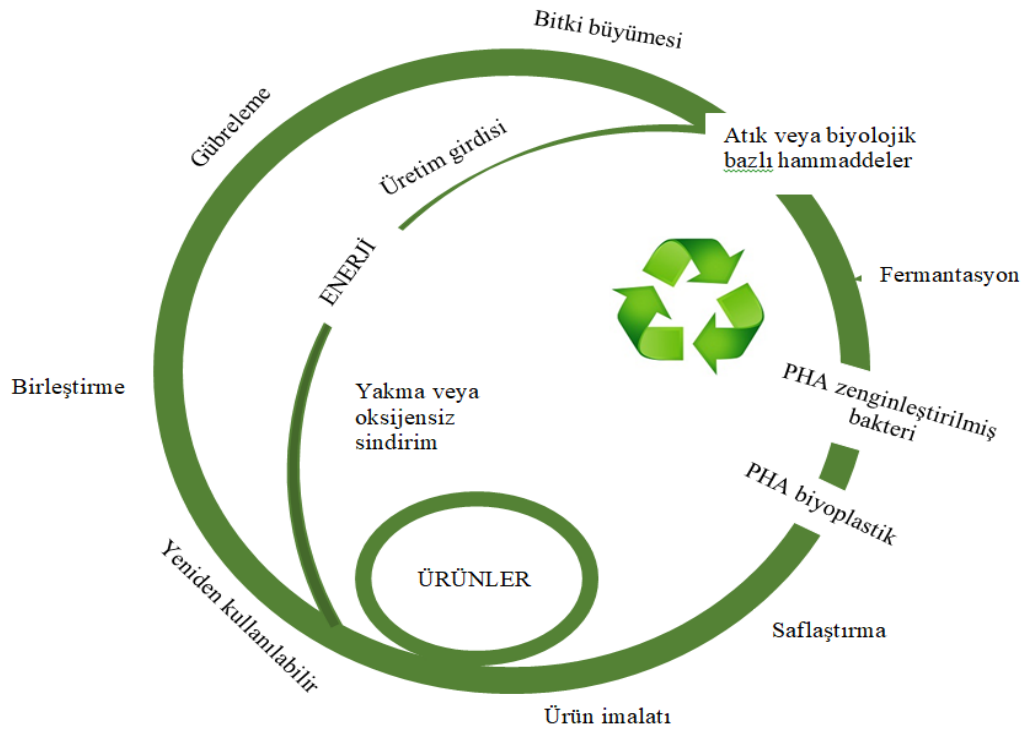
Şekil 2.4'te biyobozunur polimerlerin sentezlerine bağlı olarak 4 farklı kategoride sınıflandırması gösterilmektedir (Bordes vd., 2009):

- a) Tarımsal kaynaklardaki agro-polimerlere benzer şekilde biyokütleden meydana getirilen polimerler (Selüloz, nişasta gibi),
- b) Mikrobiyal üretim ile meydana getirilen polimerler (PHA gibi),
- c) Tarımsal kaynaklardan meydana getirilen monomerler ile kimyasal olarak oluşturulan polimerler (PLA gibi),
- d) Monomerleri ve polimerleri fosil kaynakların kimyasal senteziyle meydana getirilen polimerler (Poliesteramidler (PEA) gibi).



Şekil 2.4. Biyobozunur polimerlerin sentezlerine göre gruplandırılması (Bordes vd., 2009)

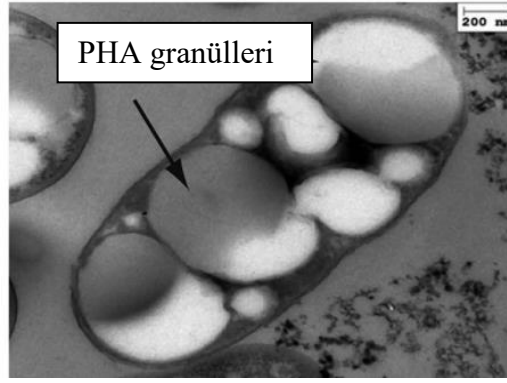
İlk olarak 1926'da Lemogine (Anderson ve Dawes., 1990) tarafından keşfedilen biyopolyester ailesinin bir üyesi olan PHA, birçok mikroorganizma tarafından doğal olarak sentetizlenebilmektedir (Tan vd., 2014). Günümüzde, 150'den fazla PHA çeşidinin bulunduğu tespit edilmiştir ve bu da PHA'ların en büyük doğal polyester grubu olduğunun göstergesidir (Kumar vd., 2009). Genelde aşırı karbon kaynağı varlığında, oksijen, azot ve fosfor gibi hücre artışı için sınırlayıcı beslenme şartlarında farklı mikroorganizmalar aracılığıyla üretilen PHA'lar, karbon ve enerji sağlamak için hücre içi depo görevi olan doğrusal polyesterlerdir (Jendrossek, 2009; Mitra vd., 2020). PHA, fosil yakıt kökenli geleneksel plastiklerin yerine geçebilecek alternatif maddelerden biri olup, mikrobiyal metabolik aktiviteler sonucu oluşan biyo bazlı bir polimerdir. PHA, beşikten beşiğe yani biyo bazlı biyobozunur yaşam döngüsüne sahip (Şekil 2.5), tamamıyla biyobozunabilen ve katkı maddesi olmadan %100 oranında yenilenebilir kaynaklardan üretilen bir biyopolimer olmakla birlikte, biyo-bozunur ve biyo-bazlı tek plastiktir (Akdoğan, 2021).



Şekil 2.5. PHA'nın beşikten beşiğe yaşam döngüsü (Akdoğan, 2021)

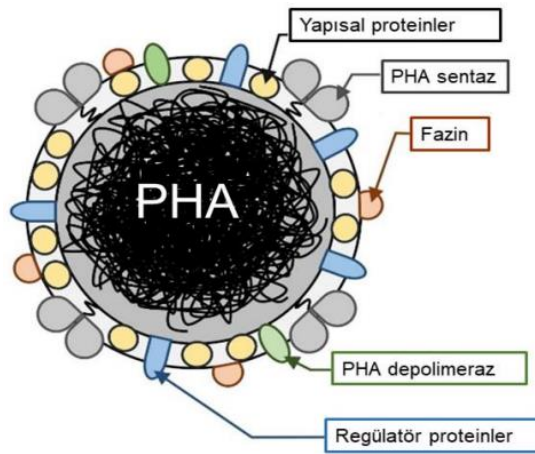
PHA'ların kimyasal, fiziksel ve termal özellikleri temelde molekül ağırlıkları ve monomerik bileşenlerin yapıları ile bağlantılıdır. PHA zincirinde, bir 3- hidroksi yağ asit monomerinin karboksil grubu ve diğer bir monomerin hidroksil grubu ester bağı oluşturur ve mikroorganizma türüne göre 50 kDa-1000 kDa arasında farklı molekül ağırlığı olan polimerler elde edilmektedir (Bera vd., 2015; Verlinden vd., 2007).

PHA, fizyolojik ve taksonomik olarak geniş bir aralıkta değişen bakteriler ile arkeler tarafından hücre içi yağ granülleri şeklinde depolanmaktadır (Muhammadi vd., 2015). Bu granüler parçacıklar; polyester, protein ve lipit içerir. Bu bileşimi ilk defa 1968'de Griebel, PHB granülleri için %97,7 polyester, %1,87 protein ve %0,46 lipit veya fosfolipitlerden oluşan *Bacillus megaterium* türünü araştırmıştır (Griebel vd., 1968). Şekil 2.6'da *P. putida* KT2440'da biriken PHA granülleri verilmektedir.



Şekil 2.6. PHA biriktiren *P. putida* KT2440'nin TEM görüntüsü (Martínez vd., 2016)

PHA granülleri, fazinler (*phaF* ve *phaP*), PHA sentaz (*phaC*), regülatör proteinler ve PHA depolimerazlar ile kaplı amorf olan hidrofobik PHA çekirdeğinden oluşmaktadır. Ortalama %2 protein, %98 PHA ve tek katmanlı fosfolipid tabakası ihtiva etmektedir (Şekil 2.7). (Parlane vd., 2016; Griebel vd., 1968). *PhaC*, granül oluşumunda kilit bir enzimdir ve hidroksi asil-KoA'nın asil grubunun yüksek molekül ağırlıklı PHA'ya polimerizasyonunu katalizlemektedir (Nambu vd., 2020).



Şekil 2.7. PHA granül yapısının şematik gösterimi (Wong vd., 2020)

Biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin veya biyoplastiklerin geliştirilmesi ve üretilmesine büyük ilgi gösterilmektedir. PHA'lar, toksik olmayan artık ürünlere sahip olmaları ve düşük çevresel kalıcılıkları nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Pachekoski vd., 2009). Karbon kaynaklarının çeşitlerine ve hücrede işleyen biyokimyasal yollara göre, mikroorganizmalar farklı PHA tiplerini sentezleme yeteneğine sahiptir. İlk tanımlanan PHA türü, PHB'dir ve doğada en sık bulunan PHA'dır. PHA'lar biyolojik olarak parçalanabilirlik, biyoyumluluk ve termoplastisite

gibi önemli özellikler sergilemekte ve bu sebeple tıbbi, tarımsal ve denizcilik uygulamaları için kullanılmaktadır (Ansari vd., 2014).

2.3. Polihidroksibütirat (PHB)

PHB, gram-pozitif bir bakteri cinsi olan *Bacillus megaterium*'da 1920'li yıllarda Fransız mikrobiyolog Lemoigne aracılığıyla keşfedilmiş olup bu zamana kadar değişik karbon atomu sayısına ve farklı türde yan grubu olan pek çok PHA türünden biridir (Prieto, 2007). Biyobozunur, termoplastik bir malzeme olan PHB'nin, petrol kökenli plastiklerin yerine geçmesi amacıyla ticaret amaçlı üretim denemeleri, 1960'larda başlasa da 1970'li yıllarda ilk endüstriyel üretimi gerçekleştirmiştir (Anderdson vd., 1990; Madison ve Huisman., 1999). BIOPOL adıyla, üretilen ilk ticari ürün patentlenmiştir (Yılmaz ve Beyatlı., 2003). Aynı yıllarda İngiltere'de Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) pek çok bakteri çeşidini, potansiyel PHB üretimi bakımından incelemiş ve hücre kuru ağırlığının %90'ı kadar PHB üretebilen *Alcaligenes eutrophus*'u endüstriyel üretimde kullanmaya başlamıştır (Madison ve Huisman., 1999). PHB'nin biyolojik bir ürün olarak önemi, biyobozunurluk, termoplastiklik (Pfüller, 1995), suda çözünmezlik ve geleneksel termoplastiklere benzer mekanik özellikleridir (Domínguez- Diaz vd., 2015).

2.3.1. PHB'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri

PHB, yüksek kristallik oranı olan, sert ve kırılğan bir malzemedir. İyi bariyer özelliklerine sahip, optikçe aktif ve piezoelektrik özellik sergileyen PHB, fiziksel ve mekanik nitelikleriyle izotaktik polipropilen (PP) ile kıyaslanmaktadır. PHB, hidrofobik özellikte olup doğada %100 oranında bozunabilmektedir (Ghaffar 2002). PHB; bakterilerde bitkilerdeki nişasta ya da insandaki yağ gibi görev almaktadır (Pool, 1989). PHB, redoks düzenleyicisidir (Anderdson vd., 1990; Madison ve Huisman., 1999; Findlay vd., 1983; Nickerson vd., 1981; Valentin vd., 1994).

PHB, biyolojik kökenli ve farklı bakteri türleri tarafından sentezlenebilen bir biyopolimerdir (Sangkharak ve Prasertsan, 2008). PHB, tamamen bakteriler tarafından sentezlenen tek biyoplastiktir (Hassan vd., 2016). PHB, petrol bazlı plastik yerine kullanılabilir, çünkü malzeme özellikleri sağlık veya çevre üzerinde herhangi bir etki yaratmamaktadır (Albureikan, 2019). PHB hidrolitik bozulmaya karşı nispeten dirençlidir. UV ışınlarına direnç göstermesine rağmen asit bazlara karşı direnç

göstermemektedir Kloroform ve diğer klorlanmış hidrokarbonlar içinde çözünmektedir (Kelleci, 2021).

PHB, amorf ve kristal fazlar içeren doğrusal zincir yapısından dolayı oldukça kristaldir (McAdam vd., 2020). Prokaryotik hücrelerde PHB, granül biçiminde sentezlenmekte ve depolanmaktadır. Yapı itibarıyla kısa zincirli 3-hidroksi yağ asitleri bulunan ve membranla kaplanmış hücre içi depo polimeridir ve tekrarlı hidrofobik parçalar içeren uzun zincirli bir polimer olan (Poirier, 2002) PHB'nin molekül ağırlığı 60.000 – 2.000.000 Da aralığında farklılık göstermektedir (Braunegg vd., 1998).

PHB suda çözünmez, hava ve su geçirmez özellikleriyle hidrolitik parçalanmalara dirençlidir (Lenz ve Marchessault 2005; Suriyamongkol vd., 2007; Seoane vd., 2015). Optikçe aktiflerdir (Batcha vd., 2014). Sentetik polimerlere göre erimiş hali daha yapışkan olup (Muhammadi vd., 2015) hücre içinde kristalize olmayarak amorf halinde bulunmaktadır (Laranja vd., 2017). Hücreden organik çözücülerle ayrıştırıldığında %60 civarında kristalize olur (Rebois vd., 2017). Erime sıcaklık derecesi 177-180°C'dir (Akaraonye vd., 2010; Muhammadi vd., 2015). Katı ancak kırılma yapısıdır. Kırılma uzama oranı yaklaşık %5 tir (Balaji vd., 2013; Singh vd., 2015). Yüksek oranda polimerizasyon özelliği vardır (Suriyamongkol vd., 2007). Termoplastik olduğu için kolayca preslenip şekillenmektedir (Sharmila vd., 2011).

Doğa dostu ve tamamen biyobozunur bir polimer olan ve petrol bazlı polimerlerin yerine gelecek vaat eden PHB'nin temel özellikleri şunlardır (Markl vd., 2018):

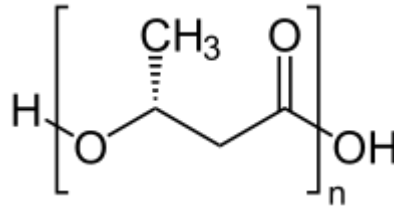
- ✓ Tamamen biyolojik olarak parçalanabilir
- ✓ Biyouyumlu
- ✓ Kısmen kristal (yüksek derecede kristallik)
- ✓ Yüksek erime sıcaklığı (yaklaşık 175 °C)
- ✓ 2-4 °C cam geçiş sıcaklığı
- ✓ Suda çözünmez ve hidrolitik bozunmaya nispeten dirençlidir
- ✓ O₂, H₂O ve CO₂ için düşük geçirgenlik
- ✓ Optik Aktivite
- ✓ Piezoelektrik
- ✓ İyi ultraviyole direnci
- ✓ Zehirsiz
- ✓ Çekme mukavemeti 40 Mpa

PHB, bazı petrol bazlı plastiklere benzer özelliklerinden dolayı bilim dünyasının ilgisini çekmektedir. Ortak özelliklerin çoğuna sahip oldukları için PHB ile plastik polipropilen karşılaştırılır. Çizelge 2.2’de görüldüğü gibi PHB, izotaktik PP’ye oldukça benzer fiziksel ve mekanik özelliklere sahiptir (Markl vd., 2018).

Çizelge 2.2. PHB ve PP’nin kıyaslanması (Markl vd., 2018)

Özellik	PHB	PP
Kristal erime noktası (°C)	175	176
Kristallik (%)	80	70
Moleküler ağırlık (Dalton)	5x10 ⁵	2x10 ⁵
Cam değişim ısısı(°C)	4	-10
Yoğunluk g/cm ³	1.25	0.90
Bükülme modülü (Gpa)	4.0	1.7
Gerilme direnci (Mpa)	40	38
Kırılma için uzatma (%)	6	400
Ultraviyole direni	İyi	Kötü
Solvent direnci	Kötü	İyi

PHB yapısında kısa zincirli β -hidroksi yağ asitleri içermekte ve tekrarlanan hidrofobik ünitelerinden oluşmaktadır (Anderson ve Dawes., 1990; Yılmaz vd., 2003). PHB’ nin genel formülü $(C_4H_6O_2)_n$ şeklindedir (Şekil 2.8). (n) sayısı 35000 gibi yüksek sayıya ulaşabilmektedir (Yılmaz vd., 2003).



Şekil 2.8. PHB ‘nin kimyasal yapısı (Yeo vd., 2018)

2.3.2. PHB’nin Mikroorganizmalar Tarafından Biyosentezi

Imperial Kimya Endüstrisi 1980’li yıllarda PHB üretimi için fermantasyon yöntemi geliştirmiştir (Türe, 2019). *Alcaligenes eutrophus*’un kullanıldığı bu fermantasyon yönteminde, PHB üretiminde en büyük değişken olan karbon kaynağı için glikoz ve propionik asit kullanılmıştır. Yapılan araştırmalar neticesinde, *A. eutrophus*’un hücre kuru ağırlığının yaklaşık %90’ı kadar PHB ürettiği görülmüş, bundan dolayı *A. eutrophus*’un endüstriyel alanda kullanılabileceği bildirilmiştir (Lee, 1996; Madison ve Huisman., 1999).

PHB, prokaryotik canlıların büyük bir bölümünün sentezleyebildiği bir polimerdir ve farklı bakteri türlerinde depolanabilmektedir. Örnek olarak toprak, deniz veya tatlı su ve bunların farklı tabakalarından izole edilen; fotosentetik anaerobik bakteriler, heterotrofik ve ototrofik aerobik ve çeşitli gram-pozitif veya gram-negatif bakteri türleri verilebilir (Poirier, 2002; Findlay vd., 1983).

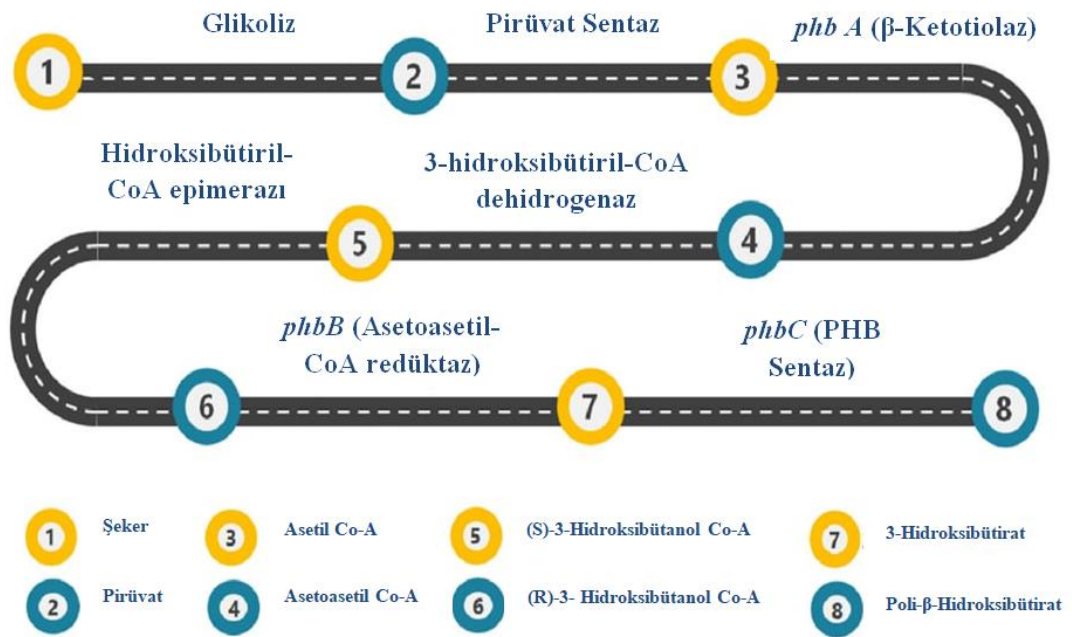
Çoğu organizmada PHA'lar, bol miktarda karbon kaynağı ve nitrojen (yüksek C/N oranları) ve fosfor gibi önemli besin maddelerinin sınırlandırıldığı koşullar altında birikmektedir (Füllöp vd., 2012). Büyümeye bağlı PHA birikimi örnekleri, *Alcaligenes latus* ve *Ralstonia eutropha H16* gibi bazı β -proteobakteri türlerinde de bilinmektedir. Ortamda aşırı miktarda karbon kaynağının olup nitrojen, oksijen ve diğer temel minerallerin (P, S, Mg, K, Fe vb.) kısıtlı olduğu durumlarda PHB birikiminin daha çok olduğu gözlemlenmiştir (McCool vd., 1996; Brandl vd., 1991). Ayrıca, *Alcaligenes latus* ve *Azotobacter vinelandi* gibi bazı bakteriler, besin eksikliği olmadığında bile PHB biriktirebilmektedir (Sharma ve Dhingra, 2016). PHB ve mikroorganizmaların büyüme evreleri arasında bir bağlantı olduğu rapor edilmiştir. Bakterilerin hızlı geliştikleri eksponansiyel faz sırasında PHB üretimi artarken durgunluk fazına yaklaşıldığında maksimum seviyede birikime ulaşılmaktadır (McCool vd., 1996). PHB birikiminin hücrelerin büyüme sırasında bölünme yaşamadığı şartlarda da olduğu rapor edilmiştir (Lee, 1996). Sporlu bakterilerin ise, sporlanma dönemlerinden hemen önce PHB birikimi yaptıkları ve bu biriktirilen PHB'nin spor üretimi esnasında enerji kaynağı olarak kullanıldığı bulunmuştur (Nickerson vd., 1981).

Hücrelerde PHB birikimi belirli şartlar altında gerçekleşmektedir; bu şartlar NAD(P)H ve asetil-CoA oranlarının artması ve serbest koenzim A miktarının düşmesidir. Bu şartların oluşması farklı bakteriler için değişiklik göstermekle birlikte, genellikle potasyum, nitrojen, sülfür veya oksijen gibi gerekli maddelerin kısıtlanmasıyla büyümenin engellendiği durumlarda gerçekleşmektedir (Braunegg vd., 1998). PHB polimeri, doğal bir biyopolimer olup, bakteriler tarafından depolanan bir enerji kaynağıdır. Bu polimerin biyosentezi, üç temel enzim tarafından katalizlenen 3 basamaklı reaksiyonla gerçekleşmektedir (Şekil 2.9). (Imandi vd., 2023).

1. Asetil-CoA'nın Kondensasyonu: *phbA* geni tarafından kodlanan β -ketoasil-CoA tiolaz enzimi sayesinde iki asetil-CoA molekülü bir araya gelerek asetoasetil-CoA molekülünü oluşturmaktadır.

2. Asetoasetil-CoA'nın Redüksiyonu: *phbB* geni tarafından kodlanan asetasetil-CoA dehidrojenaz enzimi sayesinde asetasetil-CoA, NADPH kullanarak (R)-3-hidroksibütiril-CoA'ya indirgenmektedir.

3. PHB Polimerizasyonu: *phbC* geni tarafından kodlanan PHB polimeraz enzimi ile (R)-3-hidroksibütiril-CoA molekülleri polimerize olarak PHB'yi oluşturmaktadır. Tüm bu genler arasında *phbC*, nihai konsantrasyondan sorumlu anahtar enzim olan PHB polimerazı kodladığı için PHB sentezi için en önemli gen olarak kabul edilmektedir ve PHB içeriği ve çoğunlukla PHB polimerazın aktivitesi ile ilgilidir (Kam, 2009).



Şekil 2.9. PHB biyosentezinin şematik gösterimi (Imandi vd., 2023)

PHB sentez yolu çok karmaşık bir süreç olup düzenlenmesi farklı çevresel, metabolik ve genetik sinyalleri içermektedir. NADH üretilmekte ve hücre büyümesi için kullanılmaktadır. Hücre büyümesi durduğunda, NADH konsantrasyonu artmakta ve bu da TCA (tri karboksilik asit) döngüsünün aktivitesinde bir azalmaya neden olmaktadır. Bu yüzden TCA döngüsü inhibe edildiği için asetil-CoA, PHB sentetik yolunu aktive etmektedir (Sharma ve Dhingra, 2016).

Besin sınırlaması, aseto-asetil CoA vermek üzere sitrat sentaz ve izo-sitrat dehidrojenazın baskılanması nedeniyle TCA döngüsünden iki asetil-CoA molekülünün yoğunlaşmasıyla başlatılan metabolik yolu aktive etmektedir. Daha sonra, aseto-asetil

CoA daha sonra aseto-asetil CoA redüktazın etkisiyle hidroksibütiril-CoA'ya indirgenir. Daha sonra, PHB, (R)-3-hidroksibütiril-CoA moleküllerinin PHB sentaz aracılığıyla polimerleştirilmesinden sentezlenmektedir (Sharma ve Dhingra, 2016).

Besin açısından zengin koşullarda, TCA döngüsünden yüksek miktarda koenzim A üretimi, β -ketotiyolaz inhibe ederek PHB sentezini bloke etmektedir. Asetil-CoA, enerji üretimi ve hücre büyümesi için TCA döngüsüne yönlendirilmektedir. Çizelge 2.3.'de, *phbA*, *phbB*, *phbC* olarak anılan PHA'nın biyosentezinde yer alan proteinleri kodlayan genler gösterilmektedir. PHB sentezinde *phbA*, *phbB* ve *phbC* tarafından kodlanan β -ketotiyolaz, redüktaz ve sentaz başlıca rol oynayan enzimlerdir (Sharma ve Dhingra, 2016).

Çizelge 2.3. PHB biyosentezinde yer alan genler (Sharma ve Dhingra, 2016)

Gen	Protein
<i>phbA</i>	β -ketotiyolaz
<i>phbB</i>	Asetil CoA redüktaz
<i>phbC</i>	PHB sentaz
<i>phbP</i>	Fazin
<i>phbZ</i>	PHB depolimeraz

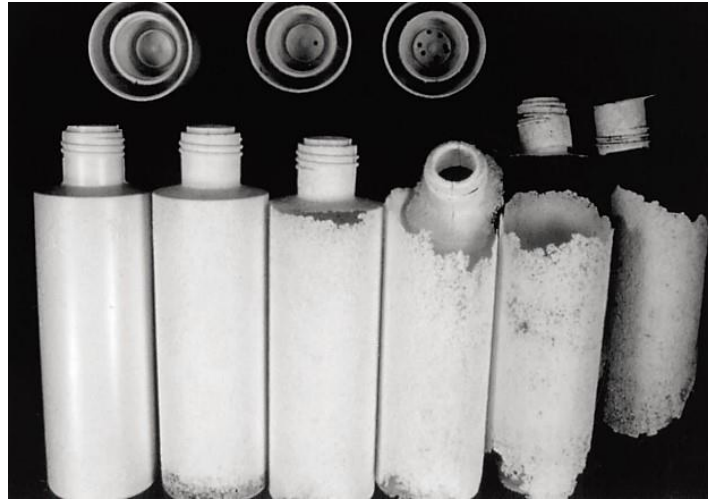
PHB sentezindeki görevli enzimler, çeşitli hücre içi koşullara uyum göstermek için PHB üretebilen farklı mikroorganizmaların geniş bir çeşitlilikte olmasını gerektirmektedir. Fakat PHB sentez reaksiyonu üzerinde yapılan biyokimyasal araştırmalar genel olarak *Alcaligenes eutrophus* ve *Zooglea ramigera* türlerinde yapılmıştır. PHB'nin ilk tanımlandığı ve izole edildiği *Bacillus megaterium* türünde ise biyosentez mekanizması tam anlamıyla incelenmemiştir (Madison ve Huisman., 1999).

2.3.3. PHB'nin parçalanabilirliği

İnsan bedeni ve toprak gibi sahalarda, toksik etkiye neden olmadan tamamıyla bozunabilmesi, PHB'nin en önemli özelliklerinin başında gösterilebilir (Braunegg vd., 1998). Petrol kökenli plastiklerden yapılan tek kullanımlık ürünler doğada 1000 yılda parçalanmadan kalırken biyopolimerler doğada kısa sürede parçalanmakta ve parçalanırken toksik salınım yapmamaktadır (Öztunç, 2022). PHB'nin en ilginç özelliklerinden biri de bozunmasıdır. Bir polimerin bozunması, büyük ve karmaşık olan bir molekülün daha küçük moleküllere kırılması şeklinde gerçekleşen bir süreç olarak

karakterize edilebilir. Normalde bozulma polimer zincirinin bölünmesi ve kristalin retikulumdaki yapının kırılmasıyla oluşup genel olarak polimerin işlevsellik kaybına yol açmaktadır (Cortés vd., 2008). PHB, petrol kökenli plastikler ve onun tehlikeli etkilerine çözüm olarak önerilmiştir. PHB'lerin bozunma süresi hem çevreye hem de polimerin bileşimine bağlıdır (Sharma ve Dhingra, 2016). Işık, hava, ısı ve nem gibi birçok çevresel faktör, PHB'nin bozunmasını etkilemektedir (Santos vd., 2017).

PHB, doğada biyolojik olarak kısa zamanda parçalanabilmektedir. PHB aerobik koşullarda CO₂ ve H₂O'ya, anaerobik koşullarda CO₂ ve CH₄'e kadar ayrışabilmektedir. (Altaee vd., 2016). PHB'den üretilen materyaller anaerobik ve aerobik ortamlarda kolay bir şekilde parçalanmaktadır (Braunegg vd., 1998; Lee, 1996). (Şekil 2.10). Parçalanma süresi anaerobik ortamda birkaç ay sürerken, deniz gibi tuzlu su ortamlarında birkaç yılda parçalanma gerçekleşebilmektedir. Mikrobiyal faaliyet, çevre ısısı ve biyopolimerin yüzey kalınlığı parçalanma sürecini etkilemektedir. Parçalanma süresine biyolojik faktörlere ek olarak fiziksel ve kimyasal faktörler de etki etmektedir. Fiziksel faktörleri güneş ışığı, ıslanma miktarı oluştururken; kimyasal faktörleri hidroliz ve oksidasyon hızı oluşturur (Madison ve Huisman., 1999).



Şekil 2.10. Biyopolimer kökenli plastiğin doğada kaybolma süreleri (0, 2, 4, 6, 8 ve 10 haftalık) (Madison ve Huisman.,1999)

PHB'nin biyolojik olarak parçalanması sürecinde, topraktaki birçok mikroorganizma rol oynamaktadır (Türe, 2019). Gram pozitif bakteriler, belirli gram negatif mikroorganizmalar, streptomisetler ve küf mantarları; toprak bünyesinde bulunan ve parçalama özellikleriyle öne çıkan mikroorganizmalara örnek olarak verilmektedir (Mergaert vd., 1993)

PHB'nin parçalanma zamanı ihtiva ettiği katkı maddelerinin seviyesine göre değişmekte olup bu zaman birkaç ay ıla yıla kadar sürebilmektedir. Parçalanma esnasında nitrojen oksidin oluşmaması, doğanın korunması için mühim bir faktördür. Bozunan biyoplastik, bitkilerin gelişmesine fayda sağlamaktadır (Chen vd., 1991; Madison ve Huisman, 1999).

Polimerin parçalanma sürecinde nem, mekanik aşınma ve güneş ışığı fiziksel etkenler olarak; mantarlar, bakteriler ve yüksek yapılı organizmalar, biyolojik etkenler; oksidasyon ve hidroliz kimyasal faktörler olarak direkt etkilidir (Madison ve Huisman, 1999). PHB, bakteri kaynaklı doğal bir malzemedir ve birçok mikroorganizma tarafından parçalanabilmektedir (Madison ve Huisman, 1999). Fermantatif yollarla PHB elde edilmesi, yağ asitleri ve şeker vb. tarımsal ürünlerin enerji, karbon kaynağı olarak faydalanılabilesine dayanmaktadır (Lee, 1996). Mikroorganizmalar tarafından PHB'nin parçalanması, hücre içi ve hücre dışı şeklinde 2 farklı biçimde gerçekleşmektedir (Volova vd., 2015). Üretici mikroorganizma tarafından gerçekleştirilen hücre içi parçalanmada mikroorganizma, hücre içerisinde depoladığı PHB granüllerini katabolize edip enerji ihtiyacını gidermek amacıyla parçalama işlemini yapmaktadır (Altaee vd., 2016). Hücre içi PHB depolimeraz enzimi, hücre içindeki PHB granüllerinin parçalanmasında gereksinim duyulur ve bu enzim ile, PHB granülleri hidrolize edilerek mikroorganizmanın enerji ihtiyacı karşılanmaktadır (Ong vd., 2017). Bu enzim suda çözünmeyen polimeri suda çözünen bir polimere hidrolize etmektedir. Polimerin kristalli bölgeleri su geçirmez olduğundan, bu bozunma türünde polimerin kristalliği belirleyici bir etkendir (Santos vd., 2017). PHB depolimeraz enzimleri hücre içi parçalama enzimi olup *Alcaligenes eutrophus* ve *Bacillus megaterium*'da gözlenmiştir. Hücre içi parçalama enzimleri hücre içinde hareketli ve kristalize olan PHB'yi parçalamaktadır (Lee Young vd., 1972). İlk olarak, mikroorganizmalar polimer yüzeyini kolonize etmektedir. Polimerlerin çoğu mikroorganizmaların hücre zarından geçemeyecek kadar büyük olduğu için, zincirler kırılmakta ve emilebilecekleri daha küçük bileşikler oluşmaktadır ki bu da polimerik zincirlerin hidroliz yoluyla daha küçük birimler halinde sindirilmesinden sorumlu hücre dışı enzimler tarafından yapılabilmektedir. PHB, hücre içinde asimile edildikten sonra, hücre içi enzimler PHB'yi metabolize edip onu bir besin ve karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. Bu bozulma (Santos vd., 2017);

- Polimer yapısında kayıp,
- Sayısal molar kütlede önemli bir azalma,

- Kimyasal yapı değişikliği,
- Mekanik deformasyon,
- Renk değişimi,
- Parçalanmaya neden olmaktadır.

Hücre dışı parçalanma üretici mikroorganizma yerine diğer mikroorganizmalar ile gerçekleştirilir (Altae vd., 2016). Diğer mikroorganizmalar tarafından, PHB depolamış mikroorganizmanın lizise uğramasından hemen sonra çevreye salınan PHB granüllerini kullanmak amacıyla hücre dışı PHB depolimeraz enzimi salınır ve bu sayede hücre dışındaki PHB, mineralizasyona geçirerek mikroorganizma aracılığıyla metabolize edilmektedir (Ong vd., 2017).

2.4. *Cereibacter sphaeroides*

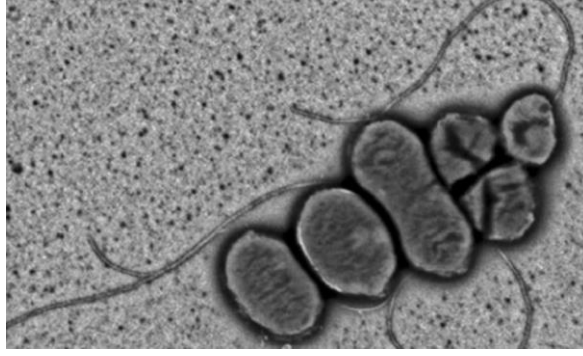
Mor kükürtsüz bakterilerden biri olan *C. Sphaeroides*, proteobakterilerin α -3 alt grubuna ait olup gram negatif fotosentetik bir bakteridir. Birçok farklı çevresel ve beslenme koşullarında büyüebilmektedir (Peuser vd., 2010). Çizelge 2.4’de bakterinin taksonomik sınıflandırması verilmiştir.

Çizelge 2.4. *C. sphaeroides*’in taksonomik sınıflandırması (<https://bacdive.dsmz.de/strain/13812>)

Alem	Bacteria
Şube	<i>Pseudomonadota</i>
Sınıf	<i>Alphaproteobacteria</i>
Takım	<i>Rhodobacterales</i>
Aile	<i>Paracoccaceae</i>
Cins	<i>Cereibacter</i>
Tür	<i>Cereibacter sphaeroides</i>

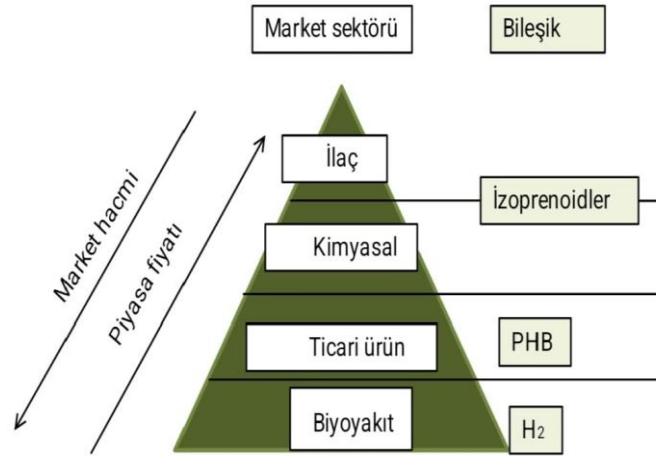
Organik bileşikler, fotoheterotrofik ve kemoheterotrofik büyüme için hem karbon kaynağı hem de indirgeyici olarak kullanılır (Mackenzie., 2007). *C. sphaeroides*’in şekli çubuk olmasına rağmen, aerobikten fotoheterotrofik büyümeye geçtiğinde kokobasil şekline geçmektedir (Slovak vd., 2005). *C. sphaeroides* zengin ikincil metabolitlere sahiptir. Metabolik olarak çok yönlü olmasından dolayı farklı ortamlarda yaşayabilmektedir ve morfolojileri yaşadıkları ortamlara göre kalp, oval ya

da kısa basiller şeklinde olabilmektedir (Pellerin ve Gest, 1983). Flagellaları sayesinde aktif hareket edebilmektedir (Şekil 2.11). pH, ışık yoğunluğu, oksijen ve çeşitli organik kimyasal konsantrasyonları dahil olmak üzere farklı uyaranlara tepki olarak hareket edebilmektedir (Berry ve Armitage, 2000). *C. sphaeroides*'in genomunda iki adet kromozoma (CI 2,9 Mb ve CII 0,9 Mb) ek beş tane ekstra kromozomal plazmit bulunmaktadır (Suwanto ve Kaplan, 1989). *C. sphaeroides*'in optimum büyüme pH aralığı 6-8 iken optimum büyüme sıcaklığı ise 28-30°C arasındadır (Kars ve Alparslan, 2013). Ortamda oksijen varlığına göre renk farklılığı göstermektedir; oksijensiz ortamlarda kahverengi, oksijenli ortamlarda ise pembe renge sahiptir (Krieg ve Holt, 1984).



Şekil 2.11. Yabani tip *C. sphaeroides*'in flagellar filamentlerinin elektron mikrografı. Bar = 1 µm (Fabela vd., 2013)

C. sphaeroides, izoprenoidler (Qianget vd., 2019; Zhang vd., 2018), PHB (Kobayashi ve Kondo, 2019) ve hidrojen (Akroum-Amroucheet vd., 2019; Shimizu vd., 2019) gibi biyo-bazlı bileşiklerin doğal bir üreticisidir (Şekil 2.12). Ayrıca bakteriyoklorofiller, B₁₂ vitamini, 5 aminolevülinik asit ve karotenoidler gibi değerli maddeler içermektedir (Park vd., 2012). Bu moleküller farklı pazar sektörlerine yayılarak bu mikroorganizmanın biyoteknoloji endüstrisi içinde farklı uygulamalarına izin vermektedir (Orsi vd., 2020).



Şekil 2.12. Biyoekonomi piramidi: *C. sphaeroides* tarafından üretilen bileşikler gösterilmektedir (Orsi vd., 2020)

2.4.1. *Cereibacter sphaeroides*'de PHB üretimi

PHB üretimi için çok uygun bir mikroorganizma olan *C. sphaeroides*, azot sınırlayıcı koşullar altında hücresel kuru ağırlığının %70'ine kadar PHB biriktirebilir (Brandl vd., 1991). Asetat, çeşitli karbon kaynakları arasında en yüksek PHB üretimini sağlamıştır (Sangkharak ve Prasertsan, 2008). *C. sphaeroides* hem fototrofik hem de kemolithotrofik koşullar altında büyür ve CO₂, süksinik asit ve asetik asit gibi çok çeşitli substratları kullanmaktadır (Brandl vd., 1991; Wang vd., 1993; Kim vd., 2012). Karanlık ortamda aerobik olarak büyüdüğünde yüksek miktarda PHB üretebilmektedir (Özsoy, 2012). *C. sphaeroides* suşları %60-80 oranında PHB üretebilmektedir. *C. sphaeroides*, hücre içi depolama malzemesi olarak yüksek karbon / düşük nitrojen oranında PHB biriktirmektedir. Özellikle karbon kaynağı olarak asetat varlığında hücre kuru ağırlığının %45'i kadar PHB üretebilmektedir (Kars ve Gündüz, 2010).

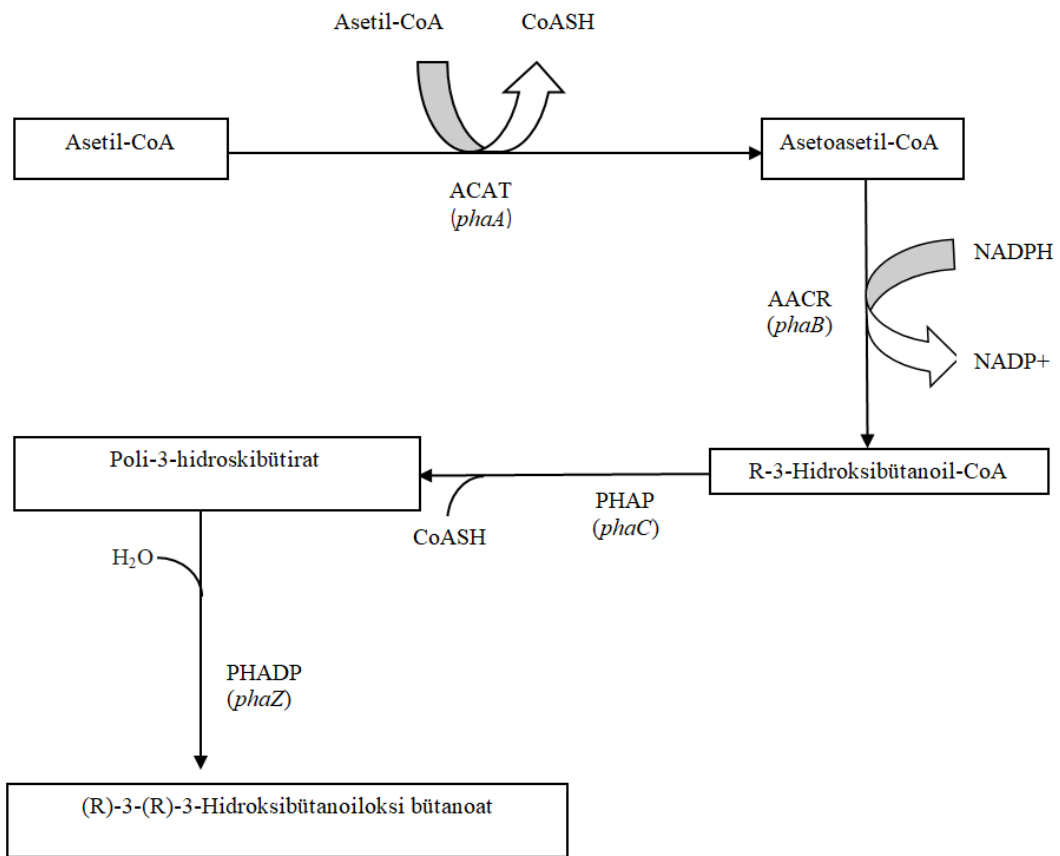
C. sphaeroides'te PHB, asetil koenzim A (asetil-CoA) adı verilen bir molekülden üç farklı enzimin katalitik reaksiyonları ile sentezlenmektedir (Şekil 2.13):

İlk olarak, *phaA* geni tarafından kodlanan asetil koenzim A asetiltransferaz enzimi (ACAT) bir asetil grubunu bir asetil-CoA molekülünden alarak diğer bir asetil-CoA molekülüne aktarmakta ve asetoasetil koenzim A (asetoasetil-CoA) ile koenzim A (CoA-SH) üretilmektedir.

İkinci olarak, *phaB* geni tarafından kodlanan asetoasetil koenzim A redüktaz enzimi (ACE) asetoasetil-CoA'nın asetoasetil grubunu indirgemekte ve nikotinamid

adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kofaktörü kullanarak (R)-3-hidroksibütanoil koenzim A ((R)-3-hidroksibütanoil-CoA) üretmektedir.

Son olarak, *phaC* geni tarafından kodlanan poli(3-hidroksialkanoat) polimeraz (PHAP), (R)-3-hidroksibütanoil-CoA moleküllerinden birkaç (R)-3-hidroksibütanoil grubu polimerize ederek PHB ve Koach üretmektedir. Sentezlenen PHB, gerektiğinde *phaZ* geni tarafından kodlanan poli (3-hidroksialkanoat) depolimeraz (PHADP) enzimi ile parçalanmakta ve karbon kaynağı olarak kullanılmaktadır (Kobayashi ve Kondo, 2019).



Şekil 2.13. *C. sphaeroides*'te PHB biyosentez yolu (Kobayashi ve Kondo, 2019)

2.5. *Cupriavidus necator*

Toprak bakterisi olan *C. necator* H16 (aynı zamanda *Ralstonia eutropha* H16 olarak da bilinir) yaklaşık 60 yıl önce topraklarda ve su ortamlarında fakültatif anaerobik koşullarda izole edilmiş gram negatif bir bakteridir. *C. necator* H16, β -

proteobacteria sınıfına ait olup enerji kaynağı olarak ya organik bileşikleri (heterotrofik olarak) ya da hidrojeni (ototrofik olarak) kullanabilmektedir. Karbon kaynağına bağlı olarak karışık beslenme koşullarında da büyüebilmektedir (Jajesniak vd., 2014). Heterotrofik büyüme, geniş bir karbon kaynağı yelpazesi kullanılarak gerçekleşir ve hatta kemolitotrofik büyüme durumunda bile CO₂ kullanılabilir (Sohn vd., 2021) *C. necator* H16 oksijen sınırlı veya anaerobik koşullarda büyüebilse de esas olarak aerobik koşullarda büyümektedir (Reinecke vd., 2009). Çizelge 2.5’de bakterinin taksonomik sınıflandırması verilmiştir.

Çizelge 2.5. *C. necator* ’un taksonomik sınıflandırması (<https://bacdive.dsmz.de/strain/2033>)

Alem	Bacteria
Şube	<i>Pseudomonadota</i>
Sınıf	<i>Betaproteobacteria</i>
Takım	<i>Burkholderiales</i>
Aile	<i>Burkholderiaceae</i>
Cins	<i>Cupriavidus</i>
Tür	<i>Cupriavidus necator</i>

2.5.1. *Cupriavidus necator* ’da PHB üretimi

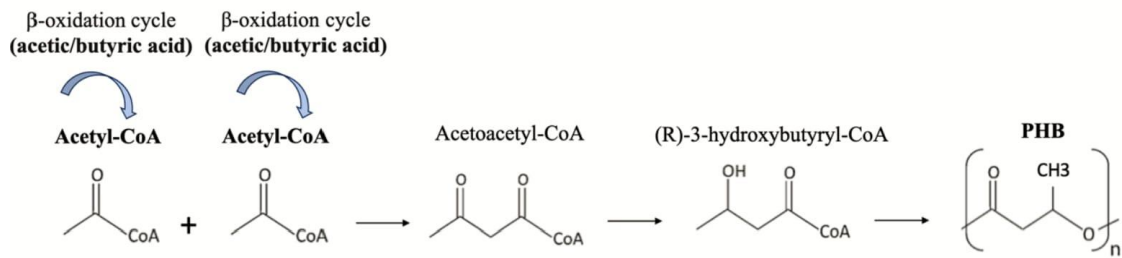
C. necator’un, PHB üretim kapasitesi hücre kuru ağırlıklarının yaklaşık % 80’i kadar olup PHB üzerine en fazla araştırma yapılan türlerdendir (Hao vd., 2017; Pradhan vd., 2017). *C. necator*’un PHB biyosentezi şekil 2.14’de gösterilmiş olup, 3 ana adımda gerçekleşmektedir:

- Asetil-CoA’nın kondenzasyonu: β -oksidasyonundan üretilen iki asetil-CoA molekülünden 3-ketotiolaz enzimi (*PhaA*) tarafından asetoasetil-CoA oluşmaktadır.
- Asetoasetil-CoA’nın redüksiyonu: asetoasetil-CoA redüktaz enzimi (*PhaB*) ile NADPH kullanılarak 3-hidroksibutiril-CoA’ya indirgenmektedir.
- Polimerizasyon: PHA sentaz enzimi (*PhaC*), oluşan 3-hidroksibutiril-CoA molekülünü mevcut bir polimer zincirine ekleyerek PHB polimerini uzatmaktadır (Szacherska vd., 2021). Bu üç adımda görev alan genler phaCAB operonunda bulunur. Bu operonun nükleotit dizisi ve fonksiyonu, PHB sentezleyebilen birçok

bakteri ailesinde oldukça korunmuştur (Peoples ve Sinskey, 1989a; Peoples ve Sinskey, 1989b). Bu operonda:

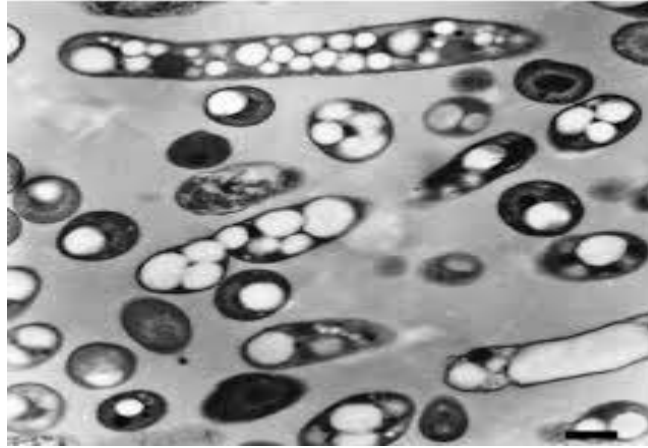
- *phaC*: PHA sentazını kodlamaktadır.
- *phaA*: β -ketotiolazı kodlamaktadır
- *phaB*: asetoasetil-CoA redüktazını kodlamaktadır.

Metabolik yola göre, asetil-CoA PHB sentezi için birincil metabolit olarak kabul edilir (Kessler ve Witholt., 2001). *phaCAB* operonu sürekli olarak ifade edilse de PHB sentezi enzimatik ve transkripsiyonel düzeyde düzenlenmektedir. Bu nedenle, besleme süreci gibi stratejiler öncü substratların oranını düzenlemek için kullanılmaktadır (Byrom, 1987; Jung vd., 2000).



Şekil 2.14. *C. necator*'e ait PHB biyosentez reaksiyonu (Szacherska vd., 2021)

C. necator, PHB gibi PHA'ların bir kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu biyoplastikler, hücre sitoplazmasından geri kazanıldıktan sonra (Aramvash vd., 2015) veya kurutulmuş biyokütle kullanılarak (Kunasundari vd., 2013) biyoplastik üretimi için kullanılabilir. PHB'ler ve *C. necator*'un kurutulmuş biyokütlesi, PHB'nin bakteriler tarafından B-hidroksibutirat'a parçalanmasına dayalı olarak antimikrobiyal, insektisidal ve antiviral aktiviteler için kullanılabilir (van Hung vd., 2019). *C. necator*; izopropanol, hidrokarbonlar, metil ketonlar, serbest yağ asitleri, alkanlar vb. gibi çeşitli bileşikler üretmek üzere genetik olarak modifiye edilmektedir (Marc vd., 2017). Şekil 2.15'de PHB granülleri içeren *C. necator* görülmektedir.



Şekil 2.15. PHB granülleri içeren *C. necator* (Panich vd., 2021)

2.6. *Rhodospseudomonas palustris*

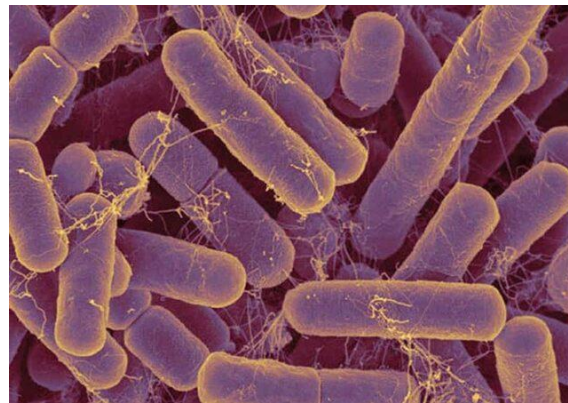
Rhodospseudomonas palustris, *Nitrobacteraceae* familyasından gram negatif bir bakteri cinsidir (Angra vd., 2023). *Rhodospseudomonas* hücreleri çubuk şeklindedir ve asimetric olarak bölünerek kutupsal olarak büyüme ve hareket etmek için flagella kullanmaktadır (Suwansaard, 2010). Oksijenli ve oksijensiz büyüebilmektedir. Organik veya inorganik bileşenleri enerji için kullanabilmektedir (Touloupakis vd., 2021). *R. palustris* fakültatif bir fototroftur. Havada yetiştirildiğinde beyaz renklidir ve aerobik solunum yaparak büyümektedir. Oksijensiz koşullara maruz kaldığında ise, gerçekleştirilmek zorunda olduğu oksijen üretmeyen bir fotosentez türü için ihtiyaç duyduğu ışık emici pigmentleri sentezlediği için koyu mor bir renk almaktadır (Harwood, 2022). (Şekil 2.16). *R. palustris* anaerobik koşullar altında laktat, asetat ve malat gibi organik asitleri enerji ve elektron kaynağı olarak kullanabilmektedir (Brown vd., 2020). *R. palustris*, doğada özellikle göller, topraklar, bataklıklar ve deniz gibi yeterli ışığa sahip anaerobik su ortamlarında yaygın olarak bulunmaktadır (Guan vd., 2017). Çizelge 2.6'da bakterinin taksonomik sınıflandırması verilmiştir.

Çizelge 2.6. *R. palustris* 'in taksonomik sınıflandırması (<https://bacdive.dsmz.de/strain/168493>)

Alem	Bacteria
Şube	<i>Pseudomonadota</i>
Sınıf	<i>Alphaproteobacteria</i>
Takım	<i>Hyphomicrobiales</i>
Aile	<i>Nitrobacteraceae</i>

Cins	<i>Rhodopseudomonas</i>
Tür	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>

R. palustris, birçok başka alanda uygulanma potansiyeline sahip, çok yönlü bir bakteridir (Patel vd., 2012). Atık su arıtımı (Kim vd., 2004), biyohidrojen üretimi (McKinlay vd., 2014), mikrobiyal yakıt hücreleri (Xing vd., 2008) ve elektrosentez (Bose vd., 2014) çalışmalarında kullanılmaktadır. Su ürünleri endüstrisi ve atık su arıtma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Peirong ve Wei, 2013). Azot fiksasyonu, hidrojen gazı üretimi, anaerobik aromatik biyolojik bozunma ve karmaşık hücre döngüsü, *R. palustris* fizyolojisinin diğer öne çıkan özellikleridir (Melton vd., 2014; Pechter vd., 2016). Foto-fermentasyon yoluyla veya foto-fermentasyon ve karanlık fermentasyonun tamamlanması yoluyla (Patel vd., 2012) hidrojen üretimi için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (McKinlay ve Harwood, 2010). Metan (Fixen vd., 2016) ve bütanol (Doud vd., 2017) gibi diğer biyo yakıt üretimi ve PHB (Wu vd., 2012), polisakkarit (Fritts vd., 2017) ve izoprenoid (Xu vd., 2016) gibi değerli kimyasalların üretimi, *R. palustris*'in biyopolimerler ve bunların yapı taşlarının üretimi için potansiyelini göstermektedir (Patel vd., 2012).



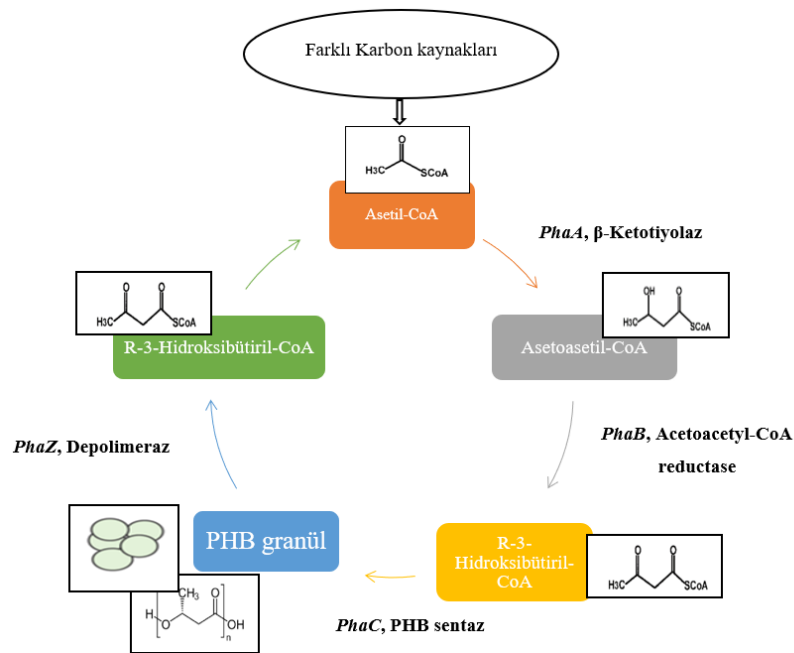
Şekil 2.16. *R. palustris*'in mikroskopik görüntüsü (Adams, 2021)

2.6.1. *Rhodopseudomonas palustris*'te PHB üretimi

Mor bakteri hücrelerinde, besin eksikliği PHB biriktirmek için potansiyel bir stres büyüme ortamı oluşmaktadır. *R. palustris* azotun az olduğu durumda önemli miktarda PHB biriktirmiştir (Carlozzi vd., 2019; Ranaivoarisoa vd., 2019). *R. palustris*'te PHB sentezi, asetat ve propiyonat tarafından tetiklenmektedir (Wu vd.,

2012). Asetat substrat olarak kullanıldığında, azot bileşiklerinin (amonyak) az olduğu durumlarda PHB üretimi için glioksilat yol kullanılır (McKinlay vd., 2014). *R. palustris*, PHB üretmek için lignin parçalanma ürünü olan p-kumaratı kullanabilmektedir (Brown vd., 2020; Al siyabi vd., 2021).

R. palustris'teki PHB üretimi genellikle β -ketotiyolaz enzimi (*PhaA*) tarafından iki tane Asetil-Coa'nın Asetoasetil-CoA'ya yoğunlaşmasıyla başlamaktadır. Daha sonra Asetoasetil-CoA redüktaz enzimi, (*phaB*), Asetoasetil-CoA'yı (R) -3-Hidroksibütiril-CoA'ya dönüştürmektedir. Sonrasında *phaC1* ve/veya *phaC2* (R)-3-hidroksibütiril-CoA'yı PHB granüllerine polimerize etmektedir. PHB, karbon depolama mobilizasyonu sırasında birkaç enzimatik işlemle (R)-3-hidroksibütiril-CoA'ya ve ardından asetil-CoA'ya geri indirgenmektedir (Şekil 2.17). (Ranaivoarisoa vd., 2019).



Şekil 2.17. *R. palustris* TIE-1'deki PHB döngüsü ve varsayılan genler (Ranaivoarisoa vd., 2019)

2.7. Melas

Şeker endüstrisinde pancardan şeker eldesi sırasında yan ürün olarak elde edilen, koyu kahverengi renkli, oldukça viskoz bir sıvı olan melas, yaklaşık % 50-55 oranında şeker içermektedir. Şeker içeren kısmında % 30-35 oranında sükröz, % 15-20 oranında glikoz ve fruktoz gibi fermente edilebilir indirgen şekerler bulunmaktadır. Pigmentler, aminoasitler, fenolik bileşenler, inorganik tuzlar (SO_4^{-2} , Ca^{+2} , Na^{+}), karamel

maddeleri, melanoidinler, melaninler gibi renk oluşturucu maddeler, kompleks polisakkaritler, karbonhidrat olmayan çeşitli bileşikler, malik asit, sitrik asit, propiyonik asit ve asetik asit içermektedir (Luo vd., 2018; Wright vd., 2014; Pattanakittivorakul vd., 2019). (izelge 2.7). % 4-11 aralığında demir sülfat, sodyum klorür, potasyum, magnezyum, fosfat, kalsiyum gibi organik olmayan bileşikler bulunmaktadır. Potasyum oranı yüksek olan şeker pancarı melasında B grubu vitaminler de yer almaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Ediz ve Beyatlı, 2005). şeker kamışı melası, bakteri hücrelerinin büyümesi için uygun olan demir, magnezyum, kalsiyum, potasyum ve B7 dahil vitaminlerin yanı sıra sükroz, glikoz, fruktoz içermektedir (Shasaltaneh vd., 2013). Melas bileşimi elde edildiği bitki kaynağına, mahsln yetiştirilme şekline, yetiştirildiği bölgedeki toprağın içerdiği besin maddelerine ve şekerin rafine edilme işlemine göre değişmektedir. Melasın zgl ısısı 0.5 cal/kg/°C'dir ve bu özgül ısı ve viskozitesi hem sıcaklığa hem de su içeriğine bağlıdır (Wright vd., 2014; Pattanakittivorakul vd., 2019). Betain ve glutamik asit, şeker pancarı melasındaki belirgin azotlu maddeler olup melasın kendine has koku ve lezzetinin oluşmasında rol oynamaktadır. Mikroorganizmalar melastaki azotun yalnızca % 40-60'ını harcayabildikleri için sıvı amonyak, amonyum tuzları veya üre besiyerine eklenerek azot zenginleştirmesi yapılabilmektedir (Katırcıoğlu ve Aksöz, 1996; Göksungur, 1998; Mercan, 2002).

Çizelge 2.7. Melasın genel kompozisyonu (Ertan, 2022)

Kompozisyon	% Aralık (w/w)
Sükroz	29-40
Su	17-25
Glikoz	4-14
Kl	7,15
Potasyum	4-50,83
Kalsiyum	0,8-15
Magnezyum	1-14
Sodyum	0,09-9
Protein	0,5-4,5
Sülfat	2,24-9,91
Aminoasit	0,3-1,5
Azotlu olmayan asitler	1,5-8
Vaks, steroller, fosfatidler	0,1-1
Biotin	0,1-2 ppm, 0,36mg/kg
Riboflavin	1-6 ppm, 1,8 mg/kg

Melas; maya, etanol, monosodyum glutamat, sitrik asit, endüstriyel enzimler ve başka birçok ürünlerin mikrobiyal üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ertan, 2022). Melas ile birçok mikroorganizma tarafından farklı biyosentetik yollardan aşağıdaki gibi katma değeri yüksek olan biyo-ürün ve endüstriyel enzimler üretilmektedir (Bajaj vd., 2014; de Morais vd., 2017; Wang vd., 2018; Zhang vd., 2018):

- Biyoetanol,
- Tek hücre yağı (SCO),
- Pullulan,
- Fruktooligosakkaritler (FOS),
- Bütirik asit (BA),
- Dokosaheksaenoik asit (DHA),
- Biosülfaktan,
- Biyopigment,
- Şeker alkollerini,
- PHA,
- Organik asitler,
- Polisakkarit,
- Lipaz ve proteaz

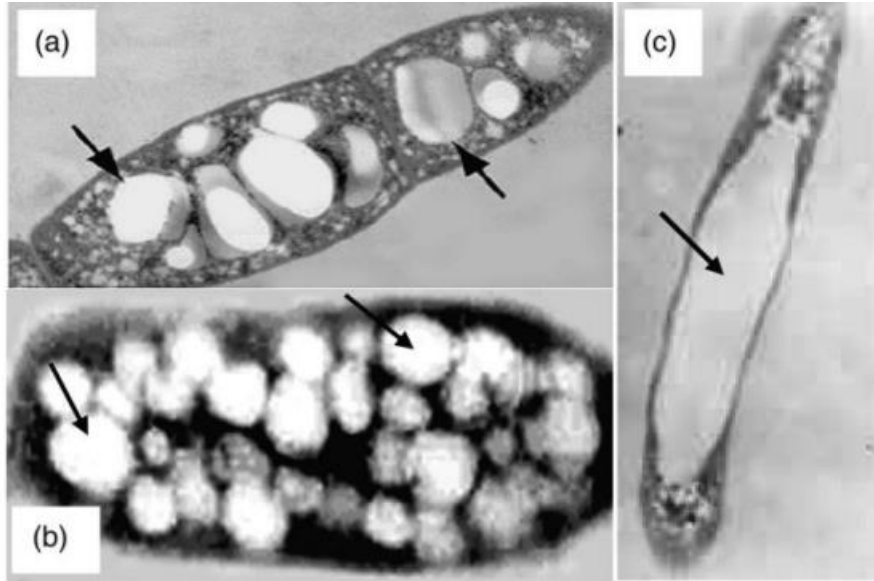
Tüm bu biyomalzeme ve enzimlerin gıda, biyoenerji, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde önemli uygulamaları bulunmaktadır (Ertan, 2022).

Geleneksel plastiklerin biyoplastiklerle değiştirilmesindeki en büyük zorluk biyoplastik üretimiyle ilgili maliyetlerdir. Maliyeti en aza indirmek için melas, peynir altı suyu, aktif çamur, nişasta gibi daha ucuz ortam alternatifleri önerilmektedir (Keshavarz ve Roy, 2010). Kullanılan pahalı hammaddelerin % 20-50 ürün fiyatına yansıdığı bilinmektedir. Yüksek maliyeti azaltmak amacıyla alternatif substrat kaynağı olarak doğal ürünler, endüstriyel ve tarımsal atıklar kullanılmaktadır (Sathiyanarayanan vd., 2013). PHB üretiminde karbon kaynağı olarak farklı birçok tarımsal atık kullanılmaktadır. Pancar melası, peynir altı suyu, hurma şurubu, şeker kamışı melası, soya, elma-kavun atığı, domates atığı, bezelye kabuğu, ksiloz ve atık sular bunlar arasında dikkat çeken kaynaklar olmuştur (Kumar vd., 2009; Chee vd., 2010). Melas, hem düşük maliyetli PHB üretiminde faydalanılabilen bir karbon kaynağıdır hem de

içerdiği vitamin ve mineral ile büyüme faktörü kaynağı olarak kullanılmaktadır (Gouda vd., 2001).

2.8. PHB Görüntüleme Yöntemleri

Bakteri içerisindeki PHB granülleri, yüksek oranda ışığı kırdığı için faz-kontrast mikroskobu ve elektron mikroskobuyla nitel olarak kolayca görülebilmektedir (Güngörmedi, 2012). Genellikle küre şeklinde olan PHB'nin her bir granül çapı 100-800 nm arasında farklılık sergilemektedir. Ek olarak bu granüller 2 ile 4 nm kalınlıktadır ve non üniter membranla kaplıdır. Granüller genel olarak % 98 oranında PHB, % 2 oranında ise protein barındırmaktadır (Türe, 2019). Şekil 2.18'de çeşitli mikroorganizmaların hücre içinde depo edilmiş PHB granülleri yer almaktadır. Sentezlediği mikroorganizmanın şekli, bölünmesi ve gelişim şartlarına göre hücre içinde depolanan PHB granüllerinin miktarı ve büyüklüğü değişiklik göstermektedir (Wu vd., 2016).

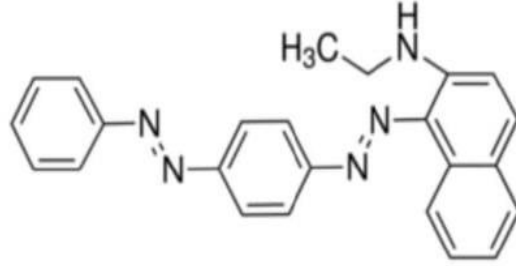


Şekil 2.18. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından hücre içinde depolanan PHB'nin mikroskop görüntüleri
(a) *Bacillus sp.* (b) *Ralstonia eutropha* (c) mutant *Ralstonia eutropha* (Muhammadi vd., 2015)

2.8.1. Sudan Black ile PHB granüllerinin boyanması

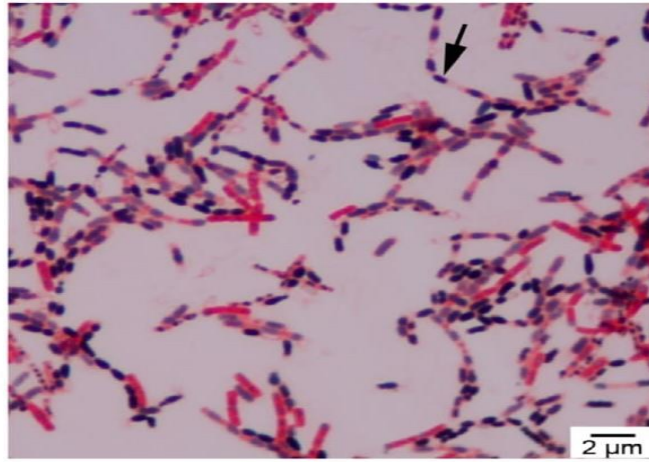
Nötr yağlar ve lipitler için son derece yüksek afiniteye sahip, yağda çözünen bir boya olan Sudan Black B (SBB) (Adnan vd., 2022), sterollerini ve fosfolipidleri

boyamaktadır. Bu boyanın n6trofillerdeki azurofilik ve spesifik gran6lleri boyarken peroksidazın yalnızca azurofilik gran6lleri boyamaktadır (Dalva, 2022). Şekil 2.19'da SBB' nin form6l6 verilmiştir.



Şekil 2.19. Sudan Black B form6l6 (Calleja, 2020)

Lipofilik bir boya olan SBB'nin y6ksek hassasiyetli bir PHA taraması olduğu rapor edilmiştir. PHA i7eren bakteriler sudan black boyamasından sonra, koyu renkli gran6ller olarak g6r6nmektedir (Şekil 2.20). Sudan black boyama, PHB'ler i7in potansiyel suşları taramakta kullanılan basit bir y6ntem olarak kabul edilmektedir (Wei vd., 2011). PHB biriktiren koloniler SBB boyası ile boyandığında mavimsi-siyah g6r6n6rken, PHB biriktirmeyen koloniler beyaz g6r6nmektedir (Adnan vd., 2022).

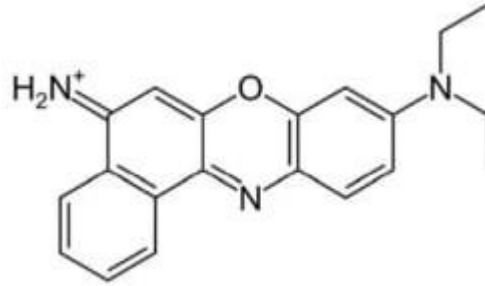


Şekil 2.20. *Bacillus thuringiensis* B417-5'deki PHB gran6llerinin SBB ile g6r6nt6lenmesi (Thammasittirong vd., 2017)

2.8.2. Nile Red ile PHB gran6llerinin boyanması

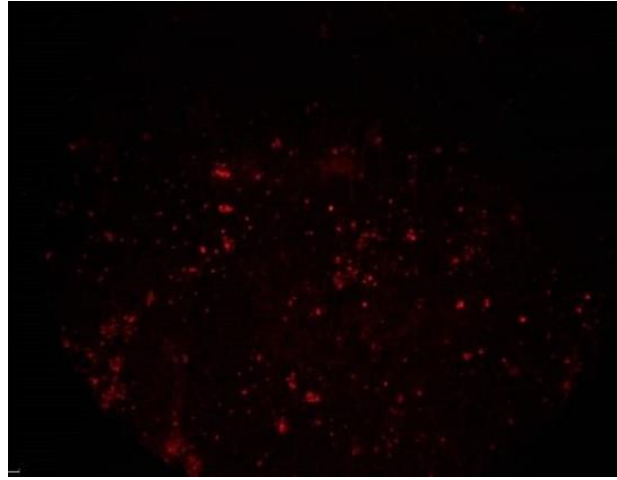
Nil Red, 9 konumda bir dietilamino grubuna sahip 5H-benzo[a]fenoksazin-5-on'dan oluşan organik bir heterotetrasiklik bileŐiktir (Şekil 2.21). Membranlar veya lipit

benzeri inklüzyonlar (PHB, triaçil-glisericler) gibi hidrofobik hücre yapılarını görselleştirmek için kullanılan lipofilik floresan boyalardandır (Juengert vd., 2018).



Şekil 2.21. Nile red formülü (Calleja, 2020)

Nil red, PHA tespiti için SBB'den daha spesifik ve üstündür. Hücrelerin içindeki PHB'yi tespit edebilmektedir (Mesquita vd., 2015; Arikawa vd., 2017). Nile Red boyası PHB granüllerine bağlanmakta ve floresan mikroskobu ile kolayca tespit edilebilmekte ve koyu kırmızı renkte görüntü elde edilmektedir (Juengert vd., 2018). (Şekil 2.22).



Şekil 2.22. *R. palustris* 7850'deki PHB granüllerinin Nile Red ile boyanmış floresans mikroskop görüntüsü (Akpınar, 2023)

2.9. PHB Ekstraksiyon Yöntemleri

PHA'ların ekstraksiyonu onlarca yıldır incelenmiştir ve genellikle iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Burniol-Figol vd., 2020; Koller, 2020):

- Enzimatik, kimyasal ve mekanik bozulma yöntemleri kullanılarak PHA olmayan hücre kütlelerinin sindirimi,

- Çözücü bazlı ekstraksiyon yöntemleri

PHA'nın salınmasına ve çözünmesini sağlayan, çözücü bazlı ekstraksiyon yöntemleri genellikle en etkili yöntem olarak kabul edilmektedir. Solvent bazlı ekstraksiyon, uygulama kolaylığı, polimerin yüksek geri kazanımı ve saflığının yanı sıra çok az bozulması gibi belirli avantajlara sahiptir. Ayrıca bu yöntem, polimerlerin daha fazla saflaştırılmadan tıbbi olarak uygulanmasını sağlayan lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel endotoksinleri de ortadan kaldırmaktadır (Volova vd., 2015). PHA ekstraksiyonu için kullanılan en başarılı çözücüler; metilen klorür (Volova vd., 2015), sodyum hipoklorit (Heinrich vd., 2012), metanol, kloroform, heksan, 1.2-propilen karbonat, etanol, etilen karbonat ve asetik anhidritdir (Samrot vd., 2021; McChalicher vd., 2010).

2.9.1. Kloroform ile PHB ekstraksiyonu

Kloroform gibi düşük kaynama noktalı klorlu çözücülerin kullanılması, yüksek PHA kalitesi ve ekstraksiyon verimi ile sonuçlanmıştır (Kshirsagar vd., 2013). Çözücünün temel görevi öncelikle hücre zarı geçirgenliğini bozarak, oluşan por yapılardan PHA'ları çözebilmektir (PubChem, 2023). Sodyum hipoklorit/kloroform kullanılarak PHB ekstraksiyon mekanizması, hücre zarının sindirilmiş PHB olmayan bileşenlerle eşzamanlı olarak sodyum hipoklorit ile denatürasyonunu, ardından kloroformda çözünmesini içermekle birlikte hem PHB geri kazanımı hem de saflığı sağlamaktadır (Marudkla vd., 2018). Ancak, dünya sağlık örgütü kloroformun hayvanlarda kanserojen olduğunu belirlemiştir, ayrıca havaya maruz kaldığında hızla buharlaşmakta, suda kolayca çözünmekte ve parçalanma ürünlerinin her ikisinde de çevreye zararlı fosgen ve hidrojen klorür bulunmaktadır (Marudkla vd., 2018). Bu nedenle, bu yöntem çevre dostu değildir ve biyoplastik seri üretimi için uygun değildir (Muhammadi vd., 2015).

2.9.2. Ultrasonik yöntemle PHB ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemi esnasında mikrobiyal hücre duvarlarının bozulması için yeni bir metot olan sonikasyon, sıvı bir ortamda bir ses dalgasının hızlı sinüzoidal hareketini kullanmaktadır. Bu yöntem, sıvıdaki çekirdeklenme bölgelerinde daha çok büyüyen ve sonrasında çöken mikro kabarcıkların üretilmesine neden olmaktadır. Bu süreç, temelde

çekirdeklenme, gaz/buhar kabarcıklarının büyümesi ve patlamalı olarak çökmesi olan kavitasyon olarak bilinmektedir. Kabarcık çökerken, mikrobiyal hücrelerin hücre duvarlarının kırılmasına neden olan şok dalgaları şeklinde mekanik enerjiye dönüşen bir enerji oluşturmaktadır. Hücreler, fermantasyon döngüsü tamamlandıktan sonra, toplanacakları hücre peletlerini elde etmek amacıyla santrifüjlenmekte ve safsızlıkları gidermek için iki kez damıtılmış su ile yıkanmaktadır. Sonrasında pellet, daha fazla depolama için liyofilizatörde dondurularak kurutulmaktadır (Pradhan vd., 2017).

2.9.3. Yüksek basınçlı CO₂ kullanarak PHB ekstraksiyonu

Bu ekstraksiyon yönteminde, PHB saflaştırması için alternatif bir çözücü olarak yüksek basınçlı CO₂ kullanılmaktadır. Bu yöntem, biyomedikal uygulamalarda PHB termoplastiklerinin daha fazla geliştirilmesi için uygun bir seçenek olabilir. Süperkritik CO₂ (SCCO₂), hem hidrofobik bileşiklerin ekstraksiyonunun hem de belirli polimerlerden uçucu bileşiklerin ve safsızlıkların uzaklaştırılması için ticari ölçekte kullanılmıştır. PHB'nin saflaştırılmasında CO₂; bol, ucuz, inert, alev almaz, toksik olmadığı ve kritik bir sıcaklığa (31,1°C) ve basınca (72,9 bar) sahip olduğu için çok iyi bir alternatiftir. PHB saflaştırması için optimize edilmiş bir protokolden oluşmakta olup biyolojik olarak parçalanabilen ve yenilenebilir PHB'yi saflaştırmak için çevre dostu, tek adımlı bir prosesi temsil etmektedir. Teknik hem biyomedikal PHB uygulamaları için hem de çeşitli sektörler için çok fazla potansiyele sahiptir (Daly vd., 2018).

2.9.4. SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) sonikasyon ile PHB ekstraksiyonu

PHA'nın (özellikle PHB) izolasyonu ve kantitasyonu için zararlı çözücüler veya pahalı ekipman gerektirmeyen yeni, basit ve hızlı bir yöntemden oluşan bu yöntemde, hücreler SDS solüsyonunda sonike edilir ve PHB'yi geri kazanmak amacıyla santrifüjlenir. SDS sonikasyon işlemi kullanılarak PHB'nin saflaştırılması, suda süspanse edilmiş donmuş veya kurutulmuş hücrelere uygulanabilir ve ticari bir büyük sonikatör ve santrifüj kullanılarak kolayca ölçeklendirilebilir. Bu yüzden, bu yöntem plastik işleme çalışmalarında yüksek miktarlarda PHB hazırlamak için yararlı olabilir (Arikawa vd., 2017). Hidrofilik materyali hücreden çözmek için yaygın olarak % 0.025-0.2 SDS konsantrasyonu kullanılmaktadır (Kurian ve Das, 2021).

2.10. PHB Karakterizasyon Yöntemleri

2.10.1. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

Molekülün kuvvetli manyetik bir alana yerleştirilmesi ve bu moleküldeki bazı atom çekirdeklerinin bu alanda bulunan elektromanyetik ışınları absorblaması tekniğiyle yapılan bir yöntemdir. Birçok molekülün yapısının belirlenmesinde kullanılan önemli bir teknik olup hidrojen içeren gruplar, grupların hidrojen sayıları ve bu gruplara bağlı komşu gruplar belirlenebilmektedir. NMR spektroskopisi, karışımları saflaştırma ya da ayırma adımları gerektirmeden moleküler düzeyde hızlı bir şekilde analiz edebilen bir yöntemdir (Hatzakis, 2019). NMR, bakteriler tarafından sentezlenen PHB'nin kimyasal yapısını gözlemlemek amacıyla kullanılmakta olup (Trakunjae vd., 2021; Hamdy vd., 2022) NMR analizindeki tepe noktaları kontrol edilerek doğrulanabilmektedir (Al-Shok vd., 2023). NMR spektroskopisi, moleküllerin yapısını ve bileşimini belirlemek için kullanılan güçlü bir analitik tekniktir. Bu teknik, belirli atom çekirdeklerinin manyetik özelliklerine dayanmaktadır (Hatzakis, 2019):

- Nükleer Spin: Belirli atom çekirdekleri, tıpkı küçük birer mıknatıs gibi davranarak kendi eksenleri etrafında dönmesine nükleer spin denir.
- Gyromagnetic Oran (γ): Bu oran, bir çekirdeğin manyetik momentinin (mıknatıslanma gücünün) açısal momentumuyla (dönme miktarıyla) olan ilişkisini ifade etmektedir. Her çekirdek türü için farklı bir gyromagnetic oranı vardır.
- Manyetik Moment (μ): Bir çekirdeğin oluşturduğu manyetik alanın gücünü ifade etmektedir. Gyromagnetic oran ve nükleer spin ile doğru orantılıdır.

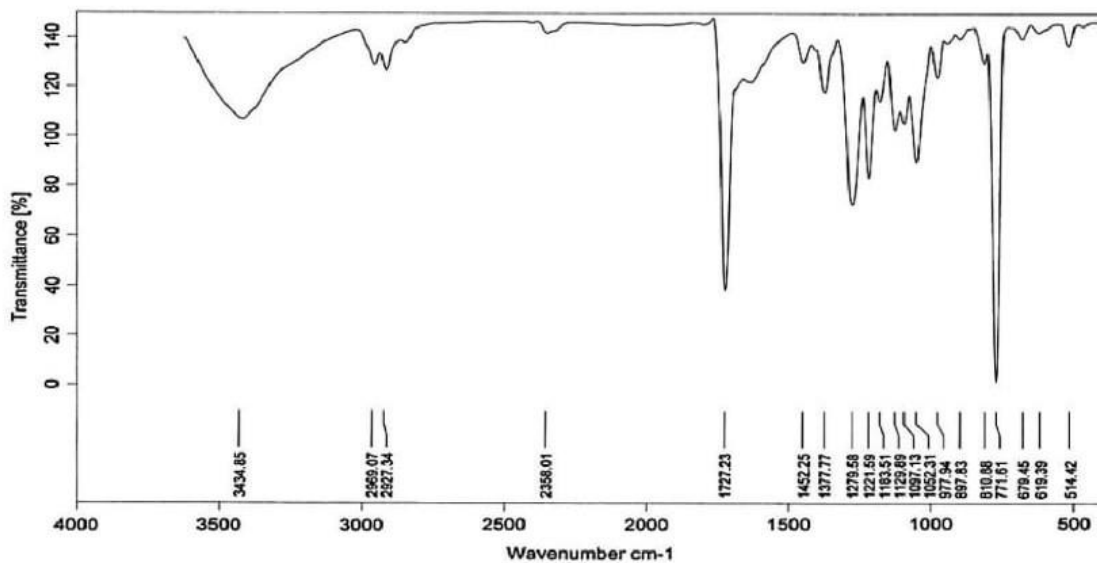
NMR Nasıl Çalışır:

- Numunenin Manyetik Alana Yerleştirilmesi: Numune, güçlü bir manyetik alan içine yerleştirilir. Bu alan, nükleer spinlerin manyetik alanı ile etkileşerek onları belirli yönlerde hizalanmasına neden olur.
- Radyo Frekans (RF) Darbesi: Numuneye, nükleer spinlerin rezonans frekansına eşit bir radyo frekansı darbesi uygulanır. Bu darbe, nükleer spinlerin yönünü değiştirir.
- Rahatlama ve Sinyal Tespiti: RF darbesi kesildiğinde, nükleer spinler tekrar eski durumlarına dönmeye çalışırken enerji yayarlar. Bu enerji, bir NMR sinyali

olarak tespit edilir. NMR spektrumu, bu sinyalin frekans ve şiddetine göre oluşturulur (Hatzakis, 2019).

2.10.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

CH_3 , CH_2 , $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$, CH ve OH gibi öne çıkan fonksiyonel grupların varlığı, PHB'nin varlığının kritik bir belirleyicisidir. FTIR spektroskopisi, kalitatif tanımlama ve ekstrakte edilen bileşiklerde bu tür grupların mevcudiyetini kontrol etmek için kullanılmaktadır (Thapa vd., 2018). $1,727 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant ester karbonil grubuna ve $1,279 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bant $-\text{CH}$ grubuna karşılık gelirken, $1,000$ ile $1,300 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki bantlar ester grubunun $\text{C}-\text{O}$ bağının gerilmesini gösterir. $2,969$ ve $2,927 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bükülmeler, bir alkil- CH_3 grubunu göstermektedir ve $1,377 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bükülme, simetrik bir bükülme $-\text{CH}_3$ grubuna karşılık gelmektedir $1,452 \text{ cm}^{-1}$ 'deki bükülme, $-\text{CH}_2$ veya $-\text{CH}_3$ 'ün asimetrik bükülmesiyle ilişkilidir. Ayrıca, $3,434 \text{ cm}^{-1}$ 'deki önemsiz bantlar, bir terminal $-\text{OH}$ grubuyla ilişkilidir (Şekil 2.23). (Ramezani vd., 2014). ZnSe kristali üzerinde PHB tozunun doğrudan analizi ile gerçekleştirilir. Spektrofotometre üzerinde $400-4000 \text{ cm}^{-1}$ 'de 32 tarama, 4 cm^{-1} çözünürlük ve 2 cm^{-1} aralık ile elde edilmektedir. Kızılötesi spektrumlar, yan zincir ve fonksiyonel grupları belirlemek için analiz edilmektedir (Nygaard vd., 2021). FTIR spektroskopisi hem katı, sıvı hem de gaz örneklerini analiz etmek için kullanılmaktadır (Samrot vd., 2021).



Şekil 2.23. PHB'nin FTIR spektrumu (Ramezani vd., 2014)

2.11. PHB Kullanım Alanları

PHB, biyoyumlulukları ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri sayesinde birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Chen, 2010). Bu alanlara örnek olarak tarım endüstrisi, ambalaj endüstrisi, farmasötik alanlar, biyomedikal alanlar verilebilir (Vaishnav ve Choudhary, 2021) (Şekil 2.24).

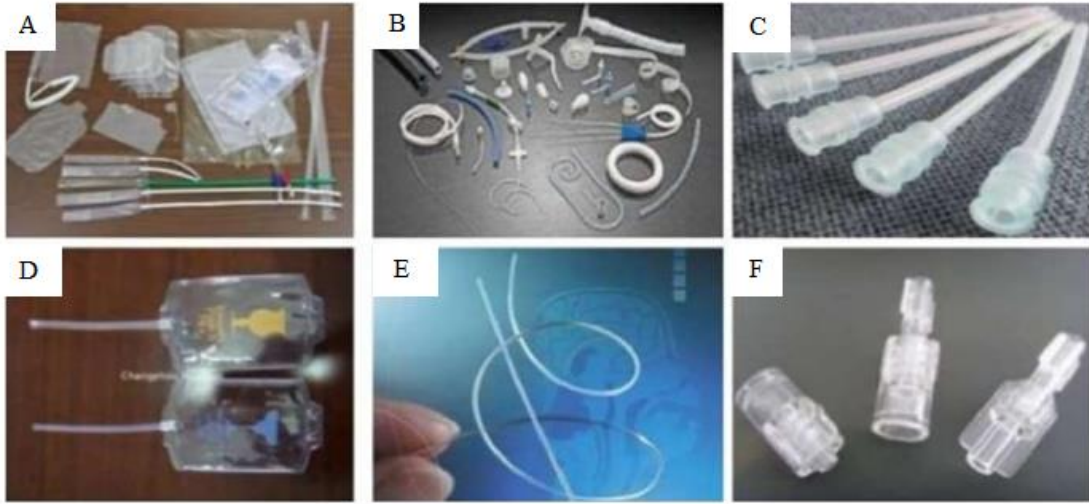


Şekil 2.24. PHB'nin farklı alanlarda uygulama örnekleri

2.11.1. Tıbbi kullanımı

Biyobozunurluğu sayesinde tıp alanında, esas olarak dikişler, implantlar, ürolojik stentler, kardiyovasküler doku mühendisliği, kırık fiksasyonu, narkolepsi ve alkol bağımlılığı tedavisi, ilaç verme vektörleri, hücre mikrokapsülasyonu, destek için kullanılır (Santos vd., 2017). (Şekil 2.25). PHB ile yapılan in-vitro testler sonucunda; kondrosit, epitel hücreleri, osteoblast vb. hücre çeşitlerine biyoyumlu özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Türkay, 2013). PHB'nin biyolojik olarak parçalanabilirlik özelliğine ek olarak biyolojik olarak uyumlu olması ve memelilere toksik olmamasından dolayı doku mühendisliğinde; cerrahi implantlar, yara örtüleri, vida ve zımbalar için biyomateryal olarak kullanılabilir (Pleissner vd., 2014). PHB'ler

sağlık hizmetlerinde, dikiş ipleri, doku onarım cihazları, eklem kırıkrdak onarımı, sinir kılavuzları ve kemik iliği iskeletleri gibi çeşitli tıbbi malzemelerin üretiminde de kullanılmaktadır (Koller vd., 2010). Bir başka biyomedikal kullanım olan kontrollü ilaç salımı için PHB bazlı kompozit parçacıklar geliştirilmiş olup, nanopartiküllerin minimum topaklanma ile homojen olarak dağılmış düşük ilaç dozajı ile yüklendiğini göstermiştir (Rezaei vd., 2016).



Şekil 2.25. PHB'nin çeşitli tıbbi uygulamaları (A) Tabakalar (B) İmplantlar (C) Tüpler (D) Damla şişesi (E) Ürolojik stentler (F) Vida (Calleja, 2020)

PHB yüksek kristalliğe, nispeten yüksek erime noktasına ve iyi hidrolitik stabiliteye sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı PHB biyomedikal amaçlar için sıkça kullanılmaktadır. Kopolimerleri/kompozitleri kemik implantlarında kullanılabilir de, PHB bazlı nanoparçacıklar da son on yılda ümit verici ilaç verme sistemleri olarak kabul edilmektedir. Sadece biyolojik olarak parçalanabilir değiller, aynı zamanda biyolojik olarak emilebilmekte, yani filtrasyon veya metabolizma yoluyla doğal yollardan elimine edilebilmektedir. Bozunma, ester bağlarının hidrolizi ile gerçekleşmektedir. PHB nanopartikülleri ve düşük moleküler ağırlıklı polimer fragmanları, makrofajlar tarafından fagosite edilebilmekte ve hücre içinde parçalanabilmektedir. Bozunma ürünü olan 3-hidroksibütirat insan kanında fizyolojik olarak bulunduğundan, bunun uygun türevleri akut sitotoksikite göstermemektedir (Babos vd., 2020). PHB, gastrointestinal sistemdeki çeşitli hidrolazlar tarafından 3-hidroksibütirat (3HB) ve oligo3-hidroksibütirat (oligo-3HB) olarak bozunabilmektedir

(Wang vd., 2019). PHB'nin ilaç verme uygulamaları son zamanlarda antimikrobiyal ve kanser tedavisi, gen verme ve topikal ilaç verme şeklinde genişletilmiştir (Babos vd., 2020). PHB olumsuz tepki vermeden insan vücuduna yerleşebilir ve antibiyotiklerin kontrollü salınımı için taşıyıcı olarak kullanılabilir (Koller, 2018). (Çizelge 2.8). PHB'yi diğer biyoyumlu polimerlerle (3-hidroksivalerat gibi) birleştirerek yapılan PHB bazlı plastikler ilaç dağıtım ve doku mühendisliği dahil olmak üzere birçok uygulama bulunmaktadır (Rydz vd., 2015).

Çizelge 2.8. PHB'nin medikal alanda uygulama örnekleri (Choi vd., 2020)

Ürün	Uygulama
PHB	Hücre içi ilaç salınımı için nanopartiküller Kas-fasiyal yaraları iyileştiren sütür
Poli (3HB-co-3HHx)	Doku mühendisliği (kıkırdak, kemik iliği hücresi, kalp kapakçıkları)
PHB	Kemik iliği osteoblastı, kemik dokusu mühendisliği
Poli(3HB-co-3HV)	Kanser tedavisi için ilaç dağıtım taşıyıcısı
Poli(3HB-co-4HB)	Antibiyotik dağıtım sistemi
poli (3HB-co-3HV) / PCL karışımı	Fotodinamik tedavi için ilaç dağıtım taşıyıcısı

2.11.2. Ziraatte kullanımı

PHB'den fide taşımacılığında, tohum kapsüllendirilmesinde, pestisit veya gübre ve bitki gelişim düzenleyicilerinin kontrollü bırakılması amacıyla plastik örtü olarak ya da sulama delikleri yapılmasında faydalanılmaktadır (Türe, 2019; Güngörmedi 2012). Tarımda, PHB yaygın olarak pestisitlerin ve gübrelerin salınması için kullanılır (Santos vd., 2017). PHA'ların tarım alanındaki diğer bir kullanımı, bitkilerdeki azot fiksasyonunu arttırmak amacıyla uygulanan bakteri inokulantlarıdır. Tarım alanında aşılama preparatlarındaki bakteri inokülümünün çok zamanda kuraklık, depolanma ile sıcaklık koşulları vb. zor durumlarda direnç göstermesi gerekmektedir. Taşıyıcı içine kültürlenmiş bakteriler yüksek düzeyde canlı kalabilmelidir. Bu yüzden, alanda yapılan çalışmalar, bakterilerin taşıyıcılar içinde uzun vadede canlı kalmasını sağlamak amacıyla besin ya da sentetik ürün gibi elementlerin de var olmasını amaçlamaktadır (Dobbelaere vd., 2001; Philip vd., 2007).

2.11.3. Paketlemede ve tek kullanımlık malzemelerin yapımında kullanımı

Tek kullanımlık plastiklerin, özellikle gıda ambalajlarının yoğun kullanımı ve uygunsuz atılması sonucu büyük miktarda plastik atık oluşmuştur. Bu nedenle, özellikle geri dönüşümü zor olan ambalaj malzemelerinin, biyolojik olarak parçalanmayan plastiklerden PHB gibi biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerle değiştirilmesi gerekmektedir (Geyer vd., 2017). PHB'ler hidrofobik, optik olarak aktif, termoplastik, piezoelektrik, insan ve doğa için toksik olmayan ve aktif doğa gibi özelliklere sahiptir. Ayrıca, PHB'ler gazlar ve suya karşı iyi bariyer özelliklerine sahiptir (Koller, 2014). Bu malzeme özellikleri, PHB'leri ambalaj malzemeleri için uygun hale getirmektedir. Ayrıca, PHB'ler pipetler ve şişeler gibi gıda ile ilgili ürünlerde kullanılabilir. 2018 yılında, tamamen biyolojik olarak parçalanabilen ilk plastik pipet, Nodax PHA'dan Danimer Scientific tarafından geliştirilmiştir. 2019 yılında, tamamen PHA'lardan yapılmış içecek şişeleri, Kaliforniya'da faaliyete geçen The Cove tarafından geliştirilmiştir (Şekil 2.26). Kaplar toprakta yaklaşık beş yıl içinde parçalanabilirken, geleneksel PET plastik şişelerin parçalanması yaklaşık 500 yıl sürmektedir (Choi, 2020). PHB, kolay şekil alabilme ve doğada tamamen çözünebiliyor olması gibi özelliklerinden dolayı, genellikle tek kullanımlık materyaller ve paketleme malzemelerinin üretimi için kullanılmaktadır (Wang vd., 2012). PHB ve kopolimerleri paketleme filmlerinde ve tek kullanımlık malzemelerde (hijyenik ürünler, çocuk bezleri, mutfak malzemeleri vb.) kullanılmaktadır. Kopolimerle düşük erime sıcaklığına ve esnek yapıya sahip olmasından dolayı preslenmiş ürünlerin imalatında da kullanışlıdır. Şampuan kutuları, tek seferlik kullanılan tıraş bıçakları, meşrubat şişeleri, karton süt kutuları, plastik çatal, bıçak, tabak malzemeleri, poşetler, tepsi ve mutfak kapları gibi geniş bir aralığa sahip kullanımı mevcuttur (Hazar Yoruç ve Uğraşkan., 2017).



Şekil 2.26. Cove şirketi tarafından geliştirilen biyoçözünür şişe (McGlasson, 2023)

PHB sert ve kararlı bir termoplastik olup, 168 °C ile 182 °C arasında değişen erime noktasına, 2 °C ile 4 °C arasında değişen camsı geçiş sıcaklığına, %5 ile %8 arasında değişen kopma uzamasına ve 1.18 g/cm³ ile 1.26 g/cm³ arasında değişen yoğunluğa sahip bir biyopolimerdir. Bu özellikleri ile ambalaj, tek kullanımlık çatal, bıçak ve biyoplastik torba yapımı gibi birçok sektörde kolaylıkla kullanılabilir (Bellini vd., 2022). Günlük hayatta da daha fazla kullanım alanları bulmaya başlayan PHB'ler karşımıza kişisel hijyen ürünlerinin ambalajlarının yapımı, tek kullanımlık sofa örtüleri veya doğada biyolojik olarak parçalanabilen torbalar gibi örnekler ile çıkmaktadır. PHB'ler bütün bu avantajlara sahip olmalarına rağmen, petrokimyasal yollarla üretilen plastikler de daha maliyetli olmaları nedeniyle pazarda yer bulmakta zorlanabilmektedirler (Masaeli vd., 2013). Tıraş bıçağı ve bebek bezi yapımında tercih edilmektedir (Wang vd., 2012). Ayrıca nem kaybını önleyip parlaklıkla kokuyu koruyabilmesinden dolayı gıda ve kozmetik malzemelerin paketlenmesinde, su/şampuan ambalajlarında kullanılmaktadır (Khosravi-Darani ve Bucci 2015; Garcia Campo vd., 2017). PHB, gıda ambalajı için başarıyla test edilmiş ve PP'den daha sert olduğu bulunmuştur. PHB, şişelerin, lateksin ve çeşitli paketleme ürünlerinin imalatında kullanılmaktadır (Markl, Grünbichler ve Lackner, 2018). PHB'ler, kağıt kaplama uygulamalarında, süt kreması ikamelerinde, gıda aroma maddelerinde kullanılmaktadır (Santos vd., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Suşları

Bu tezde *Cereibacter sphaeroides* O.U. 001 (DSM5864), *Rhodopseudomonas palustris* 7850 (DSM 127) ve *Cupriavidus necator* H16 (DSM 428) olmak üzere 3 farklı bakteri kullanıldı. Bu üç bakteri de gram negatif grubunda olup *C. sphaeroides* ve *R. palustris* mor kükürtsüz fotoheterotrofik bakteridir. Çalışmanın amacı bu 3 bakterinin şeker pancarı melası ile hazırlanan besiyeri ortamında çoğaltılması ve sonrasında asetat besiyerine geçirilip azot limitasyonu ile PHB üretiminin artırılması, elde edilen PHB'nin görüntülenmesi ve karakterizasyonunun yapılmasıdır. -80°C`de stoklanmış olan *C. sphaeroides* O.U. 001 (DSM5864) ve *R. palustris* 7850 (DSM 127) Biebl ve Pfenning (BP) agar besiyerine, *C. necator* H16 (DSM 428) LB Broth (Miller) agar besiyerine ekilerek 30±1°C de (96 saat) aktifleştirilmiştir.

3.2. Ortam ve Kültür Koşulları

3.2.1. Melas besiyerinde bakterilerin büyütülmesi, OD ve pH analizi

Tek saf koloniler elde edildikten sonra bakteriler, çalışmaya başlamadan önce adaptasyon ve aktifleştirme için karbon kaynağı olarak melas içeren sıvı besiyerine aktarıldı. Bir koloni, 30±1°C'de 250 mL'lik erlenmeyer şişede 100 mL sterilize edilmiş melas besiyerine kültürlendi. Melas besiyeri içeriği Çizelge 3.1`de verilmektedir. Besiyeri hazırlandıktan sonra pH, 5M NaOH kullanılarak 6.8`e sabitlendi.

Çizelge 3.1. Melas besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Melas	68
Na Glutamat.H ₂ O	0,37
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,025
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

Melas besiyeri hazırlanmadan önce melas ön işleme tabi tutuldu. 68 gram melas tartılarak 450 mL distile suda çözündürüldü. 50 mL lik falkon tüplere aktarılarak 8500

g'de 15 dk santrifüjlendi. Süpernatant alındı, pellet atıldı. Çizelge 3.1'de verilen içerik hazırlandıktan sonra ortam sterilizasyonu 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavlama ile gerçekleştirildi. Vitaminlerin yapısı yüksek sıcaklıkta bozulacağından dolayı vitamin çözeltisinin sterilizasyonu 0.22 µm gözenekli filtreden geçirilerek sağlandı. Otoklavdan sonra melas besiyerine eser element ve demir sitrat çözeltisi eklendi. Melas besiyerinin 30°C'ye kadar soğumasından sonra ise vitamin çözeltisi eklendi.

Fotosentetik bakteriler (*C. sphaeroides* ve *R. palustris*) aerobik, karanlık koşullarda (aliminyum folyo ile sarılarak) ve çalkalamalı (Thermo-scientific MAXQ 4450 1CE) inkübatörde 150 rpm'de 30±1°C'de, *C. necator* H16 ise aerobik ve ışık altında (aliminyum folyo kullanılmadan) 150 rpm 'de 30±1 °C'de inkübe edilmiştir. Deneyler, 100 mL çalışma hacmine sahip 250 mL reaktör (erlenmeyer şişesi) kullanılarak % 10'luk (90 mL besiyeri 10 mL stok bakteri) ekim yapılarak üç tekrar (n=3) halinde gerçekleştirildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Melas besiyerinde bakterilerin büyütülmesi

Melas besiyerinde büyüme esnasında hücre yoğunluğunu ölçmek amacıyla yaklaşık 24 saat aralıklarla örnekler alınarak spektrofotometre ile *C. sphaeroides* 660 nm'de (OD_{660nm}), *R. palustris* 660 nm'de (OD_{660nm}) ve *C. necator* 600 nm'de (OD_{600nm}) 2 mL örnek alınarak optik yoğunluk ölçüldü. OD ve pH hücrelerin ölüm veya düşüş aşamasına kadar ölçüldü. Kültürden 24 saat zaman aralıklarında örnekler alınıp OD ölçümlerine paralel olarak pH ölçümleri de yapıldı. Spektrofotometrede 0,8'in üzerinde çıkan değerlerde seyreltme yapıp çıkan değer seyreltme katsayısı ile çarpılarak sonuç hesaplandı.

3.2.2. Asetat besiyerinde bakterilerin büyütülmesi, OD ve pH analizi

Melas besiyerinde çoğaltılan *R. palustris* 7850, *C. sphaeroides* O.U. 001 ve *C. necator* HI6, santrifüj ile çöktürülerek asetat besiyerine geçirilip azot limitasyonu ile PHB üretimleri indüklendi. Çizelge 3.2'de asetat besiyerinin genel içeriği yer almaktadır. Çizelge 3.2'de verilen içerik hazırlandıktan sonra ortam sterilizasyonu 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklavlama ile sağlandı. Vitaminlerin yapısı yüksek sıcaklıkta bozulacağı için vitamin çözeltisinin steril edilmesi için 0.45 µm çapında gözenekli filtre kullanıldı. Otoklavdan sonra asetat besiyerine demir sülfat ve eser element çözeltisi eklendi. Asetat besiyeri 30 °C'ye kadar soğuduktan sonra vitamin çözeltisi eklendi. Asetat besiyeri konsantrasyonu 70 mM olarak ayarlandı. Besiyeri hazırlandıktan sonra pH, 5M NaOH kullanılarak 6.8'e sabitlendi.

Çizelge 3.2. Asetat besiyeri içeriği(g/L)

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NH ₄ Cl	0 veya 1 mM
NaCl	0.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
Asetik asit (70 mM)	4003 µl
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

6 adet erlende melas besiyerinde 48 saat büyütülmüş bakteriler falkonlara alınarak 5000 rpm de 15 dk santrifüjlendi, süpernatant atıldı. Pellet 100 mL 70 mM asetat (0 veya 1 mM NH₄Cl) içeren steril erlene alındı. Fotosentetik bakteriler (*C. sphaeroides* ve *R. palustris*) aerobik, karanlık koşullarda (aliminyum folyo ile sarılarak)

ve çalkalamalı (Thermo-scientific MAXQ 4450 1CE) inkübatörde 150 rpm'de $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de, *C. necator* H16 ise aerobik ve ışık altında (aliminyum folyo kullanılmadan) 150 rpm 'de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edimiştir. Deneyle, 100 mL çalışma hacmine sahip 250 mL reaktör (erlenmayer şişesi) kullanılarak (100 mL besiyeri + pellet) gerçekleştirildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. 3 bakterinin 1 mM NH_4Cl içeren 70 mM Asetat besiyerinde büyütülmesi

Asetat besiyerine aktarılan bakterilerin büyüme esnasında hücre yoğunluğunu ölçmek amacıyla 0, 24, 48 ve 72. saatlerde örnekler alınarak spektrofotometre ile *C. sphaeroides* 660 nm'de ($\text{OD}_{660\text{nm}}$), *R. palustris* 660 nm'de ($\text{OD}_{660\text{nm}}$) ve *C. necator* 600 nm'de ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) 2 mL örnek alınarak optik yoğunluk ölçüldü. Spektrofotometrede 0,8'in üzerinde çıkan değerlerde seyreltme yapılarak çıkan değer seyreltme katsayısı ile çarpılarak sonuç hesaplandı. OD ölçümlerine paralel olarak pH ölçümleri de yapıldı.

3.3. Boyama ve Mikroskop ile Görüntüleme

3 bakteri türü 250 mL'lik erlenlerde aerobik koşulda 30°C 'de PHB üretimi için optimize edilmiş inkübasyon süresi olarak kabul edilen 48 saat (geç logaritmik faz) boyunca melas besiyerinde inkübe edildi. Melas besiyerinde 48 saat büyütülen bakteriler 70 mM asetat besiyerine aktarıldı ve 72 saat inkübasyona bırakıldı. PHB, karbon ve enerji rezervi görevi görmektedir, melas ve asetik asitten sağladığı karbon kaynağı ile dengesiz büyüme koşullarında sitoplazmada birikmektedir. Bakteriler durağan faza geçiş döneminde enerji olarak PHB granüllerini kullanmaya başlamaktadır. Bakteriler tarafından üretilen PHB mikroskop kullanılarak incelenebilmektedir. Bakteri izolatlarının ürettiği PHB Sudan Black ve Nile Red

kullanılarak boyama yöntemi ile görüntülendi. Bu çalışmada her bir bakteri ayrı ayrı kültüre edilerek PHB boyama işlemleri yapıldı.

3.3.1. Sudan Black B ile boyama

Maksimum PHB üretimi için 48 (melas besiyeri için) ve 72 saat (asetat besiyerine aktarımdan sonra) inkübasyon sonrasında bakteriler SBB (Isolab, 970.D01.0050) boyası kullanılarak PHB birikimi açısından incelendi. 50 mL % 70'lik etanolde 0,15 gram SBB 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. SBB boyaması için;

- ❖ 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 SBB 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.
- ❖ Hazırlanan preparatlar mikroskop (Nikon esclipe E200) 100X okülerde görüntülendi.

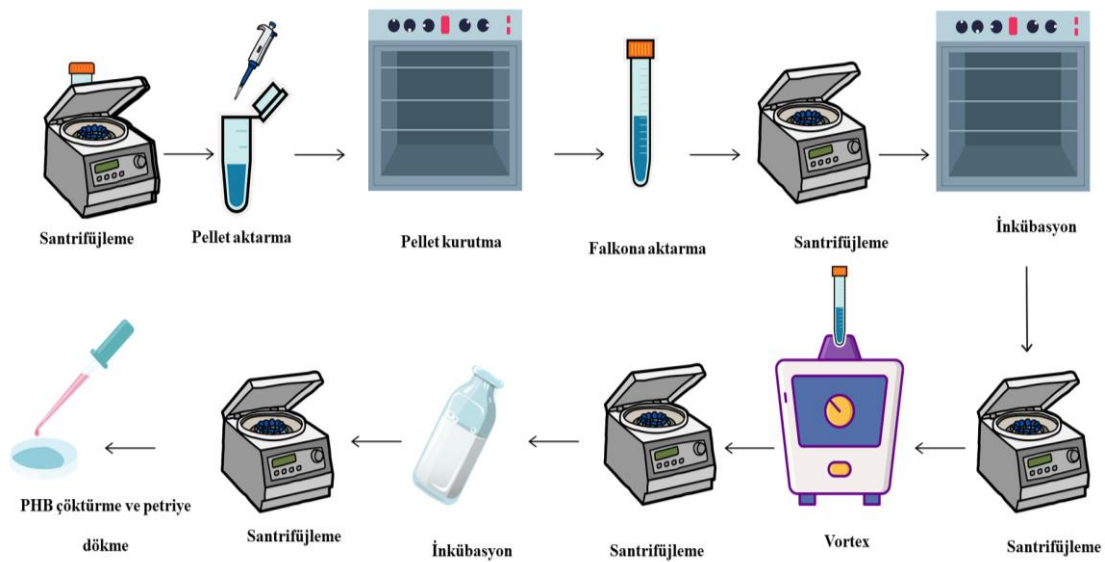
3.3.2. Nile Red ile boyama

Nil Red, hücre içi PHB'yi tespit etmek için kullanılan hızlı ve kolay tekniktir. Nil Red PHB granüllerine bağlanır ve floresan mikroskobu ile kolayca tespit edilir. Renkleri koyu kırmızıdan yoğun sarı-altın emisyonuna kadar değişmektedir. Maksimum PHB üretimi için 48 (melas besiyeri için) ve 72 saat (asetat besiyerine aktarımdan sonra) inkübasyon sonrasında bakteriler Nile Red (Sigma Aldrich, 72485-100MG) boyası kullanılarak PHB birikimi açısından incelendi. Nile Red boyama için;

- ❖ 2 mL bakteri çözeltisi 7500 rpm'de 5 dakika (4°C) santrifüjlenir ve süpernatant atıldı.
- ❖ Pellet 500 µl distile suda çözdürüldü ve 2 kat seyreltildi.
- ❖ Eppendorf tüpündeki 100 µl bakteri çözeltisine 10 µl seyreltilmiş Nil Red ilave edildi ve floresan boya ışıktan etkilendiği için alüminyum folyo ile sarılıp oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- ❖ Çözelti, 5 dakika (4°C) boyunca 7500 rpm'de santrifüjlenip süpernatant atıldı.
- ❖ Pellet daha sonra 100 µl steril distile suda çözüldü ve 15 µl bakteri/ boya çözeltisi, mikroskop slaytta yerleştirildi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Görüntüleme konfokal mikroskobu (63X Zeis) kullanılarak yapıldı.

3.4. Bakteri Kültürlerinden PHB Ekstraksiyonu

Maksimum PHB üretimi için 6 adet erlene 100'er mL lik ekim yapılarak 48 (melas besiyeri için) ve 72 saat (asetat besiyerine aktarımdan sonra) sonunda ekstraksiyon yapıldı. PHB ekstraksiyon işlemi Şekil 3.3'de özetlendi.



Şekil 3.3. PHB ekstraksiyon aşamaları

- ❖ Hücre kültürü 50 mL'lik falkonlara eşit şekilde bölünerek 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Bütün santrifüj işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilir. Sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı.

- ❖ 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 santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- ❖ Pellet tekrardan 1 mL distile suda çözdürülerek 50 mL'lik falkonlara aktarıldı.
- ❖ Pigment ekstraksiyonu için üzerine aseton-metanol karışımı (9 mL) homojenleştirilerek ilave edilip oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakıldı.
- ❖ 6000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu prosedür bakteri hücrelerinin rengi tamamen değişene kadar birkaç kez tekrarlandı.
- ❖ Kalan suyun çıkarılması için pellet üzerine 10 mL etanol ilave edildi ve 50 °C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı.
- ❖ 6000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- ❖ Hücre duvarının parçalanıp PHB'nin geri kazanılması için pellet üzerine 6 mL (% 6) sodyum hipoklorit (NaClO) eklendi ve 10 dk vorteks yapıldı. Sonrasında 37 °C' de 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- ❖ 6000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı, sonrasında süpernatant atıldı.
- ❖ PHB'nin elde edilmesi için pellet 1 mL kloroformda çözdürüldü, 10 mL'lik cam penisilin şişesine aktarıldı ve 4 mL daha kloroform eklendi.
- ❖ Şişenin ağzı kapağı ile kapatıldı ve herhangi bir buharlaşma olasılığına karşı kapak kısmı parafilm ile sarılıp bir kaç gün 30 °C'de inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Daha sonra 9000 rpm 15 dk 30°C 'de santrifüj yapıldı ve pipet yardımı ile alttaki PHB içeren kloroform fazı yeni bir falkona aktarıldı.
- ❖ PHB çöktürmek için kloroform üzerinde eşit miktarda soğuk (% 100) metanol (-20°C) eklendi.
- ❖ Çökelti daha sonra kloroform ve metanolü buharlaştırmak için bir petri kabına döküldü. Toz PHB elde etmek için bir kaç gün 30°C de inkübasyona bırakıldı, kurutma işlemi tamamlanıp tartıldı. PHB, sabit bir ağırlık gözlenene kadar kurutuldu.

3.5. PHB Verim Hesaplaması

Bakterilerin CDW (hücre kuru ağırlığı)'si 48 (melas besiyeri için) ve 72 saat (asetat besiyerine aktarımdan sonra) inkübasyondan sonra belirlendi. Hücreler 13.000 rpm, 15 dk santrifüjlenerek ile toplandı, distile suyla yıkama işlemi yapıldı. Hücre

pelletleri 80°C'de 1 saat 30 dk kurutuldu. İlk olarak boş eppendorf ve sonrasında kuru hücreli pelletler elektronik bir denge kullanılarak tartıldı. Bakteriler tarafından üretilen kuru PHB yüzdesini hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı (Marudkla vd., 2018).

$$(\%)\text{PHB verimi} = \frac{\text{Ekstrakte edilen kuru PHB ağırlığı (g/L)}}{\text{Kuru hücre ağırlığı(g/L)}} \times 100$$

3.6. PHB Polimerlerinin Karakterizasyonu

3.6.1. NMR ile PHB karakterizasyonu

PHB'nin moleküler yapılarını belirlemek için kurutulmuş örnekler 1 mL döteryumlu kloroform (CDCl₃) içerisinde süspanse edildi. Çözülen örneklerin ¹H-NMR analizleri (Bruker avance neo 400 MHz) kullanılarak gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak PHB standardı (Merck, 363502-10G) kullanıldı.

3.6.2. FTIR ile PHB karakterizasyonu

ZnSe kristali üzerinde PHB'nin doğrudan analizi yapıldı. Kızılötesi spektrumlar 3900-500 cm⁻¹ de ve FTIR Thermo Scientific–Nicolet iS20 spektrofotometre ile analiz yapıldı. Standart olarak NMR da kullanılan aynı PHB standardı kullanıldı.

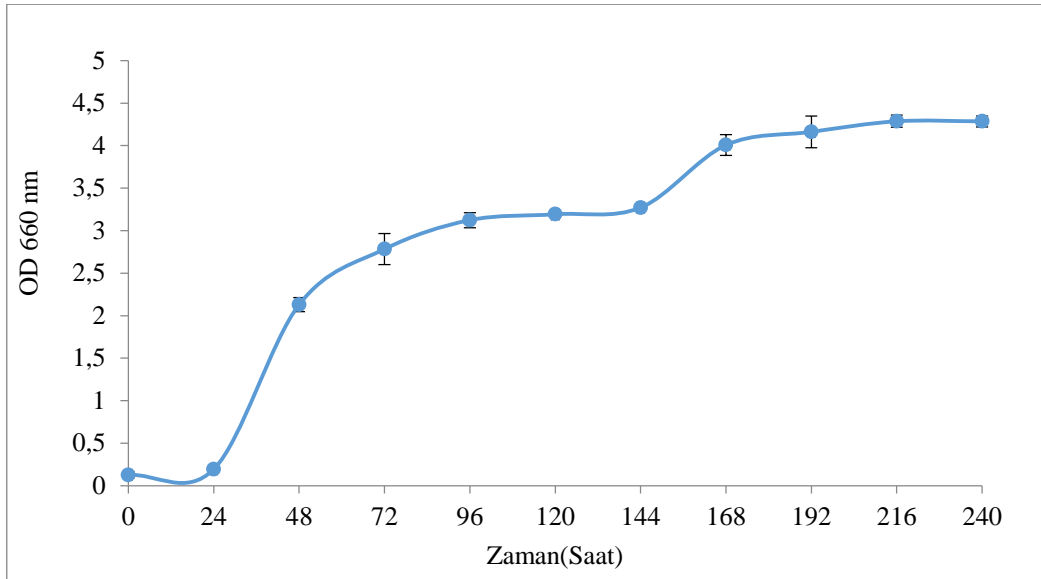
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri

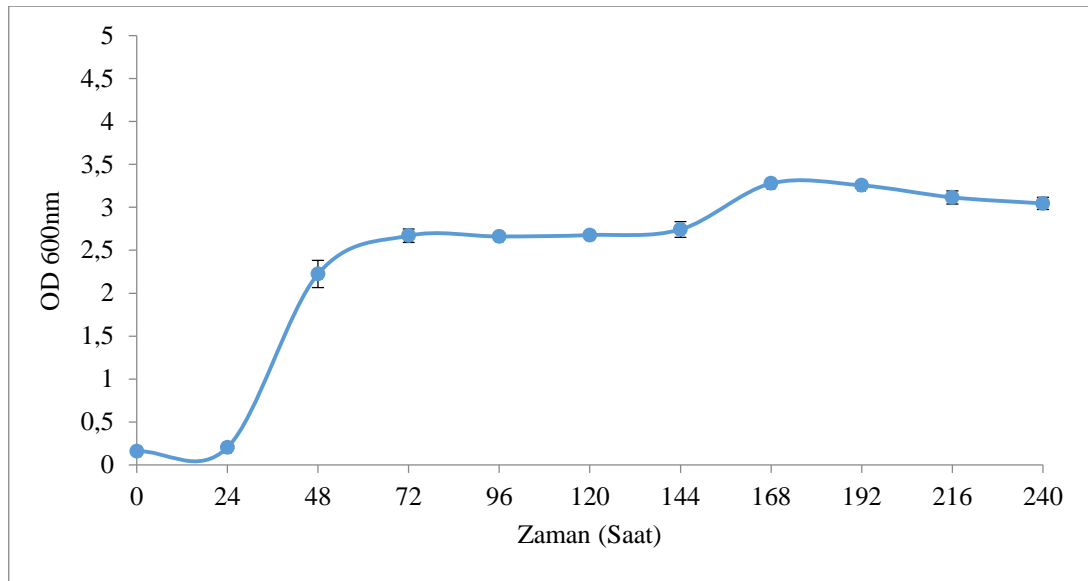
4.1.1. Büyüme eğrileri

4.1.1.1. Melas besiyeri için büyüme eğrileri

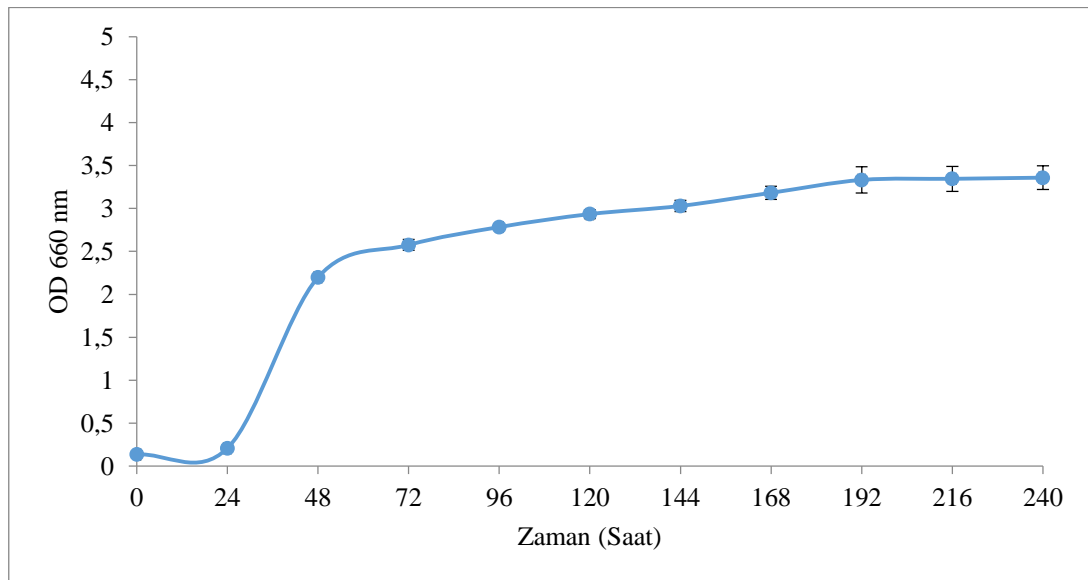
Melas besiyerinde büyütülen bakterilerin üreme sırasında hücre yoğunluğunu ölçmek için yaklaşık 24 saat aralıklarla 2 mL örnekler alınarak spektrofotometrede *C. sphaeroides* ve *R. palustris* 660 nm’de (OD660nm), *C. necator* 600 nm’de (OD600nm) ölçüldü. İstatiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edebilmek için deneyler 3 tekrarlı yapıldı. Şekil 4.1, 4.2, 4.3,`te, melasta yetiştirilen *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864), *C. necator* H16 (DSM 428), *R. palustris* (DSM 128) ‘in büyüme eğrileri gösterilmiştir.



Şekil 4.1. *C. sphaeroides* O.U.001(DSM 5864)’in büyüme eğrisi (OD660 nm)



Şekil 4.2. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın büyüme eğrisi (OD600 nm)

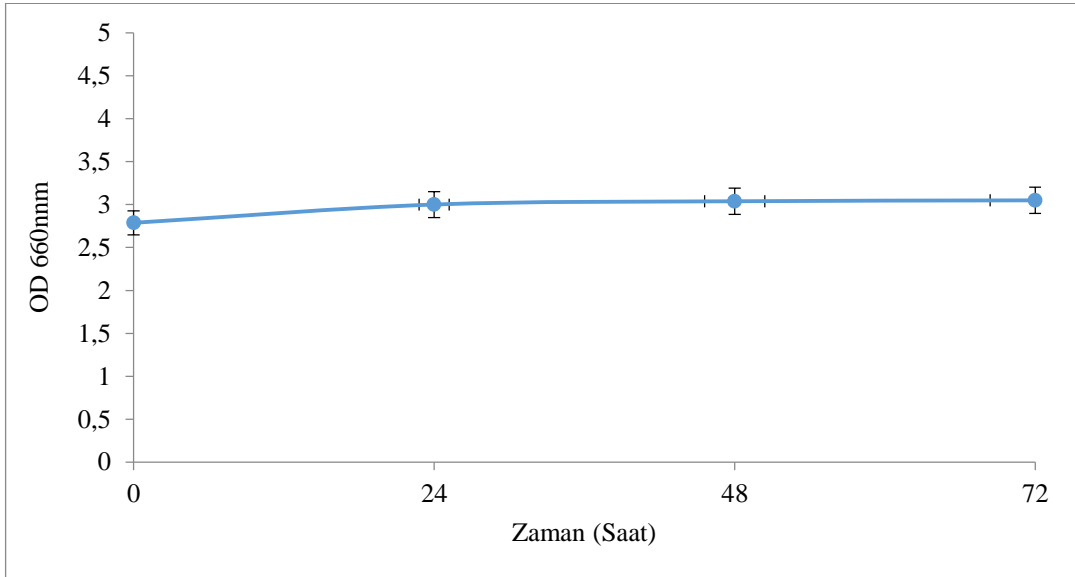


Şekil 4.3. *R. palustris* (DSM 128) 'in büyüme eğrisi (OD660 nm)

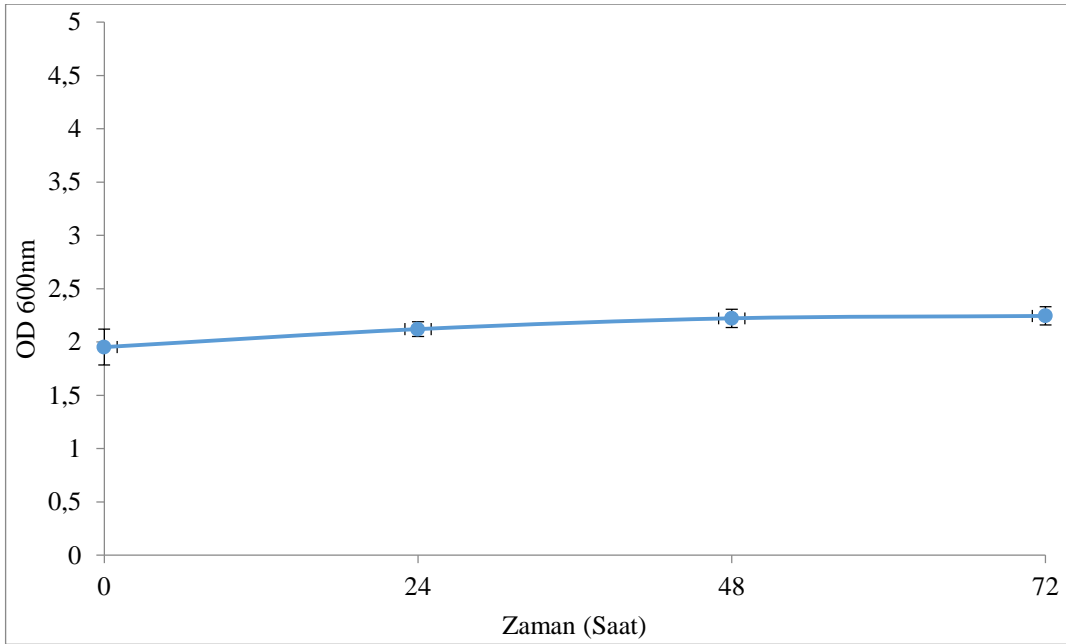
Melas besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides*'in maximum OD değeri 4.28, *C. necator*'un 3.27, *R. palustris*'in 3.35 olarak ölçülmüştür. Buna göre melas besiyerinde bu 3 bakteriden en iyi büyüme sağlayan *C. sphaeroides* olup daha sonra *R. palustris* ve en az büyüme sağlayan *C. necator* olmuştur. 3 bakteride de geç logaritmik faza geçiş 48. saat olarak belirlendi. Sudan black ve Nile red boyama işlemleri ve ekstraksiyon işlemi buradaki 48. saat baz alınarak yapıldı. Bunun nedeni bakterilerin geç logaritmik fazda hücre içi PHB granüllerini biriktirmeleridir.

4.1.1.2. Asetat besiyeri için büyüme eğrileri

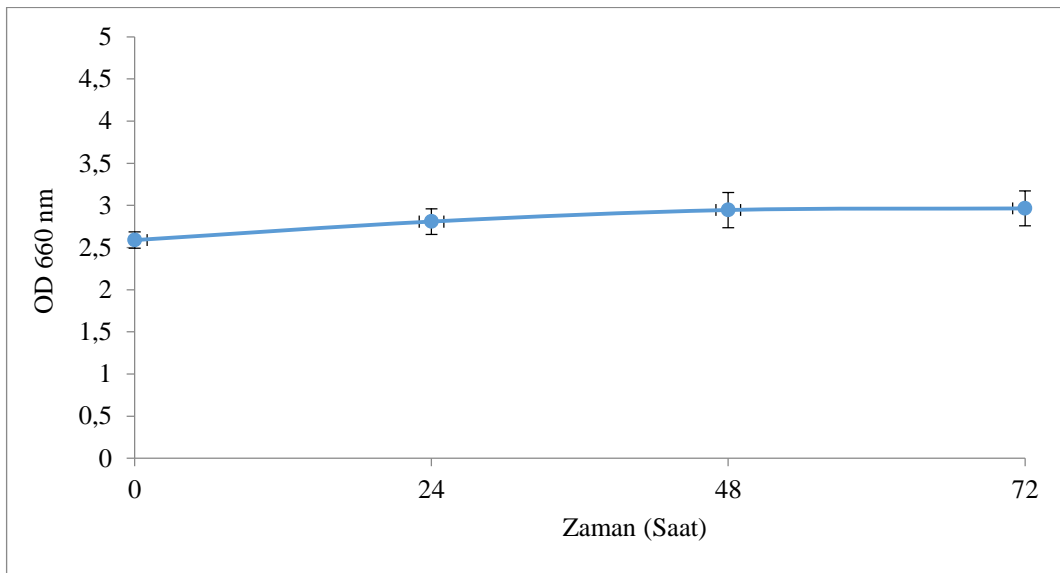
Asetat besiyerine aktarılan bakterilerin büyüme esnasında hücre yoğunluğunu ölçmek amacıyla başlangıçtan ekstraksiyon aşamasına kadar (0, 24, 48 ve 72. saatlerde) örnekler alınarak spektrofotometre ile *C. sphaeroides* 660 nm'de (OD_{660nm}), *R. palustris* 660 nm'de (OD_{660nm}) ve *C. necator* 600 nm'de (OD_{600nm}) 2 mL örnek alınarak optik yoğunluk ölçüldü. İstatiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edebilmek için deneyler 3 tekrarlı yapıldı. Şekil 4.4, 4.5, 4.6'da, melas besiyerinden asetat besiyerine aktarılan *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864), *C. necator* H16 (DSM 428), *R. palustris* (DSM 128)'in büyüme eğrileri gösterilmiştir.



Şekil 4.4. *C. sphaeroides* O.U.001(DSM 5864)'in büyüme eğrisi (OD_{660nm})



Şekil 4.5. *C. necator* H16 (DSM 428)'nin büyüme eğrisi (OD600nm)



Şekil 4.6. *R. palustris* (DSM 128)'in büyüme eğrisi (OD660nm)

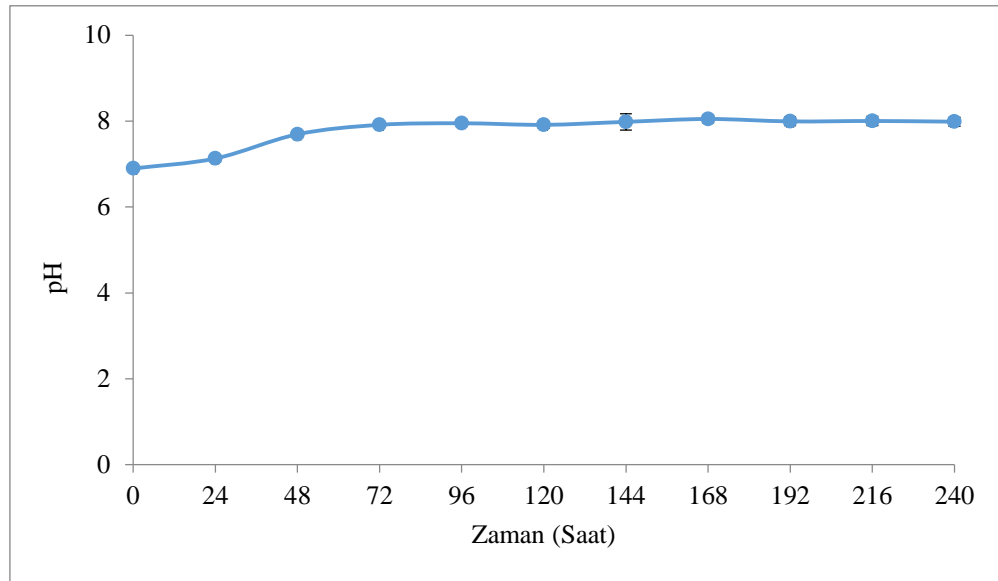
Asetat besiyerine aktarılan *C. sphaeroides*'in maximum OD değeri 3.04, *C. necator*'un 2.24, *R. palustris*'in 2.96 olarak ölçülmüştür. Buna göre asetat besiyerinde bu 3 bakteriden en iyi büyüme sağlayan *C. sphaeroides* olup daha sonra *R. palustris* ve en az büyüme sağlayan *C. necator* olmuştur. *C. sphaeroides* 65 mM asetat içeren bir ortamda büyütüldüğünde hücrelerde artan bir PHB sentezini sağlayan *phaC* gen ekspresyonunu ortaya çıkarmıştır (Monroy & Buitrón, 2020). Sonuçlara göre bakteriler çok fazla büyüme göstermemiştir çünkü asetat besiyerine aktarmaktaki amaç bakteri

büyümesi değil PHB miktarını artırmak olduğu için çok fazla büyüme beklenmemektedir.

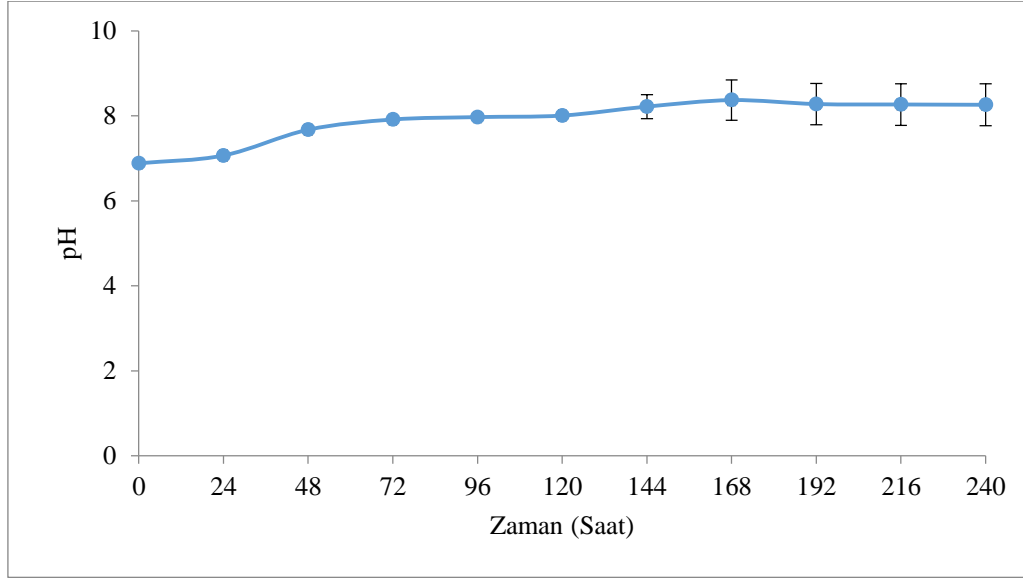
4.1.2. pH Analizleri

4.1.2.1. Melas besiyeri için pH analiz

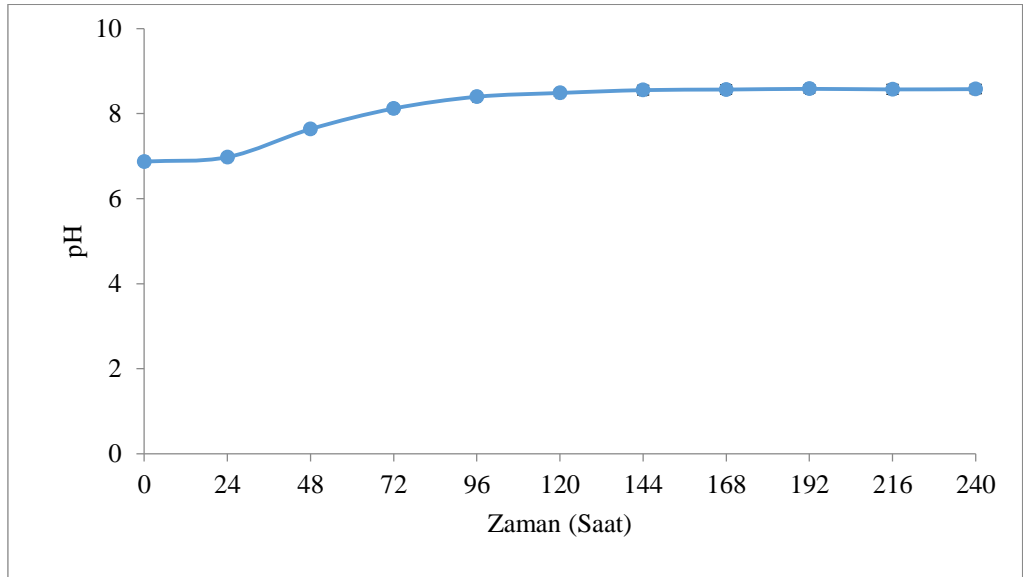
Deney başlangıcında ortamın pH değeri 6.80 olarak sabitlendi ve kültürlenen bakterilerin pH değişimleri ölüm aşamasına kadar ölçüldü. Kültürün pH değişimi her 24 saatte bir örnek alınarak takip edildi. Bu çalışmada pH deneyi üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Şekil 4.7, 4.8, 4.9’da melas besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864), *C. necator* H16 (DSM 428), *R. palustris* (DSM 128)’in pH değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.7. *C. sphaeroides* O.U.001(DSM 5864)’in pH değerleri



Şekil 4.8. *C. necator* H16 (DSM 428) 'un pH değerleri



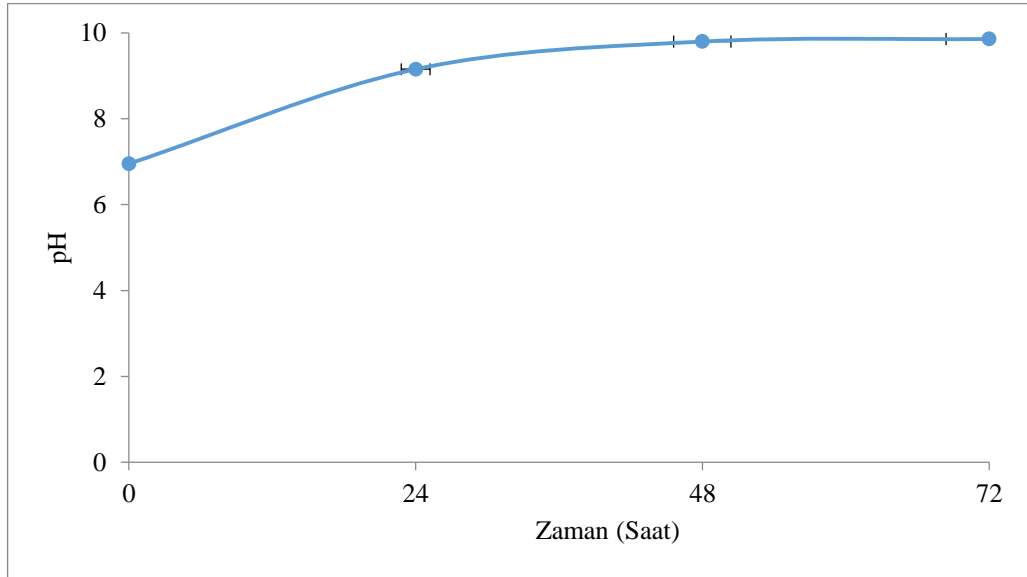
Şekil 4.9. *R. palustris*(DSM 128)'in pH değerleri

Grafiklere göre 3 bakterinin de başlangıç pH değeri ortalama 6.88 dir. *C. sphaeroides*, 6.89 başlangıç pH değerinden 168. saatte maximum 8.05 pH değerine çıkmıştır. Geç logaritmik faz saati olan 48. saatte pH değeri 7.69 dur. *C. necator* 6.88 başlangıç ph değerinden 168. saatte maximum 8.37 pH değerinde ulaşmıştır. Geç logaritmik faz saati olan 48. saatte pH değeri 7.67 dir. *R. palustris* 6.87 başlangıç pH değerinden 192. saatte maximum 8.58 pH değerine ulaşmıştır. Geç logaritmik faz saati olan 48. saatte pH değeri 7.63 tür. Fotosentetik bakteriler için optimum pH seviyesinin 7,1 ile 7,3 arasında olduğu bildirilmiştir (Koku vd., 2002). Maximum pH değerine *C.*

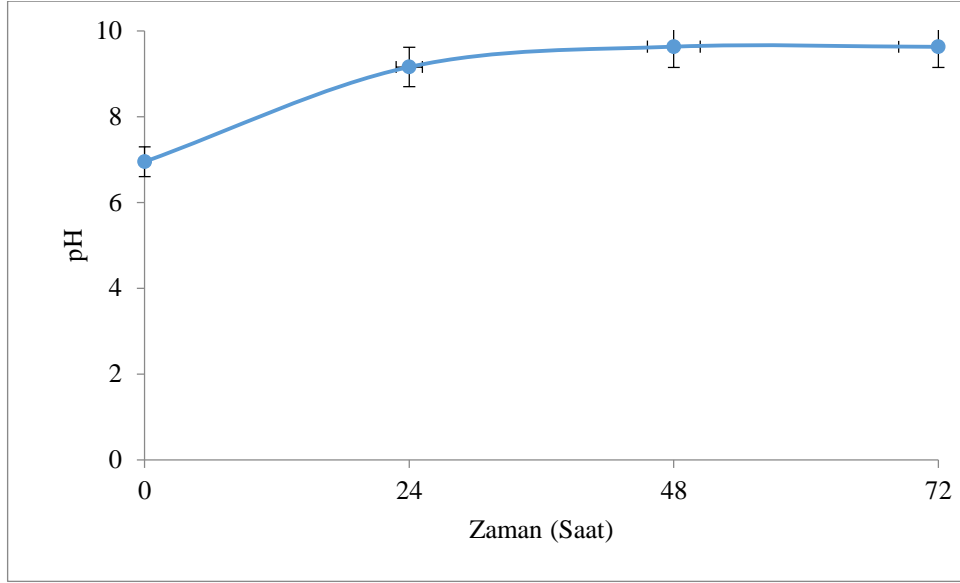
sphaeroides ve *C. necator* 168. saattte ulaşırken *R. palustris* 192. saatte ulaşmıştır. PHB ekstraksiyonu yapılan 48. saatte *C. sphaeroides* maximum pH değerine sahipken *R. palustris* en düşük pH değerine sahiptir.

4.1.2.2. Asetat besiyeri için pH analizi

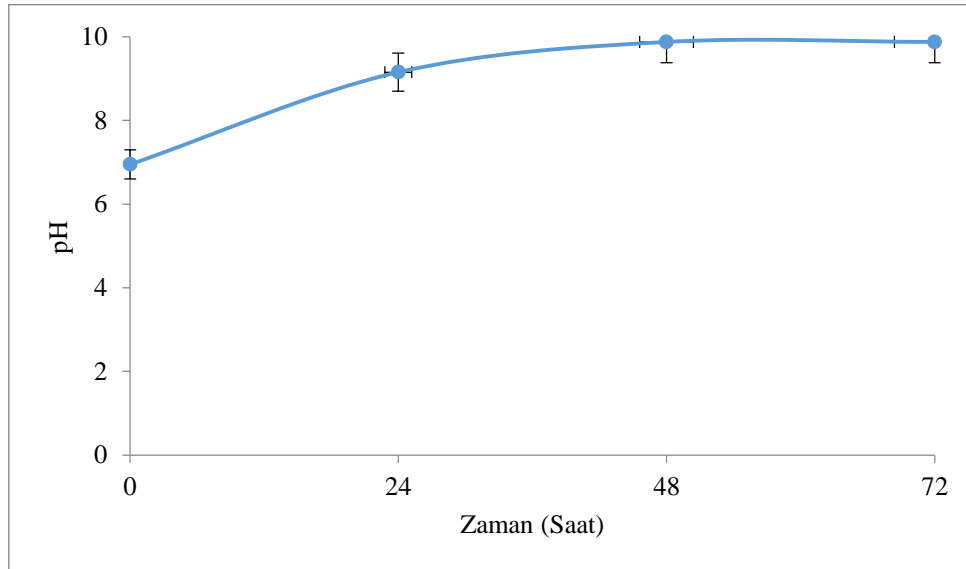
Deney başlangıcında ortamın pH değeri 6.80 olarak sabitlendi ve kültürlenmiş bakterilerin pH değişimleri ekstraksiyon aşamasına kadar (0, 24, 48 ve 72. saatlerde) ölçüldü. Bu çalışmada pH deneyi üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Şekil 4.10, 4.11, 4.12,'te melas besiyerinden asetat besiyerine aktarılan *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864), *C. necator* H16 (DSM 428), *R. palustris* (DSM 128)'in pH değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10. *C. sphaeroides* O.U.001(DSM 5864) 'in pH değerleri



Şekil 4.11. *C. necator* H16 (DSM 428)'un pH değerleri



Şekil 4.12. *R. palustris*(DSM 128) 'in pH değerleri

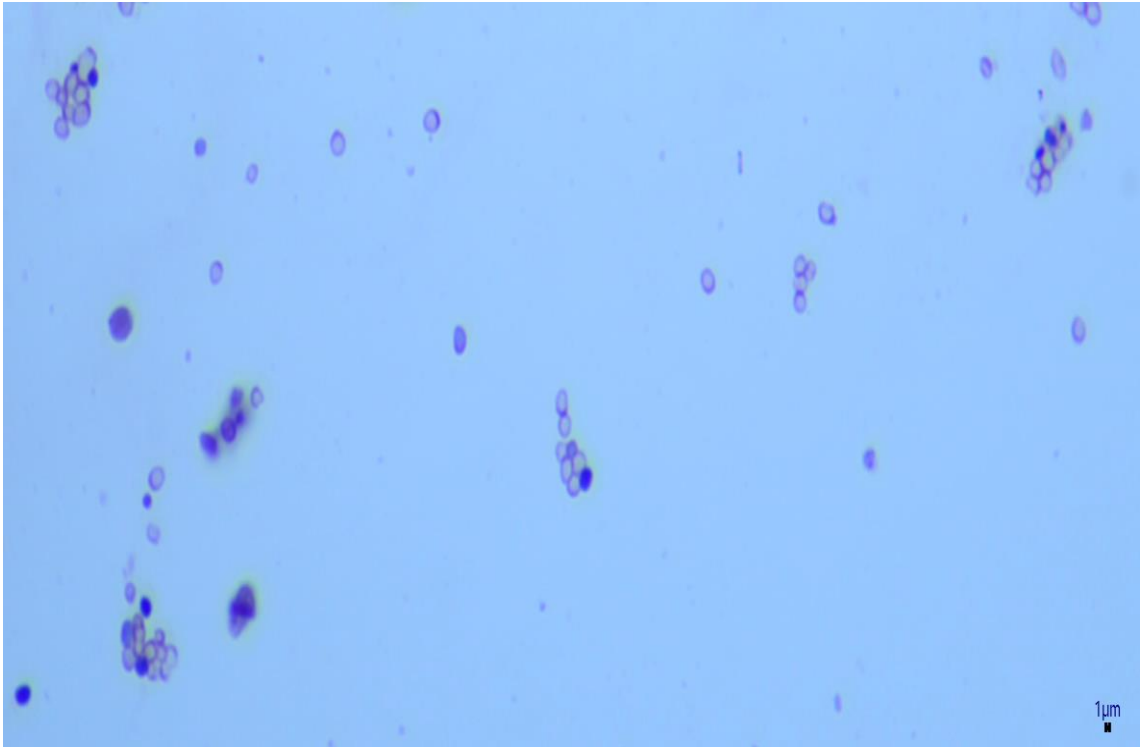
Grafiklere göre 3 bakterinin de başlangıç pH değeri ortalama 6.95 tir. *C. sphaeroides*, 6.95 başlangıç pH değerinden 72. saatte maximum 9.85 pH değerine çıkmıştır. *C. necator* 6.95 başlangıç pH değerinden 48. saatte maximum 9.63 pH değerinde ulaşmıştır. *R. palustris* 6.95 başlangıç pH değerinden 72. saatte maximum 9.87 pH değerine ulaşmıştır. Maximum pH değerine *C. sphaeroides* ve *R. palustris* 72. saatte ulaşırken *C. necator* 48. saatte ulaşmıştır. PHB ekstraksiyonu yapılan 72. saatte *C. sphaeroides* maximum pH değerine sahipken *C. necator* en düşük pH değerine

sahiptir. Fotosentetik bakterilerde biriken PHB miktarı, pH ve substrat türü gibi fizyolojik koşullara bağlıdır (Monroy & Buitrón, 2020).

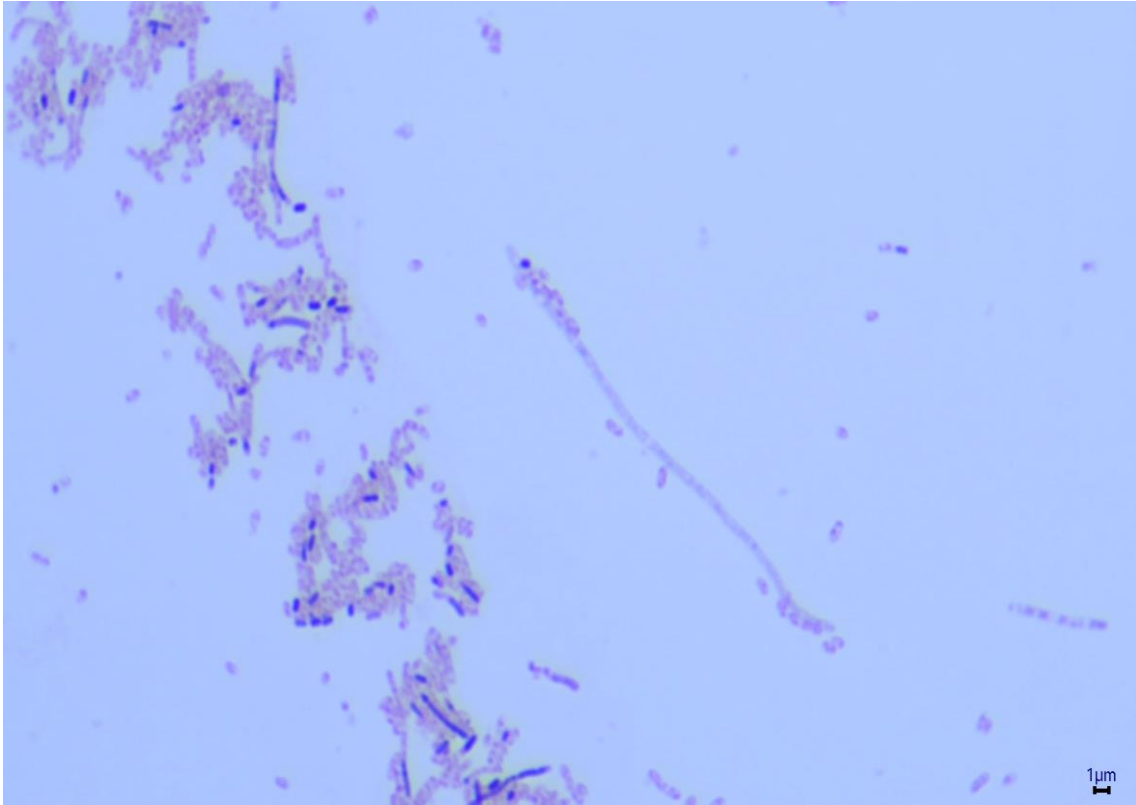
4.2. Boyama ve Mikroskop ile Görüntüleme

4.2.1. Sudan Black B boyama

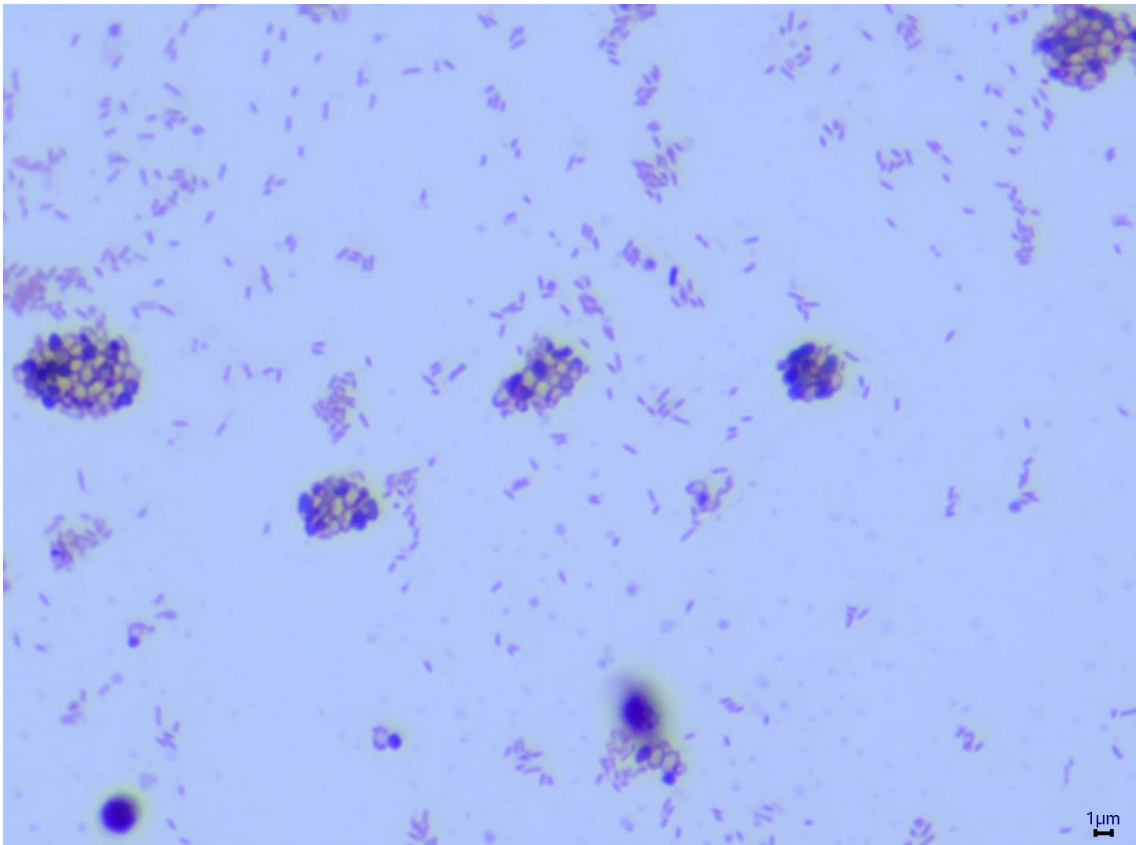
Maksimum PHB üretimi melas besiyeri için 48 saat, melas besiyerinden asetat besiyerine aktarılan bakteriler için 72 saat olduğundan bu saatlerde SBB boyası ile bakteriler boyandı (Şekil 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18). PHB biriktiren koloniler SBB boyası ile boyandığında mavimsi-siyah görünürken, PHB biriktirmeyen koloniler beyaz görünmektedir (Adnan vd., 2022).



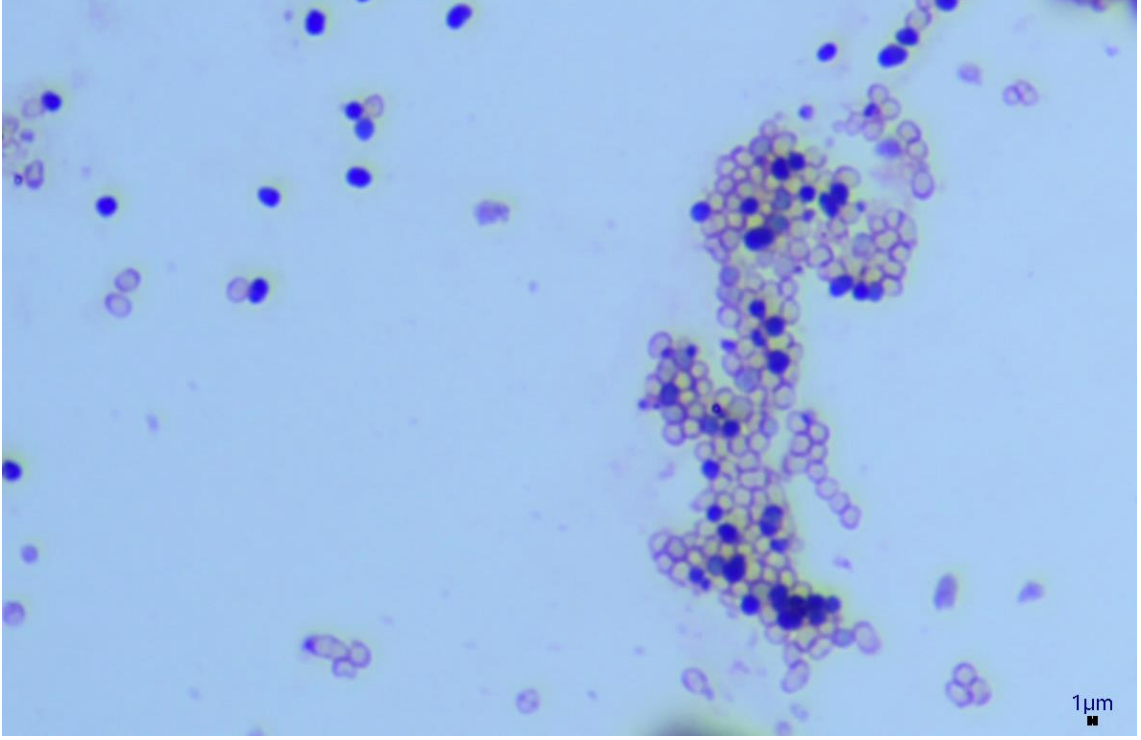
Şekil 4.13. Melas besiyerinde *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü



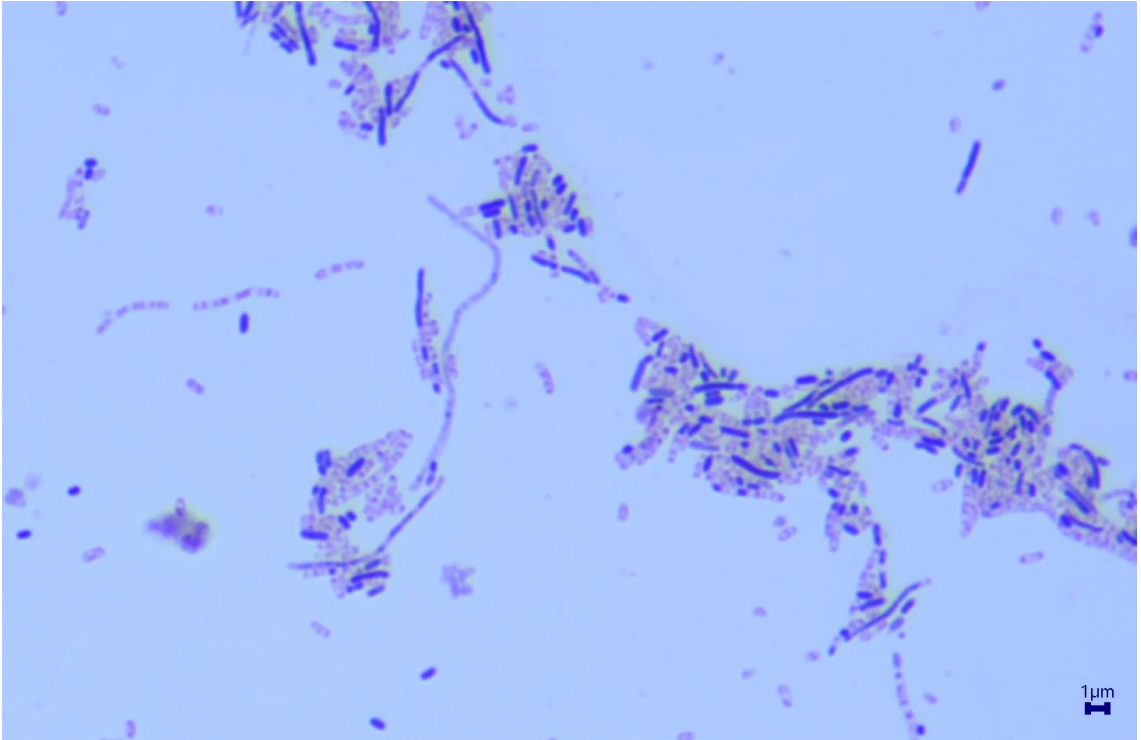
Şekil 4. 14. Melas besiyerinde *C. necator* H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü



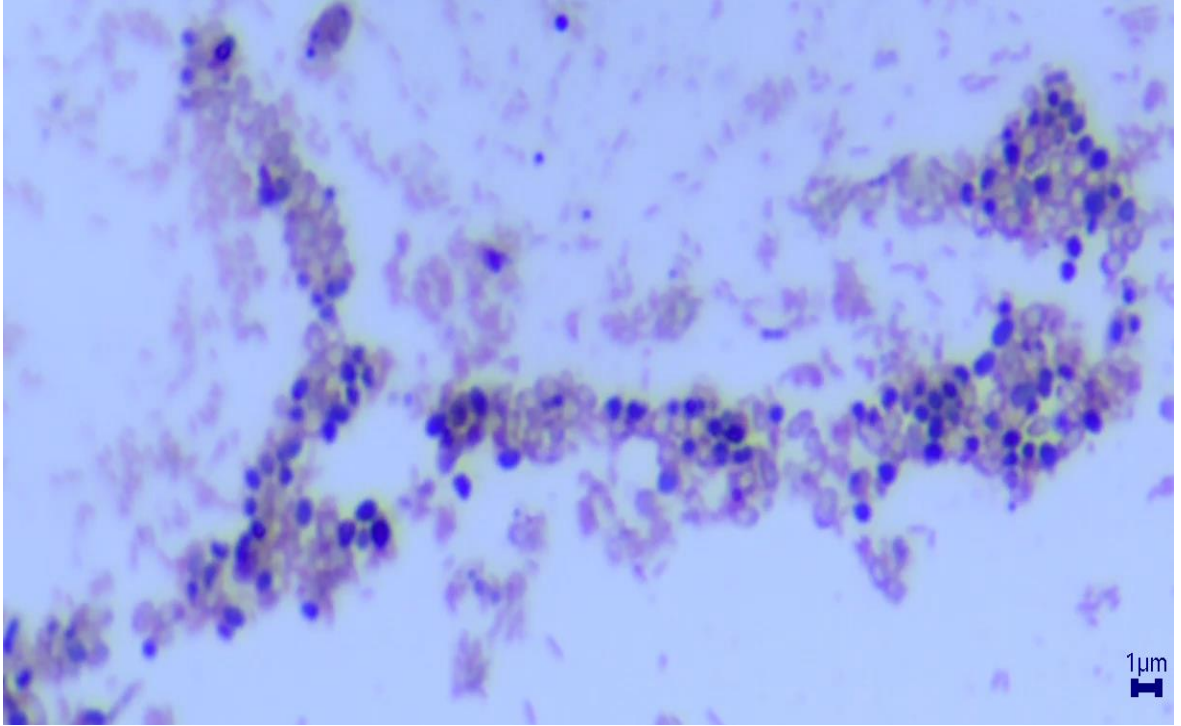
Şekil 4.15. Melas besiyerinde *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 100x görüntüsü



Şekil 4.16. Asetat besiyerine aktarılan *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü



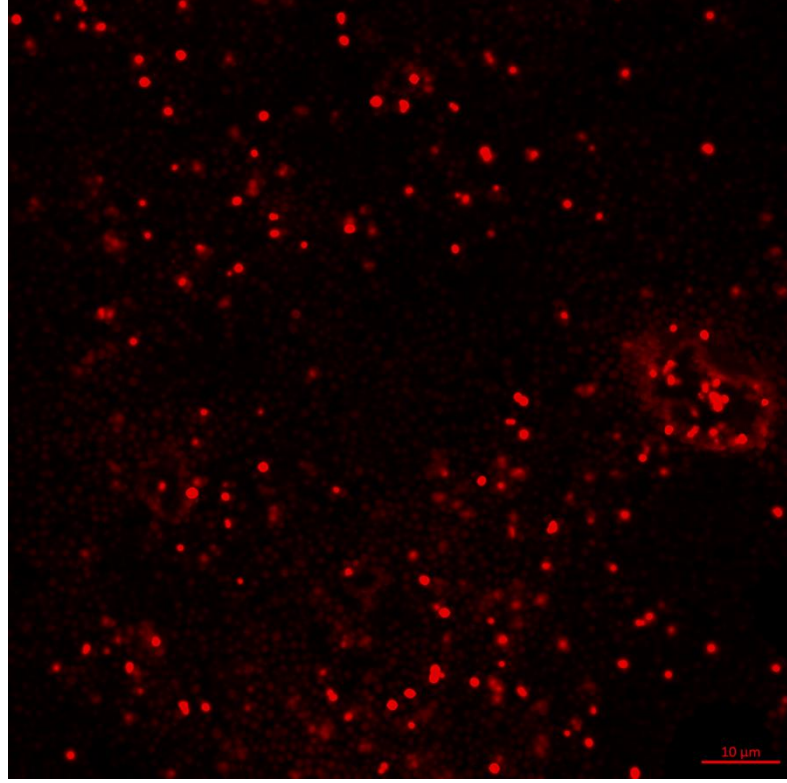
Şekil 4.17. Asetat besiyerine aktarılan *C. necator* H16 (DSM 428)'nin ürettiği PHB granüllerinin 100X görüntüsü



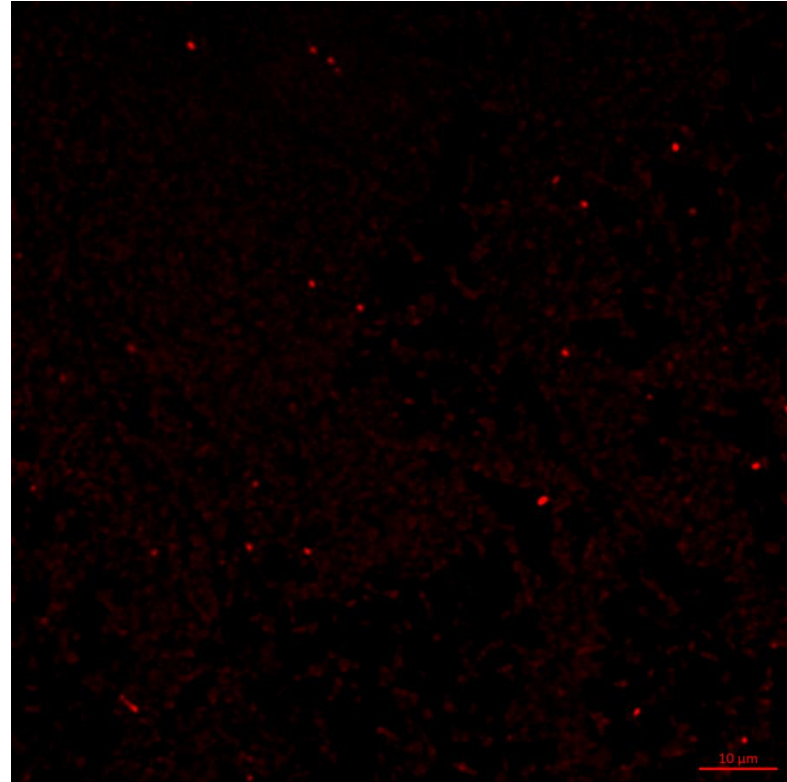
Şekil 4.18. Asetat besiyerine aktarılan *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 100x görüntüsü

4.2.2. Nile Red boyama

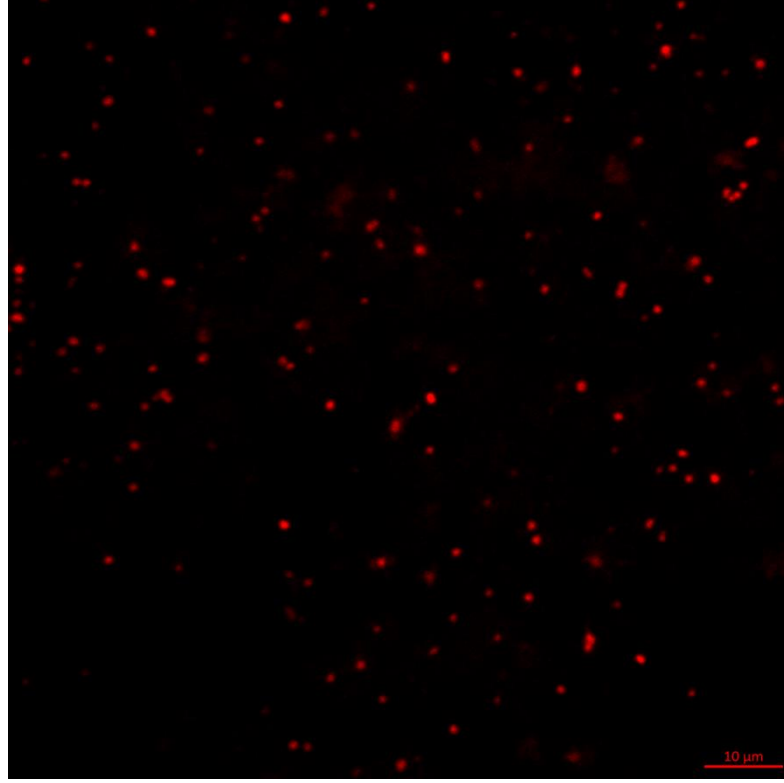
Nil red hücre içi PHB, membranlar ve lipit inklüzyon cisimleri gibi hidrofobik moleküllerin görselleştirilmesinde kullanılan lipofilik floresan bir boyadır. Bu boyama yöntemi hücre içi PHB'yi tanımlamak için hızlı ve kolay bir tekniktir (Juengert vd., 2018). Şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24'te bakteriler üzerindeki nil red boyaması gösterilmektedir. Nil red boyamasının pozitif sonuçları kırmızı-altın rengini göstermektedir.



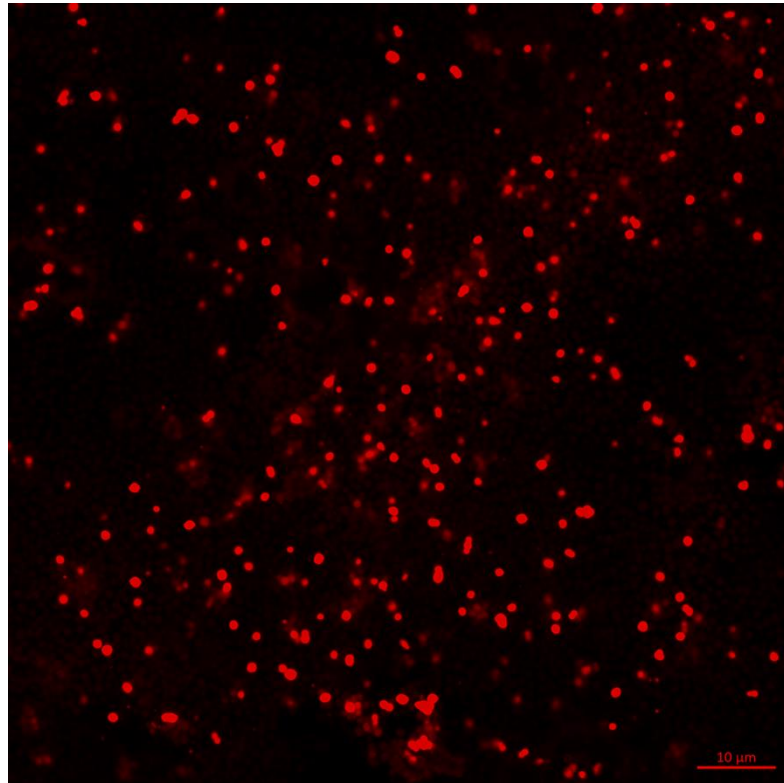
Şekil 4.19. Melas besiyerinde *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü



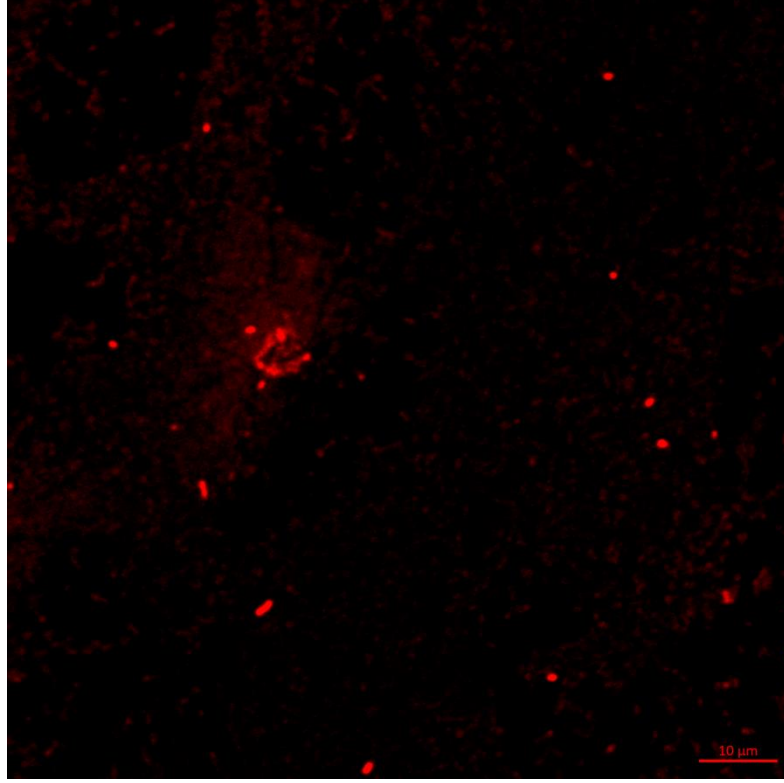
Şekil 4.20. Melas besiyerinde *C. necator* H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü



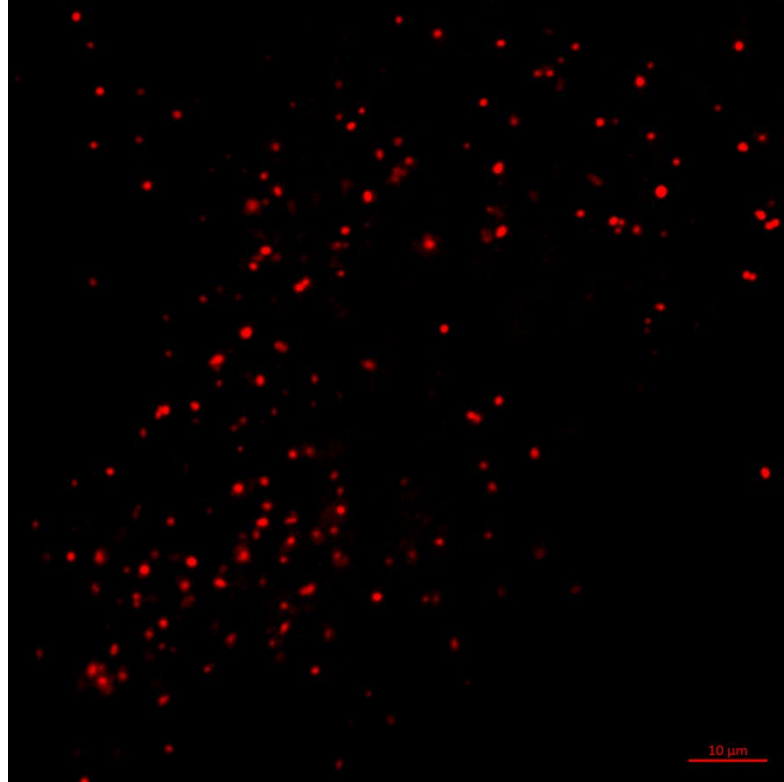
Şekil 4.21. Melas besiyerinde *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü



Şekil 4.22. Asetat besiyerine aktarılan *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)' in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü



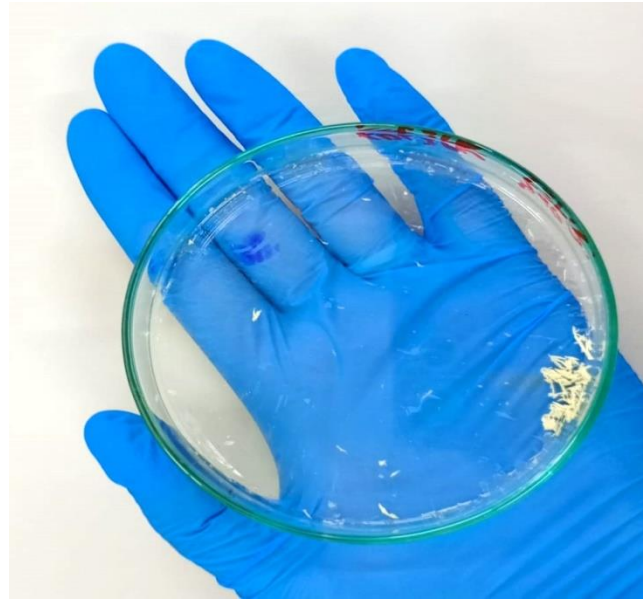
Şekil 4.23. Asetat besiyerine aktarılan *C. necator* H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü



Şekil 4.24. Asetat besiyerine aktarılan *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB granüllerinin 63X görüntüsü

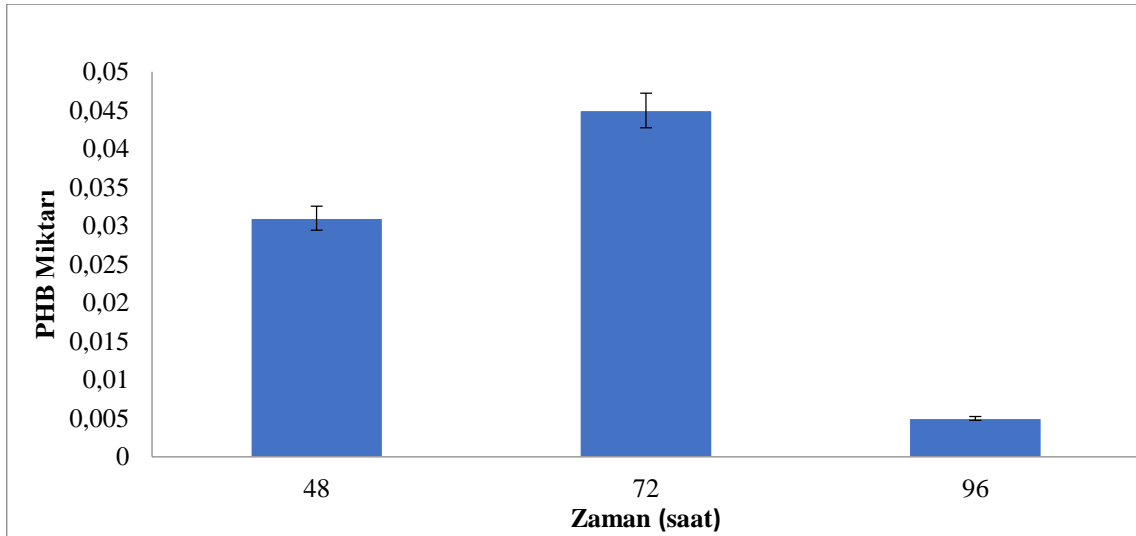
4.3. PHB Ekstraksiyonu

Fotosentetik bakteriler, besin sınırlayıcı koşullar ve fazla karbon kaynağı altında PHB biyopolimerini biriktirebilmektedir. PHB üretimiyle ilgili bir çalışmada, asetat ve amonyum ile en yüksek PHB içeriği (kuru hücre ağırlığının % 40'ı) bulunmuş ve asetat üretim için en avantajlı substrat olarak bildirilmiştir (Monroy & Buitrón, 2020). Bir çalışmada PHB üretimi için en iyi azot kaynağının amonyum klorür olduğu belirlenmiştir (Ertan, 2022). Bu nedenle bu tez çalışmasında besiyeri olarak asetat, azot kaynağı olarak amonyum klorür kullanılmıştır. PHB, çözücü ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Bakterilerin hücre kuru ağırlığı ölçüldü ve ekstrakte edilen PHB tartıldı ve daha sonra PHB verimi yüzdesi hesaplandı. Şekil 4.25'te ekstrakte edilen saf PHB gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Ekstrakte edilen saf PHB

Bakteriler melas ortamında büyütülüp asetat ortamına geçirildikten 48 saat sonra yapılan ekstraksiyonlardan beklenen sonuç alınamadı. Bunun sebebinin bakterilerin asetat ortamına adapte olamayarak PHB üretmedikleri olarak düşünüldü ve 48 saat inkübasyon süresi 72 ve 96 saat olarak tekrar denendi. Yapılan ekstraksiyon sonucunda 72 saat inkübasyon süresinde maximum PHB miktarına ulaşıldığı için deneylere 72 saat üzerinden devam edildi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Farklı inkübasyon sürelerinde üretilen PHB miktarı

Melas besiyerinde yüksek biyokütlelere ulaştırıp 70 mM asetat ortamına aktarma stratejisinin işe yarayıp yaramadığını görmek için melas besiyerinde büyütülmeden direkt 70 mM asetat besiyerinde büyütülen bakterilerden de ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstrakte edilen PHB ağırlıkları tartılmış ve farklı bakterilerden elde edilen PHB verimi ve miktarı Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bakteriler tarafından üretilen % PHB verimi

Bakteriler	Ortam	İnkübasyon süresi	Hücre kuru ağırlığı (CDW)g/L	PHB Miktar (g/L)	% PHB verimi (w/w)
<i>R. palustris</i>	Melas	48	2,5	0,007	% 0,29
<i>C. necator</i>	Melas	48	5,1	0,012	% 0,23
<i>C. sphaeroides</i>	Melas	48	1,1	0,006	% 0,54
<i>R. palustris</i>	Melas + Asetat	72	2,5	0,014	% 0,56
<i>C. necator</i>	Melas + Asetat	72	3,3	0,015	% 0,45
<i>C. sphaeroides</i>	Melas + Asetat	72	7,8	0,045	% 0,57
<i>C. necator</i>	Asetat	48	1,4	0,563	% 39,34
<i>C. sphaeroides</i>	Asetat	48	2,8	0,435	% 15,53

Çizelge 4.1’de gösterildiği gibi, melas besiyerinde *R. palustris*, *C. necator* ve *C. sphaeroides* sırasıyla, 2,5, 5,1 ve 1,1 g/L hücre kuru ağırlığına sahiptir. En yüksek hücre kuru ağırlığa *C. necator* sahipken en düşük kuru ağırlığa *C. sphaeroides* sahiptir. PHB miktarlarına bakıldığında en fazla PHB miktarına sahip *C. necator* (0,012 g/L), *R. palustris* (0,006 g/L) ve en az PHB miktarına sahip *C. sphaeroides* (0,006 g/L) dir. PHB verimliliğine bakıldığında melas besiyerinde en yüksek verimle PHB üreten bakteri *C. sphaeroides* iken en az verimle PHB üreten bakteri *C. necator*’dur. Hücre kuru

ağırlıklarının tespiti için kullanılan melastan kaynaklanan çökme sonuçların değişmesine neden olmuştur (Türkoğlu, 2009). *Rhizobium phaseoli* CIAT 899 suşuyla ilgili yapılan bir çalışmada % 0,5'lik melas konsantrasyonunda 96 saatlik inkübasyon sonunda % 29,43 verime ulaşmıştır (Türkoğlu, 2009). *Rhizobium spp.* ile ilgili yapılan başka bir çalışmada PHB verimi % 0,5'lik melas konsantrasyonunda % 24,23 olarak tespit edilmiştir (Avşar, 2017). *Rhizobium meliloti* Y11 suşu ile yapılan bir çalışmada melasın % 0,5 konsantrasyonunda maksimum % 56,31 oranında PHB ürettiği bulunmuştur (Mercan, 2002). *Bacillus subtilis* FI ve *Bacillus megaterium* PI suşları ile yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis* FI'nın % 0,5 melas konsantrasyonunda % 84,71 ve *Bacillus megaterium* PI'nın % 2 melas konsantrasyonunda % 85 verimlilikte PHB ürettiği bildirilmiştir (Ediz, 2004). *Rhizobium* ile yapılan başka bir çalışmada *Rhizobium leguminosarum* IFO 14778 suşunun % 0,5'lik melas konsantrasyonunda % 24,23 verimlilikle PHB ürettiği bildirilmiştir (Avşar, 2017). Karbon kaynağı olarak melas içeren optimize edilmiş PHB üretim besiyeri ortamında büyütülmüş olan *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* hücrelerindeki hücre içi PHB miktarının kuru hücre miktarı başına verimleri sırasıyla % 62,21 ve % 58,7 (w/w) olarak belirlenmiştir (Gomaa, 2014). Şeker pancarı melasının kullanılması, geleneksel mineral bazlı besiyerine kıyasla biyokütle üretiminde 2-3 kat artışla sonuçlanmıştır (Schmid vd., 2019). *Cupriavidus necator* ATCC 25207 suşuyla yapılan bir çalışmada melasta bulunan sükroz enzimatik (invertaz) ve kimyasal hidroliz (H₂SO₄) ile tamamen hidroliz edilip kullanılmıştır. Bu yöntemlerle ön işleme tabi tutulan melas çözeltileri ve hidroliz edilmeyen melas çözeltisi büyüme besiyerine eklenerek mikrobiyal büyümeler gerçekleştirilmiş, hidroliz edilmeyen melas içeren besiyerinde sükrozun az miktarda kullanıldığı ve sadece hücre büyümesinde tüketildiği ve hiç PHB üretilmediği bulunmuştur (Ertan, 2022). Benzer şekilde (Jafari ve Hejazi, 2024) melasın hidrolize uğramadan PHB üretimi üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. Melasa işlem uygulamadan önce çözünür halde olan bileşiklerin mikrobiyal büyüme üzerinde olumsuz bir etkisi olmazken, PHB üretiminde inhibisyon etki gösterdiği düşünülmektedir. Asitle hidrolize melas (55,00 g/L) içeren besiyerinin enzimatik hidrolize melas (55,00 g/L) besiyerine göre % 151,00 daha fazla PHB üretimi yapıldığını göstermektedir. Bu sonuçlar optimal PHB üretimi için asitle hidroliz edilen melasın daha uygun olduğunu göstermektedir (Ertan, 2022).

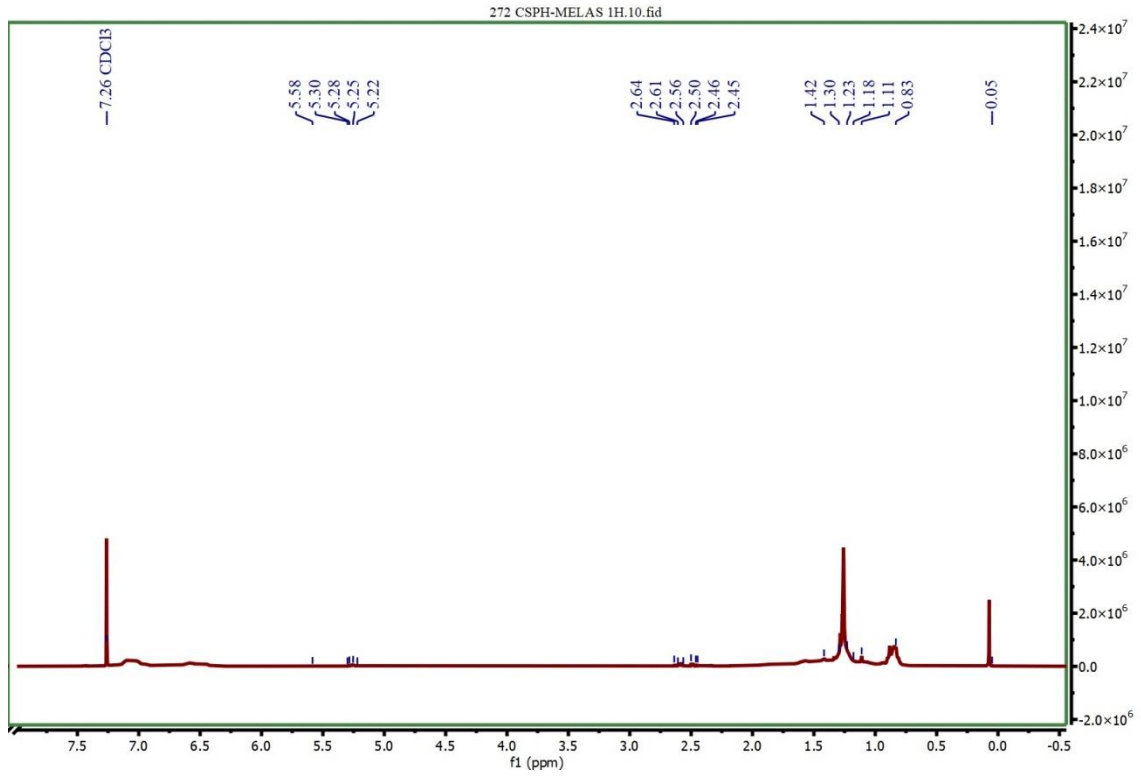
Melas besiyerinden sonra asetat besiyerine geçirilen bakterilere bakıldığında *R. palustris*, *C. necator* ve *C. sphaeroides* sırasıyla, 2,5, 3,3 ve 7,8 g/L hücre kuru ağırlığına sahiptir. En yüksek hücre kuru ağırlığına *C. sphaeroides* sahipken en düşük

kuru ağırlığa *R. palustris* sahiptir. PHB miktarlarına bakıldığında en fazla PHB miktarına sahip *C. sphaeroides* (0,045 g/L), *C. necator* (0,015 g/L) ve en az PHB miktarına sahip *R. palustris* (0,014 g/L) dir. PHB verimliliğine bakıldığında asetat besiyerine aktarılan bakterilerden en yüksek verimle PHB üreten bakteri *C. sphaeroides* iken en az verimle PHB üreten bakteri *C. necator*'dur. Asetat besiyeri ile yapılan bir çalışmada (Akpınar, 2023) *C. sphaeroides* 0,014 g, *R. palustris* 0,031 g, *C. necator* 0,005 g PHB üretmiştir. *C. sphaeroides* ve *C. necator* melas besiyerinde büyütülmeden direkt 70 mM asetat besiyerinde 48 saat inkübe edildikten sonra yapılan ekstraksiyon sonucunda sırasıyla % 15,53 ve % 39,34 verimlilikle PHB üretilmiştir. Bu da çalışmada uygulanan stratejinin başarısız olduğunu gösterip yüksek miktarda PHB üretmek için doğrudan 1 mM NH₄Cl ile hazırlanan 70 mM asetat besiyeri kullanılabileceğini göstermektedir.

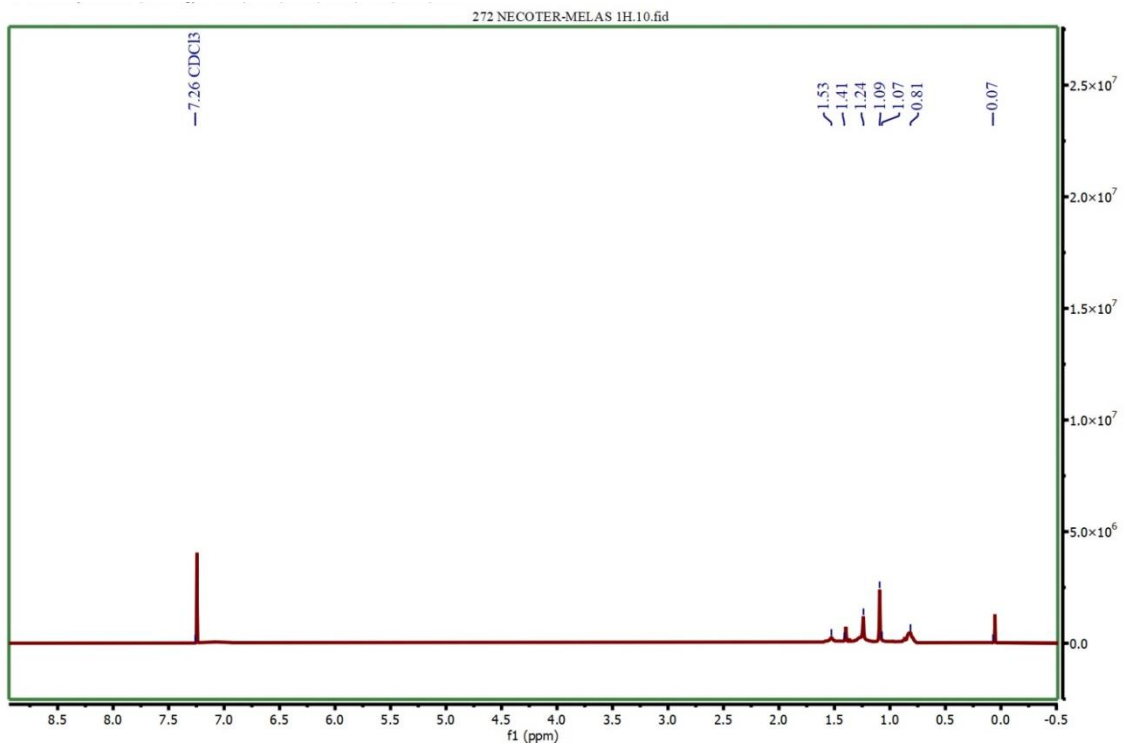
4.4. PHB Polimerlerinin Karakterizasyonu

4.4.1. NMR ile PHB karakterizasyonu

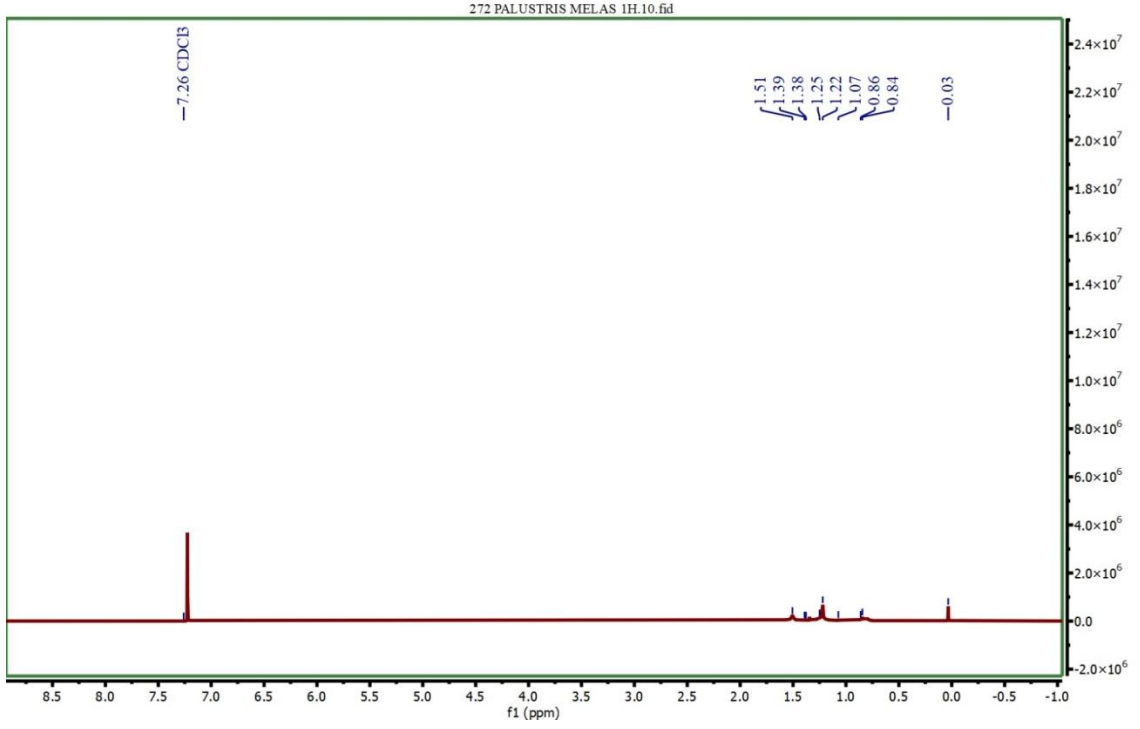
Bakterilerden ekstrakte edilen PHB, NMR spektroskopisi kullanılarak analiz edildi. Şekil 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33'te gösterildiği gibi NMR analizi, bakteriler tarafından üretilen polimerin polihidroksibutirat (PHB) olduğunu göstermiştir.



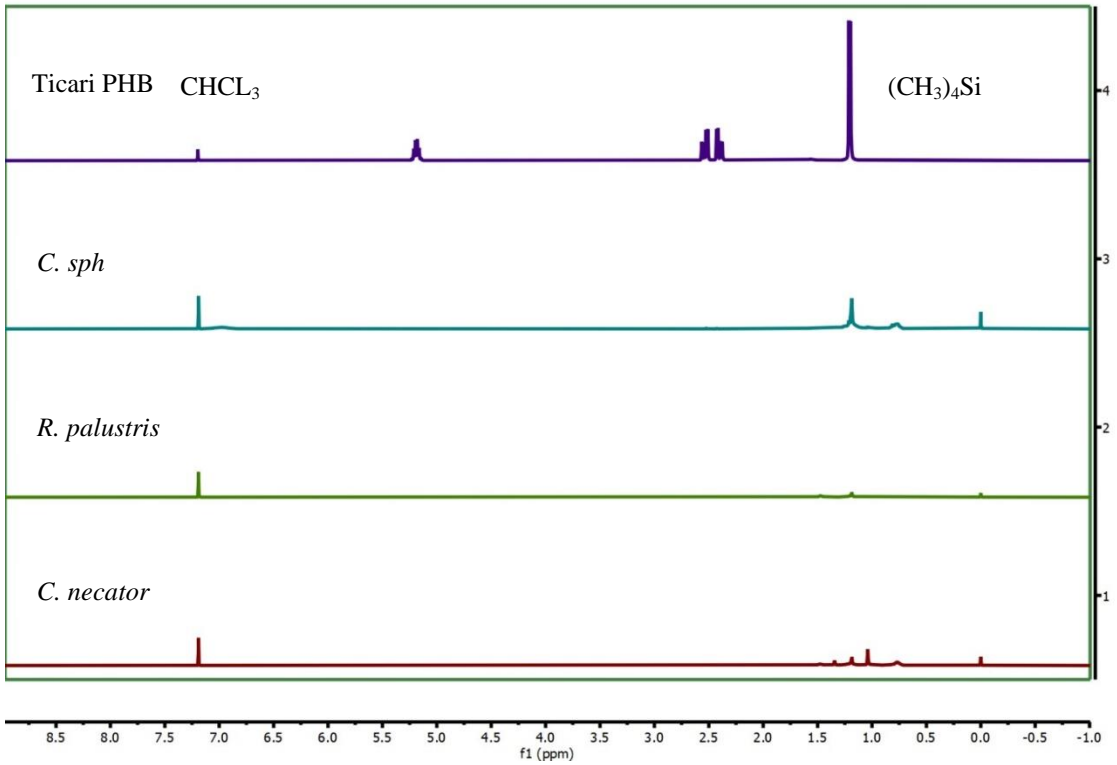
Şekil 4.27. Melas besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864) 'in ürettiği PHB' nin ^1H NMR spektrumu



Şekil 4.28. Melas besiyerinde büyütülen *C. necator* H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB' nin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 4.29. Melas besiyerinde büyütülen *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB'nin ¹H-NMR spektrumu

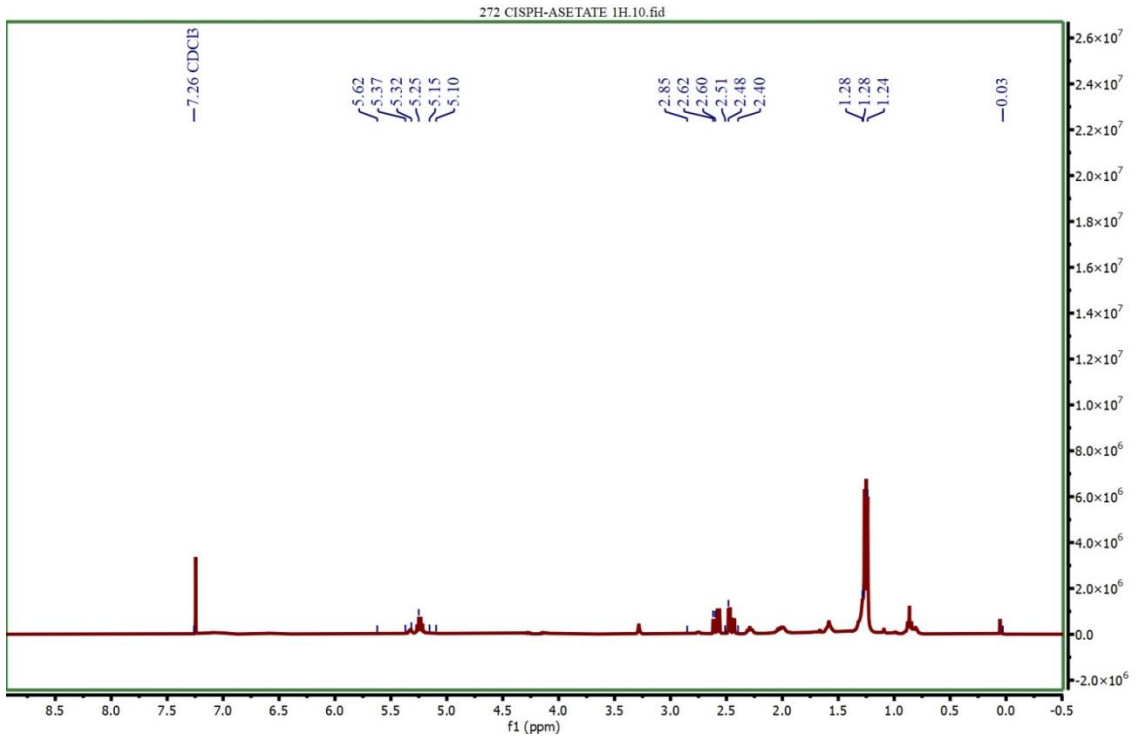


Şekil 4. 30. Standart ticari PHB ve melas besiyerinde büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin NMR spektrumunun karşılaştırılması

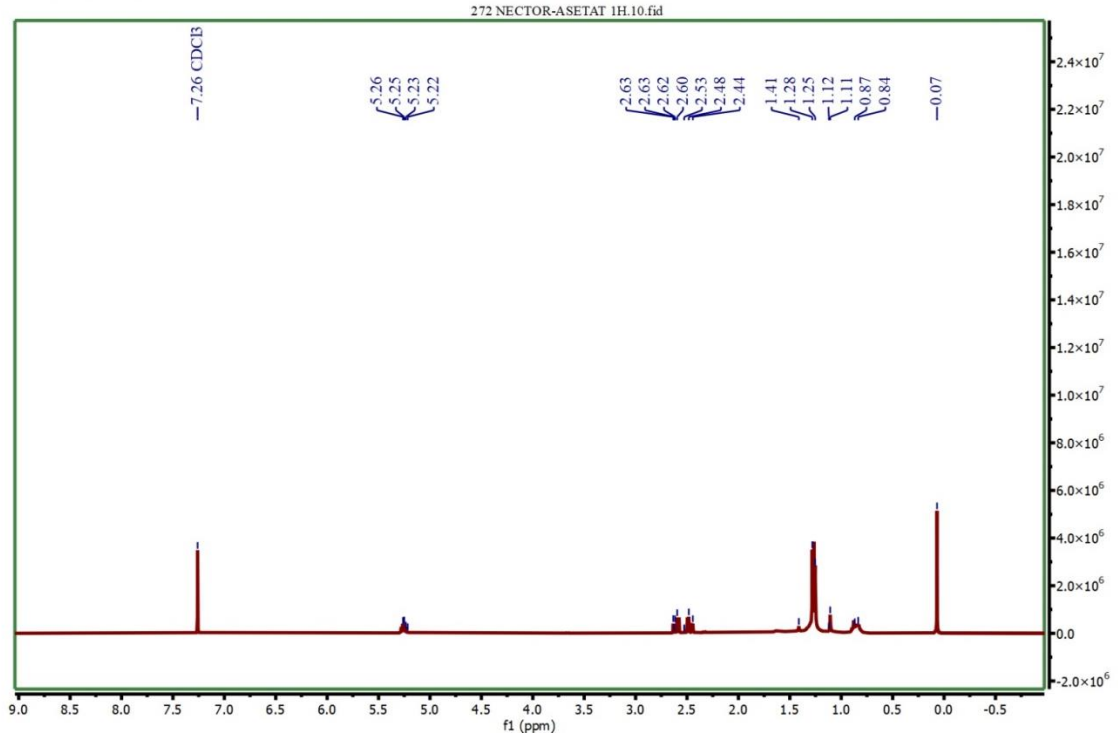
Çizelge 4.2’ de gösterildiği gibi, NMR zirveleri önceki çalışmalarla tutarlıdır. Bu çalışmada, 1.07-1.53 ppm arasındaki tepe, metil grubunun (-CH₃) varlığını, 2.45-2.64 ppm arasındaki tepe, metilen grubunun (-CH₂) varlığını ve 5.25- 5.58 ppm arasındaki tepe (-CH) varlığını gösterdi. *C. sphaeroides* PHB standardı ile aynı piklere sahipken *C. necator* ve *R. palustris* (-CH₂) ve (-CH) piklerine sahip değildir, bu piklerin olmaması kirlilik olarak düşünülebilir. Şekil 4.30’da gösterdiği gibi, 7.26 ppm’deki NMR zirvesi çözücüyü (CD₃Cl) ve 0.0 ppm’deki zirveler dahili standardı (CH₃)₄Si’yi temsil etmektedir.

Çizelge 4.2. Melas ortamında büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB ‘nin ¹H NMR zirveleri (ppm) ve karşılık gelen PHB yapısal grubu

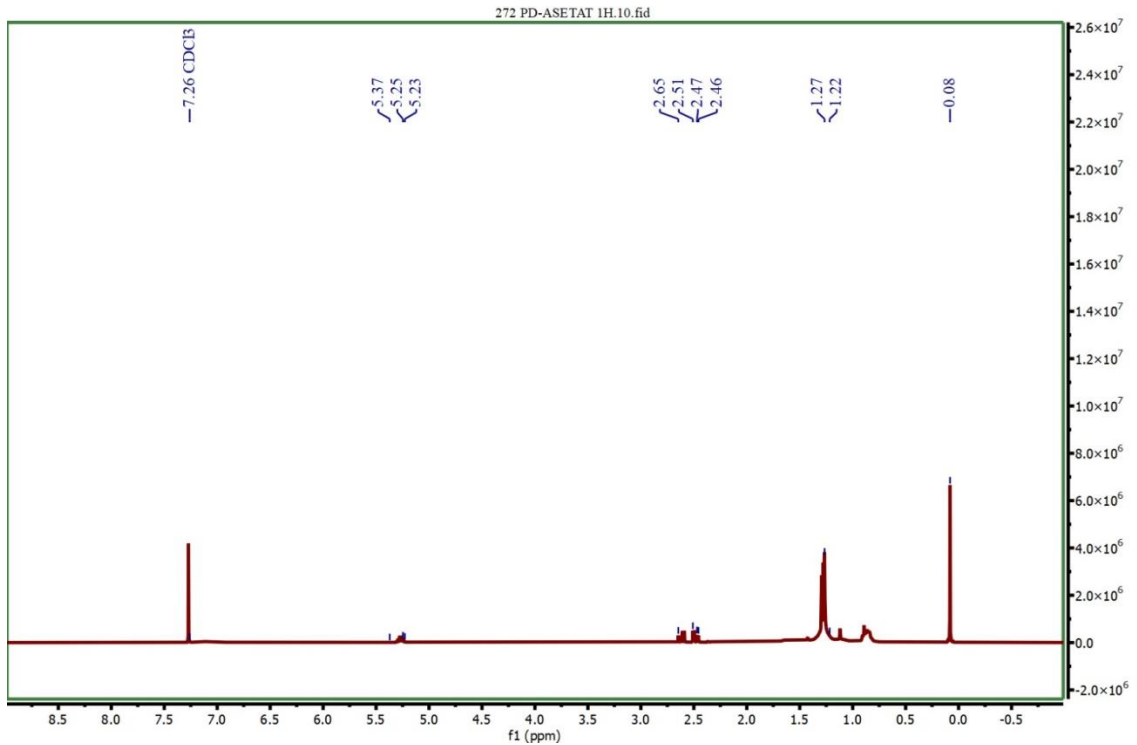
PHB yapısal grubu	¹ H NMR pikler (ppm)
CH ₃	1.07-1.53
CH ₂	2.45-2.64
CH	5.25-5.58
C=O	-



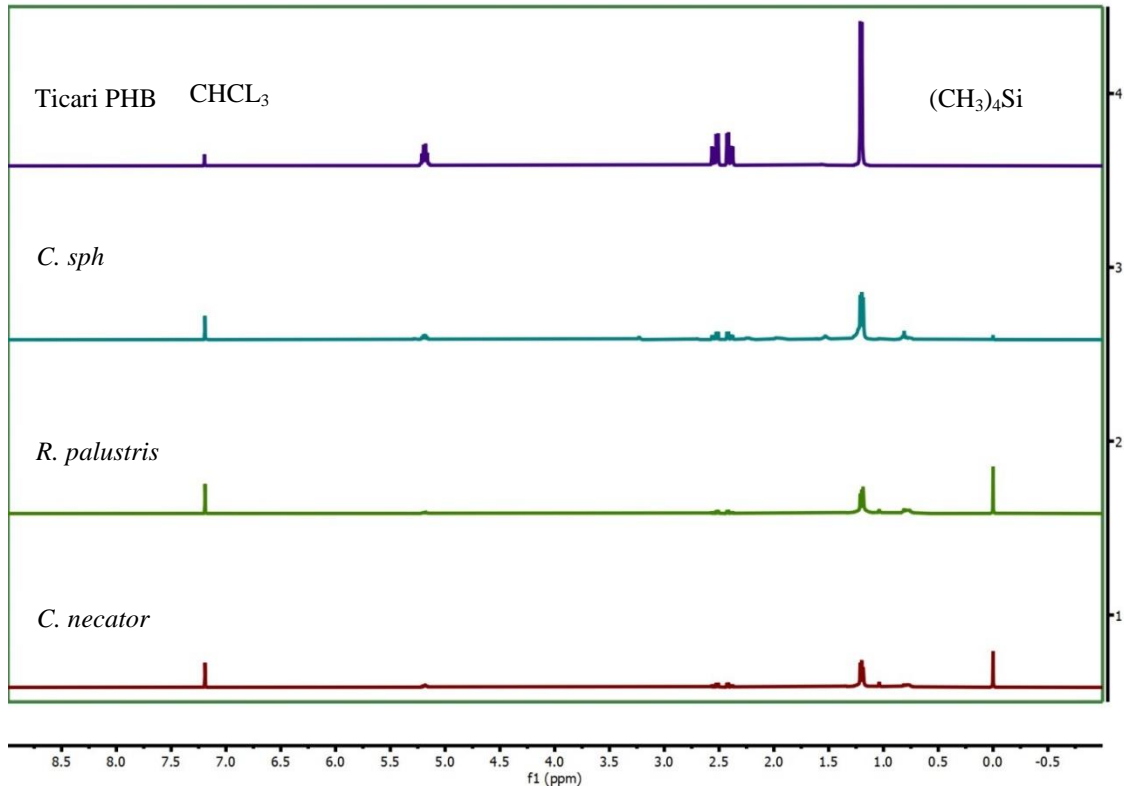
Şekil 4.31. Asetat besiyerine aktarılan *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864) ‘in ürettiği PHB’ nin ¹H NMR spektrumu



Şekil 4.32. Asetat besiyerine aktarılan *C. necator* H16 (DSM 428)'nin ürettiği PHB' nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 4.33. Asetat besiyerine aktarılan *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB' nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 4. 34. Standart ticari PHB ve asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin NMR spektrumunun karşılaştırılması

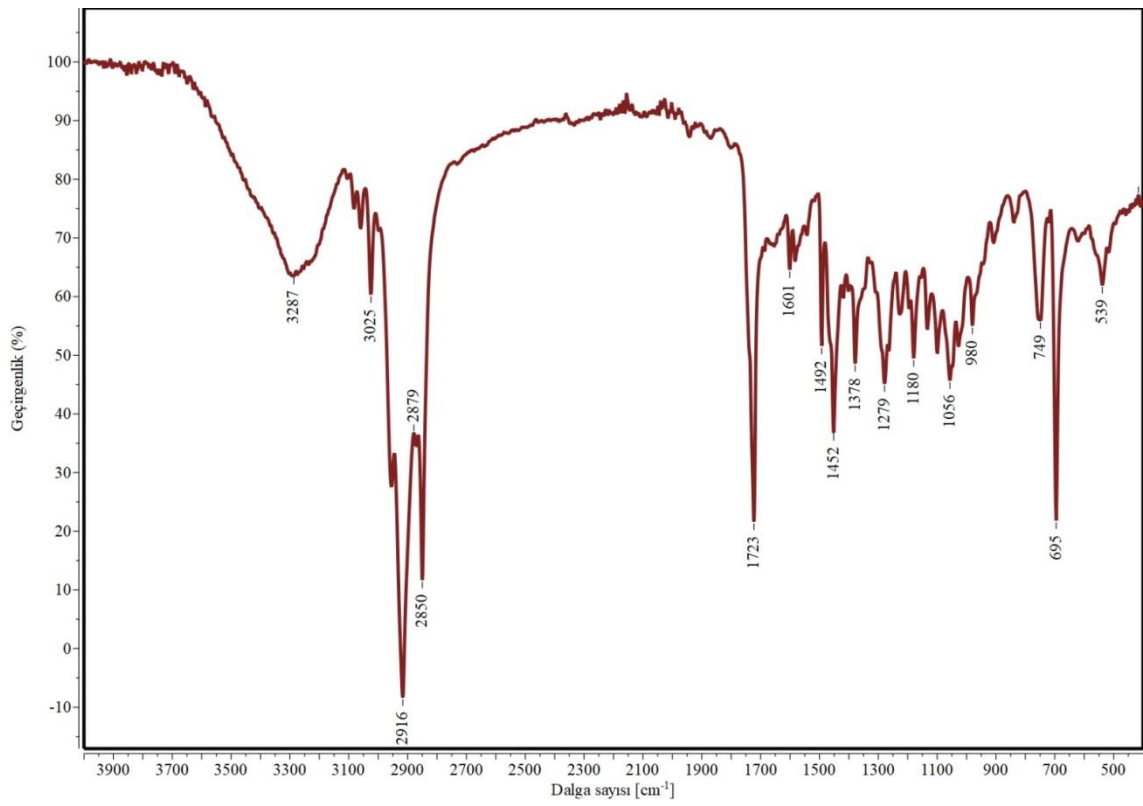
Şekil 4.31, 4.32 ve 4.33'de görüldüğü üzere metin (-CH), metilen (-CH₂) ve metil (-CH₃)'e karşılık gelen bir dizi karakteristik PHB tepe noktası görülmektedir (Aramvash vd., 2018). 1.11-1.41 ppm arasındaki tepe, metil grubunun (-CH₃) varlığını, 2.40-2.85 ppm arasındaki tepe, metilen grubunun (-CH₂) varlığını ve 5.22- 5.62 ppm arasındaki tepe (-CH) varlığını gösterdi (Çizelge 4.3). *C. sphaeroides*, *C. necator* ve *R. palustris* PHB standardı ile aynı piklere sahiptir. Bu da ekstrakte edilen maddenin PHB olduğunu göstermektedir. Şekil 4.34'te gösterildiği gibi, 7.26 ppm'deki NMR zirvesi çözücüyü (CD₃Cl) ve 0.0 ppm'deki zirveler dahili standardı (CH₃)₄Si'yi temsil etmektedir.

Çizelge 4.3. Asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin ¹H NMR zirveleri (ppm) ve karşılık gelen PHB yapısal grubu

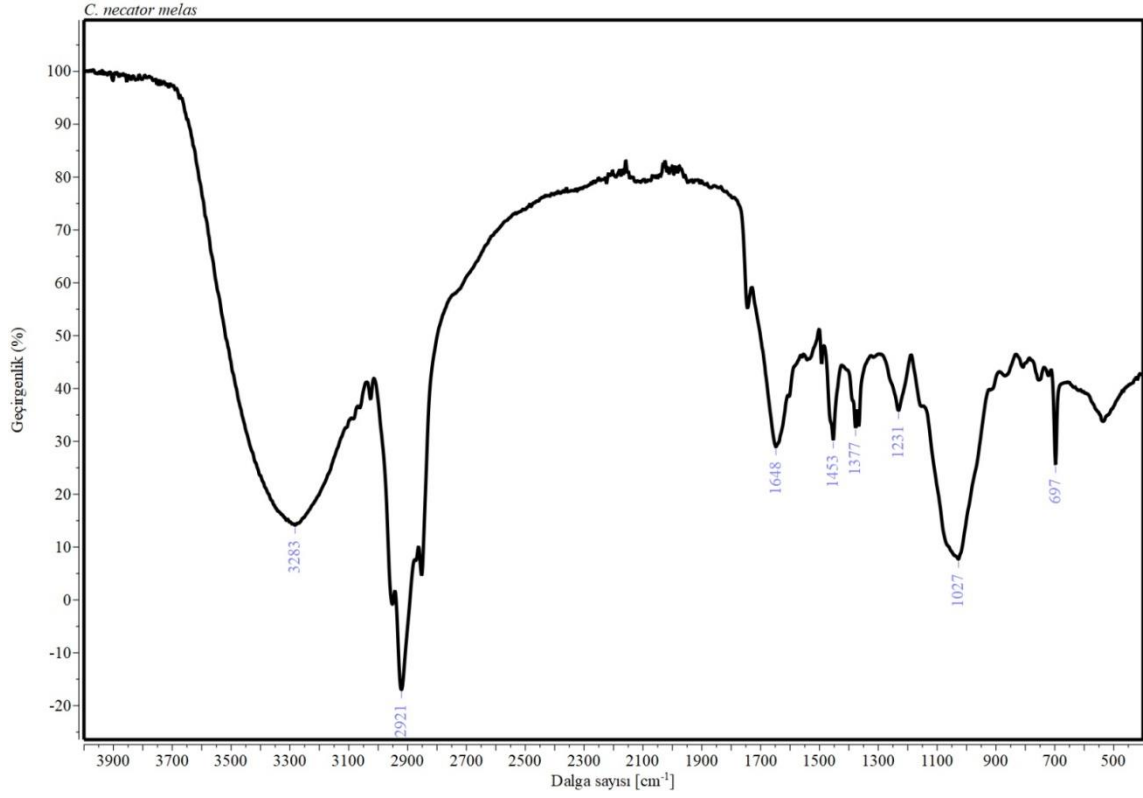
PHB Yapısal Grubu	¹ H NMR pikler (ppm)
CH ₃	1.11-1.41
CH ₂	2.40-2.85
CH	5.22-5.62
C=O	-

4.4.2. FTIR ile PHB karakterizasyonu

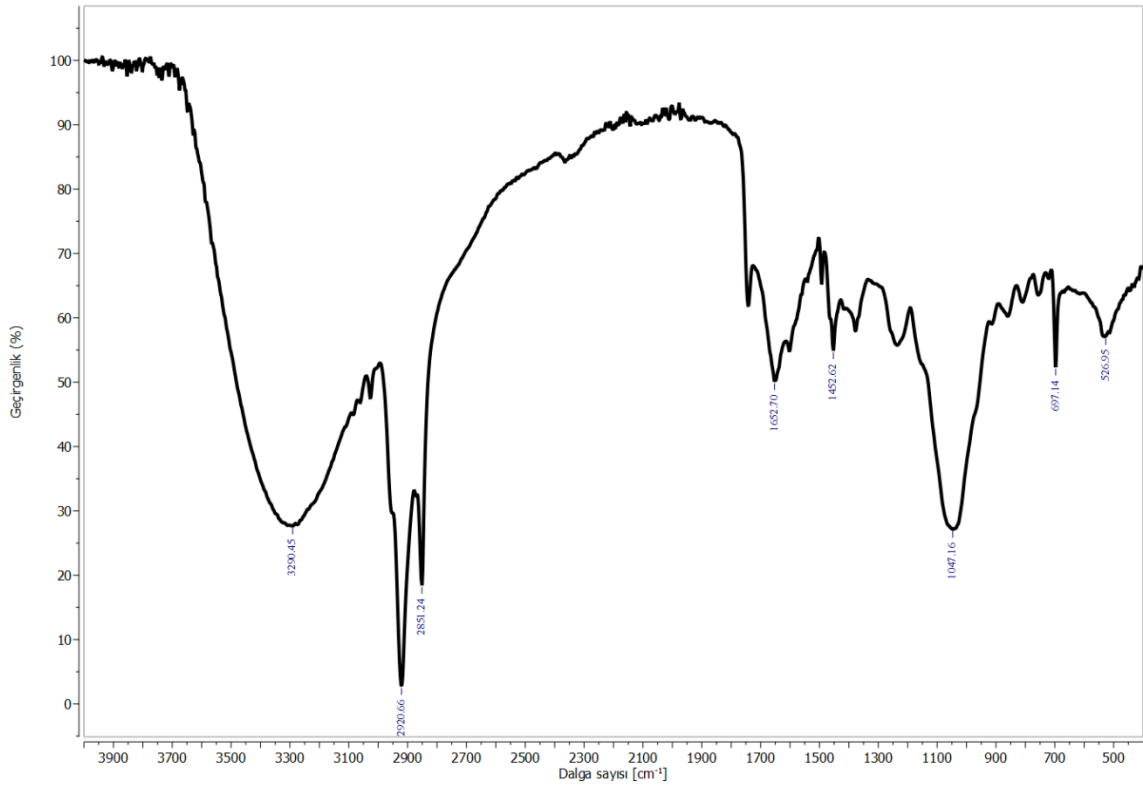
3 farklı bakteriden ve 2 farklı ortandan ekstrakte edilen PHB polimerinin fonksiyonel grupları FTIR ile analiz edildi. PHB'ye ait fonksiyonel gruplar, farklı pik noktalarına karşılık gelen dalga boyu ile karşılaştırılarak tanımlandı. FTIR pik dalga boyu sonuçları Şekil 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.40, 4.41, 4.42'de gösterilmiştir. Ticari standart ve bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin FTIR spektrumu 3900 ile 500 cm^{-1} arasında gözlenmiştir.



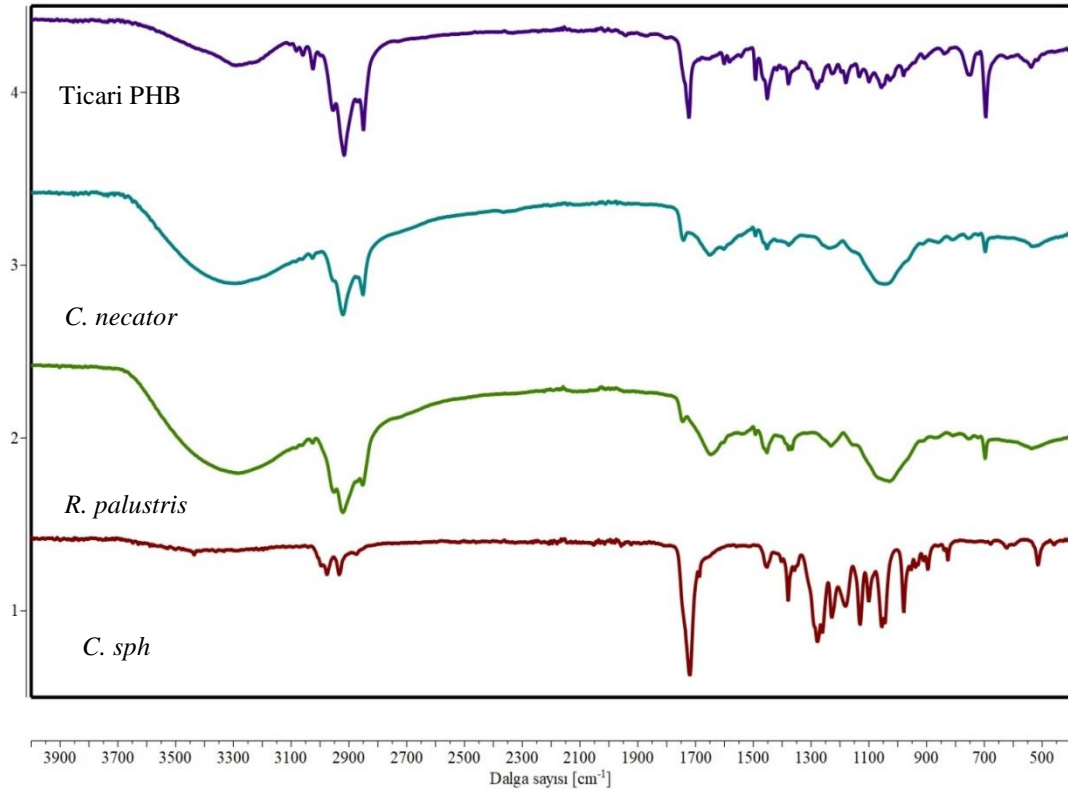
Şekil 4.35. Melas besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864) 'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



Şekil 4.36. Melas besiyerinde büyütülen *C. necator* H16 (DSM 428)'nin ürettiği PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm⁻¹)



Şekil 4.37. Melas besiyerinde büyütülen *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm⁻¹)

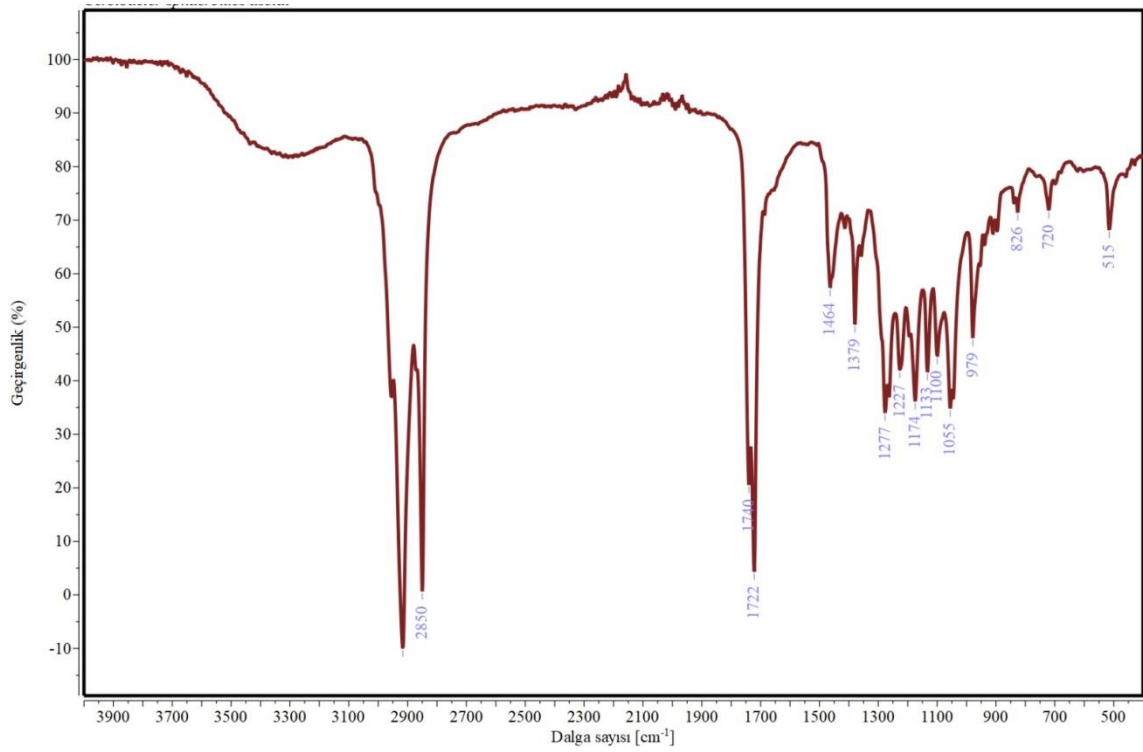


Şekil 4. 38. Standart ticari PHB ve melas besiyerinde büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm⁻¹) karşılaştırması

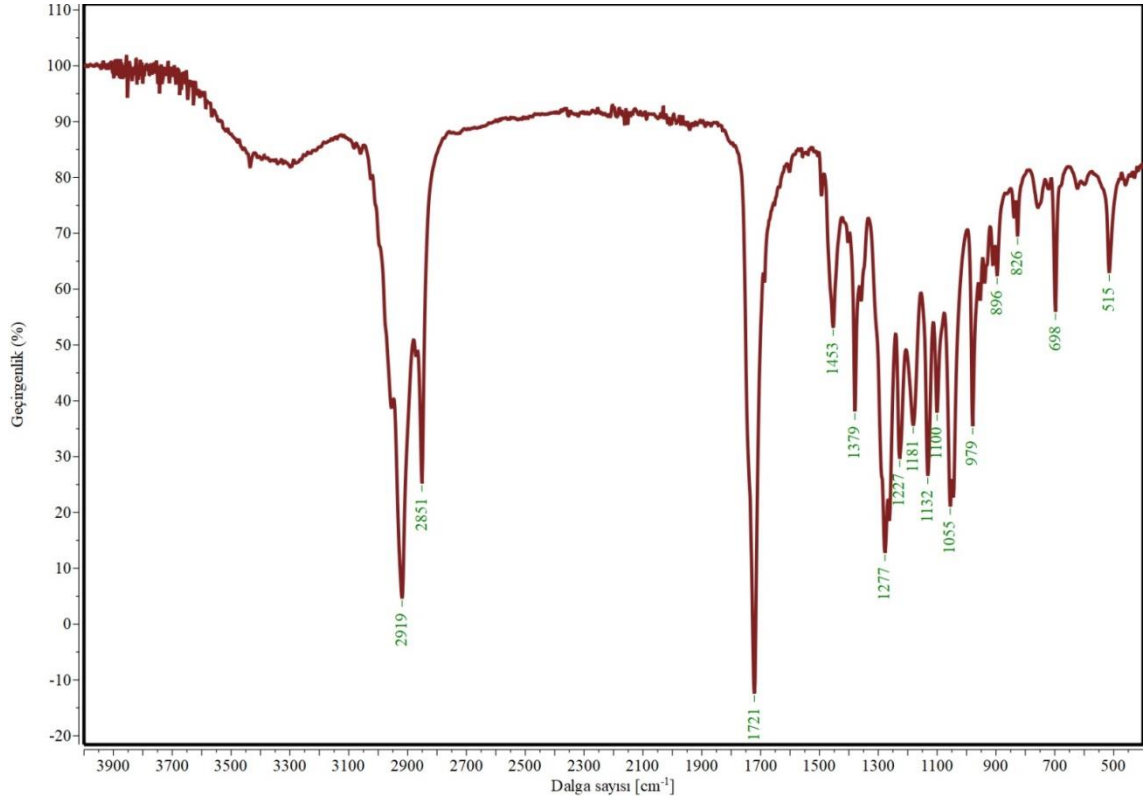
Analizden elde edilen FTIR spektrumlarına karşılık gelen fonksiyonel PHB grupları bir referans tablosu kullanılarak tespit edildi ve doğrulanmıştır. (https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table (Erişim tarihi 15.04.2025)). FTIR dalga boyuna karşılık gelen fonksiyonel PHB grupları Çizelge 4.4'te gösterilmektedir. Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi 1376-1378 cm⁻¹'deki absorpsiyon CH₃ grubunun varlığını, 1452-1453 cm⁻¹'deki absorpsiyon CH₂ grubunun varlığını, 2850-2921 cm⁻¹'deki absorpsiyon CH grubunun varlığını, 1647-1723 cm⁻¹'deki absorpsiyon C=O fonksiyonel grubunun varlığını, 1047-1056 cm⁻¹'deki absorpsiyon C-O grubunun varlığını, 3282-3290 cm⁻¹'deki absorpsiyon O-H grubunun varlığını göstermektedir. Benzer bir PHB absorpsiyon spektrumu Mekala ve Suganya tarafından bildirilmiştir (Mekala & Suganya, 2018).

Çizelge 4.4. Melas ortamında büyütülen bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm^{-1})

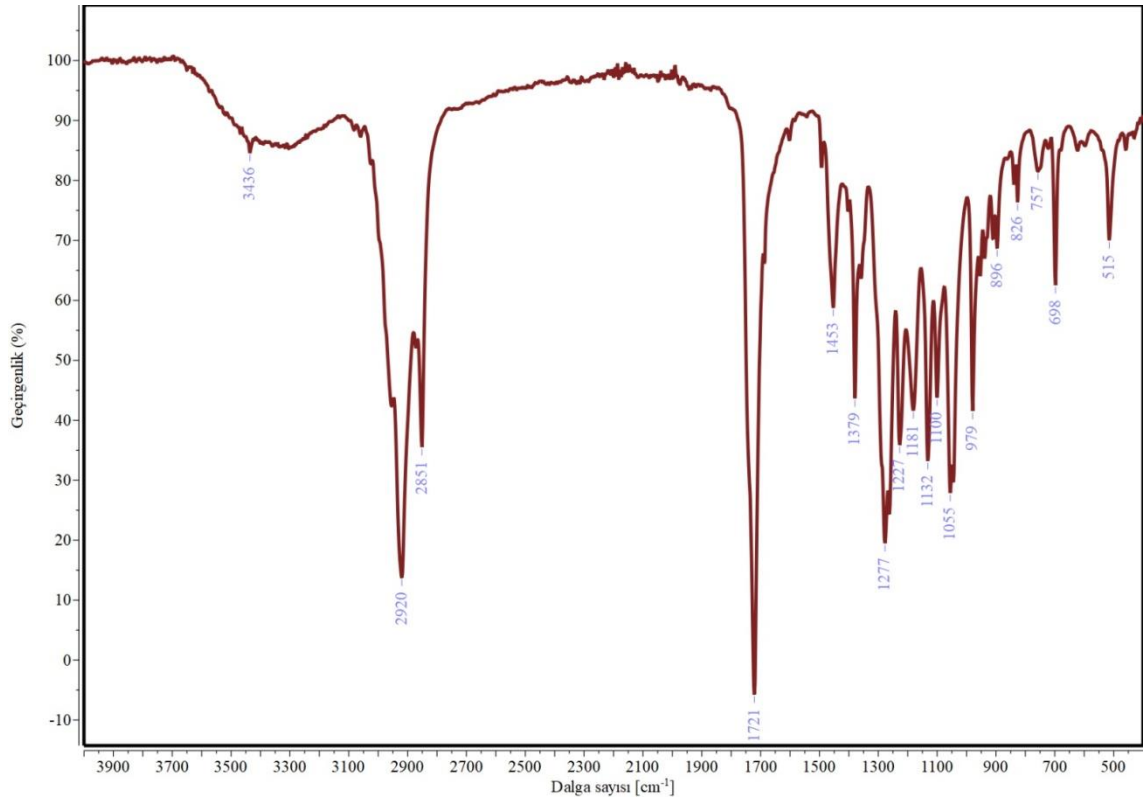
Fonksiyonel grup	FTIR dalga sayısı (cm^{-1})
CH_3	1376-1378
CH_2	1452-1453
C-H	2850-2921
C=O	1647-1723
C-O	1047-1056
O-H	3282-3290



Şekil 4.39. Asetat besiyerine aktarılan *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864) 'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})

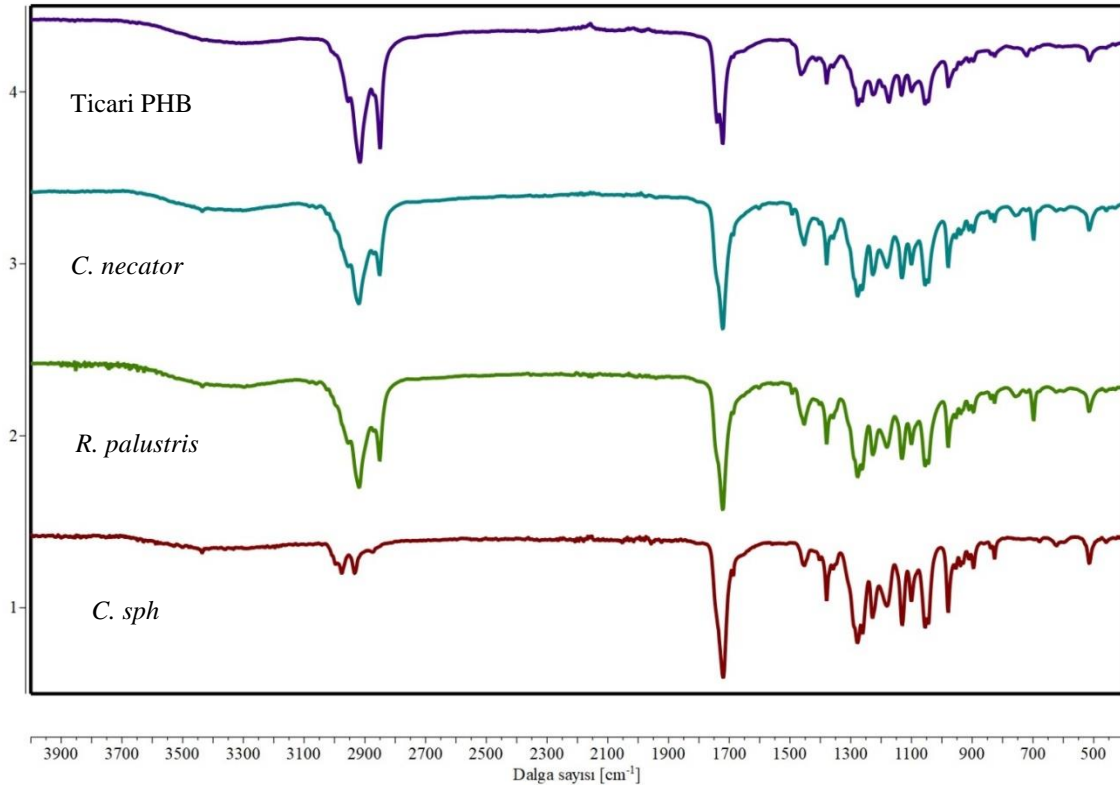


Şekil 4.40. Asetat besiyerine aktarılan *C. necator* H16 (DSM 428)'nın ürettiği PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



Şekil 4.41. Asetat besiyerine aktarılan *R. palustris* (DSM 128)'in ürettiği PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})

1)



Şekil 4. 42. Standart ticari PHB ve asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}) karşılaştırması

Analizden elde edilen FTIR spektrumlarına karşılık gelen fonksiyonel PHB grupları bir referans tablosu kullanılarak tespit edildi ve doğrulanmıştır. (https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table (Erişim tarihi 15.04.2025)). FTIR dalga boyuna karşılık gelen fonksiyonel PHB grupları Çizelge 4.5'de gösterilmektedir. Çizelge 4.5'de gösterildiği gibi 1379 cm^{-1} 'deki absorpsiyon CH_3 grubunun varlığını, $1453\text{-}1464 \text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon CH_2 grubunun varlığını, $2850\text{-}2851 \text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon CH grubunun varlığını, $1721\text{-}1722 \text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon $\text{C}=\text{O}$ fonksiyonel grubunun varlığını, 1055 cm^{-1} 'deki absorpsiyon C-O grubunun varlığını, 3436 cm^{-1} 'deki absorpsiyon O-H grubunun varlığını göstermektedir. Benzer bir PHB absorpsiyon spektrumu Ertan tarafından bildirilmiştir (Ertan, 2022).

Çizelge 4.5. Asetat besiyerine aktarılan bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm^{-1})

Fonksiyonel grup	FTIR dalga sayısı (cm^{-1})
CH ₃	1379
CH ₂	1453-1464
C-H	2850-2851
C=O	1721-1722
C-O	1055
O-H	3436

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Cereibacter sphaeroides, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Cupriavidus necator* PHB üretimi açısından çok yönlü ve farklı metabolizmalara sahip olmalarından dolayı moleküler biyoloji çalışmalarında sıkça kullanılan mikroorganizmalardır. Besin sınırlayıcı faktör altında mor kükürtsüz bakteriler PHB üretmektedir. Üç mikroorganizmanın melas ve asetat ortamında PHB üretimi araştırılmıştır. Bu çalışmada karbon kaynağı olarak melas (68 g), besin sınırlamasında azot kaynağı olarak NH₄CL (1mM) kullanılmıştır. *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*, melas ve 70 mM asetat ortamında büyümeleri ve PHB üretimi incelendi. Melas ortamında *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da sırasıyla 4,28, 3,35, ve 3,27 OD değerleri ve aynı sıra ile 8,05, 8,58 ve 8,37 pH değerleri ölçüldü. Asetat ortamında *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da sırasıyla 3,04, 2,96 ve 2,24 OD değerleri ve aynı sıra ile 9,85, 9,87 ve 9,63 pH değerleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek optik yoğunluk (4,28±0.03) *C. sphaeroides*'te gözlenmiştir. Bu sonuç, bu bakterinin karbon kaynağı olarak melası *R. palustris* ve *C. necator*'a kıyasla daha iyi kullanabileceğini göstermektedir.

Melasta büyütülen bakterilerden yapılan ekstraksiyon sonucunda 600 mL ile başlanılan bakteri kültürlerinde, *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. necator*'da sırasıyla 1,1, 2,5 ve 5,1 g hücre kuru ağırlıkları tespit edildi, aynı sıra ile 0,007 ve 0,012 ve 0,006 g PHB kuru ağırlıkları tartıldı. Asetat besiyerine aktarılan bakterilerden yapılan ekstraksiyon sonucunda *C. sphaeroides*, *R. palustris* ve *C. Necator*'da sırasıyla 7,8, 2,5 ve 3,3 g hücre kuru ağırlıkları tespit edildi, aynı sıra ile 0,045, 0,014 ve 0,015 g PHB kuru ağırlıkları tartıldı. PHB verimi incelendiğinde melas ortamında *C. sphaeroides* % 0,54, *R. palustris* % 0,29, *C. necator* % 0,23 verimlilikte PHB üretirken asetat ortamına aktarılan *C. sphaeroides* % 0,57, *R. palustris* % 0,56, *C. necator* % 0,45 verimlilikle PHB üretmiştir.

Bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin karakterizasyonu NMR ve FTIR ile yapıldı, kontrol ve standart referans olarak ticari PHB kullanıldı. Elde edilen PHB ile standart arasında çok büyük fark gözlenmedi. Sonuç olarak, bakterilerden biyoplastik üretimi, çevre için yeni bir alternatif yoldur. Ayrıca, biyopolimerlerin tıp ve biyomühendislik alanlarında kullanımı, petrol bazlı plastikler yerine gelecek vaat eden

bir çözümdür. Son olarak farklı bakteriler ve ortam şartlarında üretilebilecek biyopolimer miktarını artırmanın yolları hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

5.2. Öneriler

- ❖ Kullanılan melas miktarı değiştirilerek daha iyi sonuçlar alınabilir.
- ❖ Melas ön işleme tabi tutularak içerisindeki süktroz parçalanabilir.
- ❖ PHB ekstraksiyonunda kloroform yerine daha az zararlı çözücüler kullanılabilir.
- ❖ Daha büyük hücre hacminde çalışarak üretilen PHB miktarı artırılabilir.
- ❖ Kültür koşulları değiştirilerek PHB üretimi artırılabilir.
- ❖ Düşük maliyetle yüksek miktarda PHB üreten transgenik bitkilerin, rekombinant bakterilerin, alglerin ve ekstremofil organizmaların kullanımı verimliliği arttırabilir.
- ❖ PHB üretiminde safsızlık kontrol edilebilir. Böylece nihai PHB üretimi olarak kirlilik ortadan tamamen kaldırılmış olur.

6. KAYNAKLAR

- Adams, Jake., 2021, *Purple Non Sulfur Bacteria Now Available as a Coral Food from Hydrospace*, <https://reefbuilders.com/2021/02/25/purple-non-sulfur-bacteria-now-available-as-a-coral-food-from-hydrospace/>, [Ziyaret Tarihi: 09.11.2024].
- Adnan, M., Siddiqui, A. J., Ashraf, S. A., Snoussi, M., Badraoui, R., Alreshidi, M., Elasbali, A. M., Al-Soud, W. A., Alharethi, S. H., Sachidanandan, M., Patel, M., 2022, Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization, *Polymers*, 14 (19).
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., Roy, I., 2010, Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 732-743.
- Akdoğan, M., 2021, Polihidroksialkanoatların genetiği değiştirilmiş bakterilerde üretimi, karakterizasyonu ve matematiksel modellenmesi, Doktora tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-35.
- Akpınar, B. N., 2023, Asetat ortamında büyütülen *Cereibacter Sphaeroides* O.U. 001, *Rhodopseudomonas Palustris* 7850 ve *Cupriavidus Necator* H16 İle Polihidroksibütirat (Phb) üretimi ve üretilen polimerlerin karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 1-54.
- Akroum-Amrouche, D., Akroum, H., Lounici, H., 2019, Green hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*, *Energy Sources, Part A: Recover, Utilization, and Environmental Effects*, 1–19. <https://doi.org/10.1080/15567036.2019.1666190>.
- Albureikan, M. O., 2019, Classical and molecular detection of polyhydroxybutyrateproducing bacteria obtained from different habitats, *Journal of American Science*, 15 (3).
- Al-Shok, L., Town, J. S., Coursari, D., Wilson, P., Haddleton, D. M., 2023, Post-polymerisation modification of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) using thiol-ene and phosphine addition, *Polymer Chemistry*, 14 (22), 2734-2741. <https://doi.org/10.1039/d3py00272a>.
- Alsiyabi, A., Brown, B., Immethun, C., Long, D., Wilkins, M., 2021, Synergistic experimental and computational approach identifies novel strategies for polyhydroxybutyrate overproduction, *Metabolic Engineering*, 68, 1–13.
- Altaee, N., El-Hiti, G. A., Fahdil, A., Sudesh, K., and Yousif, E., 2016, Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil, *SpringerPlus*, 5 (1), 762.
- Anderson, A., ve Dawes, E., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54 (4), 450-472.

- Angra, V., Sehgal, R., Gupta, R., 2023, Trends in PHA production by microbially diverse and functionally distinct communities, *Microbial Ecology*, 85 (2), 572-585, <https://doi.org/10.1007/s00248-022-01995-w>.
- Ansari, S., Fatma, T., 2014, Polyhydroxybutyrate - a Biodegradable Plastic and its Various Formulations. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 3 (2), 9494–9499.
- 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>.
- Aramvash, A., Shahabi, Z., Aghjeh, S., Ghafari, M., 2015, Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*, *International Journal of Environmental Science Technology*, 12, 2307. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0768-3>.
- Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., Matsumoto, K., 2017, Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoates by SDS-sonication treatment, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124 (2), 250-254.
- Aşkın Demir, M., 2023, Biopolymer production potential from pickle brine effluent through microbial processes, Yüksek Lisans tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*, İstanbul, 1-6.
- Avşar, H., 2017, Yabani baklagil batkelerinden izole edilen *rhizobium spp.* türlerinin siderofor üretimi ve melas besi ortamında poly-β hidroksibütirat (PHB) üretim veriminin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kırşehir, 1-79.
- Babos, G., Rydz, J., Kawalec, M., Klim, M., Fodor-Kardos, A., Trif, L., Feczko, T., 2020, Poly (3-hydroxybutyrate)-based nanoparticles for sorafenib and doxorubicin anticancer drug delivery, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (19), 7312.
- Balaji, S., Gopi, K., Muthuvelan, B., 2013, A review on production of poly βhydroxybutyrate from cyanobacteria for the production of bio plastics, *Algal Research*, 2 (3), 278-285.
- Bajaj, B. K., Singh S., Khullar M., Singh K., Bhardwaj S., 2014, Optimization of fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (5), 653–662.
- Batcha, A. F. M., Prasad, D. R., Khan, M. R., Abdullah, H., 2014, Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) by *Cupriavidus necator* H16 from jatropha oil as carbon source, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37 (5), 943-951.

- Bellini, S., Tommasi T., Fino D., 2022, Poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis by *Cupriavidus necator*: A review on waste substrates utilization for a circular economy approach. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100985.
- Bera, A., Dubey, S., Bhayani, K., Mondal, D., Mishra, S., Ghosh, P. K. 2015, Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate using seaweed-derived crude levulinic acid as co-nutrient, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 487-494.
- Berry, R. M., Armitage, J. P., 2000, Response kinetics of tethered *Rhodobacter sphaeroides* to changes in light intensity, *Biophysical Journal*, 78 (3), 1207-1215.
- Billard, G., Wolch Boucher, J., 2019, The challenges of measuring plastic pollution, *Field Action Science Reports*, 19, 68-75.
- Bordes, P., Pollet, E., Averous, L., 2009, Nanobiocomposites: Biodegradable Polyester/Nanoclay Systems, *Progress in Polymer Science*, 34, 125-155.
- Bose, A., Gardel, E. J., Vidoudez, C., Parra, E. A., Girguis, P. R., 2014, Electron uptake by iron-oxidizing phototrophic bacteria, *Nat. Commun*, 5 (3391), 1-7.
- Brandl, H.; Gross, R.A.; Lenz, R.W.; Lloyd, R.; Fuller, R.C., 1991, The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*, *Arch. Microbiol*, 155, 337–340.
- Braunegg, G., Lefebvre, G., Genser, K. F. 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, *Journal of Biotechnology*, 65, 127–161.
- Brown, B., Immethun, C., Wilkins, M. Saha, R., 2020, *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 polyhydroxybutyrate production from a lignin aromatic and quantification via flow cytometry, *Bioresource Technology Reports*, 11, 100474, <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100474>.
- Burniol-Figols, I.V. Skiadas, A.E. Daugaard, H.N. Gavala, 2020, Polyhydroxyalkanoate (PHA) purification through dilute aqueous ammonia digestion at elevated temperatures, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 95 (5), 1519–1532, <https://doi.org/10.1002/JCTB.6345>.
- Byrom, D., 1987, Polymer synthesis by microorganisms - technology and economics, *Trends in Biotechnology*, 5 (9), 246-50.
- Calleja, S., 2020, State of the art in the purification of PHB's from biomass and new harmless extraction methods, Master Thesis, *Technischen Universität Berlin*, 5-20.
- Carlozzi, P., Giovannelli, A., Traversi, M. L., Touloupakis, E., Di Lorenzo, T., 2019, Poly-3-hydroxybutyrate and H₂ production by *Rhodopseudomonas sp.S16-VOGS3* grown in a new generation photobioreactor under single or combined

- nutrient deficiency, *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 821-828, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.220>.
- Chee, J.-Y., Yoga, S.-S., Lau, N.-S., Ling, S.-C., Abed, R. M., Sudesh, K., 2010, Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics, *Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1395-1404.
- Chen, G.Q., 2010, *Plastics from bacteria*, Microbiology Monographs, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-03287_5_3.
- Chen, G.-Q., König, K.-H. and Lafferty, R. M. 1991, Occurrence of poly-d (-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*, *FEMS Microbiology Letters*, 84 (2), 173-176.
- Choi, S.Y., Cho, I. J., Lee, Y., Kim, Y. J., Kim, K. J., Lee, S.Y., 2020, Microbial polyhydroxyalkanoates and nonnatural polyesters, *Adv. Mater*, DOI: 10.1002/adma.201907138.
- Cortés, A., Landázuri, A., Maldonado, J., 2008, Screening and isolation of PHB producing bacteria in a polluted marine microbial mat, *Microb Ecol*, 56, 112–120.
- Dalva, Klara., 2022, *Histokimyasal Boyalar Hk Notlar*, https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/140139/mod_resource/content/1/histokimyasal%20boyalar%20hk%20notlar.pdf. [Ziyaret Tarihi: 25 Kasım 2023].
- Daly, S. Fathi, A., Bahramian, B., Manavitehrani, I., McClure, D. D., Valtchev, P., Schindeler, A., Dehghani, F., Kavanagh, J. M., 2018, A green process for the purification of biodegradable poly (β hydroxybutyrate, *The Journal of Supercritical Fluids*, 135, 84-90.
- de Moraes Júnior W. G., Terrasan C. R. F., Fernández-Lorente G., Guisan J.M., Ribeiro E. J., de Resende M. M., Pessela B. C., 2017, Solid-phase amination of *Geotrichum candidum* lipase: ionic immobilization, stabilization and fish oil hydrolysis for the production of omega-3 polyunsaturated fatty acids, *European Food Research and Technology*, 243 (8), 1375-1384.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J. F. and Kapulnik, Y., 2001, Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*, *Functional Plant Biology*, 28 (9), 871-879.
- Domínguez-Díaz, M., Meneses-Acosta, A., Romo-Urbe, A., Peña, C., Segura, D., Espin, G., 2015, Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β hydroxybutyrate (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *Eur. Polym. J*, 63, 101–112.
- Doud, D. F. R., Holmes, E. C., Richter, H., Molitor, B., Jander, G., Angenent, L. T., 2017, Metabolic engineering of *Rhodospseudomonas palustris* for the obligate

- reduction of N-Butyrate to N-Butanol, *Biotechnol. Biofuels*, 10 (1), 178, doi:10.1186/s13068-017-0864-3.
- Ediz, N., 2004, Bazı *Bacillus* Cinsi bakterilerin melas besiortamında PHB üretimleri, toplam protein profilleri ve plazmid DNA'larının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1-112.
- Ediz, N., Beyatlı, Y., 2005, *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5, 1–22.
- Endres, H.-J., 2017, Biorefineries. In N. T. Kurt Wagemann (Ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Springer*, 166, 427-468.
- Ergene, E., 2015, Bazı *Bacillus* suşları ile melastan ekzopolisakkarit üretim koşullarının optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sakarya, 1-56.
- Ertan, F., 2022, Tarımsal atıklardan yüksek katma değerli ürünlerin elde edilmesi, Doktora Tezi, *Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze, 16-32.
- Fabela, S., Domenzain, C., De la Mora, J., Osorio, A., Ramirez-Cabrera, V., Poggio, S., Dreyfus, G., Camarena, L., 2013, A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*, *Journal of Bacteriology*, 195 (23), 5285-5296.
- Findlay, R. H., White, D. C., 1983, Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol*, 45, 1, 71-78.
- Fixen, K. R., Zheng, Y., Harris, D. F., Shaw, S., Yang, Z.-Y., Dean, D. R., 2016, Light-driven carbon dioxide reduction to methane by nitrogenase in a photosynthetic bacterium, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 113 (36), 10163–10167, doi:10.1073/pnas.1611043113.
- Fritts, R. K., LaSarre, B., Stoner, A. M., Posto, A. L., McKinlay, J. B., 2017, A Rhizobiales-specific unipolar polysaccharide adhesin contributes to *Rhodopseudomonas palustris* biofilm formation across diverse photoheterotrophic conditions, *Appl. Environ. Microbiol*, 83 (4), e03035–03016. doi:10.1128/AEM.03035-16.
- Garcia-Campo, M. J., Quiles-Carrillo, L., Masia, J., Reig-Pérez, M. J., Montanes, N., and Balart, R., 2017, Environmentally friendly compatibilizers from soybean oil for ternary blends of poly (lactic acid)-PLA, poly (ϵ -caprolactone)-PCL and poly (3-hydroxybutyrate)-PHB, *Materials*, 10 (11), 1339.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L., 2017, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Sci. Adv*, 3, e1700782.
- Ghaffar, AMEA. 2002, Development of a biodegradable material based on poly (3-hydroxybutyrate) PHB, Martin-Luther University, Wittenberg: 115.

- Gomaa E. Z., 2014, Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (1), 145–154.
- Gouda, M. K., Swellam, A. E. Omar, S. H., 2001, Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources, *Microbiological Research*, 156 (3), 201-207.
- Göksungur, Y., 1998, Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 19-63.
- Griebel R., Smith Z., Merrick J. M., 1968, Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta- hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*, *Biochemistry*, 7 (10), 3676–3681.
- Guan, C.-J., Ji, Y.-J., Hu, J.-l., Hu, C.-N., Yang, F., Yang, G.-E., 2017, Biotransformation of rutin using crude enzyme from *Rhodopseudomonas palustris*, *Curr. Microbiol*, 74 (4), 431–436. doi:10.1007/s00284-017-1204-3.
- Güngörmedi, G., 2012, Hidrokarbonla kirli topraklardan izole edilmiş mikroorganizmaların biyoplastik üretim yeteneklerinin belirlenmesi ve biyoplastığın karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 15-20.
- Halden, R. U., 2010, Plastics and health risks, *Annual Review of Public Health*, 31, 179-194.
- Hamdy, S. M., Danial, A. W., Gad El-Rab, S. M. F., Shoreit, A. A. M., Hesham, A. E. L., 2022, Production and optimization of bioplastic (Polyhydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* strain SH-02 using response surface methodology, *BMC Microbiology*, 22 (1), <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02593-z>.
- Hao, J., Wang, X., and Wang, H., 2017, Investigation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis from mixed culture enriched by valerate-dominant hydrolysate, *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 11 (1), 5.
- Harwood, C. S., 2022, *Rhodopseudomonas palustris*, *Trends in Microbiology*, 30 (3), 307-308, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.12.001>.
- Hassan, M. A., Bakhiet, E. K., G. Ali, S., Hussien, H.R., 2016, Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus sp.* isolated from Egypt. *J App Pharm Sci*, 6 (4), 46-51.
- 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>.
- Hazar Yoruç, A. B., Uğraşkan, V., 2017, Yeşil polimerler ve uygulamaları, *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, 17 (1), 318–337.

- Heinrich, D., M.H. Madkour, M.A. Al-Ghamdi, I.I. Shabbaj, A., 2012, Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite, *AMB Express* 2 (1), <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-59>.
- Hsu, C. W., Li, Y. C., Chu, C. Y., Liu, C. M., Wu, S. Y., 2014, Feasibility evaluation of fermentative biomass-derived gas production from condensed molasses in a continuous two-stage system for commercialization, *International Journal Of Hydrogen Energy*, 39, 19389 -19393.
- Imandi, S. B., Karanam, S. K., Nagumantri, R., Srivastava, R. K., Sarangi, P. K., 2023, Neural networks and genetic algorithm as robust optimization tools for modeling the microbial production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from Brewers' spent grain, *Biotechnol Appl Biochem*, 70:962–978. DOI: 10.1002/bab.2412.
- Jafari, M. S., Hejazi, P., 2024, Poly(3-hydroxybutyrate) production using supplemented corn-processing byproducts through *Cupriavidus necator* via solid-state fermentation: Cultivation on flask and bioreactor scale, *Journal of Biotechnology*, 392, 1-10.
- Jajesniak, P., Omar-Ali HEM., Wong, T. S., 2014, Carbon dioxide capture and utilization using biological systems: Opportunities and challenges, *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*, 4 (3), 1-15.
- Jendrossek, D., 2009, Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes), *Journal of Bacteriology*, 191 (10), 3195- 3202.
- 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, Y-M., Lee, Y-H., 2000, Utilization of oxidative pressure for enhanced production of poly- β -hydroxybutyrate and poly(3-hydroxybutyrate-3 hydroxyvalerate) in *Ralstonia eutropha*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90 (3), 266-270.
- Kam, Y. C., 2009, Cloning and characterization of an unusual Polyhydroxyalkanoate acid synthase (phaC) gene from a *Chromobacterium Sp.* isolated locally, Master Thesis, Doctoral dissertation, *Universiti Sains Malaysia*, 6-16.
- Kars, G., Alparslan, Ü., 2013, Valorization of sugar beet molasses for the production of biohydrogen and 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* OU 001 in a biorefinery concept, *International journal of hydrogen energy*, 38 (34), 14488-14494.
- 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>.

- Katırcıoğlu, H., Aksöz, N., 1996, Tek hücre proteini eldesi ve bunun *Drosophila* gelişimine etkisi, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 16 (2), 37-44.
- Kelleci, O., 2021, Odun biyopolimer kompozitlerin üretilmesi ve çok kriterli karar verme yöntemleri ile parametre optimizasyonu, Doktora tezi, *Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*, Bartın, 15-18.
- Keshavarz, T., Roy, I., 2010, Polyhydroxalkanoates: bioplastics with a green agenda, *In Current Opinion in Microbiology*, 13 (3), 321-326. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.02.006>.
- Kessler, B., Witholt, B., 2001, Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism, *Journal of Biotechnology*, 86 (2), 97- 104.
- Khosravi-Darani, K., and Bucci, D. Z., 2015, Application of poly (hydroxyalkanoate) in food packaging: Improvements by nanotechnology, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29 (2), 275-285.
- Kim, M. K., Choi, K.-M., Yin, C.-R., Lee, K.-Y., Im, W.-T., Lim, J.H., Lee, S.-T., 2004, Odorous swine wastewater treatment by purple non-sulfur bacteria, *Rhodospseudomonas palustris*, isolated from eutrophicated ponds, *Biotechnol. Let*, 26, 819-822.
- Kim, M. S.; Kim, D. H.; Cha, J., 2012, Culture conditions affecting H₂ production by phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* KD131, *Int J Hydrog Energy*, 37, 14055–14061.
- Kobayashi, J., Kondo, A., 2019, Disruption of poly (3- hydroxyalkanoate) depolymerase gene and overexpression of three poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic genes improve poly (3-hydroxybutyrate) production from nitrogen rich medium by *Rhodobacter sphaeroides*, *Microbial Cell Factories*, 18, 1–13.
- 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).
- Koller, M., 2014, Poly(hydroxyalkanoates) for Food Packaging: Application and Attempts towards Implementation, *ApplFood Biotechnol*, 1 (1), 3-15.
- Koller, M., 2018, Biodegradable and biocompatible polyhydroxy-alkanoates (PHA): auspicious microbial macromolecules for pharmaceutical and therapeutic applications, *Molecules*, 23 (2), 1-20.
- Koller, M., 2020, Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters from surrounding microbial biomass, *Eurobiotech. J*, 4 (3), 113–126, <https://doi.org/10.2478/EBTJ-2020-0013>.

- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., Braunegg, G., 2010, Microbial PHA production from waste raw materials, in plastics from bacteria: *Natural Functions and Applications*, Chen, G. G.-Q., 85-119, Springer Berlin Heidelberg.
- Krieg, N. R. ve Holt, J. G., 1984, *Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology*.-vol. 1, William and Wilkins, Baltimore, London.
- Kshirsagar, P. R., Kulkarni, S. O., Nilegaonkar, S. S., Niveditha, M., Kanekar, P. P., 2013, Kinetics and model building for recovery of polyhydroxyalkanoate (PHA) from *Halomonas campisalis*, *Separation and Purification Technology*, 103, 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.10.007>.
- Kumar, T., Singh, M., Purohit, H., Kalia, V., 2009, Potential of *Bacillus* sp. To produce polyhydroxybutyrate from biowaste, *Journal of Applied Microbiology*, 106 (6), 2017-2023.
- Kunasundari, B., Murugaiyah, V., Kaur G., Maurer F. H., Sudesh K., 2013, Revisiting the single cell protein application of *Cupriavidus necator* H16 and recovering bioplastic granules simultaneously, *PLoS One*, 8, e78528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078528>.
- Kurian, N. S., Das, B., 2021, Comparative analysis of various extraction processes based on economy, eco-friendly, purity and recovery of polyhydroxyalkanoate: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 183, 1881-1890, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.007>.
- Laranja, J. L. Q., Amar, E. C., Ludevese-Pascual, G. L., Niu, Y., Geaga, M. J., De Schryver, P., and Bossier, P., 2017, A probiotic *Bacillus* strain containing amorphous poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) stimulates the innate immune response of *Penaeus monodon* postlarvae, *Fish and Shellfish Immunology*, 68, 202-210.
- LeBlanc, R., 2017, How Long Does It Take Garbage to Decompose? The balance. <https://wasteadvantagemag.com/how-long-does-it-take-for-garbage-todecompose/> [Ziyaret Tarihi: 09.09.2024].
- Lee, S. Y., 1996, Review bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49 (1), 1-14.
- Lee Young, H., Chao, F., Turnbill, C., Philpott, D. E., 1972, Ultrastructure of *Pseudomonas saccharophila* at early and late log phase of growth, *Journal of Bacteriology*, 109 (2), 862-870.
- Lenz, R. W., and Marchessault, R. H., 2005, Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology, *Biomacromolecules*, 6 (1), 1-8.
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E. R., 2003, Bioplastics from microorganisms, *Current Opinion in Microbiology*, 6 (3), 251-260.

- Luo, J., Guo, S., Wu, Y., & Wan, Y., 2018, Separation of sucrose and reducing sugar in cane molasses by nanofiltration, *Food and Bioprocess Technology*, 11, 913-925.
- Mackenzie C., Eraso, J. M., Choudhary, M., Roh, J. H., Zeng, X., Bruscella, P., Puskás, A. and Kaplan, S., 2007, Postgenomic adventures with *Rhodobacter sphaeroides*, *Annual Review of Microbiology*, 61, 283-307.
- Madison, L. L., Huisman, G. W., 1999, Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic, *Mic Mo. Bio Reviews*, 63, 21-53.
- Marc, J., Grousseau, E., Lombard, E., Sinskey, A. J., Gorret, N., Guillouet, S. E., 2017, Over expression of GroESL in *Cupriavidus necator* for heterotrophic and autotrophic isopropanol production, *Metabolic Engineering*, 42, 74– 84. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.05.007>.
- Markl, E., Grünbichler, H., Lackner M., 2018, PHB-Bio Based and Biodegradable Replacement for PP: A Review, *Nov Tech Nutri Food Sci*, 2, 206-209.
- Marudkla, J., Patjawit, A., Chuensangjun, C., Sirisansaneeyakul, S., 2018, Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator DSM 545* using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite, *Agriculture and Natural Resources*, 52 (3), 266-273. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.09.009>.
- Martinez, V.; Henary, M., 2016, Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues, *Chemistry-A European Journal*, 22 (39), 13764-13782.
- Masaeli, E. M., M. Nasr-Esfahani, M. H., Sadri, S., Hilderink, J., Apeldoorn, A., Blitterswijk, C., Moroni, L., 2013, Fabrication, characterization and cellular compatibility of Poly (Hydroxy Alkanoate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *PLOS ONE*, 8, 1- 13.
- McAdam B., Brennan Fournet M., McDonald P., Mojicevic M., 2020, Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics, *Polymers*, 12 (12), 2908.
- McChalicher, C. W. J., Srienc, F., Rouse, D. P., 2010, Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate, *AIChE Journal*, 56 (6), <https://doi.org/10.1002/aic.12087>.
- McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., & Cannon, M. C., 1996, Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, *FEMSMicrobiology Letters*, 138 (1), 41–48.
- McGlasson, R., 2023, *The world's first 'biodegradable' water bottle is here — and it breaks down over 200 times faster than plastic*, <https://www.thecooldown.com/green-home/acura-zdx-ev-electric-car-review/> [Ziyaret Tarihi: 20 Kasım 2024].

- McKinlay, J. B., Harwood, C. S., 2010, Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel, *Curr. Opin. Biotechnol*, 21 (3), 244–251, doi:10.1016/j.copbio.2010.02.012.
- McKinlay, J. B., Oda, Y., Rühl, M., Posto, A. L., Sauer, U., Harwood, C. S., 2014, Non-growing *Rhodopseudomonas palustris* increases the hydrogen gas yield from acetate by shifting from the glyoxylate shunt to the tricarboxylic acid cycle, *J. Biol. Chem*, 289 (4), 1960–1970, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.527515>.
- Mekala, M., & Suganya, K. (2018). Characterisation of drug loaded with poly-beta-hydroxyl-butyrate (PHB) nanoparticles onto the cotton gauze for tuberculosis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 12(11), 142-150. <https://doi.org/10.5897/ajpp2017.4865>
- Melton, E. D., Schmidt, C., Behrens, S., Schink, B., Kappler, A., 2014, Metabolic flexibility and substrate preference by the Fe(II)-Oxidizing purple non-sulphur bacterium *Rhodopseudomonas palustris* Strain TIE-1, *Geomicrobiol. J*, 31, 835-843.
- Mercan, N., 2002, *Rhizobium* cinsi bakterilerin Poli- β -hidroksibütirat üretimlerinin belirlenmesi, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile elde edilen toplam protein profillerinin ve plazmid DNA' larının incelenmesi, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-174.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., Swings, J., 1993, Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils, *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (10), 3233-3238.
- Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M. A. M., Ferreira, E. C., 2015, Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining, *Analytica Chimica Acta*, 865 (1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.018>.
- Miller, Stephen A., 2013, Sustainable polymers: opportunities for the next decade, *ACS Macro Letters*, 2, 550-554.
- Mitra, R., Xu, T., Xiang, H., Han, J., 2020, Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory, *Microbial Cell Factories*, 19 (86), 1-30.
- Monroy, I. & Buitrón, G., 2020, Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. *Journal of Biotechnology*, 317, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.012>.
- Muhammadi, S., Afzal, M., Hameed, S., 2015, Bacterial polyhydroxyalkanoatesecofriendly next generation plastic: production,

biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8, 56-77.

- Nambu, Y., M. Ishii-Hyakutake, K. Harada, S. Mizuno, T. Tsuge, 2020, Expanded amino acid sequence of the PhaC box in the active center of polyhydroxyalkanoate synthases, *FEBS Letters*, 594, 710-716.
- Narancic, T., Cerrone, F., Beagan, N., O'Connor, K. E., 2020, Recent Advances in Bioplastics: Application and Biodegradation, *Polymers*, 12 (920), 1-38.
- Nakata, H., Tamura, M., Shintani, T., Gomi, K., 2014, Evaluation of baker's yeast strains exhibiting significant growth on Japanese beet molasses and compound analysis of the molasses types, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 715- 719.
- Nickerson, K. W., Zarnick W. J. Kramer, V. C., 1981, Poly-B-Hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiology Letters*, 12, 327-331.
- 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>.
- Odian G., 2004, *Principles of Polymerization*, 4th Edition, John Wiley&Sons, Staten Island, New York, 1-9.
- Ong, S. Y., Chee, J. Y., Sudesh, K., 2017, Degradation of Polyhydroxyalkanoate(PHA): a review, *Journal of Siberian Federal University*, 10 (2), 211.
- Orsi, E., Beekwilder, J., Eggink, G., Kengen, S.W.M., Weusthuis, R. A., 2020, The transition of *Rhodobacter sphaeroides* into a microbial cell factory, *Biotechnology and Bioengineering*, 118, 531–541.
- Özsoy, B., 2012, Hydrogen and poly-beta hydroxy butyric acid production and expression analyses of related genes in *rhodobacter capsulatus* at different acetate concentrations, Master Thesis, *The Graduate School Of Natural And Applied Sciences Of Middle East Technical University*, Ankara, 30-44.
- Öztunç, B., 2022, Biyolojik yöntemle endüstriyel atık sulardan biyopolimer depolama şartlarının belirlenmesi, Yüksek lisans tezi, *Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*, Konya, 3-17.
- Pachekoski, W. M., Agnelli, J. A. M., Belem, L. P., 2009, Thermal, mechanical and morphological properties of poly (hydroxybutyrate) and polypropylene blends after processing, *Materials Research*, 12 (2), 159-164.
- Panich, J., Fong, B., Singer, Steven, W., 2021, Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* H16 for sustainable biofuels from CO₂, *Trends in Biotechnology*, 39 (4), <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.001>.

- Park, J. M., M. Kim, H. J., Lee, A., Jang, J., Min, aY., H. Kim., 2012, Enhancing the production of *R. sphaeroides*-derived physiologically active substances using carbonic anhydrase-immobilized electrospun nanofibers, *Biomacromolecules*, 13 (11), 3780–86. doi:10.1021/bm3012264.
- Parlane, N. A., S.K. Gupta, P. Rubio-Reyes, S. Chen, M. Gonzalez-Miro, D.N. Wedlock, B. Rehm., 2016, Self-Assembled Protein-Coated Polyhydroxyalkanoate Beads: Properties and Biomedical Applications, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3, 3043-3057.
- Patel, S. K. S., Kumar, P., Kalia, V. C., 2012, Enhancing biological hydrogen production through complementary microbial metabolisms, *Int. J. Hydrogen Energy*, 37 (14), 10590–10603, doi:10.1016/j.ijhydene.2012.04.045.
- Pattanakittivorakul S., Lertwattanasakul N., Yamada M., Limtong S., 2019, Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement, *International Journal of General and Molecular Microbiology*, 112 (7), 975-970.
- Pechter, K. B., Gallagher, L., Pyles, H., Manoil, C. S., Harwood, C. S., 2016, Essential genome of the metabolically versatile Alphaproteobacterium *Rhodopseudomonas palustris*, *J. Bacteriol*, 198, 867-876.
- Pellerin, N. B. ve Gest, H., 1983, Diagnostic features of the photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Current Microbiology*, 9 (6), 339- 344.
- Peirong, Z., Wei, L., 2013, Use of fluidized bed biofilter and immobilized *Rhodopseudomonas palustris* for ammonia removal and fish health maintenance in a recirculation aquaculture system, *Aquac. Res*, 44 (3), 327–334. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.03038.x.
- Peoples, O. P., Sinskey, A. J., 1989a, Fine structural analysis of the *Zoogloea ramigera* phbA-phbB locus encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase: nucleotide sequence of phbB, *Mol. Microbiol*, 3, 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00180.x>.
- Peoples, O. P., Sinskey, A. J., 1989b, Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC), *J. Biol. Chem*, 264, 15298–15303. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84825-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84825-1).
- Peuser, V., Metz, S., Klug, G., 2010, Response of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* to iron limitation and the role of a Fur orthologue in this response, *Journal Society for Applied Microbiology*, 3 (3), 397–404.
- Pfüller, U., Franz, H., Preib, A. 1977, Sudan Black B: Chemical structure and histochemistry of the blue main components, *Histochemistry*, 54, 237-250.

- Phanse, N., Chincholikar, A., Patel, B., Rathore, P., Vyas, P., Patel, M., 2010, Screening of PHA (poly hydroxyalkanoate) producing bacteria from diverse sources, *International Journal of Biosciences*, 1 (6), 27-32.
- Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I., 2007, Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82 (3), 233-247.
- Pleissner, D., Lam, W. C., Han, W., Lau, K. Y., Cheung, L. C., Lee, M. W., Lei, H. M., Lo, K. Y., Ng, W. Y., Sun, Z., Melikoglu, M., Lin, C. S. K., 2014, Fermentative polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from bakery waste. *BioMed Research International*, 1-8, <https://doi.org/10.1155/2014/819474>.
- Poirier, Y., 2002, Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology ve basic studies of lipid metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41 (2), 131-155.
- Pool, R., 1989, In search of the plastic potato, *Science*, 245 (4923), 1187-1189.
- Pradhan, S., Borah, A. J., Poddar, M. K., Dikshit, P. K., Rohidas, L., Moholkar, V. S., 2017, Microbial production, ultrasound-assisted extraction and characterization of biopolymer polyhydroxybutyrate (PHB) from terrestrial (*P. hysterophorus*) and aquatic (*E. crassipes*) invasive weeds, *Bioresource Technology*, 242, 304-310.
- Prieto, M. A., 2007, From oil to bioplastics, a dream come true?, *Journal of Bacteriology*, 189 (2), 289-290.
- PubChem., 2023, *Process for preparing poly-beta-hydroxybutyric acid*. PubChem Patent Summary for US-3044942-A.
- Qiang, S., Su, A. P., Li, Y., Chen, Z., Hu, C. Y., Meng, Y. H., 2019, Elevated β -Carotene synthesis by the engineered *Rhodobacter sphaeroides* with enhanced CrtY expression, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 9560–9568.
- Ramezani, M., Amoozegar, M. A., Ventosa, A., 2014, Screening and comparative assay of poly-hydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly- β -hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium *Oceanimonas sp.* GK1, *Ann Microbiol*, 65, 517–526.
- 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>.

- Rebois, R., Onidas, D., Marcott, C., Noda, I., Dazzi, A., 2017, Chloroform induces outstanding crystallization of poly (hydroxybutyrate)(PHB) vesicles within bacteria, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409 (9), 2353-2361.
- Reinecke, F., Steinbüchel, A., 2009, *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16 (1–2), 91–108.
- Rezaei F., Rafienia M., Keshvari H., Sattary M., Naeimi M., Keyvani H., 2016, Fabrication of poly hydroxybutyrate-polyethylene glycol-folic acid nanoparticles loaded by paclitaxel, *Current drug delivery*, 13 (1), 57-64.
- Rydz, J., Wanda, S., Mariya, K., Darinka, C., 2015, Polyester-Based (Bio) degradable polymers as environmentally friendly materials for sustainable development, *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (1), 564–596.
- Sağdıç S., 2023, Meşe ağacı palamudu nişastası bazlı antibakteriyel özelliğe sahip biyoplastik nişasta/halloysit nanotüp/karanfil esansiyel yağı ve biyoplastik nişasta/halloysit nanotüp/gümüş nanopartikül kompozit materyallerin hazırlanması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Antalya, 1-7.
- Samrot, A. V., Samanvitha, S. K., Shobana, N., Renitta, E. R., Kumar, P. S., Kumar, S. S., Abirami, S., Dhiva, S., Bavanilatha, M., Prakash, P., Saigeetha, S., Shree, K. S., Thirumurugan, R., 2021, The synthesis, characterization and applications of polyhydroxyalkanoates (Phas) and PHA-based nanoparticles, *Polymers*, 13 (19), <https://doi.org/10.3390/polym13193302>.
- Sangkharak, K.; Prasertsan, P., 2008, Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition, *Electron. J. Biotechnol*, 11 (3).
- Santos, A. J., Valentina, L. V. O., Schulz, A. A. H., Duarte, M. A. T., 2017, From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties, Part I, 13(26), *Ingeniería y Ciencia*, 269-288. doi:10.17230/ingciencia.13.26.10.
- Sathiyarayanan, G., Kiran, G. S., Selvin, J. and Saibaba, G., 2013, Optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus megaterium* MSBN04 under solid state culture, *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 253- 261.
- Schmid M. T., Song H., Raschbauer M., Emerstorfer F., Omann, M., Stelzer F., Neureiter M., 2019, Utilization of desugared sugar beet molasses for the production of poly(3-hydroxybutyrate) by halophilic *Bacillus megaterium uyuni* S29, *Process Biochemistry*, 86, 9-15.
- Seoane, I. T., Manfredi, L. B., Cyras, V. P., 2015, Properties and processing relationship of polyhydroxybutyrate and cellulose biocomposites, *ProcediaMaterials Science*, 8 (1), 807-813.

- Sharma, M., Dhingra, H. K., 2016, Poly- β -hydroxybutyrate: A Biodegradable Polyester, Biosynthesis and Biodegradation, *British Microbiology Research Journal*, 20, 1-11.
- Sharmila, T., Meenakshi, S. A., Kandhymathy, K., Bharathidasan, R., Mahalingam, R., 2011, Screening and characterization of Polyhydroxybutyrate producing bacteria from sugar industry effluents, *World Journal of Science and Technology*, 1 (9), 22-7.
- Shasaltaneh, M.D., Moosavi-Nejad, Z., Gharavi, S., Fooladi, J., 2013, Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*, *Iran. J. Microbiol*, 5, 285–292.
- Sheldon, R. A., ve Norton, M., 2020, Green chemistry and the plastic pollution challenge: towards a circular economy, *Green Chemistry*, 22, 6310-6322.
- Shen, Q., Hui Lin, H., Wang, Q., Fan, X., Yang, Y., Zhao, Y., 2015, Sweetpotato vines hydrolysate promotes single cell oils production of trichosporon fermentans in high-density molasses fermentation, *Bioresource Technology*, 176, 249–256.
- Shimizu, T., Teramoto, H., Inui, M., 2019, Introduction of glyoxylate bypass increases hydrogen gas yield from acetate and L-glutamate in *Rhodobacter sphaeroides*, *Applied and Environmental Microbiology*, 85, 1–17.
- Singh, M., Kumar, P., Ray, S., and Kalia, V. C., 2015, Challenges and opportunities for customizing polyhydroxyalkanoates, *Indian Journal Of Microbiology*, 55 (3), 235-249.
- Slovak, P. M., Wadhams, G. H. and Armitage, J. P., 2005, Localization of MreB in *Rhodobacter sphaeroides* under conditions causing changes in cell shape and membrane structure, *Jornal of Bacteriology*, 187 (1), 54-64.
- Sohn, Y.J., Son, J., Jo, S.Y., Park, S.Y., Yoo, J.I., Baritugo, K.-A., Na, J.G., Choi, J., Kim, H.T., Joo, J.C., Park, S.J., 2021, Chemoautotroph *Cupriavidus necator* as a potential game-changer for global warming and plastic waste problem: a review, *Bioresour. Technol*, 340, 125693. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125693>.
- Sprajcar, M., Horvat, P., Krzan, A., 2012, Biopolymers and Bioplastics: Plastics aligned with nature, plastic project, innovative value chain for development for sustainable plastics in central Europe, *European Union*, 1-32.
- Srikanth, S., Swathi, M., Tejaswini, M., Sharmila, G., Muthukumar, C., Jaganathan, M. K., Tamilarasan, K., 2014, Statistical optimization of molasses based exopolysaccharide and biomass production by *Aureobasidium pullulans* MTCC 2195, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3, 7–12.
- 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.

- Suwansaard, M., 2010, Production of hydrogen and 5-Aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria from palm oil mill effluent, Doctor of Philosophy, *Prince of Songkla University*, Thailand, 20-25.
- Suwanto, A. and Kaplan, S, 1989, Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes, *Journal of Bacteriology*, 171, 5850-5859.
- Szacherska K., Oleskowicz-Popiel P., Ciesielski S., Mozejko-Ciesielska J., 2021, Volatile Fatty Acids as Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates Production, *Polymers*, 13 (3), 1-19.
- Tan G.A., Chen C., Li L., Ge L., Wang L., Razaad I. M., Li Y., Zhao L., Mo Y., Wang J., 2014, Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review, *Polymers*, 6, 706-754.
- Thammasittirong, A., Saechow, S., Thammasittirong, Sutticha Na-R., 2017, Efficient polyhydroxybutyrate production from *Bacillus thuringiensis* using sugarcane juice substrate, *Turk J Biol*, 41, 992-1002.
- Thapa, C., Shakya, P., Shrestha, R., Pal, S., Manandhar, P., 2018, Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB, *Nepal Journal of Biotechnology*, 2 (1), 62-68.
- Touloupakis, E., Poloniataki, E. G., Casciana, M., Ghanotakis, D. F. Carozzi, 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>.
- Trakunjae, C., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Kosugi, A., Arai, T., Sudesh, K., Vaithanomsat, P., 2021, Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus sp. strain BSRT1-1* using response surface methodology, *Scientific Reports*, 11 (1), <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81386-2>.
- Tsuge, T., Hyakutake, M., Mizuno, K., 2015, Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (15), 6231-6240.
- Türe, E., 2019, Halofilik arkelerde polihidroksibütirat (PHB) üretiminin belirlenmesi ve optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, *On Dokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Samsun, 12-20.
- Türkay, D., 2013, Kardiyovasküler sistem rahatsızlıklarının teşhis ve tedavisinde kullanılmak üzere yeni nesil nanotaşıyıcıların geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 110-114.

- Türkoğlu, Z. 2009, Bazı *rhizobium* bakterilerinin melas besi ortamında poly- β -hidroksibütirat (phb) üretimlerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Elazığ, 23-32.
- Ülger, B., 2015, Evaluation of bioplastics biodegradation under landfill conditions, Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi*, İstanbul, 1-3.
- Vadivelu, M. A., Kumar, C. R. ve Joshi, G. M., 2016, Polymer composites for thermal management: a review, *Composite Interfaces*, 23 (9), 847-872.
- Vaishnav, A., Choudhary, D. K., 2021, Microbial Polymers Applications and Ecological Perspectives, https://doi.org/DOI:10.1007/978-981-16-0045-6_1.
- Valentin, H. E., Lee, E. Y., Choi, C. Y., Steinbüchel, A., 1994, Identifications of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, *Appl Microbiol Biotechnol*, 40, 710-716.
- van Hung, N., Bossier, P., Hong, N.T.X., Ludeseve, C., Garcia-Gonzalez, L., Nevejan, N., De Schryver, P., 2019, Does *Ralstonia eutropha*, rich in poly- β hydroxybutyrate (PHB), protect blue mussel larvae against pathogenic vibrios?, *Journal of Fish Diseases*, 4, 777–787. <https://doi.org/10.1111/jfd.12981>.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., Radecka, I., 2007, Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1437-1449.
- Volova, T. G., Boyandin, A. N., Prudnikova, S. V., 2015, Biodegradation of polyhydroxyalkanoates in natural soils, *Journal of Siberian Federal University*, 8 (2), 152.
- Wang, R.-Y., Shi, Z.-Y., Chen, J.-C., Wu, Q. Chen, G.-Q., 2012, Enhanced coproduction of hydrogen and poly-(R)-3-hydroxybutyrate by recombinant PHB producing *E. coli* over-expressing hydrogenase 3 and acetyl-CoA synthetase, *Metabolic Engineering*, 14 (5), 496-503.
- Wang, X., Jiang, X. R., Wu, F., Ma, Y., 2019, Microbial Poly-3-Hydroxybutyrate (PHB) as a Feed Additive for Fishes and Piglets *Article in Biotechnology Journal*, DOI: 10.1002/biot.201900132.
- Wang, X.; Modak, H. V.; Tabita, F. R., 1993, Photolithoautotrophic growth and control of CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* in the absence of ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, *J Bacteriol*, 175, 7109–7114.
- Wang Z., Li H., Feng J., Zhang A., Ying H., He X., Ouyang P., 2018, Enhanced succinic acid production from polyacrylamide-pretreated cane molasses in microbial electrolysis cells, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93 (3), 855–860.
- Wei, Y. H., Chen, W. C., Huang, C. K., Wu, H. S., Sun, Y. M., Lo, C. W., Janarthanan, O. M., 2011, Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing

strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains, *International Journal of Molecular Sciences*, 12 (1), 252-265.

- Wolchover, N., 2011, Why Doesn't Plastic Biodegrade? LiveScience, <https://www.livescience.com/33085-petroleum-derived-plastic-nonbiodegradable.html>, [Ziyaret Tarihi: 11.11.2024].
- Wong, J. X., K. Ogura, S. Chen, B. Rehm, 2020, Bioengineered Polyhydroxyalkanoates as Immobilized Enzyme Scaffolds for Industrial Applications, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8 (156), 1-22.
- Wright A. G., Ellis T. P., Ilag L. L., 2014, Filtered molasses concentrate from sugar cane: natural functional ingredient effective in lowering the glycaemic index and insulin response of high carbohydrate foods, *Plant Foods Humans Nutrient*, 69, 310–316.
- Wu, H., Chen, J., Chen, G. Q., 2016, Engineering the growth pattern and cell morphology for enhanced PHB production by *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (23), 9907-9916.
- Wu, S. C., Liou, S. Z., Lee, C. M., 2012, Correlation between bio-hydrogen production and Polyhydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Rhodospseudomonas palustris* WP3-5, *Bioresour. Technol*, 113, 44–50, doi:10.1016/j.biortech.2012. 01.090.
- Xing, D., Zuo, Y., Cheng, S., Regan, J.M., Logan, B. E., 2008, Electricity generation by *Rhodospseudomonas palustris* DX-1, *Environ. Sci. Technol*, 42, 4146-4151.
- Xu, W., Chai, C., Shao, L., Yao, J., Wang, Y., 2016, Metabolic engineering of *Rhodospseudomonas palustris* for squalene production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 43 (5), 719–725, doi:10.1007/s10295-016-1745-7.
- Yeo, J. C. C., Muiruri, J. K., Thitsartarn, W., Li, Z. He, C., 2018, Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications, *Materials Science and Engineering*, 92, 1092- 1116.
- Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y., 2003, Biyoplastik: Poli-β-Hidroksibütirat (PHB), *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1 (9), 1-33.
- Yousuf, R. G., Webb, C., Winterburn, J., 2018, *Novel Polyhydroxybutyrate (PHB) production using a waste date seed feedstock*, https://www.proquest.com/dissertations-theses/novel-polyhydroxybutyrate-phb-production-using/docview/2116952378/se_2?accountid=159111 [Ziyaret Tarihi:10.11.2024].
- Zhang, J., Gao, D., Cai, J., Liu, H., Qi, Z., 2018, Improving coenzyme Q10 yield of *Rhodobacter sphaeroides* via modifying redox respiration chain, *Biochemical Engineering Journal*, 135, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.006>.

Zhang S., Wang J., Jiang H., 2021, Microbial production of value-added bioproducts and enzymes from molasses, a by-product of sugar industry, *Food Chemistry*, 346, 128874–128887.

EKLER**EK-1** 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

EK-2 Vitamin çözeltilisi

Vitamin	mg/L
Thiamine	500
Niacin	500
Biotin	15