



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***CEREIBACTER SPHAEROIDES* VE
CUPRIAVIDUS NECATOR'UN DÖRT FARKLI
KARBON KAYNAĞINDAKİ PHB ÜRETİM
VERİMLİLİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Besna DALMIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Mayıs-2026

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Besna DALMIŞ tarafından hazırlanan “*Cereibacter sphaeroides* ve *Cupriavidus necator*’un dört farklı karbon kaynağındaki PHB üretim verimliliklerinin karşılaştırılması” adlı tez çalışması 20/05/2026 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

Dr.Öğr Üyesi Aylin GAZDAĞLI TALAY

.....

Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

.....

Üye

Dr.Öğr. Üyesi SEDEF AKÇAALAN

.....

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 (24YL15006) ve Avrupa Birliği Ufuk Avrupa REGENEU projesi (Proje no:101079123) tarafından 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.

Besna DALMIŞ

Tarih: 20.05.26

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***CEREIBACTER SPHAEROIDES* VE *CUPRIAVIDUS NECATOR*'UN DÖRT FARKLI KARBON KAYNAĞINDAKİ PHB ÜRETİM VERİMLİLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Besna DALMIŞ

**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS

2026, 161 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Gökhan KARS

Dr. Öğretim Üyesi Aylin GAZDAĞLI TALAY

Dr. Öğretim Üyesi SEDEF AKÇAALAN

Polihidroksibutirat (PHB) gibi mikrobiyal kaynaklı biyopolimerler, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri, biyolojik uyumlulukları ve doğal dokulara yapısal benzerlikleri nedeniyle insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri açısından umut vadeden alternatifler olarak ortaya çıkmaktadır. Bakteriler, azot veya fosfor gibi temel bir besin maddesinin eksikliği (sınırlayıcı faktör) gibi stres koşulları altında, karbon kaynağını hücre içinde PHB olarak depolar. Örneğin, fotosentetik mor kükürtsüz bir bakteri olan *Cereibacter sphaeroides*, azot sınırlı koşullar altında kuru hücre ağırlığının %60-70'ine kadar, çok yönlü bir model organizma olan *Cupriavidus necator* ise çeşitli karbon kaynakları kullanarak kuru ağırlığının %90'ına kadar PHB depolayabilmektedir. Bu tez çalışmasında, yüksek verimle PHB biriktirdiği bilinen *C. sphaeroides* O.U. 001 (DSM5864) ve *C. necator* H16 (DSM 428)'nin dört farklı karbon kaynağında PHB üretim verimliliklerinin karşılaştırılması amaçlandı. Karbon kaynağı olarak glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat, azot kaynağı olarak ise amonyum klorür ve amonyum sülfat kullanılmıştır. İki bakterinin 70 mM asetat ve optimize edilmiş glikoz, fruktoz ve sükroz konsantrasyonlarının olduğu ortamlarda büyümeleri ve pH değişimleri incelenerek eğriler oluşturuldu. Sudan Black B ve Nile Red boyama yöntemleri ile incelenen bakteri granülleri sırasıyla ışık mikroskobu ve konfokal mikroskop ile görüntülendi. Bakterilerin dört farklı karbon kaynağında %PHB verimlilikleri karşılaştırıldığında en yüksek verim *C. sphaeroides* 'in asetat içeren besiyerinde kültüre edilmesiyle elde edildi (%40). *C. necator*'un en iyi büyüdüğü ve verimin yüksek olduğu (%31) karbon kaynağı ise fruktoz oldu. Ekstrakte edilen PHB polimerlerinin karakterizasyonu nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA) / diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) teknikleri ile yapıldı. NMR pikleri 1,18-1,34, 2,38- 2,58 ve 5,15- 5,27 ppm aralığında kaydedildi. Fonksiyonel grupların varlığını gösteren FTIR spektrumları ise 1379-1378, 1453-1452, 2976-2921, 1720-1719, 1276-1043 ve 3307-3436 cm⁻¹ dalga boylarında kaydedildi. Tüm örneklerin TGA termogramları benzerlik gösterdi ve T_m değerleri birbirine oldukça yakındı. DSC ve TGA analizleri ile mikrobiyal PHB örneklerinin erime sıcaklığının (T_m) 160-180°C, maksimum bozunma sıcaklığının (T_{max}) ise 240-280°C aralığında olduğu belirlendi. Bu bulgular, uygun karbon kaynağı ve bakteri seçimi ile PHB üretim verimliliğinin artırılabilirliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Asetat, *Cereibacter sphaeroides*, *Cupriavidus necator*, fruktoz, glikoz, Polihidroksibutirat (PHB), sükroz.

ABSTRACT

MS THESIS

COMPARISON OF PHB PRODUCTION EFFICIENCIES OF *CEREIBACTER SPHAEROIDES* AND *CUPRIAVIDUS NECATOR* USING FOUR DIFFERENT CARBON SOURCES

Besna DALMIŞ

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

Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS

2026, 161 Pages

Jury

Prof. Dr. Gökhan KARS

Assist. Prof. Dr. Aylin GAZDAĞLI TALAY

Assist. Prof. Dr. SEDEF AKÇAALAN

Polyhydroxybutyrate (PHB), a microbial-derived biopolymer, has emerged as a promising alternative in terms of its impact on human health and the environment due to its biodegradability, biocompatibility, and structural similarity to natural tissues. Under stress conditions such as the limitation of essential nutrients like nitrogen or phosphorus, bacteria store carbon sources intracellularly in the form of PHB. For example, the photosynthetic purple non-sulfur bacterium *Cereibacter sphaeroides* can accumulate PHB up to 60–70% of its dry cell weight under nitrogen-limited conditions, while the versatile model organism *Cupriavidus necator* can store PHB up to 90% of its dry weight using various carbon sources. In this thesis, it was aimed to compare the PHB production efficiencies of *C. sphaeroides* O.U. 001 (DSM 5864) and *C. necator* H16 (DSM 428), both known for their high PHB accumulation capacity, using four different carbon sources. Glucose, fructose, sucrose, and acetate were used as carbon sources, while ammonium chloride and ammonium sulfate were used as nitrogen sources. Growth curves and pH changes were monitored in media containing 70 mM acetate and optimized concentrations of glucose, fructose, and sucrose. Bacterial granules were visualized using Sudan Black B and Nile Red staining methods under light microscopy and confocal microscopy, respectively. When PHB production efficiencies were compared across four different carbon sources, the highest yield was obtained from *C. sphaeroides* cultured in acetate-containing medium (40%). In contrast, the best growth and highest yield for *C. necator* were observed with fructose (31%). The extracted PHB polymers were characterized using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and thermogravimetric analysis (TGA) / differential scanning calorimetry (DSC). NMR peaks were recorded in the ranges of 1.18–1.34, 2.38–2.58, and 5.15–5.27 ppm. FTIR spectra indicating functional groups were observed at wavelengths of 1379–1378, 1453–1452, 2976–2921, 1720–1719, 1276–1043, and 3307–3436 cm⁻¹. TGA thermograms of all samples showed similar patterns, and melting temperatures (T_m) were found to be quite close. DSC and TGA analyses revealed that the melting temperature (T_m) of microbial PHB samples ranged between 160–180°C, while the maximum degradation temperature (T_{max}) was between 240–280°C. These findings demonstrate that PHB production efficiency can be enhanced by selecting appropriate carbon sources and bacterial strains.

Keywords: Acetate, *Cereibacter sphaeroides*, *Cupriavidus necator*, fructose, glucose, Polyhydroxybutyrate (PHB), sucrose.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması sürecinde bilgi ve düşünceleriyle yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Gökhan KARS'a teşekkür ederim. Değerli katkılarından dolayı tez jüri üyeleri Dr.Öğr Üyesi Aylin GAZDAĞLI TALAY ve Dr.Öğr. Üyesi SEDEF AKÇAALAN'a teşekkür ederim. Desteklerinden dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje no: 24YL15006) ve Avrupa Birliği Ufuk Avrupa REGENEU projesine (Proje no:101079123) teşekkür ederim. Aileme ve laboratuvar arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Bu tezi babama ithaf ediyorum.

Besna DALMIŞ
KONYA-2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Plastik Malzeme Kullanımı	4
2.2. Biyopolimerler	6
2.2.1. Polihidroksialkonatlar (PHA)	8
2.2.1.1. Biyobozunurluk ve biyoyumluluk	10
2.2.1.2. PHA'ların biyosentezi	11
2.2.2. Polihidroksibütirat (PHB)	13
2.2.2.1. PHB granüllerinin morfolojisi ve PHB inklüzyonlarıyla ilişkili proteinler.....	14
2.2.2.2. Mikrobiyal PHB üretimi	16
2.2.2.3. PHB üretimi için mikroorganizmalar	18
2.2.2.3.1. Cupriavidus necator	18
2.2.2.3.2. Cereibacter sphaeroides	22
2.2.2.4. Karbon kaynakları	27
2.2.2.5. PHB ekstraksiyon yöntemleri	29
2.2.2.6. PHB'nin biyolojik parçalanması.....	33
2.2.2.7. PHB görüntüleme yöntemleri	36
2.2.2.7.1. Sudan Black B	36
2.2.2.7.2. Nile Red	37
2.2.2.8. PHB karakterizasyon yöntemleri	40
2.2.2.8.1. Termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)	41
2.2.2.8.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	42
2.2.2.8.3. Nükleer manyetik rezonans (NMR).....	43
2.2.2.9. PHB uygulama alanları	44
2.2.2.9.1. Endüstriyel uygulamalar	44
2.2.2.9.1.1. Ambalaj malzemesi olarak PHB.....	44
2.2.2.9.2. Tıbbi uygulamalar	45
2.2.2.9.2.1. Biyomedikal cihazlar, malzemeler ve ilaç taşıyıcıları olarak PHB.....	45
2.2.2.9.3. Tarımsal uygulamalar	48

3. MATERYAL VE YÖNTEM	49
3.1. Bakteri Suşları, Ortam ve Kültür Koşulları	49
3.2. Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması.....	53
3.3. pH Eğrilerinin Oluşturulması	53
3.4. PHB Granüllerinin Görüntülenmesi	53
3.4.1. Sudan Black B ile boyama.....	53
3.4.2. Nile Red ile boyama	54
3.5. Bakteri Kültürlerinden PHB Ekstraksiyonu	55
3.6. Kuru Hücre Ağırlığı Ölçümü ve PHB Verim Hesaplaması.....	56
3.7. Üretilen PHB Polimerlerin Karakterizasyonu	57
3.7.1. NMR ile PHB karakterizasyonu	57
3.7.2. FTIR ile PHB karakterizasyonu.....	57
3.7.3. TGA/DSC analizi ile karakterizasyon	57
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	59
4.1. Ön Çalışmalar, Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri.....	59
4.1.1. Karbon kaynaklarının optimizasyonuna yönelik ön çalışmalar.....	59
4.1.2. Büyüme eğrileri	61
4.1.3. pH analizleri.....	67
4.2. PHB Granüllerinin Görüntülenmesi	73
4.2.1. Sudan Black B ile görüntüleme	73
4.2.2. Nile Red ile görüntüleme.....	77
4.3. PHB Ekstraksiyonu.....	83
4.4. Üretilen PHB Polimerlerinin Karakterizasyonu	89
4.4.1. NMR spektroskopisi ile polimer yapısının karakterizasyonu.....	90
4.4.2. FTIR spektroskopisi ile polimer yapısının karakterizasyonu	92
4.4.3. TGA/DSC analizi ile polimer yapısının karakterizasyonu	94
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	102
5.1 Sonuçlar	102
5.2 Öneriler	103
6. KAYNAKLAR	105
EKLER	132

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. 2024 yılında kullanım ömrünü tamamlayan plastik atıkların yönetim yollarına göre dağılımı	5
Şekil 2.2. Plastik geri dönüşümündeki zorluklar	6
Şekil 2.3. Biyoplastik türlerinin sınıflandırılması	7
Şekil 2.4. PHB filminin zaman içindeki morfolojik değişimi	11
Şekil 2.5. PHA monomerinin genel yapısı verilmiştir.....	12
Şekil 2.6. PHB granülünün şematik gösterimi	16
Şekil 2.7. PHB'nin biyosentetik yolu	17
Şekil 2.8. <i>C. necator</i> H16' da hücre içi PHB granülleri	20
Şekil 2.9. <i>C. necator</i> 'un glikoz ve fruktozda PHB üretim şeması.....	22
Şekil 2.10. <i>C. sphaeroides</i> ' in asetat asimilasyonunda etilmalonil-CoA ve PHB biyosentez yolu	24
Şekil 2.11. <i>C. sphaeroides</i> 'te PHB biyosentez yolu.....	25
Şekil 2.12. PNS bakterilerde karbon metabolizmasının basitleştirilmiş genel şeması ...	26
Şekil 2.13. Anaerobik ve aerobik ortamlarda PHB bozunmasının şematik gösterimi ...	35
Şekil 2.14. Sudan Black.....	37
Şekil 2.15. <i>Cupriavidus taiwanensis</i> suşlarının immersiyon yağı ile 100X objektifte gözlemlenen Sudan Black B ile boyanmış PHB granülleri	37
Şekil 2.16. Nile Red.....	38
Şekil 2.17. <i>P. Denitrificans</i> hücrelerinin farklı floresan boya ile boyanması	39
Şekil 2.18. PHB örneklerinin karakterizasyonunda kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi	41
Şekil 2.19. PHA bazlı çeşitli biyomedikal uygulamalar.....	47
Şekil 3.1. PHB ekstraksiyon aşamaları.....	55
Şekil 4.1. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)'in glikoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₆₀).....	61
Şekil 4.2. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)'in fruktoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₆₀).....	62
Şekil 4.3. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)'in sükroz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₆₀).....	63
Şekil 4.4. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)'in asetat içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₆₀).....	63
Şekil 4.5. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın glikoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₀₀)	64
Şekil 4.6. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın fruktoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₀₀)	64
Şekil 4.7. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın sükroz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₀₀)	65
Şekil 4.8. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428)'nın asetat içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD ₆₀₀)	65
Şekil 4.9. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864)'in glikoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi.....	67
Şekil 4.10. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864)'in fruktoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi.....	68
Şekil 4.11. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864)'in sükroz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi.....	69
Şekil 4.12. <i>C. sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864)'in asetat içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi	69

Şekil 4.13. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428) 'nın glikoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi.....	70
Şekil 4.14. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428) 'nın fruktoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi.....	70
Şekil 4.15. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428) 'nın süktroz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi.....	71
Şekil 4.16. <i>C. necator</i> H16 (DSM 428) 'nın asetat içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi.....	71
Şekil 4.17. Bakterilerden elde edilen ve Sudan Black B ile boyanan PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	77
Şekil 4.18. Bakterilerden elde edilen ve Nil red ile boyanan PHB granüllerinin 63 X görüntüsü	82
Şekil 4.19. PHB kurutma aşamaları.....	83
Şekil 4.20. Ekstrakte edilen PHB örnekleri.....	84
Şekil 4.21. Ticari ve dört farklı besiyerinde büyütülen <i>C. sphaeroides</i> ve <i>C. necator</i> 'dan ekstrakte edilen PHB'nin NMR spektrumlarının karşılaştırılması	90
Şekil 4.22. Ticari ve dört farklı besiyerinde büyütülen <i>C. sphaeroides</i> ve <i>C. necator</i> 'dan ekstrakte edilen PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}) karşılaştırması	92
Şekil 4.23. <i>C. sphaeroides</i> 'in dört besiyerinden elde edilen ve standart PHB'lerin TGA termogramları.....	95
Şekil 4.24. <i>C. necator</i> 'un üç besiyerinden elde edilen ve standart PHB'lerin TGA termogramları.....	96
Şekil 4.25. <i>C. sphaeroides</i> 'in dört besiyerinden elde edilen ve standart PHB'lerin DSC eğrileri.....	97
Şekil 4.26. <i>C. necator</i> 'un üç besiyerinden elde edilen ve standart PHB'lerin DSC eğrileri	98

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. PHA polimerlerinin örnekleri.....	12
Çizelge 2.2. PHB'nin mekanik ve fiziksel özellikleri	14
Çizelge 2.3. Halojensiz çözücüler	30
Çizelge 3.1. Asetat besiyeri içeriği (g/L).....	50
Çizelge 3.2. Glikoz besiyeri içeriği (g/L)	50
Çizelge 3.3. Fruktoz besiyeri içeriği (g/L)	50
Çizelge 3.4. Sükroz besiyeri içeriği (g/L).....	50
Çizelge 3.5. Asetat besiyeri içeriği (g/L).....	51
Çizelge 3.6. Glikoz besiyeri içeriği (g/L)	51
Çizelge 3.7. Fruktoz besiyeri içeriği (g/L)	52
Çizelge 3.8. Sükroz besiyeri içeriği (g/L).....	52
Çizelge 4.1. Optimize edilen karbon kaynakları konsantrasyonları	60
Çizelge 4.2. Farklı besiyerlerinde yetiştirilen bakterilerde % PHB verimi	84
Çizelge 4.3. Farklı stratejiler ile büyütülen <i>C. necator</i> ve <i>C. sphaeroides</i> için literatürde bildirilen ve üretilen PHB miktarları	85
Çizelge 4.4. <i>C. sphaeroides</i> ve <i>C. necator</i> ' un dört farklı besiyerinden elde edilen PHB'nin ¹ H NMR pikleri (ppm) ve onlara karşılık gelen PHB yapısal grupları.....	91
Çizelge 4.5. <i>Burkholderia cepacia</i> BPT1213 tarafından atık gliserol kullanılarak sentezlenen PHB'nin ¹ H NMR pikleri (ppm) ve onlara karşılık gelen yapısal gruplar..	91
Çizelge 4.6. <i>C. sphaeroides</i> ve <i>C. necator</i> ' un dört farklı besiyerinden elde edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı	93
Çizelge 4.7. <i>C. necator</i> 'dan elde edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm ⁻¹).....	94

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

SİMGELER

°C	Derece
CO ₂	Karbondioksit
Da	Dalton
dk	Dakika
g	Gram
g/L	Gram/Litre
GPa	Gigapascal
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molar
Mb/Mbp	Megabaz
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MPa	Megapascal
MW	Moleküler ağırlık
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir
rpm	Dakikada devir sayısı
Td	Bozunma sıcaklığı
Tg	Cam geçiş sıcaklığı
Tmax	Maksimum bozunma sıcaklığı
Tm	Erime sıcaklığı
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR

CDW	Hücre kuru ağırlığı
DCM	Diklorometan
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ED	Entner-Doudoroff
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
H₂	Hidrojen
HCl	Hidroklorik asit
H₂SO₄	Sülfirik asit
HB	Hidroksi bütirat
lcl-PHA	Uzun zincirli PHA
mcl-PHA	Orta zincirli PHA
MP	Mikroplastik
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NP	Nanoplastik
OD	Optik yoğunluk
PBAT	Polibütilen adipat tereftalat
PCL	Polikaprolakton
PE	Polietilen
PET	Polietilen tereftalat
PHA	Polihidroksialkonat
PHB	Polihidroksibütirat
PHBV	Polihidroksibütirat-ko-valerat
PNSB	Fotosentetik Mor Kükürtsüz bakteriler
PP	Polipropilen
PPP	Pentoz fosfat yolu
PS	Polistiren
PVC	Polivinil klorür
RNA	Ribonükleik Asit
SBB	Sudan Black B
scl-PHA	Kısa zincirli PHA
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Tri Karboksilik Asit Döngüsü
TGA	Termogravimetrik analiz
UV	Ultraviyole
VFA	Uçucu yağ asitleri

1. GİRİŞ

Plastik kirliliği çevre için son derece büyük bir problem haline gelmiştir. Üretilen petrol bazlı plastiklerin çok az bir kısmı geri dönüştürülebilir durumdadır. Plastiklerin büyük bir kısmı okyanusa atılarak, bir kısımları yakılar ve çok az bir kısmı ise geri dönüştürülerek tekrar kullanılabilir hale gelir. Geri dönüştürülemeyen plastiklerin çevreye zararları oldukça fazladır. Biyobozunur olmayan kompozitlerin bir araya gelip birikmesi ile; ekolojik bozulma, iklim değişikliği gibi ciddi problemler ile birlikte CO₂ emisyonunda da artış meydana gelmektedir. Bu sebeplerden dolayı plastik kullanımında azalmaya gidilip onun yerine biyobozunur polimerlerin kullanımı için fikirler ortaya atılmıştır (Balasubramanian vd., 2024).

Petrol türevi plastiklerin çevre kirliliği başta olmak üzere pek çok olumsuz ve zararlı etkilerinin olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda bu durum, toksik etkilerinin az olduğu biyopolimer üretimi konusunda araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu alanda çalışmalar artmıştır. Dünyanın pek çok yerinde plastikler ve onlardan geriye kalan kalıntıları birçok yaşam alanında bulunmakta olup bu plastikler tamamen biyobozunur olmadıkları için de etrafa salınmaktadır. Plastiklerin hem insanlara hem hayvanlara hem de doğaya büyük ölçüde zarar verdiği söylenebilir. Bu nedenle parçalanabilen, toksik etkisi az olan, biyoyumlu polimerlerin üretimi petrol türevi plastiklere karşı faydalı bir alternatif olmuştur (Acharjee vd., 2023).

Bakteriler biyolojik fonksiyonu olan çeşitli polimerler üretirler. Bu polimerler özellikle tıp ve endüstri alanlarında kullanım için yararlı özelliklere sahiptirler. Bu polimerleri değerli kılan asıl özellikler ise biyoyumlu, parçalanabilen ve yenilenebilir olmalarıdır. Biyoyumlu olmaları yani toksik olmayan bileşiklerden oluşmaları sebebiyle ilaç kullanımında ve kontrollü ilaç salınımında, yaraların tedavisinde ve doku mühendisliğinde kullanımları mevcuttur (Rehm, 2010).

Mikrobiyal polimerler, geleneksel plastiklere benzer özelliklere sahiptirler. Bu sebeple birçok uygulamada kullanılabilirler. Biyoplastikler, mikrobiyal olarak sitoplazmada sentezlenen inklüzyon cisimcikleri şeklinde olan ve suda çözünmeleri mümkün olmayan plastiklerdir. Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) biyolojik olarak parçalanabilir ve yenilenebilir bir kaynaktan üretilen biyoplastiklerdir. PHB, PHA ailesine ait bir mikrobiyal poliesterdir (Thapa vd., 2018).

Bakteriler tipik olarak dengesiz büyüme gibi stresli koşullara yanıt olarak PHA'lar üretir ve depolar. Ancak PHA'ların yüksek maliyet nedeniyle geleneksel plastiklere göre piyasada kabulü sınırlıdır. PHA, mikroorganizmalar tarafından üretilen bir biyolojik poliestere ailesine verilen bir terimdir (Mozejko-Ciesielska vd., 2019). PHB, PHA'ların bir üyesidir. Optik olarak aktif olmakla birlikte PHB, konfigürasyonu D(-) şeklindedir. Bazı bakterilerde bu polimer hücre içinde suda bozulmadan depo edilir. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından sınırlayıcı koşullar altında hücre içi karbon ve enerji depolama bileşikler olarak üretilen mikrobiyal poliesterlerdir. Poli(3-hidroksibutirat) (PHB), ilk keşfedilen ve en çok çalışılan polimerdir. Bu sebeple PHA'ların en önemli üyesidir. Bakteriler metabolizmaları ile asetil-koenzim-A (asetil-CoA) üretirler ve bu, üç biyosentetik enzim tarafından PHB'ye dönüştürülür (Sabancı, 2015).

PHB'nin kopolimerleri valerat ve glikoz karışımı gibi substratların kullanılmasıyla meydana gelir. Bakterinin türüne, yaşam şekline ve büyüdüğü koşula bağlı olarak PHB'nin moleküler ağırlığı farklılık gösterebilir. PHB'nin kırılabilirliği valerat gibi maddelerin eklenmesi ile kopolimer meydana getirilerek azaltılabilir. Kullanılan substratların değiştirilmesiyle zaman içerisinde bakterilerin farklı kopolimerler sentezlemesi mümkündür. PHB'ların biyosentezi üç farklı enzim aracılığı ile gerçekleşmektedir (McAdam vd., 2020). Asetil CoA, başlangıç bileşik olarak görev yapar. Substrat miktarındaki artış da aynı zamanda sentez hızını artırır (Yao vd., 2025). PHB, organik çözücülerde kristalize bir yapıya sahipken hücre içinde sıvı, atmosferik koşullarda ise katı haldedir. Mikroorganizmalarda yağ damlacıkları şeklinde bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerinin çoğunun PHB ürettiği gözlemlenmiştir (Küçük, 2017).

Fotosentetik mor kükürtlü bir bakteri olan *Cereibacter sphaeroides*, azot sınırlı koşullar altında kuru hücre ağırlığının %60-70'ine kadar PHB biriktirebilmektedir (Krasil'nikova vd., 2015). Çok yönlü ve sağlam bir model organizma olan *Cupriavidus necator*, çeşitli karbon kaynakları kullanarak kuru ağırlığının %90'ına kadar PHB depolayabilmektedir (Bellini vd., 2022). Glikoz ve fruktoz gibi şekerler genellikle PHB homopolimerini elde ederken, yağ asitleri ve şekerler ise kopolimerleri elde edilirken kullanılır. Kullanılan farklı karbon kaynakları ve bakteriler ile, birbirinden farklı seviyelerde polimer veya kopolimer sentezi gerçekleşmektedir (N. Jiang vd., 2023).

Bu tez çalışmasında yüksek düzeyde PHB üreten bakteri suşunun ve optimum üretim koşullarının belirlenmesi amacıyla, *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 (DSM

5864) ve *Cupriavidus necator* H16 (DSM428) suşlarının; asetat, glikoz, fruktoz ve süktroz olmak üzere dört farklı karbon kaynağı kullanarak poli(3-hidroksibütirat) (PHB) üretim kapasiteleri araştırılmıştır.



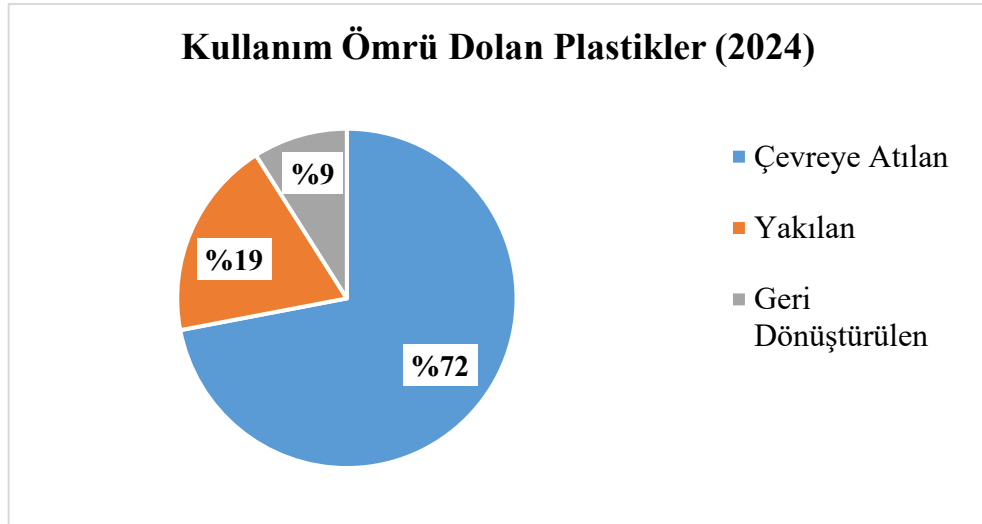
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde, çalışmanın konusunu oluşturan polihidroksialkanoatlar (PHA) ve özellikle polihidroksibütirat (PHB) ile ilgili literatürde yer alan bilgiler özetlenmiştir. PHB üretiminde kullanılan mikroorganizmalar, karbon kaynaklarının etkisi ve üretim süreçleri hakkında önceki çalışmalar da incelenmiş ve yer verilmiştir.

2.1. Plastik Malzeme Kullanımı

Petrol bazlı plastikler hafif, esnek, dayanıklı ve bozulmaya karşı dirençli olma gibi sahip oldukları çeşitli özellikler sebebiyle oldukça talep görmektedir. Geniş uygulama alanları mevcuttur. Çok yönlü olmalarının yanında yıllık üretimlerinin 300 milyon tonun üzerinde olduğu bilinen petrol bazlı plastikler çeşitli endişelere sebep olmaktadır. Bu plastiklerin üretimi ek fosil yakıt kullanımına da ihtiyaç duyar ve kirliliğin artmasına neden olur. Büyük ölçekli plastik üretimi ve kullanılması başta çevre üzerinde olmak üzere pek çok alanda olumsuz etkilere yol açmaktadır (Marichelvam vd., 2019).

Sentetik plastiklere olan bu bağlılık ciddi kirlilik sorunlarına neden olmaktadır. Bertarafı için kullanılan yöntemler zordur. Yakma işlemi zararlı yan ürün oluşmasına sebep olur ve pahalıdır. Çöplük alanlarında bozulma süreçleri oldukça yavaştır. Uzun zaman alan geri dönüşüm işlemi özelliklerinin değişmesine sebep olur ve ayrıştırılmaları da kolay değildir. Pigment ve kaplama gibi katkı maddelerinin eklendiği plastiklerin de geri dönüştürüldükten sonra kullanımı sınırlı olmaktadır (Castilho vd., 2009). Plastiklerden üretilen bu malzemeler kısa süreli amaçlar için kullanılıp hızlı bir şekilde atığa dönüşmektedir. 2024 yılında atık olan plastiklerin yaklaşık %72'si çevreye bırakılmış, %19'u yakılmış ve sadece %9'u geri dönüştürülmüştür (Şekil 2.1). Bu sayılar çevre verilen bu zararın önüne geçmek için yeni çözümler geliştirilmesinin bir ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır (Shahar vd., 2025).



Şekil 2.1. 2024 yılında kullanım ömrünü tamamlayan plastik atıkların yönetim yollarına göre dağılımı. Grafik; plastik atıkların geri dönüşüm, enerji geri kazanımı (yakma), düzenli depolama ve kontrolsüz çevresel deşarj kategorilerine göre yüzdesel dağılımını göstermektedir (Karasik vd., 2023; Shahar vd., 2025)

Ayrışmaya karşı dirençli plastiklerin yüzyıllar boyunca çevrede kalması mümkündür. Plastik çöpler tamamen ayrışmadan önce genellikle plastik parçacıkları olan mikroplastik (MP), mezoplastik ve nanoplastiklere (NP) parçalanırlar. Özellikle MP ve NP'ler küçük boyutlu olmaları sebebiyle; hızlı bir şekilde farklı yerlere transfer olabilmeleri, emilme ihtimallerinin yüksek olması, hayvan dokuları arasında göç etmelerinin muhtemel olması ve besin ağına kolay bir şekilde girip insanlara geçme ihtimallerinin olması nedeniyle endişe vericidirler. Bu plastiklerin insan ve hayvan sağlığı için toksik etkiler bırakmaları bir tehdit olduklarını kanıtlamıştır (Peng vd., 2020; Thompson vd., 2004).

Nüfus artışıyla birlikte plastik ürünlere olan talep ve ihtiyaç artmaktadır. Hemen hemen her alanda kullanılan plastiklerin ambalaj sektörü başta olmak üzere yapı ve inşaat sektörü, elektronik, otomobil vb. sektörler için kullanımının yoğun olduğu söylenebilir. Kullanılan plastik türlerinin %80'inin polipropilen (PP), polietilen (PE), polistiren (PS), polietilen tereftalat (PET) ve polivinil klorür (PVC) olması çevrede de yaygın olarak bulunmalarına neden olmaktadır (Bucknall, 2020). Şekil 2.2'de plastiklerin geri dönüşümündeki zorluklar verilmiştir.



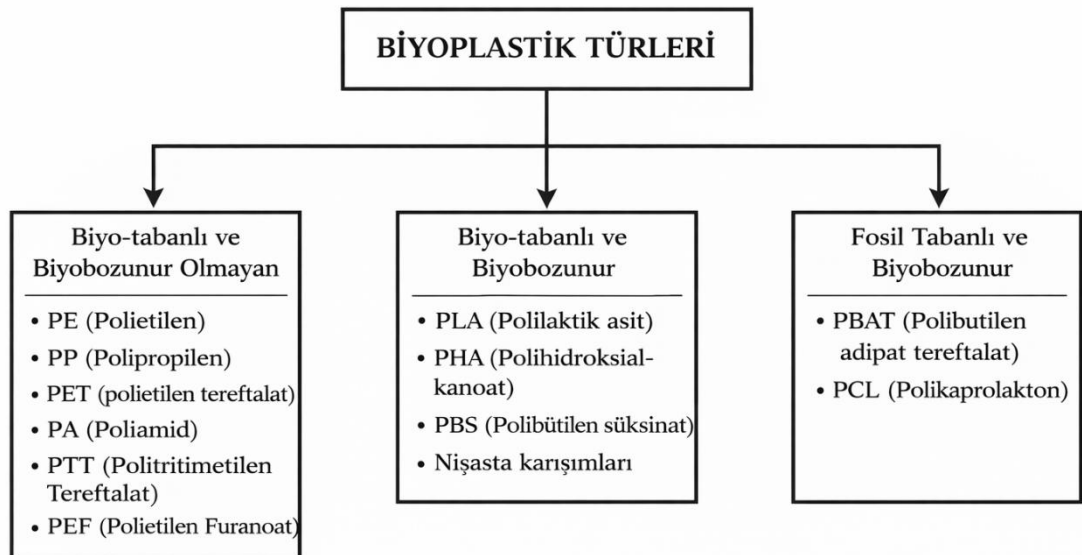
Şekil 2.2. Plastik geri dönüşümündeki zorluklar (Arora vd., 2023)

2.2. Biyopolimerler

Sentetik plastiklerin olumsuz çevresel etkileri, ticari ve endüstriyel uygulamalar için doğal olarak parçalanabilir plastiklerin geliştirilmesi alternatifinin düşünülmesine sebep olmuştur. Plastik kirliliğini önlemek için bazı canlılar tarafından doğal yollarla üretilen ve çevre dostu olan biyopolimerler kullanılabilir. Sentetik plastiklere kıyasla biyolojik olarak parçalanabilmeleri ve biyoyoumlu olmaları gibi avantajlara sahiptirler (Das vd., 2023). Biyoplastikler, bir yıl için üretilen petrol bazlı plastiklerin yaklaşık yüzde birini oluşturmaktadır. Bu durum kullanılan plastik malzemelerin fazlalığını gösterebilir. Plastiklerin çevresel etkilerini azaltmak için benzer fizikokimyasal özelliklere sahip biyopolimerlerin kullanımı artırılmalıdır. Doğal olarak mikroorganizmalar ve bitkiler tarafından üretilirler. Bakteriyel biyopolimerler depo materyali olarak üretilmektedir. Doku mühendisliği iskeleleri ve kontrollü ilaç salım sistemleri gibi biyomedikal uygulamalarda umut verici oldukları kabul edilir (Yao vd., 2025).

Biyolojik olarak bozunabilen polimerler, polipropilen (PP), polietilen (PE) ve polietilen tereftalat (PET) gibi petrol türevli polimerlerin en iyi alternatifi haline gelmiştir. Alternatif polimer arayışının en temel sebebi petrol bazlı plastiklerin çevre, insan ve doğa üzerinde bıraktığı ciddi sorunlar ve bozunma oranlarının düşük olmasıdır. Kullanılan fosil kaynaklı plastiklerin az bir kısmı (<10) geri dönüştürülebilir, az bir kısmı yakılır (<10) ve geriye kalan büyük kısmı ise (%80) çevrede çöp şeklinde birikmektedir (Pinaeva ve Noskov, 2024). Polimerlerin geri dönüşüm süreçlerinde yüksek maliyet kullanımı kısıtlayıcı bir faktör olup bu yüzdenin az olmasının asıl sebebi sayılmaktadır. Dünya çapında plastiklerle mücadele artmıştır. Mikroorganizmalar tarafından işlendikten sonra biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, plastiklerin çevre üzerindeki zararlı etkisini azaltacaktır (Pinaeva ve Noskov, 2024). Karbon ayak izinin azaltılması, sürdürülebilirlik ve yüksek biyobozunurluluk oranları sebebiyle biyoplastikler tercih edilebilmektedir.

Biyopolimerlere örnek olarak polilaktik asit, nişasta karışımları, polihidroksibütiratlar, selüloz, kitin ve kazein polimerleri verilebilir. Biyoplastikler, özelliklerine ve kaynaklarına göre genellikle üç kategoriye ayrılır. Biyobazlı biyolojik olarak parçalanamayan plastikler, biyobazlı biyolojik olarak parçalanabilen plastikler ve fosil bazlı biyolojik olarak parçalanabilen plastikler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılırlar (Jayarathna vd., 2022). PP, PE ve PET biyolojik bazlı bozunmayan plastiklere birer örnektir. Tamamen ya da bir kısmının doğal kaynaklı olmasından dolayı yapısal olarak petrol bazlı plastiklere benzerler ve bu nedenle parçalanmazlar. Biyobazlı biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin ise nişasta, selüloz, PLA, PHA ve PHB olduğu bilinmektedir (Şekil 2.3) (Santana vd., 2018). Biyobozunur olan bu plastikler genellikle bitki ve mikroorganizmalardan üretilmektedirler. Biyolojik parçalanabilirlik, iyi mekanik özellik, uygun maliyet ve fazla miktarda bulunabilmeleri gibi özellikler nedeniyle küresel olarak üretilen tüm biyoplastik kaynakları arasında en çok kullanılan türlerdir. Ayrıca nişasta kaynaklı biyoplastikler geniş bir üretim kapasitesine sahiptir (Santana vd., 2018; Shafqat vd., 2021). PHA'nın kopolimeri olan polihidroksibütirat-ko-valerat (PHBV) nişasta ile birleştirilmiş ve nişastanın PHBV'nin parçalanmasını hızlandırdığı bulunmuştur (Imam vd., 1998).



Şekil 2.3. Biyoplastik türlerinin sınıflandırılması (Jayarathna vd., 2022)

Polimer bağlarına (eter, ester ya da amid) hidrolitik olarak kararsız bağların eklenmesi gibi çeşitli yollarla fiziksel ve kimyasal özellikleri geliştirilebilmektedir. Örnek

olarak en yaygın kullanılan polikaprolakton (PCL) ve polimerler polibütilen adipat tereftalat (PBAT) verilebilir (Shamsuddin vd., 2017).

Biyoplastiklere olan talep hızla artmaktadır. Ambalajlama, tarım, inşaat, elektronik, tekstil ve otomotiv gibi farklı uygulamalarda kullanılmaktadırlar. Ambalaj sektörü oldukça fazla biyoplastik kullanımına sahiptir. Biyoplastikleri petrol bazlı plastiklerle kıyaslarken üretim için kullanılan yöntem ve hammaddeler önemli rol oynar. Biyoplastikler genellikle yenilenebilir kaynaklardan elde edilir (Sathiascelan vd., 2024). Bu kaynaklar şeker kamışı, mısır ve tarımsal atıklar olarak sıralanabilir. Bu kaynakların kullanımı ile fosil yakıtlara olan bağımlılığın azalması ve karbon emisyonunun düşürülmesi sağlanır. Mikrobiyal yetiştirme ya da fermantasyon gibi üretim süreçlerinin karışık olması, endüstriyel ölçekte üretim için sınırlayıcı olabilir (Sathiascelan vd., 2024). Biyoplastiklerin üretim yöntemleri, çevre üzerinde etkileri ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri üretilen plastik için önemli birer faktördür (M. S. Lee ve Salleh, 2025).

2.2.1. Polihidroksialkonatlar (PHA)

Mikroorganizmalar tarafından enerji depo maddesi olarak sentezlenen polimerlerdir. Diğer biyoplastikler arasında nispeten daha küçük bir ticari pazar payına sahip olduğu ancak homopolimeri olan PHB'nin daha hızlı biyobozunurluluk oranları gösterdiği bilinir (Yao vd., 2025). Bakteriler hücrelerinde karbon ve enerji kaynağı olarak hücre içi PHA granüllerini tüketirler. Metabolizmada, 3-ketotiolaz (*pha A*), PHB sentaz (*pha C*) ve asetoasetil-CoA redüktaz (*pha B*) diye adlandırılan üç biyosentetik enzim görev alır ve asetil koenzim A'yı kullanarak PHB'ye dönüştürürler. Mikrobiyal kökenli ve biyolojik olarak parçalanabilen bir poliester grubudur (Tserki vd., 2006). Hidroksi alkonatların poliesteri olan PHA'lar 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden oluşur ve hücrelerin sitoplazmasında zarla çevrilmiş 0,2-0,5 µm çapında granüller şeklinde hücre içinde birikir. Çoğunlukla bir ester bağıyla oluşmaktadırlar. PHB'nin en sık rastlanan mikrobiyal PHA olmasının yanında 150'den fazla bilinen PHA türü tanımlanmıştır ve bunlar monomer zincir uzunluğuna göre ayrılırlar (Z. Li vd., 2016). PHA'lar genellikle içerdikleri karbon atom sayısına göre kısa zincirli (scl-PHA), orta zincirli (mcl-PHA) ve uzun zincirli PHA'lar (lcl-PHA) olmak üzere üç gruba ayrılır. Kısa zincirli PHA'ların polimer zincirine bağlı bir ya da iki karbon atomu varken, orta zincir uzunluklu PHA'lar

6-14 karbon atomundan oluşur uzun zincirli olanlar ise 14'ten fazla karbon atomu içermektedir (Sabapathy vd., 2020).

Monomer içeriğine göre PHA homopolimerlerinin ya da kopolimerlerin özellikleri değişiklik gösterir. PHB ve PHV scl-PHA'lara örnek olarak verilebilir. Kullanılan karbon kaynağına ve mikroorganizma türüne bağlı olarak üretilen PHA türü değişebilmektedir. Ayrıca üretim için kullanılan substrat ve beslenme şekli ile düzenleme yapılabilir. Homopolimerlerin yanında poli(3-hidroksibutirat-ko-3-polihidroksivalerat) gibi kopolimerler ve doğal olmayan poliesterlerde PHA sentazlar aracılığı ile sentezlenebilmektedir (Tebaldi vd., 2019).

PHA'lar darbeye dayanma gücü zayıf, yüksek kırılma derecesine sahip, kısmen kristalin ve yüksek viskoz özelliklere sahip termoplastiklerdir. Erime sıcaklıklarına yakın veya üzerinde sıcaklıklarda şekil verilebilirler (P. Kumar ve Kim, 2018). PHA'lar sahip oldukları biyobozunurluluk, toksik olmama ve biyouyumluluk gibi biyolojik özellikler sebebiyle doku mühendisliği, ilaç ve cerrahi uygulamalar gibi pek çok uygulama için idealdirler. Nüfus artışı ile birlikte plastik tüketimi önemli derecede artmıştır. Tüketimi çok fazla olan petrol türevli plastiklerin çok az bir kısmı geri dönüştürülebilir. Petrokimyasal türevli plastiklerin tüketimindeki bu artış aynı zamanda fosil bazlı kaynakların da eş zamanlı olarak tükenmesine sebep olmaktadır. Biyobozunur olmayan kompozitlerin bir araya gelip birikmesi ile; ekolojik bozulma, iklim değişikliği gibi ciddi problemlerin yanında CO₂ emisyonunda da artış meydana gelmektedir (Balasubramanian vd., 2024). Bu sebeplerden dolayı plastik kullanımında azalmaya gidilip, doğayla daha uyumlu, çözünmesi mümkün ve toksisitesi az olan plastiklerin üretilmesi şeklinde yollar izlenmeye başlanmıştır. Parçalanabilen, toksik etkisi az olan, biyouyumlu polimerlerin üretimi petrol türevi plastiklere karşı faydalı ve en iyi alternatif olmuştur (Kaur vd., 2024). Biyobozunur polimerler bazı mikroorganizmaların yaşam döngüleri sonucunda elde edilebilmektedir (Samrot vd., 2021). Bakterilerin biyolojik fonksiyonlarından biri olan bu biyopolimerleri değerli kılan asıl özellikler biyouyumlu, parçalanabilen ve yenilenebilir olmalarıdır. Bu polimerlerin plastiklere göre başlıca, insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri olmak üzere pek çok avantajları da mevcuttur. Çok yönlü olmaları sebebiyle geniş uygulama alanlarına sahip olan petrol bazlı plastiklerin çevresel etkilerini azaltmak için benzer fizikokimyasal özelliklere sahip biyopolimerlerin kullanımı artırılmalıdır. İmplantlarda, sürdürülebilir ambalajlama ve atıkların yönetimi gibi farklı

alanlarda kullanılabilmesine olanak sağlar (Acharjee vd., 2023; Balasubramanian vd., 2024).

2.2.1.1. Biyobozunurluk ve biyoyumluluk

PHA'nın biyomalzeme olarak sayılmasındaki temel bir özellik biyolojik olarak parçalanmasıdır. Biyoplastikler, suda çözünmez ve inerttir. Ancak birçok ekosistemde çeşitli mikroorganizmalar tarafından parçalanabilirler (S. Y. Lee, 1996). Aerobik ve anaerobik koşullarda sırasıyla CO₂, su ve metana parçalanır. Mikrobiyal bozulması enzimatik reaksiyonlarla gerçekleşir. Mikroorganizmalardaki hücre dışı PHA depolimeraz ya da hücre içi depolimeraz ile parçalanma gerçekleşir (Pooja vd., 2023). Bozunma, hücre içi depolimerazın PHB'yi 3-hidroksibütirik aside indirgemesi ile başlar. Ardından 3-hidroksibütirik asit asetil asit türevlerine oksitlenir. Asetil asetat ise asetil-CoA'ya dönüşür. Asetil-CoA, TCA döngüsüne girip CO₂'ye oksitlenir (Morlino vd., 2023). Sıcaklık, nem seviyesi, besin kaynağı ve pH gibi çevresel faktörlerin de parçalanma üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (S. Y. Lee, 1996).

PHA'ların bağışıklık üzerinde herhangi bir tepkiye neden olmaması biyoyumlu olduğunu gösterir. Polimerin saflığı ise uyumluluğunda etkili olan temel faktör olması nedeniyle saflaştırma önemli bir adımdır. Parçalanması sonucu toksik olmayan ürünlerin oluşması biyoyumlu olduğunun bir diğer kanıtıdır (Thamarai vd., 2024). 3HB (Hidroksi bütirat) bir kan bileşeni olduğu ve ökaryotların zarlarında bulunduğu için PHA'ların biyoyumlu olmasının normal olduğunu kanıtlar (Reusch, 2000; Wiggam vd., 1997).

Tanımlanmış olan bu monomerler teknolojik ilerlemelerin olmasında etkili olmuşlardır. Kardiyovasküler uygulamalarda, kalp kapakçıklarında, vasküler stentler ve greftlerde, perikardiyal yamalar ve arter büyütme gibi biyomedikal alanlarda farklı şekillerde kullanılmışlardır (Bassous vd., 2016). Diş hastalıkları ve yaralanmalarının tedavisinde kemik ve doku rejenerasyonunda öncülük etmek için uygulanmaktadır. Ayrıca bu poliestерler üretra rekonstrüksiyonunda ve emilebilir dikiş yapısında kullanılarak yara tedavisinde uygulanmıştır (Bassous vd., 2016; Galgut vd., 1991; Kostopoulos ve Karring, 1994; van der Giessen vd., 1996). Şekil 2.4'te biyobozunurluluğa örnek olarak, yapılmış bir PHB filminin zaman içindeki değişimi yer almaktadır.



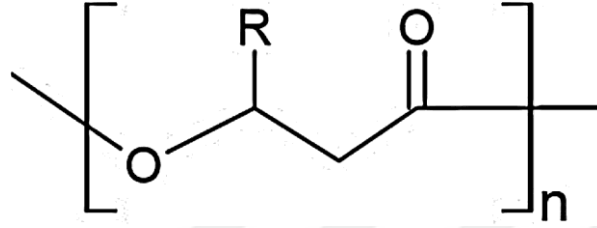
Şekil 2.4. PHB filminin zaman içindeki morfolojik değişimi (Acharjee vd., 2024)

Bakteriler tarafından yüksek miktarda bir biyopolimer olan PHA üretilmektedir. Bakteriye PHA üretiminde fermentasyon ve devamındaki işlemler için yüksek üretim maliyeti olması engel olarak söylenebilir. PHA'lar hidrofobik ve iyi film oluşturma özelliklerine sahip olduklarından dolayı termal bozunmaya yatkın olma ve sınırlı işlevsellik gibi zayıf özelliklerin, farklı modifikasyonlarla iyileştirilmesi mümkündür. Böylece daha esnek ve daha dayanıklı ürünler üretilir (Reeve, 1993).

2.2.1.2. PHA'ların biyosentezi

PHA, genel olarak mikrobiyal fermentasyon, transgenik bitkilerde sentez ve kimyasal veya enzimatik kataliz olmak üzere üç farklı yolla sentezlenebilir (Winnacker, 2019). Bu yöntemler arasında mikrobiyal fermentasyonun en yaygın olarak kullanılan olduğu söylenebilir. Polimerizasyon sürecinde kullanılan karbon kaynakları ve enzim türlerine bağlı olarak mikrobiyal sentez gerçekleşir. PHA'ların biyosentezi üç farklı ana yolla gerçekleşebilmektedir (Azizimehr vd., 2024). I.yol: asetil-CoA'dan 3-hidroksibütiril-CoA'ya dönüşüm, II.yol: yağ asidinin β -oksidasyonunu ve III.yol: yağ asidi sentezini kapsamaktadır. Kullanılan karbon kaynağı şekerler ise I ve III. yollar, yağ asitleri ise de II.yol kullanılır (Azizimehr vd., 2024; Winnacker, 2019). I.yol, scl-PHA'ların sentezinde kullanılır. Şeker, amino asit ya da yağ asidi molekülleri ilk önce iki asetil-CoA molekülüne, sonrasında *phaA* ve *phaB* tarafından iki hidroksibütiril-CoA molekülüne dönüştürülür. Ardından *phaC* yardımıyla yoğunlaşma reaksiyonu gerçekleşir ve PHB'ye polimerize edilir. Bu yol kullanılarak üretilen polimerlere örnek olarak PHB, PH4B, PHBV ve PHBP verilebilir. II.yol, mcl-PHA'ların sentezi için kullanılır. Glikoz, gliserol, sükröz, metanol ve karbondioksit gibi karbon kaynakları kullanılırken III.yol ile polimer sentezlenir. Yağ asidi molekülleri β -oksidasyon yoluyla parçalanır. Yağ asitleri önce enoil-CoA'ya ardından R-3-hidroksiasil-CoA'ya dönüştürülür. Son adım olarak da mcl-PHA sentaz tarafından mcl-PHA oluşur. Örnek olarak PHO, PHHx ve PHN verilebilir (Zytner vd., 2023). PHA birikiminin karbon/azot oranının artması ile birlikte

arttığı gözlemlenmiştir. Besin maddelerinin kısıtlanması ile ortamdaki büyümenin dengesizliğine yanıt olarak PHA birikimi olmaktadır. Biyosentez için gerekli olan azot, fosfat, magnezyum, sülfat ve oksijen gibi besin maddelerinin kısıtlı olduğu ve karbon kaynağının bol bulunduğu ortamda mikroorganizmaların PHA depoladıkları anlaşılmıştır (Jacquel vd., 2008). PHA'nın genel yapısı Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5. PHA monomerinin genel yapısı verilmiştir (Zytner vd., 2023)

Monomerin tipine göre tanımlanmış olan birçok homopolimer ve kopolimer vardır (Çizelge 2.1). 3-hidroksi asitleri içeren PHA'lar optikçe aktif ve PHA sentaz enzimi nedeniyle R konfigürasyonundadır. PHA'ların moleküler ağırlığı genellikle 100-1000 kDa arasındadır. Polimer mol kütlesi, karbon kaynağına ve konsantrasyonuna, pH'a, kültür koşullarına ve bakteri türüne bağlıdır (Anderson vd., 1992). Monomerlerin zincir uzunluğu polimerin erime noktasını, kristallik derecesini, camsı geçiş sıcaklığını ve hidrofobikliğini etkiler (Dartailh vd., 2021).

Çizelge 2.1. PHA polimerlerinin örnekleri (Z. Li ve Loh, 2015)

Kimyasal Adı	Kısaltma	Yan gruplar	Yapı
Poli(3-hidroksibutirat)	P3HB	Metil	Homopolimer
Poli(4-hidroksibutirat)	P4HB	Hidrojen	Homopolimer
Poli(3-hidroksivalerat)	P3HV	Etil	Homopolimer
Poli(3-hidroksiheksanoat)	P3HHx	Propil	Homopolimer
Poli(3-hidroksiheptanoat)	P3HHp	Butil	Homopolimer
Poli(3-hidroksioktanoat)	P3HO	Pentil	Homopolimer
Poli(3-hidroksinonanoat)	P3HN	Heksil	Homopolimer
Poli (3-hidroksibutirat- <i>ko</i> -3-hidroksivalerat)	PHBV	Metil/etil	Kopolimer

PHA üretiminde genellikle, ilk önce büyüme ardından PHA birikimi aşaması şeklinde iki aşamalı fermentasyon süreci oluşturulur. Büyüme aşamasında, azot/fosfor kaynağında azalmayla birlikte maksimum biyokütle üretimi gerçekleşir. İkinci aşamada

ise besin eksikliği ile ortamdaki fazla karbon, biyokütle büyümesi yerine PHA birikimi ve sentezlenmesine yönlendirilir (Dietrich vd., 2017).

PHA'nın biyosentez yolu; Krebs döngüsü, glikoliz ve β -oksidasyon gibi bakterinin besin metabolizmasından ve enerji üretiminden sorumlu yolları ile asetil-CoA gibi ortak ara ürünlerin üretilmesi sebebiyle birbirleriyle bağlantılıdır. Asetil-CoA, bu yolların entegre olmasındaki asıl sebeptir (Zheng vd., 2020).

2.2.2. Polihidroksibütirat (PHB)

PHB, PHA'lar arasında ilk izole ve karakterize edilen (3-HB) monomerlerinden oluşan bir homopolimerdir (Steinbüchel ve Valentin, 1995). PHB'nin termoplastik ve kristalin yapısının moleküler kütlesiyle ilişkili olduğu düşünülür. Doğada farklı mikroorganizmalar tarafından üretilen en yaygın biyolojik poliester olduğu bilinmektedir. Düşük oksijen geçirgenlikte ve sahip olduğu doğrusal zincir yapısı amorf ve kristal fazlar içerdiği için oldukça kristalindir. Mikroorganizmalar tarafından karbon rezervi olarak ve bakteriyel fermantasyon ile endüstriyel ölçekte üretilir (Yeo vd., 2018). Sentetik polimerlere göre daha sert ve esnek olma gibi çeşitli avantajlara sahiptir. PP ve PE gibi petrol bazlı plastiklere benzer fiziksel özellikler gösterdiği için alternatif olabileceği düşünülmüştür. PHB'nin mikroorganizmalar tarafından doğal olarak sentezlenmesi, biyoyoumlu ve biyolojik olarak parçalanabilmesi son zamanlarda ilgi görme sebeplerindendir (Getachew ve Woldeesenbet, 2016).

PHB, yapısında düzenli olarak paketlenmiş kristalin bölgeler ve daha düzensiz olan amorf bölgelerin bir arada bulunduğu yarı kristalin bir polimerdir. Kristalin bölgeler, polimer zincirlerinin sıkı ve düzenli hizalanması sonucu oluşurken, amorf bölgeler daha gevşek ve esnek bir yapı oluşumuna neden olur. Bu sebeple yüksek kristallik derecesi polimerde sert ve kırılgan olmayı teşvik ederken, amorf bölgelerin varlığı az da olsa esneklik kazandırmaktadır. Bu durum PHB yapısının mekanik özelliklerini doğrudan etkilediğini göstermektedir (Eesaee vd., 2022; Wellen vd., 2015).

Polimerlerin kimyasal yapıları ve molekül ağırlıkları, özelliklerini etkiler. PHB türleri ana zincirdeki karbon atomu sayısı ve yan zincir uzunluğu bakımından farklılık göstermektedir. Fosil bazlı plastiklere alternatif olan PHB'ler termal ve mekanik özelliklerindeki eksiklikler sebebiyle sınırlı bir uygulama alanına sahiptir. Polimerlerde kristalleşme derecesi ne kadar yüksekse o kadar sert ve sağlam malzeme elde edilir.

Ancak yüksek kristallik (%60-80) kırılğan ve düşük gerinim değerlerine de sebep olmaktadır. PHB, PP ile karşılaştırılabilir mekanik özelliklere sahiptir ancak PHB'nin termal işlenebilirliği pratik uygulamalarda sınırlıdır. Polimerler, nişasta ve selüloz gibi doğal malzemeler ile fiziksel karıştırma veya bir kimyasal modifikasyon olan kopolimerizasyon ile termal ve fiziksel özellikleri iyileştirilebilir. Daha sağlam, esnek ve dayanıklı özelliklerde olan malzeme oluşturulması uygulanabilir bir yaklaşım olarak görülmüştür (D. Li vd., 2025; McAdam vd., 2020).

Kimyasal yapısı, tekrarlayan monomer birimlerinde bulunan bir metil grubu ($-CH_3$) ve bir ester bağı ($-COOR$) ile karakterize edilir. PHB'nin temel yapıtaşı olan 3-hidroksibütirat monomeri, bir hidroksil ($-OH$) grubu ve bir karboksil grubunun ($-COOH$) esterleşmesi sonucu oluşan bir ester fonksiyonel grubu içerir (Grigore vd., 2019). Bu fonksiyonel gruplar ve ester bağları, PHB'nin termoplastik özelliklerini ve biyobozunabilirliğini belirleyen temel unsurlar arasında yer alır (Grigore vd., 2019). Bakterilerden elde edilen PHB'nin moleküler ağırlığının genellikle $1 \times 10^4 - 3 \times 10^6$ g/mol arasında olduğu ve polidispersitesinin de yaklaşık olarak iki olduğu bilinir. Erime sıcaklığı yaklaşık $180^\circ C$ iken cam geçiş sıcaklığı $4^\circ C$ 'dir (Doi, 1990). PHB'nin genel fiziksel ve mekanik özellikleri Çizelge 2.2'de listelenmiştir.

Çizelge 2.2. PHB'nin mekanik ve fiziksel özellikleri (Kaplan, 1998; Markl, 2018)

Özellik	PHB
Kristal Erime Noktası ($^\circ C$)	175
Kristallik (%)	80
Moleküler ağırlık (Dalton)	5.10^5
Cam geçiş sıcaklığı ($^\circ C$)	4
Yoğunluk (g/cm^3)	1.25
Eğilme modülü (GPa)	4.0
Çekme dayanımı (MPa)	40
Kopmada uzama (%)	6
Ultraviyole direnci	İyi
Solvent direnci	Zayıf

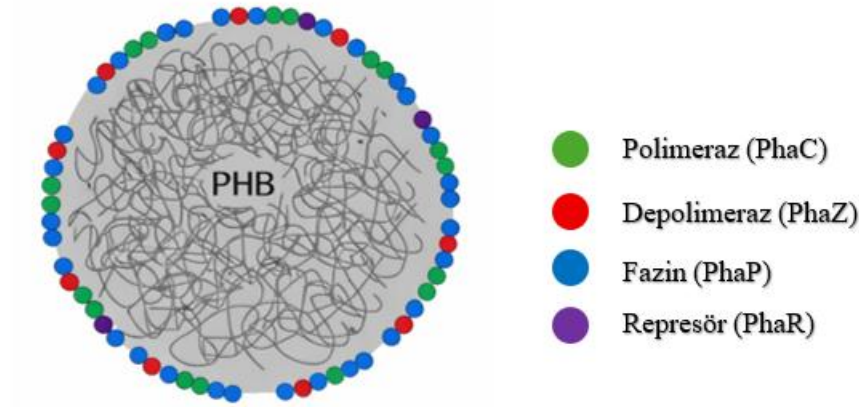
2.2.2.1. PHB granüllerinin morfolojisi ve PHB inklüzyonlarıyla ilişkili proteinler

Bakterilerde karbon ve enerji depolama bileşiği olarak bilinen PHB, karbon kaynağının fazla besin maddesinin ise sınırlı olduğu ortamlarda granül (inklüzyon cisimcikleri) şeklinde birikmektedir (Yañez vd., 2020). PHB granülleri sitoplazma içerisinde, sitoplazmik membranda veya ona yakın yerde lokalize olmaktadır. Granül çapları $0,2-0,4 \mu m$ aralığında değişebilmektedir. Hücre içinde tek bir granül ya da birden

fazla granül halinde bulunabilen inklüzyonlar, tür ve büyüme koşullarına bağlı olarak farklı bölgelerde yoğunlaşabilmektedirler (Jendrossek vd., 2007; Wahl vd., 2012).

PHB inklüzyon cisimlerinin oluşumunda yer alan çok sayıda gen ve protein tanımlanmıştır. PHA granülleri ile ilgili proteinler: PHB sentazlar, düzenleyici proteinler, PHB depolimerazlar ve fazinler olmak üzere dört gruba ayrılabilir (L. Wang vd., 2019). PHB sentaz, PHB sentezini PHB depolimeraz ise bozunmasını başlatır. Düzenleyici proteinler; fazinlerin ifade düzeyini polimer sentezlenirken ve bozunurken düzenler (Martínez vd., 2023). PHA sentaz (*phaC*): Mikroorganizmalardaki PHA tipini belirleyen anahtar enzim olarak tanımlanmaktadır. Özgül bağlanma yeteneği ve farklı yapılarından dolayı üç tane PHA sentaz (*phaC*) tipi vardır (Saravanan vd., 2022). Kısa zincir uzunluklu (SCL) olanlar: 3-5 karbon atomu içermektedirler. İkinci olarak orta zincir uzunluklu (MCL) olan PHA sentazlar 6-14 karbon atomu içermektedirler. Üçüncü tip PHA sentaz ise C ve E olmak üzere iki alt birimden meydana gelmektedir. Bu proteinin aktivitesi için her iki alt birimin mevcut olması gerekmektedir.

PHB'nin biyosentezinde görevli asıl enzimdir (Rehm ve Steinbüchel, 1999). Hücre içi PHB depolimeraz (*phaZ*): Ortamda fazla karbon bulunduğunda depolanan bileşiğe PHB denilmektedir. Bu yüzden mikroorganizmalarda depolanan bu karbonun geri kazanılması için depolimerizasyon sistemi bulunmaktadır. PHB'nin parçalanmasında görevlidir. Fazinler (*phaP*): Hidrofobik bir çekirdekten oluşan PHB inklüzyonları katabolik ve katabolik olmayan çeşitli proteinlerden oluşan bir fosfolipit yapılı tek katmanlı membranla çevrilidir. Katabolik proteinler arasında PHB sentaz ve PHB depolimeraz yer alırken, katabolik olmayan proteinler arasında fazinler (*phaP*) olarak isimlendirilen proteinler yer almaktadır (Steinbüchel vd., 1995). PHA depolayan bakterilerde bulunması gereken protein gruplarından biridir. Üretilen PHA'ların boyutu üzerinde de etkilidir. PHA biyosentezinde yer alan enzimlerin aktivite seviyeleri, PHA inklüzyonlarının boyutu üzerinde etkilidir. Artan fazin ve PHA sentaz proteinlerinin aktivitesi ile birlikte inklüzyon sayısında da artış olduğu görülmektedir. Fazinler, inklüzyonların oluşmasında ve stabilizasyonunda rol almaktadırlar. Bakterilerin içinde bulunan polimer zincirini stabilize eder ve PHB granüllerinin boyutunu kontrol ettiği bilinir (Sudesh vd., 2000). Şekil 2.6'da PHB granülünün şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.6. PHB granülünün şematik gösterimi (Koning vd., 2023)

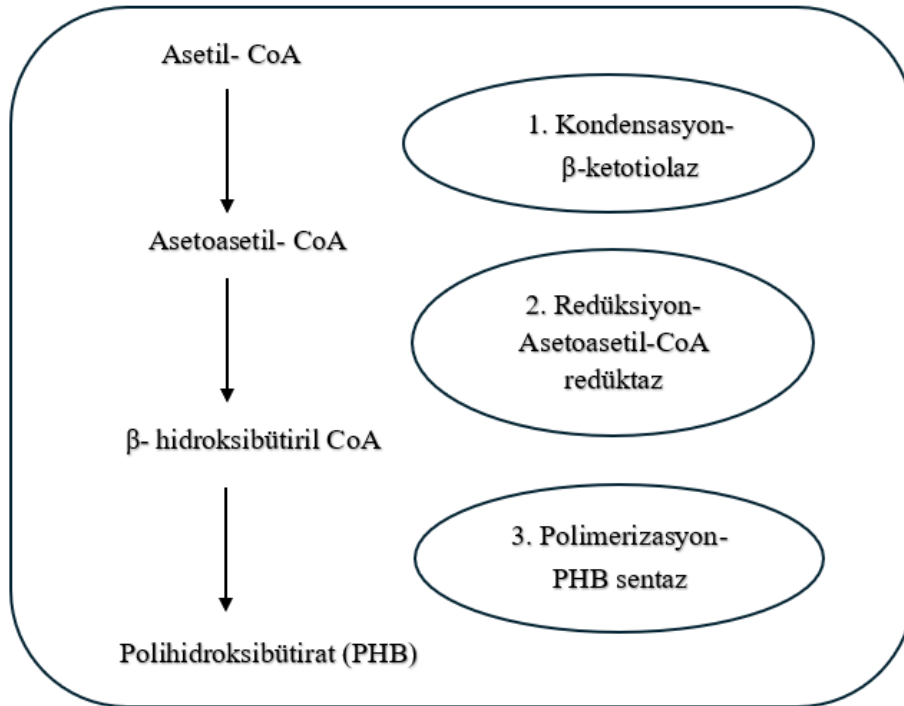
PHB/PHA granül yüzey tabakasında proteinlerin varlığı kabul edilse de fosfolipit varlığı kanıtlanamadığı için moleküler bileşim tam bilinmemektedir. Yapılan bir çalışmada, prokaryotlarda PHB granüllerinin polimer çekirdek ve fonksiyonel ve yapısal proteinlerden oluşan bir yüzey tabakasından oluşan bir kompleks olduğu ortaya koyulmuştur. PHB granüllerinin yüzey tabakasının fosfolipit içermediği ve sadece granül yüzeyinde lokalize proteinlerden oluştuğu varsayılmıştır. *In vivo* olarak, sonuçlar hücre zarında fosfolipit varlığı ile uyumlu iken granül yüzeyinde varlığıyla çelişmektedir (Bresan vd., 2016).

2.2.2.2. Mikrobiyal PHB üretimi

PHB, mikroorganizmalarda besin stresi altında ve karbon fazlalığının olduğu ortamda granül şeklinde biriken enerji ve karbon depo ürünüdür (McAdam vd., 2020; Rao vd., 2010). Mikrobiyal PHB üretiminin metabolik yolları için *phaA* (β -ketotiolaz), *phaB* (asetoasetil-CoA redüktaz) ve *phaC* (PHB sentaz) genlerinin gerekli olduğu bildirilmiştir. PHB biyosentezinde anahtar enzim olarak kabul edilen PHB sentazların I, II ve III olmak üzere üç tipinin farklı moleküler ağırlıklarına sahip PHB sentezlediği bilinmektedir. Tip I PHB sentazlar, 500.000 ile birkaç milyon kDa aralığında en yüksek moleküler ağırlıklara sahip polimer sentezlerken, tip II sentazlar yaklaşık 50.000-500.000 kDa arasında PHB sentezlemektedir. Tip III PHB sentazlar ise Tip I ve II sentazların arasında moleküler ağırlığa sahip polimerler sentezleyebilmektedir. PHB polimerinin moleküler ağırlığının büyük ölçüde PHB sentaz enziminin aktivitesine bağlı olduğu söylenebilir (Elsayed vd., 2018). PHB sentazlar PHB sentezinin son basamağı olarak bilinen, CoA'yı

serbest bırakıp 3-hidroksibütiril-CoA'nın PHB'ye dönüşümünü katalize etmekte görevli enzimlerdir. PHB biyosentetik genleri arasında bulunan *phaA* ve *phaB* genleri ile *C. sphaeroides*'te PHB birikimi arasında anlamlı bir korelasyon vardır. Asetil-CoA için seçici olan β -ketotiyolazların, *phaA* geninin artan ekspresyonu ile PHB birikiminde artışa sebep olabildiği kaydedilmiştir (Gutschmann vd., 2021; Y. R. Lee vd., 2020).

PHB sentezinde rol alan temel enzimler şunlardır: (i) PHB sentaz (*phaC*), (ii) β -ketotiyolaz (*phaA*) ve (iii) asetoasetil-CoA redüktaz (*phaB*). PHB bakterilerde, karbon ve enerji kaynağı olarak işlev görür ve β -ketotiyolaz (*phaA*), asetilasetil-CoA redüktaz (*phbB*) ve PHB sentaz (*phbC*) tarafından katalize edilen üç aşamalı bir reaksiyonla sentezlenir. Mikrobiyal PHB üretiminde ilk adım olan kondensasyon basamağı iki asetil-CoA molekülünün, β -ketotiyolaz tarafından asetoasetil-CoA'ya yoğunlaşmasıyla başlar. İkinci adım olan redüksiyonda asetoasetil-CoA, asetoasetil-CoA redüktaz tarafından indirgenerek β -hidroksibütiril CoA oluşturulur. Son adım olan polimerizasyon aşamasında ise β -hidroksibütiril CoA, PHB sentaz tarafından PHB'ye polimerize edilir (Şekil 2.7). Sitoplazmada granüller şeklinde biriken PHB granüllerinin büyüklük ve miktarı granüllere bağlanabilen fazin proteinler *phaC* ve *phaP*'nin miktarına bağlı olarak düzenlenir (M. Kumar vd., 2020).



Şekil 2.7. PHB'nin biyosentetik yolu (Czemplik vd., 2011)

Uygun beslenme koşullarında, 3-ketotiolaz krebs döngüsü tarafından üretilen fazla miktardaki koenzim tarafından baskılanarak PHB sentezini engeller ve asetil-CoA'yı enerji üretimine yönlendirir. Durum tersi olduğunda ise yani dengesiz koşullar altında, asetil-CoA PHB sentez yoluna yönlendirilir ve PHB birikimine yol açar. PHB biriktiren mikroorganizmalarda çevresel değişikliklere cevap olarak görülen bir stratejidir (Y.-M. Jung ve Lee, 2000; Tan vd., 2014).

2.2.2.3. PHB üretimi için mikroorganizmalar

Bu zamana kadar bakteri ve arkeler de dahil olmak üzere 300'den fazla PHA üreten suş tanımlanmıştır (Saravanan vd., 2022). Gram-negatif bakterilerde PHB birikimi iyi bilinirken aynı zamanda çeşitli gram pozitif bakteriler, anaerobik (kükürtsüz ve kükürtlü) ve aerobik (siyanobakteriler) fotosentetik bakteriler ve bazı arkebakteriler de PHB sentezleyebilmektedir. PHB üreten suşların çoğunun gram negatif bakterilerden olduğu bilinir. Gram negatif bir bakteri olan *C. necator* yüksek PHB üretim kapasitesine sahip ve PHB sentezi için denenen ilk bakterilerdendir (J. Wang vd., 2024). PHB sentezlediği bilinen gram pozitif bakterilerden biri olan *Bacillus*'un *B. cereus* ve *B. megaterium* türleri yüksek PHB sentez kapasitesine sahiptir (Martínez-Herrera vd., 2023). Mikroorganizmalar PHB'yi, suda çözünmeyen bir yapıya sahip olduğu için hücre içi lipid parçacıkları olarak depolar. Bazı bakteri türlerinde polimer depolamak için azot, fosfor ve oksijen gibi besin maddelerinin sınırlı olması gerekmektedir. *C. necator*, *Pseudomonas oleovorans* ve *P. putida* bu türlere örnek verilebilir. Bunun haricinde bazı bakteri türlerinde ise besin kısıtlaması polimerin depolanmasını etkilemez ve büyüme sırasında da polimer depolanabilmektedir. *Alcaligenes latus* ve *Azotobacter vinelandii*'nin mutant suşu ise bu bakteri grubuna örnek verilebilir (Muhammadi vd., 2015).

2.2.2.3.1. *Cupriavidus necator*

C. necator; toprak, göletlerden gelen çamur, yeraltı suyu ve kök nodülleri gibi farklı ortamlardan izole edilebilen bir bakteridir (Moriuchi vd., 2019). Daha önce *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* ve *Wautersia eutropha* olarak adlandırılan *C. necator*'un PHB üretebilen mikroorganizmalar arasında

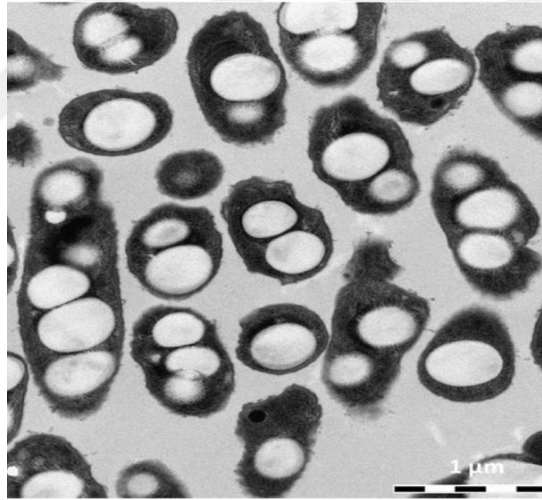
en kapsamlı çalışılmış bakteri olduğu söylenebilir. Bunun başlıca sebepleri; büyük miktarda PHB üretebilme yeteneği, çok çeşitli karbon kaynağını kullanabilmesi ve genom bilgisinin bilinmesidir (Akkoyunlu vd., 2024). *C. necator* umut verici bir PHB üreticisidir. Bu durumun başlıca sebebi ototrofik veya heterotrofik yollarla farklı substratları kullanarak, kuru hücre ağırlığının (DCW) %90'ına kadar PHB biriktirme kapasitesine sahip olmasıdır (Nygaard, Yashchuk, Nosed, vd., 2021).

PHB üretimi için model bir mikroorganizmadır. Heterotrofik ve ototrofik koşullar altında büyüeyebilen fakültatif kemolitotrofik bir bakteri olan *C. necator*, sahip olduğu metabolik yolların çok çeşitli olması sebebiyle de farklı karbon kaynaklarını asimile ederek PHB üretebilmektedir. *C. necator*, tek karbon sayılı n- alkanoatlardan 3HB ve 3HV kopolimerlerini, çift karbon sayılı n- alkanoatlardan ise P(3HB) homopolimerini üretebilmektedir (Sudesh vd., 2000). *C. necator* H16, çubuk şeklinde olup toprakta yaşayan fakültatif kemoototrofik bir suştur. Bu suшта PHB sentezi; asetil-CoA'nın asetil-CoA asetiltransferaz, asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sentaz ile katalizlenmesi ve PHB polimerine dönüşümü şeklindedir. PHB granüllerinin yüzeyi fazinlerle (*phaP*) kaplıdır. Granüllere bağlı bir diğer protein olan PhaR, PhaP'nin ifadesini düzenler. *C. necator* H16'ı fruktozu karbon kaynağı olarak kullandığında heterotrofik fermantasyon yolu ile PHB sentezler (Tang vd., 2022). Heterotrofik ve ototrofik büyüme arasında geçiş yapma kapasitesine sahip bir bakteri olması *C. necator*'un çok yönlü bir metabolizmaya sahip olduğunu gösterir (Pohlmann vd., 2006). *C. necator*'un H16 suşu en iyi karakterize edilmiş ve değişken fizyolojik davranışlar gösterdiği bilinen suştur (Jawed vd., 2022). Yapılan birçok çalışma bazı bakterilerde UV ışını, ısı, oksidatif stres, ozmotik şok gibi çevresel streslerin PHA sentezlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir. Strese karşı koruyucu bir yol olarak PHA granülleri ortaya çıkmaktadır (Koller, 2019).

C. necator, yağ asitleri, şeker bazlı substratlar ve çeşitli yağları hammadde olarak kullanarak oksijen, fosfor ve azot gibi stres koşullarına cevap olarak PHB üretir. Metabolik olarak geniş substrat kullanımına sahip olmasına rağmen *C. necator*'un vahşi tipi sü krozu kullanamaz (Morlino vd., 2023). Khonde ve arkadaşları tarafından PHB üretimi üzerine yapılan bir çalışmada, *C. necator*' un sü kroz kullanımı için rekombinant bir suş tasarlandı. Tasarlanmış suş ile çalışma sonucunda sakaroz başarılı bir şekilde metabolize edilebilmiş ve PHB üretimi yapılabilmektedir. Yenilenebilir karbon kaynakları arasından şeker pancarı veya şeker kamışından elde edilen sakkaroz ekonomik ve çok bulunan endüstriyel substratlardan biridir. Sakaroz açısından zengin olan ve fruktoz,

glikoz, önemli büyüme faktörleri ve mikro besin maddelerini de içeren şeker kamışı biyoşurubu ile tasarlanmış *C. necator* suşu kullanılarak PHB üretilebilmiştir (Khonde vd., 2025). Çok yönlü metabolizmaya sahip olduğu bilinen *C. necator* 'un H16 suşu en iyi karakterize edilmiş ve değişken fizyolojik davranışlar gösterdiği bilinen suştur (Jawed vd., 2022).

C. necator, elektron vericisi olarak H_2 ve karbon kaynağı olarak CO_2 ile aerobik olarak büyüebilir ve büyük miktarda PHB biriktirebilir (Jawed vd., 2022). PHB üreten bakterilerde $NADH/NAD^+$ ve $NADPH/NADP^+$ dengesi önemlidir. Çünkü karbonun TCA döngüsüne mi yoksa PHB polimerinin oluşumuna mı gideceğini belirler. Besin sınırlayıcı koşullar altında asetil-CoA, TCA döngüsü yerine PHB oluşumuna yönlendirilir. $NADPH/NADP^+$ oranı asetil-CoA'nın TCA döngüsünden uzaklaştırılıp PHB biyosentez yoluna yönlendirilmesinde önemli bir rol oynar ve asetoasetil-CoA redüktaz aktivitesi üzerinde de olumlu etki uygular (Hectors vd., 2025). *C. necator* H16 tarafından depolanan hücre içi PHB granülleri Şekil 2.8'de yer almaktadır.

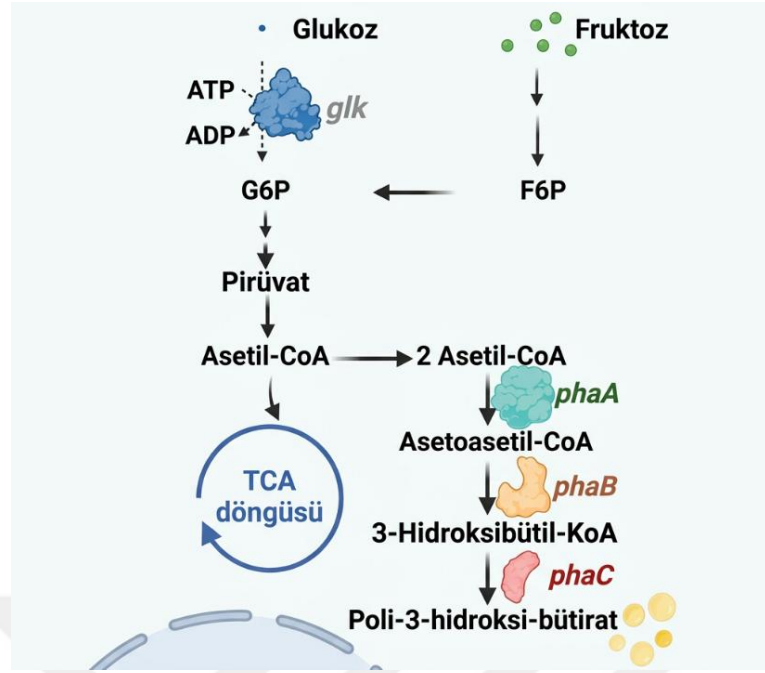


Şekil 2.8. *C. necator* H16' da hücre içi PHB granülleri (Buntinx vd., 2024)

Fruktoz ve glikoz gibi şekerler PHB üreten çeşitli mikroorganizmalar için yaygın kullanılan substratlardandır. *C. necator* asetik asit, glikoz ve fruktoz gibi karbon kaynaklarını kullanarak verimli büyüme ve PHA birikimi göstermiştir (Amer ve Kim, 2023). *C. necator* hücre büyümesinde glikoz taşıyıcılarının eksikliği ve düşük glukokinaz aktivitesi sebebiyle sınırlı glikoz alma yeteneğine sahiptir. Ancak mutant suşlar ile glikozu metabolize etme yeteneği kazandırılabilir. Doğal tip *C. necator* fruktozu rahatça kullanabilmektedir. Vahşi tip *C. necator* H16 ise fruktoz ve *N*-asetilglukozamin gibi

sınırlı substrat aralığına sahip olmakla birlikte fruktozu verimli bir şekilde metabolize edebilmektedir (Raberg vd., 2011). Daha önce yapılan çalışmalarda, Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ve oksidatif pentoz fosfat yollarının iki anahtar enzimi olan fosfofruktokinaz ve 6-fosfoglukonat dehidrogenaz aktiviteleri H16 suşunda tespit edilememiş ve ilgili genler de genomda tanımlanmamıştır (Gottschalk vd., 1964). Fruktoz önce bir taşıyıcı tarafından hücre içine alınır. Ardından Entner-Doudoroff (2-keto-3-deoksiglukonat 6-fosfat [KDPG]) yoluyla katabolize edilir (Pohlmann vd., 2006). Fruktoz ilk önce fruktokinaz tarafından fruktoz-6-fosfata fosforile edilir daha sonra bir ara madde olan glikoz-6-fosfata dönüşür ve Entner-Doudoroff yolu üzerinden pirüvata metabolize edilir (I. Y. Lee vd., 1996; Zhila vd., 2021). *C. necator*'da PHB üretim yolu üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada iki asetil-CoA molekülü 3-ketotiolaz tarafından yoğunlaştırılarak asetoasetil-CoA (*phaA*) oluşturulur. İkinci aşamada, asetoasetil-CoA redüktaz (*phaB*), NADPH tüketimiyle asetoasetil-CoA'yı 3-hidroksibütiril-CoA'ya dönüştürür. Son aşamada ise elde edilen molekül PHA sentaz (*phaC*) tarafından PHB'ye polimerize edilir. PHB biyosentezinde görevli genler olan *phaA*, *phaB* ve *phaC*'nin *C. necator*'da *phaCAB* operonunda kodlandığı bilinmektedir (Peoples ve Sinskey, 1989).

C. necator'da glikoz hücre içine alındıktan sonra glukokinaz (glk) tarafından fosforile edilerek glukoz-6-fosfata (G6P) dönüştürülür. Oluşan G6P glikoliz yoluna katılarak sırasıyla pirüvat ve devamında asetil-CoA'ya metabolize edilir. Asetil-CoA, PHB biyosentez yolunun başlangıç substratı olarak görev yapar (Şekil 2.9) Glikoz taşıma sırasında fosforillenir ve Entner-Doudoroff yoluyla katabolize edilir (Lin ve Ng, 2025; Zhila vd., 2021). Lin ve Ng'nin yaptığı çalışmada glikoz ve fruktoz beraber kullanılarak karışık karbon kaynakları ile PHB verimi ve biyokütle birikimi araştırılmış ve olumlu sonuçlar kaydedilmiştir (Lin ve Ng, 2025).



Şekil 2.9. *C. necator*'un glikoz ve fruktozda PHB üretim şeması (Lin ve Ng, 2025)

Karbon kaynağı olarak asetat kullanıldığında, ilk olarak asetat asetil-CoA'ya dönüştürülür ve bir kısım asetil-CoA, NAD(P)H üretimi ve büyüme için trikarboksilik asit döngüsüne (TCA) yönlendirilirken bir kısım ise sırasıyla asetasetil-CoA ve 3-hidroksibütiril-CoA'ya PHB sentezi için dönüştürülür (Cai vd., 2023; Dias vd., 2006).

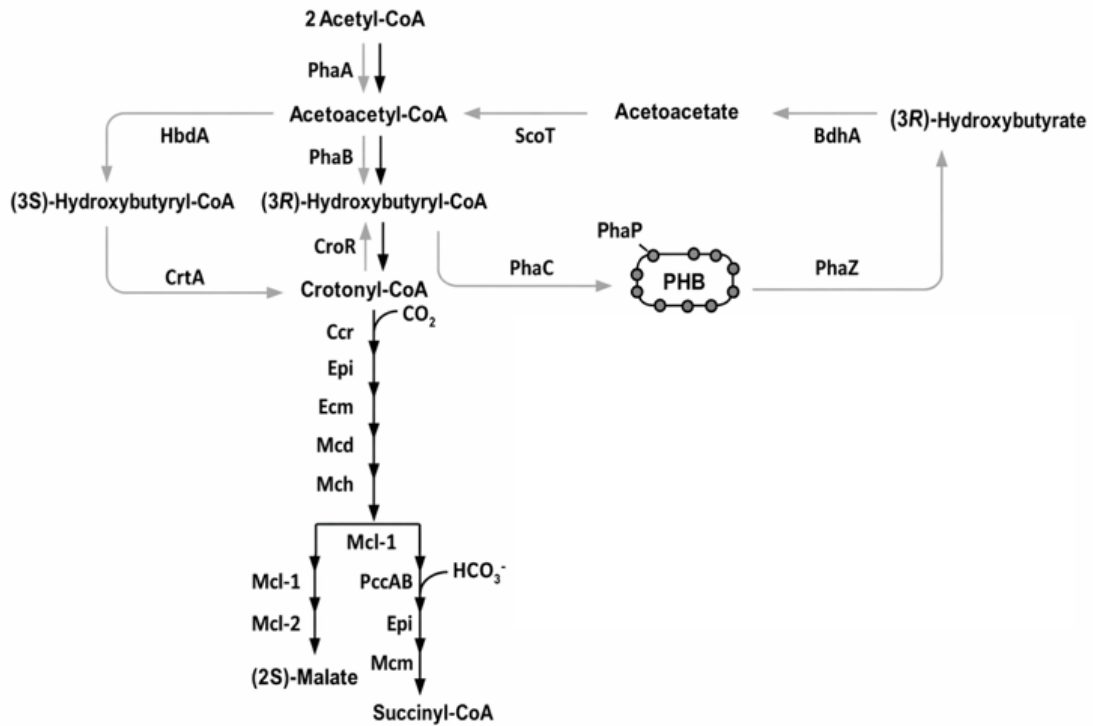
2.2.2.3.2. *Cereibacter sphaeroides*

Cereibacter sphaeroides (eski adıyla *Rhodopseudomonas sphaeroides* ve *Rhodobacter sphaeroides*), yüksek miktarda PHB biriktirdiği bildirilen oldukça elverişli bir mikroorganizmadır. Azotça sınırlı koşullar altında, *C. sphaeroides*'te hücresel kuru ağırlığın %70'ine kadar PHB biriktirilebildiği gözlemlenmiştir. Farklı karbon kaynakları arasında en yüksek PHB üretimi asetatta olmuştur. Çok yönlü metabolizması sebebiyle fotosentez, solunum, çeşitli sinyal yolları gibi hücre içi olaylar üzerine yapılan araştırmalarda faydalıdır. Mor kükürtsüz bir bakteri olan *C. sphaeroides* hem fototrofik hem de kemolitotrofik koşullar altında karbondioksit ve asetik asit gibi çok çeşitli substratları kullanarak büyüebilmektedir (Sangkharak ve Prasertsan, 2007).

PNSB'ler fizyolojik ve çevresel koşullara bağlı olarak kullanabildikleri geniş substratlar ile oksijenli veya oksijensiz ortamlarda büyüeyebilen bir heterojen gram-negatif proteobakteri grubudur. *C. sphaeroides*, PHB üretimi için en iyi çalışılmış mor

kükürtsüz (PNS) bakterilerden biridir. *C. sphaeroides*'in farklı suşlarının çeşitli substratları kullanma kapasitesine sahip olması, büyük ölçekli polimer üretimi için uygun aday olduğunu göstermektedir. PHB üretimini arttırmak için birçok araştırmacı tarafından farklı fermantasyon koşulları incelenmiştir. Asetat, bütirik asit, laktat, malat ve süksinat PNS bakteriler tarafından bir hücre içi depolama bileşiği olan PHB üretiminde kullanılan muhtemel organik asit kaynaklarıdır (Kim vd., 2011). Mor kükürtsüz (PNS) fotosentetik bakteriler, fotoheterotrof, fotoototrof veya kemoheterotrof olarak büyüeyebilen çok yönlü organizmalardan oluşmaktadır. Bu mikroorganizmalar ışık ve karbon kaynağının varlığı gibi ortamdaki çeşitli koşullara bağlı olarak bir moddan diğerine geçebilirler (Basak ve Das, 2007). PNS bakteriler sahip oldukları özellikler nedeniyle PHB üretiminde dikkat çekmiştir. Organik asit ve şekerlerin yanında asimile edebildikleri karbon kaynakları çeşitlidir. PNS bakteriler PHB, hidrojen, karotenoid ve 5-aminolevulinik asit gibi yararlı malzemeleri yüksek verimle üretebilmektedir. *C. sphaeroides*, daha önce pH, ışık yoğunluğu ve substrat türü gibi çeşitli büyüme faktörleri altında PHB üretimi için incelenmiştir. PHB üretiminde PNS bakteriler tarafından asetat sık tercih edilen bir karbon kaynağı olarak bildirilmiş (Kobayashi ve Kondo 2019). Son yıllarda mor kükürtsüz bakteriler biyorafineri yaklaşımı kapsamında eş zamanlı olarak koenzim Q10, pigment, PHA ve hidrojen gibi yüksek katma değerli ürünleri üretebilmeleri sebebiyle dikkat çekmektedir. Metabolik esneklikleri sayesinde farklı substratlarda büyümeleri kolaylaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda *C. sphaeroides*' in metabolik süreçleri ve farklı karbon kaynaklarındaki PHB üretme yeteneği ayrıntılı olarak incelenmiştir (Chen vd., 2012; P. Kumar ve Kim, 2018).

Asetat, düşük maliyeti nedeniyle PHB üretimi gibi biyoteknolojik süreçler için potansiyel bir karbon kaynağıdır. (Gu vd., 2024). *C. sphaeroides* PHB biyosentezinde asetati, asetil-CoA asimilasyonu için etilmalonil-CoA yolu ile sentezleyebilmektedir (Erb vd., 2009). Şekil 2.10'da *C. sphaeroides*' in asetat asimilasyonunda etilmalonil-CoA ve PHB biyosentez yolu yer almaktadır.

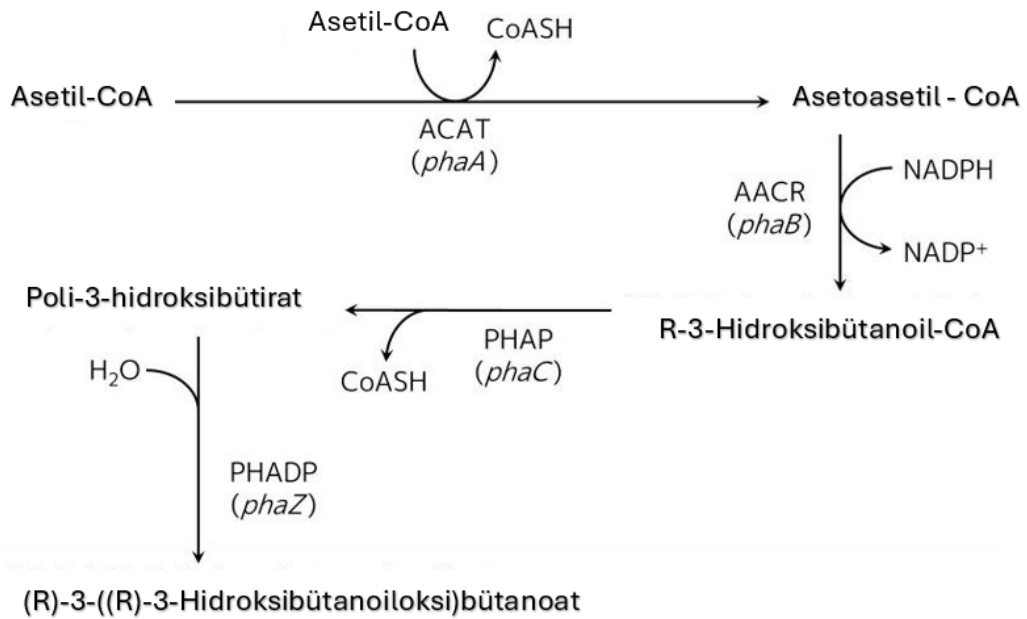


Şekil 2.10. *C. sphaeroides*' in asetat asimilasyonunda etilmalonil-CoA ve PHB biyosentez yolu (Erb vd., 2007; Fales vd., 2001; Shimizu vd., 2022)

C. sphaeroides asetatı asimile etmek için etilmalonil-CoA yolunu ana yolak olarak kullanır (Erb vd., 2007). Asetat bu yolak ile enerji üretimi ve hücre büyümesi için gerekli olan ara bileşiklere dönüştürülür. Etilmalonil-CoA yoluyla asetat asimilasyonunun ilk aşamaları aynı zamanda PHB biyosentezinin de ilk aşamalarıdır (Shimizu vd., 2022). Asetatın asetil-CoA'ya dönüşmesi ile başlayan süreç iki asetil-CoA mülkülünün birleşerek asetoasetil-CoA'yı oluşturması (*phaA*) ile devam eder. Asetoasetil-CoA daha sonra (3R)-hidroksibütiril-CoA'ya indirgenir (*phaB*). PHB biyosentezi ve asetat metabolizması bu kısma kadar olan ilk aşamaları ortak paylaşır (Alber vd., 2006). Bu aşamadan sonra (3R)-hidroksibütiril-CoA ya PHB depolamak için polimerize edilir ya da CroR enzimi ile krotonil-CoA'ya dönüştürülerek asimilasyon yoluna devam edip TCA döngüsünün öncü molekülleri olan (2S)-malat ve süksinil-CoA'ya dönüştürülür (Erb vd., 2009). Karbon akışı, hücrenin besin durumu ve redoks dengesine bağlı olarak, asetatın *C. sphaeroides* tarafından asimilasyonu TCA döngüsü, etilmalonil-CoA yolu ve PHB biyosentezine yönlendirilir (Alber vd., 2006; Fales vd., 2001).

Asetat ve bütirat gibi pirüvat oluşturmada asetil birimlerine kolayca dönüştürülen substratların genel olarak PHB ürettiği öne sürülmektedir (Doelle, 2014; Koku vd., 2002).

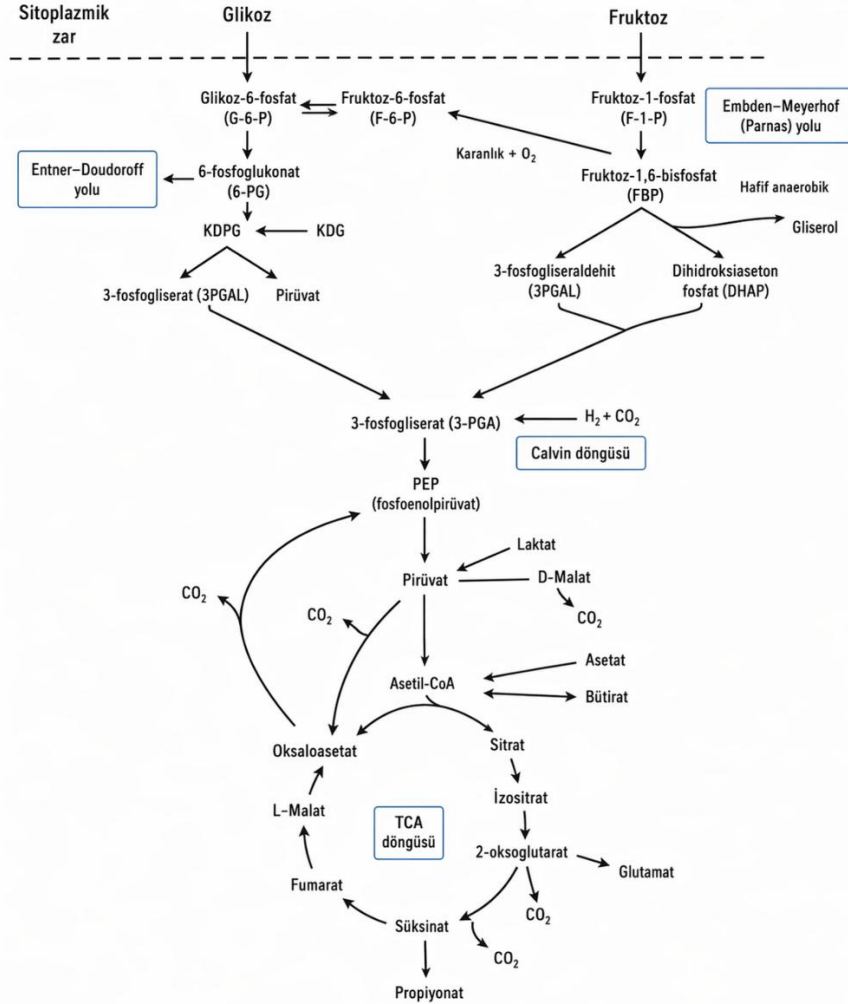
PHB üretimi açısından *C. sphaeroides*'e bakıldığında karbon kaynağı asetate olduğunda diğer karbon kaynaklarına göre daha fazla PHB ürettiği bulunmuştur. Fotosentetik bakterilerin asetate kullanırken glioksilat, sitramalat ve etilmalonil-CoA gibi çeşitli metabolik yolları kullanabilecekleri ortaya koyulmuştur. *C. sphaeroides* ise asetate etilmalonil-CoA yoluyla metabolize eder. Etilmalonil-CoA yoluyla asetate asimilasyonunda ilk olarak asetate, asetil-CoA'ya aktive edilir ardından PHB biyosentetik yolunun adımları ile PHB sentezlenir (Alber Birgit E. vd., 2025). Bu adımlar Şekil 2.11'de verilen *C. sphaeroides*'in PHB biyosentez yolu ile ortaktır.



Şekil 2.11. *C. sphaeroides*'te PHB biyosentez yolu (Kobayashi ve Kondo, 2019)

PNSB türlerinin şekerleri metabolize etmek için kullandıkları metabolik yollar; Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) yolu, Entner-Doudoroff (ED) yolu ve pentoz fosfat yoludur (PPP) (Şekil 2.12). Bilinen en yaygın iki monosakkarit glikoz ve fruktozudur. Glikoz kaynağı, fruktoza göre daha fazla olmasına rağmen PNSB tarafından metabolize edilmesi fruktoza göre daha karmaşık ve glikoz taşınması için bir taşıma sistemi tespit

edilmemiştir (Saier vd., 1971). PNS bakterilerin substratları kullanma yolları, türler arasında veya aynı türün farklı suşları arasında farklılık gösterebilir (Koku vd., 2002).



Şekil 2.12. PNS bakterilerde karbon metabolizmasının basitleştirilmiş genel şeması (Koku vd., 2002)

Yine PNS bakteriler biyolojik atıklarda disakkarit veya polisakkarit şeklinde bulunan şeker içerikli yan ürünleri doğrudan ya da monosakkarit haline getirmek için ön işlem uygulamasından sonra metabolize edebilmektedirler. Fruktoz fotosentetik bakterilerde fruktoza özgü olan fosfotransferaz sistemi (PTS) ile taşınır ve fruktoz-1-fosfata fosforile edilerek verimli bir şekilde metabolize edilir (Tao vd., 2012). *C. sphaeroides*' te fruktoz asimilasyonu çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir. Fototrofik koşullarda EMP yolu kullanılırken, aerobik koşullar altında ED yolu kullanılır

(Conrad ve Schlegel, 1977). Glikoz ise *C. sphaeroides* için karbon kaynağı olarak kullanıldığında ED yolu ile metabolize edilir (Y. Yang vd., 2021). Şeker kullanımı ile ilgili yapılan çoğu çalışma ve araştırma biyohidrojen üretimi üzerinde olmuştur (Bayon-Vicente vd., 2025).

2.2.2.4. Karbon kaynakları

Mikrobiyal fermantasyon süreçleri ile üretilen PHA'ların üretim maliyetinin yüksek olması bir sorundur. Kullanılan karbon kaynakları ise üretim maliyeti üzerinde etkilidir. Bu yüzden maliyet düşürmenin önemli yaklaşımlarından biri de atık ve yan ürünlerin hammadde olarak kullanılmasıdır (Castilho vd., 2009). Karbon açısından zengin atıkların PHB üretimi için yeniden kullanılması polimer üretim maliyetini düşürmekle beraber atık yönetim sistemleri üzerinde de etkili olacaktır. PHB üretiminin ekonomik uygulanabilirliğini ve sürdürülebilirliğini arttırmak için uygun maliyetli substratların alternatif olarak kullanılması gerekmektedir (Najar vd., 2024).

PHB; tarımsal ve endüstriyel yan ürünler, atık sular ve organik atıklar gibi çeşitli ucuz substratlar kullanılarak elde edilebilir. Yaygın olarak kullanılan karbon kaynaklarına ise glikoz, fruktoz, sükroz, nişasta, selüloz, maltoz, ksiloz, asetik asit, bütirik asit, propiyonik asit, oleik asit ve hekzanoik asit örnek verilebilir. Meyve atıkları serbest glikoz, fruktoz ve sükroz içerdikleri için PHB üreten suşlar tarafından kullanılabilir (Sirohi vd., 2020).

Tüm canlılar tarafından metabolik süreçlerde karbon enerji kaynağı olarak kullanılır. Karbon kaynağı, elde edilen polimerin konsantrasyonunu ve monomer bileşimi gibi özellikleri de belirlemektedir. Bakteriler hücre duvarlarının kalın ve sert olması sebebiyle yapısı büyük moleküllerin geçişi kısıtlıyken, glikoz gibi basit yapılı moleküllerin geçişi daha kolaydır. Bu nedenle glikoz gibi substratların karbon kaynağı olarak kullanımı desteklenmektedir (Bano vd., 2024).

Biyokütle birikmesi için şekerlerin substrat olarak kullanılması uygun ve verimlidir ancak, yabancı tip *C. necator*, glikoz alımı için bir taşıma sisteminin olmaması sebebiyle glikozu verimli bir şekilde metabolize edemez. *C. necator* DSM 545 gibi çeşitli mutant suşlar kullanılarak glikoz alma yeteneği kazandırılır. Tasarlanan bu rekombinant suşlar ile PHB üretim verimlilikleri üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Alhafız vd., 2025). *C. necator* suşları, fruktoz ile desteklenmiş ortamda yetiştirildiğinde P(3HB)

homopolimeri üretme yeteneğine sahiptir (Murugan vd., 2017). *C. necator* H16 tarafından hücre büyümesi ve P(3HB) birikimi için yalnızca fruktoz etkili bir şekilde kullanılır (Purama vd., 2018).

Şeker pancarı ve şeker kamışının yan ürünlerinden biri olan melas, PHB üretimi için yararlı vitamin, mineral, element ve yüksek miktarda sükroz, glikoz ve fruktoz içerir. Ancak *C. necator*'un melası kullanabilmesi için enzimatik veya kimyasal yöntemler ile ön işleme tabi tutulması gerekmektedir (Ertan vd., 2021). Yüksek şeker konsantrasyonlu bir karbon kaynağı olan melas, bol bulunması ve düşük maliyeti sebebiyle biyoteknolojik süreçlerde yaygın olarak kullanılır (Dalsasso vd., 2019). *C. necator* tarafından melas kullanılarak PHB üretebilmek için melasın hidrolize edilmesi gerekir çünkü bu bakteri sükrozu hidrolize edemez. Hidroliz için enzimatik, kimyasal yada karışık yöntemler kullanılabilir (Sen vd., 2019). Şeker kamışı melasının hidrolizi, asit (HCl ya da H₂SO₄) veya enzimatik (invertaz) hidroliz ile yapılabilir. Asit yöntemleri ile hidroliz arasında HCl (%92), H₂SO₄ (%50)'e göre daha yüksek bir hidroliz verimi sergilemiştir. Ancak HCl ile yüksek hidroliz verimine rağmen *C. necator* metabolizması için toksik olabilecek hidroksimetilfurfural (HMF) gibi istenmeyen yan ürünleri oluşturma olasılığı göstermiştir (W. Wang vd., 2014). İnvertaz kullanımı ile enzimatik hidrolizde %90 verim elde edilmiş. İşlem verimi açısından invertaz yöntemi en avantajlı yoldur ancak enzim fiyatı ve substrat kalitesi gibi olası dezavantajları vardır (Dalsasso vd., 2019). Şeker kamışı melasının yüksek miktarda şeker içeriği esas olarak sükroz (%32) ve invert şekerlerden (%16) oluşmaktadır (Hashizume vd., 1967). *C. necator*'un sükrozu metabolize edemediği bildirilmiştir. Bu nedenle sükrozun monomerleri olan fruktoz ve glikoza hidrolizi için ön işleminden geçmesi gerekmektedir. Hidrotermal ön işlem ve mikrodalga destekli alkali ön işlem son yıllarda alternatif olarak ilgi görmüştür (Nomanbhay vd., 2013; B. Yang vd., 2018).

C. necator fruktoz ve glikoz gibi şekerleri substrat olarak kullandığında 3HB monomerleri içeren PHA'lar üretirken, yağ asitleri ve bitkisel yağları kullandığında ise 3HV ya da ko-monomerlerini üretmektedir (Morlino vd., 2023). Yapılan araştırmalar *C. necator*'un karbondioksiti de PHB üretimi için kullanabileceğini göstermektedir. Karbon kaynağı, sentezlenen polimerlerin kimyasal bileşimi ve verimi üzerinde etkilidir. Asetik asit, propiyonik asit, valerik asit, bütrik asit ve heptanoik asit gibi uçucu yağ asitleri, PHBV'nin üretimi için yapı taşı görevi gören karbon kaynakları olarak kullanılmaktadırlar (Hathi vd., 2022).

C. necator PHB üretiminde, substrat olarak sükrozu hidrolize edemediği için kullanamaz. Sükroz hidrolizi için yapılan çalışmalarda genellikle asit ya da enzimatik (invertaz) hidroliz ön işlemlerinden biri gereklidir. Yapılan bir çalışmada pahalı enzim kullanımına alternatif bir yaklaşım olarak, sükrozu hidrolize edebilen *Bacillus subtilis* ve PHA biriktiren *C. necator* 5119 suşlarının birlikte kültüre edildiği bir konsorsiyum tasarlanmıştır. PHA biriktiremeyen *B. Subtilis*'in sükrozu, glikoz ve fruktoza hidrolize eder ve bu şekerleri asetik asit ve propiyonik asit gibi organik asitlere fermente eder, *C. necator* ise serbest şeker ve organik asitleri büyüme ve PHA biriktirmek için kullanır. Sükroz hidrolize edebilen uyumlu bakteriler ile PHA biriktiren bakterilerin birlikte kültüre edilmesine dayalı olan bu araştırmada, başlangıçta *B. Subtilis* baskın haldeyken serbest şekerler kullanılabilir hale geldikçe *R. Eutropha* 5119'un hızla büyüyerek konsorsiyumda baskın hale geldiği gösterilmiştir. Bakterilerin birlikte uyumu ve etkileşimleri ile mikrobiyal konsorsiyumun büyümesinde artış gözlemlenmiş ve öncü madde eklenmeden sükrozdan P(3HB-co- 3HV) kopolimer üretimiyle sonuçlanmıştır (Bhatia vd., 2018a).

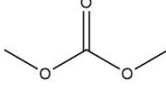
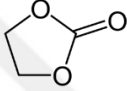
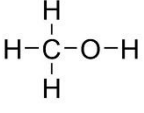
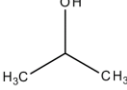
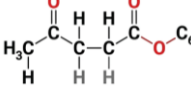
2.2.2.5. PHB ekstraksiyon yöntemleri

Üretilmek istenilen ürünün, hücrelerden farklı yöntemler kullanılarak ayrılması ekstraksiyon işlemi olarak isimlendirilmektedir. Kullanılan substrat ve mikroorganizmanın türü dikkat edilerek yapılabilen farklı ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleri mevcuttur (Mascarenhas ve K, 2021). Mikroorganizmalar PHB ile birlikte lipid, DNA, RNA, polipeptit ve peptidoglikan gibi pek çok PHB olmayan bileşen içerir. Polimer dışındaki bu bileşenlere biyokütle denilmektedir. Ekstraksiyon işleminin asıl amacı ise elde edilecek polimerin bu hücre kütesinden yüksek saflıkla kazanabilmektir. PHB'nin hücre dışına çıkarılması için çeşitli çözücüler kullanılmaktadır. Bu çözücülerin her birinin avantajları ve dezavantajları vardır. Bir ekstraksiyon yöntemi için çevre dostu ve maliyetin uygun olmasıyla birlikte elde edilen ürünün saflığı ve geri kazanımının mümkün olması da önemlidir (Kurian ve Das, 2021).

PHA ekstraksiyonu yapılırken kimyasal, biyolojik ve fiziksel destekli ancak kimyasal bazlı olmak üzere çeşitli yollar kullanılabilir. Kimyasal PHA ekstraksiyon yöntemlerinde yaygın olarak çözücü ekstraksiyon metodu kullanılmaktadır. Laboratuvarlarda düşük ölçekli PHB elde etmek için çözücü ekstraksiyonu uygun bir yol

olsa da üretimin fazla maliyetli olması ve kullanılan çözücülerin tekrar kullanılabilirliğinin zor ve düşük olması endüstriyel PHB üretimi için sınırlayıcı birer faktördür. Laboratuvar ölçekli PHB üretiminde, yaygın olarak yüksek ekstraksiyon verimliliğine sahip olan kloroform ve diklorometan (DCM) organik çözücülerini kullanılmaktadır. Ancak yüksek verimle birlikte halojenli çözücülerin hem çevre hem de sağlık üzerinde olumsuz etkileri vardır. Bu durum toksisitesi düşük halojensiz çözücülerin kullanılmasının alternatif olarak düşünülmesine sebep olmuştur. Çizelge 2.3'te daha önce alternatif olarak çeşitli araştırmalarda kullanılan halojensiz çözücüler yer almaktadır (J. Wang vd., 2024).

Çizelge 2.3. Halojensiz çözücüler

Halojensiz çözücüler	Yapısal formül	Kimyasal yapı
Dimetil karbonat	$C_3H_6O_3$	
Etilen karbonat	$C_3H_4O_3$	
Metanol	CH_3OH	
Propanol	C_3H_8O	
Metil levulinat	$C_6H_{10}O_3$	
1,3-dioksolan	$C_3H_6O_2$	
Sikloheksan	C_6H_{12}	

Yüksek miktartlı PHB üretimi için ekstraksiyon aşamasında kullanılan çözücülerde yapılacak olan iyileştirme maliyeti düşürebilir çünkü çözücü ekstraksiyonu PHB elde etme de önemli yer tutmaktadır.

Sodyum hipoklorit (NaClO) hücrelerin yapısal bozulmasında etkili olduğu için PHB elde etmede hücre lizisini artırmak için kullanılabilir. Kloroform ile birlikte kullanıldığında yapılan ekstraksiyon sonucunda yüksek verimde PHB elde edilmiştir (Elsayed vd., 2018). NaClO kullanımı çevre üzerinde riskli olduğundan dolayı hücre lizisini sağlamak için Tween 20 gibi hafif yüzey aktif maddelerin kullanımının mümkün olabileceği düşünülmektedir (Kurian ve Das, 2021).

Sodyum hipokloritin kullanılması PHB'nin bozulmasına sebep olabilmektedir. En az bozulmayla PHB elde etmek için halojenli olmayan çözücüler, alkoller ve dimetil karbonat (DMC) gibi farklı çözücüler kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Çözücülerin karşılaştırmasına dayanarak DMC'nin halojenli çözücülere kıyasla toksik etkisinin daha az olduğu söylenebilir (Koller, 2020).

NaOH ve KOH gibi alkaliler kullanılarak da ekstraksiyon işlemi yapılabilir. NaOH hücre lizisinde etkili olsa da safsızlığı gidermekte çok az etkili olduğu söylenebilir. Çoğunlukla suda çözünmeyen lipid ve proteinlerin sebep olduğu bu safsızlıkları gidermek için etanol ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi çözücüler kullanılabilir. NaOH ve SDS işlemlerinin birleştirilmesi ile polimer safsızlığının etkili bir şekilde uzaklaştığı gözlemlenmiştir (Y. Jiang vd., 2015).

Ekstraksiyon yaklaşımlarından bir diğeri ise PHB dışındaki hücre kütlelerinin uzaklaştırılmasını içerir. Hidrofilik olan hücre kütlesi kimyasal veya enzimatik işlemler ile suda çözünabilir hale getirilir. Hücre parçalanmasında genellikle siklik karbonatlar ve hipoklorit gibi kimyasallar kullanılmaktadır. Hipokloritin etkili kullanımı yüzey aktif maddelerin de beraberinde kullanılmasını gerektirir. Bu yöntemle yüksek miktarda polimer dışı hücre kütlesi çözünbilse de işlem yapılırken halojenli ve toksik bileşenlerin meydana gelmesi riski oluşmaktadır (Aljuraifani vd., 2019). İçerdiği riskler nedeniyle sık kullanılan bir yöntem değildir. Hipoklorite alternatif olarak siklik karbonat esterlerinin (etilen karbonat, 1,2-propilen karbonat) kullanılabilirliği düşünülmüştür. Bu yöntem ile polimerin filtrasyon yoluyla çözücünden ayrılabilmesinin mümkün olması ve çözücünün tekrar kullanılabilmesi, çözücü ekstraksiyonuna kıyasla daha iyi olduğunu göstermektedir. Polimerin depolimerizasyonu bu metodun dezavantajı olarak söylenebilir (Koller, 2020).

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) hidrofilik bileşiklerin giderilmesinde yaygın olarak kullanılan bir deterjandır. Yüksek SDS miktarı kullanımının yüksek saflıkta PHB elde edilmesinde önemli bir rol aldığı görülmektedir. Ancak kullanılan SDS miktarı da önemlidir. Eşik değerin üstünde kullanılan SDS, PHB'nin çözünmesine neden olup ürün eldesini olumsuz etkiler (Kourmentza vd., 2017).

Alkalaz ve lizozim gibi enzimlerin kullanıldığı enzimatik yöntem ekstraksiyon için bir diğer seçenektir. Enzimler, hücre duvarlarının ve zarlarının yapısını bozar ve proteinlerin çözünmesine sebep olur. Böylece hücre içi ürünlerden biri olan PHB'nin serbest olmasını sağlar. Enzim, ısı işlemi ve yüzey aktif maddelerin bir arada kullanımı ile %90 üzeri saflıkta polimer elde edilmesi sağlanabilir. Ancak kullanılan enzimlerin üretimi bu yöntemin maliyetini arttırmaktadır. Artan maliyet endüstriyel ölçekte PHB üretimi için bu yöntemin sık kullanımını kısıtlamaktadır (Israni vd., 2018).

Ekstraksiyon için kullanılabileceği düşünülen bir diğer yola örnek olarak biyolojik yöntemler verilebilir. Genetik mühendisliği süreçleri ile PHA depolimeraz mutasyona uğramış veya inaktif PHA depolimeraza sahip mutant suşlar kullanılarak PHB'nin geri kazanımının artırılmasının potansiyel bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir (Kourmentza vd., 2017).

Yapılan bir çalışmada, *C. sphaeroides*'in PHA depolimeraz (*phaZ*) geni silinmiş bir suşu oluşturularak PHB üretimi üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Aynı bakterinin herhangi bir manipülasyon yapılmayan ana suşu ile mutant olarak oluşturulan suş arasında üretilen PHB'nin, hücreler tarafından parçalanması karşılaştırılmış. *PhaZ* geni silinmiş olan suşta 5 günlük inkübasyon sonucunda yaklaşık 2,9 kat daha yüksek PHB üretilmiştir (Kobayashi ve Kondo, 2019). Yine *C. necator* H16 ve PHA sentaz geninin mutant olduğu rekombinant bir suşunda PHA birikimi, tüketimi ve moleküler ağırlığı arasındaki bağlantı değerlendirilmiştir *C. necator*'da depolimeraz aktivitesinden sorumlu birden fazla gen vardır. Bu genlerin PHB birikimi ve tüketimi üzerinde farklı etkilere sahip olduğu söylenebilir. PHB granüllerine neredeyse hiç etkisi olmayan ve güçlü aktiviteye sahip olan genlerin olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle ana suş ile mutant suşun sahip olduğu genler arasında moleküler ağırlık, polimer üretimi ve tüketimi değişiklik göstermiştir. Ayrıca polimerizasyon aktivitelerinin fazin (*phaP*) varlığı ile değişiklik gösterdiği düşünülmektedir (Arikawa vd., 2016).

Kimyasal kullanmadan; yüksek basınçlı homojenizasyon, ultrasonik parçalama ve hava sınıflandırması gibi mekanik parçalama yöntemleri de ekstraksiyon için

kullanılmıştır. Pek çok yöntemde olduğu gibi elde edilen ürünün saflığı istenilen düzeyde olmadığı için polimer üretiminde uygun yöntemler olmadıkları söylenebilir (Jacquel vd., 2008).

2.2.2.6. PHB'nin biyolojik parçalanması

PHA'lar katalitik, termal, fotooksidatif ve mekanik bozunma gibi çeşitli yollarla parçalanabilmektedir. Mikrobiyal bozunmada polimerler doğal ortamlarda yüksek miktarda parçalanmaktadır (Paloyan vd., 2025). Katalitik bozunmada enzimler gibi polimer parçalanmasını hızlandıran moleküller kullanılır. Ancak katalizörler maliyet artışına neden olan bir unsur olarak değerlendirilmektedir. Termal bozunma, yüksek sıcaklıkların kullanılması ile polimer zincir kopmalarının meydana gelmesidir ve istenmeyen yan ürün üretimi mümkündür. Polimerin ışık ve UV radyasyonuna maruz kalması ile fotooksidatif bozunmalar meydana gelmektedir. Zincir kopmaları ve bozunmaları ile serbest radikaller oluşmaktadır. Mekanik bozunma polimerde fiziksel parçalanma oluşmasına neden olmaktadır (Lv vd., 2014; Zandieh vd., 2024).

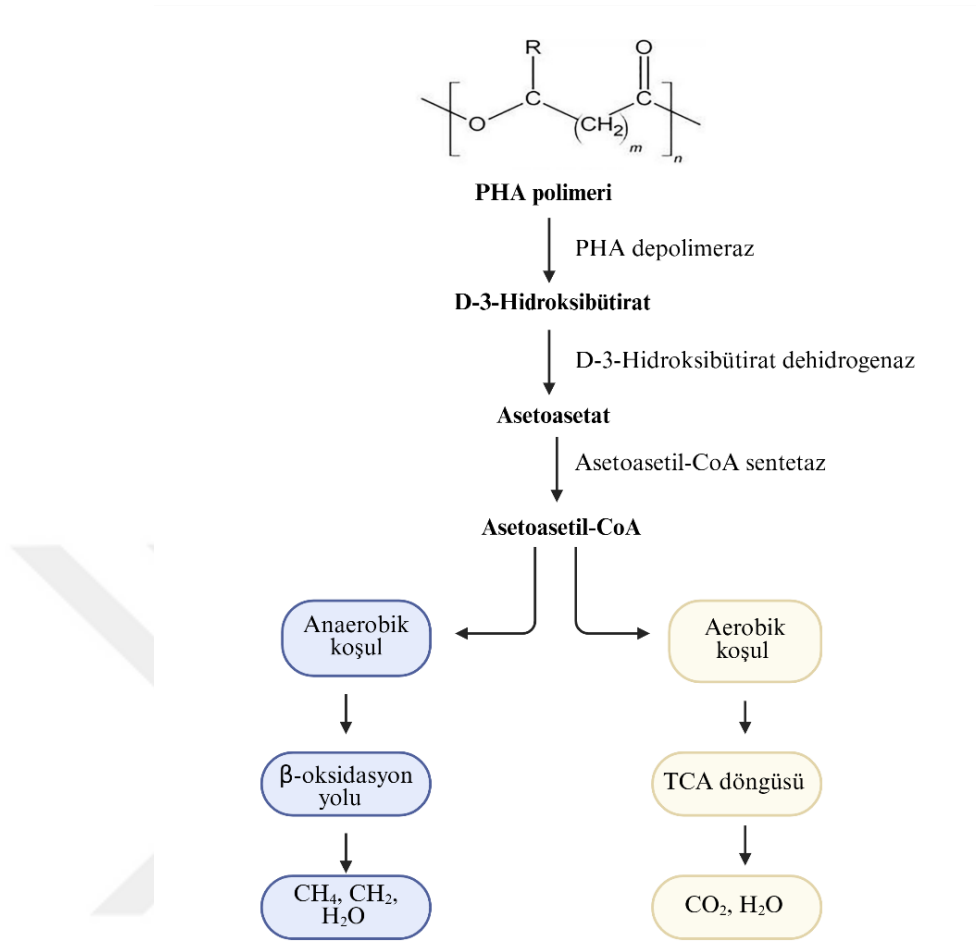
Polimerler, aerobik ve anaerobik koşullar altında biyolojik olarak parçalanabilmekte ve bunun sonucunda çeşitli ürünler oluşmaktadır. Aerobik parçalanma, oksijen varlığında gerçekleşir ve son elektron alıcısı olarak oksijen kullanılır. Anaerobik parçalanma ise oksijenin olmadığı koşullarda gerçekleşir ve elektron alıcıları olarak nitratlar, sülfatlar, CO₂ ve diğer moleküller kullanılır. Biyopolimerlerin çoğu hem anaerobik hem de aerobik ortamlarda parçalanabilmektedir. Biyolojik aerobik parçalanma oksijen varlığında organik karbonun CO₂'ye dönüştürülmesi şeklindedir. Anaerobik biyolojik parçalanma sonucunda ise CO₂ ve metan üretilmektedir (Pedersen vd., 2012; Zhang vd., 2025).

Biyolojik bozunma süreci genellikle dört aşamada gerçekleşir (Kjeldsen vd., 2018). Bu aşamalar başlatma, asimilasyon, mineralizasyon ve stabilizasyondur. Polimerin yüzeyinde mikrobiyal biyofilm oluşması ile başlatma aşaması gerçekleşir. Bu aşamada polimer granüllerine parçalanır ve fizikokimyasal özelliklerinde değişiklikler meydana gelir. Asimilasyon aşamasında biyofilmler, polimerin oligomerik, dimerik ve monomerik formlar olan daha küçük yapılara dönüşümü katalize etme görevinden sorumlu başta depolimeraz olmak üzere çeşitli hücre dışı enzimler salgılar böylece polimerin moleküler boyutu azaltılmış olunur. Mineralizasyon aşamasında

mikroorganizmalar monomer ve diğer formları kullanıp enerji, biyokütle ve farklı metabolitler üretirken son aşama olan stabilizasyon da ise bu bileşikler CO_2 , H_2O , CH_4 ve inorganik tuzlara dönüştürülür (Kjeldsen vd., 2018; Maddalwar vd., 2021). Polimerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, biyotik ve O_2 ve sıcaklık gibi abiyotik çevresel faktörler biyopolimerlerin bozunması üzerinde etkili unsurlardandır. Polimer ester bağlarının kırılmasını uyarmada sıcaklık ve nem etkilidir (Choe vd., 2021). Enzimatik hidroliz, polimerlerin suda çözünabilir hale gelmesine yardımcı olup parçalanmayı hızlandırır. Hücre dışı ve hücre içi depolimerazlar olarak bilinen enzimler substratlara karşı özgüllük gösterebilmektedirler. Parçalamada görevli olan bu enzimler bakteriler ve bazı mantarlarda bulunmaktadır. Birçok mikroorganizma PHA depolimeraza sahip olduğu için PHA'ları parçalayabilmektedir. Hücre dışı depolimeraz enzimleri ester bağlarını hidrolize ederek monomer ve oligomer formlarını oluşturmaları sebebiyle, parçalanmada önemli rol oynamaktadır. Polimer yüzeyinin bozulması ile polimer yapısında gözenekler oluşmaya başlar ve bu durum PHA'ların bozunmasını başlatır. PHA'ların bozunması birkaç yıl sürerken PHA filmleri 40 gün içinde bozulabilir (Laycock vd., 2017; Volova vd., 2010). Bozunma hızını etkileyen birçok faktör vardır. Bunlar sıcaklık, nem seviyesi, pH, substrat kaynağı, PHA'ın bileşimi, polimer türü (homopolimer veya kopolimer), kristallliği ve yüzey alanı olarak sıralanabilir (Dulac vd., 2025).

PHB, toprak, deniz suyu ve göl suyu gibi çeşitli ortamlardan izole edilmiş olan bazı mikroorganizmaların hücre dışı PHB depolimeraz salgılaması ile suda çözünür monomer ve oligomerlere hidrolize edilir. PHB depolimeraz ile PHB'nin enzimatik hidrolizi ile 3HB dimeri ve 3HB monomeri üretilir. Hidroliz, enzimin oligomerin hidroksil terminalinden ikinci ve üçüncü ester bağlarını koparması ile gerçekleşir. Enzimatik bozunma adsorpsiyon ve hidroliz olmak üzere iki adımdan oluşur. İlk adım enzimin PHB'nin yüzeyine adsorpsiyonu ikinci adım ise enzimin aktif bölgesinin polimer zincirini hidrolizidir. Parçalanma suda çözünür yapıda olan PHB depolimerazlar ile yüzeyde enzimatik hidroliz yoluyla meydana gelir (Doi vd., 1994; Mukai vd., 1993).

Mikroorganizmalar tarafından salgılanan PHA depolimerazlar, polimerdeki ester bağların hidrolizini katalizler ve D-3-hidroksibutirat ve asetoasetat gibi küçük alt birimlere ayırır. Oluşan monomerler veya oligomerler mikroorganizmalar tarafından alındıktan sonra aerobik bakterilerdeki trikarboksilik asit döngüsü (TCA), anaerobik bakterilerde ise β -oksidasyon yolu gibi metabolik süreçlere girer ve asetil-CoA gibi metabolitlere parçalanırlar (Şekil 2.13) (Numata vd., 2009; Zhou vd., 2023).



Şekil 2.13. Anaerobik ve aerobik ortamlarda PHB bozunmasının şematik gösterimi (Acharjee vd., 2023)

Fizyolojik koşullar altında yüzey erozyonu ile PHA'ların parçalanması sonucu 3-hidroksibütirat ve hidroksiasil-koenzim A gibi metabolitler oluşur. Oluşan bu metabolitlerin doğal olması biyoyoumlu, biyolojik olarak emilebilir ve immünojenik olmama gibi özellikte olmalarının sebeplerindendir ve biyolojik sistemler için de kullanılabileceklerini gösterir (D. Li vd., 2025).

PHA ailesinin önemli bir üyesi olan poli(3-hidroksibütirat-ko-4-hidroksibütirat) [P(3HB-co-4HB)], insanlarda mevcut ökaryotik lipazlar tarafından doğal metabolitlere hidrolize edilebilme kapasitesi nedeniyle biyomedikal uygulamalar açısından son derece dikkat çekicidir. Bu özellik, söz konusu polimerin biyobozunurluğunu ve biyoyoumluluğunu artırmakta, dolayısıyla güvenli bir biyomalzeme olarak kullanımını desteklemektedir. PHA'ların temel parçalanma ürünleri olan 3-hidroksiasitler, hayvan metabolizmasında doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Özellikle 3-hidroksibütirik asit ve

4-hidroksibütirik asidin insan kanının normal fizyolojik bileşenleri arasında yer aldığı rapor edilmiştir. Bu durum, P(3HB-co-4HB) ve benzeri PHA türevlerinin, parçalanma süreçleri sonunda toksik olmayan ürünler açığa çıkarması sayesinde biyomedikal alanda implant, doku mühendisliği iskeleleri ve kontrollü ilaç salım sistemleri gibi pek çok uygulama için güvenilir adaylar olarak öne çıkmalarını sağlamaktadır (Vigneswari vd., 2016).

Doğada, PHA'ların hücre dışı PHA depolimerazlara sahip mikroorganizmalar tarafından parçalandığı bilinmektedir. Toprakta homopolimer ve kopolimerde bozunma hızı karşılaştırılmış ve kopolimerlerin daha hızlı bozunduğu görülmüştür. Polimer kristalinite derecesi, biyobozunma hızını doğrudan etkilemektedir (Mukai vd., 1993). Homopolimerler yüksek kristaliniteye sahip oldukları için parçalanmaları daha zordur. Kopolimerlerin düşük kristaliniteye ve gözenekli yüzeylere sahip olmaları mikroorganizmaların yüzey adsorpsiyonunu kolaylaştırır ve bozunmayı hızlandırır (Pramanik vd., 2014).

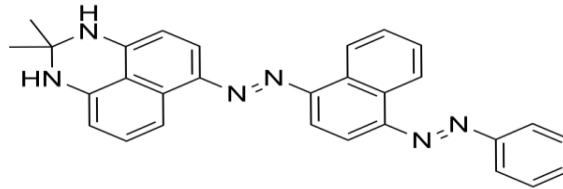
2.2.2.7. PHB görüntüleme yöntemleri

HücreSEL boyama tekniğine dayalı hızlı ve kolay yaklaşımlar kullanılarak hücrelerin PHB üretebilme yeteneğine sahip olup olmadığı belirlenebilmektedir. Mikroorganizmalarda PHB üretim yeteneği tespitinde kullanılan en yaygın yaklaşımlar ise Sudan Black B (SBB) ve Nile Red gibi lipofilik boyaların kullanımını içermektedir. Hücre içi depolama bileşikler olan PHA granüllerinin görselleştirilmesi için SBB ile hücre boyanmasında ısı ile sabitlenmiş hücreler gerekirken, Nile Red' de canlı hücrelerin büyüme koşulları altında boyanması gerekir (Cánovas vd., 2021). Nile red ve SBB, PHB granüllerinin seçici boyanmasında en çok kullanılan boyama teknikleri arasındadır (Mesquita vd., 2015).

2.2.2.7.1.Sudan Black B

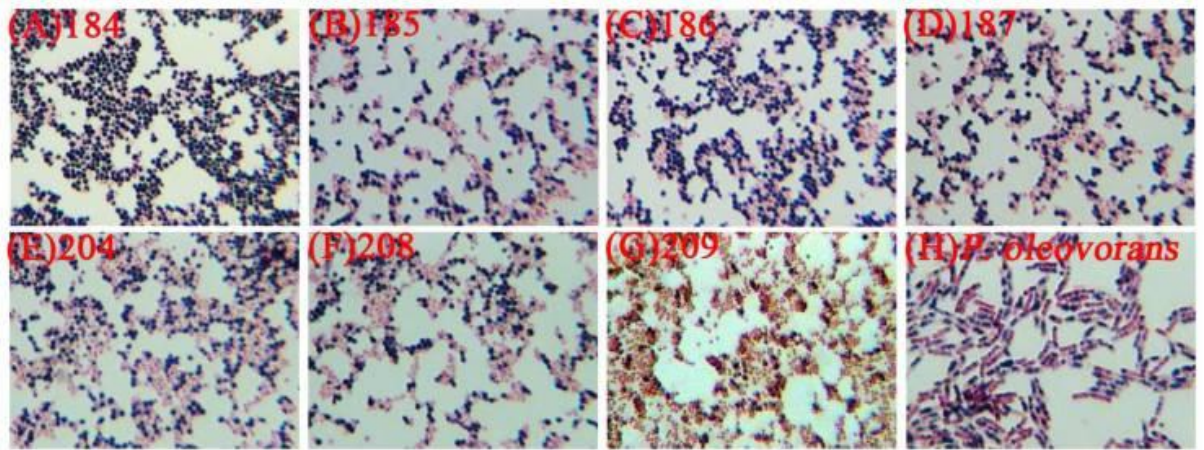
SBB, lipofilik özelliği ve non polar yapısı nedeniyle hidrofobik depo biyopolimer granüllerine karşı yüksek bağlanma afinitesi gösteren lipofilik bir boyadır. Bu etkileşim sayesinde etkin bir boya olup mikroskopik sonuçlar ile PHB üreten mikroorganizmaların taranmasında da önem taşır. Yapılan bir çalışmada bir bakteri suşunun PHB biriktirme

yeteneğini doğrulamak için SBB boyası ile mikroskopik gözlem yapılmış ve hücre içi lipid ve biyopolimer içeriği ortaya koyulmuştur (Narayanan vd., 2020). Şekil 2.14'te SBB'nin formülü verilmiştir.



Şekil 2.14. Sudan Black (Calleja Luque, 2020)

PHB granüllerinin varlığı SBB boyama yöntemi kullanılarak test edilmektedir. SBB ile yapılan boyama ile granüller sitoplazmada mavi- siyah renkte tanımlanır (Şekil 2.15)(Porras vd., 2018).

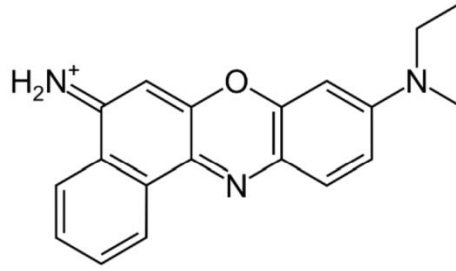


Şekil 2.15. *Cupriavidus taiwanensis* suşlarının immersiye yağ ile 100X objektifte gözlemlenen Sudan Black B ile boyanmış PHB granülleri (Y.-H. Wei vd., 2011)

2.2.2.7.2. Nile Red

Hücre içi PHB varlığının tespit edilmesinde kullanılan en hızlı ve kolay yollardan biri, Nile red boyamasını temel alan mikroskopi yaklaşımıdır. Nile red, hidrofobik hücre

yapısına sahip membranları ve PHB gibi lipid benzeri inklüzyonları görselleştirmek için kullanılan lipofilik bir floresan boyadır. PHB granüllerine bağlanarak floresan mikroskopi ile kolayca tespit edilmeyi sağlar. Nile red'in emisyon rengi bağlandığı lipid ortamının polaritesine göre değişmektedir. Hidrofobik yapılarda 560 nm dalga boyunda uyarılıp 590 nm'nin üzerinde emisyon gösterir (Juengert vd., 2018). Nile Red'in yapısı Şekil 2.16'da yer almaktadır.

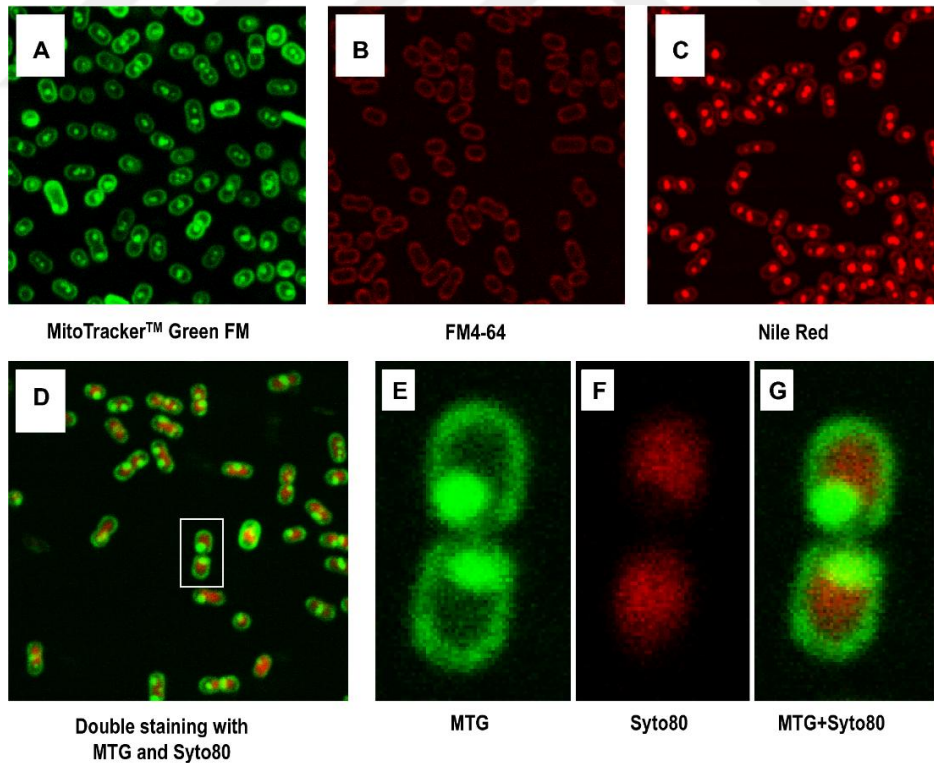


Şekil 2.16. Nile Red (Martinez ve Henary, 2016)

Hızlı ve verimli olmaya yardımcı, spesifik ve floresan bir PHA boyası olan Nile red boyaması ile PHA biriktiren ve biriktirmeyen suşlar ayırt edilebilmiş ve birikim açısından pozitif suşların floresanı parlak kırmızimsı-turuncu floresans renginde olmuştur (Bhat vd., 2024; Olayiwola vd., 2026). PHB granülleri tek katmanlı bir fosfolipit tabakasıyla kaplı lipofilik çekirdeğe sahiptir. Bu yüzden onu boyayabilmek için uygun lipofilik boyalar kullanılabilir. Farklı bakteriler kullanılarak yapılmış önceki pek çok çalışmada Nile red ile boyama yapılmış ve Nile red ile PHB granüllerinin varlığı arasında bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Floresan boyalarla bağlanan hücre içi PHB granülleri floresan yayar ve boyanmış PHB granüllerinin floresan yoğunluğu ve PHB konsantrasyonunun iyi bir bağlantıya sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Cao vd., 2022; Jendrossek vd., 2007). Nile red, oldukça floresan ve SBB'den daha yüksek PHB afinitesine sahiptir. Bu afiniteler PHB granül boyutuna ve bakteri türüne göre değişmektedir. Granülleri görselleştirmek için kullanılan Nile red boyası lipofilik yapısı nedeniyle kullanışlıdır ve parlak kırmızı floresan granüller olarak görüntülenirler. Nile red ile yapılan granül boyaması ile birlikte hücre içi lipidler ve hücre duvarındaki lipidler gibi diğer lipid inklüzyonları ve membranlar da floresan boyaya spesifik olmayan şekilde bağlanabilir ve floresans yayabilir. Bu durum sapmalara yol açıp belirsiz sonuçlara neden olabilir. Bu sebeple yapılan bazı araştırmalarda ek bir floresan boya kullanımı ile PHB granüllerinin birlikte lokalizasyonun daha uygun olabileceği düşünülmüş ve bu

yaklaşımın yararlı olabileceği doğrulanmıştır. İkinci bir floresan boyama yöntemi kullanılması sitoplazmadaki granüllerin yüksek çözünürlükte, hızlı ve kolay görüntülenmesini sağlar. Çift boyama yöntemi ile granül boyutunun daha iyi analizinin uygun bir yol olduğu kanıtlanmıştır (Cánovas vd., 2021; Cao vd., 2022; Olayiwola vd., 2026).

Bir çalışmada *Paracoccus denitrificans*'da PHB granül oluşumu lazer taramalı konfokal mikroskopi (LSCM) ile incelenmiş (Bordel vd., 2021). Floresan boyama MitoTracker Green FM (MTG), FM4-64, Nile red ve Syto 80 boya ile yapılmış ve Nile red PHB granüllerini, FM4-64 ise membranı boyamak için kullanılmıştır (Şekil 2.17) Normalde mitokondri boyaması için kullanılan bir boya olan MTG'nin de Nile red ile birlikte PHB granüllerini boyayabildiği gösterilmiş ancak Nile red ile boyamada floresan yoğunluğu daha güçlü olmuştur. Ayrıca MTG membran boyası ve Syto80 DNA boyası olarak kullanarak, *P. Denitrificans* hücrelerinde çift boyama deneyleri gerçekleştirilmiş (Şekil 2.17 D-G) ve kutuplarda PHB granülleri ve merkezde DNA'ları bulunan hücreler görüntülenmiştir (Bordel vd., 2021).



Şekil 2.17. *P. Denitrificans* hücrelerinin farklı floresan boyalarla boyanması **A** MitoTracker™ Green FM (MTG); **B** FM4-64; **C** Nile Red, **D** MTG ve Syto80 ile çift boyama. **E – G** Yeni bölünmüş bir ana hücreden elde edilen hücrelerin MTG görüntüsü (**E**), Syto80 görüntüsü (**F**), üst üste bindirilmiş görüntü (**G**) (Bordel vd., 2021)

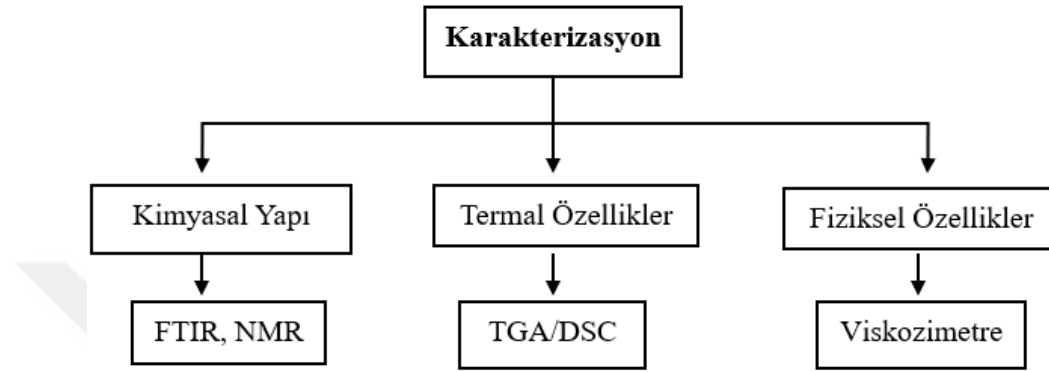
Başka bir çalışmada *Haloferax mediterranei*'deki PHA granüllerinin hücre içi lokalizasyonunu göstermek için Nile red ve SYBR Green ile çift floresan boyama yöntemiyle konfokal floresan mikroskopi analizi yapılmıştır. *Hfx. Mediterranei* hücreleri, lipid floresan boyası olan Nile red ve nükleik asit boyası olan SYBR Green ile birlikte boyanarak konfokal mikroskopi ile, hücre sitoplazmasındaki çok sayıda DNA noktasıyla PHA granüllerinin hücre içi birlikte lokalizasyonu ortaya çıkarılmıştır (Cánovas vd., 2021).

Nile red ve Nile blue A, PHA boyamasında en yaygın kullanılan florokromlardır. Ancak hücre içi ve hücre duvarlarındaki lipitler bu florokromlara bağlanıp floresans yayabilir. Bu sapmaların önüne geçmek için farklı PHA florokromları araştırılmıştır. LipidGreen1, LipidGreen2 ve BODIPY PHA'ya daha güçlü özgüllüğe ve daha kararlı floresans yoğunluğuna sahip birer floresan boya olarak incelenmiş ve saf kültürlerde test edilmiştir (Cao vd., 2022). BODIPY keskin bir emisyon bandı verir ancak ortaya çıkan yüksek arka plan floresansı daha fazla yıkama adımı gerektirir (Zhu vd., 2011). LipidGreen, BODIPY ile karşılaştırıldığında daha az arka plan floresansı ile daha iyi hassasiyet göstermiştir (Kettner ve Griehl, 2020). Kettner ve Griehl (2020), LipidGreen2'nin PHB'yi seçici olarak boyayabildiğini bildirmiştir. *C. necator*'da hücre içi PHB görüntülenmesinde LipidGreen2 kullanılırken hücre zarı boyanması tespit edilmemiş ve Nil Red'den daha yüksek bir PHB afinitesine sahip olduğu varsayılmıştır (Kettner ve Griehl, 2020).

2.2.2.8. PHB karakterizasyon yöntemleri

Tıbbi uygulamalarda, çeşitli endüstriyel ve ticari alanlarda biyolojik olarak parçalanabilen polimer kullanımının artırılması ve uygulanabilirliklerinin genişletilmesi için, polimerlerin gereksinimleri karşılayacak şekilde olması, istenen ve beklenen performansı göstermesi önemli ve gereklidir. Bu yüzden biyopolimerlerin özellik ve niteliklerini anlamak ve bazı uygulamalardaki performansını optimize etmek gerekmektedir. Polimerlerin yapısal, fiziksel, termal, mekanik ve kimyasal özelliklerini değerlendirmek ve analiz etmek için yapılan karakterizasyon yöntemleri ise optimizasyon için istenen özellikte ve standartlara uygun ürünlerin uygulamaya geçmesi için oldukça önemli ve merkezi bir rol oynamaktadır (Kargupta vd., 2025). Verimli PHB üretimi için, uygun karbon kaynaklarında belirlenmiş suşlar ile ekstrakte edilmiş olan polimerlerin

doğrulanması ve fiziksel, yapısal, termal ve kimyasal özelliklerinin analiz edilmesi için karakterizasyon teknikleri kullanılmaktadır. Elde edilen PHB örneklerinin karakterizasyonunda; Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) kullanılan yöntemler arasındadır (Şekil 2.18) (Kargupta vd., 2025).



Şekil 2.18. PHB örneklerinin karakterizasyonunda kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi (Kargupta vd., 2025)

2.2.2.8.1. Termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC)

Polimer örneklerinin yapısal özelliklerini ve termal kararlılığını incelemek için termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) teknikleri kullanılmaktadır. Termogravimetri, ısıtma hızı ve koşullarından etkilenmektedir. Örneklerde, bozunma mekanizmasının belirlenmesine yardımcı olarak ağırlık kaybının ve termal bozunmanın ölçülebilir bir analizini TGA eğrileriyle sunmaktadır (Vahabi, Michely, vd., 2019). Buharlaştırma, ayrışma ve oksidasyon gibi süreçler ile numune ağırlık artışı veya kaybı gibi kütledeki değişiklikler TGA ile ölçülebilmektedir. Farklı bileşim ağırlık oranlarına sahip kompozit numunelerde T_{max} (maksimum bozunma sıcaklığı)'taki ağırlık kaybı (%) ve kalıntı yüzdesi de TGA ile incelenmektedir. TGA analizi sonucu elde edilen grafik, polimer termal bozunma davranışını göstermektedir. Sıcaklık ve kütle değişimleri arasındaki ilişkinin analizi sonucu, örnek bileşimi ve termal kararlılık her bileşiğe özgü farklı termogramların elde edilmesiyle incelenmektedir. Sıcaklık ve zamana bağlı olarak numune kütlesindeki farklar ile termogram elde edilmektedir (Frone vd., 2019). TGA analizinde başlangıç bozunma sıcaklığı ve

maksimum kütle kaybı, sıcaklık ile ilişkilendirilerek termal kararlılık belirlenebilmektedir. TGA da ısıtma hızının artması ile numune bozunma hızı da artmaktadır. Polimer bozunma süreci birden fazla basamakta gerçekleşebilmekte ve bozunmadaki başlangıç, maksimum ve bitiş sıcaklıkları grafik üzerinden anlaşılabilir. Termal özelliklerin belirlenmesinde TGA ile birlikte DSC (diferansiyel taramalı kalorimetri) kullanılarak karakterizasyon yapılmaktadır. Polimerler için temel parametreler olan erime sıcaklığı (T_m), cam geçiş sıcaklığı (T_g) ve kristalinite (X_c) gibi termal özellikler DSC yöntemi kullanılarak belirlenmektedir. DSC, malzemelerin erime sıcaklıklarının karşılaştırılması ile termal ve yapısal özelliklerin analiz edilmesinde kullanılan bir tekniktir. DSC termogramlarında kristalleşme derecesindeki artışın, maksimum erime sıcaklığı ϵ değerini de önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir. DSC de hem ısıtma hem de soğutma ısı akış eğrileri ile cam geçiş sıcaklığı (T_g) ve erime sıcaklığı gözlenir (Blanco ve Siracusa, 2021; Mandragutti vd., 2024; Nygaard, Yashchuk, Nosedá, vd., 2021).

2.2.2.8.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), PHB gibi polimerlerin moleküler yapısını ve kimyasal bileşimini incelemek için kullanılan bir analitik yöntemdir. Polimer kimyasal bağlarının tanımlanmasında kullanılan ve güvenilir bir teknik olan FTIR, numunelerin kızılötesi ışığı absorplamasına dayanmaktadır. PHA'ların FTIR spektrumları çeşitli fonksiyonel gruplara karşılık gelen karakteristik pikler göstermektedir. Gözlenen bu pikler sayesinde alifatik zincirler (CH gerilmesi) ve ester grupları (C=O gerilmesi) gibi temel yapısal bileşenlerin tanımlanması mümkün hale gelmektedir. Böylece FTIR spektrumları ile örnekler farklı fonksiyonel gruplar açısından taranıp sınıflandırılabilir (Sachan vd., 2025). FTIR, kopolimer veya karışımlarda da farklı bileşenlerin miktarlarının hesaplanmasını sağlayabilmektedir. Biyopolimerlerin tanımlanmasında ana pik ve ana grup olan C=O grubunun varlığı önemlidir. FTIR analizi kullanılarak yapılmış olan bir çalışmada farklı suşlarda 1732 cm^{-1} ve 1653 cm^{-1} 'deki pikler C=O grubunun varlığını, 2933 cm^{-1} ve 2984 cm^{-1} 'deki pikler metan ve metilen gruplarının, 1380 cm^{-1} ve 1285 cm^{-1} 'deki pikler ise metil grubunun varlığını göstermiş ve böylece PHB üretimi doğrulanmıştır. Numunedeki fonksiyonel grupların ayırt

edilmesi ile birlikte kovalent bağlar da karakterize edilebilmektedir (Hosseini ve Nazari, 2025).

FTIR analizinde, dalga sayısı ve geçirgenlik yüzdesi belirli fonksiyonel gruplara karşılık gelmektedir. Orimi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da $1723,73\text{ cm}^{-1}$ ' deki absorbans PHB'nin karakteristik özelliği olan ester karbonil ($\text{C}=\text{O}$) gruplarına, $1278,68\text{ cm}^{-1}$ ' deki absorbans asimetrik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $2850-3026\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki absorbanslar $\text{C}-\text{H}$, $840-1181\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki absorbanslar ise PHB yapısındaki $\text{C}-\text{C}$ ve $\text{C}-\text{O}$ bağlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. $3436,51\text{ cm}^{-1}$ ' deki geniş bantın ise terminal hidroksil ($-\text{OH}$) gruplarının gerilme titreşimleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Orimi vd., 2025).

2.2.2.8.3. Nükleer manyetik rezonans (NMR)

PHA'nın özellikleri, polimer zincirini oluşturan monomer türlerine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle monomer bileşiminin belirlenmesi önemli olup ^1H NMR (proton) spektroskopisi, PHA'nın kimyasal yapısının ve kompozisyonunun karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan bir analizdir. Monomer birimleri hakkında detaylı bilgi ile polimer zincirinde hidrojen atomlarının pozisyonunu bilmeyi mümkün hale getirir. Polimer zincirlerinin uç gruplarında bulunan protonlara ilişkin bilgi sağlayarak polimerizasyon mekanizmasının belirlenmesinde etkili olur. Polimerlerin karmaşık moleküler yapılarını çözmek için kullanılan diğer nükleer manyetik rezonans türü ise karbon ^{13}C -NMR spektroskopisidir (Hendy vd., 2025; Senila vd., 2023). Elde edilen biyopolimerlerin fonksiyonel gruplarının daha ayrıntılı karakterizasyonu için NMR spektroskopisi yapılmaktadır. Yapılan HNMR ile standart ve ekstrakte edilen mikrobiyal PHB örnekleri spektrumları karşılaştırılmakta ve NMR spektrumundaki sinyaller metil, metilen ve metin gibi çeşitli grupları temsil etmektedir. Farklı suşlar kullanarak yapılan çalışmalarda genellikle $1,27$ ($-\text{CH}_3$), $2,4-2,6$ ($-\text{CH}_2$) ve $5,27$ ($-\text{CH}$) ppm'deki pikler sırasıyla metil, metilen ve metin gruplarının ve 3HB'nin varlığını göstermektedir. Spektrumlarda $0,8$ ve $0,9$ ppm'de görülen sinyaller ise 3-hidroksi valerat (3HV) grubunun varlığını gösterir (Jin vd., 2024). PHA'nın mikro yapısını, monomer dizisini ve bileşimini analiz etmek için kullanılan NMR yöntemi genellikle doymuş ve doymamış polimerleri analiz etmek için de kullanılmaktadır. NMR analizi öncesinde

PHB örnekleri genelde döteryumlanmış kloroformda çözülür ve analiz yapılır (Bano vd., 2024).

2.2.2.9. PHB uygulama alanları

PHA'ların biyobozunurluk ve biyouyumluluk gibi doğal özelliklere sahip olmaları, pek çok alanda farklı uygulamalarda kullanılabilecek bir biyolojik malzeme olmalarını sağlamaktadır. Polimerler; kozmetik kaplarda, ambalaj malzemelerinde, biyolojik veya kimyasal maddelerin salınımı için taşıyıcı olarak ve ilaç veya aşı taşıyıcısı olarak kullanılabilirler. Doku rejenerasyonu için potansiyel olacağı düşünülen biyolojik molekül olan polimerler biyo-implant malzemesi olarak kullanılabilir. Doku mühendisliği alanında da matriks olarak uygulandığında yapışkanlık özelliği gösterdiği ve biyokomposit olarak kullanımın ise kemik rejenerasyonunu arttırdığı düşünülmektedir (Ali ve Jamil, 2016; Ray ve Kalia, 2017). Biyoplastikler; Tarım, tıp, gıda, kozmetik ve tekstil gibi sektörlerde geleneksel plastiklerin yerini alıp uygulama alanını arttırabilir.

2.2.2.9.1. Endüstriyel uygulamalar

Çevre dostu özellikleri nedeniyle PHB'nin endüstriyel uygulama alanları giderek genişlemektedir. Bu biyopolimer, farklı sektörlerde sürdürülebilir malzeme ihtiyacını karşılayabilecek önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır.

2.2.2.9.1.1. Ambalaj malzemesi olarak PHB

PHA'lar elektronik, kozmetik ve ambalajlama gibi bazı endüstriyel uygulamalarda biyolojik olarak parçalanma, düşük geçirgenlik ve düşük cam geçiş sıcaklığı gibi özellikleri sebebiyle ince film ve kaplama malzemesi olarak kullanım için umut vermektedirler (Vahabi, Rohani Rad, vd., 2019).

Esnek, dayanıklı, iyi darbe direnci ve termal kararlılıkta olmaları sebebiyle geleneksel plastikler ambalaj malzemesi olarak kullanılmaktadır. Biyopolimer bazlı gıda ambalajı kullanımı biyobozunur olmaları sebebiyle ilgi çekici hale gelmiştir. PHA'lar propilene olan benzer özellikleri nedeniyle çeşitli kaplama malzemelerinde kullanılmaktadır. Kırılgan ve darbeye karşı düşük dirençli olmaları daha fazla uygulama

alanına sahip olmasını kısıtlamaktadır. Bu zayıf noktalar, hidroksi valerat veya hidroksi oktanoat gibi farklı monomerlerle kopolimerizasyon işlemi sonucu kopolimer oluşturularak iyileştirilebilir ve üretilecek plastik malzemenin ambalajlamada daha iyi özellikte olması sağlanabilmektedir. Yine, karışımlar oluşturularak da uygulama alanları genişletilebilir. Örneğin PLA, PHB ve d-limonen karışımlarının mekanik ve termal özellikleri sebebiyle gıda ambalajlarında kullanılabilecek bir karışım olduğu düşünülmektedir (S. J. Hong vd., 2025).

Sentetik polimerler yavaş bozunma hızına sahip oldukları için PHB gibi biyolojik olarak parçalanabilen biyopolimerler gıda ambalajı için değerlendirilmiş ve krem peynir, mayonez ve margarin gibi bazı yağlı gıdaların ambalajlanmasında alternatif olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir (Bucci, Tavares ve Sell 2007). Biyopolimer bazlı gıda ambalajı kullanımındaki en büyük sorun ürün raf ömrü ile biyoplastik malzemenin dayanıklılığının uyumlu hale getirilmesidir. Kullanılan ambalaj paketinin mekanik özellikleri sağlam olmalı ve bozulmamalıdır (Rosa vd., 2004).

2.2.2.9.2. Tıbbi uygulamalar

PHB'nin toksik olmayan bozunma ürünleri oluşturması ve canlı dokularla uyumlu olması, bu polimeri biyomedikal uygulamalar için cazip bir malzeme haline getirmektedir. Bu nedenle PHB; ilaç taşıma sistemleri, yara örtüleri, doku mühendisliği ve geçici implantların geliştirilmesinde değerlendirilmektedir.

2.2.2.9.2.1. Biyomedikal cihazlar, malzemeler ve ilaç taşıyıcıları olarak PHB

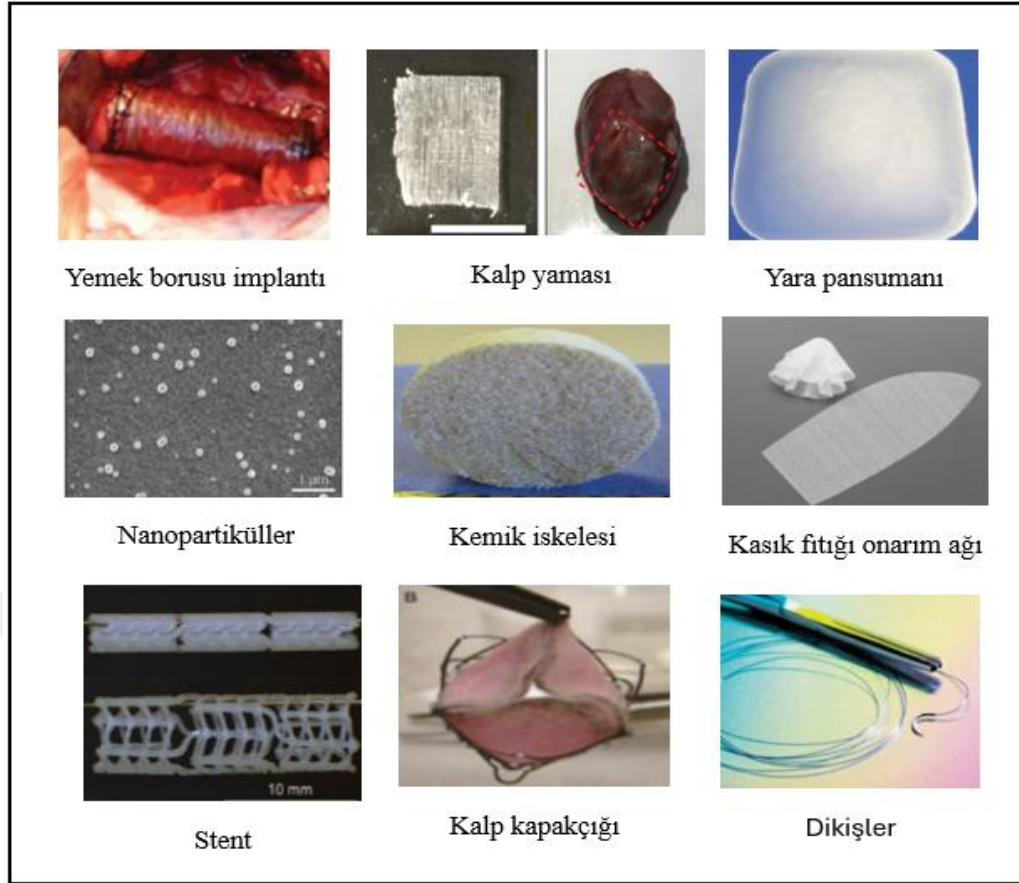
PHA'lar biyoyoumlu olmaları sebebiyle doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesi gibi biyomedikal uygulamalarda ilgi görmüşlerdir. Toksik olmama, esneklik ve yüksek mekanik dayanıklılıkta olmaları ilaç dağıtımı için seçenek olmalarını sağlamıştır. İlaç taşıyıcı ajan olarak PHA'lar, hidrofilik veya hidrofobik ilaç yüklü nano veya mikroküre nanopartiküller oluşturularak kontrollü ilaç salımında incelenmişlerdir. Nanopartiküllerle konjuge edilen PHA ve kopolimerleri, nanotaşıyıcı olarak etkili olabilir. Düşük esnekliğe sahip olmaları ve sertlikleri nedeniyle çeşitli biyomedikal alanlarda kullanılmalarına rağmen doku mühendisliğinde kullanımlarını kısıtlamıştır. Bu sorun hidrofilik fonksiyonel grupların eklenmesi ya da çeşitli hidrofilik biyopolimerlerle birleştirilmeleri

gibi bazı modifikasyonların yapılması ile fonksiyonel hale getirilmeleri ile çözülmeye çalışılır (Pramanik vd., 2014; D.-X. Wei vd., 2018).

Biyopolimerler ile yama temelli yara kapanması, önemli bir strateji olarak değerlendirilmiştir. Yaraların iyileşme sürecinde destekleyici matriks olarak PHA'lar denenmiş ve PHBV kopolimeri ile yara iyileştirici yamalar oluşturmak için araştırmalar yapılmıştır. Yine PHBV nanofiberleri ile modifiye edilmiş yara pansuman malzemesi kullanılarak hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Kitosan ve hiyalüronik asitten oluşan esnek yapıda PHBV karışımli polisakkaritlerin çeşitli hücrelerin büyümesini desteklediği görülmüştür (Augustine vd., 2020; Leenstra vd., 1998).

Birkaç çalışma, elektrospinning yöntemi kullanılarak yapılmış olan hidroksiapatit/PHA kompozitinin kemik doku mühendisliğinde kullanımı üzerinde araştırma yapmıştır (Zarei vd., 2019). Kanser tedavisinde hidrofobik PHA polimerlerinin hidrofobik ilaçları vücudun belirli bölgelerine dağıtabilme özelliğinden faydalanılarak etkilerine bakılmıştır (L. Jiang vd., 2019). Ayrıca ince PHB filmleri kanser hücrelerinin belirlenmesinde de kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada normal hücreler PHB tabakalarına kolayca bağlanamazken kanser hücrelerinin ise tabakalara iyi bağlandığını göstermiştir. Kanseri hücrelerin tespitinde, yardımcı olarak PHB filmlerinin kullanımı fikri üzerine çalışma yapılmıştır (Sabarinathan vd., 2018).

PHA polimerlerinin tıbbi ve biyomedikal endüstrilerdeki çeşitli uygulamaları şu şekilde sıralanabilir: PHA biyofilmleri, kök hücre kültürü için iskeleler, hemokompatibl ve sitokompatibl damar stenti, bağ ve tendon iskele malzemesi, dikişler, yara örtüleri, kalp kapakçıkları, perikardiyal yamalar, pansumanla, vasküler greftler ve mikroküre implantları (Şekil 2.19) (Guerrini vd., 2017; Thamarai vd., 2024). Gözenekli yapıları, PHA'ların omurga yaralanmalarının tedavi sürecinde kullanılabilmesine olanak sağlayabilmektedir. Bir çalışmada omurilik onarımını desteklemek için Schwann hücreleri ile ekilmiş biyolojik olarak parçalanabilir poli- β -hidroksibutirat iskeleti tasarlanmış ve hücrelerin PHB iskeletine tutunduğu ve çoğaldığı gözlemlenmiştir (Novikova vd., 2008). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi, PHB'nin dikiş ipliği olarak kullanımını onaylamıştır (Ke vd., 2017).



Şekil 2.19. PHA bazlı çeşitli biyomedikal uygulamalar (Gregory vd., 2022)

PHA'ların: Kalp yamaları, damar greftleri, kalp kapakçıkları, kulak rekonstrüksiyonları, dikişler ve yara pansumanları, sinir kanalları, kıkırdak dokusu, kemik implantları ve ilaç dağıtımı gibi biyomedikal uygulamalar için ideal malzeme özelliklerine sahip olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Pulingam vd., 2022).

Poli-3-hidroksioktanoat[P(3HO)], onarım için kardiyak yama olarak incelenmiştir. Yamaların mekanik özelliklerinin kalp kasına yakın olduğu ve polimerin hücre çoğalması, canlılığı ve yapışması yönünden iyi olduğu gösterilmiştir. Yamalarla birlikte gözenekli ve lifli yapıların kullanılmasının hücre gelişmesi ve yapışması özelliklerini gösterdiği gözlemlenmiştir (Bagdadi vd., 2018).

Damarların tekrardan daralması anlamına gelen restenoz riski, klinikte kullanılan metalik stentlerin temel bir sorunudur. Bu riski azaltmak için biyolojik olarak parçalanabilir stent üretimi umut verici olabilir. Bir çalışmada, PLLA (poli-l-laktik asit) /poli (4-hidroksibutirat) [P(4HB)]'den yapılmış biyolojik olarak parçalanabilir stentler, kalıcı stentlerin sorunlarını çözmek için bir domuz modeline yerleştirilmiş ve daha düşük bir distal darlık derecesi gibi olumlu sonuçlar göstermiştir (Kischkel vd., 2016).

Biyopolimerler ve kolajen peptitleri ile elektrospinning yöntemi kullanılarak nanofiber yapıda matriks üretilmiş ve yara iyileşmesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. İn vitro çalışmalar fare fibroblastları kullanılarak yapılmış ve P(3HB- co -4HB) ve kollajen peptitleri içeren nanofiberlerin hücre çoğalmasını ve yapışmasını desteklediği gösterilmiştir. P(3HB- co -4HB) /kollajen nanofiberlerinin yara kapanması üzerinde %98 etkili olduğu tespit edilmiştir. Yara iyileşmesini hızlandırdığı gözlemlenmiş olan nanofiberlerin umut verici bir yara pansuman yapısı olacağı düşünülmektedir (Vigneswari vd., 2016).

Yapılmış olan çeşitli araştırmalar PHB'lerin; mekanik özellikleri, hücre aktivitesi ve anjiyogenezi teşvik etmeleri, çok az ya da hiç bağışıklık tepkisi ve biyoyumlu olmaları sebebiyle gelecekte biyomedikal malzemelerde kullanımlarının artacağını göstermektedir (Gregory vd., 2022).

2.2.2.9.3. Tarımsal uygulamalar

PHA'ların parçalanabilir ve uyumlu olmaları sebebiyle tarımsal uygulamalar için de ideal oldukları söylenebilir. Kontrollü insektisit salınımı için P(3HB-3HV) kullanılmıştır. İnsektisit içeren P(3HB-3HV) peletleri ekim sırasında mahsullerle karıştırılıp uzun süreli ve etkili bir koruma hedeflenmektedir. Bazı tarımsal uygulamalarda da PHA bazlı karışım filmler kullanılmıştır. Plastik torbaların aksine bozunmaları esnasında çevreye herhangi bir zararlı madde yaymamaları nedeniyle biyolojik olarak parçalanabilir bitki torbaları olarak kullanılabilirler (Bano vd., 2024).

Biyolojik olarak parçalanabilir malç filmleri, mahsul sağlığını doğrudan etkileyebileceği ihtimalinden dolayı tarımsal uygulamalar için bir başka araştırma konusu olmuştur. Biyolojik olarak parçalanabilir malç filmlerinin kullanımı, tarımsal ürünlerini gelişimini iyileştirmekle birlikte, olumsuz iklim koşullarından ve böceklerden korumayı destekleyebilir (Campanale vd., 2024).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, çalışmada PHB üretimi için kullanılan mikroorganizma, besiyeri bileşenleri ve kültür koşulları ile birlikte fermentasyon süreçleri ve ürünün elde edilmesine yönelik ekstraksiyon yöntemleri açıklandı. Ayrıca elde edilen PHB'nin karakterizasyonunda kullanılan analiz teknikleri detaylandırıldı.

3.1. Bakteri Suşları, Ortam ve Kültür Koşulları

Bu tezde *C. sphaeroides* O.U. 001 (DSM5864) ve *C. necator* H16 (DSM 428) olmak üzere 2 farklı bakteri kullanıldı. Bu tez çalışmasının amacı, çok yönlü metabolizmaya sahip ve yüksek verimle PHB biriktirdiği bilinen iki gram negatif bakteri kullanarak dört farklı karbon kaynağında en iyi büyüme koşullarının optimizasyonunun ve ardından PHB üretim verimi karşılaştırılmasının yapılmasıdır. PHB üretimi için en iyi koşul belirlendikten sonra elde edilen PHB örneklerinin görüntülenmesi ve karakterizasyonun yapılması belirlenen hedeflerdendir. -80°C'de stoklanmış olan *C. sphaeroides* O.U. 001 (DSM5864), Biebl ve Pfenning (BP) agar besiyerine, *C. necator* H16 (DSM 428) ise LB Broth (Miller) agar besiyerine ekilerek 30±1°C de (96 saat) aktiveleştirildi. Tek saf koloniler elde edildikten sonra bakteriler, çalışmaya başlamadan önce adaptasyon ve aktiveleştirme için karbon kaynağı olarak glukoz, fruktoz, sükroz ve asetat içeren sıvı besiyerlerine aktarıldı. Tek koloni 30±1°C'de 250 mL'lik erlenmeyer şişede 100 mL sterilize edilmiş besiyerlerinde kültüre edildi. *C. necator* kültürlerinde amonyum sülfat, maksimum PHB verimi ve iyi bir biyokütle üretimine yol açtığı ve *C. necator* tarafından PHA üretmek için en sık kullanılan azot kaynağı olduğu için bu çalışmada *C. necator* kültürlerinde amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) azot kaynağı olarak kullanıldı. *C. sphaeroides* kültürlerinde ise azot kaynağı olarak 2mM amonyum klorür (NH₄Cl) kullanıldı.

Glikoz, fruktoz ve sükrozun optimum konsantrasyonunu belirlemek için ön çalışma yapıldı. Ön çalışmada beş farklı konsantrasyon (10, 20, 30, 40, 50 g/L) kullanıldı ve ölçülen optik yoğunluk değerlerine göre optimum büyüme konsantrasyonları belirlendi. Kullanılan asetat konsantrasyonu ise Akpınar (2023) tarafından yapılan ayrıntılı çalışmalar temel alınarak belirlendi ve kullanıldı (Akpınar, 2023). Besiyeri hazırlandıktan sonra pH, 5M NaOH kullanılarak 6.8'e sabitlendi. Ortam sterilizasyonu,

hazırlanan besiyerlerinin 15 dakika 121°C’de otoklavlanması ile gerçekleştirildi. Otoklav işleminden sonra besiyerlerine eser element, demir sülfat/sitrat ve vitamin çözeltisi eklendi. *C. sphaeroides* için kullanılan eser element çözeltisi bileşimi Ek 15’te, vitamin çözeltisi bileşimi Ek 16’da iken *C. necator* için kullanılan eser element çözeltisi bileşimi Ek 17’de verildi. Çizelge 3.1, 3.2, 3.3 ve 3.4’te *C. sphaeroides* için kullanılan asetat, glikoz, fruktoz ve sükroz besiyerlerinin içeriği verildi.

Çizelge 3.1. Asetat besiyeri içeriği (g/L)

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

Çizelge 3.2. Glikoz besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl (2mM)	0.1069
Glikoz	10
NaCl	0.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05
Vitamin	1ml
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sitrat	5ml

Çizelge 3.3. Fruktoz besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl (5mM)	0.26745
Fruktoz	1
NaCl	0.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05
Vitamin	1ml
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sitrat	5ml

Çizelge 3.4. Sükroz besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl (2mM)	0.1069
Sükroz	10

Çizelge 3.4 (devam) Sükroz besiyeri içeriği (g/L)

NaCl	0.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05
Vitamin	1ml
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sitrat	5ml

Çizelge 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8’de *C. necator* için kullanılan asetat, glikoz, fruktoz ve sükroz besiyerlerinin içeriği verildi.

Çizelge 3.5. Asetat besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgSO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
NaCl	0,4
Asetik asit, C ₂ H ₄ O ₂	70mM
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sülfat	1ml

Çizelge 3.6. Glikoz besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgSO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
NaCl	0,4
Glikoz	50
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sülfat	1 ml

Çizelge 3.7. Fruktoz besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgSO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
NaCl	0,4
Fruktoz	20
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sülfat	1 ml

Çizelge 3.8. Sükroz besiyeri içeriği (g/L)

İçerik	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
MgSO ₄	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,5
KH ₂ PO ₄	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
NaCl	0,4
Sükroz	10
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sülfat	1 ml

C. sphaeroides, aerobik, karanlık koşullarda (alüminyum folyo ile sarılarak) ve çalkalamalı (Thermo-scientific MAXQ 4450 1CE) inkübatörde 150 rpm’de 30°±1C’de, *C. necator* H16 ise aerobik ve ışık altında (alüminyum folyo kullanılmadan) 150 rpm ‘de 30±1 °C’de inkübe edildi. 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. *C. sphaeroides* fruktoz besiyerinde ise anaerobik koşullarda aydınlık ortamda 30°C sıcaklıkta ve kültür kabı olarak ise 100 mL’lik penisilin şişesi kullanılarak kültüre edildi.

3.2. Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması

Hücre yoğunluğunu ölçmek için *C. sphaeroides* 'in 660 nm'de *C. necator* 'un ise 600 nm'de 24 saat aralıklarla örnek optik yoğunlukları (OD), spektrofotometre ile ölçüldü. 2000µL hücre kültürü ile yapılan ölçümlerde, OD değeri 0,8'in üzerinde çıktığında kültür edilen besiyeri ile seyreltmeler yapıldı ve sonuç hesaplandı. OD ölçülerek takip edilen hücre büyümesi ölçümleri ölüm fazına kadar kaydedildi. OD değerlerindeki ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı.

3.3. pH Eğrilerinin Oluşturulması

Glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat ortamında çoğaltılan bakterilerin pH'ı 24 saatte bir 2000µL örnek alınarak pH metre ile takip edildi. Yapılan pH ölçümleri üç tekrar halinde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar farklı karbon kaynaklarında karşılaştırıldı. İlk başta 7.00 ve 6.8'e ayarlanmış olan pH'ta değişimler meydana geldi ve bu farklılıklar kaydedildi. pH'taki değişiklikler ölüm fazına kadar ölçüldü.

3.4. PHB Granüllerinin Görüntülenmesi

Optimize edilmiş inkübasyon süresi olarak kabul edilen süre boyunca bakteriler farklı besiyerlerinde inkübe edildi. PHB biriktirme aşamasına kadar inkübe edilen hücrelerin PHB granülleri Nile red ve SBB boyaları kullanılarak mikroskopi yöntemleri ile görüntülendi.

3.4.1. Sudan Black B ile boyama

C. sphaeroides ve *C. necator* farklı karbon kaynaklarında belirlenen inkübasyon sürelerinde kültüre edildi ve 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.
- Preparatlara etiketleme yapılarak üzerine 1-2 damla distile su damlatıldı ve 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 ışık mikroskopunda (Nikon esclipse E200) 100X okülerde görüntülendi.

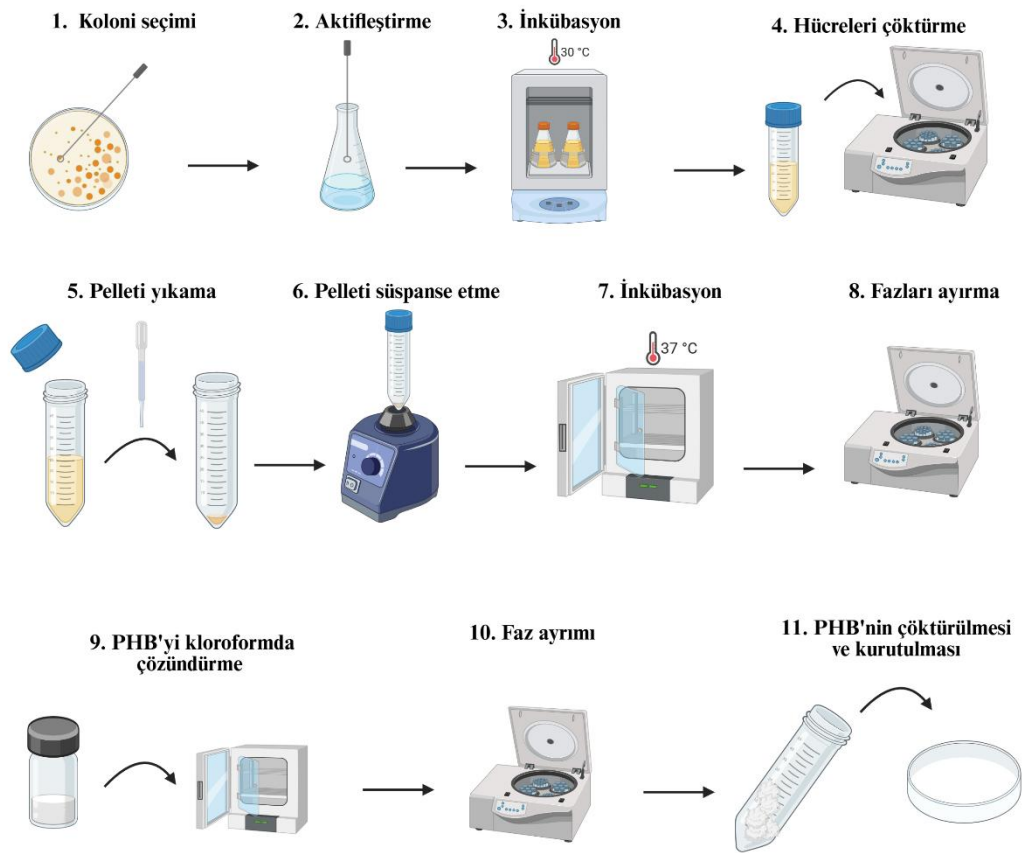
3.4.2. Nile Red ile boyama

Hücre içi PHB granülleri Nile Red ile boyandı. Bakteri hücreleri ve PHB granülleri konfokal lazer taramalı mikroskopu (CLSM) ve konfokal lazer taramalı floresan mikroskopu ile görüntülendi. Nile Red boyama yöntemi şu şekilde yapıldı:

- 1 mL bakteri kültürü 7500 rpm'de 5 dakika (4°C) santrifüjlendi ve süpernatant atıldı.
- Pellet 1 mL %0,9 NaCl çözeltisi içinde nazikçe çözüldü.
- Ependorf tüpündeki 100 µl bakteri çözeltisine 10 µl seyreltilmiş Nile Red ilave edildi ve floresan boya ışıktan etkilendiği için alüminyum folyo ile sarılıp oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- Çözelti, 5 dakika (4°C) boyunca 7500 rpm'de santrifüjlenip süpernatant atıldı.
- Pellet daha sonra 500 µl %0,9 NaCl ile nazikçe çözüldü ve 10 µl bakteri/ boya süspansiyonu mikroskopik lam üzerine yerleştirildi, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Görüntüleme, konfokal mikroskop (63X Zeiss) ile yapıldı.

3.5. Bakteri Kültürlerinden PHB Ekstraksiyonu

Bakteriler PHB üretim aşamasına gelene kadar inkübe edildi ve ardından hücre kültüründen organik çözücü (kloroform) kullanılarak PHB ekstraksiyonu yapıldı. PHB üretimi için %10 bakteri kültürü ekimi ile bakteriler kültüre edildi. *C. sphaeroides* için dört, *C. necator* için ise üç farklı koşulda inkübasyon sonrası logaritmik fazda ekstraksiyon işlemi yapıldı. Şekil 3.1’de PHB ekstraksiyon aşamaları verildi.



Şekil 3.1. PHB ekstraksiyon aşamaları

PHB ekstraksiyon protokolü şu şekildedir:

- Hücre kültürü 50 mL’lik falkonlara eşit şekilde bölünerek 5000 rpm’de 15 dk santrifüjlendi. Bütün santrifüj işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilip sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı.
- Falkonda bulunan pellet 1 mL distile suda çözündürülerek 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 çözündürülerek 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 çözündürüldü, 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 birkaç 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 birkaç gün 30°C de inkübasyona bırakıldı, kurutma işlemi tamamlanıp tartıldı. PHB, sabit bir ağırlık gözlenene kadar kurutuldu.

3.6. Kuru Hücre Ağırlığı Ölçümü ve PHB Verim Hesaplaması

Kuru hücre ağırlığı (CDW) optimize edilmiş inkübasyon süresinden sonra belirlendi. ilk olarak boş eppendorf tüpler tartıldı. Ardından bakterileri toplamak için 13.000 rpm, 15 dk santrifüj yapıldı. Distile su ile yıkama işlemi yapıldı ve hücre pelletleri 80°C'de 1 saat 30 dk kurutuldu. Kurutma işleminden sonra eppendorf tüplerlerdeki kuru

hücre pelletleri tekrar tartıldı. Elde edilen mikrobiyal PHB biyopolimerlerin verimliliklerini hesaplamak için aşağıdaki denklem (3.1) kullanıldı (Hosseini ve Nazari, 2025).

$$(\%) \text{PHB verim} = \frac{\text{Ekstrakte edilen PHB ağırlığı (g/L)}}{\text{Kuru hücre ağırlığı (g/L)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.7. Üretilen PHB Polimerlerin Karakterizasyonu

Ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen PHB karakterizasyon için kullanıldı. *C. sphaeroides* ve *C. necator*'un dört farklı karbon kaynağından elde edilen PHB, Nükleer manyetik rezonans (NMR), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve TGA/DSC analizleri ile karakterize edildi.

3.7.1. NMR ile PHB karakterizasyonu

Polimerlerin moleküler yapısının belirlenmesi için ^1H -NMR spektroskopisi yapıldı. Ekstrakte edilen PHB örnekleri döteryumlu kloroform içinde süspanse edilerek ^1H -NMR analizleri (Bruker avance neo 400 MHz) gerçekleştirildi. Mikrobiyal sentezlenen PHB'nin ^1H -NMR spektrumu ile ticari PHB'nin spektrumları karşılaştırıldı.

3.7.2. FTIR ile PHB karakterizasyonu

PHB polimerindeki başlıca fonksiyonel gruplar FTIR spektroskopisi kullanılarak tanımlanmıştır. Kızılötesi spektroskopisi $3900\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ aralığında FTIR Thermo Scientific-Nicolet 1S20 spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Mikrobiyal sentezlenen PHB'nin FTIR spektrumları ile ticari PHB'nin spektrumları karşılaştırıldı.

3.7.3. TGA/DSC analizi ile karakterizasyon

Polimer örneklerinin yapısal özelliklerini ve termal kararlılığını incelemek için termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) teknikleri kullanıldı. TGA analizinde sıcaklık ve zamana karşı numunedeki ağırlık farklılıkları

hesaplanmaktadır. PHB'nin termal kırılmalığı termogravimetrik analizle belirlendi. TGA değişen sıcaklıkla birlikte ağırlık kaybının yüzdesini vermektedir. Bu analiz üretilen mikrobiyal PHB biyopolimerinin bozunmasını aşamalı ağırlık kaybı ile gösterdi. TGA eğrilerindeki ağırlık kaybı polimerin bozunması ile kendini gösterir. Kontrol grubu olarak ticari PHB kullanılarak karşılaştırma yapıldı.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Bu bölümde çalışmadan elde edilen deneysel sonuçlar sunuldu ve literatür bilgileri ile karşılaştırılarak tartışıldı.

4.1. Ön Çalışmalar, Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri

PHB üretim sürecine temel oluşturan ön çalışmalar, büyüme eğrileri ve pH analizleri çalışmanın bu kısmında verildi, kültür koşullarının gelişim üzerindeki etkileri incelendi ve ardından eğriler oluşturuldu.

4.1.1. Karbon kaynaklarının optimizasyonuna yönelik ön çalışmalar

Yapılan deneyler sonucunda *C. sphaeroides*'in farklı karbon kaynaklarında optimum koşulları belirlendi. Glikoz besiyeri için yapılan beş farklı konsantrasyon arasında deney sonunda, en iyi büyümenin olduğu konsantrasyon 10g/L olarak tespit edildi. Fruktoz besiyerinde en iyi büyüme 1g/L olarak belirlendi. Sükroz besiyerinde ise bakterinin en iyi büyüdüğü konsantrasyon 10g/L olarak belirlendi.

C. sphaeroides'in önemli fizyolojik davranışlarından bazıları H₂ üretimi ve PHB üretmektir. Hidrojen ve PHB üretimi dengesiz büyüme koşulları altında olur. Araştırmacılar bu iki yolun indirgeyici güç için birbirleri ile rekabet içinde olabileceğini düşünmüşlerdir (Chen vd., 2012). Yapılan literatür araştırmalarına göre, *C. sphaeroides* anaerobik koşullarda büyütüldüğünde asıl amacın hidrojen üretmek olduğu görüldü. Ancak en iyi koşulu tespit etmek için glikoz, fruktoz ve sükrozun farklı konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan besiyerlerine yapılan bakteri ekimleri hem aerobik hem de anaerobik koşullarda büyütüldü. Fruktoz besiyerinde *C. sphaeroides* anaerobik ve aerobik koşullarda incelendiğinde aerobik ortamda büyüme gözlemlenmez iken anaerobik ortamda büyüme gözlemlendi.

Amonyum iyonunun nitrojenaz aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi vardır. Dolayısıyla hidrojen üretimi üzerine de vardır. H₂ üretiminde görevli olan *nifH* ve *nifA* genlerinin amonyum klorür konsantrasyonu arttığında ifade seviyeleri azalır. Yapılan araştırmalarda 2mM NH₄Cl'den yüksek konsantrasyonlar kullanıldığında hidrojen üretimi azalmaktadır. 3 mM NH₄Cl'de az da olsa H₂ üretimi meydana gelmektedir. 5 mM

NH₄Cl içeren ortamda H₂ üretiminden sorumlu genlerin ifade edilmediği ve H₂ üretimi olmadığı gözlemlenmiştir (Akköse, 2008). Bu sebeple bakteri fruktoz besiyerinde anaerobik ortamda büyütüldüğünde 5 mM NH₄Cl kullanıldı. Glukoz, sükroz ve asetat besiyerlerinde ise 2 mM NH₄Cl kullanıldı ve bu üç besiyerinde *C. sphaeroides*'in aerobik ortamda daha iyi büyüdüğü gözlemlendi.

Beş farklı konsantrasyona bakıldığında fruktoz besiyeri aerobik ve anaerobik koşullarda beş konsantrasyonda da büyümedi. Ardından 1 g/L ve 5g/L fruktoz konsantrasyonları da denendi. Anaerobik koşullarda besiyerinde 1 g/L fruktoz kullanıldığında *C. sphaeroides*' in büyüdüğü gözlemlendi.

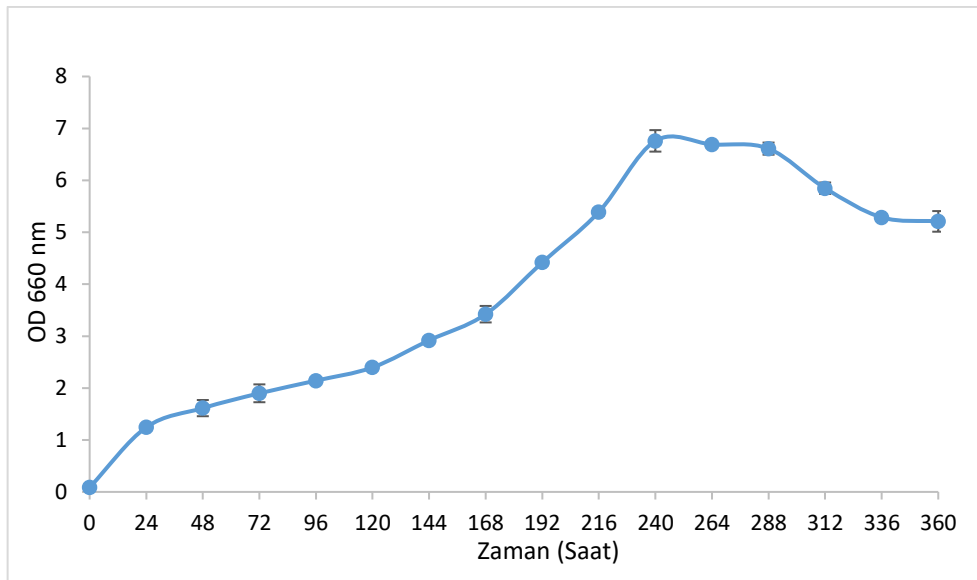
C. necator dört farklı karbon kaynağında farklı konsantrasyonlarda büyütüldü ve optimum büyümenin olduğu koşullar belirlendi (Çizelge 4.1). Glikoz besiyerinde sırasıyla 10-50 g/l konsantrasyonları kullanıldı ve büyümenin konsantrasyon artışı ile birlikte arttığı görüldü. Bu nedenle 60 ve 70 g/l glikoz konsantrasyonları da denendi. En iyi büyüme, glikoz besiyerinde 50 g/l iken fruktoz besiyerinde 20 g/l konsantrasyon olduğu tespit edildi. Asetat besiyerinde en iyi büyüme 70mM olarak belirlendi. Sükroz besiyerinin hiçbir konsantrasyonunda *C. necator*'un büyümesi gözlemlenmedi. Yapılan çeşitli araştırmalar *C. necator*'un sükrozu karbon kaynağı olarak kullanamadığını göstermektedir. Sükroz, invertaz enziminin kullanımıyla glikoz ve fruktoza hidrolize edilerek kullanılabilir ancak bu çözüm maliyeti arttırmaktadır (Bhatia vd., 2018; Park vd., 2014).

Çizelge 4.1. Optimize edilen karbon kaynakları konsantrasyonları

Bakteri Adı	Karbon Kaynağı	Konsantrasyon
<i>Cereibacter sphaeroides</i>	Glukoz	10 g/L
	Fruktoz	1 g/L
	Sükroz	10 g/L
	Asetat	70 mM
<i>Cupriavidus necator</i>	Glukoz	50 g/L
	Fruktoz	20 g/L
	Asetat	70 mM
	Sükroz	Büyüme olmadı

4.1.2. Büyüme eğrileri

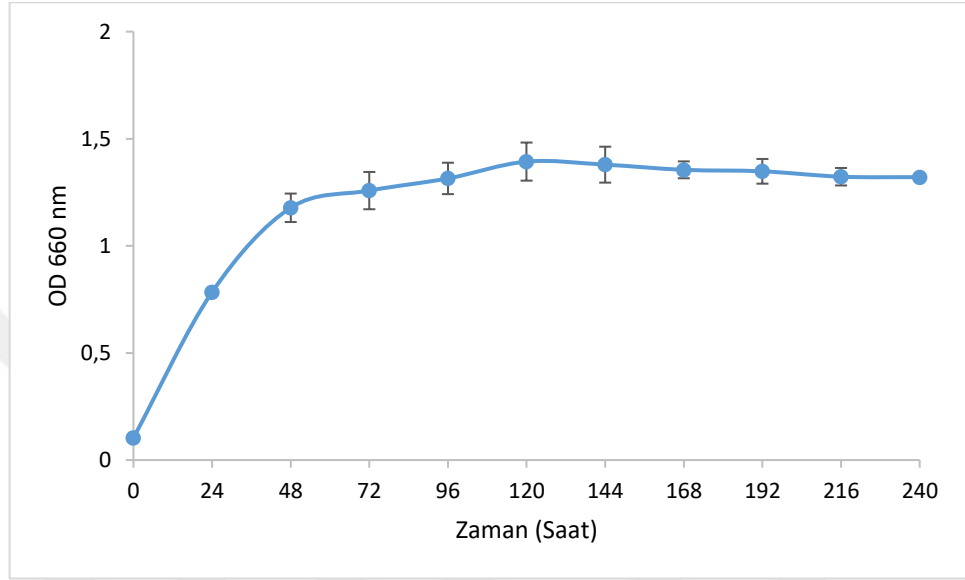
Besiyerinde inkübasyon sırasında 24 saat aralıklarla optik yoğunluk ölçüldü. Örneklerden 2 ml alınarak spektrofotometre ile OD değerlerine bakıldı. Bakterinin üremesi PHB birikimiyle doğru orantılı olmaktadır. *C. sphaeroides* için 660nm’de (OD_{660nm}), *C. necator* için ise 600 nm’de (OD_{600nm}) ölçüm yapıldı. Anlamlı sonuçlar elde etmek için deneyler 3 tekrarlı yapıldı. Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4’te *C. sphaeroides*’in Şekil 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8’de ise *C. necator* ‘un sırasıyla glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat besiyerlerinde OD değerlerinin bulunduğu büyüme eğrileri yer almaktadır. Grafiklere hata çubukları eklendi. Grafiklerde zamana bağlı optik yoğunluk değişimleri gösterilerek bakterilerin lag, eksponansiyel (log), durağan ve ölüm fazları ortaya koyuldu. Farklı koşullarda, başlangıçta kısa bir adaptasyon (lag) fazı gözlenirken sonrasında hızlı hücre bölünmesi ile log fazına geçildiği kaydedildi. Besin maddelerinin azalması ve metabolit birikimi ile birlikte büyüme durağan faza ulaştı ve son aşama olarak hücre yoğunluğunda azalma meydana geldi.



Şekil 4.1. *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)'in glikoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD_{660})

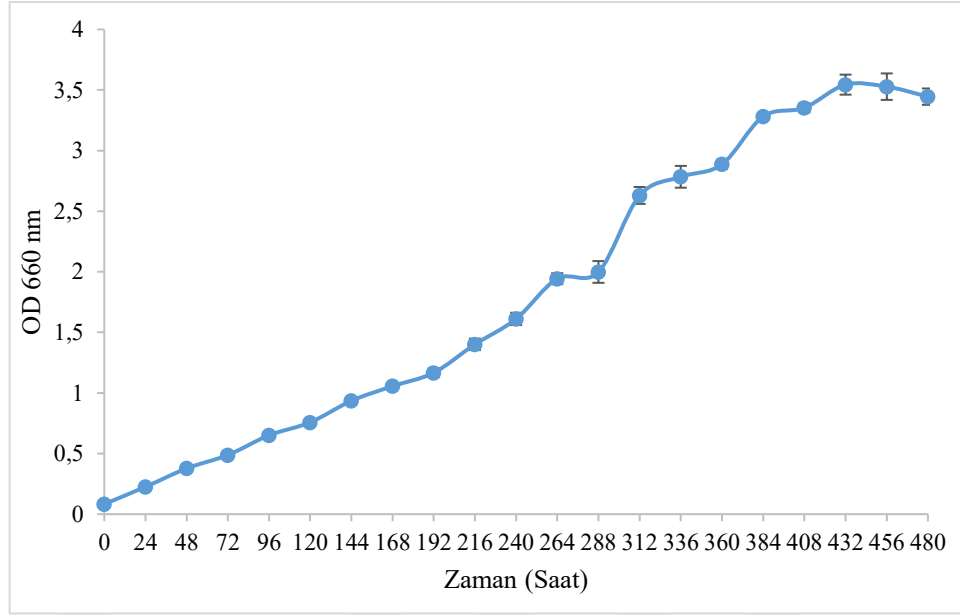
C. sphaeroides'in glikoz içeren besiyerinde büyüme eğrisinden yola çıkarak kısa süren bir lag fazından sonra yaklaşık 240.saate kadar bir logaritmik büyüme fazı ardından

karbon kaynağının tüketilmesiyle durağan faz ve hücre büyümesinin azalması ile birlikte ölüm fazının gözlemlendiği söylenebilir. Maksimum OD değeri 6,76 olarak 240.saatte kaydedildi.



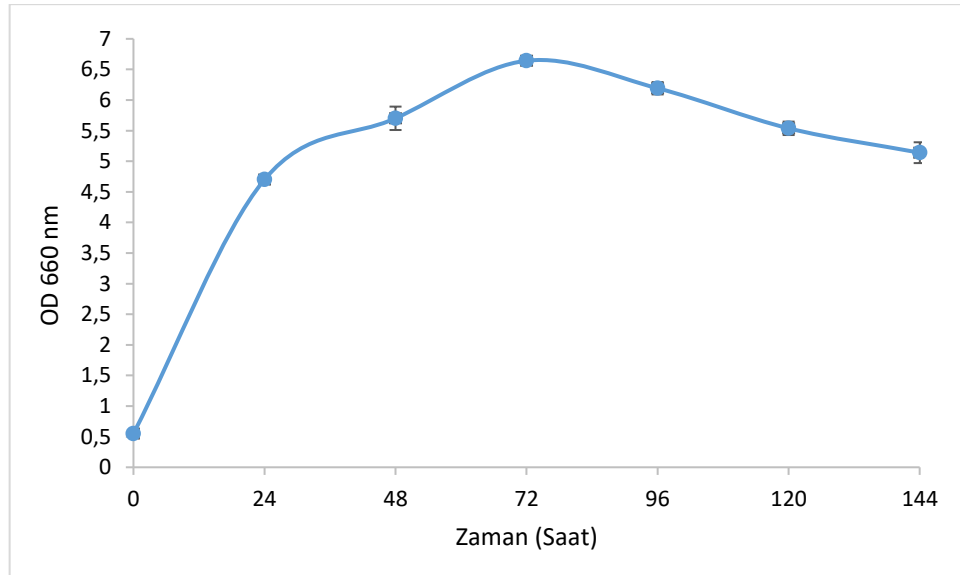
Şekil 4.2. *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)'in fruktoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD₆₆₀)

Büyüme eğrisinin incelendiğinde fruktozun *C. sphaeroides* için verimli bir karbon kaynağı olmadığı düşünüldü. Lag ve log fazlarının ardından 120.saatten sonra gözlenen ve besinlerin sınırlı olduğu durağan fazda hücre yoğunluğunun sabitlendiği kaydedildi. Maksimum OD değeri 120.saatte yaklaşık 1,39 olarak belirlendi.



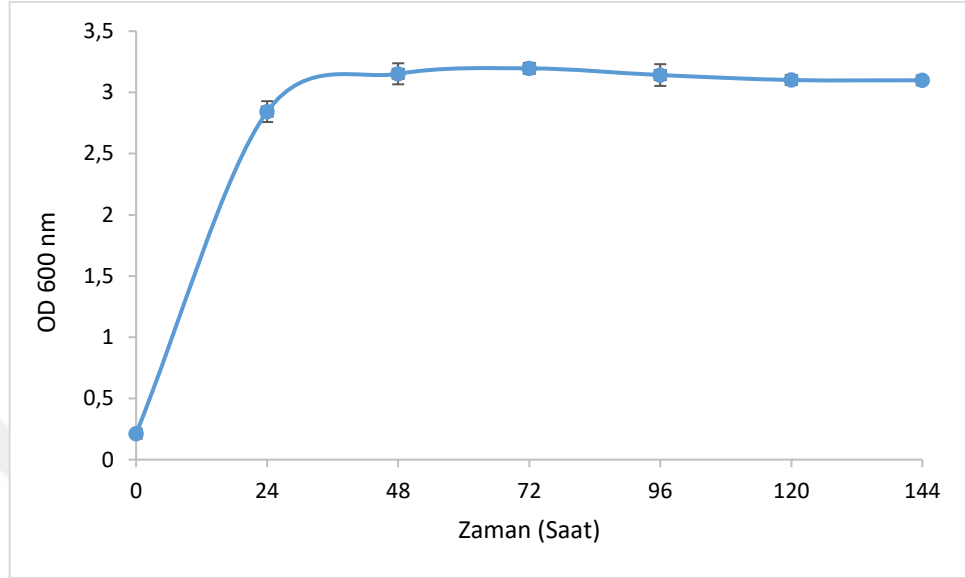
Şekil 4.3. *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)'in süktroz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD₆₆₀)

C. sphaeroides'in süktroz içeren besiyerinde büyüme eğrisi incelendiğinde uzun süren bir logaritmik fazdan sonra yaklaşık 456.saatte hücre büyümesinin yavaşlayıp düşüşe geçtiği kaydedildi. Büyüme eğrisinden yola çıkarak, *C. sphaeroides*'in süktrozu substrat olarak kullanırken yavaş bir büyüme profili sergilediği ve bu durumun karbon metabolizmasından kaynaklı olabileceği söylenebilir.



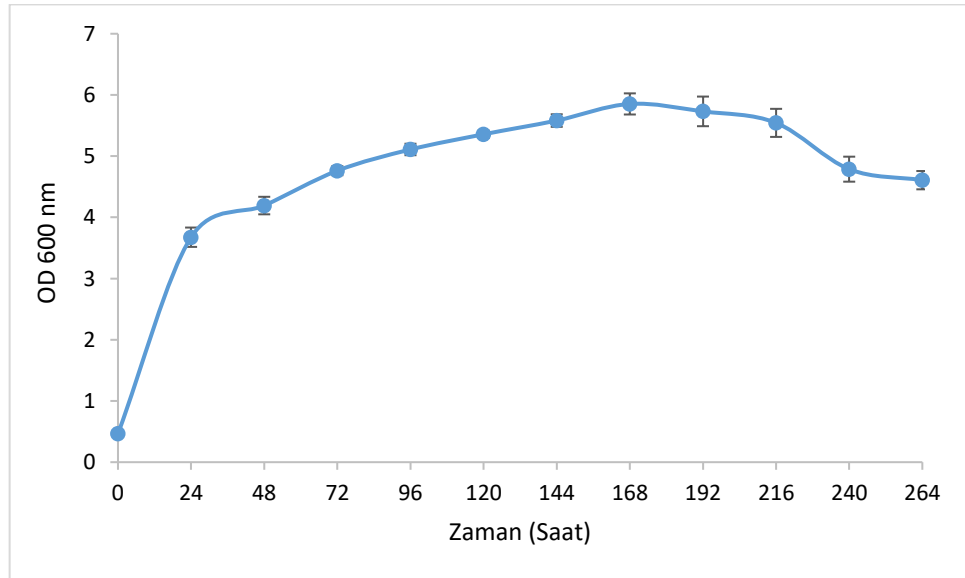
Şekil 4.4. *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)'in asetat içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD₆₆₀)

C. sphaeroides 'in asetatta yüksek hücre büyümesi beraberinde yüksek PHB içeriğini de getirdi. Kısa bir lag fazından sonra, hızlıca log fazına geçiş olduğu kaydedildi ve 72.saatten sonra hücre büyümesinde düşme ile beraber ölüm fazına geçiş gözlemlendi.



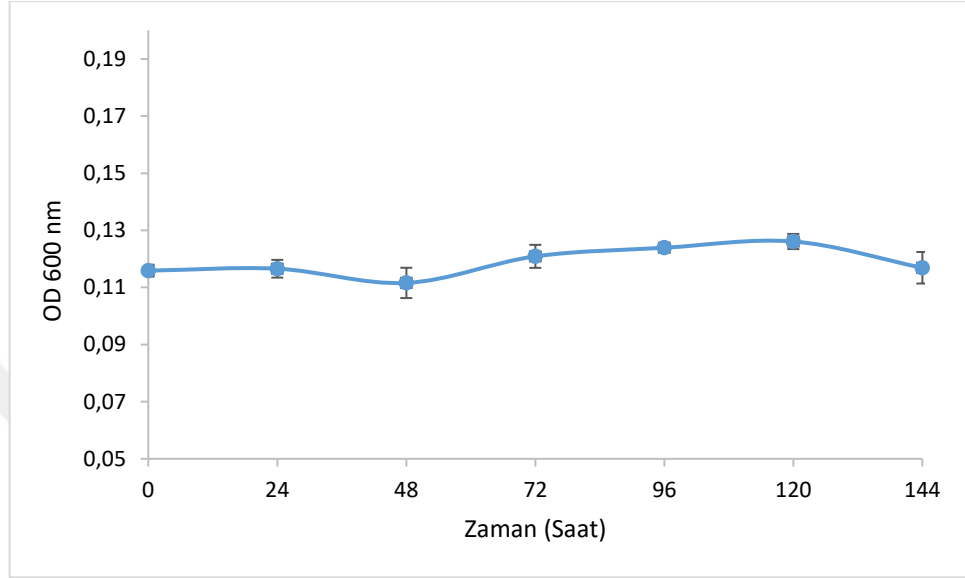
Şekil 4.5. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın glikoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD₆₀₀)

C. necator glikoz besiyerinde karbon kaynağını hızlıca kullanıp eksponansiyel faza geçti ve 48.saatten sonra yine hızlı bir durağan faza geçiş eğrisi gösterdi. Maksimum OD 48.saatte 3,15 olarak kaydedildi.



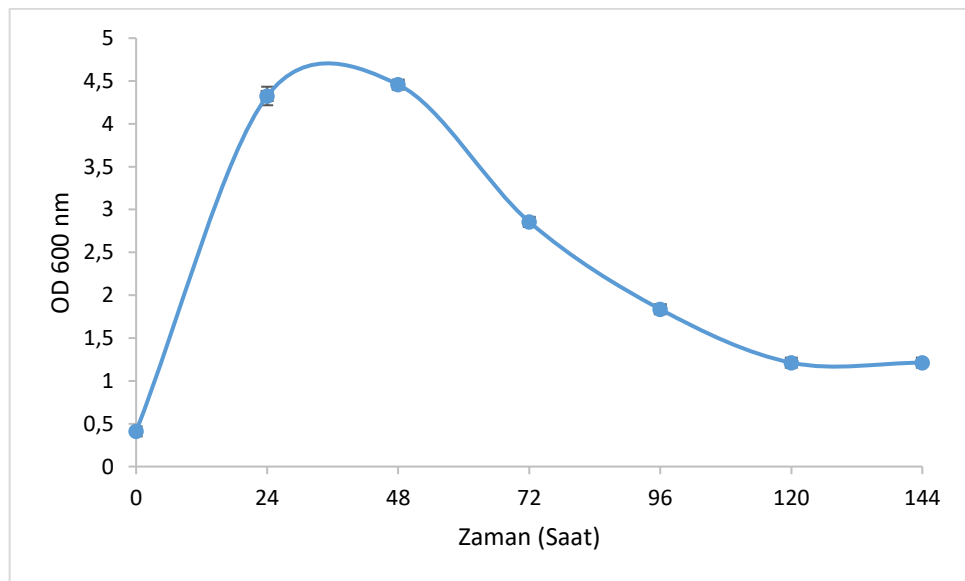
Şekil 4.6. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın fruktoz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD₆₀₀)

C. necator fruktoz içeren besiyerinde hızlı adaptasyon sebebiyle ilk 24 saatte iyi bir büyüme gösterdi ve logaritmik faz böyle devam etti. Maksimum OD 168.saatte yaklaşık 5,85 olarak kaydedildi ve ardından hücre yoğunluğu azalmaya başladı ve düşüş meydana geldi.



Şekil 4.7. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın sükroz içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD₆₀₀)

C. necator sükrozu metabolize edemediği için, sükroz karbon kaynağı olarak kullanıldığında kültürde büyüme gözlenmedi. Bu durum *C. necator*'un sükroz içeren besiyerinde büyüme eğrisinin incelenmesi ile doğrulandı.



Şekil 4.8. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın asetat içeren besiyerinde büyüme eğrisi (OD₆₀₀)

C. necator'un asetat içeren besiyerinde büyüme eğrisi incelendiğinde, OD değerinde hızlı bir artış gözlemlendi bu durum bakterinin karbon kaynağını aktif tükettiği ve biyokütle artışının maksimum seviyeye ulaştığı eksponansiyel büyüme fazına girdiğini göstermektedir. 48. Saatte maksimum OD yaklaşık 4, 45 olarak kaydedilirken ardından hücre büyümesinde düşüşle birlikte ölüm fazına geçiş olduğu görüldü.

C. sphaeroides'in glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat besiyerlerindeki OD değerleri oluşturulan grafiğe göre yorumlandığında en fazla OD değerine glikoz ortamında ulaşıldığı gözlemlendi. Glikozun ardından büyümenin en çok olduğu ortam asetattır. En düşük OD değerlerinin ulaşıldığı koşul ise fruktoz besiyerinde kültürlenen ortamdır. Glikoz ortamında 240.saatte maksimum OD değeri 6,7 olarak gözlemlendi. Asetat besiyerinde ise 72.saatte maksimum OD değeri 6,60 olarak ölçülmüştür. Fruktoz besiyerinde en yüksek OD olan 1,4 değerine 120.saatte ulaştı. Bakteri sükroz ortamında yavaş büyümüş ve ancak 432.saatte OD= 3,50' ye ulaştı. *C. necator*'un dört farklı besiyerinde maksimum OD değeri fruktoz ortamında 168.saatte 5,85 olarak kaydedildi. Fruktozdan sonra en fazla büyümenin olduğu besiyeri 48.saatte OD değeri 4,45 olan asetattır. *C. necator* sükroz besiyerinin hiçbir konsantrasyonunda büyümedi ve OD değeri 0,12 olarak kaydedildi ve bununla birlikte en az büyüme 3,14 OD değeri ile glikoz ortamında oldu. *C. sphaeroides* ve *C. necator* 'un dört farklı besiyerinde kültüre edilmesi ile elde edilen OD değerleri arasında karşılaştırma yapıldığında maksimum OD değeri *C. sphaeroides*'in glikoz (OD=6,76), ardından yine *C. sphaeroides* asetat (OD=6,64) sonrasında da *C. necator* fruktoz (OD=5,85) besiyeri olarak kaydedildi.

C. sphaeroides 'in asetatta yüksek PHB içeriği aynı zamanda en yüksek hücre büyümesini de beraberinde getirdi ve diğer substratlara göre bir avantaj gösterdi. Asetatın PHB oluşumunda öncü bileşik olan asetil-CoA' ya kolayca dönüştürülmesi daha yüksek verimde PHB üretmesinin bir sebebi olarak görüldü.

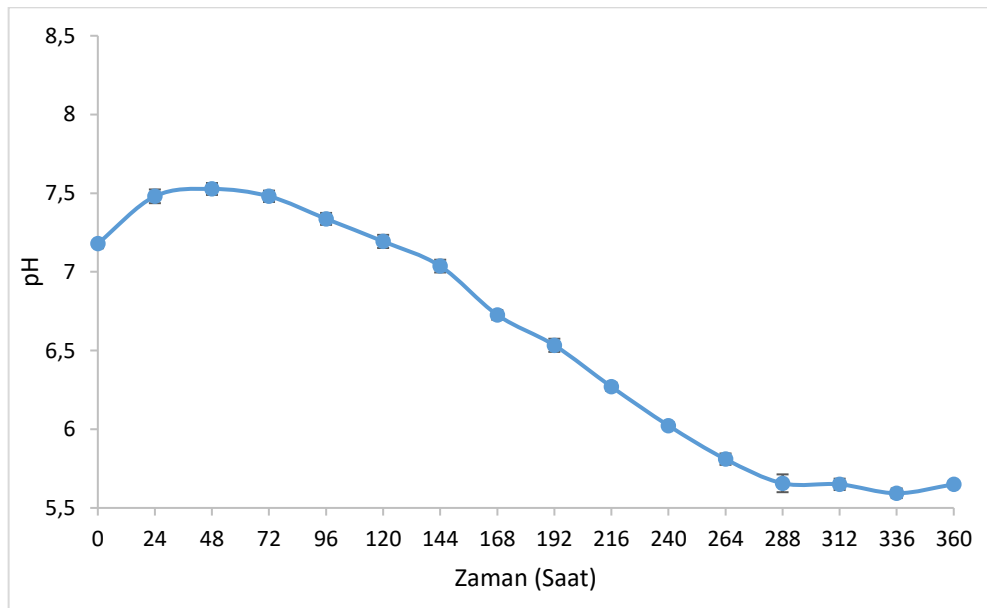
PNSB kültürleri kullanılarak PHB üretimi için, şeker bakımından zengin substratlar H₂ üretimini teşvik ettikleri için önerilmemektedir (Monroy ve Buitrón, 2020). Hücre büyümesi, PHA birikimi ve bileşimi, karbon ve azot kaynağı konsantrasyonlarından etkilenir (Monroy ve Buitrón, 2020).

Bakteriler geç logaritmik fazda PHB granüllerini biriktirmektedir. Büyüme grafikleri dikkate alınarak bakterilerin farklı karbon kaynaklarında geç logaritmik faza geçiş saatleri belirlendi. SBB, Nile red ve ekstraksiyon işlemleri belirlenen bu saatlere göre yapıldı. *C.*

sphaeroides 'in glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat besiyerlerindeki belirlenen saatleri sırasıyla 192, 36, 320 ve 48 iken *C. necator*'un glikoz, fruktoz ve asetat besiyerlerinde belirlenen saatleri 22, 126 ve 18 olmuştur.

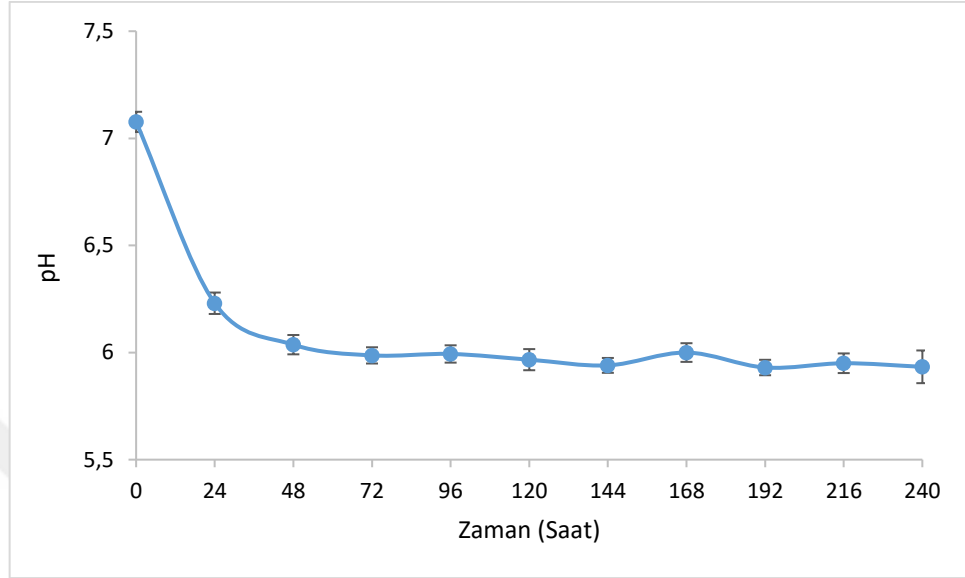
4.1.3. pH analizleri

PNSB kültürleri için 6,8 pH değeri tavsiye edildiği için *C. sphaeroides* için kültür ortamlarının başlangıç pH değeri 6,8'e ayarlandı. *C. necator* için kültür başlangıç pH'ı 7,0'ye ayarlandı. Kültür ortamının pH'ı 24 saate 2 mL örnek alınarak pH metre ile takip edildi. Ayarlanmış olan pH'ta değişimler meydana geldi ve bu farklılıklar kaydedildi. Anlamlı sonuçlar elde etmek için deneyler 3 tekrarlı yapıldı. Şekil 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12'de *C. sphaeroides* 'in Şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16'da ise *C. necator*' un sırasıyla glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat besiyerlerinde kültür süresince pH değişimleri yer almaktadır. Grafiklere hata çubukları eklendi. Grafiklerde, inkübasyon boyunca ortam pH'ında zamana bağlı değişim gösterildi. Başlangıçta nötr veya hafif alkali olan pH değerleri, mikroorganizmaların metabolik aktiviteleri sonucu değişti. İlerleyen aşamalarda, substrat tüketimi ve metabolik dengenin değişmesiyle pH değerinde kısmi stabilizasyon veya sınırlı artış meydana gelebilmektedir. Bu değişimler, hücresel büyüme dinamikleri ve karbon kaynağı metabolizması ile doğrudan ilişkilidir.



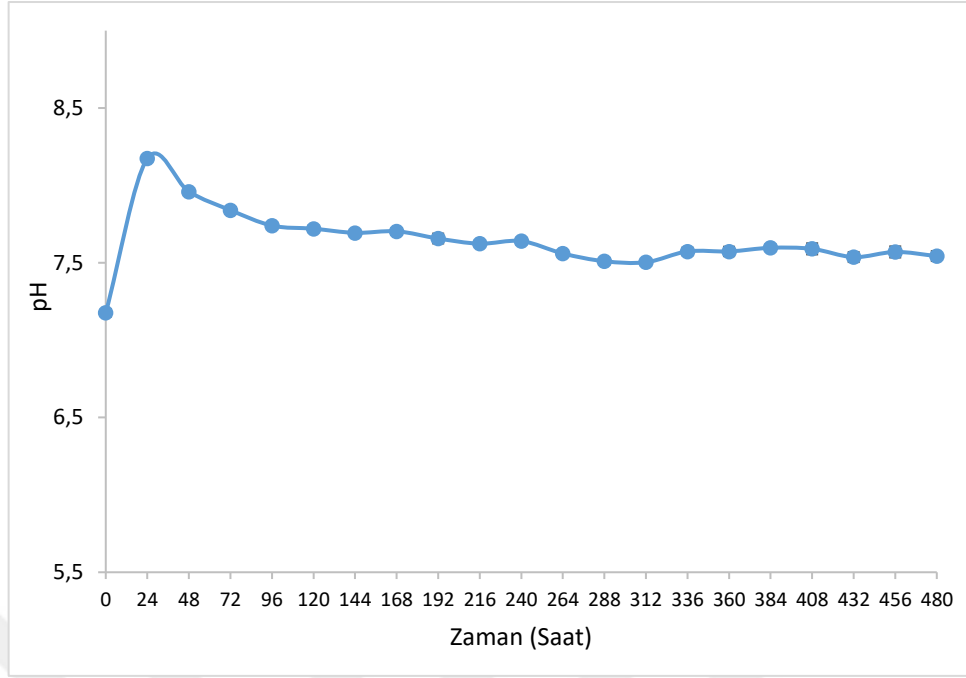
Şekil 4.9. *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)'in glikoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi

C. sphaeroides'in başlangıç pH'ı hafif alkali olan glikoz içeren besiyerinde, takip edilen pH kültür süresince farklılık gösterdi ve 48.saatte maksimum değerine ulaşp ilerleyen aşamalarda substrat tüketimine bağlı olarak kademeli düşüş kaydedildi.



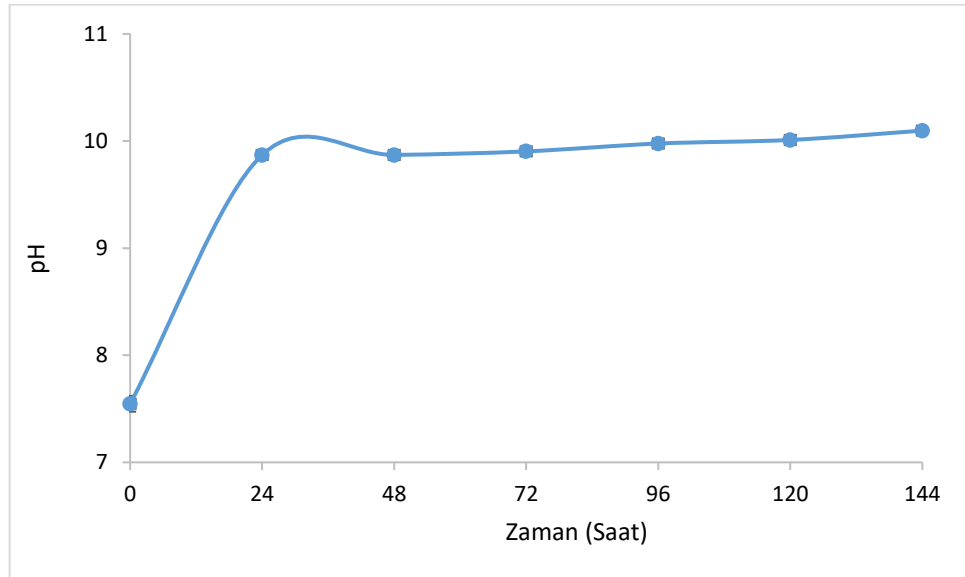
Şekil 4.10. *C. sphaeroides* O.U.001(DSM 5864)'in fruktoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi

Hafif alkali bir başlangıç pH'ına sahip *C. sphaeroides*'in fruktoz içeren besiyerinde pH'ta 24.saatte hızlı bir düşüş gözlemlendi ve devamındaki fazlarda bu değer düşmeye devam edip bir süre sonra pH yaklaşık 5,95'te sabitlendi.



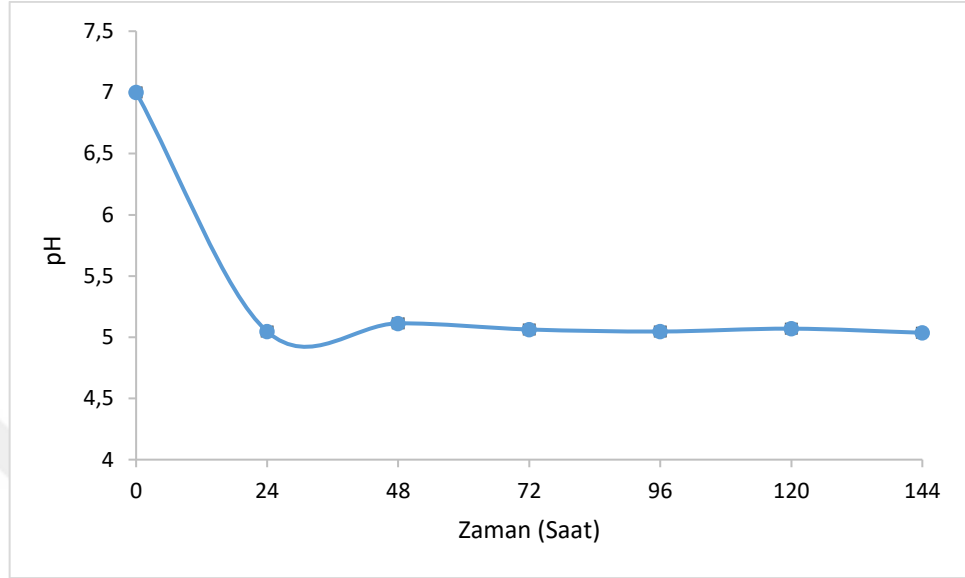
Şekil 4.11. *C. sphaeroides* O.U.001(DSM 5864)'in süktroz içeren besiyerinde kültür süresince pH değışimi

C. sphaeroides 'in süktroz besiyerinde kültür süresince 24 saat inkübasyondan sonra pH yaklaşık 7,5'te sabit kalıp ölüm fazına kadar yaklaşık bu değerde kaydedildi.



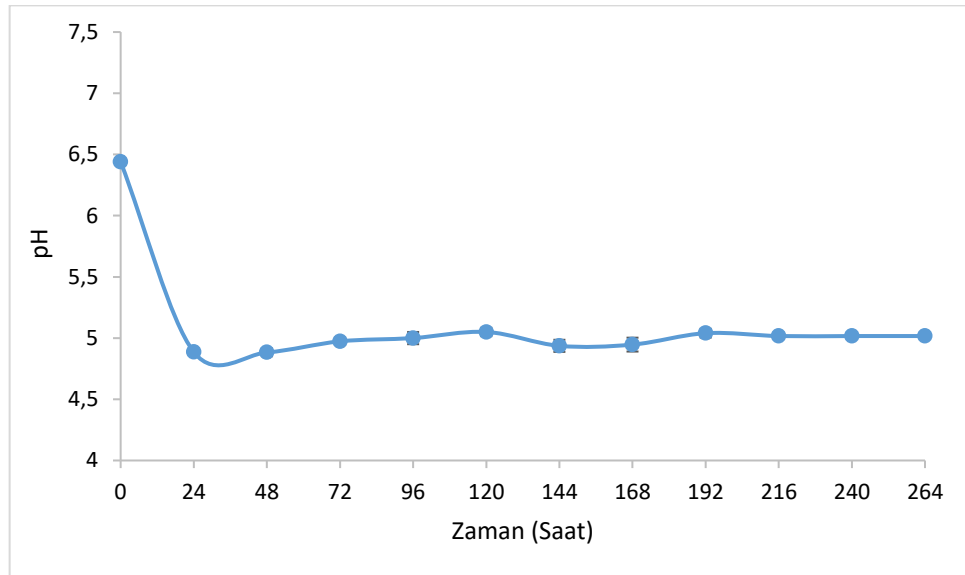
Şekil 4.12. *C. sphaeroides* O.U.001(DSM 5864)'in asetat içeren besiyerinde kültür süresince pH değışimi

Başlangıç pH'ı 7,0 olarak ayarlanan asetat ortamında pH aralığının 9,87'ye yükseldiği kaydedildi. Bu durum asetat besiyerinde daha önce karşılaşılan sonuçlara benzerdir. pH 'ta ki artışla doğru orantılı olarak PHB miktarının da arttığı söylenebilir.



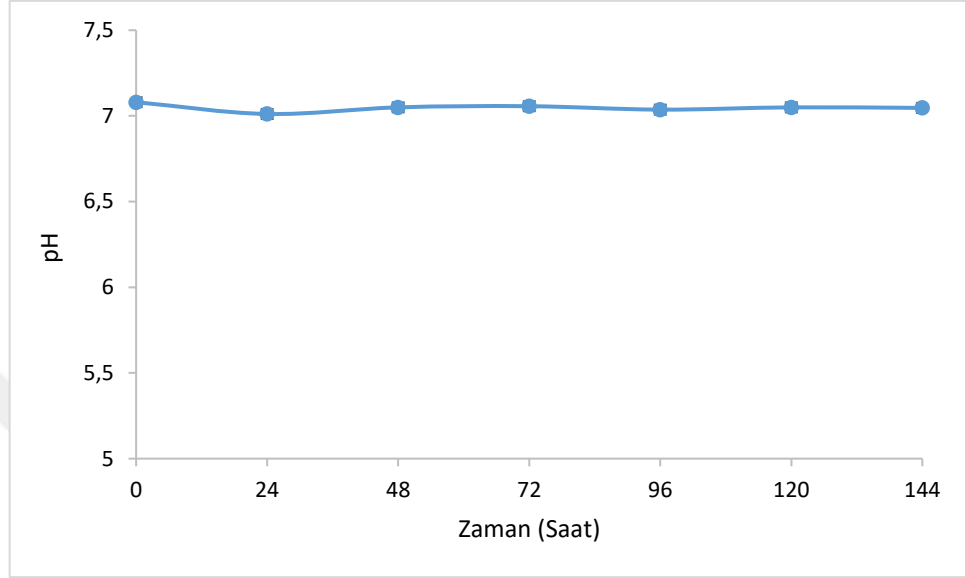
Şekil 4.13. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın glikoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi

Başlangıç pH'ı 7,0 olarak ayarlanan glikoz ortamında 24.saat ile birlikte pH'ta ciddi düşüş yaşandı ve ölüm fazına kadar yaklaşık 5'te sabitlendi.



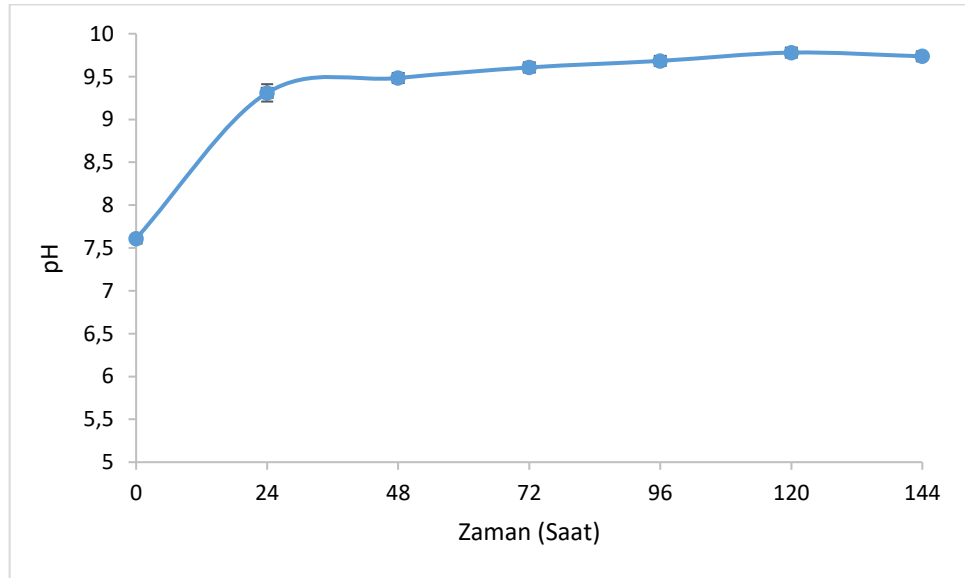
Şekil 4.14. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın fruktoz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi

Başlangıç pH'ı 6,5 olan kültürde 24.saatte maksimum düşüş yaşandı ve pH 4,88 olarak kaydedildi. Yine kültür süresince pH değişimi ortalama 5 değerinde oldu. Glikoz ve fruktoz substratlarında kültür süresince pH'taki düşüş ile OD değerindeki yükselişin birbiri ile bağlantılı ve uyumlu olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.15. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın sükroz içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi

C. necator sükrozu substrat olarak kullanamaz. Bu yüzden başlangıç pH'ı kültür süresince sabit ve aynıydı, beklendiği üzere herhangi bir değişim kaydedilmedi.



Şekil 4.16. *C. necator* H16 (DSM 428) 'nın asetat içeren besiyerinde kültür süresince pH değişimi

C. necator'un asetat içeren besiyerinde başlangıç pH'ı 7,5 iken kültür süresince bu değer yaklaşık 9,8'e yükseldi. pH'taki bu artış OD değişimi ile de uyumludur.

Grafiklerden yola çıkarak gözlemlenen sonuçlara göre tüm koşullarda pH= 7.0 – 7.5 aralığında değişmekle birlikte benzer başlangıç pH değerlerine sahiptir. *C. sphaeroides* asetat besiyerinde en yüksek pH değerine (pH=10) ulaştı. Asetat besiyerinde bakterinin büyümesi ile doğru orantılı olarak pH değerinde de artma meydana geldi. Fruktoz ve glikoz besiyerlerinde ise pH değeri bakteri büyümesi ile azalmaya başladı. Glikoz ortamında kültürün ilk pH değeri 7.0' iken pH= 5.60 ölçülen son değer oldu. Fruktozlu ortamda ise ölçülen son pH değeri 5,90'dır. Sükroz besiyerinde kültürün pH değerleri bakteri büyümesi süresince 7,17- 7,54 değerleri arasında değişti. *C. necator* asetat besiyerinde tüm koşullar arasında en yüksek pH değeri olan 9,78'e ulaştığı kaydedildi. Sükroz besiyerinde başlangıç pH değeri büyüme gerçekleşmediği için sabit kaldı. *C. necator* glikoz ve fruktoz besiyerleri için başlangıç pH değerleri 6,50 ve 7 iken inkübasyon boyunca bu değerler pH=5'e düştü ve en düşük pH değerleri olarak kaydedildi.

Yapılan bir araştırmada, *C. necator* 'un büyüme potansiyeli için fruktoz karbon kaynağı olarak kullanılmış 7,0'lık bir başlangıç pH değerine karşı kültür sonunda ölçülmüş olan pH değeri 5,26 olarak ölçülmüştür (Khanna ve Srivastava, 2005). Kontrolsüz pH koşullarının karbon kaynaklarının tam tüketilememesine sebep olabileceği ve bu olumsuz büyüme koşullarının da büyümeyi azalttığı ve besin tüketimini durdurduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda pH değerindeki bu düşüşün de ortamda azot kaynağı olarak kullanılan amonyum sülfatın amonyum iyonları tüketildiğinde H₂SO₄ oluşumundan kaynaklanıyor olabileceği not edilmiştir (Khanna ve Srivastava, 2005). *C. necator* ve *C. sphaeroides* farklı karbon kaynaklarında pH değerleri açısından karşılaştırıldığında iki bakterinin glikoz ve fruktoz besiyerlerinde pH değerlerinde azalma gözlemlendi (pH= 5-6). Asetat her iki bakterinin de maksimum pH değerine ulaşılan besiyeri oldu. Asetat ortamında OD değeri arttıkça pH değeri de arttı. Ancak glikoz ve fruktoz ortamında OD değeri arttıkça pH değerlerinde düşüş yaşandı. Sükroz ortamında ise *C. sphaeroides* için OD artışıyla birlikte pH değerinde yavaş bir artış gözlemlendi.

Ortam pH'ı mikrobiyal büyümeyi ve PHA birikimini etkiler. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda *C. sphaeroides* asetat ortamında pH'ın yükseldiği bildirilmiştir. Kim ve ark., yaptığı çalışma ile *C. sphaeroides* 'te yüksek pH ile yüksek PHB seviyeleri arasında doğrudan bir ilişki olduğu doğrulanmıştır. Başlangıç pH'ı 7,0 olarak ayarlanmış

olan asetat ortamında pH aralığının 9,2-10,3'e yükseldiği kaydedilmiştir. Asetat karbon kaynağı olarak kullanıldığında kültürleme süresinde 9,0'ın üzerindeki bu yükselmenin PHB birikimini kolaylaştırabileceği bildirilmiştir (Kim vd., 2012). pH 5,4'ün altına düştüğünde *C. necator*'un büyümesinin engellendiğini bildiren çalışmalar vardır. Başlangıç pH'ının 6,5 olduğu deneylerde son pH yaklaşık 4'e düşmüştür. Bu durum düşük biyokütle üretimi, bakteri büyümesi ve PHB birikimine yol açmıştır (Aramvash, Akbari Shahabi, vd., 2015; Nygaard vd., 2019). Karbon kaynağı olarak glikoz kullanıldığında kültürün başlangıç pH'ı 7,0 iken, ölçülen son pH değerinin 5,5'e düştüğü kaydedilmiş ve pH'taki bu düşüşün glikozun eksik tüketimine yol açtığı düşünülmüştür (Liu vd., 2014).

4.2. PHB Granüllerinin Görüntülenmesi

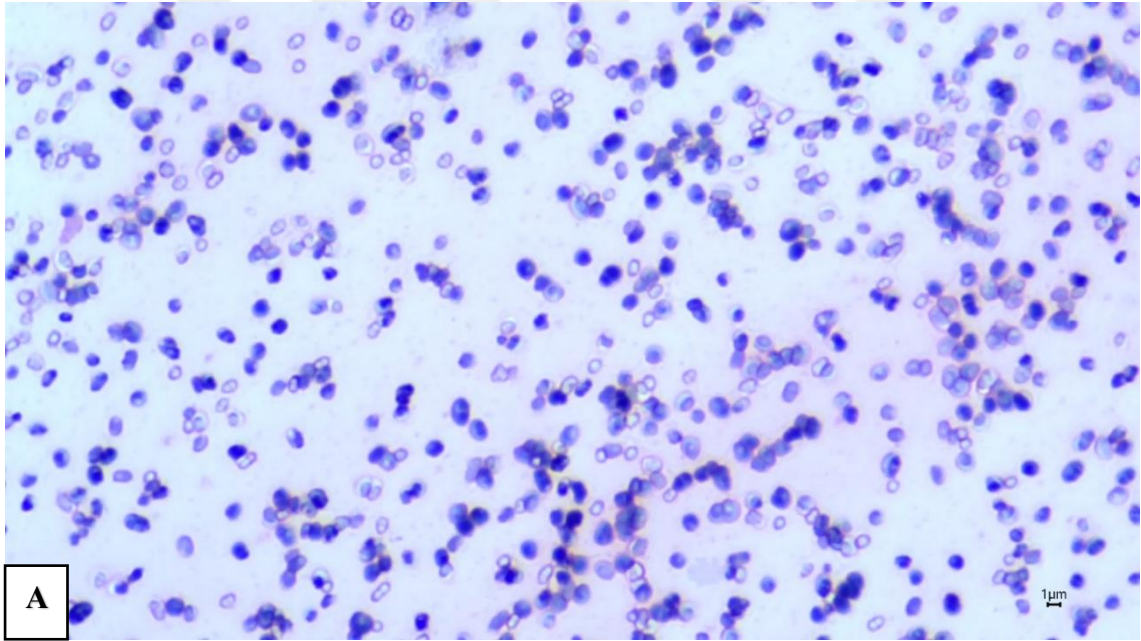
PHB üretimi gerçekleştiren mikroorganizmalarda oluşan granüllerin hücre içi lokalizasyonu ve morfolojisi, Nile Red ve SBB yöntemleri ile mikroskopik olarak analiz edildi.

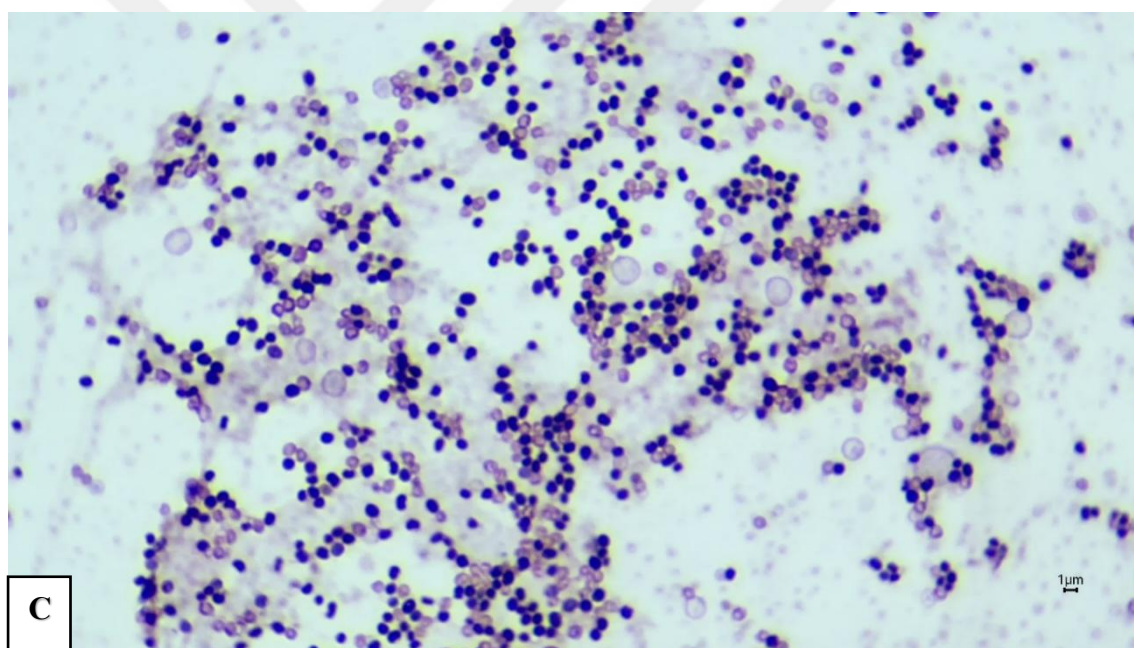
4.2.1. Sudan Black B ile görüntüleme

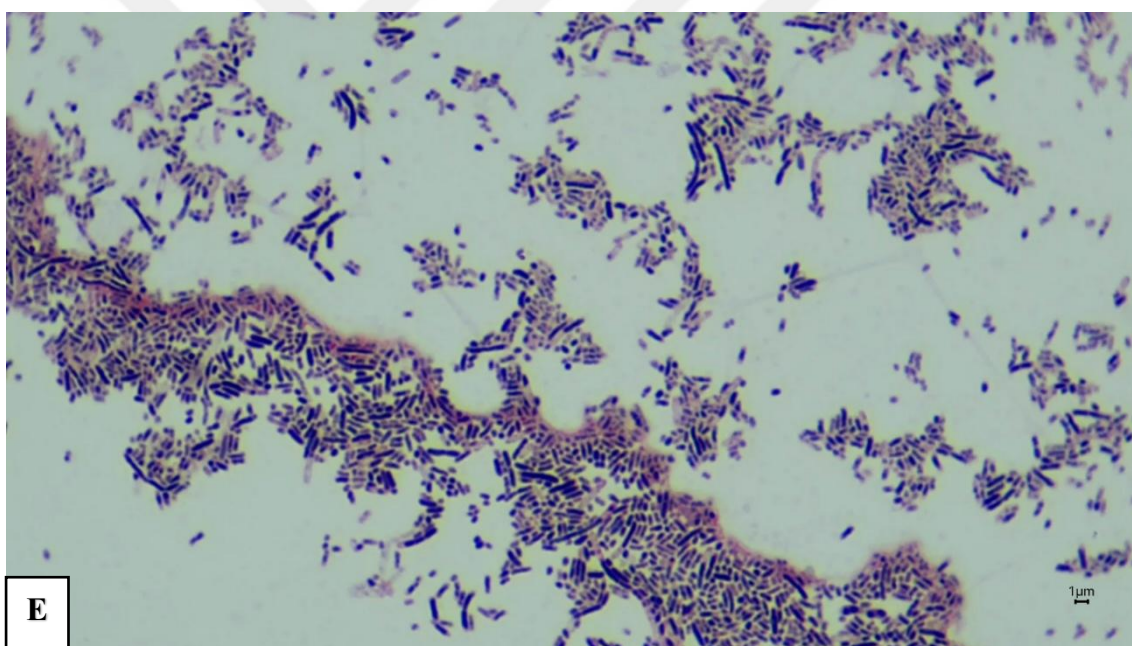
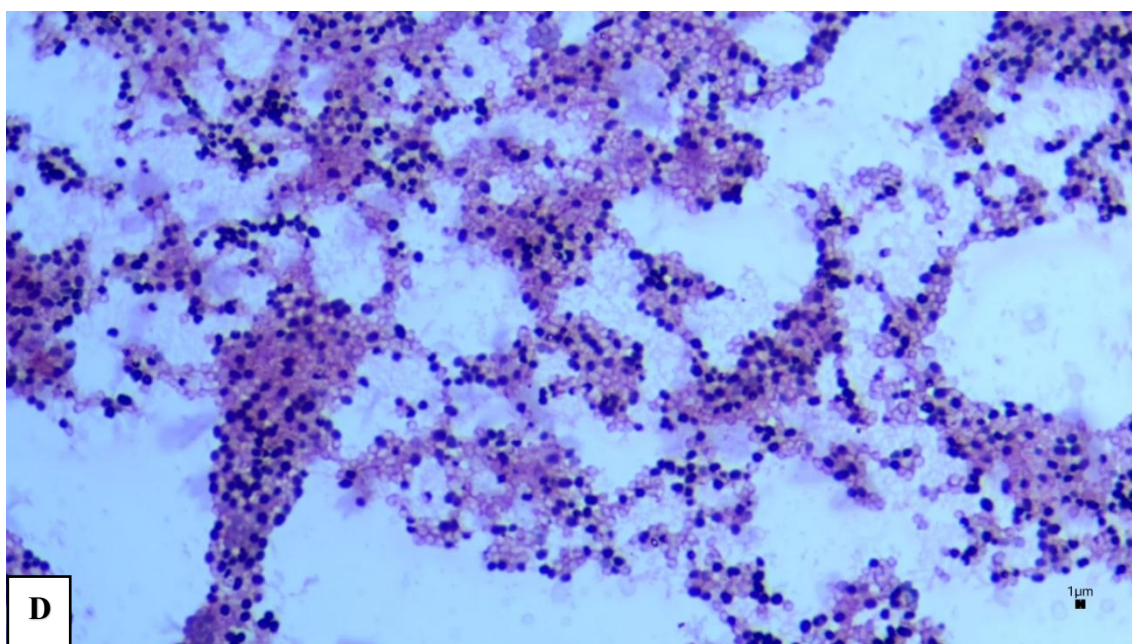
Lipofilik boyalar ile canlı bakteri hücresinde PHB granüllerini tespit etmek için en sık kullanılan yöntemlerden biridir. PHB içeren bakterileri SBB ile boyadıktan sonra koyu renkli granüller görmek mümkün olmaktadır. Maksimum PHB üretiminin olduğu saatlerde SBB ile bakteriler boyandı. PHB biriktiren kolonilerde granüller siyah-mavimsi görünüyorken, PHB biriktirmeyen koloniler beyaz görünmektedir (Thammasittirong vd., 2017). Farklı koşullarda büyütülen iki bakteri SBB ile boyandı ve PHB üretimi doğrulandı.

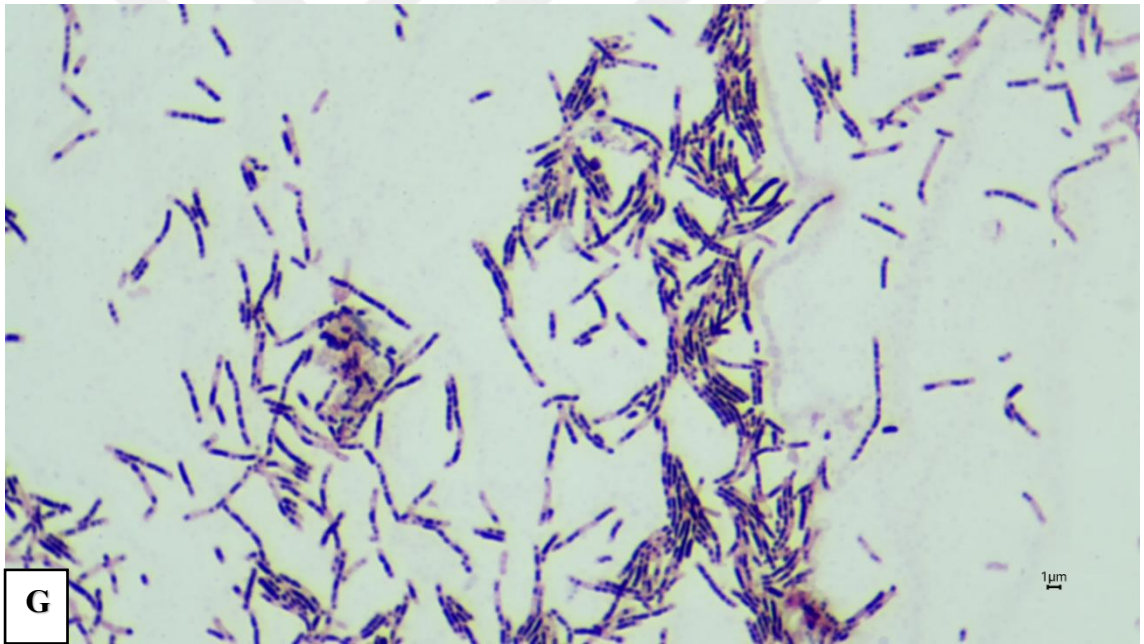
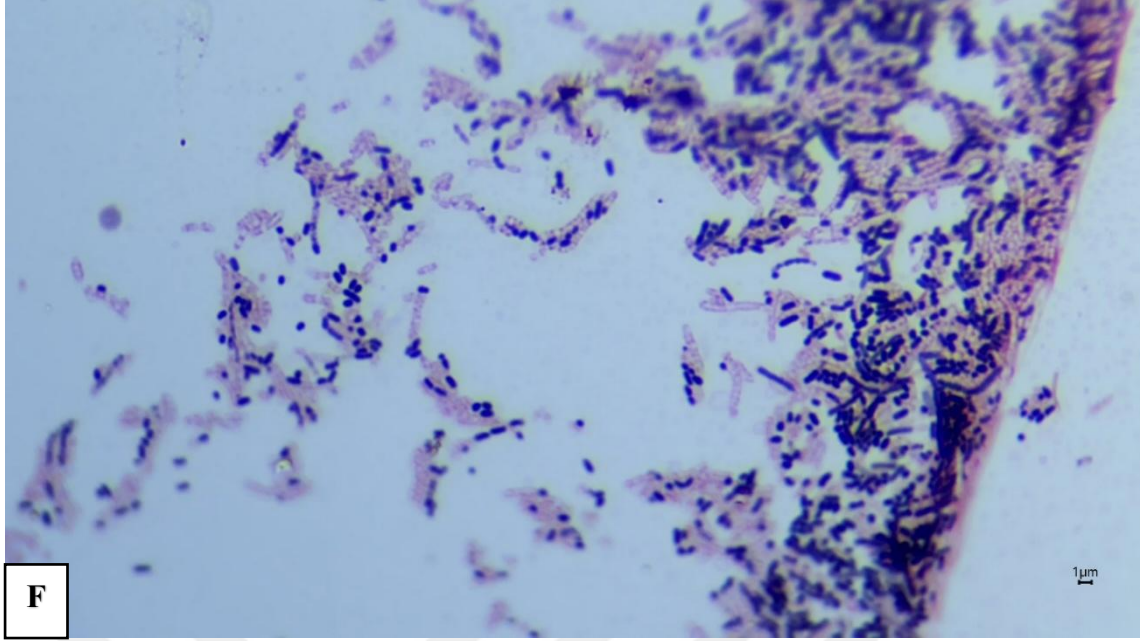
SBB boyaması sonucunda hücre içerisinde koyu mavi-siyah renkte granüller net bir şekilde gözlemlendi. Bu durum hücre içi PHB birikimini temsil eder. Şekil 4,17'de, SBB boyama sonucu *C. sphaeroides* hücrelerinin ağırlıklı olarak yuvarlak/oval morfolojide olduğu, buna karşılık *C. necator* hücrelerinin çubuk formunda bulunarak yer yer zincirimsi dizilimler oluşturduğu belirlendi. Farklı karbon kaynaklarında elde edilen örnekler karşılaştırıldığında, *C. sphaeroides* asetat ortamında daha yoğun ve belirgin granül oluşumu gözlemlenmiş olup, bu durum daha yüksek PHB birikimine işaret etmektedir.

C. necator'da tüm karbon kaynaklarında gözlenen belirgin granül boyanması, bu mikroorganizmanın farklı karbon kaynakları altında da etkin bir şekilde PHB biriktirebildiğini gösterdi. Gözlenen granül yoğunluğu ve dağılımı, kültür koşullarının hücre içi PHB birikimi üzerinde belirleyici bir etkiye sahip olduğunu gösterir. Elde edilen belirgin boyama sonuçları kullanılan yöntemin PHB granüllerinin tespitinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışmada *C. sphaeroides* ve *C. necator* için farklı karbon kaynakları altında elde edilen sonuçlar, Nile Red ve SBB boyama yöntemleri arasında genel olarak uyum gösterdi. Nile red ve SBB görüntülerinde PHB granüllerinin dağılımı ve yoğunluğu karbon kaynağına bağlı olarak benzer eğilimler sergiledi. Ayrıca şekil analizlerinde de karbon kaynağına bağlı olarak granül yoğunluğu ve hücre içi lokalizasyon açısından benzer sonuçlar elde edilmesi, kullanılan yöntemlerin PHB tespiti açısından güvenilir ve birbiriyle tutarlı olduğunu göstermektedir. Şekil 4.17'de *C. sphaeroides*'in glikoz (A), fruktoz (B), süktroz (C) ve asetat (D), *C. necator*'un ise glikoz (E), fruktoz (F) ve asetat (G) besiyerlerinde ürettiği SBB ile boyanmış PHB granüllerinin 100X görüntüsü yer almaktadır.







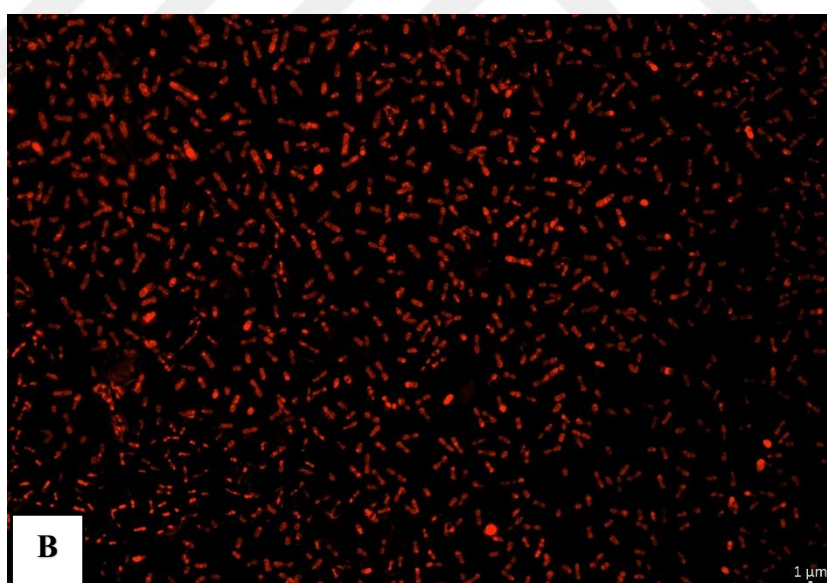
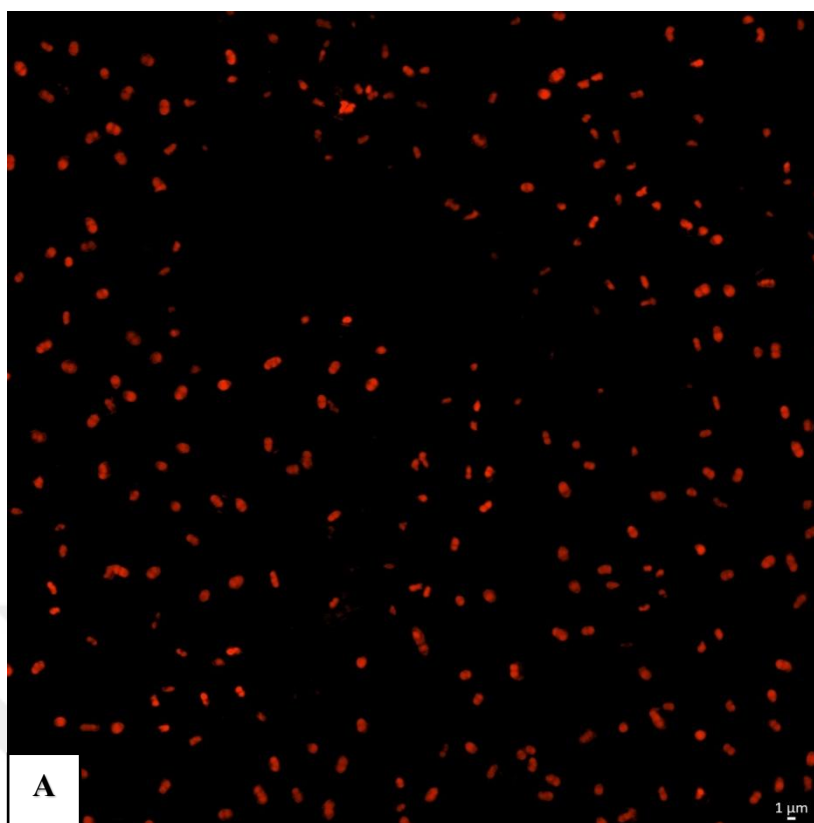


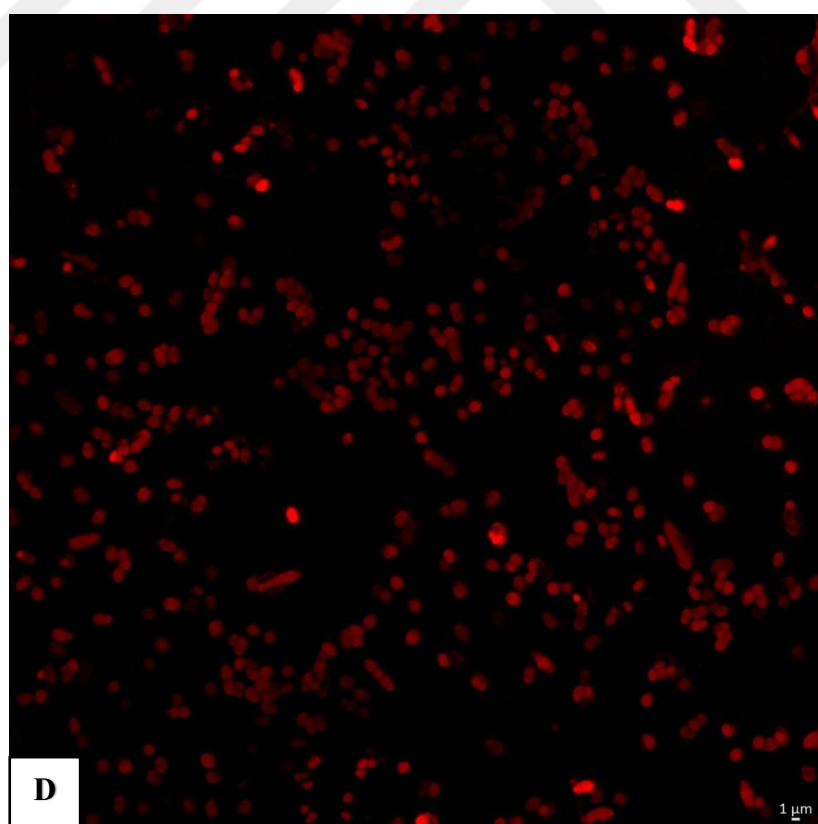
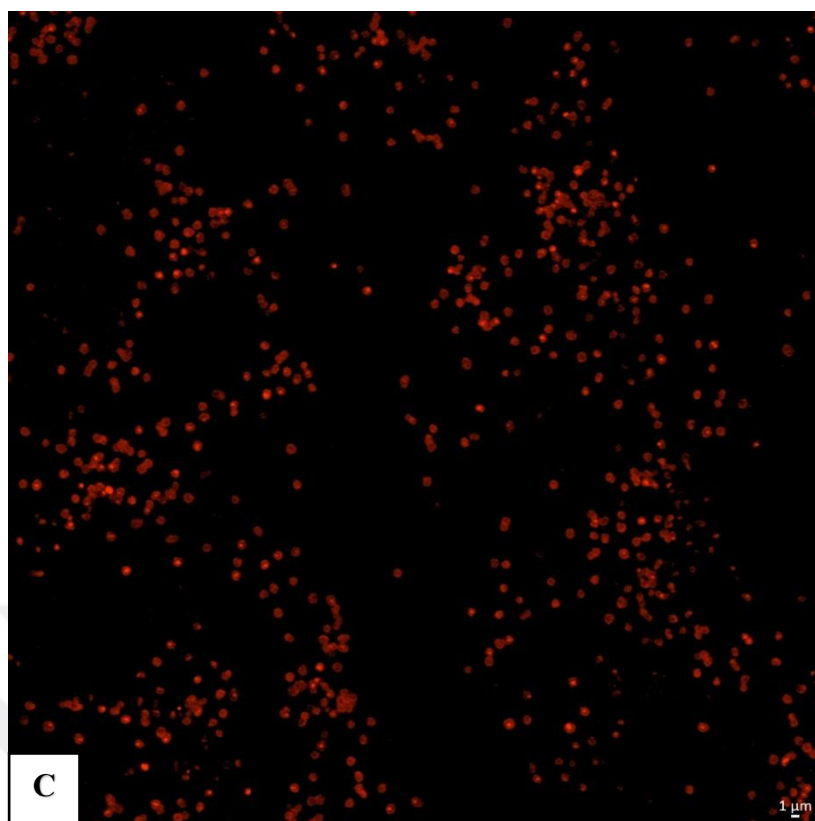
Şekil 4.17. Bakterilerden elde edilen ve Sudan Black B ile boyanan PHB granüllerinin 100X görüntüsü *C. sphaeroides* glikoz (A), fruktoz (B), sükroz (C) ve asetat (D) ve *C. necator* glikoz (E), fruktoz (F) asetat (G)

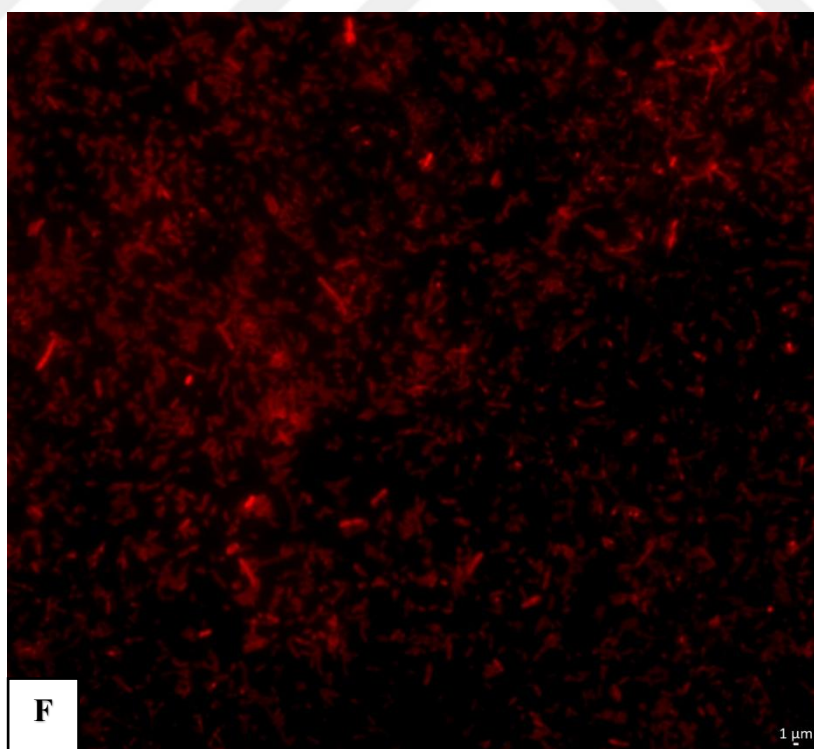
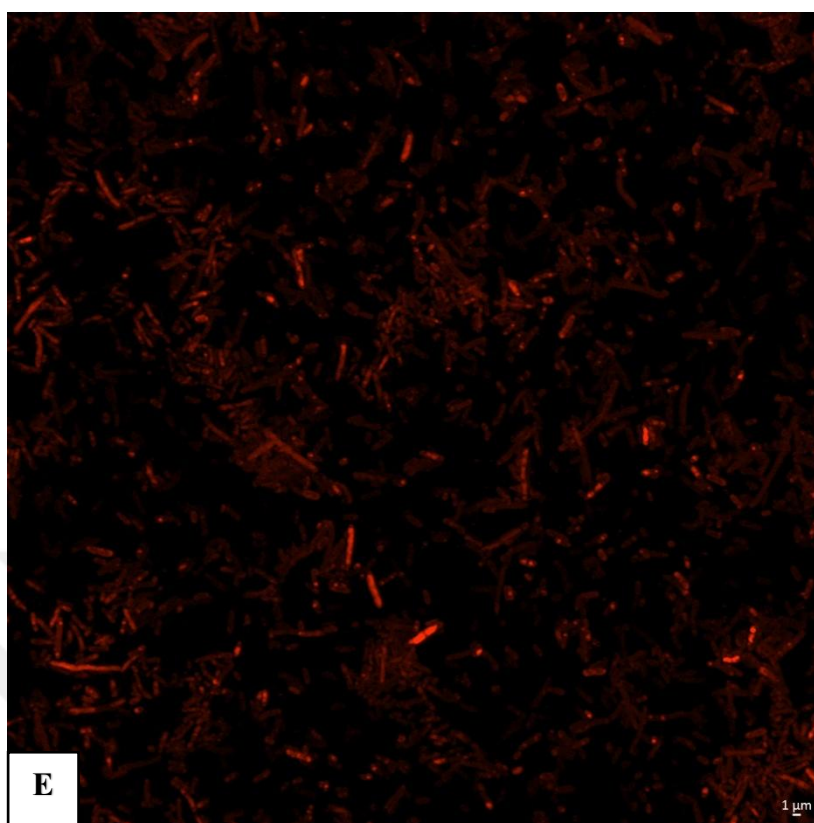
4.2.2. Nile Red ile görüntüleme

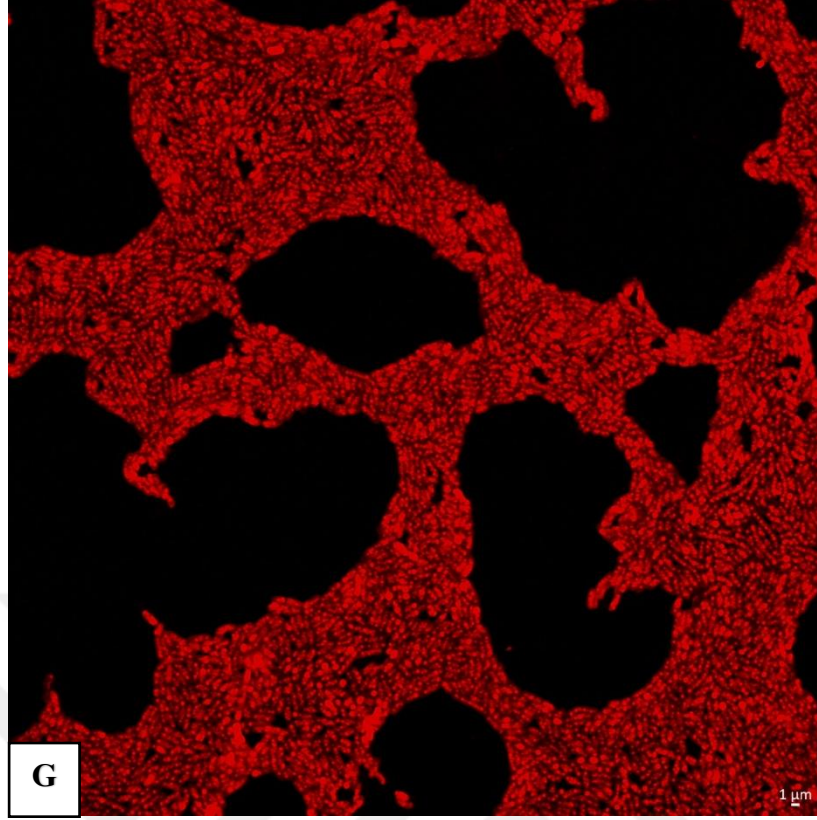
Nil Red, hücre içi PHB granüllerinin tespit edilmesinde kullanılan başka bir hızlı ve kolay tekniktir. Nil Red, lipitlere bağlanabilir, çeşitli organik çözücülerde çok çözünür ve güçlü bir floresans verir. Hücre içi granüller kırmızı renginde boyanır. Farklı karbon

kaynakları kullanılarak yetiştirilen *C. sphaeroides* ve *C. necator*'un Nile red ile boyanması sonrası konfokal mikroskopi görüntülerinde, floresans yoğunluğunun karbon kaynağına bağlı olarak değiştiği gözlemlendi. Boyanmış PHB granüllerinin floresan yoğunluğu ve PHB konsantrasyonu arasında iyi bir bağlantıya sahip olduğu ortaya konulmuştur (Cao vd., 2022; Jendrossek vd., 2007). *C. necator* fruktoz ortamında boyama sonucu yüksek floresans gözlemlenmiş olup bu durum artmış PHB birikimini göstermektedir. *C. sphaeroides* hücrelerinin daha çok oval/yuvarlak morfoloji sergilediği gözlemlenirken, *C. necator* hücrelerinin çubuk formunda olduğu ve yer yer kısa zincirler oluşturacak şekilde yan yana dizildiği belirlendi. Bu farklılık, türlere özgü morfolojik özelliklerden kaynaklanmakta olup, özellikle *C. necator*'un bölünme sonrası hücrelerinin tamamen ayrılmamasına bağlı olarak zincirimsi yapıların oluşabileceği düşünüldü. *C. necator*'un üç karbon kaynağında da zincir formunda uzamış hücreler gözlemlenirken *C. sphaeroides*'in dört karbon kaynağında boyama sonrası yuvarlak şekilde hücreler gözlemlendi. *C. sphaeroides* fruktoz ortamındayken hücre başına birden fazla granül birikimi varken, süktroz ortamında genellikle bir granül gözlemlendi. Asetat ve glikoz gibi bazı koşullarda hücre içinde tek bir noktada güçlü floresan görülmesi, aşırı PHB granülü üretiminin veya granüllerin hücre çevresine yakın lokalizasyonun bir sonucu olarak düşünüldü. *C. necator*'un da farklı karbon kaynaklarında hücre başına birden fazla granül biriktirdiği gözlemlendi. Granül sayısı ve dağılımındaki farklılıklar, karbon kaynağının hücre içi PHB metabolizması üzerinde belirleyici bir etkisi olduğunu göstermektedir. Tüm koşullar arasında hem hücresel yapı hem de PHB granüllerinin en iyi boyandığı ve görüntülendiği koşul *C. sphaeroides*'in fruktoz ortamında kültürü sonucu yapılan boyamada kaydedildi. Bu görüntüde (Şekil 4.18 B), hem hücrelerin belirgin şekilde görüntülendiği hem de PHB granüllerinin yüksek netlikte tespit edilebildiği gözlemlenmiştir; bu durum boyama ve görüntüleme koşullarının uygun olduğunu göstermektedir. Tüm koşullarda granül hücre ayrımının gözle görülememesinin bir sebebi de Nile red'in hem PHB granüllerine hem de hücre duvarı lipitlerine bağlanabilmesi olabilir. Şekil 4.18'de Nile Red ile boyanmış olan farklı karbon kaynaklarında büyütülmüş bakterilerin PHB granülleri yer almaktadır. Görüntüler *C. sphaeroides*'in glikoz (A), fruktoz (B), süktroz (C) ve asetat (D), *C. necator*'un glikoz (E), fruktoz (F) ve asetat (G) besiyerlerinde ürettiği Nile Red ile boyanmış PHB granüllerinin 63 X görüntüsü (Şekil 4.18) şeklinde bir sıralama ile verildi.









Şekil 4.18. Bakterilerden elde edilen ve Nil red ile boyanan PHB granüllerinin 63 X görüntüsü *C. sphaeroides* glikoz (A), fruktoz (B), süktroz (C) ve asetat (D) ve *C. necator* glikoz (E), fruktoz (F) asetat (G)

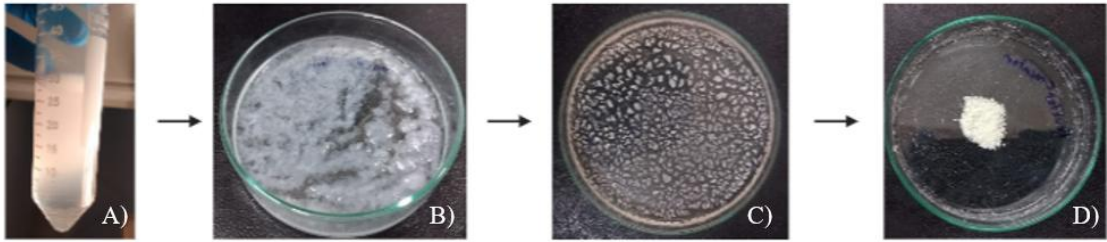
PHB granülleri bazı hücrelerde hücre kutuplarına yakın, çoğunlukla sitoplazmik membranda ya da yakınında, bir kısmı ise sitoplazmada lokalize olabilmektedir. PHB granüllerinin lokalizasyonu tür ve büyüme koşullarına bağlı olarak hücre içerisinde farklı bölgelerde yoğunlaşabilmektedir. PHB granüllerinin boyutu, mikroorganizma türüne ve hücresel metabolik durum ve büyüme koşulları gibi çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Literatürde granül çapı 0.2-0.5 μm aralığında değiştiği bildirilmiştir (Jendrossek vd., 2007; Wahl vd., 2012).

C. necator hücrelerinin farklı fermantasyon aşamalarındaki PHB granüllerinin boyutu, miktarı ve morfolojisinde değişiklikler gözlemlenmiş ve bu faktörler oldukça değişkenlik göstermiştir. Granüllerin morfolojisi değiştikçe boyut ve şekil bakımından farklılık olmuş ve farklı inkübasyon süresi hücre başına granül sayısı üzerinde oldukça etkili olmuştur. Fermantasyon süresinin değişmesiyle granüller sürekli oluşmaya devam ettiği için kademeli olarak birleşir ve zamanla sitoplazmanın kısımlarını doldurur. Fermantasyonun sonunda bazı granüllerin birleştiğini gözlenebilir. Ayrıca granüllerin boyutu sabit bir değere sahip değildir. Farklı türlerde ve farklı büyüme evrelerinde PHB

granüllerinin morfolojisi ve lokalizasyonu değişebilir. *C. necator* için PHB granülleri hücre kutuplarında görüntülenmiştir (Nygaard, Yashchuk ve Hermida, 2021).

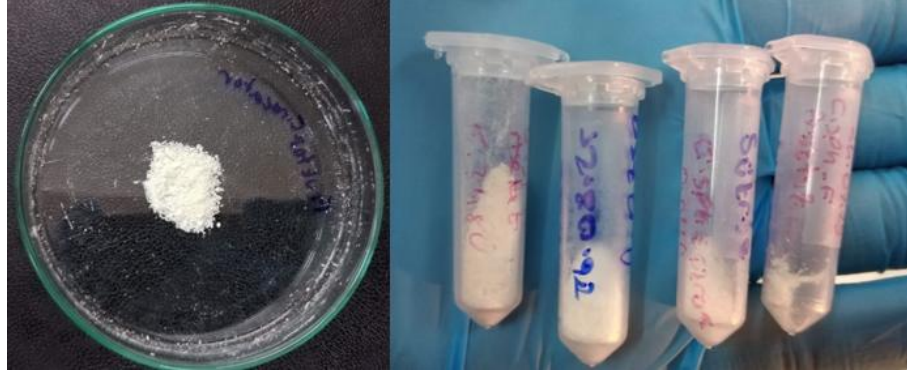
4.3. PHB Ekstraksiyonu

Mikroorganizmalar, yüksek karbon varlığında ve azotça sınırlandırılmış koşullarda yani dengesiz büyüme gibi stresli koşullara yanıt olarak depo maddesi olan PHB biriktirmektedir. Bu çalışmada besin sınırlayıcı madde olan azot kaynağı olarak amonyum klorür (2mM) ve amonyum sülfat kullanıldı. Karbon kaynağı olarak ise asetat, glikoz, fruktoz ve süktroz kullanıldı. PHB, yüksek ekstraksiyon verimliliğine sahip olması sebebiyle çözücü ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstrakte edildi. Şekil 4.19'da ekstraksiyon işleminin son basamağı olan PHB kurutma aşamaları verildi.



Şekil 4.19. PHB kurutma aşamaları A) Soğuk metanol ile çöktürme B) Nemli PHB C) Kurumaya bırakılmış PHB ve D) Kuru PHB örneği

Ölçülen kuru hücre ağırlığı ve ekstrakte edilen PHB'nin tartılması ile elde edilen veriler kullanılarak PHB verimi yüzdesi hesaplandı. Bu çalışmada ekstrakte edilen saf PHB Şekil 4.20'de gösterilmektedir.



Şekil 4.20. Ekstrakte edilen PHB örnekleri

C. sphaeroides ve *C. necator* 'un dört farklı karbon kaynağından ekstrakte edilen PHB ağırlıkları tartıldı ve farklı koşullarda elde edilen kuru hücre ağırlıkları, PHB verimi ve miktarı Çizelge 4.2'de gösterildi.

Çizelge 4.2. Farklı besiyerlerinde yetiştirilen bakterilerde % PHB verimi

Bakteri	Besiyeri	Kuru hücre ağırlığı (CDW) g/L	PHB Miktarı (g/L)	%PHB Verimi (w/w)
<i>C. sphaeroides</i>	Asetat	1,44	0,58	40,12
<i>C. sphaeroides</i>	Glikoz	0,80	0,12	15,51
<i>C. sphaeroides</i>	Fruktoz	0,34	0,01	2,88
<i>C. sphaeroides</i>	Sükroz	0,59	0,11	18,45
<i>C. necator</i>	Asetat	0,96	0,105	10,87
<i>C. necator</i>	Glikoz	1,27	0,13	10,22
<i>C. necator</i>	Fruktoz	1,04	0,33	31,76
<i>C. necator</i>	Sükroz	-	-	-

Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi *C. sphaeroides* asetat, glikoz, fruktoz ve sükroz besiyerlerinde sırasıyla 1,44, 0,80, 0,34 ve 0, 59 g/L kuru hücre ağırlığına sahip iken *C. necator* ise asetat, glikoz ve fruktoz besiyerlerinde 0,96, 1,27 ve 1,04 g/L kuru hücre ağırlığına sahiptir. En yüksek kuru hücre ağırlığı *C. sphaeroides* 'in asetat besiyerinde, en düşük kuru hücre ağırlığı *C. sphaeroides* 'in fruktoz besiyerinde elde edildi. Ekstrakte edilen PHB miktarları incelendiğinde, en yüksek PHB üretiminin 0,58 g/L ile *C. sphaeroides*'in asetat koşulunda elde edildiği, bunu 0,33 g/L PHB ile *C. necator*'un fruktoz koşulunun izlediği belirlendi. Ayrıca, en düşük PHB üretiminin *C. sphaeroides* 'in fruktoz ortamında gerçekleştiği de belirlendi. PHB verimlilikleri incelendiğinde, en yüksek verimin %40,11 ile *C. sphaeroides*'in asetat ortamında elde edildiği, bunu %31,76 verim ile *C. necator*'un fruktoz ortamının takip ettiği görüldü. En düşük verim ise %2,88 ile *C. sphaeroides*'in fruktoz ortamında oldu. Fruktozlu *C. sphaeroides* kültürü,

çalışmadaki tüm koşullar arasında en düşük kuru hücre ağırlığına, en az PHB üretimine ve en düşük PHB verimine sahip ortam olarak saptandı. Bu çalışmada incelenen tüm koşullar içinde, PHB üretimi ve biyokütle oluşumu bakımından en iyi sonuçlar *C. sphaeroides*'in asetatla beslenen kültüründe kaydedildi. *C. necator*'un glikoz kültüründe kuru hücre ağırlığı fruktoz ortamından daha fazladır ancak PHB içeriği fruktoza kıyasla daha düşüktür. Benzer sonuçlar Aramvash ve ark. (2015) tarafından da bildirilmiş ve farklı karbon kaynakları arasında en yüksek büyüme hızı glikozdan elde edilmesine rağmen, fruktoza kıyasla PHB içeriği daha düşük olmuştur (Aramvash, Akbari Shahabi, vd., 2015). Farklı karbon kaynaklarının PHB üretimi üzerindeki etkisi incelendi ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verildi.

Çizelge 4.3. Farklı stratejiler ile büyütülen *C. necator* ve *C. sphaeroides* için literatürde bildirilen ve üretilen PHB miktarları

Bakteri	Karbon kaynağı	PHB (g/L)	Referans
<i>C. necator</i> NRRL B14690	Fruktoz	6,75	(Khanna ve Srivastava, 2005)
<i>C. necator</i> ATCC 17697	Fruktoz	4,6	(Nygaard vd., 2019)
<i>C. necator</i> DSM545	Sükroz	4,82	(Khonde vd., 2025)
<i>C. necator</i> H16 (DSM 428)	Fruktoz	1,41	(Xu vd., 2021)
<i>C. necator</i> ATCC 25207	Fruktoz	4,99	(Ertan vd., 2021)
<i>C. necator</i> ATCC 25207	Glikoz	3,94	(Ertan vd., 2021)
<i>C. necator</i> NCIMB 11599	Sükroz	1,96	(Arikawa vd., 2017)
<i>C. necator</i> IBP/SFU-1	Fruktoz	5,68	(Zhila vd., 2021)
<i>C. necator</i> IBP/SFU-1	Glikoz	6,33	(Zhila vd., 2021)
<i>C. necator</i> DSM 545	Glikoz	63	(Atlić vd., 2011)
<i>C. necator</i> H16	Glikoz/Fruktoz	30,9	(Lin ve Ng, 2025)
<i>C. necator</i> NCIMB 11599	Glikoz	1,5	(Orita vd., 2012)
<i>C. necator</i> ATCC 17697	Fruktoz	25,7	(Nygaard, Yashchuk, Nosedá, vd., 2021)
<i>C. necator</i> CGMCC 1.2834	Asetat	0,43	(Cai vd., 2023)
<i>C. necator</i>	Asetat	0,46	(Ren ve Ninomiya, 2025)
<i>C. necator</i> Re2058/pCB113	Fruktoz	0,26	(Murugan vd., 2017)
<i>C. necator</i> A-04	Fruktoz	5,3	(Chanprateep vd., 2010)
<i>C. necator</i> DSM 545	Glikoz	5,16	(Rond'osová vd., 2022)
<i>C. necator</i> NRRL B14690	Fruktoz	1,4	(Khanna ve Srivastava, 2005)
<i>C. necator</i> NRRL B14690	Glikoz	0,031	(Khanna ve Srivastava, 2005)

Çizelge 4.3 (devam) Farklı stratejiler ile büyütülen *C. necator* ve *C. sphaeroides* için literatürde bildirilen ve üretilen PHB miktarları

<i>C. necator</i> NRRL B14690	Asetat	0,023	(Khanna ve Srivastava, 2005)
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Glikoz	3,3	(Baei vd., 2011)
<i>C. necator</i> DSMZ 545	Fruktoz	5,8	(Baei vd., 2011)
<i>C. necator</i> ATCC 17699	Glikoz	1,38	(Aramvash, Akbari Shahabi, vd., 2015)
<i>C. necator</i> ATCC 17699	Fruktoz	2,16	(Aramvash, Akbari Shahabi, vd., 2015)
<i>C. necator</i> ATCC 17697	Fruktoz	3,78	(Mulchandani vd., 1989)
<i>C. necator</i> H16 (DSM 428)	Fruktoz	0,33	Bu çalışma
<i>C. sphaeroides</i> U7	Asetat	2,3	(Kemavongse vd., 2007)
<i>C. sphaeroides</i> ES16	Asetat	3,12	(Sangkharak ve Prasertsan, 2007)
<i>C. sphaeroides</i> N20	Asetat	7,76	(Sangkharak ve Prasertsan, 2007)
<i>C. sphaeroides</i> U7	Asetat	2,15	(Sangkharak ve Prasertsan, 2007)
<i>C. sphaeroides</i> 14F	Fruktoz	3,5	(Lorrungruang vd., 2006)
<i>C. sphaeroides</i> 5B	Glikoz	0,94	(Lorrungruang vd., 2006)
<i>C. sphaeroides</i> 14F	Asetat	1,06	(Lorrungruang vd., 2006)
<i>C. sphaeroides</i> N20	Asetat	8,02	(Sangkharak ve Prasertsan, 2008)
<i>C. sphaeroides</i> O.U.001 (DSM5864)	Asetat	0,58	Bu çalışma

C. necator'un suşlarına yapılan metabolik mühendislik stratejiler ile glikoz ve sükroz gibi substratların metabolize edilmesi mümkün hale gelmiş ve PHB üretim verimliliği yüksek oranda artmıştır (Arikawa vd., 2017). Çok yönlü bir mikroorganizma olan *C. necator*'un şekerleri karbon kaynağı olarak kullanabildiği gösterilmiştir. Ancak *C. necator*'un hem yabanıl tip hem de mutant suşları sükrozu metabolize edemez. Bu durum sükroz bakımından zengin endüstriyel hammadde kullanımını sınırlar. Ancak metabolik olarak sükroz fosforilaz yolu eklenerek tasarlanmış *C. necator* suşları geliştirilmiş ve sükrozun verimli şekilde kullanıldığı gösterilmiştir (Jo vd., 2021; Khonde vd., 2025). Yabanıl tip *C. necator* 'un en yüksek PHB verimliliğini sağlayan karbon kaynağı fruktozdur (Khanna ve Srivastava, 2005). *C. necator* NCIMB 11599 suşu, glikozda büyütülmüş ve 201 g/L hücrenin %86'sı P(3HB) homopolimer olarak üretilmiştir (Song ve Kim, 2005). Ertan ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir araştırmada *C. necator* ATCC 25207 suşu kullanılarak fruktoz ve glikozda sırasıyla 4,99

g/L, 3,94 g/L PHB üretilmiştir. Bu çalışmada ortamdaki glikoz ve fruktoz konsantrasyonu arttıkça PHB üretimi de artmış ancak 10 g/L'ye düştüğünde hücre büyümesi için PHB tüketimi başlamıştır. Bu süşun PHB üretimi için fruktozu tercih ettiği, glikozu ise genelde mikrobiyal büyüme için kullandığı gözlemlenmiştir. Glikozun tüketim hızının fruktozdan daha yavaş olduğu kaydedilmiş (Ertan vd., 2021). Asetik asit gibi uçucu yağ asitleri (VFA), *C. necator* tarafından PHB sentezi ve büyüme için karbon kaynağı olarak kullanılabilir. Ancak yüksek konsantrasyonları hücre büyümesi üzerinde inhibe edici etkide olup metabolit üretimini bozmaktadır. Ortama kademeli olarak verilen VFA'lar PHB'ye dönüştürölür. Yapılan bu çalışmada *C. necator*' un VFA tüketiminin kinetiği incelenmiş ve *C. necator*'un büyümesi ve PHB üretimi, VFA'nin konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilenmiştir. Asetik asit tüketimi ile HB artışı gözlemlenmiş (Marudkla vd., 2018; J. Wang vd., 2010). Zhila ve ark. (2021) fruktoz, glikoz ve farklı bitkisel yağları karbon kaynağı olarak kullanarak topraktan izole edilen *C. necator* IPB/SFU-1 süşundan PHA üretmiş ve karşılaştırma yapmışlardır (Zhila vd., 2021). *C. necator*' un glikozu verimsiz kullanması sebebiyle, mutant süş olan DSM 545 glikozu kullanabilme yeteneği nedeniyle çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Bu çalışmalarda ilk adımda glikoz ortamında biyokütle birikimi sağlanır sonra ikinci bir karbon kaynağı kullanılarak PHB birikimini arttırmak hedeflenir (Diankristanti vd., 2024; Morlino vd., 2023). *C. necator* H16'nın rekombinant süşları kullanılarak %1 glikoz içeren kültür koşullarında PHB başarıyla üretilmiştir. *C. necator*'da glikoz kullanımını arttırmak ve kullanabileceği substrat aralığının genişletilmesi için yapılan başka bir çalışma ise %67.2 verimde PHB üretimi ile sonuçlanmıştır (Orita vd., 2012; Sichwart vd., 2011; Weng vd., 2023). Asetat, bütirat, propiyonat ve valerat gibi uçucu yağ asitlerinin substrat olarak birlikte kullanımına dayanan ya da zenginleştirilmiş karışık mikrobiyal kültürler ile polimer üretimini hedefleyen birçok araştırma yapılmış ve tek karbon kaynağı kullanımında elde edilen PHB miktarına kıyasla oldukça yüksek PHA birikimi olmuştur. Çift karbonlu VFA'lar (asetat ve bütirat) ile PHB sentezlenirken, tek karbonlu VFA'lar (propiyonat ve valerat) kullanıldığında PHBV üretilmiştir. Bir çalışmada, *C. necator*'un VFA'lar ile kültüre edilmesi sonucu 1,72 g/L PHA üretilmiş ve karma mikrobiyal kültürlerle yüksek verimlilik kaydedilmiştir (Cai vd., 2023; H.-R. Jung vd., 2019; Khatami vd., 2022). Yapılan bir modelleme çalışmasında *C. necator* DSM 545 süşu ile glikozdan PHB verimi yaklaşık 0,48 g PHB/g glikoz olarak rapor edilmiştir (González

vd., 2026). *C. necator* ile ilgili önceki çalışmalar da glikozun karbon kaynağı olarak verimsiz kullanımı vurgulanmıştır (Hathi vd., 2022).

Khatipov ve ark. (2006), *C. sphaeroides* tarafından çeşitli karbon ve azot kaynaklarının kombinasyonu ile PHB birikimi üzerine bir çalışma yapmış, en yüksek PHB üretimi (hücre kuru ağırlığının yaklaşık %40'ı kadar) asetat ve amonyumlu ortamda olmuştur (Khatipov vd., 2006). *Rhodobacter* türleri asetat, glikoz ve malat gibi substratları kullanabilir (Liebergesell vd., 1991). PNSB grubunda yer alan *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710 ile yapılan bir çalışmada farklı asetat konsantrasyonları (10-65 mM) denenmiş ve başlangıç asetat konsantrasyonundaki artış, biyokütle ve PHB birikiminde artışa neden olmuştur. En yüksek verimin olduğu 65 mM asetat içeren ortamda hücre kuru ağırlığının yaklaşık %20'si kadar PHB (200,3 mg PHB/g cdw) üretilmiştir (Özsoy Demiriz vd., 2019). Hustede ve ark. (1993) tarafından yapılan çalışmada da benzer sonuçlar rapor edilmiştir. *C. sphaeroides*'te 10 mM asetat kullanıldığında %38 olan PHB (% cdw'nin), 30 mM asetat kullanıldığında %70'e yükselmiştir (Hustede vd., 1993). *C. sphaeroides* substrat olarak asetatı kullandığında diğer karbon kaynaklarına göre daha fazla PHB ürettiği bulunmuştur (Monroy ve Buitrón, 2020). Bu çalışmanın sonuçları da bunu desteklemektedir, *C. sphaeroides* asetatta diğer kaynaklara kıyasla daha fazla PHB üretmiştir.

Asetatın (60 mM) karbon kaynağı olarak kullanıldığı kültür ortamında, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 mM) azot kaynağı ile PHB birikimi kuru hücre ağırlığının %54'üne ulaşmıştır. Buna karşılık, azot kaynağı olarak glutamat (8 mM) kullanıldığında PHB içeriği %51 (DCW) olarak belirlenmiştir (Kim vd., 2011). Kim ve ark. (2012), *C. sphaeroides* KD131'de karbon (asetat ve süksinat) ve azot (amonyum sülfat ve glutamat) kaynaklarının PHB ve H_2 üretimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir (Kim vd., 2012). H_2 üretimi için asetatta düşük substrat dönüşüm verimliliği kaydedilmiş ve bu durum substratın bakteri büyümesi ya da PHB depolama gibi alternatif yollar için kullanıldığını göstermiştir. En yüksek PHB verimi ise asetat ve amonyum sülfat ile elde edilmiştir (Kim vd., 2012).

Lorrungruang ve ark. (2006) tarafından yapılan araştırmada *C. sphaeroides*'in yedi farklı suşu glikoz, fruktoz ve asetat gibi çeşitli karbon kaynaklarında kültüre edilmiş ve substratların PHA üretimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Lorrungruang vd., 2006). 5 g/L karbon kaynağı içeren iki aşamalı aerobik karanlık kültürde ve anaerobik ışık kültüründe büyümeler karşılaştırılmış ve aerobik karanlık kültürdeki PHA konsantrasyonları dikkate alındığında üretim için daha pratik koşul olduğuna karar

verilmiştir. Bazı suşlar fruktoz ve glikozda önemli bir büyüme gösterememiştir. Daha yüksek fruktoz konsantrasyonunun büyüme baskıladığı görülmüştür. Sonuç olarak iki aşamalı aerobik kültürde *C. sphaeroides* 14F suşu fruktoz (1,67 g/L) ve asetatta (1,06 g/L) yüksek PHA üretimi göstermiştir. 14F suşu sü krozu doğrudan kullanamazken fruktozun PHA üretimi üzerindeki etkileri daha detaylı incelenmiş ve en yüksek PHA konsantrasyonu 3.5 g/L (%60 DCW) olarak belirlenmiştir (Lorrungruang vd., 2006).

En çok tercih edilen VFA olarak kabul edilen asetat, düşük maliyeti ve PHA sentezinde asetil-CoA'nın öncüsü olduğu için, PHB üretiminde sık kullanılan bir substrattır. Farklı *C. sphaeroides* suşları ve karbon kaynakları ile yapılmış çalışmada *C. sphaeroides* N20 suşu için asetatin PHB üretiminde en iyi karbon kaynağı olduğu gösterilmiştir (Gu vd., 2024; Sangkharak ve Prasertsan, 2008).

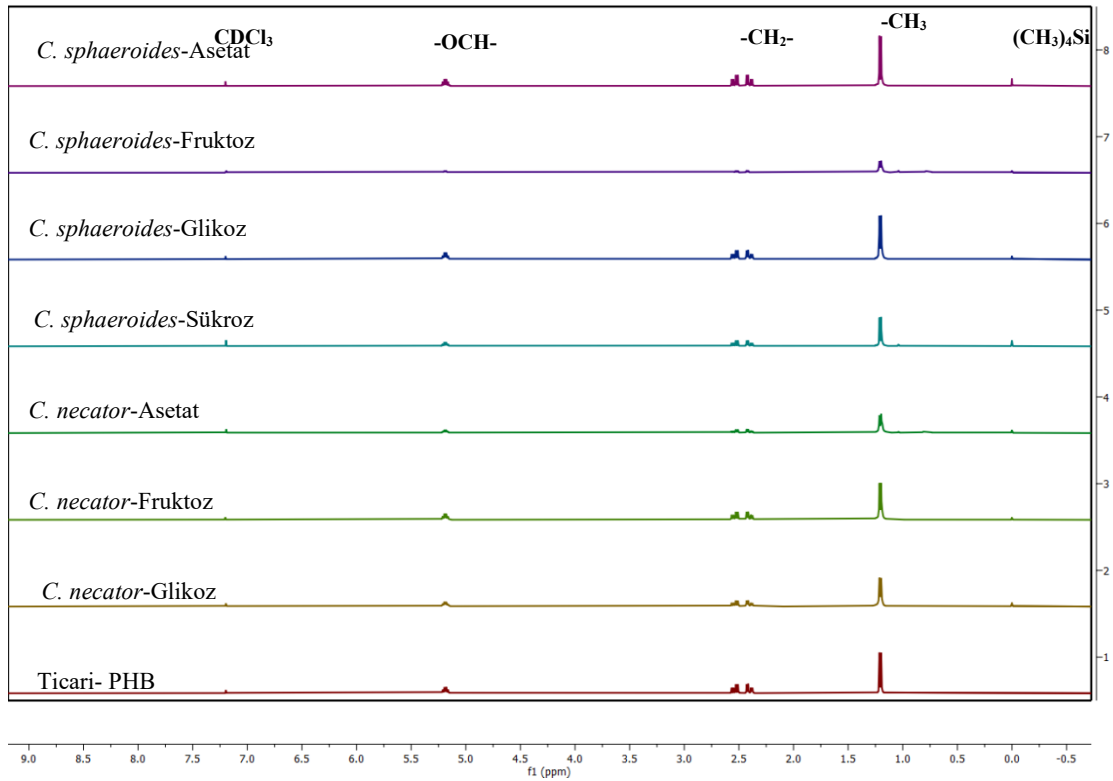
Bu çalışmada *C. necator* dört farklı karbon kaynağı arasında en yüksek PHB veriminin fruktoz varlığında elde edildiği belirlendi. Benzer şekilde literatürde de *C. necator*'un fruktozda daha yüksek PHB birikimi gösterdiği rapor edilmiştir. *C. sphaeroides* için ise en iyi büyümenin asetat içeren ortamda gözlemlendiği tespit edildi, bu durum literatür ile uyumludur. Literatürde asetatin özellikle PHB sentezi için etkili bir karbon kaynağı olduğu ve birçok bakteri türünde depolama polimeri üretimini teşvik ettiği bildirilmektedir. Elde edilen sonuçlar, karbon kaynağı tipinin hem büyüme performansı hem de PHB birikimi üzerinde belirleyici bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Yine literatürle uyumlu olarak *C. necator* sü krozu substrat olarak kullanamamıştır.

4.4. Üretilen PHB Polimerlerinin Karakterizasyonu

Fermentasyon süreçleri sonucunda elde edilen PHB polimerlerinin yapısal doğrulaması ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla karakterizasyon analizleri gerçekleştirildi. Üretilen polimerin kimyasal yapısı FTIR ve NMR analizleri ile doğrulanırken, termal davranışı DSC ve TGA teknikleri kullanılarak değerlendirildi.

4.4.1. NMR spektroskopisi ile polimer yapısının karakterizasyonu

Bakterilerden ekstrakte edilen PHB örneklerinin moleküler yapılarını belirlemek için NMR spektroskopisi kullanıldı. Şekil 4.21’de gösterildiği gibi NMR analizi, bakteriler tarafından üretilen polimerlerin PHB olduğunu doğruladı.



Şekil 4.21. Ticari ve dört farklı besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* ve *C. necator*’dan ekstrakte edilen PHB’nin NMR spektrumlarının karşılaştırılması

Bu çalışmada kaydedilen (Çizelge 4.4) NMR pikleri daha önce yapılan çalışmalarda değerler ile tutarlıdır. 1,18- 1,34 ppm aralığında gözlenen pik metil grubunun (-CH₃), 2,38- 2,58 ppm aralığında gözlenen pik metilen grubunun (-CH₂), 5,15- 5,27 ppm aralığında gözlenen pik ise (-CH) varlığını gösterdi. Şekil 27’de gösterildiği gibi spektrumda 7.20 ppm’deki NMR piki çözücüyü (CD₃Cl) temsil ederken, 0.00 ppm’deki pik referans madde olarak kullanılan tetrametilsilani ((CH₃)₄Si) temsil etmektedir.

Çizelge 4.4. *C. sphaeroides* ve *C. necator*' un dört farklı besiyerinden elde edilen PHB'nin ^1H NMR pikleri (ppm) ve onlara karşılık gelen PHB yapısal grupları

PHB yapısal grubu	^1H NMR pikleri (ppm)
CH_3	1,18-1,34
CH_2	2,38- 2,58
CH	5,15- 5,27
C = O	-

Yapılan bir araştırmada *C. necator* ATCC17697'nin fruktoz ortamında fermentasyonu ile üretilen PHB polimerinin ^1H -NMR ile gözlemlenen pikleri şu şekildedir: 1,27 ppm'deki çift rezonans sinyali $-\text{CH}_3$, 2,45–2,63 ppm'deki çiftli dördü rezonans sinyali $-\text{CH}_2-$ ve 5,26 ppm'deki çoklu rezonans sinyali ise $-\text{OCH}-$ protonlarına karşılık gelmektedir (Nygaard, Yashchuk, Nosed, vd., 2021). *Bacillus* spp. tarafından üretilen PHB'nin ^1H -NMR'ında sırasıyla 1,27 ppm'de (çift, CH_3), 2,48–2,58 ppm'de (çift dördü, CH_2) ve 5,25 ppm'de (çoklu, CH) olmak üzere üç sinyal gözlemlenmiştir (Senila vd., 2023). *Burkholderia cepacia* BPT1213 tarafından atık gliserol kullanılarak sentezlenen polimer için ^1H NMR sonucu PHB'de yaygın olarak gözlenen metil, metilen ve metin grubunu gösteren üç ana pik sırasıyla 1,20–1,21 ppm, 2,38–2,56 ppm ve 5,16–5,22 ppm'de gösterilmiştir. 7,20 ppm'de gösterilen pik ise analiz için kullanılan kloroforma karşılık gelmektedir (Drusilla Wendy vd., 2022) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *Burkholderia cepacia* BPT1213 tarafından atık gliserol kullanılarak sentezlenen PHB'nin ^1H NMR pikleri (ppm) ve onlara karşılık gelen yapısal gruplar (Drusilla Wendy vd., 2022)

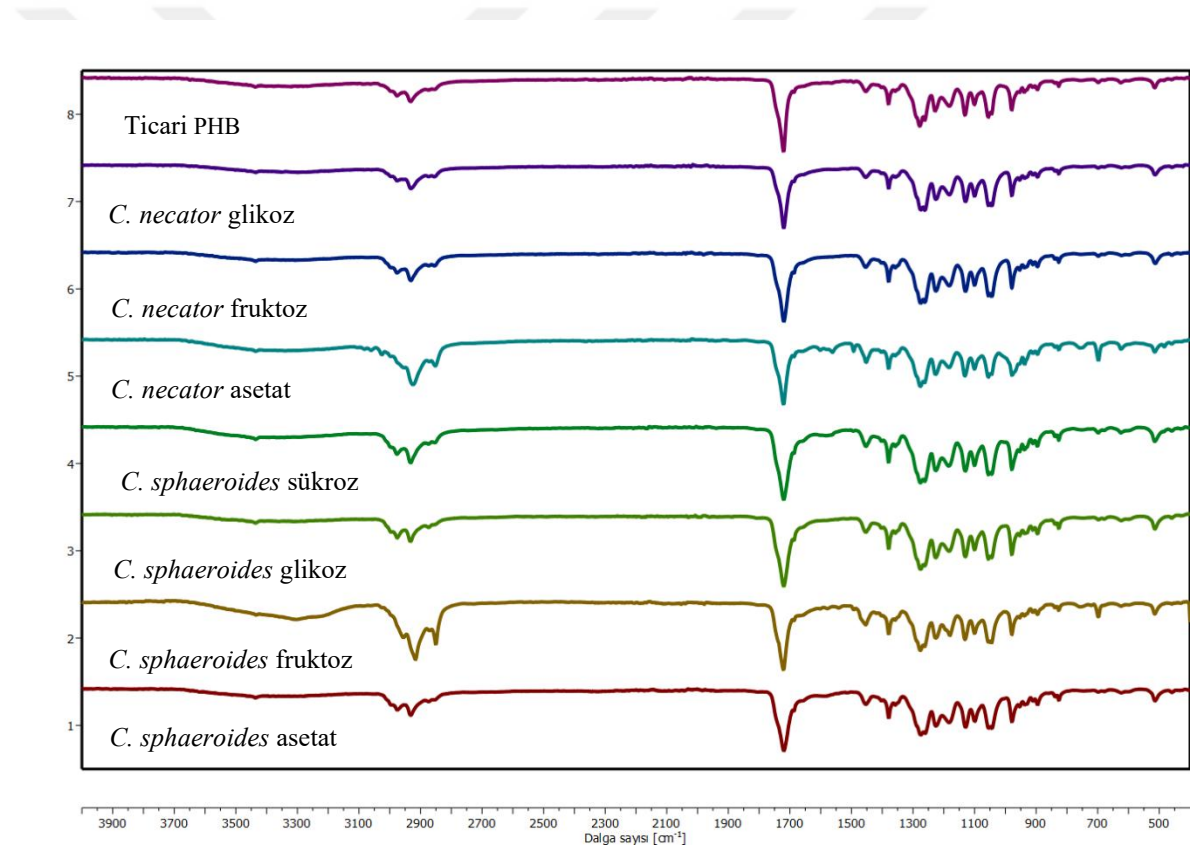
PHB yapısal grubu	^1H NMR pikleri (ppm)
CH_3	1,20–1,21
CH_2	2,38–2,56
CH	5,16–5,22

C. sphaeroides ve *C. necator*' un farklı karbon kaynaklarından mikrobiyal fermentasyonla sentezlenen PHB'nin ^1H NMR spektrumları, önceki çalışmalarda bildirilen spektrumların yanı sıra ticari PHB'nin spektrumuyla da uyumludur. Bu ekstrakte edilen polimerin PHB olduğunu gösterdi.

Elde edilen sonuçların tüm örnekler için benzer olduğu gözlemlendi ve tüm örnekler ait NMR spektrumları detaylı olarak EK 1-7'de verildi.

4.4.2. FTIR spektroskopisi ile polimer yapısının karakterizasyonu

Moleküler yapıların nitel olarak incelenmesinde kullanılan FTIR spektroskopisinin FTIR spektrumu numunenin genel kimyasal bileşimini temsil eder. Ekstrakte edilen polimerlerde ana fonksiyonel grupların varlığının doğrulanması için FTIR spektroskopisi kullanıldı. *C. sphaeroides* ve *C. necator* ile optimize edilen ortamlardan üretilen PHB örnekleri ve ticari PHB'nin FTIR spektrumları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.22' de gösterildi. Ekstrakte edilen ve standart PHB'nin FTIR spektrumları 3900 ile 500 cm^{-1} aralığında gözlemlendi. Bu sonuçlar, literatürde daha önce bildirilen çalışmaların sonuçları ile büyük ölçüde uyumludur (Trakunjae vd., 2021).



Şekil 4.22. Ticari ve dört farklı besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* ve *C. necator*'dan ekstrakte edilen PHB'nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1}) karşılaştırması

Ekstrakte edilen PHB'lerin FTIR spektrumları ile fonksiyonel gruplar tespit edildi ve doğrulandı. Çizelge 4.6'da bu çalışmada, *C. sphaeroides* ve *C. necator*'un dört farklı besiyerinden elde edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayıları (cm^{-1}) verildi. Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi 1379-1378 cm^{-1} 'deki adsorpsiyon CH_3

grubunun varlığını, 1453-1452 cm^{-1} 'deki adsorpsiyon CH_2 grubunun varlığını, 2976-2921 cm^{-1} 'deki adsorpsiyon CH grubunun varlığını, 1720-1719 cm^{-1} 'deki adsorpsiyon $\text{C}=\text{O}$ grubunun varlığını, 1276-1043 cm^{-1} 'deki adsorpsiyon $\text{C}-\text{O}$ grubunun varlığını, 3307-3436 cm^{-1} 'deki adsorpsiyon $\text{O}-\text{H}$ fonksiyonel grubunun varlığını göstermektedir.

Çizelge 4.6. *C. sphaeroides* ve *C. necator*' un dört farklı besiyerinden elde edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm^{-1})

Fonksiyonel grup	FTIR dalga sayısı (cm^{-1})
CH_3	1379-1378
CH_2	1453-1452
$\text{C}-\text{H}$	2976-2921
$\text{C}=\text{O}$	1720-1719
$\text{C}-\text{O}$	1276-1043
$\text{O}-\text{H}$	3307-3436

Sentezlenen polimerlerin FTIR spektrumları, literatürde daha önce bildirilen verilerle iyi bir uyum göstermekte ve PHB'nin başarılı bir şekilde üretildiğini doğrulamaktadır. Nygaard ve arkadaşlarının (2021) fruktoz ortamında elde ettiği polimerin FTIR spektrumlarında PHA'ların karakteristik ester karbonil grubuna karşılık gelen $\text{C}=\text{O}$ bağ gerilmesine bağlı 1720 cm^{-1} 'de yoğun bir bant gözlemlenmiştir. 1181 cm^{-1} 'de, $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ grubunun asimetrik gerilme titreşiminden dolayı bir bant kaydedilirken metil ve etil gruplarından kaynaklanan $\text{C}-\text{H}$ gerilmesi, 2900 cm^{-1} civarındaki bölgede bant vermiştir. Bu spektrumlar ticari PHB'nin spektrumları ile de uyumlu bulunmuştur (Nygaard, Yashchuk, Nosedá, vd., 2021). Başka bir çalışmada FT-IR spektrumu incelendiğinde PHB'ye özgü karakteristik piklerin varlığı görülmektedir. 2976 ve 2934 cm^{-1} 'de gözlenen iki güçlü pik, sırasıyla $-\text{CH}_3$ ve $-\text{CH}_2$ gruplarının $\text{C}-\text{H}$ gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1743, 1724 ve 1287 cm^{-1} 'de ortaya çıkan belirgin pikler ise ester karbonil gruplarına ($\text{C}=\text{O}$) ve asimetrik $\text{O}-\text{C}$ gerilme titreşimlerine atfedilmektedir. Bunun yanı sıra, 1381, 1466 ve 3440 cm^{-1} 'de gözlenen pikler $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$ ve $\text{O}-\text{H}$ grupları ile ilişkilendirilmektedir (Senila vd., 2023). *Burkholderia cepacia* BPT1213'ten ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları FT-IR spektroskopisi ile incelendiğinde, PHA'lara ait karakteristik bantlar gözlenmiştir. 3444 cm^{-1} dalga sayısındaki bant hidroksil ($-\text{OH}$) grubunu temsil etmektedir. 1730 cm^{-1} 'de

gözlenen yoğun bant ise ester grubuna ait karbonil gerilme titreşimini ($C=O$) göstermektedir ve PHB için tipik bir özelliktir. $1454\text{--}1382\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında belirlenen güçlü bantlar metil (CH_3) ve metilen (CH_2) gruplarının deformasyon titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca 1134 cm^{-1} 'de gözlenen bant $C-O-C$ bağlarının gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir (Drusilla Wendy vd., 2022). Başka bir çalışmada *C. necator* ile PHB üretilmiş ve FTIR ile analiz edilmiştir. Çizelge 4.7'de elde edilen PHB'nin FTIR dalga sayıları (cm^{-1}) ve onlara karşılık gelen fonksiyonel grupları verilmiştir.

Çizelge 4.7. *C. necator*'dan elde edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm^{-1}) (Azizi vd., 2017)

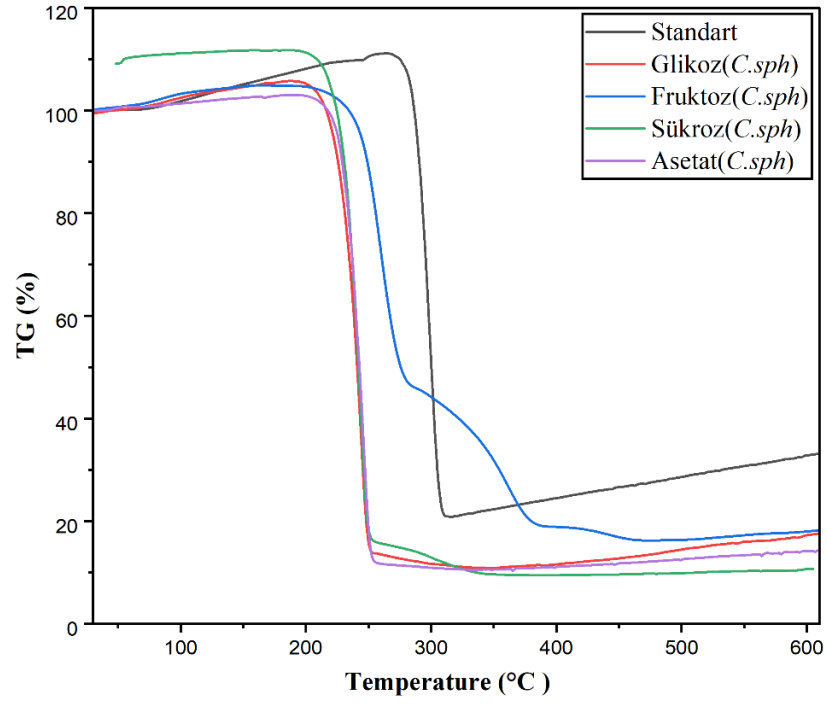
Fonksiyonel grup	FTIR dalga sayısı (cm^{-1})
CH_3	1367
CH_2	1460-1440
C-H	2927-2856
$C=O$	1741
C-O	1180
O-H	3435

Bu analiz sonuçlarına göre *C. necator* ve *C. sphaeroides* 'in fermantasyonu ile üretilen biyopolimerin homopoliester PHB olduğunu doğruladı. Elde edilen sonuçların tüm örnekler için benzer olduğu gözlenmiş olup, tüm örneklerle ait FTIR grafikleri detaylı olarak EK 8-14'te verildi.

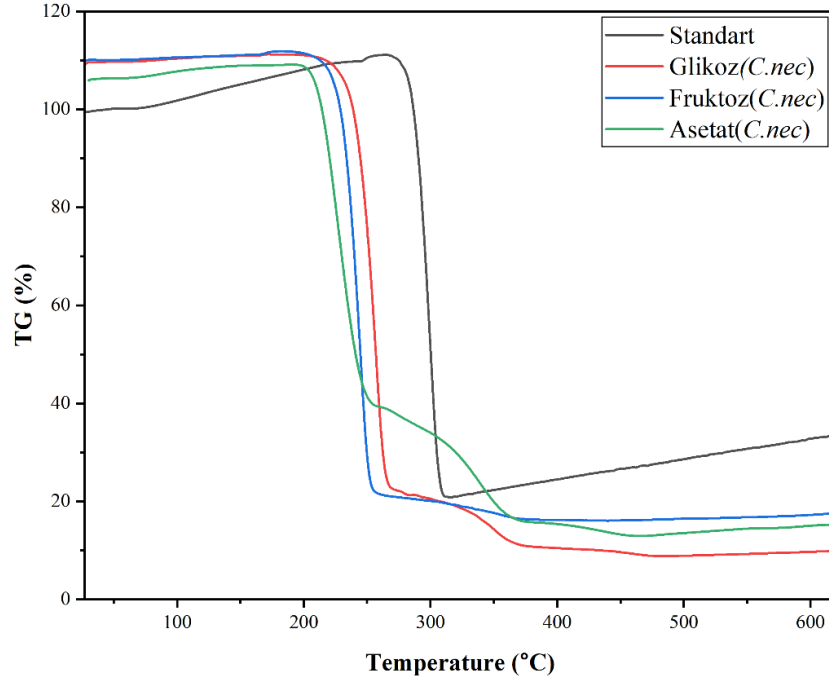
4.4.3. TGA/DSC analizi ile polimer yapısının karakterizasyonu

Elde edilen PHB örneklerinin termal özelliklerini incelemek için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve termogravimetrik analiz (TGA) teknikleri yapıldı. TGA analizinde buharlaşma, ayrışma veya oksidasyon gibi süreçler ile sıcaklık ve zamana bağlı olarak polimerin kütlesindeki değişimler ölçülmektedir. TGA termogramları, sıcaklık ve zamana bağlı olarak örnek kütlesi arasındaki farklar ile elde edilir. Kütle kaybı aşamalarını analiz eden TGA ile polimerin termal kararlılığı gözlemlenir. DSC analizinde örneklerin erime sıcaklıkları karşılaştırılarak yapısal ve termal özellikler analiz edilir. Bu teknikler ile polimerlerin termal kararlılığı, bozunma kinetiği ve faz geçişleri gibi

özelliklerin anlaşılması sağlanır. Yedi PHB örneğinden elde edilen TGA termogramları benzerlik gösterdi. Örneklerdeki maksimum ağırlık kaybı hızı (T_m) sıcaklık değerleri hemen hemen aynıydı. Şekil 4.23 4.24, 4.25 ve 4.26'da elde edilen PHB'lerin TGA termogramları ve DSC eğrileri gösterilmektedir. Ticari PHB ve ekstrakte edilen PHB'ler arasında karşılaştırma yapıldı.



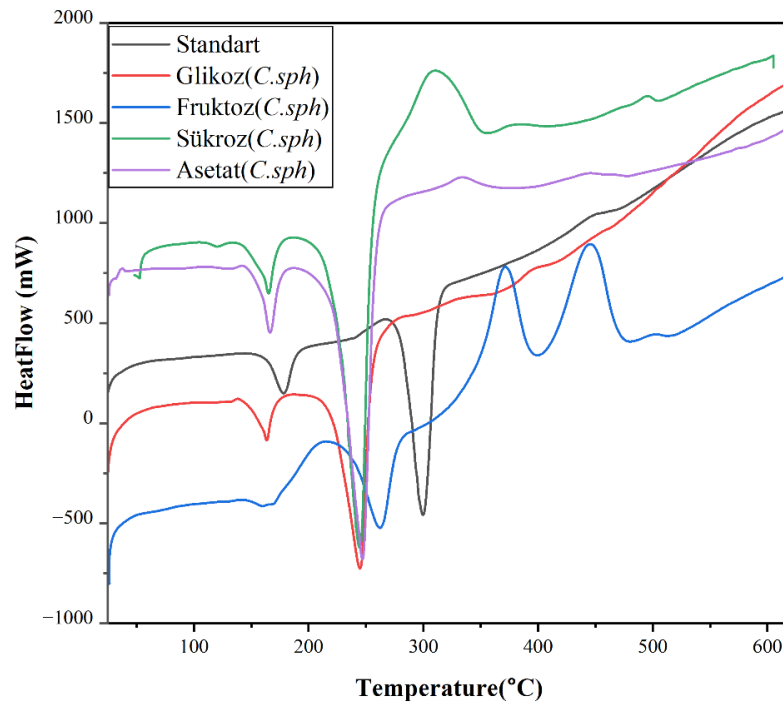
Şekil 4.23. *C. sphaeroides*'in dört besiyerinden elde edilen ve standart PHB'lerin TGA termogramları



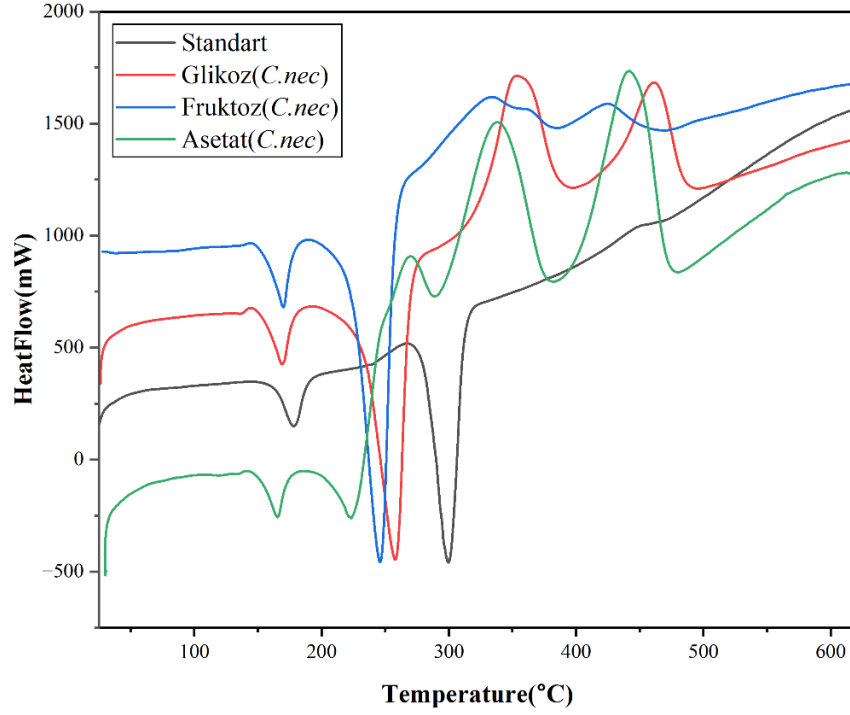
Şekil 4.24. *C. necator* 'un üç besiyerinden elde edilen ve standart PHB'lerin TGA termogramları

PHB genellikle 240-290°C aralığında bir ana bozunma göstermektedir. Bu sıcaklık aralığında polimer zincirlerinin kopması ile kütle kaybı meydana gelmeye başlar. Polimer bozunma sıcaklığı, elde edilen PHB'nin saflığı, molekül ağırlığı, bakteri türü ve kullanılan karbon kaynağına göre değişebilmektedir. TGA grafikleri incelendiğinde beklenildiği üzere her iki bakteride de 240-300°C aralığında eğriler hızlı bir düşüş gösterdi ve ana bozunma gerçekleşti. TGA analizinde grafiklere göre ağırlık kayıpları *C. sphaeroides*'te asetat, glikoz, fruktoz ve sükroz için sırasıyla 246,56°C, 244,32°C, 260°C ve 243,92°C, *C. necator*'da ise asetat, glikoz ve fruktoz için sırasıyla 240°C, 257,47°C ve 245,35°C' de ticari PHB örneğinde ise 300,63°C'de başladı. Grafiklerde bu aralıkta başlayan ani ağırlık kaybı PHB'nin bozunma sürecini göstermekte olup DSC analizinde gözlemlenen bozunma geçişiyle de tutarlıdır. Bu sonuçlar PHB polimerinin karakteristik termal davranışı ile uyumludur. Ticari PHB (standart) elde edilen örnekler arasında en yüksek Tonset (başlangıç bozunma sıcaklığı)'e sahiptir. Bu durumun ticari PHB'nin yüksek ortalama molekül ağırlığına ve termal dayanıma sahip olması ile açıklanabileceği düşünüldü. *C. sphaeroides* ile üretilen dört farklı PHB örneğinin Tonset değerleri birbirine oldukça yakın yani benzer TGA profilleri sergiledi. Bu durum farklı karbon kaynaklarının polimer yapısı üzerinde önemli ölçüde değişime sebep olmadığını düşündürmektedir.

Yaklaşık 600°C’de gözlenen yüksek kalan kalıntı oranı örneklerdeki hücresel artıkların veya inorganik bileşenlerin saflaştırma aşamasında tam olarak uzaklaştırılmadığını işaret etmektedir. Kalıntı miktarları incelendiğinde, *C. necator*’un asetat, glikoz ve fruktozdan elde edilen PHB örnekleri %91,05, %91,10 ve %92,77 oranında kütle kaybına uğrayarak büyük ölçüde ayrılmış ve geriye kalan kül miktarı sırasıyla %8,95, %8,9 ve %7,23 olarak belirlendi. *C. sphaeroides* asetat, glikoz, fruktoz ve sükroz ortamından elde edilen örnekler ise sırasıyla %86,33, %75,38, %82 ve %91 oranında kütle kaybına uğrarken aynı sıra ile kalıntı miktarları %13,67, %24,62, %18 ve %9 olarak belirlendi. Ticari PHB ise %67,18 oranında kütle kaybına uğrarken geriye kalan kalıntı miktarı %32,82 oldu. TGA analiz sonuçlarına göre ticari PHB örneğinde yaklaşık %33 oranında kalıntı gözlenirken, mikrobiyal kaynaklı PHB örneklerinde bu oran belirgin şekilde daha düşük bulundu. Ticari PHB’de gözlenen yüksek kalıntı miktarı, üretim sürecinde kullanılan katkı maddeleri ve olası inorganik safsızlıkların varlığı ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Buna karşılık mikrobiyal PHB’nin katkı maddesi içermemesi nedeniyle termal bozunma sonrası daha düşük kalıntı bıraktığı düşünülmektedir. Termogravimetrik analizde yüksek sıcaklıkta kalan kütle, safsızlıkları içerebilir (Pradhan vd., 2017).



Şekil 4.25. *C. sphaeroides*’in dört besiyerinden elde edilen ve standart PHB’lerin DSC eğrileri



Şekil 4.26. *C. necator* 'un üç besiyerinden elde edilen ve standart PHB'lerin DSC eğrileri

Standart olarak kullanılan ticari ve ekstrakte edilen PHB örneklerinin DSC grafiklerinde yaklaşık 160-180°C'de maksimuma ulaşan düşük şiddetli endotermik pikler, polimerlerde erime sıcaklığına karşılık gelmektedir. Tüm örneklerde yaklaşık 160–180 °C civarında PHB'ye ait karakteristik erime pikleri gözlemlendi ve PHB'nin erime sıcaklığı (T_m) ile ilişkilendirildi. Literatürde PHB T_m 'si için bildirilen sıcaklıkların çoğu 160 °C ile 180 °C aralığındadır ve bu çalışmada elde edilen değerler bu aralıkla uyumludur (McAdam vd., 2020). Yine tüm örneklerde ikinci belirgin ve şiddetli bir endotermik pik kaydedildi ve yaklaşık 240- 300 °C aralığında gözlenen bu pikler PHB'nin termal bozunma sıcaklığı (T_d) ile ilişkilendirildi. DSC eğrilerinde polimerler için hızlı degradasyon sürecine karşılık gelen ve yaklaşık 240–300 °C aralığında olan bu pikler ile TGA grafiğinde kütle kaybının en hızlı olduğu belirlenen bozunma sıcaklıkları arasında uyum olduğu kaydedildi.

C. necator ve *C. sphaeroides* tarafından üretilen PHB örneklerinin TGA ve DSC analizlerinden elde edilen sonuçlar, literatürde bildirilenlere benzerdir (Heinrich vd., 2012; Nygaard, Yashchuk, Nosedá, vd., 2021; Pradhan vd., 2018). Bu çalışmada bildirilen sonuçlara çok benzer olarak, Hablot ve ark. (2008), *C. necator*'dan üretilen PHB için ağırlık kaybının ana aşamasının 230°C - 305°C aralığında olduğunu bildirmiştir

(Hablott vd., 2008). İki bakteri türünden elde edilen PHB örneklerinin, standart PHB'ye kıyasla daha düşük termal kararlılık gösterdiği sonucuna varılabilir çünkü tüm örneklerde maksimum bozunma sıcaklıkları standart PHB'den daha düşük yani termal bozunmaya karşı gösterilen direnç standarda kıyasla azdır. Ticari PHB ile karşılaştırıldığında, bu çalışmadaki örneklerin daha düşük sıcaklıkta bozunması polimerlerin moleküler yapısı ve ağırlığı ve saflık derecesi ile ilişkilendirilmiştir. Düşük molekül ağırlığı daha düşük bozunma sıcaklığının bir sebebi olabilir.

TGA analizinde kütle kaybının ilk aşaması 100°C ile 160°C sıcaklık aralığında, polimer üzerinde fiziksel olarak adsorbe edilmiş metanol, kloroform vb. çözücülerin buharlaşması ile olur. PHB'nin erime noktasından sonra, polimer bozunmasının ikinci veya ana aşaması 180°C'den sonra başlar. Ester bağların kırılması ile zincir bozulması ve hidrolizi gerçekleşir böylece molekül ağırlıkta azalma başlar (Pradhan vd., 2018).

DSC analizinde bazı PHB örneklerinde 300–500 °C sıcaklık aralığında ekzotermik pikler gözlemlendi. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleşen termal bozunma, karbonca zengin kalıntı (char) oluşumu gibi ekzotermik yan reaksiyonların ve oksidatif reaksiyonların oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Bozunmanın sonraki aşamalarında esas olarak kalıntıların oksidasyon reaksiyonları gerçekleşir (Grochowicz ve Kierys, 2017; J. Li ve Stoliarov, 2014).

C. necator'dan sentezlenen PHB'nin erime sıcaklığının 169,88 °C, maksimum bozunma sıcaklığının ise 298,82 °C olduğu bildirilmiştir (Orimi vd., 2025). Bu sonuçlar elde edilen verilerle örtüşmektedir. Kristalleşme derecesinin artırılmasının, T_m değerini önemli ölçüde yükselttiği gözlemlenmiştir (Kargupta vd., 2025). PHB'nin termal bozunması, yüksek sıcaklıklarda (200 °C'nin üzerinde) ester bağlarının rastgele kopmasıyla meydana gelir. Bu bozunma krotonik asit oluşumuna neden olur (Valle Iulianelli vd., 2016). Atık gliserolün karbon kaynağı olarak kullanılması ile üretilen PHB'nin T_m değeri 160-166°C aralığında kaydedilmiştir (Drusilla Wendy vd., 2022). Bu sonuçlar üretilen polimerlerin PHB homopolimeri olduğunu ve özelliklerinin ticari PHB'ye benzer olduğunu doğruladı.

DSC analizlerinden elde edilen erime entalpisi (ΔH_m) değerleri kullanılarak polimerlerin kristallik derecesi hesaplanabilmektedir. Ancak bu çalışmada polimer örneklerinin entalpi değerleri düşük çıkmakla beraber güvenilir şekilde hesaplanmadı. Bu sebeple kristallik derecesi de hesaplanmadı. Düşük molekül ağırlığı ve safsızlık kristallik derecesini etkiler.

Sodyum hipoklorit gibi halojenli çözücüler kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi, hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasını sağlayarak PHB'nin %86-99 saflık seviyesinde saflaştırılmasına katkıda bulunmakla birlikte, güçlü oksitleyici etkisi nedeniyle polimer zincirlerinde önemli ölçüde degradasyona yol açabilmektedir (Berger vd., 1989). Farklı çalışmalarda sodyum hipoklorit kullanıldığında yüksek saflıkta PHA elde edilmiş ancak polimerin bozunması gözlemlenmiştir. *C. necator* ile yüksek saflıkta elde edilen PHB'nin sodyum hipoklorit sebebiyle ciddi şekilde bozulduğu ve moleküler ağırlığında da %50 azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Jacquel vd., 2008). İçsel viskozite ve mutlak moleküler ağırlıktaki azalmalar, polimer zincirlerinde meydana gelen kırılmaların bir göstergesi olup, polimerin degradasyona uğradığını gösterir. Halojenli çözücülerin klorür iyonları PHA'yı çözer (Estrela vd., 2002; Kurian ve Das, 2021). Sadece hipoklorit ile yapılan işlemlerde hipoklorit oranı arttıkça molekül ağırlıkta ciddi azalmalara sebep olacak bozulma olmuştur. Yüksek molekül ağırlıklı PHB için düşük hipoklorit konsantrasyonları kullanılmalıdır (Hahn vd., 1993).

PHB'nin moleküler ağırlığı, kristallik derecesi, mekanik özellikleri ve termal davranışı arasında güçlü bir ilişki vardır. Sodyum hipoklorit kullanımıyla meydana gelen moleküler ağırlıktaki azalma polimerin fiziksel ve mekanik özelliklerini de etkiler. Zincir uzunluğunun kısalmasıyla mekanik dayanım azalır ve kırılkan yapılı olmaya sebep olur. Bu durum polimer erime davranışları üzerinde de değişikliklere sebep olabilir. Termal bozunma sıcaklığında düşme ve erime pikinin genişlemesine sebep olabilir. Ayrıca kristallik derecesinde düşüş ve beraberinde daha düzensiz kristal yapıların oluşması da muhtemeldir.

PHA'ların çeşitli özellikleri bazı koşullara bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterir. Monomerin zincir uzunluğu, polimerin hidrofobikliğini, erime noktasını, cam geçiş sıcaklığını ve kristalinite derecesini etkiler (Castilho vd., 2009). Monomerlerde bulunan karbon atomlarının sayısı monomerlerin zincir uzunluğuyla birlikte moleküler yapılarını belirler ve bu da farklı özelliklere sahip çeşitli PHA polimerlerine yol açar. PHA'ların termal özellikleri, polimerin zincir uzunluğuna bağlıdır ve bu özellikler polimerin mekanik özelliklerini doğrudan etkiler (Dalton vd., 2022).

Bir araştırmada moleküler ağırlığın PHB'nin termal geçişleri üzerindeki etkisi açıkça görülmüş ve termal özelliklerin moleküler ağırlıktan etkilendiği gösterilmiştir (Domínguez-Díaz vd., 2015). PHB'lerin erime, kristalleşme ve bozunma sıcaklıklarının başlangıçta moleküler ağırlık arttıkça arttığını gösterilmiştir (Fiorese vd., 2009). Yani

PHB'nin fiziksel özellikleri moleküler ağırlığına bağlıdır (Mongili vd., 2021). Yüksek moleküler ağırlıklı PHB, düşük moleküler ağırlıklı PHB'ye göre daha yavaş bozunur (Aramvash, Banadkuki, vd., 2015).

Hong ve ark. (2008), PHB'nin termal stabilitesinin, düşük konsantrasyonlarda bulunan kalıntı safsızlıklardan dahi önemli ölçüde etkilendiğini ortaya koymuş ve safsızlıkların polimerin kristalizasyon ve termal bozunma davranışlarında belirgin değişimlere yol açtığını göstermişlerdir. Safsızlık erime sıcaklığını değiştirmiş ve erken bozunmaya yol açmıştır. safsızlıkların termal bozunmayı hızlandırma üzerindeki etkisi DSC ve TGA analizleri ile doğrulanmıştır (S.-G. Hong vd., 2008).

Bakterilerde PHA 'lar yan zincir karbon atomlarının sayısına göre scl, mcl ve lcl olmak üzere üç sınıfa ayrılır. PHA'ların termal özellikleri, polimerin zincir uzunluğuna bağlıdır ve bu özellikler polimerin mekanik özelliklerini doğrudan etkiler. PHA monomer karbon sayısı ve zincir uzunluğu, polimerin moleküler yapısını belirler ve polimer karbonunun dallanmış yapısı yan zincirlerin kristallik üzerinde etkili olup polimerin kristallik derecesini belirlemektedir. Monomer karbon sayısındaki artışın, PHA'ların Tg, Tm ve Tc değerleri üzerinde doğrudan etkili olduğu gösterilmiştir (Dalton vd., 2022).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu bölümde, farklı karbon kaynakları kullanılarak *C. sphaeroides* ve *C. necator* suşlarında gerçekleştirilen PHB üretim çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular özetlendi ve karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Ayrıca, elde edilen veriler doğrultusunda çalışmanın geliştirilmesine yönelik öneriler sunuldu.

5.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında çok yönlü metabolizmaya sahip ve yüksek verimle PHB biriktirdiği bilinen *C. sphaeroides* ve *C. necator*'un farklı karbon kaynaklarında PHB üretim verimlilikleri araştırıldı. Bu çalışmada karbon kaynağı olarak glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat, azot kaynağı olarak ise amonyum klorür ve amonyum sülfat kullanıldı. İki bakterinin 70 mM asetat ve farklı glikoz, fruktoz ve sükroz konsantrasyonlarının olduğu ortamlarda büyümeleri incelendi. *C. sphaeroides* 'in glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat karbon kaynağında kaydedilen OD değerleri sırasıyla 6.76, 1.39, 3.54 ve 6.64 iken kaydedilen pH değerleri aynı sıra ile 7.52, 6.23, 8.17 ve 9.87 oldu. *C. necator*'un glikoz, fruktoz ve asetat ortamlarında kaydedilen OD değerleri sırasıyla 3.15, 5.85 ve 4.45 iken pH değerleri ise 5.11, 5.05 ve 7.05 idi.

Farklı koşullarda büyütülen bakteri kültürlerinden yapılan ekstraksiyonlar sonucunda önce kuru hücre ağırlıkları ve PHB miktarları sonra % PHB verimi tespit edildi. *C. sphaeroides* 'in glikoz, fruktoz, sükroz ve asetat ortamlarında kuru hücre ağırlığı sırasıyla 0.8, 0.34, 0.59 ve 1.44 (g/L) iken, elde edilen PHB miktarları ise aynı sıra ile 0.125, 0.01, 0.11 ve 0.58 (g/L) olarak kaydedildi. *C. sphaeroides* 'in farklı ortamlardaki % PHB verimliliği incelendiğinde ise aynı sıra ile %15, %2, %18 ve %40 verimlilikte PHB üretildi. *C. necator*'un glikoz, fruktoz ve asetat ortamlarında kuru hücre ağırlığı sırasıyla 1.27, 1.04 ve 0.96 (g/L) iken elde edilen PHB miktarları ise sırasıyla 0.13, 0.33 ve 0.1 (g/L) olarak kaydedildi. *C. necator*'un farklı koşullardaki % PHB verimliliği incelendiğinde ise aynı sıra ile %10, %31, %10 verimlilikte PHB elde edildi. Elde edilen bu sonuçlara göre en yüksek PHB verimi *C. sphaeroides* için asetat (%40), *C. necator* için ise fruktoz (%31) ortamında oldu. Kuru hücre ağırlığı ve üretilen PHB miktarının en fazla olduğu koşul da yine *C. sphaeroides* asetat olarak kaydedildi böylece maksimum PHB verimi de bu koşulda kaydedilmiştir. PHB yüzdesi, aynı

mikroorganizmanın farklı karbon kaynaklarının olduğu koşullarında bile değişkendir. Bu çalışmada yapılan optimizasyon sonucunda karbon kaynağının biyokütle ve PHB üretimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterildi.

Lipofilik boyalar olan SBB ve Nile Red kullanılarak *C. sphaeroides* ve *C. necator*'un farklı koşullarda PHB üretim yeteneği tespit edildi. SBB ile boyama sonucu bakteri içindeki PHB granülleri siyah, mavi ve mor renkte gözlemlenirken, Nile red ile boyama sonucunda PHB granülleri bakteri içerisinde kırmızı- turuncu renkte floresan verdi. Yapılan görüntüleme teknikleri ile hücre içi granül oluşumu doğrulandı.

Bakterilerden ekstrakte edilen PHB örneklerinin karakterizasyonu için NMR, FTIR ve TGA/DSC analizleri yapıldı. Kontrol olarak ise ticari PHB örneği kullanılarak karşılaştırma yapıldı. Analiz sonuçlarına göre ekstraksiyon ile elde edilen PHB örnekleri ve ticari PHB arasında bir fark gözlemlenmedi. Elde edilen bulgular, biyomedikal uygulamalara yönelik umut vadeden biyolojik olarak parçalanabilir PHB polimerinin potansiyelini vurgulamaktadır.

Bu çalışma sonucunda, PHB üretim kapasitesi yüksek olan iki bakteri türünün, dört farklı karbon kaynağında ve çeşitli konsantrasyonlarda gösterdikleri büyüme koşulları gözlemlendi ve optimum büyüme koşulları belirlendi. Elde edilen veriler, biyobozunur polimer üretimi için uygun substrat ve mikroorganizma seçimi açısından önemli bilgiler sunmakta olup, sürdürülebilir biyoplastik üretiminin optimize edilmesine katkı sağlamaktadır. Ayrıca çalışma sonuçları, atık su ve organik atık kaynaklı asetatın sürdürülebilir ve düşük maliyetli bir karbon kaynağı olarak PHB üretiminde değerlendirilebileceğini göstermektedir.

5.2 Öneriler

- PHB ekstraksiyonu için kullanılan çözücülerin özelliklerine göre iyileştirme yapılabilir (yeşil solvent kullanımı). Ya da PHB ekstraksiyonunda çözücü olmayan stratejiler (ultrasonikasyon ve homojenizasyon) kullanılabilir.
- Saf şeker substratlarına alternatif olarak karbon açısından zengin atıklar kullanılabilir. Böylece ucuz karbon kaynakları kullanılarak yüksek üretim maliyeti de düşürülebilir.
- Ekonomik ve çevresel performansın iyileşmesi için biyorafineri sistemleri geliştirerek, karbon kaynaklarının kullanım verimlilikleri artırılabilir.

- Elde edilen OD ve pH grafiklerinden yola çıkılarak PHB üretim verimliliğinin, pH (5) değerleriyle ilgili olabileceği düşünülmektedir. *C. necator*'un büyümesi için optimum pH seviyesi korunarak yani pH'ın düzenlediği bir sistem ile hem mikrobiyal büyüme hem de PHB birikimi arttırılması sağlanabilir. pH kontrollü biyoproseslerin geliştirilmesi ile PH değerleri üzerinde iyileştirme yapılırsa PHB verimi de arttırılabilir.
- PHB üretim verimliliğini arttırmak için biyoreaktör sistemleri kullanılabilir. Böylece endüstriyel ölçekte PHB üretim süreci analiz edilebilir.
- Biyoplastik geri dönüşümü, atık yönetimi ve PHA monomer üretimi gibi uygulamalarda PHA depolimerazların kullanımını optimize etme çalışmaları henüz erken aşamalarda. Suşların performansının, PHA depolimeraz geninin silinmesi gibi çeşitli genetik mühendisliği çalışmaları ile arttırılması mümkündür. Genetik mühendisliği araçları kullanılarak PNS bakterileri tarafından PHA üretimini iyileştirmeyi amaçlayan çalışmalar yapılabilir.
- Elde edilen polimer örneklerinin bir sonraki aşamada işlenebilirliğini tespit etmek için daha detaylı ve farklı karakterizasyon analizleri (GPC, Viskozimetri) yapılabilir. Farklı lipofilik boya kullanımı ile görüntülemeler iyileştirilebilir.
- Farklı karbon kaynaklarının bir arada bulunduğu karışık kültür ortamlarında PHB üretimi araştırılabilir. Örneğin karbon kaynağı olarak glukoz ve fruktozun birlikte kullanıldığı karışık besiyeri ortamlarında bakterilerin kültüre edilmesinin PHB üretimine etkisi deneysel çalışmalar ile incelenebilir.
- *C. necator* ile birlikte uyumlu olan ve sü krozu hidrolize edebilen bakteri (*Bacillus*) kullanımına dayalı konsorsiyum hazırlanarak fruktoz ve glikoz gibi şekerlerce zengin bir yan ürün olan melastan PHA üretimi, şeklinde çalışmalar araştırılabilir.
- Asetat organik atıkların fermentatif dönüşümünden elde edilebilen sürdürülebilir bir karbon kaynağıdır. *C. sphaeroides* asetatta en yüksek PHB verimi verdiği için, asetat atık su ve organik atıkların fermentatif dönüşümünden elde edilebilen sürdürülebilir bir karbon kaynağı olarak gelecekteki çalışmalarda optimize edilebilir ve böylece çevresel ve ekonomik sürdürülebilirlik arttırılabilir. Hem üretim maliyeti azaltılıp hem de döngüsel ekonomi yaklaşımına katkı sağlanabilir.

6. KAYNAKLAR

- Acharjee, S. A., Bharali, P., Gogoi, B., Sorhie, V., Walling, B., ve Alemtoshi. (2023). PHA-Based Bioplastic: A Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. *Water, Air, and Soil Pollution*, 234(1), 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-06029-2>
- Acharjee, S. A., Bharali, P., Ramachandran, D., Kanagasabai, V., Gogoi, M., Hazarika, S., Koch, P. J., Dutta, N., Maadurshni, G. B., Manivannan, J., Kumari, S., Walling, B., Gogoi, B., Alemtoshi, Sorhie, V., ve Vishawkarma, V. (2024). Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based sustainable bioplastic derived from *Bacillus* sp. KE4 isolated from kitchen waste effluent. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 39, 101507. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2024.101507>
- Akkoyunlu, B., Daly, S., Syron, E., ve Casey, E. (2024). Fermentation strategies for PHB production in a novel membrane bioreactor: Investigating batch and fed-batch operations. *Biochemical Engineering Journal*, 204, 109239. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109239>
- Akköse, S. (2008). *Expression Analysis Of Nitrogenase Genes In Rhodobacter Sphaeroides O.U.001 Grown Under Different Physiological Conditions* [Orta Doğu Teknik Üniversitesi]. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=BV13CP5cDIfrJaSBE_T_p_w&no=FMJ0aIsxOcysNxMoaf29Ag
- Akpınar, B. N. (2023). *Asetat Ortamında Büyütülen Rhodobacter Sphaeroides O.U. 001, Rhodopseudomonas Palustris 7850 ve Cupriavidus Necator H16 İle Polihidroksibütirat (Phb) Üretimi ve Üretilen Polimerlerin Karakterizasyonu*. Necmettin Erbakan Üniversitesi.
- Alber, B. E., Spanheimer, R., Ebenau-Jehle, C., ve Fuchs, G. (2006). Study of an alternate glyoxylate cycle for acetate assimilation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular Microbiology*, 61(2), 297-309. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05238.x>
- Alber Birgit E., Adair Jessica A., Asao Marie, Bangudi Suzy, Kotran Samuel N., ve Sandman Kathleen. (2025). Probing the core metabolism of *Cereibacter sphaeroides* by transposon mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 207(11), e00306-25. <https://doi.org/10.1128/jb.00306-25>
- Alhafiz, H. A., Longus, K., Verlinden, R. A. J., Lambauer, V., Kruschitz, A., ve Kratzer, R. (2025). Cultivation of *Cupriavidus necator* strains on hydrolyzed lignocellulosic feedstocks widely available in Europe. *Biotechnology Reports*, 47, e00899. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2025.e00899>
- Ali, I., ve Jamil, N. (2016). Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. *Frontiers in Biology*, 11(1), 19-27. <https://doi.org/10.1007/s11515-016-1389-z>

- Aljuraifani, A. A., Berekaa, M. M., ve Ghazwani, A. A. (2019). Bacterial biopolymer (polyhydroxyalkanoate) production from low-cost sustainable sources. *MicrobiologyOpen*, 8(6), e00755. <https://doi.org/10.1002/mbo3.755>
- Amer, A., ve Kim, Y. (2023). Minimizing the Lag Phase of *Cupriavidus necator* Growth under Autotrophic, Heterotrophic, and Mixotrophic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(2), e02007-22. <https://doi.org/10.1128/aem.02007-22>
- Anderson, A. J., Williams, D. R., Taidi, B., Dawes, E. A., ve Ewing, D. F. (1992). Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 9(2-4), 93-101. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05826.x>
- Aramvash, A., Akbari Shahabi, Z., Dashti Aghjeh, S., ve Ghafari, M. D. (2015). Statistical physical and nutrient optimization of bioplastic polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(7), 2307-2316. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0768-3>
- Aramvash, A., Banadkuki, N., Moazzeni-Zavareh, F., ve Hajizadeh-Turchi, S. (2015). An environment-friendly and efficient method for extraction of PHB biopolymer by non-halogenated solvents. *Journal of microbiology and biotechnology*, 25. <https://doi.org/10.4014/jmb.1505.05053>
- Arikawa, H., Matsumoto, K., ve Fujiki, T. (2017). Polyhydroxyalkanoate production from sucrose by *Cupriavidus necator* strains harboring csc genes from *Escherichia coli* W. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(20), 7497-7507. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8470-7>
- Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., ve Matsumoto, K. (2016). *Cupriavidus necator* H16'da biriken polihidroksialkanoatların moleküler ağırlığı ile poli(3-hidroksibutirat) depolimerazlar veya oligomer hidrolazlar arasındaki ilişki üzerine bir çalışma. *Journal of Biotechnology*, 227, 94-102. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.004>
- Arora, Y., Sharma, S., ve Sharma, V. (2023). Microalgae in Bioplastic Production: A Comprehensive Review. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48(6), 7225-7241. <https://doi.org/10.1007/s13369-023-07871-0>
- Atlić, A., Koller, M., Scherzer, D., Kutschera, C., Grillo-Fernandes, E., Horvat, P., Chiellini, E., ve Braunnegg, G. (2011). Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(2), 295-304. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3260-0>
- Augustine, R., Hasan, A., Patan, N. K., Dalvi, Y. B., Varghese, R., Antony, A., Unni, R. N., Sandhyarani, N., ve Moustafa, A.-E. A. (2020). Cerium Oxide Nanoparticle Incorporated Electrospun Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)

- Membranes for Diabetic Wound Healing Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 6(1), 58-70. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01352>
- Azizi, N., Najafpour, G., ve Younesi, H. (2017). Acid pretreatment and enzymatic saccharification of brown seaweed for polyhydroxybutyrate (PHB) production using *Cupriavidus necator*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101, 1029-1040. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.184>
- Azizimehr, B., Armaghani, T., Ghasemiasl, R., Kaabi Nejadian, A., ve Javadi, M. A. (2024). A comprehensive review of recent developments in hydrogen production methods using a new parameter. *International Journal of Hydrogen Energy*, 72, 716-729. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2024.05.219>
- Baei, S., Najafpour, G. D., Younesi, H., Tabandeh, F., Issazadeh, H., ve Khodabandeh, M. (2011). Growth kinetic parameters and biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* DSMZ 545 on selected substrates. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 17(1), 1-8. <https://doi.org/10.2298/CICEQ100216043B>
- Bagdadi, A. V., Safari, M., Dubey, P., Basnett, P., Sofokleous, P., Humphrey, E., Locke, I., Edirisinghe, M., Terracciano, C., Boccaccini, A. R., Knowles, J. C., Harding, S. E., ve Roy, I. (2018). Poly(3-hydroxyoctanoate), a promising new material for cardiac tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(1), e495-e512. <https://doi.org/10.1002/term.2318>
- Balasubramanian, V. K., Chellapandi, R., Balakrishnan, M., Murugan, K., Kennedy, J. P. K. J., Murugan, S., Khumalo, M. V., Sarangi, P. K., Chou, J.-Y., ve Muthuramalingam, J. B. (2024). Biosynthesis of bioplastic polyhydroxybutyrate (PHB) from microbes isolated from paddy/sugarcane fields and fabrication of biodegradable thin film. *Process Safety and Environmental Protection*, 187, 1178-1188. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.05.021>
- Bano, S., Aslam, A. A., Khan, A., Shabbir, A., Qayyum, F., Wahab, N., Jabar, A., Ul Islam, I., ve Ng, S. L. (2024). A mini-review on polyhydroxyalkanoates: Synthesis, extraction, characterization, and applications. *Process Biochemistry*, 146, 250-261. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.07.033>
- Basak, N., ve Das, D. (2007). The Prospect of Purple Non-Sulfur (PNS) Photosynthetic Bacteria for Hydrogen Production: The Present State of the Art. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 31-42. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9190-9>
- Bassous, N., Cooke, J. P., ve Webster, T. J. (2016). Enhancing Stent Effectiveness with Nanofeatures. *Methodist DeBakey Cardiovascular J*, 12(3). <https://doi.org/10.14797/mdcj-12-3-163>
- Bayon-Vicente, G., Toubeau, L., Gilson, M., G go, G., Landgey, N., Krings, S., ve Leroy, B. (2025). Metabolic pathways to sustainability: Review of purple non-sulfur bacteria potential in agri-food waste valorization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2025.1529032>

- Bellini, S., Tommasi, T., ve 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. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.100985>
- Berger, E., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C., ve Braunegg, G. (1989). PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology Techniques*, 3(4), 227-232. <https://doi.org/10.1007/BF01876053>
- Bhat, G. S., Deekshitha, B. K., Thivaharan, V., ve Divyashree, M. S. (2024). Physicochemical cell disruption of *Bacillus* sp. for recovery of polyhydroxyalkanoates: Future bioplastic for sustainability. *3 Biotech*, 14(2), 59. <https://doi.org/10.1007/s13205-024-03913-y>
- Bhatia, S. K., Yoon, J.-J., Kim, H.-J., Hong, J. W., Gi Hong, Y., Song, H.-S., Moon, Y.-M., Jeon, J.-M., Kim, Y.-G., ve Yang, Y.-H. (2018). Engineering of artificial microbial consortia of *Ralstonia eutropha* and *Bacillus subtilis* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production from sugarcane sugar without precursor feeding. *Bioresource Technology*, 257, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.056>
- Bhatia, S. K., Yoon, J.-J., Kim, H.-J., Hong, J. W., Gi Hong, Y., Song, H.-S., Moon, Y.-M., Jeon, J.-M., Kim, Y.-G., ve Yang, Y.-H. (2018). Engineering of artificial microbial consortia of *Ralstonia eutropha* and *Bacillus subtilis* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production from sugarcane sugar without precursor feeding. *Bioresource Technology*, 257, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.056>
- Blanco, I., ve Siracusa, V. (2021). The Use of Thermal Techniques in the Characterization of Bio-Sourced Polymers. *Materials*, 14(7), 1686. <https://doi.org/10.3390/ma14071686>
- Bordel, S., van Spanning, R. J. M., ve Santos-Beneit, F. (2021). Imaging and modelling of poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in *Paracoccus denitrificans*. *AMB Express*, 11(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01273-x>
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., ve Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*, 6(1), 26612. <https://doi.org/10.1038/srep26612>
- Bucci, D. Z., Tavares, L. B. B., ve Sell, I. (2007). Biodegradation and physical evaluation of PHB packaging. *Polymer Testing*, 26(7), 908-915. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2007.06.013>
- Bucknall, D. G. (2020). Plastics as a materials system in a circular economy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 378(2176), 20190268. <https://doi.org/10.1098/rsta.2019.0268>
- Buntinx, M., Vanheusden, C., ve Hermans, D. (2024). Processing and Properties of Polyhydroxyalkanoate/ZnO Nanocomposites: A Review of Their Potential as

Sustainable Packaging Materials. *Polymers*, 16(21).
<https://doi.org/10.3390/polym16213061>

- Cai, F., Lin, M., Jin, W., Chen, C., ve Liu, G. (2023). *Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxvalerate) from volatile fatty acids by Cupriavidus necator*. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200448>
- Calleja Luque, S. (2020). *State of the art in the purification of PHB's from biomass and new harmless extraction methods*. <https://hdl.handle.net/2117/341757>
- Campanale, C., Galafassi, S., Di Pippo, F., Pojar, I., Massarelli, C., ve Uricchio, V. F. (2024). A critical review of biodegradable plastic mulch films in agriculture: Definitions, scientific background and potential impacts. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 170, 117391. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117391>
- Cánovas, V., Garcia-Chumillas, S., Monzó, F., Simó-Cabrera, L., Fernández-Ayuso, C., Pire, C., ve Martínez-Espinosa, R. M. (2021). Analysis of Polyhydroxyalkanoates Granules in *Haloferax mediterranei* by Double-Fluorescence Staining with Nile Red and SYBR Green by Confocal Fluorescence Microscopy. *Polymers*, 13(10), 1582. <https://doi.org/10.3390/polym13101582>
- Cao, J.-S., Xu, R.-Z., Luo, J.-Y., Feng, Q., ve Fang, F. (2022). Rapid quantification of intracellular polyhydroxyalkanoates via fluorescence techniques: A critical review. *Bioresource Technology*, 350, 126906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126906>
- Castilho, L. R., Mitchell, D. A., ve Freire, D. M. G. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100(23), 5996-6009. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>
- Chanprateep, S., Buasri, K., Muangwong, A., ve Utiswannahakul, P. (2010). Biosynthesis and biocompatibility of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability*, 95(10), 2003-2012. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.07.014>
- Chen, Y.-T., Wu, S.-C., ve Lee, C.-M. (2012). Relationship between cell growth, hydrogen production and poly- β -hydroxybutyrate (PHB) accumulation by *Rhodopseudomonas palustris* WP3-5. *ICCE-2011*, 37(18), 13887-13894. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.06.024>
- Choe, S., Kim, Y., Won, Y., ve Myung, J. (2021). Bridging Three Gaps in Biodegradable Plastics: Misconceptions and Truths About Biodegradation. *Frontiers in Chemistry*, 9, 671750. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.671750>
- Conrad, R., ve Schlegel, H. G. (1977). Influence of Aerobic and Phototrophic Growth Conditions on the Distribution of Glucose and Fructose Carbon into the Entner-Doudoroff and Embden-Meyerhof Pathways in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Microbiology*, 101(2), 277-290. <https://doi.org/10.1099/00221287-101-2-277>

- Czemplik, M., Kulma, A., Żuk, M., Boba, A., Kostyn, K., Mituła, A., Sztajnert, M., Wróbel-Kwiatkowska, M., ve Szopa, J. (2011). Flax Engineering for Biomedical Application. İçinde S. Olsztynska ve M. Komorowska (Ed.), *Biomedical Engineering—Trends, Research and Technologies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/13570>
- Dalsasso, R. R., Pavan, F. A., Bordignon, S. E., Aragão, G. M. F. de, ve Poletto, P. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Cupriavidus necator* from sugarcane vinasse and molasses as mixed substrate. *Process Biochemistry*, 85, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.007>
- Dalton, B., Bhagabati, P., Micco, J. D., Padamati, R. B., ve O'Connor, K. (2022). A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications. *Catalysts*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/catal12030319>
- Dartailh, C., Blunt, W., Sharma, P. K., Liu, S., Cicek, N., ve Levin, D. B. (2021). The Thermal and Mechanical Properties of Medium Chain-Length Polyhydroxyalkanoates Produced by *Pseudomonas putida* LS46 on Various Substrates. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.617489>
- Das, A., Ringu, T., Ghosh, S., ve Pramanik, N. (2023). A comprehensive review on recent advances in preparation, physicochemical characterization, and bioengineering applications of biopolymers. *Polymer Bulletin (Berlin, Germany)*, 80(7), 7247-7312. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04443-4>
- Diankristanti, P. A., Lin, Y.-C., Yi, Y.-C., ve Ng, I.-S. (2024). Polyhydroxyalkanoates bioproduction from bench to industry: Thirty years of development towards sustainability. *Bioresource Technology*, 393, 130149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130149>
- Dias, J. M. L., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G. E., Ramos, A. M., Oliveira, R., ve Reis, M. A. M. (2006). *Recent Advances in Polyhydroxyalkanoate Production by Mixed Aerobic Cultures: From the Substrate to the Final Product*. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600112>
- Dietrich, K., Dumont, M.-J., Del Rio, L. F., ve Orsat, V. (2017). Producing PHAs in the bioeconomy—Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Utilisation of Waste*, 9, 58-70. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>
- Doelle, H. W. (2014). *Bacterial Metabolism*. Academic Press.
- Doi, Y. (1990). *Microbial polyesters*. Vch.
- Doi, Y., Mukai, K., Kasuya, K., ve Yamada, K. (1994). Biodegradation of Biosynthetic and Chemosynthetic Polyhydroxyalkanoates. İçinde Y. Doi ve K. Fukuda (Ed.), *Studies in Polymer Science* (C. 12, ss. 39-51). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81708-2.50010-5>

- Domínguez-Díaz, M., Meneses-Acosta, A., Romo-Urbe, A., Peña, C., Segura, D., ve Espin, G. (2015). Thermo-mechanical properties, microstructure and biocompatibility in poly- β -hydroxybutyrates (PHB) produced by OP and OPN strains of *Azotobacter vinelandii*. *European Polymer Journal*, 63, 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.12.002>
- Drusilla Wendy, Y. B., Nor Fauziah, M. Z., Siti Baidurah, Y., Tong, W. Y., ve Lee, C. K. (2022). Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) BY *Burkholderia cepacia* BPT1213 using waste glycerol as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 41, 102310. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102310>
- Dulac, L., Kedzierski, M., ve Bruzard, S. (2025). A critical review of the state of knowledge on factors responsible for the degradation in soils of polyhydroxyalkanoates. *Polymer Testing*, 149, 108861. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2025.108861>
- Eesaee, M., Ghassemi, P., Nguyen, D. D., Thomas, S., Elkoun, S., ve Nguyen-Tri, P. (2022). Morphology and crystallization behaviour of polyhydroxyalkanoates-based blends and composites: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 187, 108588. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108588>
- Elsayed, N. S., Aboshanab, K. M., Yassien, M. A., ve Hassouna, N. A. (2018). Kinetic modeling, recovery, and molecular characterization of poly-beta-hydroxybutyrate polymer in *Acinetobacter baumannii* isolate P39. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(12), 1779-1791. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2000-6>
- Erb, T. J., Berg, I. A., Brecht, V., Müller, M., Fuchs, G., ve Alber, B. E. (2007). Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: The ethylmalonyl-CoA pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10631-10636. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702791104>
- Erb, T. J., Fuchs, G., ve Alber, B. E. (2009). (2S)-Methylsuccinyl-CoA dehydrogenase closes the ethylmalonyl-CoA pathway for acetyl-CoA assimilation. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2009.06837.x>
- Ertan, F., Keskinler, B., ve Tanriseven, A. (2021). Exploration of *Cupriavidus necator* ATCC 25207 for the Production of Poly(3-hydroxybutyrate) Using Acid Treated Beet Molasses. *Journal of Polymers and the Environment*, 29(7), 2111-2125. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-02020-2>
- Estrela, C., Estrela, C. R. A., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., ve Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*, 13, 113-117. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000200007>
- Fales, L., Kryszak, L., ve Zeilstra-Ryalls, J. (2001). Control of hemA Expression in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: Effect of a Transposon Insertion in the hbdA Gene. *Journal of Bacteriology*, 183(5), 1568-1576. <https://doi.org/10.1128/jb.183.5.1568-1576.2001>

- Fiorese, M. L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A. M., Aragão, G. M. F. de, ve Reis, M. A. M. (2009). *Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from Cupriavidus necator biomass by solvent extraction with 1,2-propylene carbonate*. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900034>
- Frone, A. N., Batalu, D., Chiulan, I., Oprea, M., Gabor, A. R., Nicolae, C.-A., Raditoiu, V., Trusca, R., ve Panaitescu, D. M. (2019). Morpho-Structural, Thermal and Mechanical Properties of PLA/PHB/Cellulose Biodegradable Nanocomposites Obtained by Compression Molding, Extrusion, and 3D Printing. *Nanomaterials*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/nano10010051>
- Galgut, P., Pitrola, R., Waite, I., Doyle, C., ve Smith, R. (1991). Histological evaluation of biodegradable and non-degradable membranes placed transcutaneously in rats. *Journal of Clinical Periodontology*, 18(8), 581-586. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1991.tb00093.x>
- Getachew, A., ve Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, 9(1), 509. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
- González, E., García-Martín, A., Bolívar, J. M., Ladero, M., ve Santos, V. E. (2026). Modelling growth-arrested production of polyhydroxybutyrate by *Cupriavidus necator* DSM 545. *Process Biochemistry*, 161, 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.12.018>
- Gottschalk, G., Eberhardt, U., ve Schlegel, H. G. (1964). Verwertung von Fructose durch *Hydrogenomonas* H16 (I.). *Archiv für Mikrobiologie*, 48(1), 95-108. <https://doi.org/10.1007/BF00406600>
- Gregory, D. A., Taylor, C. S., Fricker, A. T. R., Asare, E., Tetali, S. S. V., Haycock, J. W., ve Roy, I. (2022). Polyhydroxyalkanoates and their advances for biomedical applications. *Trends in Molecular Medicine*, 28(4), 331-342. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.01.007>
- Grigore, M. E., Grigorescu, R. M., Iancu, L., Ion, R.-M., Zaharia, C., ve Andrei, E. R. (2019). Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(9), 695-712. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1605866>
- Grochowicz, M., ve Kierys, A. (2017). TG/DSC/FTIR studies on the oxidative decomposition of polymer-silica composites loaded with sodium ibuprofen. *Polymer Degradation and Stability*, 138, 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2017.03.007>
- Gu, P., Li, F., Huang, Z., ve Gao, J. (2024). Application of Acetate as a Substrate for the Production of Value-Added Chemicals in *Escherichia coli*. *Microorganisms*, 12(2), 309. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020309>
- Guerrini, S., Borreani, G., ve Voojjs, H. (2017). Biodegradable Materials in Agriculture: Case Histories and Perspectives. İçinde M. Malinconico (Ed.), *Soil Degradable*

Bioplastics for a Sustainable Modern Agriculture (ss. 35-65). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54130-2_3

- Gutschmann, B., Bock, M. C. E., Jahns, S., Neubauer, P., Brigham, C. J., ve Riedel, S. L. (2021). Untargeted metabolomics analysis of *Ralstonia eutropha* during plant oil cultivations reveals the presence of a fucose salvage pathway. *Scientific Reports*, 11(1), 14267. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93720-9>
- Hablot, E., Bordes, P., Pollet, E., ve Avérous, L. (2008). Thermal and thermo-mechanical degradation of poly(3-hydroxybutyrate)-based multiphase systems. *Polymer Degradation and Stability*, 93(2), 413-421. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.018>
- Hahn, S., Chang, Y., Kim, B. S., Lee, K., ve Chang, H. (1993). The Recovery of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechnol Tech*, 7, 209-212. <https://doi.org/10.1007/BF02566149>
- Hashizume, T., Yamagami, T., ve Sasaki, Y. (1967). Constituents of Cane Molasses: Part II. Separation and Identification of the Phenolic Compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 31(3), 324-329. <https://doi.org/10.1080/00021369.1967.10858815>
- Hathi, Z. J., Haque, M. A., Priya, A., Qin, Z., Huang, S., Lam, C. H., Ladakis, D., Pateraki, C., Mettu, S., Koutinas, A., Du, C., ve Lin, C. S. K. (2022). Fermentative bioconversion of food waste into biopolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) using *Cupriavidus necator*. *Environmental Research*, 215, 114323. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114323>
- Hectors, W., Delmulle, T., ve Soetaert, W. K. (2025). Metabolic Engineering Strategies for Enhanced Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production in *Cupriavidus necator*. *Polymers*, 17(15), 2104. <https://doi.org/10.3390/polym17152104>
- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., ve Steinbüchel, A. (2012). Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*, 2, 59. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-59>
- Hendy, M. H., Shehabeldine, A. M., Hashem, A. H., El-Sayed, A. F., ve El-Sheikh, H. H. (2025). Optimization and characterization of polyhydroxybutyrate produced by *Halomonas meridiana* using orange peel waste. *BMC Microbiology*, 25(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-04007-2>
- Hong, S. J., Ahn, K., Kim, J. T., ve Kim, Y.-T. (2025). Polyhydroxyalkanoates for sustainable food packaging: A comprehensive review on production, applications, and end-of-life scenarios for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 165, 105294. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2025.105294>
- Hong, S.-G., Lin, Y.-C., ve Lin, C.-H. (2008). Crystallization and degradation behaviors of treated polyhydroxybutyrates. *Reactive and Functional Polymers*, 68(11), 1516-1523. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.08.003>

- Hosseini, R., ve Nazari, J. (2025). Biopolymer production from sugar beet molasses by *Staphylococcus aureus*: PHB/PHBV characterization and potential for degradable plastics. *Industrial Crops and Products*, 238, 122342. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2025.122342>
- Hustede, E., Steinbüchel, A., ve Schlegel, H. G. (1993). Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 87-93. <https://doi.org/10.1007/BF00166854>
- Imam, S. H., Chen, L., Gordon, S. H., Shogren, R. L., Weisleder, D., ve Greene, R. V. (1998). Biodegradation of Injection Molded Starch-Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Blends in a Natural Compost Environment. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 6(2), 91-98. <https://doi.org/10.1023/A:1022806222158>
- Israni, N., Thapa, S., ve Shivakumar, S. (2018). Biolitic extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Bacillus megaterium* Ti3 using the lytic enzyme of *Streptomyces albus* Tia1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.07.004>
- Jacquel, N., Lo, C.-W., Wei, Y.-H., Wu, H.-S., ve Wang, S. S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15-27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>
- Jawed, K., Irorere, V. U., Bommareddy, R. R., Minton, N. P., ve Kovács, K. (2022). Establishing Mixotrophic Growth of *Cupriavidus necator* H16 on CO₂ and Volatile Fatty Acids. *Fermentation*, 8(3), 125. <https://doi.org/10.3390/fermentation8030125>
- Jayarathna, S., Andersson, M., ve Andersson, R. (2022). Recent Advances in Starch-Based Blends and Composites for Bioplastics Applications. *Polymers*, 14(21), Article 21. <https://doi.org/10.3390/polym14214557>
- Jendrossek, D., Selchow, O., ve Hoppert, M. (2007). Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), 586-593. <https://doi.org/10.1128/AEM.01839-06>
- Jiang, L., Luo, Z., Loh, X. J., Wu, Y.-L., ve Li, Z. (2019). PHA-Based Thermogel as a Controlled Zero-Order Chemotherapeutic Delivery System for the Effective Treatment of Melanoma. *ACS Applied Bio Materials*, 2(8), 3591-3600. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00467>
- Jiang, N., Wang, M., Song, L., Yu, D., Zhou, S., Li, Y., Li, H., ve Han, X. (2023). Polyhydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* based on genes related to synthesis pathway of PHB from *Massilia* sp. UMI-21. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02142-x>
- Jiang, Y., Mikova, G., Kleerebezem, R., van der Wielen, L. A., ve Cuellar, M. C. (2015). Feasibility study of an alkaline-based chemical treatment for the purification of

- polyhydroxybutyrate produced by a mixed enriched culture. *AMB Express*, 5(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0096-5>
- Jin, A., Pérez, G., Ilarduya, A. M. de, Valle, L. J. del, ve Puiggali, J. (2024). Characterization and Biomedical Applications of Electrospun PHBV Scaffolds Derived from Organic Residues. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1). <https://doi.org/10.3390/ijms26010180>
- Jo, S. Y., Sohn, Y. J., Park, S. Y., Son, J., Yoo, J. I., Baritugo, K.-A., David, Y., Kang, K. H., Kim, H., Choi, J., Rhie, M. N., Kim, H. T., Joo, J. C., ve Park, S. J. (2021). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sugarcane molasses by recombinant *Ralstonia eutropha* strains. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 38(7), 1452-1459. <https://doi.org/10.1007/s11814-021-0783-7>
- Juengert, J. R., Bresan, S., ve Jendrossek, D. (2018). Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) Content in *Ralstonia eutropha* Using Gas Chromatography and Nile Red Staining. *Bio-protocol*, 8(5), e2748. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2748>
- Jung, H.-R., Jeon, J.-M., Yi, D.-H., Song, H.-S., Yang, S.-Y., Choi, T.-R., Bhatia, S. K., Yoon, J.-J., Kim, Y.-G., Brigham, C. J., ve Yang, Y.-H. (2019). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolymer production from volatile fatty acids using engineered *Ralstonia eutropha*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.091>
- Jung, Y.-M., ve 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. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80080-8)
- Kaplan, D. L. (1998). Introduction to Biopolymers from Renewable Resources. İçinde D. L. Kaplan (Ed.), *Biopolymers from Renewable Resources* (ss. 1-29). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-03680-8_1
- Karasik, R., Lauer, N. E., Baker, A.-E., Lisi, N. E., Somarelli, J. A., Eward, W. C., Fürst, K., ve Dunphy-Daly, M. M. (2023). Inequitable distribution of plastic benefits and burdens on economies and public health. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1017247>
- Kargupta, T., Pooja, N., Rahman, Md. H., Vij, I., Biswas, R., Roy, S., ve Mazumder, N. (2025). An insight into thermal, chemical, and structural characterization of biopolymers. *Discover Applied Sciences*, 7(8), 865. <https://doi.org/10.1007/s42452-025-07549-2>
- Kaur, R., Pathak, L., ve Vyas, P. (2024). Biobased polymers of plant and microbial origin and their applications—A review. *Biotechnology for Sustainable Materials*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s44316-024-00014-x>
- Ke, Y., Zhang, X. Y., Ramakrishna, S., He, L. M., ve Wu, G. (2017). Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application. *Recent*

Advances in Biomedical Materials, 70, 1107-1119.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.114>

- Kemavongse, K., Prasertsan, P., Upaichit, A., ve Methacanon, P. (2007). *Effect of co-substrate on production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and copolymer PHBV from newly identified mutant Rhodobacter sphaeroides U7 cultivated under aerobic-dark condition*. 29(4).
- Kettner, A., ve Griehl, C. (2020). The use of LipidGreen2 for visualization and quantification of intracellular Poly(3-hydroxybutyrate) in *Cupriavidus necator*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24, 100819.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100819>
- Khanna, S., ve Srivastava, A. K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry*, 40(6), 2173-2182. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.08.011>
- Khatami, K., Perez-Zabaleta, M., ve Cetecioglu, Z. (2022). Pure cultures for synthetic culture development: Next level municipal waste treatment for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Environmental Management*, 305, 114337. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114337>
- Khatipov, E., Miyake, M., Miyake, J., ve Asada, Y. (2006). *Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate by Rhodobacter sphaeroides on various carbon and nitrogen substrates*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12976.x>
- Khonde, V., Deshpande, M., Mahajan, D., Tellis, M., Kumbhar, P., ve Ghosalkar, A. (2025). Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* using sucrose phosphorylase pathway for polyhydroxybutyrate production from sucrose. *Journal of Biotechnology*, 407, 22-30.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.08.002>
- Kim, M.-S., Kim, D.-H., Cha, J., ve Lee, J. K. (2012). Effect of carbon and nitrogen sources on photo-fermentative H₂ production associated with nitrogenase, uptake hydrogenase activity, and PHB accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* KD131. *Bioresource Technology*, 116, 179-183.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.011>
- Kim, M.-S., Kim, D.-H., Son, H.-N., Ten, L. N., ve Lee, J. K. (2011). Enhancing photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* KD131 and its PHB synthase deleted-mutant from acetate and butyrate. *2010 Asian/APEC BioH2*, 36(21), 13964-13971. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.099>
- Kischkel, S., Grabow, N., Püschel, A., Erdle, B., Kabelitz, M., Martin, D. P., Williams, S. F., Bombor, I., Sternberg, K., Schmitz, K.-P., Schareck, W., ve Bünger, C. M. (2016). Biodegradable polymeric stents for vascular application in a porcine carotid artery model. *Gefasschirurgie*, 21(Suppl 1), 30-36.
<https://doi.org/10.1007/s00772-015-0011-z>

- Kjeldsen, A., Price, M., Lilley, C., Guźniczak, E., ve Archer, I. (2018). *A review of standards for biodegradable plastics*.
- Kobayashi, J., ve 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, 40. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1088-y>
- Koku, H., Eroğlu, İ., Gündüz, U., Yücel, M., ve Türker, L. (2002). Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *International Journal of Hydrogen Energy, BIOHYDROGEN* 2002, 27(11), 1315-1329. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00127-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00127-1)
- Koller, M. (2019). Chemical and Biochemical Engineering Approaches in Manufacturing Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters of Tailored Structure with Focus on the Diversity of Building Blocks. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 32(4), 413-438. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1385>
- Koller, M. (2020). Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters from surrounding microbial biomass. *The EuroBiotech Journal*, 4(3), 113-126. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2020-0013>
- Koning, E. A. de, Panjalingam, M., Tran, J., Eckhart, M. R., Dahlberg, P. D., ve Shapiro, L. (2023). *The Biogenesis of Bacterial PHB Granules* (s. 2023.07.06.548030). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.07.06.548030>
- Kostopoulos, L., ve Karring, T. (1994). Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clinical Oral Implants Research*, 5(2), 66-74. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1994.050202.x>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., ve Reis, M. A. M. (2017). Recent Advances and Challenges towards Sustainable Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production. *Bioengineering*, 4(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Krasil'nikova, E. N., Mil'ko, E. S., Keppen, O. I., Lebedeva, N. V., ve Ivanovskii, R. N. (2015). Poly-β-hydroxybutyrate accumulation by *Rhodobacter sphaeroides* phase variants. *Microbiology*, 84(3), 347-350. <https://doi.org/10.1134/S002626171503011X>
- Kumar, M., Rathour, R., Singh, R., Sun, Y., Pandey, A., Gnansounou, E., Andrew Lin, K.-Y., Tsang, D. C. W., ve Thakur, I. S. (2020). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, 263, 121500. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>
- Kumar, P., ve Kim, B. S. (2018). Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269, 544-556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.120>

- Kurian, N. S., ve 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>
- Küçük, Ç. (2017). Yabani Vicia Aintabensis Boiss. ve Hausskn. Ex Boiss Kök Nodüllerinden İzole Edilen Rhizobium Frank İzolatlarının Tuz Toleransı Ve Phb Üretimi. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(1), Article 1. <https://doi.org/10.23902/trkjnat.304384>
- Laycock, B., Nikolić, M., Colwell, J. M., Gauthier, E., Halley, P., Bottle, S., ve George, G. (2017). Lifetime prediction of biodegradable polymers. *Topical Volume on Polymeric Biomaterials*, 71, 144-189. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.02.004>
- Lee, I. Y., Kim, M. K., Park, Y. H., ve Lee, S. Y. (1996). Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant Escherichia coli. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(6), 707-712. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19961220\)52:6<707::AID-BIT8>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19961220)52:6<707::AID-BIT8>3.0.CO;2-S)
- Lee, M. S., ve Salleh, K. M. (2025). An overview on microalgal polyhydroxybutyrate (PHB) production and improvement of mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 320, 146056. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146056>
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 14(11), 431-438. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)10061-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)10061-5)
- Lee, Y. R., Fitriana, H. N., Lee, S. Y., Kim, M.-S., Moon, M., Lee, W.-H., Lee, J.-S., ve Lee, S. (2020). Molecular Profiling and Optimization Studies for Growth and PHB Production Conditions in Rhodobacter sphaeroides. *Energies*, 13(23), 6471. <https://doi.org/10.3390/en13236471>
- Leenstra, T. S., Kuijpers-Jagtman, A. M., ve Maltha, J. C. (1998). The healing process of palatal tissues after palatal surgery with and without implantation of membranes: An experimental study in dogs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(5), 249-255. <https://doi.org/10.1023/A:1008848509911>
- Li, D., Yang, Y., Liu, R., Wu, Y., ve Guo, F. (2025). Review of Biopolymer Polyhydroxybutyrate (PHB) and Blends: Modification of Thermal and Mechanical Properties via Additive Manufacturing Processing. *Polymers*, 17(22). <https://doi.org/10.3390/polym17223083>
- Li, J., ve Stoliarov, S. I. (2014). Measurement of kinetics and thermodynamics of the thermal degradation for charring polymers. *Polymer Degradation and Stability, Special Issue Based on the 14th European meeting on Fire Retardancy and Protection of Materials, held at Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille (U. Lille-1), France, July 2013*, 106, 2-15. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.09.022>

- Li, Z., ve Loh, X. J. (2015). Water soluble polyhydroxyalkanoates: Future materials for therapeutic applications. *Chemical Society Reviews*, 44(10), 2865-2879. <https://doi.org/10.1039/C5CS00089K>
- Li, Z., Yang, J., ve Loh, X. J. (2016). Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials*, 8(4), e265-e265. <https://doi.org/10.1038/am.2016.48>
- Liebergessell, M., Hustede, E., Timm, A., Steinbüchel, A., Fuller, R. C., Lenz, R. W., ve Schlegel, H. G. (1991). Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. *Archives of Microbiology*, 155(5), 415-421. <https://doi.org/10.1007/BF00244955>
- Lin, Y.-C., ve Ng, I.-S. (2025). Rewiring *Cupriavidus necator* for Enhanced Polyhydroxybutyrate Production via Genetic Toolkits and Feeding Strategy. *Biotechnology and Bioengineering*, 122(9), 2535-2545. <https://doi.org/10.1002/bit.29043>
- Liu, T., Zhu, L., Wei, W., ve Zhou, Z. (2014). Function of glucose catabolic pathways in hydrogen production from glucose in *Rhodobacter sphaeroides* 6016. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(9), 4215-4221. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.12.188>
- Lorrungruang, C., Martthong, J., Sasaki, K., ve Noparatnaraporn, N. (2006). Selection of photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* 14F for polyhydroxyalkanoate production with two-stage aerobic dark cultivation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(2), 128-131. <https://doi.org/10.1263/jbb.102.128>
- Lv, X., Xie, W., Lu, W., Guo, F., Gu, J., Yu, H., ve Ye, L. (2014). Enhanced isoprene biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by engineering of the native acetyl-CoA and mevalonic acid pathways with a push-pull-restrain strategy. *Journal of Biotechnology*, 186, 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.06.024>
- Maddalwar, S., Kumar Nayak, K., Kumar, M., ve Singh, L. (2021). Plant microbial fuel cell: Opportunities, challenges, and prospects. *Bioresource Technology*, 341, 125772. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125772>
- Mandragutti, T., Jarso, T. S., Godi, S., Begum, S. S., ve K, B. (2024). Physicochemical characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by the rare halophile *Brachybacterium paraconglomeratum* MTCC 13074. *Microbial Cell Factories*, 23(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02324-1>
- Marichelvam, M. K., Jawaid, M., ve Asim, M. (2019). Corn and Rice Starch-Based Bio-Plastics as Alternative Packaging Materials. *Fibers*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/fib7040032>
- Markl, E. (2018). PHB - Bio Based and Biodegradable Replacement for PP: A Review. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science*, 2(5). <https://doi.org/10.31031/NTNF.2018.02.000546>

- Martínez, M. de los Á. M., Urzúa, L. S., Carrillo, Y. A., Ramírez, M. B., ve Morales, L. J. M. (2023). Polyhydroxybutyrate Metabolism in *Azospirillum brasilense* and Its Applications, a Review. *Polymers*, 15(14), Article 14. <https://doi.org/10.3390/polym15143027>
- Martinez, V., ve Henary, M. (2016). Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 22(39), 13764-13782. <https://doi.org/10.1002/chem.201601570>
- Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Rutiaga-Quiñones, O. M., de Luna-Santillana, E. de J., ve Elufisan, T. O. (2023). *Bacillus cereus*'ün polihidroksialkanoat (PHA) üreticisi olarak kapsamlı bir görünümü: Petroplastiklere umut vadeden bir alternatif. *Process Biochemistry*, 129, 281-292. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.03.032>
- Marudkla, J., Lee, W.-C., Wannawilai, S., Chisti, Y., ve Sirisansaneeyakul, S. (2018). Model of acetic acid-affected growth and poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* DSM 545. *Journal of Biotechnology*, 268, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.01.004>
- Mascarenhas, J., ve K, A. (2021). Production and Optimization of Polyhydroxyalkanoate Obtained from *Bacillus megaterium* JHA. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 8(4). <https://doi.org/10.30491/jabr.2020.242493.1263>
- McAdam, B., Brennan Fournet, M., McDonald, P., ve Mojicevic, M. (2020). Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics. *Polymers*, 12(12), 2908. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M. A. M., ve 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, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.018>
- Mongili, B., Abdel Azim, A., Fraterrigo Garofalo, S., Batuecas, E., Re, A., Bocchini, S., ve Fino, D. (2021). Novel insights in dimethyl carbonate-based extraction of polyhydroxybutyrate (PHB). *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01849-y>
- Monroy, I., ve 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>
- Moriuchi, R., Dohra, H., Kanesaki, Y., ve Ogawa, N. (2019). Complete Genome Sequence of 3-Chlorobenzoate-Degrading Bacterium *Cupriavidus necator* NH9 and Reclassification of the Strains of the Genera *Cupriavidus* and *Ralstonia* Based on Phylogenetic and Whole-Genome Sequence Analyses. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00133>

- Morlino, M. S., Serna García, R., Savio, F., Zampieri, G., Morosinotto, T., Treu, L., ve Campanaro, S. (2023). Cupriavidus necator as a platform for polyhydroxyalkanoate production: An overview of strains, metabolism, and modeling approaches. *Biotechnology Advances*, 69, 108264. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108264>
- Mozejko-Ciesielska, J., Szacherska, K., ve Marciniak, P. (2019). Pseudomonas Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(6), 1151-1166. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01422-1>
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., ve Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 56-77. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
- Mukai, K., Yamada, K., ve Doi, Y. (1993). Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(6), 361-366. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(93\)90054-P](https://doi.org/10.1016/0141-8130(93)90054-P)
- Mulchandani, A., Luong, J. H. T., ve Groom, C. (1989). Substrate inhibition kinetics for microbial growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid by Alcaligenes eutrophus ATCC 17697. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 11-17. <https://doi.org/10.1007/BF00255990>
- Murugan, P., Gan, C.-Y., ve Sudesh, K. (2017). Biosynthesis of P(3HB-co-3HHx) with improved molecular weights from a mixture of palm olein and fructose by Cupriavidus necator Re2058/pCB113. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1112-1119. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.006>
- Najar, I. N., Sharma, P., Das, R., Mondal, K., Singh, A. K., Tamang, S., Hazra, P., Thakur, N., Bhanwaria, R., Gandhi, S. G., ve Kumar, V. (2024). In search of poly-3-hydroxybutyrate (PHB): A comprehensive review unveiling applications and progress in fostering a sustainable bio-circular economy. *Food and Bioprocess Processing*, 148, 11-30. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.08.011>
- Narayanan, M., Kandasamy, S., Kumarasamy, S., Gnanavel, K., Ranganathan, M., ve Kandasamy, G. (2020). Screening of polyhydroxybutyrate producing indigenous bacteria from polluted lake soil. *Heliyon*, 6(10), e05381. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05381>
- Nomanbhay, S. M., Hussain, R., ve Palanisamy, K. (2013). Microwave-Assisted Alkaline Pretreatment and Microwave Assisted Enzymatic Saccharification of Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber for Enhanced Fermentable Sugar Yield. *Journal of Sustainable Bioenergy Systems*, 3(1), 7-17. <https://doi.org/10.4236/jsbs.2013.31002>
- Novikova, L. N., Pettersson, J., Brohlin, M., Wiberg, M., ve Novikov, L. N. (2008). Biodegradable poly- β -hydroxybutyrate scaffold seeded with Schwann cells to

- promote spinal cord repair. *Biomaterials*, 29(9), 1198-1206. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.033>
- Numata, K., Abe, H., ve Iwata, T. (2009). Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) Materials. *Materials*, 2(3), 1104-1126. <https://doi.org/10.3390/ma2031104>
- Nygaard, D., Yashchuk, O., ve Hermida, É. B. (2019). Evaluation of culture medium on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: Application of the response surface methodology. *Heliyon*, 5(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01374>
- Nygaard, D., Yashchuk, O., ve Hermida, É. B. (2021). PHA granule formation and degradation by *Cupriavidus necator* under different nutritional conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 61(9), 825-834. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100184>
- Nygaard, D., Yashchuk, O., Nosedá, D. G., Araoz, B., ve 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), e05979. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05979>
- Olayiwola, O. S., Olaniyi, O. O., Odunmbaku, E., Fadipe, T. O., Oyinloye, G. O., Amoo, R. A., ve Odeshi, T. A. (2026). Valorization of agricultural residues for bioplastic production by bacteria isolated from plastic dumpsites: Integrating waste streams into the circular bioeconomy. *Biotechnology Reports*, 49, e00941. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2025.e00941>
- Orimi, H. G., Amani, H., ve Safaeian, S. (2025). Production of an environmentally friendly biodegradable cellulose crystalline nanocomposite based on PHB obtained from *Cupriavidus necator* for developing the shelf life of food products. *Polymer*, 338, 129033. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2025.129033>
- Orita, I., Iwazawa, R., Nakamura, S., ve Fukui, T. (2012). Identification of mutation points in *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 and genetic reconstitution of glucose-utilization ability in wild strain H16 for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113(1), 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.014>
- Özsoy Demiriz, B., Kars, G., Yücel, M., Eroğlu, İ., ve Gündüz, U. (2019). Hydrogen and poly-β-hydroxybutyric acid production at various acetate concentrations using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. *International Journal of Hydrogen Energy, Special Issue on Waste to Hydrogen*, 44(32), 17269-17277. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.02.036>
- Paloyan, A., Tadevosyan, M., Ghevondyan, D., Khoyetsyan, L., Karapetyan, M., Margaryan, A., Antranikian, G., ve Panosyan, H. (2025). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates: Current state and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1542468>
- Park, S. J., Jang, Y.-A., Noh, W., Oh, Y. H., Lee, H., David, Y., Baylon, M. G., Shin, J., Yang, J. E., Choi, S. Y., Lee, S. H., ve Lee, S. Y. (2014). *Metabolic engineering*

of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. <https://doi.org/10.1002/bit.25469>

- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.-A., ve Gruss, A. (2012). Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(Volume 3, 2012), 37-58. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255>
- Peng, L., Fu, D., Qi, H., Lan, C. Q., Yu, H., ve Ge, C. (2020). Micro- and nano-plastics in marine environment: Source, distribution and threats — A review. *Science of The Total Environment*, 698, 134254. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134254>
- Peoples, O. P., ve Sinskey, A. J. (1989). Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC)*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(26), 15298-15303. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84825-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84825-1)
- Pinaeva, L. G., ve Noskov, A. S. (2024). Biodegradable biopolymers: Real impact to environment pollution. *Science of The Total Environment*, 947, 174445. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174445>
- Pohlmann, A., Fricke, W. F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B., ve Bowien, B. (2006). Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1257-1262. <https://doi.org/10.1038/nbt1244>
- Pooja, N., Chakraborty, I., Rahman, Md. H., ve Mazumder, N. (2023). An insight on sources and biodegradation of bioplastics: A review. *3 Biotech*, 13(7), 220. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03638-4>
- Porras, M. A., Villar, M. A., ve Cubitto, M. A. (2018). Improved intracellular PHA determinations with novel spectrophotometric quantification methodologies based on Sudan black dye. *Journal of Microbiological Methods*, 148, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.03.008>
- Pradhan, S., Borah, A. J., Poddar, M. K., Dikshit, P. K., Rohidas, L., ve 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, Special Issue on International Conference on Current Trends in Biotechnology & post ICCB-2016 conference on Strategies for Environmental Protection and Management (ICSEPM-2016)*, 242, 304-310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.117>
- Pradhan, S., Dikshit, P. K., ve Moholkar, V. S. (2018). Production, ultrasonic extraction, and characterization of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) using *Bacillus megaterium* and *Cupriavidus necator*. *Polymers for Advanced Technologies*, 29(8), 2392-2400. <https://doi.org/10.1002/pat.4351>

- Pramanik, N., Das, R., Rath, T., ve Kundu, P. P. (2014). Microbial Degradation of Linseed Oil-Based Elastomer and Subsequent Accumulation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Copolymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(4), 1613-1630. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1061-5>
- Pulingam, T., Appaturi, J. N., Parumasivam, T., Ahmad, A., ve Sudesh, K. (2022). Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoate in Tissue Engineering. *Polymers*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/polym14112141>
- Purama, R. K., Al-Sabahi, J. N., ve Sudesh, K. (2018). Evaluation of date seed oil and date molasses as novel carbon sources for the production of poly(3Hydroxybutyrate-co-3Hydroxyhexanoate) by *Cupriavidus necator* H16 Re 2058/pCB113. *Industrial Crops and Products*, 119, 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.013>
- Raberg, M., Peplinski, K., Heiss, S., Ehrenreich, A., Voigt, B., Döring, C., Bömeke, M., Hecker, M., ve Steinbüchel, A. (2011). Proteomic and Transcriptomic Elucidation of the Mutant *Ralstonia eutropha* G+1 with Regard to Glucose Utilization. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(6), 2058-2070. <https://doi.org/10.1128/AEM.02015-10>
- Rao, U., Sridhar, R., ve Sehgal, P. K. (2010). Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochemical Engineering Journal*, 49(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.005>
- Ray, S., ve Kalia, V. C. (2017). Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology*, 57(3), 261-269. <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0651-7>
- Reeve, M. S. (1993). *Biodegradable polyesters: Block copolymer and stereocopolymer design and characterization* [Ph.D.]. <https://www.proquest.com/pqdtglobal/docview/304075409/abstract/62698329C792468APQ/18>
- Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578-592. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2354>
- Rehm, B. H. A., ve Steinbüchel, A. (1999). Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1), 3-19. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00010-0)
- Ren, H., ve Ninomiya, K. (2025). Acetate-mediated two-stage microbial production of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) from CO₂ and H₂ using a synthetic medium free of vitamins and cysteine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 140(1), 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2025.04.004>
- Reusch, R. N. (2000). *Transmembrane Ion Transport by Polyphosphate/ Poly-(R)-3-hydroxybutyrate Complexes*. 65(3).

- Rond'ošová, S., Legerská, B., Chmelová, D., Ondrejovič, M., ve Miertuš, S. (2022). Optimization of Growth Conditions to Enhance PHA Production by *Cupriavidus necator*. *Fermentation*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/fermentation8090451>
- Rosa, D. S., Lotto, N. T., Lopes, D. R., ve Guedes, C. G. F. (2004). The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate) and poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate). *Polymer Testing*, 23(1), 3-8. [https://doi.org/10.1016/S0142-9418\(03\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9418(03)00042-4)
- Sabancı, Ş. (2015). *Mikrokristalin Selüloz Ve Odun Unu İlaveli Polihidroksibütirat (Phb) Kompozitlerinin Solvent Yöntemiyle Hazırlanması Ve Karakterizasyonu*. Bartın Üniversitesi.
- Sabapathy, P. C., Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., Zabeed, H. M., ve Qi, X. (2020). Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review. *Bioresource Technology*, 306, 123132. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123132>
- Sabarinathan, D., Chandrika, S. P., Venkatraman, P., Easwaran, M., Sureka, C. S., ve Preethi, K. (2018). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection. *Informatics in Medicine Unlocked*, 11, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2018.04.009>
- Sachan, R. S. K., Kumar, A., Karnwal, A., Paramasivam, P., Agrawal, A., ve Ayanie, A. G. (2025). Screening and characterization of PHA producing bacteria from sewage water identifying *Bacillus paranthracis* RSKS-3 for bioplastic production. *BMC Microbiology*, 25(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03841-8>
- Saier, M. H., Feucht, B. U., ve Roseman, S. (1971). Phosphoenolpyruvate-dependent Fructose Phosphorylation in Photosynthetic Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 246(24), 7819-7821. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)45849-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45849-3)
- Samrot, A. V., Samanvitha, S. K., Shobana, N., Renitta, E. R., Senthilkumar, P., Kumar, S. S., Abirami, S., Dhiva, S., Bavanilatha, M., Prakash, P., Saigeetha, S., Shree, K. S., ve 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., ve Prasertsan, P. (2007). Optimization of polyhydroxybutyrate production from a wild type and two mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides* using statistical method. *International Symposium on Biological Polyesters 2006*, 132(3), 331-340. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.07.721>
- Sangkharak, K., ve Prasertsan, P. (2008). Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(3), 83-94. <https://doi.org/10.4067/S0717-34582008000300009>
- Santana, R. F., Bonomo, R. C. F., Gandolfi, O. R. R., Rodrigues, L. B., Santos, L. S., dos Santos Pires, A. C., de Oliveira, C. P., da Costa Ilhéu Fontan, R., ve Veloso, C. M. (2018). Characterization of starch-based bioplastics from jackfruit seed

- plasticized with glycerol. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 278-286. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2936-6>
- Saravanan, K., Umesh, M., ve Kathirvel, P. (2022). Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): A Review on Biosynthesis, Properties, Fermentation Strategies and Its Prospective Applications for Sustainable Future. *Journal of Polymers and the Environment*, 30(12), 4903-4935. <https://doi.org/10.1007/s10924-022-02562-7>
- Sathiascelan, J. J., Afifah, N. M. R., Abdullah, A. A.-A., Ramakrishna, S., Vigneswari, S., ve Bhubalan, K. (2024). Exploring the advantages and limitations of degradation for various biodegradable micro-bioplastic in aquatic environments. *Journal of Environmental Management*, 366, 121777. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121777>
- Sen, K. Y., Hussin, M. H., ve Baidurah, S. (2019). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.006>
- Senila, L., Gál, E., Kovacs, E., Cadar, O., Dan, M., Senila, M., ve Roman, C. (2023). Poly(3-hydroxybutyrate) Production from Lignocellulosic Wastes Using *Bacillus megaterium* ATCC 14581. *Polymers*, 15(23), 4488. <https://doi.org/10.3390/polym15234488>
- Shafqat, A., Al-Zaqri, N., Tahir, A., ve Alsalmeh, A. (2021). Synthesis and characterization of starch based bioplastics using varying plant-based ingredients, plasticizers and natural fillers. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1739-1749. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.015>
- Shahar, F., Balakrishnan, T., ve Thariq, M. (2025). The Evolution and Environmental Prospects of Renewable Bioplastics: Types, Production Methods, and Sustainability. *Journal of Renewable Materials*, 13(6), 1071-1101. <https://doi.org/10.32604/jrm.2024.02024-0011>
- Shamsuddin, I. M., Jafar, J. A., Shawai, A. S. A., Yusuf, S., Lateefah, M., ve Aminu, I. (2017). Bioplastics as Better Alternative to Petroplastics and Their Role in National Sustainability: A Review. *Advances in Bioscience and Bioengineering*, 5(4), Article 4. <https://doi.org/10.11648/j.abb.20170504.13>
- Shimizu, T., Teramoto, H., ve Inui, M. (2022). Construction of a *Rhodobacter sphaeroides* Strain That Efficiently Produces Hydrogen Gas from Acetate without Poly(β -Hydroxybutyrate) Accumulation: Insight into the Role of PhaR in Acetate Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(12), e00507-22. <https://doi.org/10.1128/aem.00507-22>
- Sichwart, S., Hetzler, S., Bröcker, D., ve Steinbüchel, A. (2011). Extension of the Substrate Utilization Range of *Ralstonia eutropha* Strain H16 by Metabolic Engineering To Include Mannose and Glucose. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1325-1334. <https://doi.org/10.1128/AEM.01977-10>

- Sirohi, R., Prakash Pandey, J., Kumar Gaur, V., Gnansounou, E., ve Sindhu, R. (2020). Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB). *Bioresource Technology*, 311, 123536. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123536>
- Song, J. Y., ve Kim, B. S. (2005). Characteristics of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha* NCIMB 11599 and ATCC 17699. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(6), 603-606. <https://doi.org/10.1007/BF02932302>
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Liebergesell, M., Wieczorek, R., Babel, W., Föllner, C., Madkour, M. H., Mayer, F., Pieper-Fürst, U., Pries, A., ve Valentin, H. E. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(13), 94-105. <https://doi.org/10.1139/m95-175>
- Steinbüchel, A., ve Valentin, H. E. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128(3), 219-228. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x>
- Sudesh, K., Abe, H., ve Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Tan, G.-Y. A., Chen, C.-L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., ve Wang, J.-Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), 706-754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Tang, R., Peng, X., Weng, C., ve Han, Y. (2022). The Overexpression of Phasin and Regulator Genes Promoting the Synthesis of Polyhydroxybutyrate in *Cupriavidus necator* H16 under Nonstress Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(2), e01458-21. <https://doi.org/10.1128/AEM.01458-21>
- Tao, Y., Liu, D., Yan, X., Zhou, Z., Lee, J. K., ve Yang, C. (2012). Network Identification and Flux Quantification of Glucose Metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* under Photoheterotrophic H₂-Producing Conditions. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 274-283. <https://doi.org/10.1128/jb.05624-11>
- Tebaldi, M. L., Maia, A. L. C., Poletto, F., de Andrade, F. V., ve Soares, D. C. F. (2019). Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.007>
- Thamarai, P., Vickram, A. S., Saravanan, A., Deivayanai, V. C., ve Evangeline, S. (2024). Recent advancements in biosynthesis, industrial production, and environmental applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs): A review. *Bioresource Technology Reports*, 27, 101957. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101957>

- Thammasittirong, A., Saechow, S., ve Thammasittirong, S. N.-R. (2017). Efficient polyhydroxybutyrate production from *Bacillus* juice substrate *thuringiensis* using sugarcane. *Turkish Journal of Biology*, 41(6), 992-1002. <https://doi.org/10.3906/biy-1704-13>
- Thapa, C., Shakya, P., Shrestha, R., Pal, S., ve 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*, 6(1), Article 1. (Nepal). <https://doi.org/10.3126/njb.v6i1.22339>
- Thompson, R. C., Olsen, Y., Mitchell, R. P., Davis, A., Rowland, S. J., John, A. W. G., McGonigle, D., ve Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, 304(5672), 838-838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
- Trakunjae, C., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Kosugi, A., Arai, T., Sudesh, K., ve 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), 1896. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81386-2>
- Tserki, V., Matzinos, P., Pavlidou, E., ve Panayiotou, C. (2006). Biodegradable aliphatic polyesters. Part II. Synthesis and characterization of chain extended poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polymer Degradation and Stability*, 91(2), 377-384. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2005.04.036>
- Vahabi, H., Michely, L., Moradkhani, G., Akbari, V., Cochez, M., Vagner, C., Renard, E., Saeb, M. R., ve Langlois, V. (2019). Thermal Stability and Flammability Behavior of Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) Based Composites. *Materials*, 12(14). <https://doi.org/10.3390/ma12142239>
- Vahabi, H., Rohani Rad, E., Parpaite, T., Langlois, V., ve Saeb, M. R. (2019). Biodegradable polyester thin films and coatings in the line of fire: The time of polyhydroxyalkanoate (PHA)? *Progress in Organic Coatings*, 133, 85-89. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.04.044>
- Valle Iulianelli, G. C., Azevedo, R. da S., da Silva, P. S. R. C., ve Tavares, M. I. B. (2016). PHB nanostructured: Production and characterization by NMR relaxometry. *Polymer Testing*, 49, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2015.11.011>
- van der Giessen, W. J., Lincoff, A. M., Schwartz, R. S., van Beusekom, H. M. M., Serruys, P. W., Holmes, D. R., Ellis, S. G., ve Topol, E. J. (1996). Marked Inflammatory Sequelae to Implantation of Biodegradable and Nonbiodegradable Polymers in Porcine Coronary Arteries. *Circulation*, 94(7), 1690-1697. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.7.1690>
- Vigneswari, S., Murugaiyah, V., Kaur, G., Abdul Khalil, H. P. S., ve Amirul, A. A. (2016). Simultaneous dual syringe electrospinning system using benign solvent to fabricate nanofibrous P(3HB-co-4HB)/collagen peptides construct as potential leave-on wound dressing. *Materials Science and Engineering: C*, 66, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.102>

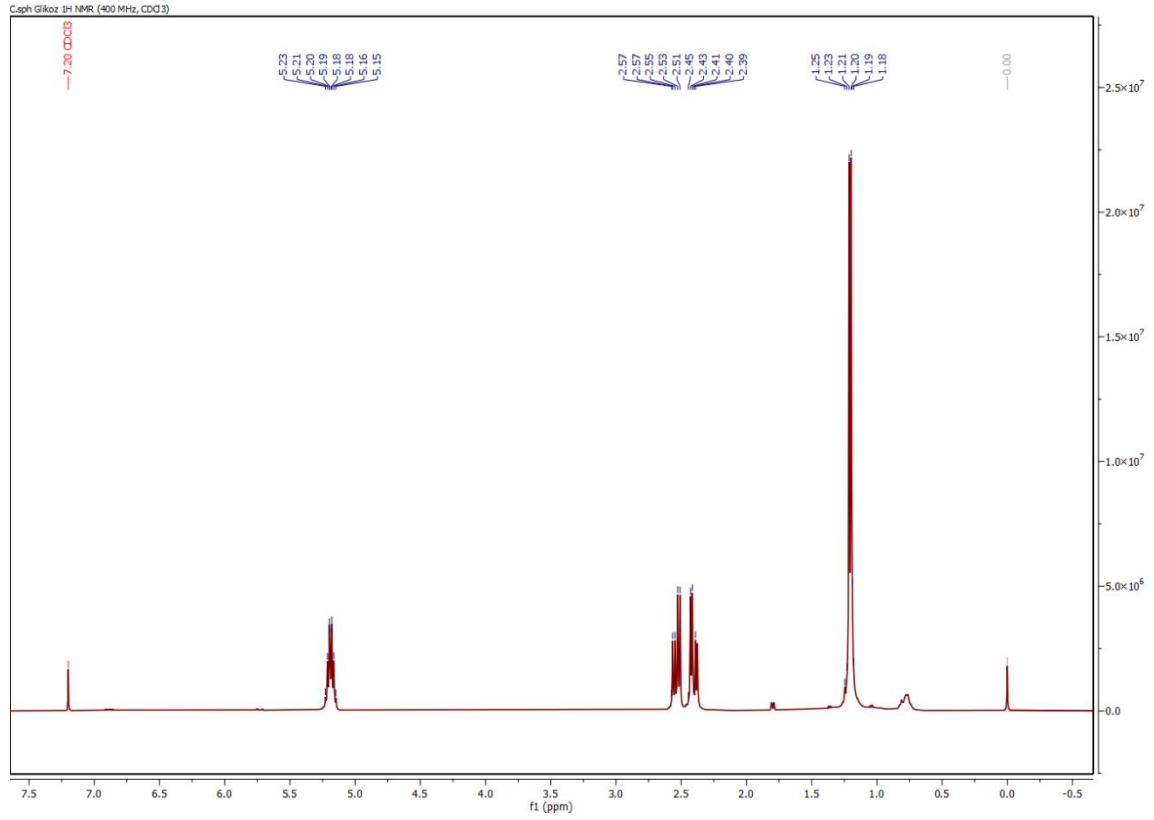
- Volova, T. G., Boyandin, A. N., Vasiliev, A. D., Karpov, V. A., Prudnikova, S. V., Mishukova, O. V., Boyarskikh, U. A., Filipenko, M. L., Rudnev, V. P., Bá Xuân, B., Việt Dũng, V., ve Gitelson, I. I. (2010). Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polymer Degradation and Stability*, 95(12), 2350-2359. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.023>
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., ve Jendrossek, D. (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiology*, 12(1), 262. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-262>
- Wang, J., Huang, J., ve Liu, S. (2024). The production, recovery, and valorization of polyhydroxybutyrate (PHB) based on circular bioeconomy. *Biotechnology Advances*, 72, 108340. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108340>
- Wang, J., Yue, Z.-B., Sheng, G.-P., ve Yu, H.-Q. (2010). Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 422-428. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.02.005>
- Wang, L., Liu, Q., Wu, X., Huang, Y., Wise, M. J., Liu, Z., Wang, W., Hu, J., ve Wang, C. (2019). Bioinformatics Analysis of Metabolism Pathways of Archaeal Energy Reserves. *Scientific Reports*, 9, 1034. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37768-0>
- Wang, W., Yang, S., Hunsinger, G. B., Pienkos, P. T., ve Johnson, D. K. (2014). Connecting lignin-degradation pathway with pre-treatment inhibitor sensitivity of *Cupriavidus necator*. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00247>
- Wei, D.-X., Dao, J.-W., Liu, H.-W., ve Chen, G.-Q. (2018). Suspended polyhydroxyalkanoate microspheres as 3D carriers for mammalian cell growth. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup2), 473-483. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1459635>
- Wei, Y.-H., Chen, W.-C., Huang, C.-K., Wu, H.-S., Sun, Y.-M., Lo, C.-W., ve 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. <https://doi.org/10.3390/ijms12010252>
- Wellen, R. M. R., Rabello, M. S., Araujo Júnior, I. C., Fachine, G. J. M., ve Canedo, E. L. (2015). Melting and crystallization of poly(3-hydroxybutyrate): Effect of heating/cooling rates on phase transformation. *Polímeros*, 25, 296-304. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.1961>
- Weng, C., Tang, R., Peng, X., ve Han, Y. (2023). Co-conversion of lignocellulose-derived glucose, xylose, and aromatics to polyhydroxybutyrate by metabolically engineered *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 374, 128762. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128762>

- Wiggam, M. I., O’Kane, M. J., Harper, R., Atkinson, A. B., Hadden, D. R., Trimble, E. R., ve Bell, P. M. (1997). Treatment off Diabetic Ketoacidosis Using Normalization of Blood 3-Hydroxybutyrate Concentration as the Endpoint of Emergency Management. *DIABETES CARE*, 20(9).
- Winnacker, M. (2019). Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(11), 1900101. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900101>
- Xu, M., Tremblay, P.-L., Ding, R., Xiao, J., Wang, J., Kang, Y., ve Zhang, T. (2021). Photo-augmented PHB production from CO₂ or fructose by *Cupriavidus necator* and shape-optimized CdS nanorods. *Science of The Total Environment*, 753, 142050. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142050>
- Yañez, L., Conejeros, R., Vergara-Fernández, A., ve Scott, F. (2020). Beyond Intracellular Accumulation of Polyhydroxyalkanoates: Chiral Hydroxyalkanoic Acids and Polymer Secretion. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00248>
- Yang, B., Tao, L., ve Wyman, C. E. (2018). Strengths, challenges, and opportunities for hydrothermal pretreatment in lignocellulosic biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(1), 125-138. <https://doi.org/10.1002/bbb.1825>
- Yang, Y., Li, L., Sun, H., Li, Z., Qi, Z., ve Liu, X. (2021). Improving CoQ10 productivity by strengthening glucose transmembrane of *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01695-z>
- Yao, J., Xiao, X.-Y., Wang, M., Zhang, Q., Chen, Y., Gou, M., Xia, Z.-Y., ve Tang, Y.-Q. (2025). A review of low-cost production of polyhydroxyalkanoates: Strategies, challenges, and perspectives. *Bioresource Technology*, 433, 132745. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132745>
- Yeo, J. C. C., Muiruri, J. K., Thitsartarn, W., Li, Z., ve He, C. (2018). Recent advances in the development of biodegradable PHB-based toughening materials: Approaches, advantages and applications. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 1092-1116. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.006>
- Zandieh, M., Griffiths, E., Waldie, A., Li, S., Honek, J., Rezanezhad, F., Van Cappellen, P., ve Liu, J. (2024). Catalytic and biocatalytic degradation of microplastics. *Exploration*, 4(3), 20230018. <https://doi.org/10.1002/EXP.20230018>
- Zarei, M., Tanideh, N., Zare, S., Sari Aslani, F., Koochi-Hosseiniabadi, O., Muthuraj, R., Jamhiri, I., Rowshanghias, A., ve Mehryar, P. (2019). Preparation and performance evaluation of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) composite scaffolds as a potential hard tissue engineering application. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 34(4-5), 386-400. <https://doi.org/10.1177/0883911519875984>
- Zhang, S.-Q., Yuan, H.-Z., Ma, X., ve Wei, D.-X. (2025). Carbon cycle of polyhydroxyalkanoates (CCP): Biosynthesis and biodegradation. *Environmental Research*, 269, 120904. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.120904>

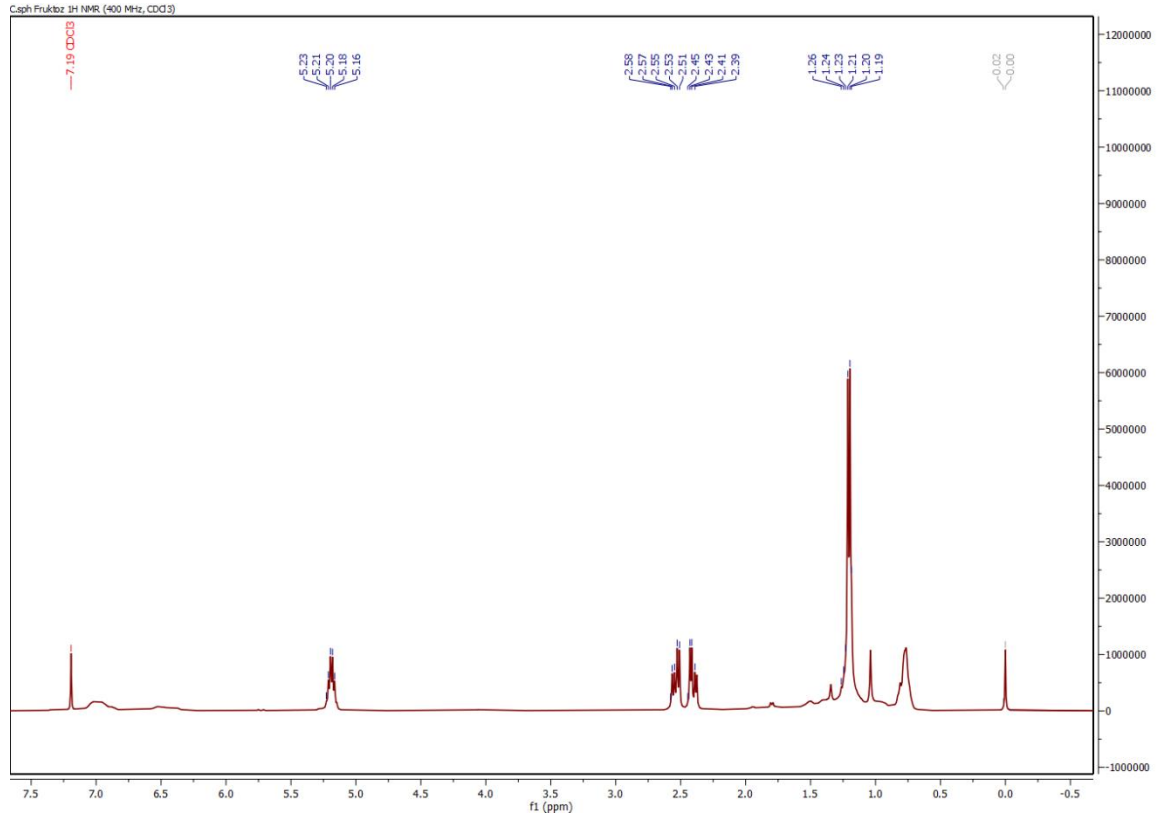
- Zheng, Y., Chen, J.-C., Ma, Y.-M., ve Chen, G.-Q. (2020). Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering, Metabolic Engineering Products Issue*, 58, 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2019.07.004>
- Zhila, N. O., Sapozhnikova, K. Y., Kiselev, E. G., Vasiliev, A. D., Nemtsev, I. V., Shishatskaya, E. I., ve Volova, T. G. (2021). Properties of Degradable Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Synthesized by a New Strain, *Cupriavidus necator* IBP/SFU-1, from Various Carbon Sources. *Polymers*, 13(18), 3142. <https://doi.org/10.3390/polym13183142>
- Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D. I., Euverink, G.-J. W., ve Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. *Journal of Environmental Management*, 341, 118033. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>
- Zhu, S., Zhang, J., Vegesna, G., Luo, F.-T., Green, S. A., ve Liu, H. (2011). Highly Water-Soluble Neutral BODIPY Dyes with Controllable Fluorescence Quantum Yields. *Organic Letters*, 13(3), 438-441. <https://doi.org/10.1021/ol102758z>
- Zytner, P., Kumar, D., Elsayed, A., Mohanty, A., V. Ramarao, B., ve Misra, M. (2023). A review on polyhydroxyalkanoate (PHA) production through the use of lignocellulosic biomass. *RSC Sustainability*, 1(9), 2120-2134. <https://doi.org/10.1039/D3SU00126A>

EKLER

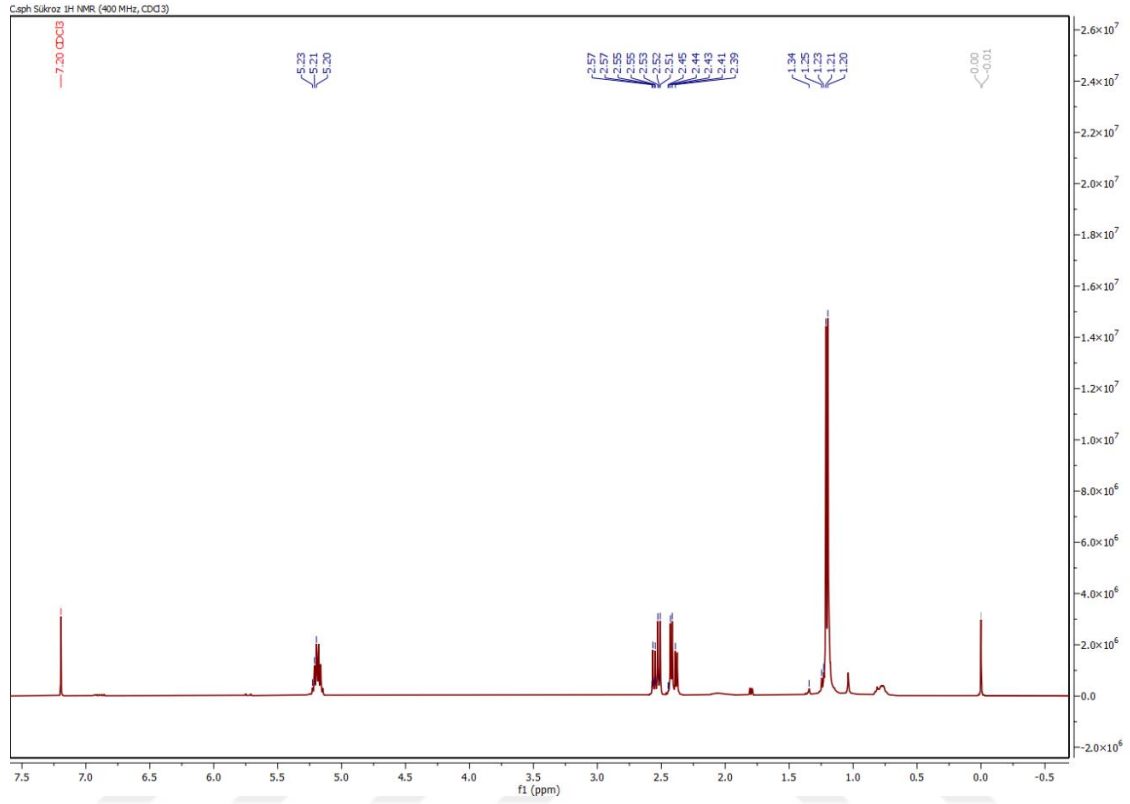
EK-1 Glikoz besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* 'in ürettiği PHB'nin ^1H NMR spektrumu



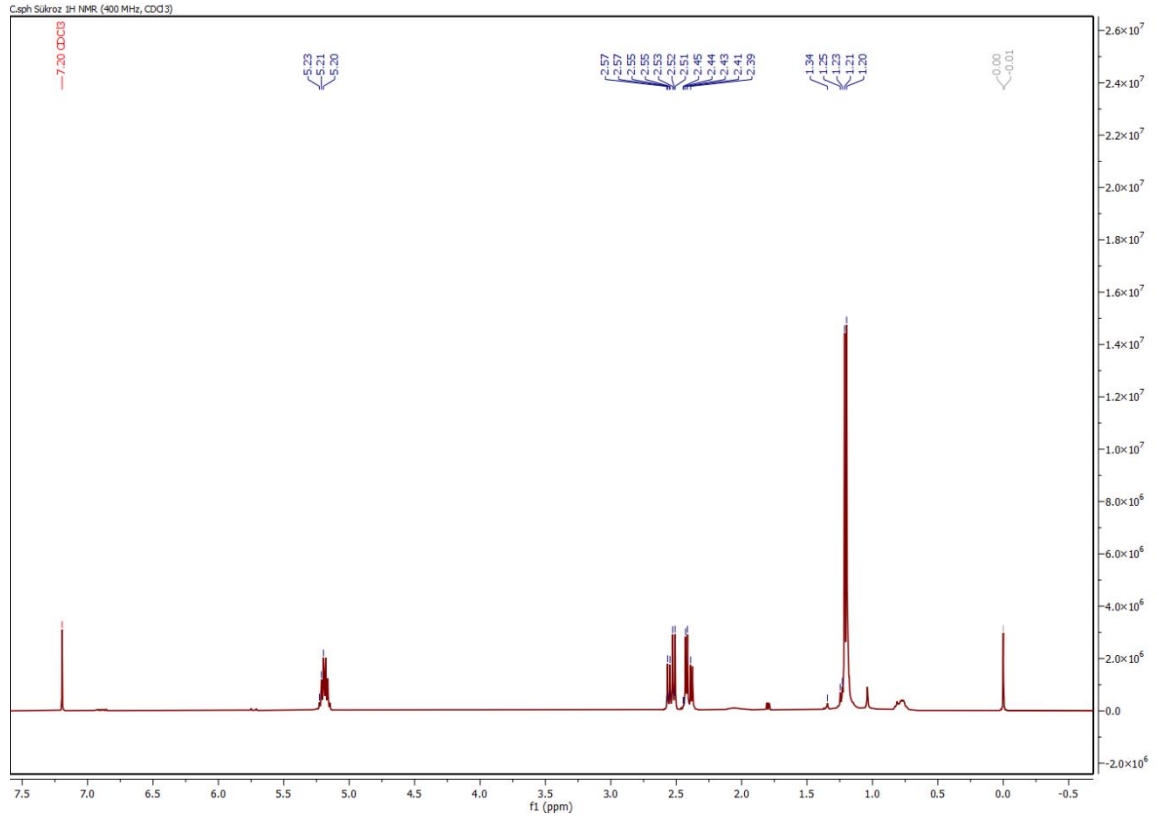
EK-2 Fruktoz besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* 'in ürettiği PHB' nin ^1H NMR spektrumu



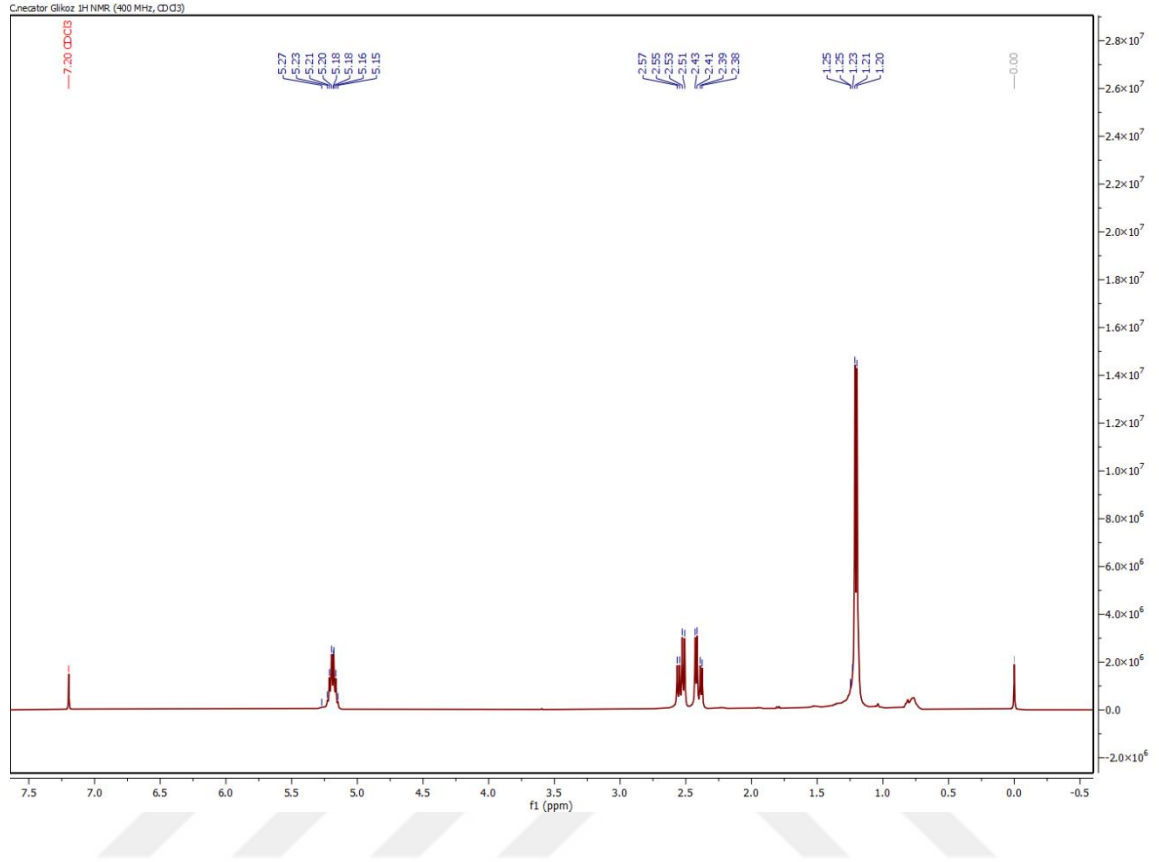
EK-3 Sükroz besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides* 'in ürettiği PHB' nin ^1H NMR spektrumu



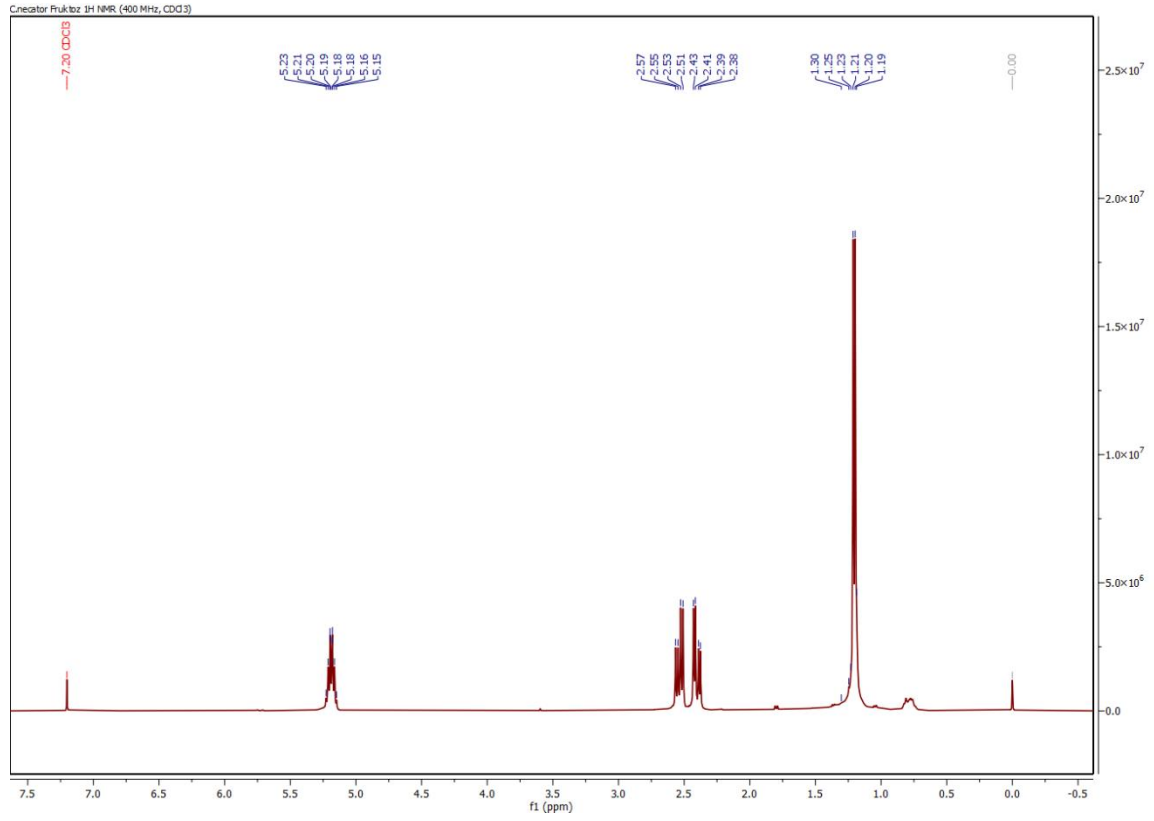
EK-4 Asetat besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides*'in ürettiği PHB' nin ^1H NMR spektrumu



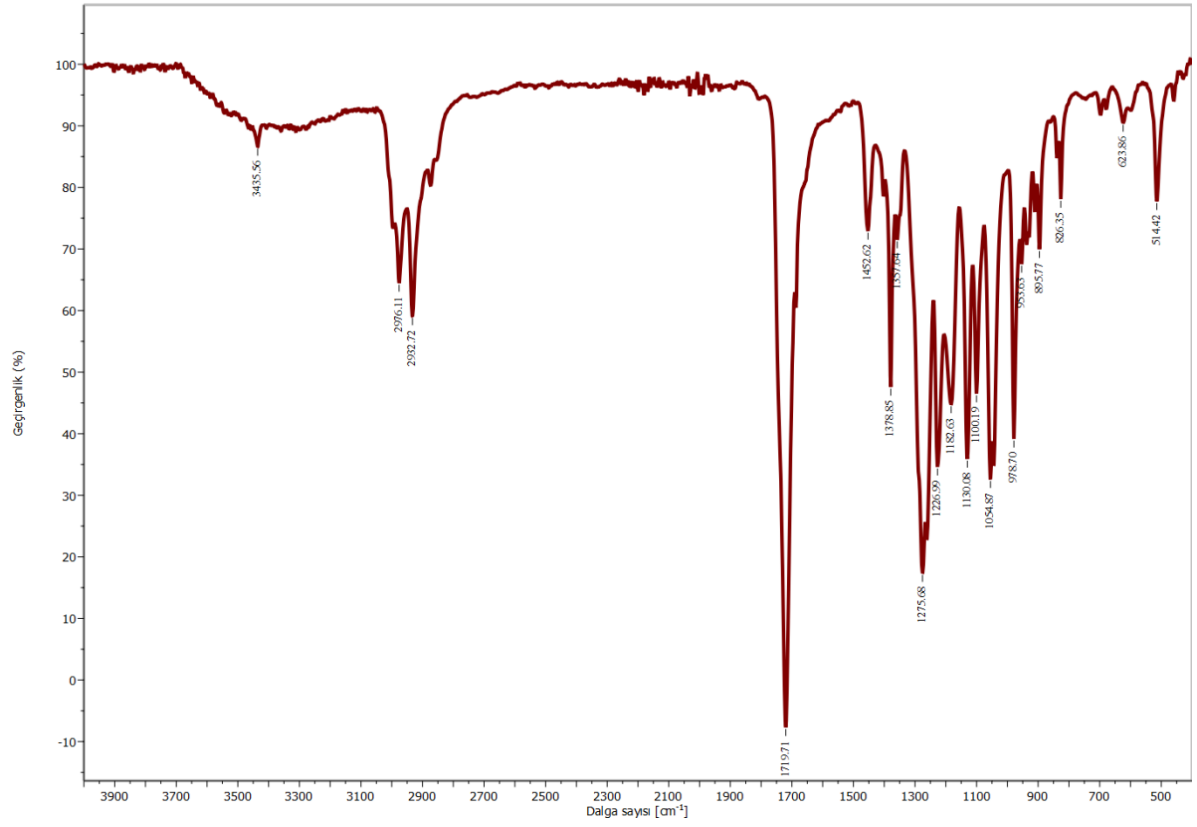
EK-5 Glikoz besiyerinde büyütülen *C. necator* 'un ürettiği PHB' nin ^1H -NMR spektrumu



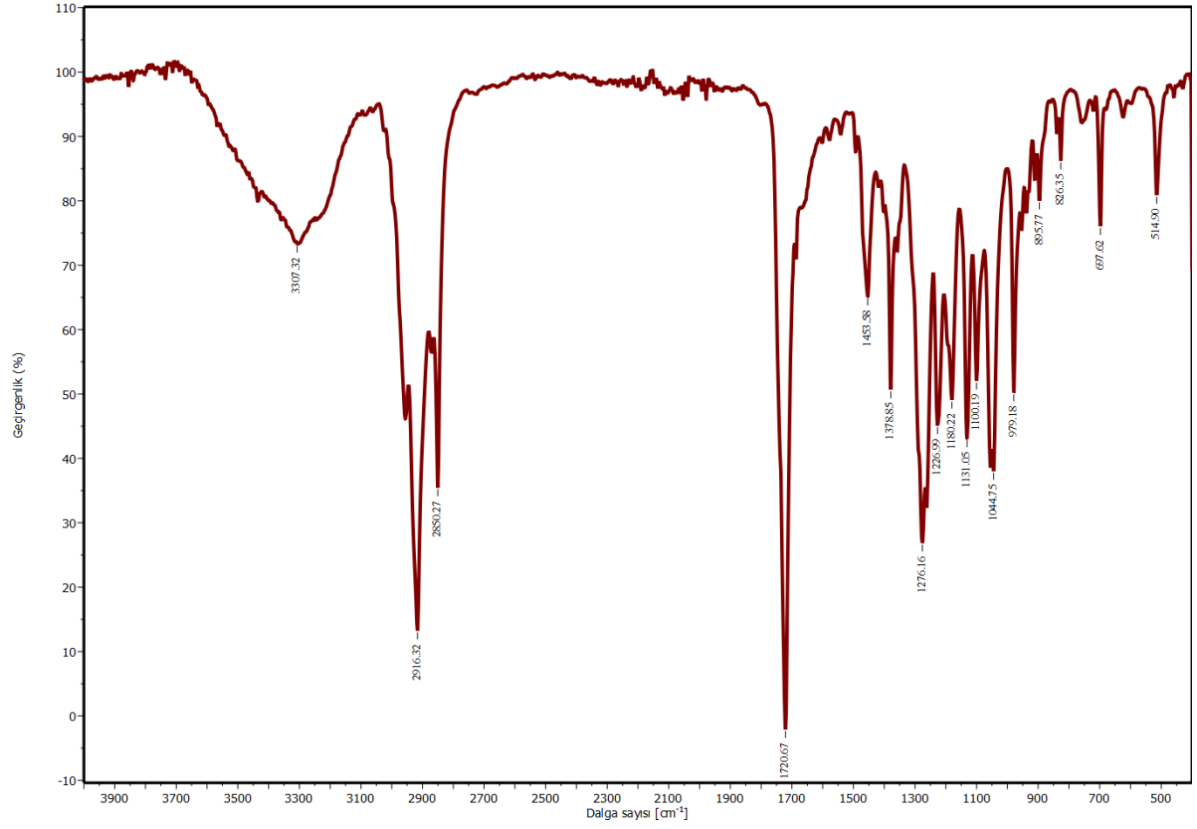
EK-6 Fruktoz besiyerinde büyütülen *C. necator*'un ürettiği PHB' nin ^1H -NMR spektrumu



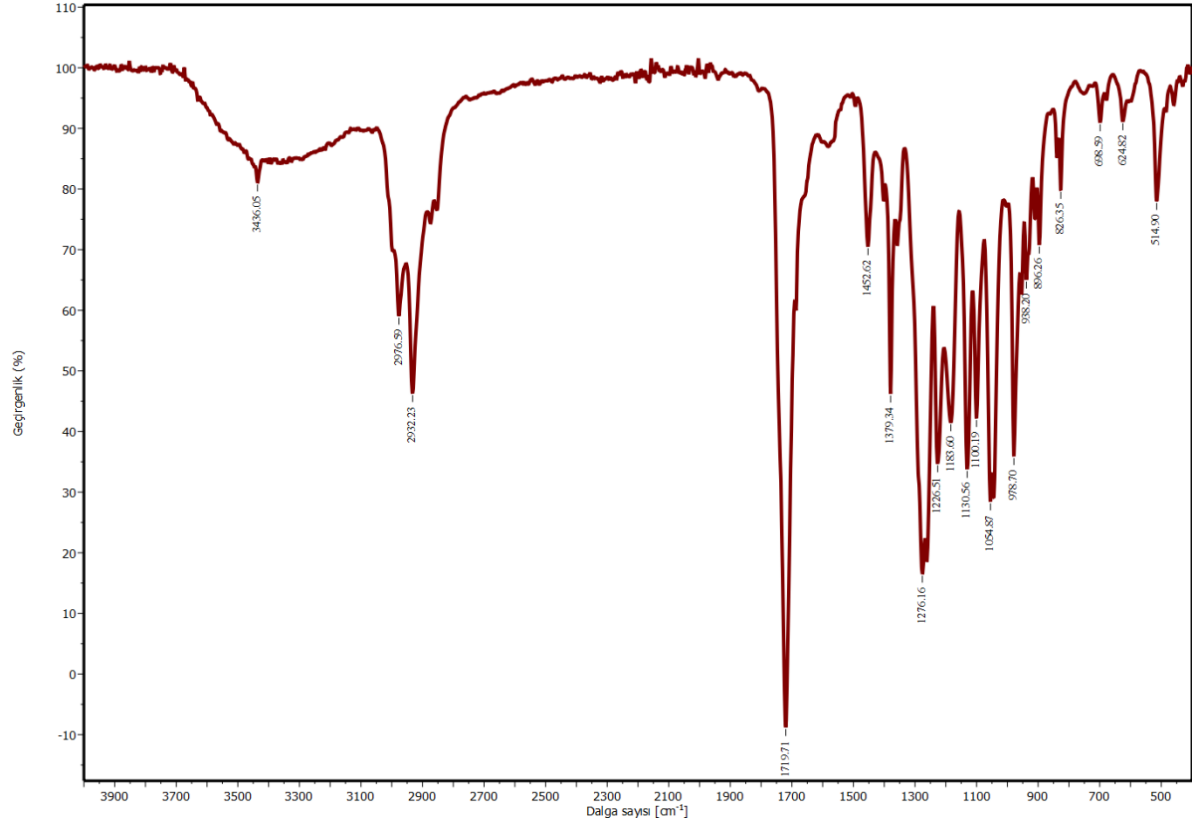
EK-8 Glikoz besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides*'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



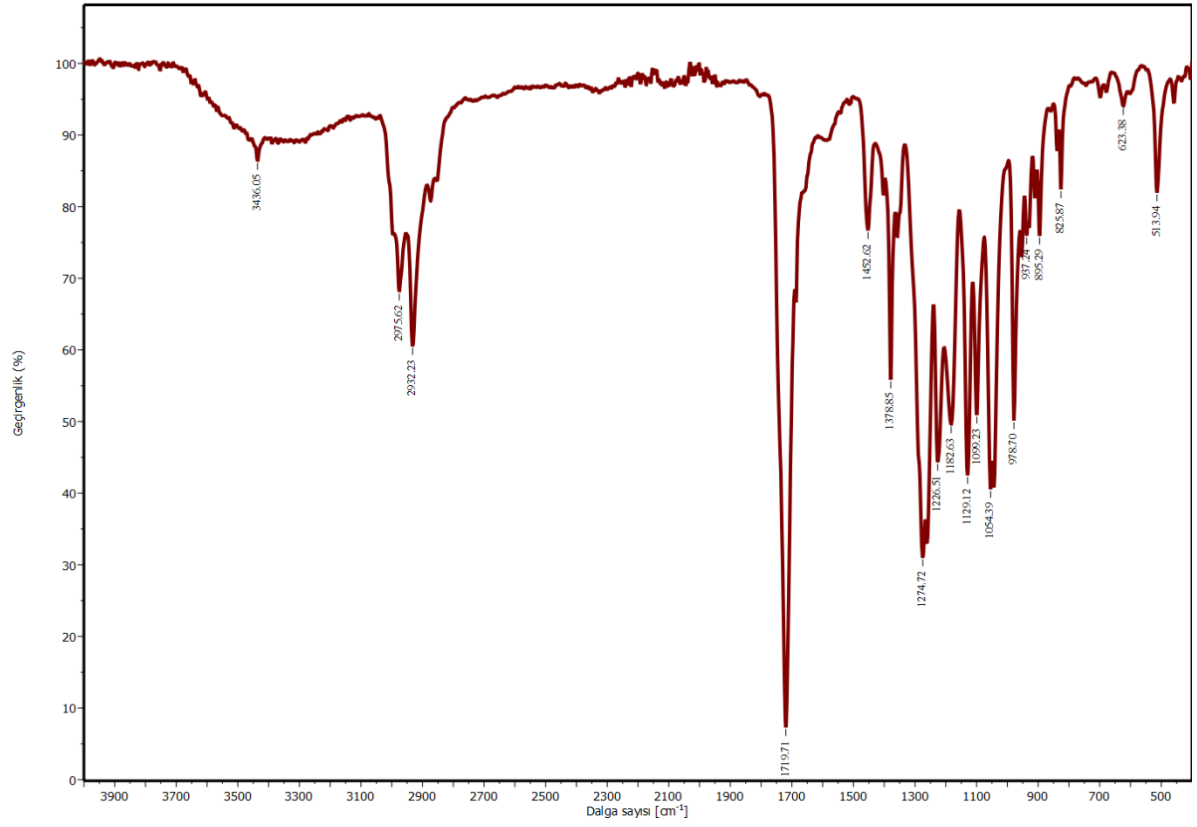
EK-9 Fruktoz besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides*'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



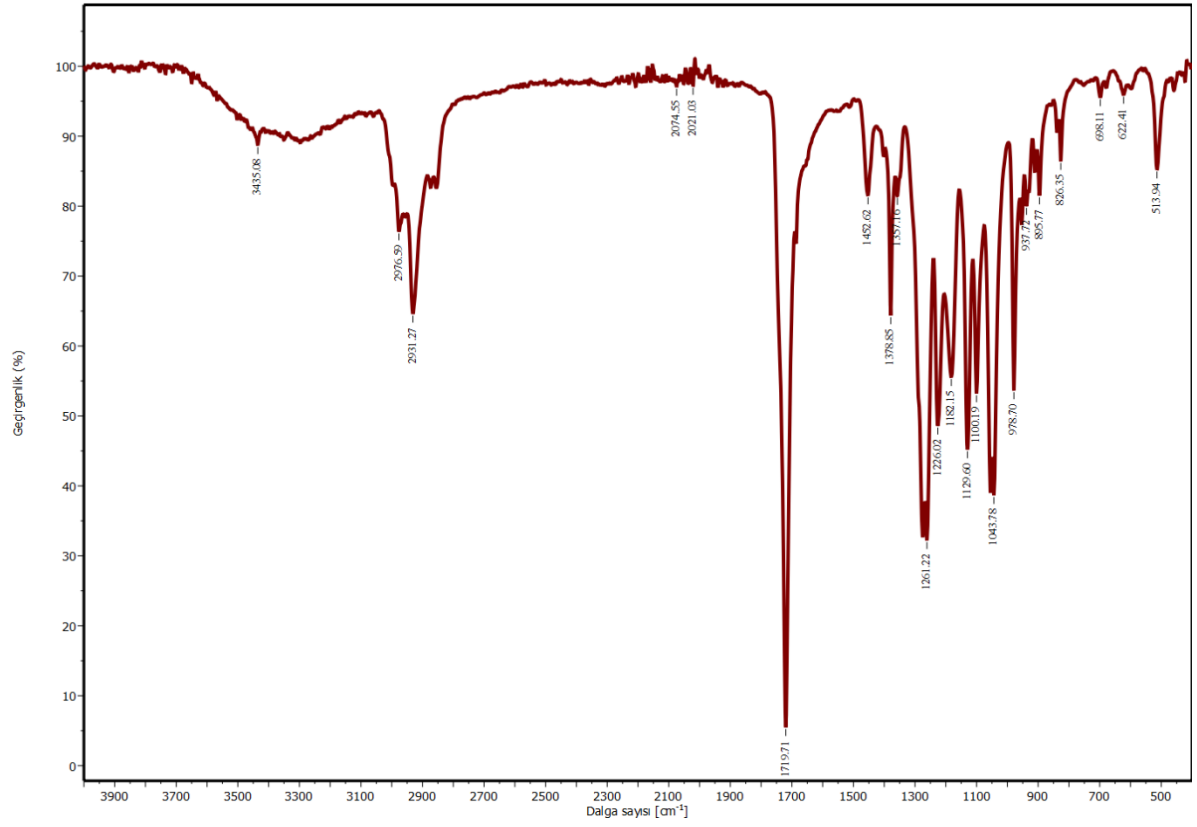
EK-10 Sükroz besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides*'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



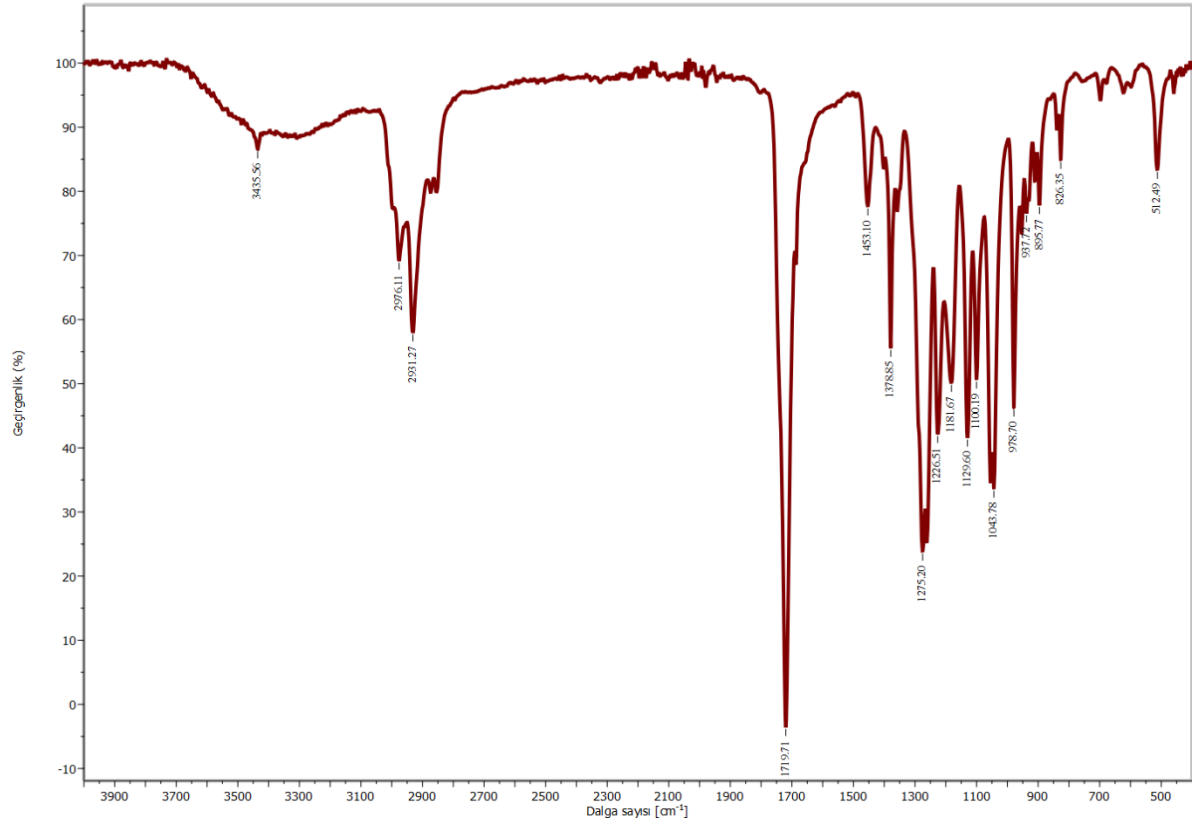
EK-11 Asetat besiyerinde büyütülen *C. sphaeroides*'in ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



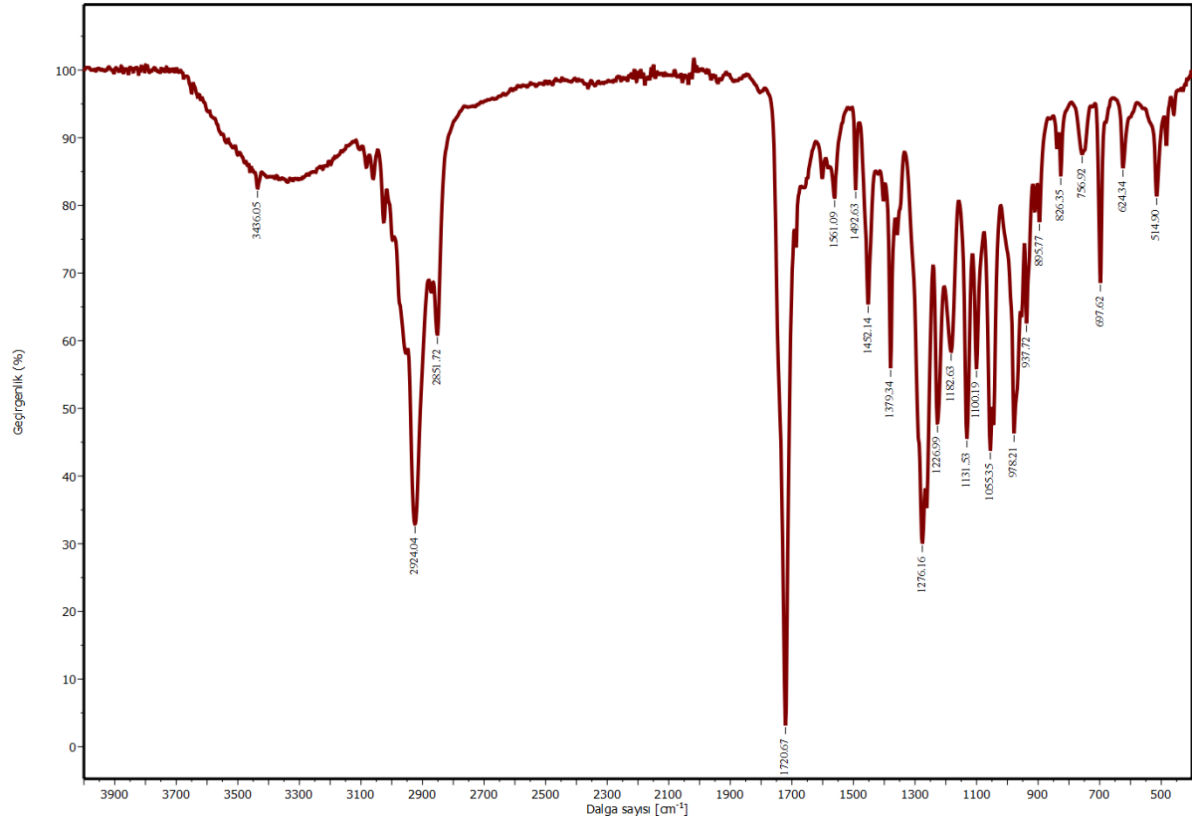
EK-12 Glikoz besiyerinde büyütülen *C. necator* ‘un ürettiği PHB’ nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



EK-13 Fruktoz besiğinde büyütülen *C. necator* ‘un ürettiği PHB’ nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



EK-14 Asetat besiyerinde büyütülen *C. necator* 'un ürettiği PHB' nin FTIR dalga sayısı (cm^{-1})



EK-15 Eser element çözeltisi (*C. sphaeroides*)

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

EK-16 Vitamin çözeltisi

Vitamin	mg/L
Thiamine	500
Niacin	500
Biotin	15



EK-17 Eser element çözeltisi (*C. necator*)

İçerik	mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	100
MnSO ₄ .4H ₂ O	100
CuSO ₄ .5H ₂ O	160
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	100
CoCl ₂ .6H ₂ O	200
NiCl ₂ . 6H ₂ O	200
H ₃ BO ₃	300