



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FOTOSENTETİK BAKTERİ
KONSORSİYUMU İLE BÜTİRİK ASİT
KULLANARAK POLİHİDROKSİBÜTİRAT
(PHB) ÜRETİMİ**
Innocent MANGA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ekim-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Innocent MANGA tarafından hazırlanan ‘‘Fotosentetik Bakteri Konsorsiyumu ile Bütirik Asit Kullanarak Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi’’ adlı tez çalışması 25/10/2024 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

Doç. Dr. Fatma SARIİPEK

.....

Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

.....

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

.....

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

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 24YL15003 nolu proje 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.

Innocent MANGA

Tarih: 25.10.2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FOTOSENTETİK BAKTERİ KONSORSİYUMU İLE BÜTİRİK ASİT KULLANARAK POLİHİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMİ

Innocent MANGA

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

Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS

2024, 109 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Gökhan KARS

Doç. Dr. Fatma SARIPEK

Dr. Öğretim Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Biyobazlı plastikler, petrol/fosil bazlı plastiklere alternatif bir seçenektir. Polihidroksibütirat (PHB) en umut verici biyopolimerler arasındadır. Bu tezde, yüksek miktarda PHB elde etmek için üç fotosentetik bakteriden oluşan bir konsorsiyum kullanıldı. Konsorsiyum, *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864), *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710) ve *Rhodospseudomonas palustris* (DSM 127) oluşmaktadır. Biyopolimer üretimini sağlamak için fotosentetik bakterilere karbon kaynağı olarak bütirik asit (30 mM) ve azot kaynağı olarak ise amonyum klorür (NH_4Cl , 2 mM) sağlandı. Ölüm evresine kadar optik yoğunluk ve pH ölçülerek bakteri üremesi gözlemlenmiştir. Gözlenen en yüksek optik yoğunluklar şunlardır; 3.18 ± 0.03 , 2.94 ± 0.07 , 2.97 ± 0.03 ve 2.65 ± 0.04 , pH değerleri 9.81 ± 0.01 , 9.87 ± 0.01 , 9.93 ± 0.01 ve 9.79 ± 0.01 , bu değerleri sırasıyla *C. sphaeroides*, *R. palustris*, *R. capsulatus* ve konsorsiyumda gözlemlenmiştir. Hücrelerdeki PHB granülleri Sudan siyahı ve Nil kırmızısı boya kullanılarak incelendi. Bakterilerde biriken PHB, solvent ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edildi. Elde edilen kurutulmuş PHB miktarları $0,2208 \text{ g/L}$ (konsorsiyum), $0,1427 \text{ g/L}$ (*C. sphaeroides*), $0,1330 \text{ g/L}$ (*R. palustris*) ve $0,0875 \text{ g/L}$ (*R. capsulatus*) olmuştur. En yüksek PHB üç fotosentetik bakteriden oluşan konsorsiyumdan, en az PHB ise *R. capsulatus*'tan elde edilmiştir. Saflaştırılan PHB, nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) teknikleriyle karakterize edildi. NMR pikleri 1,20-1,25, 2,43-2,63 ve 5,20-5,28 ppm aralığında kaydedildi. Fonksiyonel gruplar FTIR'da 2976-2932, 1453, 1720-1719, 1379, 3437-3436 ve 1278-1275 cm^{-2} dalga boylarında gözlemlendi. FTIR analizinde, PHB fonksiyonel grupları C-H, CH_2 , C=O, CH_3 , O-H ve C-O olarak tanımlandı. İlgili PHB fonksiyonel grubu tanımlamak için bir referans veri tablosu kullanıldı. Çalışmanın sonuçları, fotosentetik bakterilerden oluşan konsorsiyumun, tek saf bakteri suşlarına kıyasla daha fazla PHB biyopolimeri biriktirdiğini gösterdi. Bu nedenle, konsorsiyumun veya karışık mikrobiyal kültürün kullanımının, daha çok mikrobiyal biyopolimer elde etmek ve hasat etmek için alternatif bir yol olduğu sonucuna varılabilir.

Anahtar Kelimeler: Biyopolimer, Bütirik asit, *Cereibacter sphaeroides*, Konsorsiyum, Polihidroksibütirat, *Rhodobacter capsulatus* ve *Rhodospseudomonas palustris*.

ABSTRACT

MASTER`S THESIS

PRODUCTION OF POLYHYDROXYBUTYRATE (PHB) BY A CONSORTIUM OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA USING BUTYRIC ACID

Innocent MANGA

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

Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS

2024, 109 Pages

Jury

Prof. Dr. Gökhan KARS

Assoc. Prof. Dr. Fatma SARIİPEK

Assist. Prof. Dr. Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Bio-based plastics are an alternative replacement for petroleum/fossil-based plastics. Polyhydroxybutyrate (PHB) is among the most promising biopolymers. In this thesis, a consortium of three photosynthetic bacteria was utilized to obtain a large amount of PHB. The consortium was composed of *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864), *Rhodobacter capsulatus* (DSM 1710), and *Rhodospseudomonas palustris* (DSM 127). Butyric acid (30mM) was used to supply surplus carbon to photosynthetic bacteria and ammonium chloride (NH₄Cl, 2mM) was used as a nitrogen source at a limited concentration required for biopolymer production. The growth of bacteria was observed by measuring the optical density (OD) and pH until the death phase. The highest optical densities observed are 3.18±0.03, 2.94±0.07, 2.97±0.03 and 2.65±0.04, pH values were 9.81±0.01, 9.87±0.01, 9.93±0.01 and 9.79±0.01 for *C. sphaeroides*, *R. palustris*, *R. capsulatus* and consortium, respectively. The PHB granules in the cells were examined using Sudan Black and Nile Red dyes. PHB accumulated in bacteria was extracted using solvent extraction method. The amount of dried PHB obtained were 0.2208g/L (consortium), 0.1427g/L (*C. sphaeroides*), 0.1330g/L (*R. palustris*) and 0.0875g/L (*R. capsulatus*). The highest PHB amount was observed in a consortium of three photosynthetic bacteria with the least amount of PHB extracted from *R. capsulatus*. The extracted PHB was characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) techniques. NMR peaks were recorded within the range of 1.20-1.25, 2.43-2.63, and 5.20-5.28 ppm. The functional groups were observed at wavelength 2976-2932, 1453, 1720-1719, 1379, 3437-3436, and 1278-1275 cm⁻² in FTIR. FTIR analysis identified PHB functional groups as C-H, CH₂, C=O, CH₃, O-H, and C-O. A reference data table was used to identify the corresponding PHB functional group. The implications of the study showed that a consortium of photosynthetic bacteria accumulated more PHB biopolymer as compared to single pure bacterial strains. Therefore, it can be concluded that the use of a consortium or mixed microbial culture is an alternative way to obtain and harvest larger amounts of microbial biopolymer.

Keywords: Biopolymer, Butyric acid, *Cereibacter sphaeroides*, Consortium, Polyhydroxybutyrate, *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodospseudomonas palustris*.

ÖNSÖZ

Bu akademik yolculukta bana bilgi, yol gösteren ve önerileriyle bilgi veren hocam Prof. Dr. Gökhan KARS'a teşekkür etmek isterim. Tez savunması jüri üyeleri Doç. Dr. Fatma SARIİPEK ve Dr. Öğretim Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN'e değerli katkıları için teşekkür ederim. Aileme ve laboratuvar arkadaşlarım Besna DALMIŞ, Ayşenur ALTINKAYA, Tuğba BAŞ, Merve BAŞTUTAN, Beyza Nur SAYANER, Ayşe Nur SERİN, Nur Banu SOYLU ve Sıdıka ŞENSÖZLÜLER'a teşekkür ediyorum, sizin yardımınız ve çabanız olmadan başaramazdım. Destekleri için Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (Proje no: 24YL15003), Avrupa Birliği Ufuk Avrupa REGENEU projesine (Proje no:101079123) ve Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Innocent MANGA
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Petrol Bazlı Plastikler	3
2.2. Biyo-Plastikler/Biyopolimerler.....	5
2.2.1. Polihidroksialkanoatlar (PHA)	6
2.2.1.1. Polihidroksibütirat (PHB)	7
2.2.1.2. Polihidroksibütirat (PHB) biyosentezi	9
2.2.1.3. Polihidroksibütirat (PHB) biyosentez yolları.....	11
2.2.1.4. PHB granüllerinin morfolojisi	12
2.2.1.5. PHB'nin kimyasal ve mekanik özellikleri	14
2.2.1.6 PHB üreten mikroorganizmalar	16
2.2.2 Mor kükürtsüz bakteriler (PNSB).....	18
2.2.2.1 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	18
2.2.2.2 <i>Cereibacter sphaeroides</i>	20
2.2.2.3 <i>Rhodobacter capsulatus</i>	23
2.3 Biyoproseslerde Bakteri Konsorsiyumu Kullanımı	24
2.4. Bütirik Asit ve PHB Üretimi	27
2.5 PHB Üretimi İçin Büyüme Koşulları.....	28
2.5.1 Azot kaynağı	28
2.5.2 pH ve sıcaklık	29
2.5.3 Karbon kaynağı.....	30
2.6 Polihidroksibütirat (PHB) Ekstraksiyon Yöntemleri	30
2.6.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ekstraksiyon	31
2.6.2 Kloroform ile PHB ekstraksiyonu	31
2.6.3 Sodyum hipoklorit yöntemiyle ekstraksiyon	32
2.7 Polihidroksibütirat Karakterizasyon Teknikleri.....	32
2.7.1 Sudan Black B ile boyama.....	32
2.7.2 Nile red ile boyama.....	33
2.7.3 Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi.....	34
2.7.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	34
2.8 PHB Kullanmanın Avantajları.....	35
2.8.1. Biyoyumluluk	35
2.8.2. Parçalanabilirlik	36

2.8.2.1 Biyolojik bozunma.....	38
2.8.2.2 Termal bozulma	38
2.8.2.3 Fotodegradasyon	39
2.8.3 PHB kullanımında limitasyonlar	39
2.9 Uygulama Alanları.....	40
2.9.1 Tıbbi kullanım.....	41
2.9.2 Paketleme.....	44
2.9.3 Tarımsal uygulama	45
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	47
3.1. Bakteri Suşları, Ortam ve Kültür Koşulları	47
3.2 Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması.....	48
3.3 pH Eğrilerinin Oluşturulması.....	49
3.4 Üretilen PHB Granüllerinin Görüntülenmesi	49
3.4.1 Sudan Black B ile hücre içi PHB granüllerinin görüntülenmesi	49
3.4.2 Nile red ile hücre içi PHB granüllerinin görüntülenmesi	50
3.5 Kültürlerden PHB Ekstraksiyonu	50
3.6 Kuru Hücre Ağırlığı Ölçümü ve PHB Verimi Hesaplaması.....	53
3.7 Üretilen PHB Polimerlerin Karakterizasyonu	53
3.7.1 NMR ile PHB karakterizasyonu	53
3.7.2 FTIR ile PHB karakterizasyonu.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	54
4.1. Büyüme Eğrileri (OD) ve pH Oluşturması	54
4.1.1. Büyüme eğrileri (OD 660nm).....	54
4.1.2. pH eğrileri oluşturması	57
4.2. Üretilen PHB Granüllerinin Görüntülenmesi	60
4.3 PHB Ekstraksiyonu.....	65
4.4. Bakterilerden Ekstrakte Edilen PHB'nin Karakterizasyonu.....	67
4.4.1 Nükleer Manyetik Resonans (NMR) analizi	67
4.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FT-IR) analizi	70
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	75
5.1 Sonuçlar	75
5.2 Öneriler	77
6. KAYNAKLAR	78
EKLER	95

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1 PHB ve Polipropilen (PP) özelliklerinin karşılaştırılması.....	16
Çizelge 2.2 Üç <i>C. sphaeroides</i> suşunun hücresel büyümesi ve PHB içeriği.....	22
Çizelge 2.3 PHB bozunumunun molar kütlelerinin farklı sıcaklıklara bağımlılığı.....	38
Çizelge 2.4 PHA'nın in-vivo tıbbi implant uygulaması.....	42
Çizelge 3.1 Bütirik asit besiyeri içeriği (g/L).....	47
Çizelge 4.1 Bütirik asit içeren bir ortamda yetiştirilen fotosentetik bakteriler tarafından üretilen hücre kuru ağırlığı ve PHB içeriği.....	65
Çizelge 4.2 Bu çalışmada, bakteriden ekstrakte edilen ¹ H NMR pikleri (ppm) ve karşılık gelen kimyasal grup.....	70
Çizelge 4.3 Bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm ⁻¹).....	73

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 2016 yılında Avrupa plastik talebinin segmentlere göre dağılımı.....	3
Şekil 2.2 2015 yılında yapılan bir ankete göre petrol bazlı plastik üretimi.....	4
Şekil 2.3 Biyoplastik türleri.....	5
Şekil 2.4 Farklı PHA'ların kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.5 CH ₃ varlığı ile gösterilen PHB formülü.....	18
Şekil 2.6 Genel PHB sentez yolu.....	12
Şekil 2.7 (a) <i>Cupriavidus necator</i> H16'da bir in vivo PHB granülünün modeli ve granül üzerinde bulunan farklı PHB granülüyle ilişkili proteinler (b) Granül yüzeyinde küresel parçacıkların varlığını gösteren atomik kuvvet mikroskobu sapma görüntüsü.....	13
Şekil 2.8 Anaerobik koşullarda p-kumarat üzerinde yetiştirilen <i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009'un TEM görüntüsü.....	19
Şekil 2.9 <i>Rhodopseudomonas palustris</i> TIE-1'deki PHB döngüsü ve varsayılan genleri.....	20
Şekil 2.10 <i>Cereibacter sphaeroides</i> mikroskopik görüntüsü.....	21
Şekil 2.11 <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'te PHB sentez yolu.....	22
Şekil 2.12 Aseton ortamında <i>Rhodobacter capsulatus</i> tarafından üretilen beyaz PHB veziküllerinin görüntüsü.....	24

Şekil 2.13 Nile red moleküler yapısı.....	33
Şekil 2.14 Çamurda 80 günlük bir süre boyunca inkübasyon sırasında PHA şişelerinin biyolojik olarak parçalanması.....	36
Şekil 2.15 Anaerobik ve aerobik koşullar altında hücre dışı PHB bozulması.....	37
Şekil 2.16 Farklı alanlarda polihidroksibutirat (PHB) uygulamaları.....	40
Şekil 2.17 PHB'nin çeşitli tıbbi uygulamaları.....	41
Şekil 2.18 Farenin parietal keminde kritik kusur. (a) iskelesiz; (b) iskeleli (c) mezenkimal kök hücrelerle tohumlanmış iskeleli.....	43
Şekil 2.19 Kanser hücrelerinin tespiti için PHB tabakalarının kullanımı (a) PHB'ye bağlı olmayan normal meme epitel hücreleri için temas açısı görüntüsü. (b) PHB'ye bağlı meme kanseri hücreleri için temas açısı görüntüsü.....	44
Şekil 3.1 Bütirik asit ortamda PHB üretimi aşamaları ve koşulları.....	48
Şekil 3.2 PHB ekstraksiyon adımları.....	51
Şekil 3.3 Laboratuvarında PHB ekstraksiyon işlemi.....	52
Şekil 3.4 PHB kurutma aşamaları.....	53
Şekil 4.1 <i>Cereibacter sphaeroides</i> O.U.001(DSM 5864) OD değerleri (660).....	54
Şekil 4.2 <i>Rhodospseudomonas palustris</i> DSM 128 OD değerleri (660nm).....	55
Şekil 4.3 Konsorsiyum OD değerleri (660nm).....	55
Şekil 4.4 <i>Rhodobacter capsulatus</i> DSM 1710 OD değerleri (660nm).....	56
Şekil 4.5 Tek bakteri ve konsorsiyumun optik yoğunluğunun karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.6 <i>Cereibacter sphaeroides</i> pH değerleri.....	57
Şekil 4.7 Konsorsiyum pH değerleri.....	58
Şekil 4.8 <i>Rhodobacter capsulatus</i> pH değerleri.....	58
Şekil 4.9 <i>Rhodospseudomonas palustris</i> pH değerleri.....	59
Şekil 4.10 Tek bakteri ve konsorsiyumun pH'ının karşılaştırılması.....	59
Şekil 4.11 <i>Cereibacter sphaeroides</i> bakteri üretilen PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	60
Şekil 4.12 <i>Rhodobacter capsulatus</i> bakteri üretilen PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	61
Şekil 4.13 <i>Rhodospseudomonas palustris</i> bakteri üretilen PHB granüllerinin 100X görüntüsü.....	61
Şekil 4.14 Konsorsiyum bakterileri üretilen PHB granülleri 100X görüntüsü.....	62
Şekil 4.15 <i>Rhodospseudomoans palustris</i> (DSM 128), floresan mikroskopunda görselleştirilen Nil Red ile boyanmış PHB granüllerin görüntüsü (63X).....	63

Şekil 4.16 <i>Cereibacter sphaeroides</i> O.U.001 (DSM 5864), floresan mikroskopunda görselleştirilen Nil Red ile boyanmış PHB granüllerin görüntüsü (63X).....	63
Şekil 4.17 <i>Rhodobacter capsulatus</i> DSM 1710, floresan mikroskopunda görselleştirilen Nil Red ile boyanmış PHB granüllerin görüntüsü (63X).....	64
Şekil 4.18 Konsorsiyum bakteriler, floresan mikroskopunda görselleştirilen Nil Kırmızı1 ile boyanmış PHB granüllerinin görüntüsü (63X).....	64
Şekil 4.19 Bakterilerden ekstrake edilen saf PHB.....	65
Şekil 4.20 Konsorsiyum'un ¹ H NMR spektrumu.....	67
Şekil 4.21 <i>Cereibacter sphaerodeis</i> 'un ¹ H NMR spektrumu.....	68
Şekil 4.22 <i>Rhodobacter capsulatus</i> 'un ¹ H NMR spektrumu.....	68
Şekil 4.23 <i>Rhodospseudomonas palustris</i> 'un ¹ H NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.24 Standart PHB ve ekstrakte edilmiş PHB NMR spektrumunun karşılaştırılması.....	69
Şekil 4.25 <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'un FTIR dalga sayısı (cm ⁻²).....	71
Şekil 4.26 <i>Rhodobacter capsulatus</i> 'un FTIR dalga sayısı (cm ⁻²).....	71
Şekil 4.27 <i>Rhodospseudomonas palustris</i> 'un FTIR dalga sayısı (cm ⁻²).....	72
Şekil 4.28 Konsorsiyum FTIR dalga sayısı (cm ⁻²).....	72
Şekil. 4.29 Ticari-Standart PHB ve ekstrake edilmiş PHB FTIR karşılaştırması.....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
g/L	Gram/Litre
g	Gram
g/mol	Gram/molar
Gpa	Eğilme modülü
kDA	kilodalton
L	Litre
M	Molar
Mb/Mbp	Megabaz
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mmol/g	Milimolar/gram
Mpa	Çekme dayanımı
Mt	Metrik tonu
MW	Moleküler ağırlığı
nm	Nanometre
°C	Derece
ppm	Milyonda parça
rpm	Dakika başına rotasyon
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
Tm	Erime sıcaklığı

Kısaltmalar

3-HB	3-Hidroksibütirat
3HV	3-Hidroksivalerat
C	Karbon
C/N	Karbon/Azot oranı
ATP	Adenozin Trifosfat
CDW	Hücre Kuru Ağırlığı
CO ₂	Karbon dioksit
DFE	Karanlık fermantasyon atık sular
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DOL	Metabolik iş bölümü (Division of labor)
FTIR	Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi
G+C	Guanin+sitozin
GAP	Granülle ilişkili protein
H ₂	Hidrojen
HA	Hidroksialkanoat

HB	Hidroksibütirat
HV	Hidroksivalerat
Lcl	Uzun zincir uzunluğu
Mcl	Orta zincir uzunluğu
MMC	Karışık/Karma mikrobiyal kültür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NPCM	PHB olmayan hücresel materyal
OD	Optik yoğunluğu
OP	Oksijen geçirgenliği
PBSA	Polibütilen süksinat-ko-bütillen adipat
PCL	Polikaprolakton
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PE	Polietilen
PET	Polietilen tereftalat
PHA	Polihidroksialkonoat
PHB	Poli-R-3-hidroksibütirat
PHBHHx	Polihidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat
PHVB	Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)
PLA	Polilaktik asit
PLC	Polikaprolakton
PNSB	Mor kükürtsüz bakteriler
PP	Polipropilen
PU	Poliüretan
Rb	<i>Rhodobacter</i>
SBB	Sudan Black B
Scl	Kısa zincir uzunluğu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TCA	Tri-Karboksilik Asit Döngüsü
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
UV	Ultraviyole
WVTR	Yüksek su buharı transfer hızı

1. GİRİŞ

Plastikler modern insan yaşamının önemli bir parçasıdır ve her yerde bulunurlar. Plastiklerin moleküler yapısı, inşaat, sağlık, ulaşım, paketlenme, tüketim malları, endüstri ve elektronik gibi farklı kullanımlar için manipüle edilebilmektedir. Plastik kirliliği, şu anda insanları, hayvanları ve tüm dünyayı etkileyen çevre sorunlarının artmasına neden olmuştur (McAdam vd., 2020;Majerczak vd., 2022; Vlaeminck vd., 2022). Plastikler, bozunabilirlik özellikleri nedeniyle çevre üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir ve yeniden kullanılmak üzere geri dönüştürülemezdir (Adnan vd., 2022; Touloupakis vd., 2021), çevre kirliliğinin başlıca nedeni plastik kullanımıdır. Dahası, petrol bazlı plastikler, çevrede sindirilemezlikleri nedeniyle ekosistemi sıklıkla tehdit etmektedir (Lee vd., 2021;Angra vd., 2023).

2021'de küresel plastik üretimi 400 milyon metrik tonu (Mt) aşmıştır ve toplamın yaklaşık yüzde 85'i petrol türevliydi. Petrol bazlı plastikler neredeyse tüm endüstriyel segmentler için gerekli olsa da, biyolojik olarak parçalanamayan bu plastiklerin deniz, tatlı su ve karasal ekosistemlerde birikmesi küresel bir endişe kaynağıdır (De-Sousa Junior vd., 2022). Yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerin arayışı, sera gazı miktarını azaltmak amacıyla 1970'ten beri başlamıştır (McAdam vd., 2020). Yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin doğal çevre için tehlikeli olmadığı düşünüldüğünde, bu biyoplastikler çevreyi petrol bazlı plastik tehlikelerinden korumak için alternatif bir çözüm olabilmektedir (Aryaraj ve Pramitha, 2021; Getachew ve Woldesenbet, 2016; Touloupakis vd., 2021).

Genellikle biyoplastikler çevrede bulunan doğal mikroorganizmalar tarafından üretilir, bu nedenle biyoplastikler zaten doğal ortamda buldukları için doğaya zararlı değildir (Aryaraj ve Pramitha, 2021). Farklı çeşit mikroorganizmalar biyoplastik üretebilmektedir. Bugüne kadar polyesterleri sentezleyen yaklaşık 300 mikroorganizma türü keşfedilmiştir ve kuru hücre ağırlığının (CDW) %50-90'ı arasında değişen üretim seviyelerine ulaşılabilmektedir. PHB üreten bakterilerin çoğu genellikle üst toprak ve atık sudan izole edilmektedir. Genel olarak, PHB üreten mikroorganizmalar çeşitli ortamlarda bulunur ve atık su, yağ ve uçucu yağ asitleri gibi farklı karbon kaynaklarını kullanma yetenekleri nedeniyle büyüebilmiştir. Polihidroksialkanoatlar (PHA), büyüme sınırlayıcı koşullar altındayken veya alternatif aerobik/anaerobik koşullar altındayken fermantasyon işlemi yoluyla sentezlenebilmiştir (Yousuf, 2017).

Bakteriler çeşitli metabolik sistemleri nedeniyle her koşulda büyüyebilirler, hem koşullar hem de besinler uygun olmadığında anaerobikten aerobik metabolizmaya geçebilmektedir. Polilaktik asit (PLA), selüloz, kolajen, polibütillen süksinat-ko-bütillen adipat (PBSA), kitin, polikaprolakton (PCL) ve poli-hidroksialkanoatlar (PHA) gibi farklı parçalanabilen plastik türleri vardır (Adnan vd., 2022). Biyoplastikler, çevrede bozulmaları yüz binlerce yıl gerektiren polietilen (PE) gibi sentetik plastiklerin yerine kullanılabilir (Vu vd., 2022; Vlaeminck vd., 2022). PHB polimerleri, polipropilen ve polietilen plastiklerine benzer niteliklere sahiptir. Biyoplastik malzemelerin geliştirilmesi, dünyanın çevresel zorluklarına önemli çözümler vurgulamaktadır ve gezegenimizin restorasyonuna yol açacaktır (McAdam vd., 2020).

Biyoplastikler modern dünyada kullanım için giderek daha sürdürülebilir hale geliyor ve fosil bazlı plastiklerin yerini alması beklenmektedir. Biyopolimer örnekleri arasında nişasta karışımları, polihidroksibütirat, polilaktik asit, selüloz, kazein ve kitin polimerleri bulunur (Arora vd., 2023). PHA'nin oluşturulması iki aşamaya ayrılır; ilk aşama, dengeli bir beslenme yaklaşımıyla hücrelerin yüksek hücre yoğunluklu bir kültürde yetiştirilmesidir, ikinci aşama ise, en önemli besinlerden en az birinin sınırlandırılması ve fazla karbon kaynağı bulundurmasını içermektedir (Rajesh Banu vd., 2021). Ortamada besinlerin dengesizliği, hücre içi PHA üretimi ve birikimine neden olur. *Cupriavidus necator* (ayrıca *Ralstonia eutropha* olarak da bilinir), *Alcaligenes*, *Azotobakter*, *Basil*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, ve *Rhizobium* PHB üretmek için kullanılan yaygın olarak araştırılan suşların bazı örnekleridir ve *Ralstonia eutropha* en kapsamlı çalışılandır (McAdam vd., 2020; Narayanan vd., 2020; Touloupakis vd., 2021).

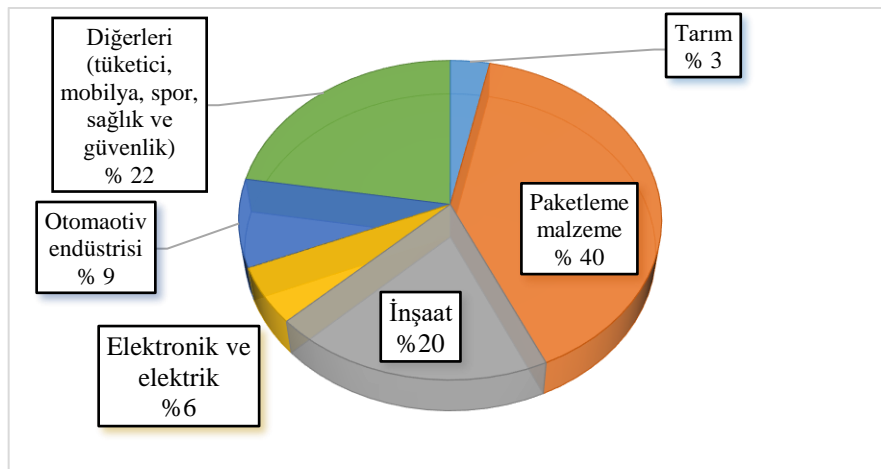
Mikroorganizmalar, mevcut karbon kaynaklarına ve hücrede aktif olan metabolik süreçlere bağlı olarak çeşitli polihidroksialkanoat formlarını sentezleyebilir. Poli-R-3-hidroksibütirat (P3HB) keşfedilen ilk PHA'ydı ve doğada bulunan en sık polihidroksialkanoattır (Thapa vd., 2018; Koch ve Forchhammer, 2021). PHB'ler, bol karbon olduğunda bakteri, arke, maya ve mantar gibi birkaç ökaryotta oluşan karbon ve enerji rezervi polimerleridir, ancak azot, fosfor, oksijen veya kükürt gibi diğer kaynaklar az olduğunda PHB üretilebilmektedir. Uygun enerji kaynakları olmadığında, bakterilere enerji sağlamak için depolama molekülü (PHB) metabolize edilmektedir (Kemavongse vd., 2007).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Petrol Bazlı Plastikler

Konvansiyonel petrol bazlı plastikler, 1940'lardan bu yana büyük ilgi ve kullanım alanı kazanmış ve dünyada kullanılan en yaygın malzeme haline gelmiştir (Singh vd., 2017). Ahşap, cam, metal ve diğer malzemelerin yerini almak için petrol bazlı plastikler kullanılmıştır. Plastiklerin geniş kabul edilebilirliği, stabilite, hafiflik, dayanıklılık ve ekonomik fizibilite dışında uygun malzeme özelliklerine atfedilir. Bununla birlikte, doğada atıldığında bu plastikler, mikroplar tarafından bozunamayacakları için birkaç yıl kalıcılıkları nedeniyle çevreye tehdit ve zarar verir (Singh vd., 2017). Dahası, mikroplastikler biyolojik olarak parçalanamadıkları için ekosistemleri sıklıkla tehdit eder (Lee vd., 2021). Petrol türevi plastikler, sera gazı emisyonu, karasal ve deniz habitatlarında birikme, kirlilik gibi yaşam döngüleri boyunca artan çeşitli çevresel sorunlarla bağlantılıdır (Acharjee vd., 2023). Aynı zamanda, plastiklerin toplanması ve geri dönüştürülmesi için altyapı, artan yıllık plastik üretim talebine ayak uyduramamaktadır (Vu vd., 2022). Plastiklerin yenilenme ve geri dönüşüm etkinliğinin olmaması sonucu plastikler doğal ortama bırakıldığında çevre kirlenir.

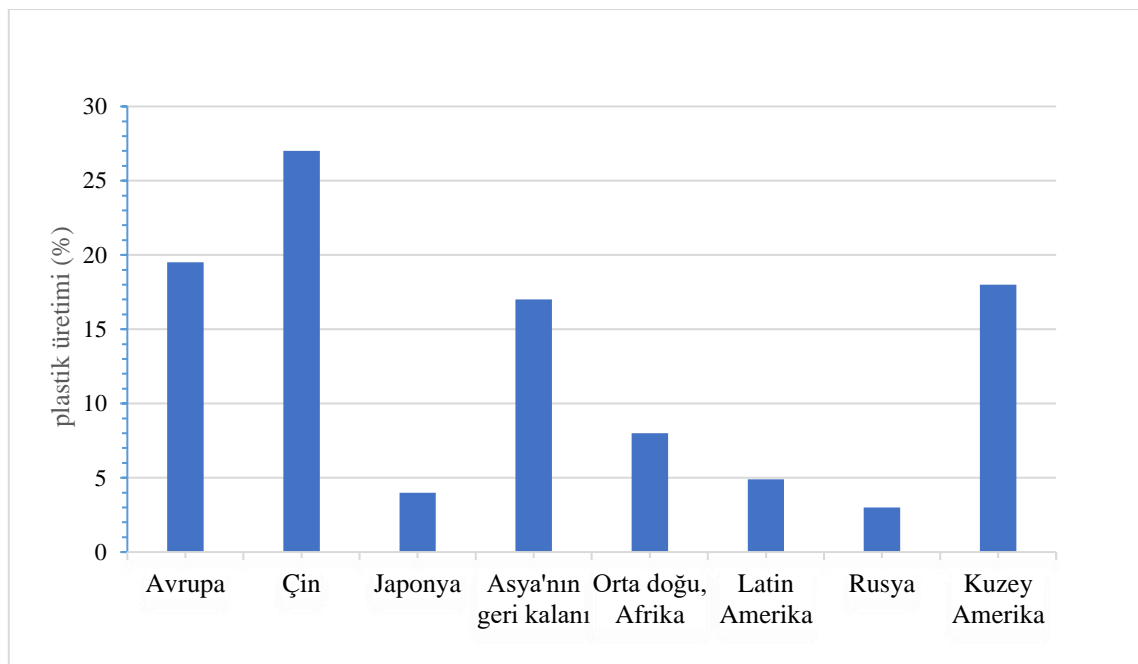
Şekil 2.1'de plastiklerin geliştirilmesinden bu yana son 50 yılda plastikler, gıda koruma, paketleme, bina ve inşaat, tekstil, ulaşım, elektrik, elektronik, endüstriyel makineler, tüketici ve kurum ürünleri dahil olmak üzere çeşitli yenilikçi şekillerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Okeke vd., 2022). Plastikler, ağırlıkları ve dayanıklılıkları nedeniyle çeşitli ürünlerde kullanılmaktadır.



Şekil 2.1 2016 yılında Avrupa plastik talebinin segmentlere göre dağılımı (Yousuf, 2017)

Petrol bazlı plastiklerin çoğu ambalaj endüstrisinde kullanılmaktadır. İnsanlar tarafından tüketilen ürünlerin çoğu, tüketicilere kolayca taşınabilmeleri için plastik kullanılarak paketlenir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi, 2016 yılında malzemenin ambalajlanmasından %40 oranında plastik talebi kaydedilmiştir. Dünyada plastiğin kullanımını ve ihtiyacı çok yüksek ve her saniye çok miktarda plastik üretilmektedir (Arora vd., 2023). Ayrıca sentetik plastik üretiminin ham maddeye ihtiyacı vardır doğal gaz veya rafine ham petrol gibi doğal kaynaklardan elde edilen malzemelerdir. Bu nedenle plastik üretiminin ve tedarik zincirinin neden olduğu kirlilik sadece sağlık sorunlarına neden olmakla kalmamaktadır, aynı zamanda dünyamızın doğal kaynaklarını da tüketmektedir (Arora vd., 2023).

İnsanlar plastiği diğer yeni malzemelere dönüştürmeye çalışır, ancak süreç boyunca farklı zorluklarla karşı karşıya kaldırılır. Bazı geri dönüşüm süreçleri, doğaya bir miktar karbon monoksit saldıkları için çevre dostu değildir. Plastik geri dönüşümü sırasında oluşan yeni bileşikler çok karmaşıktır ve basit karbon bileşiklerine bölünemez. Plastik geri dönüşümündeki zorluklar yüksek işçilik maliyeti, geri dönüşümden sonra orijinal kalite kaybı, yetersiz altyapı, plastiklerin sınıflandırılması, farkındalık eksikliği içerir (Arora vd., 2023). Dünya da plastik üretimi çok yüksektir ve bu da çevre kirliliğinin artmasına neden olmuştur. Şekil 2.2'de, 2015 yılında yapılan bir ankete göre Çin, en büyük plastik üreten ülkesidir.



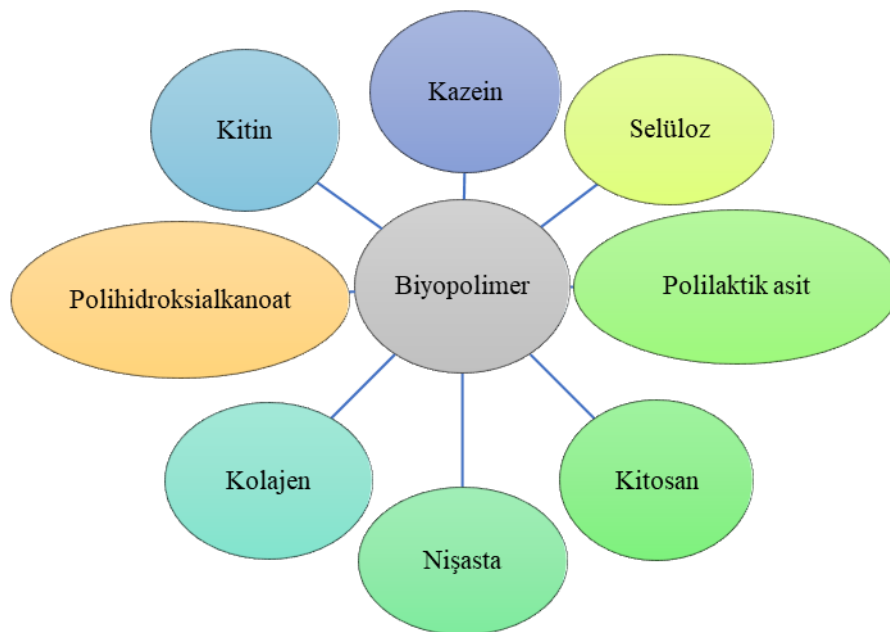
Şekil 2.2 2015 yılında yapılan bir ankete göre petrol bazlı plastik üretimi (Yousuf, 2017)

Sadece ABD'de 35,68 milyon ton plastikten sadece %8,5'i geri dönüştürülür ve geri kalanı yakılır ya da çöplüğe atılır. Plastik doğaya atıldığında kirliliğe neden olur ve plastik yandığında atmosfere sera gazları salınır. Hindistan'da tüketilen tüm plastiklerin yarısından fazlası, biyolojik olarak parçalanamayan ve oldukça atıl yapıları nedeniyle çevre için önemli bir tehlike oluşturan depolama alanlarına biriktirir (Devi vd., 2015).

Mevcut düşük atık yönetimi uygulamaları ile 2050 yılına kadar yaklaşık 12 milyar metrik ton plastik atık çevreye karışacaktır (Arora vd., 2023). Ayrıca plastikler, yutulduğunda veya solunduğunda solunum sorunlarına, cilt hastalıklarına, göz hasarına, kansere, alerjilere ve önemli ölçüde daha ölümcül sağlık sorunlarına neden olacak şekilde insan sağlığına zarar verir (Arora vd., 2023). Geleneksel plastikler genellikle kolayca bozulmazlar, özelliklerine ve çevrelerine bağlı olarak genellikle önümüzdeki 1000 yıl boyunca çevrede kalmaktadır (Acharjee vd., 2023).

2.2. Biyo-Plastikler/Biyopolimerler

Biyopolimerler esas olarak karbonun asimilasyonu ile üretilir ve mikroorganizmalar tarafından diğer enerji kaynaklarına erişilemediğinde metabolize edilecek enerji depolama molekülleri olarak kullanılır (Yousuf, 2017). Biyopolimer örnekleri arasında (Şekil 2.3) nişasta karışımları, polihidroksialkanoat, polilaktik asit, selüloz, kazein, kolajen, kitosan ve kitin polimerleri bulunur (Arora vd., 2023).



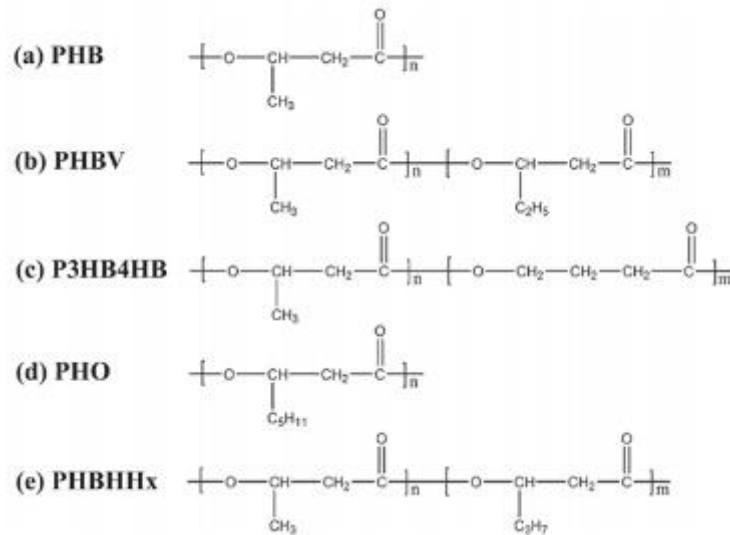
Şekil 2.3 Biyoplastik türleri

Biyopolimerlerin bozunabilirliği, genellikle hidrolitik saldırıya daha duyarlı olan polimerin amid, eter veya ester bağlarına hidrolitik olarak kararsız bağların dahil edilmesinin bir sonucudur (Arora vd., 2023). En yaygın kullanılan biyolojik olarak parçalanabilen biyoplastikler PLA, PHA, PHB ve nişasta karışımlarıdır.

2.2.1. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Polihidroksialkanoat (PHA), polimerin monomerik bileşenlerine dayanan çok çeşitli istenilen fiziksel özelliklere sahip biyolojik olarak üretilmiş bir polimer sınıfıdır. Yenilenebilir kaynaklardan yapılır ve bu nedenle geleneksel sentetik polimerlerin aksine çevreye faydalı olarak kabul edilir (Rajesh-Banu vd., 2021). Polihidroksialkanoatlar (PHA), geniş bir termoplastik polimer ailesini içeren bir mikrobiyal polyester ailesidir (McAdam vd., 2020). Polihidroksialkanoatlar, birkaç (-) gram negatif ve (+) gram pozitif bakteride, arke ve siyanobakterilerde üretilen biyolojik olarak parçalanabilen polyesterlerdir (Mezzolla vd., 2018). Polihidroksibütirat (PHB), poli-hidroksibütirat-ko-hidroksivalerat (PHBV), poli-hidroksibütirat-ko-hidroksiheksanoat (PHBHHx) ve polihidroksioktanoat (PHO), doku rejenerasyon cihazları, onarım cihazları, onarım yamaları ve dikişler gibi biyomedikal uygulamalar için sıklıkla çalışılan PHA tipleridir. (Wei vd., 2011; Mezzolla vd., 2018).

PHA, iki CoA tiyoester substratlarının varlığında üretilir. Genel olarak, PHA'nın mikrobiyal üretimi, son polimer kalitesini etkileyebilecek bir dizi karmaşık işlem adımı (kültür büyümesi, hücre içi polimer birikimi, hücre hasadı ve polimer ayrımı) takip edilir (Penloglou vd., 2012). Ana zincirin yapısı ve uzunluğu ile yan zincirler, PHA'nın türünü belirler. Şekil 2.4'te, değişen artık zincir uzunluklarına sahip farklı monomer örneklerini (polihidroksibütirat=PHB, polihidroksivalerat=PHV, kopolimer =PHBV) göstermektedir. PHA sentezi sırasında bir ortamda asetik ve bütirik asitlerin varlığı, 3-hidroksibütirat (3HB), propiyonik ve valerik asitler ise 3-hidroksivalerat (3HV) oluşumuna neden olur (Kootstra vd., 2017; Jiang vd., 2011).



Şekil 2.4. Farklı PHA'ların kimyasal yapısı (Ke vd., 2017)

Polihidroksialkanoatlar, dengesiz büyüme koşulları altında çeşitli karbon kaynaklarının metabolik dönüşümü yoluyla çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilen termoplastik polyesterlerdir (Penloglou vd., 2012; Tănase vd., 2015). Polihidroksialkanoatlar (PHA), hidroksialkanoatların (HA) polyesterleridir ve monomer olarak β -hidroksiasilden oluşur (Kemavongse vd., 2007). Temel besin kaynakları dengesiz veya düşük olduğunda, mikroplar karbon ve enerjiyi depolamak için malzeme biriktirme yaklaşımını kullanmaktadır (Kedia vd., 2014). Bu biyopolimerler karbon depolama molekülleri görevi görür ve PHA, farklı bakterilerdeki hücre kuru ağırlığının %80'inden fazlasını oluşturabilir (Yang vd., 2010). Üretilen PHA, açlık sırasında organizma için bir karbon kaynağı görevi görür ve biriken PHA, depolimeraz enzimi yardımıyla suda çözünür monomere depolimerize edilir (Sabarathan vd., 2018).

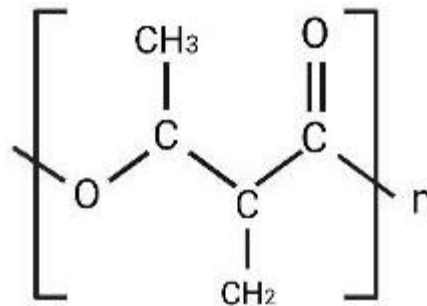
2.2.1.1. Polihidroksibütirat (PHB)

Poli-3-hidroksibütirat (PHB), çok sayıda prokaryot tarafından bir karbon depolama molekülü olarak üretilen polihidroksialkanoat (PHA) ailesinin alifatik bir polyester üyesi olarak bilinir (Müller-Santos vd., 2021; Aristya vd., 2022). Polihidroksialkanoatlar, monomerin uzunluğuna ve monomerdeki karbon sayısına göre örneğin kısa zincirli (C_3 - C_5), orta zincirli (C_6 - C_{16}) ve uzun zincirli [sırasıyla scl, mcl ve lcl] olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Koch ve Forchhammer, 2021; Rajan vd., 2019). R-yan zincirinde bir metil grubuna (CH_{3-4}) sahip olduğu için PHB, kısa zincir uzunluğunda (C_3 - C_5) polimer olarak sınıflandırılır. Sentezlenen PHB'nin tespitinde, metil grubu bir

belirleyici görevi görür. Analitik yaklaşım, sentezlenen polimeri PHB olarak tanımlayan metil fonksiyonel grubunu tespit eder.

Polihidroksibütirat (PHB), biyolojik olarak parçalanabilen özellikleri nedeniyle polyester sınıfında ticari potansiyel uygulaması olan organik bir biyopolimerdir. PHB, termoplastik bir polihidroksialkanoattır (PHA) ve en yaygın PHB türü, çeşitli bakteriler tarafından besin kaynağı olarak üretilen poli-3-hidroksibütirattır (Calleja, 2020; Hermawan & Jendrossek, 2007; Brown vd., 2022). Poli-R-3-hidroksibütirat tanımlanan ilk PHA türüdür ve doğada en yaygın bulunan PHA'dır (Thapa vd., 2018). Yüz elli PHA monomeri arasında, en çok sentezlenen PHA olan poli- β -hidroksibütirattır. Fiziksel, mekanik ve immünolojik özellikleri nedeniyle tarım, gıda ve tıptaki uygulamalar için ideal bir aday haline gelmiş ve daha fazla dikkat çekmiştir (Trakunjae vd., 2021).

PHB'ler bakteriler tarafından sentezlenen makromoleküllerdir ve bakteriler farklı stres koşullarında büyüdüklerinde yedek malzeme olarak biriken inklüzyon granülleridir (Getachew & Woldesenbet, 2016). Ke ve arkadaşları, (2017) PHA'nın genel formülünü $[-O-CH(R)-CH_2-CO-]$ olarak vermiştir. Burada eğer $R=CH_3$ ise, polimer bir P(3HB)'dir (Şekil 2.5) ve PHB'nin tipik moleküler ağırlığı $2-5 \times 10^{-3}$ kDa arasında değişir. Dos-Santos vd., (2017) bir monomerin karboksil grubu ($-COOH$) ve başka bir monomerin hidroksil grubu ($-OH$) bir ester bağlantısı oluşturur. PHA sentaz bu polimerizasyon işlemi katalize etmektedir. Yan zincirdeki karbon atomlarının sayısına bağlı olarak, fazlar farklı tiplerde sınıflandırılır.



Şekil 2.5 CH_3 varlığı ile gösterilen PHB formülü, Created in BioRender. Manga, I. (2024) <https://BioRender.com/i52j205>

Poli(3-hidroksibütirat), polimere hidrofobik özellikler de sağlayan bir metil (CH_3) grubunun varlığı ile ayırt edilir (Dos-Santos vd., 2017). Doğrusal PHB tipik olarak, her biri diğerinin hidroksil grubuna bir ester bağı yoluyla bağlanan 3-hidroksibütanoik asit monomer birimlerinden oluşur. PHB sarmal yapılar oluşturur çünkü yapısal düzenliliği, sterik engeli azaltmak için tüm yan grupların aynı yöne ve sarmalın merkezinden uzağa işaret etmesine neden olur (Sharma & Dhingra, 2016). PHB, çok sayıda 3-hidroksibütirat monomeri bir ester bağı ile birbirine bağlandığında oluşur. Polihidroksibütirat (PHB),

genellikle mikrobiyal biyosentez yoluyla üretilen polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) ailesinin bir üyesidir (Aristya vd., 2022).

PHB, Lemoigne tarafından 1926'da sitoplazmik dahil edilmede gösterildiği gibi *Bacillus megaterium*'da keşfedilmiştir (Aristya vd., 2022). Lemoigne tarafından, gram pozitif bakteri *B. megaterium* içinde poli-3-hidroksibütirat (PHB) granülleri tanımlanmıştır ve PHA'ların (polihidroksialkanoatlar) keşfedilmesine yol açılmıştır (Rehm, 2021). Biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu bir termoplastik olarak çok dikkat çekmiştir. PHA, çok çeşitli bakteriler tarafından üretilen doğal olarak en fazla bulunan ve oluşan biyopolimerlerdir ve kimyasal olarak sentezlenmiş plastiklerle aynı özelliklere sahiptir (Yang vd., 2010; Getachew & Woldesenbet, 2016). Biyolojik olarak parçalanabilen bir plastik olan polihidroksibütiratın (PHB), geleneksel plastiklere benzer özelliklere sahip olduğu bilinmektedir (Lathwal vd., 2015), ve geleneksel parçalanamayan plastiklerin değiştirilmesi için bir potansiyel sergiler.

PHB'nin, bir depolama polimeri olarak hizmet etmesinin yanı sıra çeşitli stresör türlerine karşı direnci arttırması ve bakterileri hidroksil radikallerine karşı koruması önerilmiştir (Koch & Forchhammer, 2021). PHB, yenilenebilir kaynaklar kullanılarak canlı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, tamamen biyolojik olarak parçalanabilen ve sentetik plastiklerle karşılaştırılabilir özelliklere sahip en umut verici hücre içi yedek polimerlerdir (Yousuf, 2017; Carvalheira vd., 2022; Agnihotri vd., 2022). Çeşitli PHA türler keşfedilmiş olmasına rağmen, poli-3-hidroksibütirat (PHB) homopolimeri en iyi bilinen ve karakterize edilenidir. P3HB, hem amorf hem de kristal fazları içeren doğrusal zincir yapısı nedeniyle oldukça kristaldir (McAdam vd., 2020).

2.2.1.2. Polihidroksibütirat (PHB) biyosentezi

PHB mikroorganizma hücrelerinde; mikrobiyal sekonder metabolizmanın bir yan ürünü olarak, besin stresi durumları altında veya yetersiz besinlerle ve aşırı karbon varlığı gibi olumsuz bir ortamda oluşur (McAdam vd., 2020). Genel olarak, PHB'nin mikrobiyal biyosentezi, bol miktarda karbon varlığında azot, kükürt, oksijen veya fosfat gibi bir besin maddesinin sınırlandırılması olduğunda ortaya çıkar (Yang vd., 2010). Sınırlayıcı besin tekrar sağlandıktan sonra, PHA hücre içi PHA-depolimeraz enzimi yoluyla parçalanmaya başlar ve ardından metabolize olur. Besin sınırlamasının bir sonucu olarak sitrat sentaz ve izositrat dehidrojenaz baskılandığından, TCA döngüsünden iki asetil-CoA molekülü yoğunlaşarak asetoasetil-CoA üretir. Asetoasetil-CoA redüktaz daha sonra asetoasetil-

CoA'nın hidroksibütiril-CoA'ya dönüştürülmesine neden olur. Daha sonra PHB, (R)-3 hidroksibütiril-CoA moleküllerinin polimerizasyonu yoluyla PHB sentaz tarafından üretilir (Sharma & Dhingra, 2016).

Ayrıca, polimer verimi ve kalitesi, karbon kaynağı türü, bakteri suşu, metabolik yol, çeşitli besinlerin konsantrasyonları ve yetiştirme stratejisi gibi bir dizi işlem parametresine bağlıdır. PHB biyosentezinin en önemli genleri şunlardır: (Mezzolla vd., 2018; Albureikan, 2019)

- i. PhaP, granül oluşturan bir protein olan fazinleri kodlayan genler; fazinler, sitoplazmada PHB'yi kaplayan ve stabilize eden küçük amfifilik proteinlerdir (Martínez-Martínez vd., 2019).
- ii. PhaM granül lokalizasyonu ve PhaR, aktivatörü ve düzenleyici proteinler kodlamak, düzenleyici proteinler fazin sentezini kontrol edilmektedir.
- iii. PhaC, PHA sentazın katalitik aktivitesinin hızlandırıcısını kodlayan, sentazlar PHB birikiminde rol oynar.
- iv. PhaA, asetoasetil-CoA 3-ketotiyolaz kodlaması.
- v. PhbB, asetoasetil-COA redüktaz kodlaması
- vi. PhaG, 3-hidroksiasil taşıyıcı protein-CoA transferazı kodlayan gen
- vii. Enoil-CoA hidratazı kodlayan PhaJ
- viii. Hücre içi PHA-depolimerize edici enzimleri kodlayan PhaZ, depolimerazlar PHB kullanımında rol oynar (Wahl vd., 2012).

Fazinlerin, GAP'in granüllerle ilişkili ana proteinleri olduğu gösterilmiştir. Fazinler üzerine yapılan çalışmalar, PHB üreten mikroorganizmaya bağlı olarak PHB polimeraz ve PHB depolimerazlarla olası etkileşimleri önermiştir (Martínez-Martínez vd., 2019). *Aeromonas hydrophila*'da, tek PhaP aşırı eksprese edildiğinde PHB içeriği iki kat artmıştır. Ayrıca PhaP aşırı eksprese edildiğinde poli(3-hidroksibütirat-co-3-hidroksiheksanoat) kopolyesterinin monomer bileşiminde değişiklikler gözlenmiştir (Martinez-Martinez vd., 2019).

PHA sentaz (*PhaC*), PHA üretiminde birincil ve anahtar enzimdir, PHA polimerleri oluşturmak için monomerleri polimerize eder. PHA substrat özgülüğü, uzun PHA zincirine dahil edilen monomer türlerini belirler (Zher Neoh vd., 2022; Mezzolla vd., 2018; Wahl vd., 2012). *PhaC* geni *C. sphaeroides* ve *Rhodospirillum rubrum*'da, diğer üç gen ise *R. capsulatus*'ta keşfedilmiştir. Ayrıca bu bakterilerden üç PHB sentaz enzimi (tip I, II ve III) de tanımlanmıştır (Monroy & Buitrón, 2020). Sentaz tip I enzimi, en büyük polimerlerin (500.000 ila birkaç milyon kDa) üretiminde rol oynar. Ayrıca,

sentaz tip II, moleküler ağırlığı 50000 ile 500000 kDa arasında olan PHB üretilir. Tip III enzimler, tip I ve tip II sentaz arasında moleküler ağırlıklı PHB üretilmiştir (Monroy and Buitrón, 2020). Ayrıca, Mikroorganizmalar tarafından üretilen polihidroksibütiratın moleküler ağırlığı (MW) türe, karbon kaynağına ve büyüme koşullarına bağlı olarak değişir (Alshehrei, 2019; Koch & Forchhammer, 2021; Rajan vd., 2019).

PHB'nin molekül ağırlığı ve monomer bileşiminin, fiziksel özelliklerine yansıyan mikroorganizmalara ve büyüme koşullarına bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (Balakrishna Pillai vd., 2018). Guerra-Blanco ve arkadaşlarına göre, bu enzimler, 3-hidroksiasil-CoA substratlarının PHB'ye dönüşümünü katalize ederek, 3-hidroksibütiril-CoA'nın PHB'ye dönüşümünü PHB üretimindeki son adım olarak tanımlayan diğer araştırmacı tarafından onaylanan CoA'yı serbest bırakır (Guerra-Blanco vd., 2018; Fradinho vd., 2014).

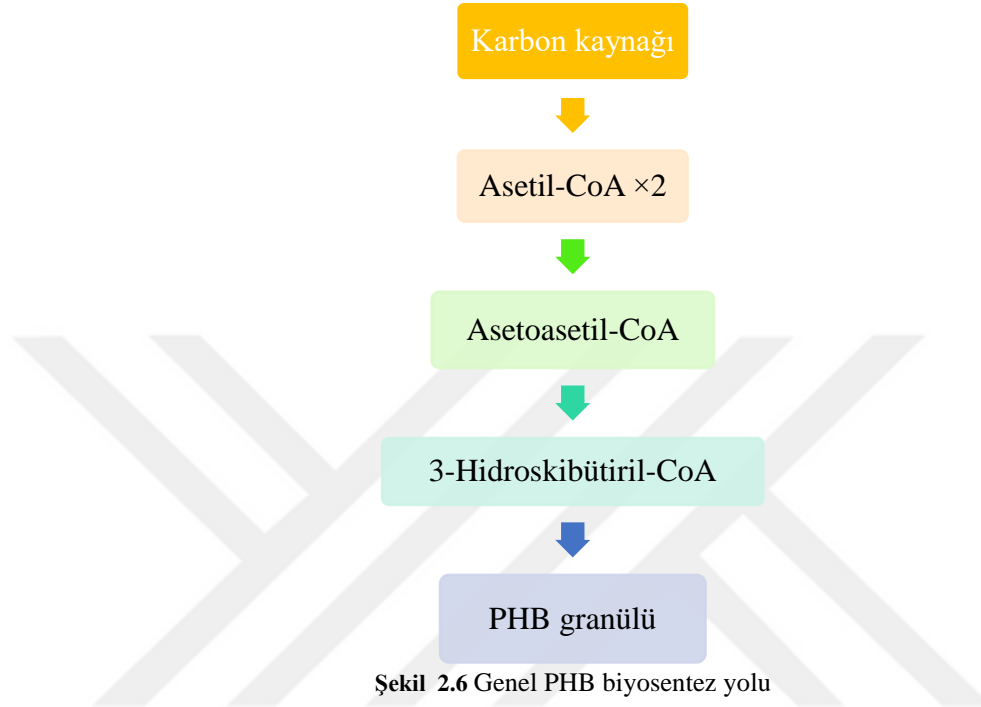
PhaC geni, PHA üretimi arasında en önemli genidir ve bu gen, biyo-polimer sentezi için anahtar enzimi kodlar (Chek vd., 2019; Mezzolla vd., 2018). PHA sentaz, PHB'nin polimerizasyonunda rol oynar ve polihidroksibütirat polimerinin biyosentezinin kontrolünde çok önemlidir. Mutasyon üzerine yapılan araştırmaya göre, *PhaA* ve *PhaAB* genlerindeki tek ve çift mutasyonlar polimerin sentezini etkilememiştir (Albureikan, 2019). Bununla birlikte, *PhaC* genindeki tek bir mutasyon ile PHB üretimi etkilenmiştir ve engellenmiştir. Bu, PHB sentezinde *PhaC* geninin en önemli gen olduğunu göstermiştir. Ek olarak, bakteri genomunda PHB sentazını kodlamaktan sorumlu olan *PhaC* geninin tespiti, PHB üreten mikroorganizmalarda PHB üretiminin bir teyidi olarak işlev görebilmektedir (Albureikan, 2019).

2.2.1.3. Polihidroksibütirat (PHB) biyosentez yolları

PHB'nin biyosentez yolu: asetil-CoA C-asetiltransferaz, NADPH'ye bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz ve PHA sentaz olmak üzere üç enzim tarafından gerçekleştirilmektedir (Aristya vd., 2022). PHB üreten mikroorganizmalar, PHB'yi üç enzimatik reaksiyonla sentezler (Martínez-Martínez vd., 2019). Mikrobiyal PHB üretimi asetil-CoA'dan başlar ve 3 adımda ilerler (Jiye vd., 2021) [Şekil 2.6];

- i. β -ketotiyolaz (*PhaA*) iki asetil-CoA'yı asetoasetil-CoA'ya yoğunlaştırır,
- ii. daha sonra asetoasetil-CoA, bir asetoasetil-CoA redüktaz (*PhaB*) ile 3-hidroksibütiril-koahidroksibütiril-koahidroksibütiril-CoA'ya indirgenir.

- iii. son olarak, 3-hidroksibütiril-CoA monomerleri, bir PHB sentaz (*PhaC*) ile PHB'ye polimerize edilir, PHB sentaz *PhaC1*, PHB sentezindeki anahtar enzimdir ve biyokimyasal özellikleri geçmişte çeşitli katkılarında araştırılmıştır (Pfeiffer ve Jendrossek, 2014).

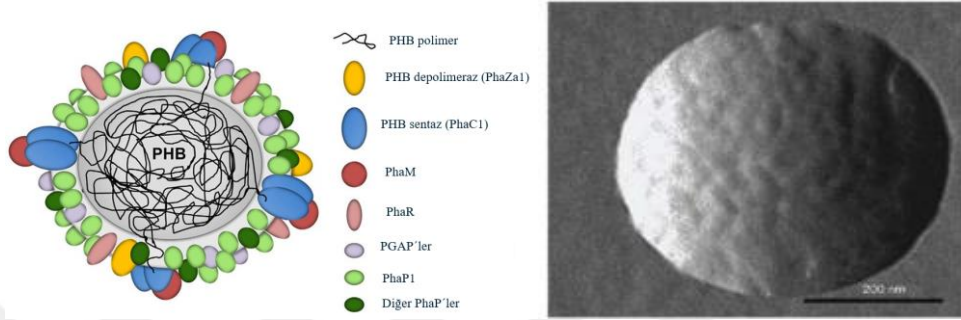


Sentezlendikten sonra PHB, granülle ilişkili proteinler (GAP'ler) tarafından kapsanan PHB içeren karbonozomlar adı verilen granüller halinde paketlenir (Martínez-Martínez vd., 2019). PHB'ye giden biyokimyasal yol oldukça basittir ve asetil koenzim-A'dan (asetil-CoA) PHB'nin monomerik öncüsüne, PHB sentaz (*PhaC1* geni) ile PHB'ye polimerize edilen 3-hidroksibütiril-CoA'ya (3HB-CoA) kadar sadece iki enzimatik adım gerektirir (Pfeiffer & Jendrossek, 2014). Temel besin kaynakları dengesiz veya düşük olduğunda, mikroplar karbon ve enerjiyi depolamak için malzeme biriktirme yaklaşımını kullanır (McAdam vd., 2020).

2.2.1.4. PHB granüllerinin morfolojisi

PhaP'ler, polihidroksibütirat (PHB) granüllerinin sayısının ve boyutunun düzenlenmesinde rol oynayan ampifilik proteinlerdir (Martínez-Martínez vd., 2019). Bakteri hücrelerinde PHA, bir lipit kaplaması ve fazinler, PHA sentaz ve depolimerazlar gibi çeşitli proteinlerle kaplanmış çözünmeyen granüller olarak depolanır (Arikawa vd., 2017). Şekil 2.7'de karbonozomlar olarak da adlandırılan polihidroksibütirat (PHB)

granülleri, bir PHB polimer çekirdeği, yapısal ve fonksiyonel proteinlerden oluşan bir yüzey tabakasından oluşan supramoleküler komplekslerdir (Bresan vd., 2016; Nygaard vd., 2021; Koch & Forchhammer, 2021). Proteinlerin çoğu spesifik olarak PHB granüllerinin yüzeyinde lokalizedir. PHB granülleri, yüzeylerinde keşfedilen çok sayıda proteinin bir sonucu olarak çok işlevli birimler olarak sınıflandırılmış ve bu organel benzeri yapılar için "karbon atomları" adı önerilmiştir (Bresan vd., 2016).



Şekil 2.7 (a) *Cupriavidus necator* H16'da bir in vivo PHB granülünün modeli ve granül üzerinde bulunan farklı PHB granülüyle ilişkili proteinler (Bresan vd., 2016) (b) Granül yüzeyinde küresel parçacıkların varlığını gösteren atomik kuvvet mikroskobu sapma görüntüsü (Kunasundari ve Sudesh, 2011)

Sentezlendikten sonra polihidroksibütirat, granülle ilişkili proteinler(GAP'ler) tarafından kapsanan PHB içeren karbonozomlar adı verilen granüller halinde paketlenir (Martínez-Martínez vd., 2019; Müller-Santos vd., 2021). PHA, bakterilerde hücre içi olarak $0.5\pm 0.2\mu\text{m}$ çapında depolama granülleri olarak depolanır, (Nygaard vd., 2021) yüzey tabakası fosfolipit içermez ve sadece proteinlerden oluşmaktadır. PHB granüllerinin yüzeyinde bulunan protein; yapısal, biyosentetik, katabolik ve düzenleyici işlevler gibi çeşitli rollere sahiptir. Şu anda bilinen PHB granülüyle ilişkili proteinler (boşluklar), farklı renklere globüller ile sembolize edilmektedir. Bu modeldeki tüm proteinlerin daha önce floresan proteinlerle uygun füzyonların ekspresyonu yoluyla in-vivo PHB granüllerine bağlandığı gösterilmiştir (Bresan vd., 2016). Bununla birlikte, PHB/PHA granül yüzey tabakasının kesin moleküler yapısı henüz bilinmemektedir.

Fazinler PhaP geni tarafından kodlanır, fazinler (PhaP) PHB granüllerinde bulunan baskın proteinlerdir ve sentezlerinde rol oynadığı düşünülmektedir. PhaP yokluğunda hücrenin sitoplazmayı kaplayan tek bir granülü sentezlediği, ancak bu proteinler mevcut olduğunda hücrenin daha fazla sayıda küçük granül sentezlediği tespit edilmiştir (Monroy & Buitrón, 2020). Fazinler ayrıca hidrofobik PHB yüzeyini hidrofilik sitoplazmadan korur ve protein etkileşimlerini önler (Koch & Forchhammer, 2021).

Ayrıca, düzenleyici proteinlerin (PhaR), PHB ve DNA moleküllerini bağlayabildikleri için PHB üretiminde fazin düzenleyicileri olarak hareket ettikleri varsayılmaktadır. PHB'nin yokluğunda, Maehara ve ark., PhaR'ın granülle ilişkili protein PhaP'ın gelişimini engelleyen düzenleyici bir mekanizmaya aracılık ettiğini keşfetmiştir. Bununla birlikte, hücreler PHB toplamaya başladığında, PhaR, PhaP promotör alanından ayrılarak PhaP ekspresyonunu düzenleyebilir (Monroy & Buitrón, 2020). PhaM, PHB granülünün bakteri nükleoidine bağlanması ve her iki yavru hücrenin de hücre bölünmesi sırasında ana hücreden neredeyse eşit miktarda PHB granülü almasını sağlamak için çok önemli görünmektedir (Pfeiffer & Jendrossek, 2014; Mezzolla vd., 2018). Ayrıca PhaM, PHB metabolizmasını doğrudan etkileyerek PHB sentaz PhaC1'i uyarır. Karbon yoksunluğu altında, Şekil 2.7'de gösterilen PhaZ'ler, PHB hidrolizinden (suyla bölünme) ve tiolitikten sorumludur (Müller-Santos vd., 2021). Polimeraz enzimleri, enerji için polimerin basit monomere parçalanmasında rol oynar.

2.2.1.5. PHB'nin kimyasal ve mekanik özellikleri

Polimerler genellikle hidrofobiklik, erime noktası, cam geçiş sıcaklığı ve kristallik derecesi gibi faktörlere göre karakterize edilmektedir. PHA ailesi, sert kristalden elastik olana kadar çok çeşitli mekanik özelliklere sahiptir (Samrot vd., 2021). PHB'nin mekanik özellikleri geleneksel polimerlerle karşılaştırılabilir, aynı zamanda biyolojik bozunma oranlarının yüksek olması, çeşitli mikroorganizmalar tarafından suya ve karbondioksit'e parçalanması nedeniyle dikkat çekici malzemelerden biri haline gelmiş bir polimerdir (Yousuf, 2017; Shah, 2014). PHB'nin bozulması sırasında karbon döngüsü tamamen kapalıdır. Hücrenin içindeki PHB, sıvı amorf bir durumda bulunur. PHB tamamen izotaktiktir ve herhangi bir zincir dallanmasına sahip değildir, bu nedenle, işleme sırasında kolayca akar (Dos-Santos vd., 2018).

Ayrıca, PHB suda çözünmez ve hidrolitik bozulmaya karşı dirençlidir, ancak kloroform ve diğer klorlu hidrokarbonlar gibi organik çözücülerde çözünür. Bu nedenle çoğu PHB ekstraksiyon işlemi organik çözücü ekstraksiyon yöntemini kullanılmaktadır (Calleja, 2020). Ek olarak, PHB bozunma sırasında sabit bir pH'a sahiptir, bu da PHB'yi hücreler ve bağışıklık sistemleriyle oldukça uyumlu hale getirir (Chernozem vd., 2022). PHB'ler daha kırılabilir ve serttir. Molekül ağırlığı ile birlikte, yan zincirin uzunluğu, monomer türü ve ester bağı ile fonksiyonel grup arasındaki ayrımın tümü PHA'nin mekanik özelliklerini etkiler (Acharjee vd., 2023). Bu değişkenlerin etkileşimi,

polimerlerin cam geçiş (T_g) ve erime (T_m) sıcaklıklarının yanı sıra kristalliklerini (sertlik/esneklik) değiştirir (Acharjee vd., 2023). Kopolimer sentezi, PHA özelliklerini iyileştirmek, plastik esnekliğini artırmak, cam geçiş sıcaklığını (T_g) ve erime sıcaklığını (T_m) düşürmek için yaygın bir yaklaşımdır (Mezzolla vd., 2018). Çalışmalara göre PHB'nin cam geçiş sıcaklığı 0-15°C arasındadır.

PHBV polimerlerinin piezoelektrik özellik sergilediği bilinmektedir (Sabarinathan vd., 2018). PHB, kalp, kemik ve sinir dokularının iyileşmesinde kilit rol oynayan piezoelektrik özellikler sergiler. Piezoelektrik etki; bir malzemenin bir dış kuvvetin neden olduğu mekanik deformasyona yanıt olarak elektrik yükleri üretme kabiliyetini ifade eder. Piezoelektrik etkinin ürettiği elektrik yükleri, özellikle elektriksel olarak uyarılabilir dokulara ait hücrelerde hücre sel reaksiyona neden olur (Chernozem vd., 2019; Zviagin vd., 2019; Chernozem vd., 2022). Bununla birlikte, nispeten yüksek bir kristallik, sertlik ve kopmada düşük uzama, homopolimer PHB'nin biyo uygulamalarını sınırlayabilir (Chernozem vd., 2022). Özellikle kristal yapı, PHB'nin ve kopolimerlerinin mekanik özelliklerini, biyolojik bozunma kinetiğini ve biyoyumluluğunu etkilemiştir. Dahası, PHB iskelelerinin kristal yapısındaki değişikliklerin piezo tepkilerini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. Buna karşılık, malzemelerin piezoresponsu hücrelerin elektriksel olarak uyarılmasına izin verir (Chernozem vd., 2022). Kristallik, polimer moleküler düzenlemesindeki yapısal düzen ve düzenlilik derecesi olarak tanımlanır ve plastik malzemenin mekanik özelliklerinin tanımlanmasında baskın olduğu için bir polimerin en önemli özelliklerinden biridir (McAdam vd., 2020).

P(3HB) için %50'den fazla kristallik değerini belirtirken, %60'tan fazla bir değer bildirir; kristallik derecesi ayrıca polimer dokunsallığını, sertliğini, modülünü, yoğunluğunu, şeffaflığını ve soğuk çekme veya sünek akışların doğasını da etkiler (McAdam vd., 2020; Yun vd., 2013). Kristalliğin, farklı mikroorganizmalardan PHB üretildiğinde değişen temel özelliklerden biri olduğu gözlenmiştir.

Orta zincir uzunluklarına sahip PHA elastik ve esnektir; kopma oranlarında yüksek uzamaya, orta gerilme mukavemetine ve düşük kristalliğe sahiptir. Termal özellikleri, 160-180°C olan erime noktasına yakın sıcaklıklarda, PHB ciddi dengesizlik gösterir (Acharjee vd., 2023). PHB'lerin erime noktaları karbon kaynağına göre değişir. Yarı kristal doğası nedeniyle, PHB'ler kristal ve saf amorf malzemeler arasında erime davranışı sergiler. PHB, 170°C'yi aşan sıcaklıklarda, moleküler ağırlıkta ve krotonik asit oluşumunda farklı raporları vardır (Acharjee vd., 2023; Lee vd., 2023). Bir saat boyunca

190°C'de tutulduktan sonra, bir polihidroksibütirat örneği başlangıçtaki moleküler ağırlığının neredeyse yarısı kaybedilmiştir.

PHB polimeri, bazı petro-bazlı plastiklere benzer özellikleri göz önüne alındığında bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. PHB, plastik polipropilen ile karşılaştırıldığında ortak özellikler gözlenir. Çizelge 2.1'de hem fiziksel hem de mekanik özellikler izotaktik polipropilen plastiklere oldukça benzerdir (Markl vd., 2018). PHA'lar, kullanılan monomerlere göre çeşitli termal ve mekanik özelliklere sahiptir.

Çizelge 2.1 PHB ve Polipropilen (PP) özelliklerinin karşılaştırılması (Markl vd., 2018)

Özellikler	PHB	PP
Kristal erime noktası (°C)	175	176
Kristallik (%)	80	70
Moleküler ağırlığı(Dalton)	5.10 ⁵	2.10 ⁵
Cam geçiş sıcaklığı (°C)	4	-10
Yoğunluk (g/cm ³)	1.25	0.90
Eğilme modülü (GPa)	4.0	1.7
Çekme dayanımı (MPa)	40	38
Kopma uzaması (%)	6	400
Ultraviyole dayanımı	İyi	Kötü
Solvent direnci	Dirençsiz	Dirençli

Ayrıca, McAdam ve arkadaşları, çizelge 2.1'de gösterildiği gibi PHB'nin aynı mekanik özelliklerini bildirmiştir (McAdam vd., 2020). Biyo bazlı plastik kullanımında mekanik özellikler önemli bir faktördür. Yapılan araştırmalara göre polihidroksibütirat ve konveksiyonel plastiklerin benzer özelliklere sahip olduğu aynı zamanda biyopolimerlerin parçalanamayan petrol bazlı plastiklerin yerine alternatif olarak kullanılabileceği sonucuna varılabilmektedir.

2.2.1.6 PHB üreten mikroorganizmalar

Polihidroksialkanoatlar (PHA) üreticileri, süt atıkları, hidrokarbonla kirlenmiş alanlar, kağıt hamuru ve kağıt fabrikası atıkları, tarımsal atıklar, arıtma tesisi aktif çamurları, rizosfer ve endüstriyel atıklar gibi doğal olarak veya yanlışlıkla yüksek organik maddeye veya büyüme sınırlı koşullarına maruz kalan çeşitli ekolojik nişlerde bulunmuştur (Singh-Saharan vd., 2014). Birkaç heterotrofik ve ototrofik aerobik bakteri, fazla karbon kaynağı varlığında besinleri sınırlamak koşuluyla PHA'yı karbon ve enerji depolama malzemeleri olarak üretilip biriktirmektedir. PHB'ler, karbon kaynağı bol olduğunda ve azot, fosfor, oksijen veya kükürt gibi diğer besinlerin sınırlı olduğu durumlarda bakteri, arke, maya ve mantar gibi az sayıdaki ökaryotta üretilen karbon ve enerji rezervi polimerleridir (Thapa vd., 2018; Yang vd., 2010).

Doğal olarak PHB üreten bazı bakterilerin *Cuprividus necator*, *Alcaligen*, *Pseudomonas*, *Basil*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* ve *Micrococcus* olduğu bulunmuştur (Thapa vd., 2018; Martínez-Martínez vd., 2019). Literatüre göre, 400'den fazla mikroorganizmanın PHB ürettiği bildirilmiştir. Proteobakterilere ve mor kükürtsüz bakterilere ek olarak, siyanobakteriler de azot sınırlı koşullar altında karbondioksitten PHA üretebilmektedir (Lee vd., 2021). Besin açısından sınırlı koşullar altında, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* ve *Rhodospirillum rubrum* dahil olmak üzere birçok mor kükürtsüz bakteriler (PNSB), PHA ve H₂'yi birlikte üretebilmiştir (Padovani vd., 2016; Singh-Saharan vd., 2014). Bu iki metabolik yol rekabet eder, ancak H₂ ve PHB'nin birleşik üretimi çevre için büyük bir avantajdır, alternatif enerji kaynakları ve geri dönüştürülebilir plastikler elde edilir (Padovani vd., 2016). Siyanobakteriler ve bakteriler, PHA üretimi için konakçı polimer hücre fabrikaları olarak düşünülebilir. Bazı siyanobakteriyel suşlar, foto-ototrofik koşullarda yetiştirildiğinde bile bu polimeri biriktirebilmiştir (Balaji vd., 2013; Carpine vd., 2015).

Yağı ayrıştırırken PHA üretebilen *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Brochothrix*, *Caulobacter*, *Ralstonia*, *Burkholderia* ve *Yokenella* bakteri suşları, yağla kirlenmiş alanlardan izole edilmiştir (Singh-Saharan vd., 2014). Bu araştırmada, *Cuprividus nectaor* JMP 134'ün, besinle sınırlı bir ortamda karbon kaynağı olarak fenol veya sodyum benzoat gibi büyümeyi engelleyen kimyasallar verildiğinde hücre kuru ağırlığının (CDW) % 50'sine kadar PHB oluşturduğu gösterilmiştir (Singh Saharan vd., 2014). PCR sonuçlarına göre, *Burkholderia terricola*, *Lysobacter gummosus*, *Pseudomonas extremaustralis*, *Pseudomonas brassicacearum* ve *Pseudomonas orientalis* dahil olmak üzere bazı mikroplar, *PhaC* genine sahip oldukları için PHA üreticileri olarak tanımlanmıştır (Singh-Saharan vd., 2014). Mikroorganizmalar, plastik kirliliğini azaltmak için iki şekilde çalışır; birincisi, plastiği doğal ortamda parçalayarak, ikincisi, şu anda kullanılan petrol türevi plastiğe uygun bir alternatif olarak polimerleri sentezleyen biyosentetik sistemler geliştirektir (Varghese vd., 2022; Koch ve Forchhammer, 2021). PHB, fiziksel ve kimyasal nitelikleri nedeniyle petrol bazlı plastiklerin yarattığı kirliliğe karşı potansiyel bir çözüm olarak kabul edilmektedir.

2.2.2 Mor kükürtsüz bakteriler (PNSB)

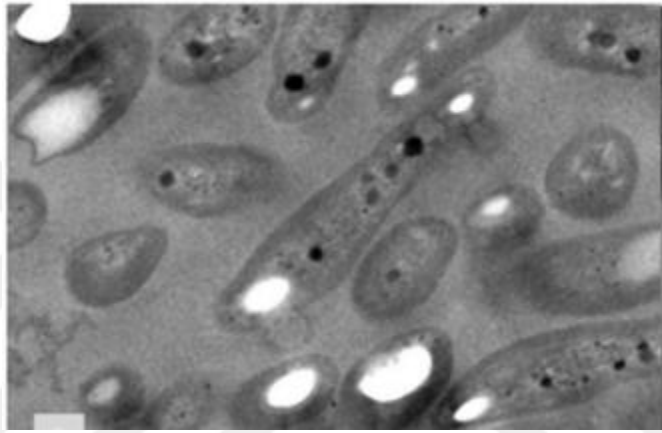
Mor kükürtsüz bakteriler (PNSB) metabolik çok yönlülükleriyle bilinir ve anoksijenik fotoheterotroflar olarak gelişir (Cabecas-Segura vd., 2022). *Rhodococcus* türleri ve *Rhodobacter* türleri gibi mor kükürtsüz bakteriler, besinle sınırlı koşullar altında şekerlerden iyi bilinen PHB üreticileridir. Mor kükürtsüz bakteriler (PNSB), anaerobik koşullarda fotosentez gerçekleştirerek organik asitler, alkol ve indirgenmiş karbon kaynaklarından H₂ üretir. Bu özellik, karanlık fermantasyon atık sularını (DFE) arıtmak için kullanılma potansiyeline sahiptir (Cheng vd., 2015; Rai vd., 2014). Araştırmalara göre, PNSB ek olarak, siyanobakteriler de azot sınırlı koşullar ve aerobik altında polihidroksibütirat üretebilmiştir (Montiel-Corona vd., 2015; Lee vd., 2021). PNS bakterileri, çeşitli çevresel koşullar altında çeşitli metabolik aktiviteler sergilemektedir ve *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* ve *Rhodobacter*, PNS bakterilerinin en iyi bilinen cinsleridir (Kars & Gündüz, 2010). Halotolerant fotosentetik bakteriler, biyoteknolojinin çeşitli alanlarında çok sayıda gerçek veya potansiyel uygulama sunar. Tuzlu koşullarda yaşayabilmelerinin yanı sıra, kendilerini hem ışığın varlığına hem de yokluğuna ayarlama yetenekleri de diğer mikroorganizmalara göre avantaja sahip olmalarını sağlar (Sangkharak ve Prasertsan, 2008).

2.2.2.1 *Rhodopseudomonas palustris*

Rhodopseudomonas palustris, *Nitrobacteraceae* familyasından bir Gram negatif bakteri cinsidir (Angra vd., 2023). *Rhodopseudomonas* hücreleri çubuk şeklindedir ve asimetric olarak bölünerek kutupsal olarak büyür ve hareket etmek için flagella kullanılır. Bu bakteriler, intrasitoplazmik olan fotosentetik zarlara sahiptir (Suwansaard, 2010). *R. palustris*, G+C içeriği % 65 olan tek bir 5.4 Mbp kromozoma sahiptir ve aerobik koşullarda yetiştirildiğinde beyaz olan fototrofik bir türdür. *R. palustris*, yağ asitleri, amino asitler, aromatik bileşikler ve lignin dahil olmak üzere farklı kimyasalları metabolize edebilen mor fototrofik bir bakteridir. Sonuç olarak, kontamine habitatların ve atık suyun biyoremediasyonunda önemli bir türdür (Davenport ve Bose, 2022).

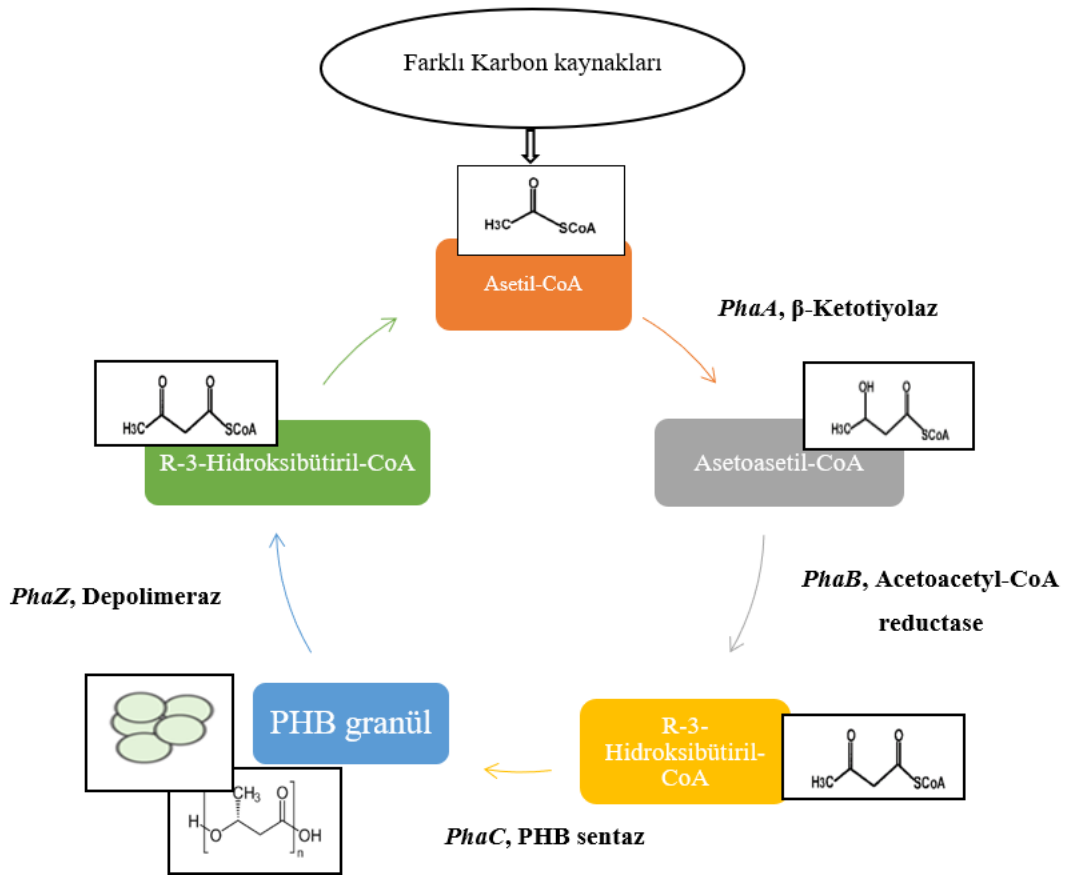
R. palustris, çok çeşitli substratlar kullanarak yararlı ürünler üreten farklı bir metabolik sisteme sahiptir (Brown, Wilkins, vd., 2022). Bu mor kükürtsüz bakteri, hayatta dört farklı metabolizma gerçekleştirebilir. *R. palustris*, farklı hammaddeleri kullanma yeteneği ve esnek metabolik yolu nedeniyle ucuz hammaddelerden PHB

üretebilmiştir (Brown, Wilkins, vd., 2022; Ranaivoarisoa vd., 2019). Bakteriler, glinoselülozik gibi atık maddeleri katma değerli ürünlere dönüştürür. Örneğin, bu bakteri lignin parçalayarak PHB'ye dönüşür ve *R. palustris*, iyi termokimyasal özelliklere sahip bir PHB polimeri üretebilir (Brown, Wilkins, vd., 2022). Besin eksikliğinin, mor bakteri hücrelerinde PHB biriktirmek için potansiyel bir stres büyüme ortamı olduğu bilinmektedir. Azot az olduğunda, *R. palustris* önemli miktarda PHB biriktirmiştir (Carlozzi vd., 2019). Şekil 2.8'de, *R. palustris*, PHB moleküllerini granül olarak biriktirebilir ve bir PHB depolimeraz enzimi (*PhaZ*) kullanarak karbon açlığı olan bir ortam olduğunda biriken polihidroksibutiratı bozabilmektedir.



Şekil 2.8 Anaerobik koşullarda p-kumarat üzerinde yetiştirilen *Rhodospseudomonas palustris* CGA009'un TEM görüntüsü (Brown, Immethun, vd., 2022)

R. palustris, diğer tüm PHB üreten bakteriler gibi, polihidroksibutirat sentezi ve katabolizmayı kodlayan bir gene sahiptir. *R. palustris* ayrıca depolanan karbonun dengelenmesine yardımcı olan önemli miktarda PHA oluşturur. Uyarlanabilirlikleri, bozunabilirlikleri ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanma yetenekleri nedeniyle çok çeşitli uygulamalar için uygundur (Angra vd., 2023). Literatürde asetik, propiyonik ve bütirik asitlerin bir karışımını kullanarak *R. palustris* tarafından hidrojen ve PHB'nin sentezini araştırmıştır (Rajesh Banu vd., 2021; Shakeri vd., 2011). Biyoplastik birikimine ek olarak, *R. palustris* ile ayrıca biyohidrojen üretilmiştir (Padovani vd., 2016). Samrot vd., *R. palustris* SP5212'nin çözücü geri kazanım yöntemi olarak kloroform kullanırken %7.7 PHB ürettiğini bulunmuştur (Samrot vd., 2021). Carlozzi ve arkadaşları, *R. palustris* 42OL'ün doğal açık-koyu döngülerde dışarıda yetiştirilmesiyle de P3HB bakımından zengin biyokütleler elde edilmiştir (Carlozzi vd., 2019). *R. palustris*'teki PHB üretimi genellikle β -ketotiyolaz enzimi (*PhaA*) tarafından iki tane asetil-koanın asetoasetil-CoA'ya yoğunlaşmasıyla başlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 *Rhodospseudomonas palustris* TIE-1'deki PHB döngüsü ve varsayılan genler (Ranaivoarisoa vd., 2019)

Şekil 2.9'da gösterildiği gibi, ilk adım Asetil-CoA farklı karbon kaynaklarından oluşturulur ve daha sonra iki asetil-CoA yoğunlaştırarak asetoasetil-CoA elde etmektir. Enzim asetoasetil-CoA redüktaz, *PhaB*, asetoasetil-CoA'yı (R) -3-hidroksibütiril-CoA'ya dönüştürür. *PhaC1* ve/veya *PhaC2* sonunda (R)-3-hidroksibütiril-CoA'yı PHB granüllerine polimerize eder. PHB, karbon depolama mobilizasyonu sırasında birkaç enzimatik işlemle (R)-3-hidroksibütiril-CoA'ya ve ardından asetil-CoA'ya geri indirgenir (Ranaivoarisoa vd., 2019). *Rhodospseudomonas* mor kükürtsüz bakteriler (PNSB) kullanılarak fotofermantasyon, H₂ ve PHB gibi yüksek değerli ürünler üretmek için uygun bir biyolojik yaklaşımdır ve entegre biyolojik üretimleri, biyopolimerlerin üretim maliyetlerini düşürme potansiyeline sahiptir (Franco-León vd., 2021).

2.2.2.2 *Cereibacter sphaeroides*

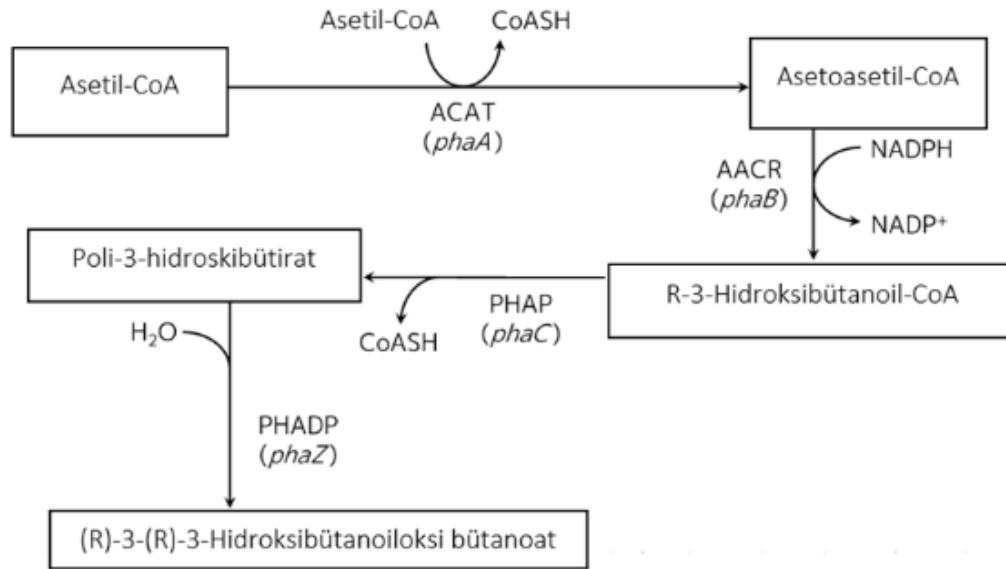
Fotoheterotrofik koşullarda, *C. sphaeroides*, hidrojen üreten mor kükürtsüz bir gram negatif bakteridir (Kars vd., 2008; Shimizu vd., 2022). *C. sphaeroides*, organik maddeleri karbon kaynağı olarak kullanma yeteneğine sahiptir, bu nedenle suş, fotoheterotrofik bakteriler olarak sınıflandırılır. *C. sphaeroides*, ikili fisyon yoluyla

simetrik olarak bölünen, 0,8-1,0 μ m uzunluğunda ve 0,3-0,5 μ m genişliğinde, α -proteobakteriler, oval şekilli bir bakteridir (Şekil 2.10). Agar ortamında bakteriler, çapları 2-4mm arasında değişen pürüzsüz, küresel, pembe ila koyu kırmızı koloniler üretir (Kemavongse vd., 2007).



Şekil 2.10 *Cereibacter sphaeroides* mikroskopik görüntüsü
<https://genome.jgi.doe.gov/portal/rhosp/rhosp.home.html> erişim tarihi:19-10-23

Kootstra ve diğerleri, esas olarak asetik ve propiyonik asit elde etmek için anaerobik arıtmayı, ardından atık suyun fototrofik *C. sphaeroides* ile PHA'ya dönüştürülmesini içeren hurma yağı değirmeni atık suyundan PHA üretmek için iki aşamalı bir süreç geliştirmiştir (Kootstra vd., 2017). Yapılan bir araştırma, *C. sphaeroides* büyüme sıcaklığı olarak bilinen 30°C'nin hücre gelişimi ve PHB oluşumu için en iyi sıcaklık koşulu olduğunu ve 30°C'den daha yüksek veya daha düşük sıcaklıklarda ciddi şekilde engellendiklerini bulunmuştur (Lee vd., 2020). Aerobik ve anaerobik koşullarda, mor kükrütsüz bakteriler (*Paracoccaceae* ailesi), özellikle *C. sphaeroides*, PHA'nın en çok çalışılan homopolimer veya kopolimer üreticileridir. *C. sphaeroides* ES16'nın UV mutant suşunun PHB biriktirdiğini keşfetmiştir. Suş, ko-substratın tanımlanması ve ko-substratın PHB'nin yanı sıra kopolimer PHBV sentezi üzerindeki etkisi açısından daha fazla araştırılmıştır (Kemavongse vd., 2007). Şekil 2.11'de gösterdiği gibi *C. sphaeroides*'te PHB, asetil koenzim-A'dan (asetil CoA) üç tip enzimin katalitik reaksiyonları ile üretilir. *C. sphaeroides*, PHB sentezinde asetatı asimile etmek için etilmalonil-CoA yolunu kullanır (Kars ve Gündüz, 2010).



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

İlk aşamada bir asetil grubu başka bir asetil grubuna aktarılır ve asetoasetil oluşur ve ikinci adım, asetoasetil-CoA'nın R-3-hidroksibutanoile indirgenmesini içerir (Kobayashi ve Kondo, 2019). Son olarak poli (3-hidroksialkanoat) polimeraz, (R)-3-hidroksibutanoil-CoA moleküllerinden çoklu (R)-3-hidroksibutanoil gruplarını, reaksiyonun son ürünleri olarak PHB ve CoASH'ı polimerize edilmektedir (Kobayashi ve Kondo, 2019). Kemavongse ve arkadaşları, *C. sphaeroides* suşları gibi PNS bakterileri, hücre kuru ağırlıklarının% 60-80'ini üretebilmiştir (Kars & Gündüz, 2010). Halotolerant bakterilerin, *C. sphaeroides* ES16'nın, açlık koşulu altında biriken yüksek miktarda polihidroksiyalkanoat (%40-60 DCW) ürettiği bildirilmiştir (Sangkharak & Prasertsan, 2008). Bir çalışmada, en yüksek PHA (3.5g/L PHA, %60 DCW), iki aşamalı aerobik karanlık koşul altında 5g/L fruktoz ortamında yetiştirilen *C. sphaeroides* suşu 14F kullanılarak elde edilmiştir (Sangkharak ve Prasertsan, 2008). Çizelge 2.2'de gösterildiği gibi, üretilen PHB miktarı, bakteri türüne ve suşuna bağlıdır.

Çizelge 2.2 Üç *C. sphaeroides* suşunun hücresel büyümesi ve PHB içeriği (Sangkharak ve Prasertsan, 2008)

Bakteriler	Maksimum büyüme ^a DCW (g/L)	PHB	
		Konsantrasyon (g/L)	Miktar ^b (%)
<i>C. sphaeroides</i> ES16	7.44±0.20	1.45±0.15	19.5
<i>C. sphaeroides</i> N20	8.20 ±0.09	4.44±0.23	53.9
<i>C. sphaeroides</i> U7	8.12±0.11	8.12±0.11	42.0

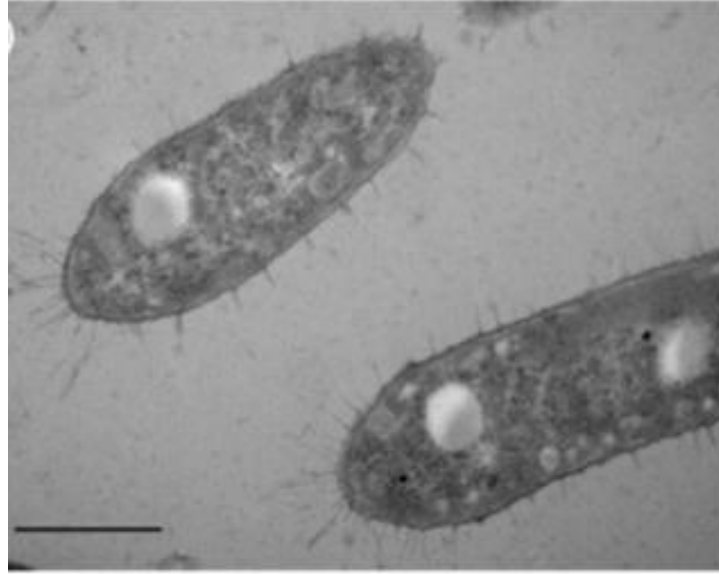
(a)DCW=Hücre kuru ağırlığı=toplam hücre konsantrasyonu (b)PHB (% CDW) = (PHB konsantrasyonu/CDW) ×100

C. sphaeroides, PHB sentezi için son derece faydalı bir bakteridir, PHB, azot sınırlayıcı koşullar altında *C. sphaeroides*'te hücresel kuru ağırlığın% 70'ine kadar birikmiştir. Fu ve arkadaşlar, *C. sphaeroides*'in çeşitli metabolizması, fotosentez, solunum ve farklı sinyal ağları gibi iç aktiviteleri incelemek için son derece değerlidir (Lee vd., 2020). *C. sphaeroides*, biyoremediasyonda çeşitli metal oksitleri ve oksianyonları detoksifiye edebilmektedir ve ayrıca karbon dioksit fiksasyonu, azot fiksasyonu, sitokrom çeşitliliği ve elektron taşıma sistemlerine sahiptir (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/rhosp/rhosp.home.html> erişim tarihi:21-11-23).

2.2.2.3 *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus, çeşitli koşullarda gelişmesine izin veren metabolik olarak esnek bir sisteme sahip, kükürtsüz mor bir proteobakteridir (Kumka & Bauer, 2015). *R. capsulatus*, değişen ortama yanıt olarak metabolik yollar arasında geçiş yapabilen, en uyarlanabilir metabolizmaya sahip mor kükürtsüz bir bakteridir ve tek bir 3.5 Mb kromozomdan oluşur. Işığın varlığında bu tür organik maddeler tüketerek fototrofik olarak büyür ve ışığın yokluğunda kemolitotrofi ve fermantasyona geçer (Asif vd., 2021). Mor kükürtsüz bir proteobakteri olan *R. capsulatus*, 25-30°C arasında değişen sıcaklıklarda büyüebilmektedir (<https://bacdiv.dsmz.de/strain/13806> erişim tarihi 19-10-23).

Çevrelerine bağlı olarak *R. capsulatus* çubuk veya hareketli olarak büyüeyebilir, morfoloji pH'daki değişikliklerden etkilenir, örneğin pH 7'nin altına düştüğünde bakteri küreselleşir ve zincirler oluşturur. Fotosentetik mor kükürtsüz *R. capsulatus* genellikle bir ortamda ışığa ve oksijene doğru veya ondan uzaklaşmalarına izin veren tek bir flagela içerir. *R. capsulatus*, asetat kullanarak hidrojen üretilir, PHB üretimi için potansiyel bir aday gibi görünmektedir ve PHB üretiminde optimal bir karbon kaynağı konsantrasyonu bulup kullanılmalıdır (Özsoy-Demiriz vd., 2019). *R. capsulatus*, değerli biyobozunur polimer üretmek için kullanılacak açık-koyu döngüler sırasında PHB biriktirme kapasitesine sahiptir (Şekil 2.12) ve PHB birikimi açısından, *C. sphaeroides* ve *R. capsulatus*, *R. palustris*'ten daha fazla PHB biriktirilmiştir (Montiel Corona vd., 2017).



Şekil 2.12 Aseton ortamında *Rhodobacter capsulatus* tarafından üretilen beyaz PHB veziküllerinin görüntüsü (TEM 500nm) (Mayet vd., 2013)

PhaA (-ketotiyolaz), *PhaB* (asetoasetil-CoA redüktaz) ve *PhaC* (PHB sentaz), PHB yolunda yer alan *R. capsulatus*'ta keşfedilen üç gendir (Monroy ve Buitrón, 2020). En önemli gen, PHB birikiminin anahtarı olan önemli bir enzim olan PHB sentazını kodlayan *PhaC*'dir. *R. capsulatus*, sitramalat döngüsünü kullanır ve %70'e kadar kuru ağırlık biriktirebilmiştir (Kars ve Gündüz, 2010). *R. capsulatus* DSM 1710 (ATCC 11166), hem aerobik hem de anaerobik olan ve atık suyu arıtmak için kullanılan bir bakteridir. Toprak, tatlı su ve okyanus dahil olmak üzere çeşitli habitatlarda bulunan ve bu ortamlardan kolayca izole edilebilen gram negatif bakterilerdir (Costa vd., 2017). Organizmanın azot kaynağı amonyum klorürle sınırlandırıldığında, daha yüksek polimer verimleri rapor edilmiştir, 65mg/L amonyum klorür konsantrasyonunda, *R. capsulatus* 240 mg/L PHB üretilmiştir. Bu çalışmada, polimer birikiminde % 4'lük bir artış olmasına rağmen, kuru hücre ağırlığı ile polimer birikimi arasında bir bağlantı gözlenmemiştir (Merugu vd., 2012).

2.3 Biyoproseslerde Bakteri Konsorsiyumu Kullanımı

Bir mikrobiyal konsorsiyum genellikle bir toplulukta birlikte çalışma yeteneğine sahip farklı mikroplar grubu olarak tanımlanmaktadır. Mikrobiyal konsorsiyumların (MMC'ler) uygulanması, ekim sırasındaki maliyetlerdeki önemli düşüş nedeniyle büyük ilgi görmektedir (Zhou vd., 2022; Shalin vd., 2014). Ek olarak, MMC'nin bakım gereksinimleri düşük olduğu için üretim maliyetlerini düşürmek için tek saf kültürler yerine karışık mikrobiyal kültürler (MMC) kullanılır (Rajesh Banu vd., 2021; Wang vd.,

2017;Colombo vd., 2017). Atık su, ham hurma çekirdeği yağı, kullanılmış yemeklik yağ, peynir altı suyu ve kahve telvesi ile şarap atığı likörü gibi düşük maliyetli atık akışlarını substrat olarak kullanma yetenekleri nedeniyle, karışık mikrobiyal konsorsiyumların PHA birikimi için umut verici olduğu kanıtlanmıştır (Zhou, 2023).

Karma mikrobiyal konsorsiyum kullanımının avantajları vardır. Bir bakteri konsorsiyumunun kullanımı özellikle atık suyun arıtılmasında yararlıdır, atık su birçok farklı organik madde ve asit içerir ve bir ortamda çeşitli bakteriler bulunduğu organik suyu fermente edebilmektedir ve toksik olmayan bileşikler oluşturabilirler. PHA sentezi için karma mikrobiyal konsorsiyum (MMC'ler) kullanılır, çünkü sterilite gereksinimleri daha azdır ve tek saf kültürlerle göre biyo-rafineri ve atık/atık su arıtma işlemlerine entegre edilmesi daha kolaydır (Huang vd., 2017; Policastro vd., 2021;Basset vd., 2016). Bakteri konsorsiyumu karmaşık bir biyolojik matris içerir ve dinamik bileşim, özellikle seçici bir ortamda fonksiyonel özelliklerle ilgilidir. Mikroorganizmalar, konsorsiyum içindeki nispi bolluk üzerinde etkisi olan kendi optimal büyüme koşullarına sahip olabilmektedir (Wang vd., 2017).

Bakteriler tarafından düşük PHB üretimini ele alma stratejilerinden biri mikrobiyal konsorsiyumların kullanılmasıdır (Duncker vd., 2021). Mikrobiyal konsorsiyumlar, çoklu ve simbiyotik mikrobiyal popülasyonlara sahip topluluklardır. Mikrobiyal konsorsiyum, substrat kullanımının kapsamını genişleterek tek bir bakterinin düşük dönüşüm verimliliği sorunlarını çözebilmektedir (Zhu vd., 2022). Önceki çalışmalarda, *P. putida* ve *S. cerevisiae*'nin bir konsorsiyum olarak olumlu etkileşimlere sahip olduğunu göstermiştir (Wei vd., 2023). Ayrıca, farklı bakteri popülasyonlarının metabolik bir yolda farklı adımlar attığı metabolik iş bölümü (DOL), bakterilerin aktivitesini artırıp biyoküttelede bir artışa neden olabilir (Wei vd., 2022). Konsorsiyum içinde bir bakteri türünün bütirat kullanarak oluşturduğu bir son ürün veya yan ürün konsorsiyumdaki bir başka bakteri için substrat olabilmektedir. Bu mekanizma metabolik iş bölümü (DOL) olarak da adlandırılmaktadır. Böylece substrat dönüşme etkinliği ve ürün verimliliği artmaktadır. Bhatia ve ark, karbon kaynağı kullanımını artırmak için bir mikrobiyal konsorsiyumu (*Ralstonia eutropha* ve *Bacillus subtilis*) kullanmıştır (Bhatia vd., 2018).

Mikrobiyal topluluğun yapısı ile fonksiyonel performansı arasındaki ilişkiyi anlamaya ihtiyaç vardır. Bu, bir mikrobiyal konsorsiyum sürecinin tasarlanması ve sürdürülmesi için faydalıdır (Zhou vd., 2022). Monokültür, tek bir PHA biriktiren mikroorganizmanın kültürüdür ve monokültür kullanımı, karışık kültür (konsorsiyum)

kullanımına kıyasla pahalıdır. Bununla birlikte, karışık bir kültür kullanıldığında farklı PHA'lar üretilir. Konsorsiyumların ve karışık organik asitlerin kullanımının polihidroksialkanoat üretiminde başka zorlukları da vardır, örneğin yem bileşiminin PHA üretimi üzerindeki etkisi nedir? Hangi tür PHB üretilebilir ve bu nasıl kontrol edilebilir? Konsorsiyum içindeki hangi mikroplar PHA üretimine dahil olur? (Zhou, 2023). Bu nedenle, çevresel koşullardaki ve substrat bileşimlerindeki değişikliklerle ilgili dinamiklerini anlamak için karışık mikrobiyal konsorsiyumlar hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir. Bu, PHA üretiminde yer alan baskın türlerin tanımlanmasına izin verir ve ayrıca mikroorganizmaların eko-fizyolojik özelliklerinin yanı sıra PHA üretiminin anlaşılmasına yardımcı olur.

Bir çalışmada, *C. sphaeroides* AV1B'nin saf kültürleri (155mg PHB), karma konsorsiyum kültürlerinden (55mg PHB) daha yüksek PHB verimleri sergilenmiştir (Luongo vd., 2017). Karışık PHB üreten türler, saf kültürlerle kıyasla çok düşük PHB miktarına sahiptir ve saf kültürlerin PHB üretimindeki önemine dikkat çekmiştir. İncelenen karma konsorsiyumlarda bir arada bulunan çeşitli bakteri türlerinin substrat kullanımını iyileştirdiği bulunmuştur (Policastro vd., 2020). Konsorsiyum tarafından daha iyi kullanılması, organik bileşiklerin katma değerli ürünlere dönüştürülmesiyle sonuçlanır.

Yüksek miktarda biyopolimer elde etmek için, PHA depolimeraz geni, *P. putida* KT2442 ve *C. sphaeroides* HJ'de olduğu gibi PHA bozulmasını inhibe etmek için elenebilmiştir (Zhou, 2023). Gen, PHB'yi monomerlere bölen bir polimeraz enzimini kodlar. Gen mutasyona uğradığında veya nakavt edildiğinde, bakteri hücrelerinin sitoplazmasında çok fazla PHB biriktirebilmiştir. Bir konsorsiyumda, üretilecek biyo-plastik miktarını artırmak için farklı organizmalar arasında simbiyotik ilişkiye ihtiyaç vardır. Bir konsorsiyumda çok fazla bakteri olduğunda, besinler için rekabet olacak ve bu da düşük miktarda polimer üretilmesine neden olacaktır. Bir konsorsiyumdaki mikrobiyal çeşitliliğin azaltılmasının, özellikle PHA üreten bakteriler olduğunda, beslenen toplu PHA üretiminde faydalı olduğu öne sürülmüştür (Coats vd., 2016). Bu nedenle, sağlanan ortamdaki karbon miktarına uygun belirli miktarda farklı bakteri türüne sahip olmaya ihtiyaç vardır.

2.4. Bütirik Asit ve PHB Üretimi

Bütirik asit (n-bütanol asit, $[CH_3(CH_2)_2COOH]$), $8^\circ C$ 'de katılaşıp ve $164^\circ C$ 'de kaynayan yağlı renksiz bir sıvı oluşturan bir karboksilik asittir (Goldberg & Stefan Rokem, 2019; Agnihotri vd., 2022). Bütirik asit, 4 karbonlu bir organik asittir, suda ve etanolde çözünebilmektedir. Bütirik asit, yağ asitlerinin veya pirüvik asidin parçalanmasından elde edilen asetil-CoA'dan anaerobik koşullar altında sentezlenir (Goldberg & Rokem, 2009). Rajesh-Banu ve ark.'ya göre, atık suyun asidojenik fermantasyonundan üretilen organik asit, PHA üretimi için avantajlı ve uygun maliyetli bir substrat sağlanmaktadır (Rajesh Banu vd., 2021). Bütirik asit, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Megasphaera* ve *Sarcina* dahil olmak üzere çeşitli bakteriler tarafından üretilmiştir (Agnihotri vd., 2022). Bütirik asit, şeker fermantasyonu sırasında birkaç anaerobik bakteri tarafından üretilen ana son üründür. *Clostridium* türleri, hücre gelişimi için basit bir ortama ve nispeten yüksek bir üretim oranına ihtiyaç duydukları için bütirik asit sentezi için en etkili şekilde kullanılmıştır (Rajesh Banu vd., 2021). Karbon substrat, polimerin yapısını ve özelliklerini belirler. Örneğin PHB, çift sayılı karbon substratlarla yapılan sert, kırılğan bir plastiktir (Coats vd., 2016). Karbon kaynağı, PHA sentezini etkileyen en kritik faktörlerden biridir, çünkü PHA üretim yolu boyunca birden fazla ara ürün oluşur. Bütirat, PHB oluşturmak için asetil-CoA'ya ve ardından -hidroksibütirata (HB) oksitlendikten sonra bir karbon kaynağı olarak kullanılır (Kemavongse vd., 2007).

Zhou, (2023) çoğu organik atık akışı, hidroliz ve asidojenik fermantasyondan sonra asetik asit, propiyonik asit, bütirik asit, valerik asit ve heksanoik asit gibi (uçucu) yağ asitlerinin kombinasyonlarını içerir. Bütirik asit 1869'da Lieben ve Rossi tarafından keşfedilmiştir. Bütirat, iki nedenden dolayı PHA üretimi için ilginç bir substrattır. İlk olarak, yüksek bir teorik ürün verimine sahiptir. Marang vd, (2013) göre bütirat, PHA sentezi için ilgi çekici bir substrattır. PHA, bütirat üzerinde (karbon bazında 0,94 mol/mol) asetattan %40 daha fazla stokiyometrik verime sahiptir.

Marang vd, (2013); Agnihotri vd., (2022), ikincisi, bütirat, organik atık akışlarının asidojenik fermantasyonu sırasında büyük miktarlarda üretilir. Bütiratın baskın bir substrat olduğu zaman, amonyumun varlığında, yüksek bir PHB seviyesine ulaşılacağı için bu atık su çevreye daha az zararlı olacaktır. Bütirat, fermente şeker kamışı pekmezi, zeytinyağı değirmeni atık suları, kağıt fabrikası atık suları, atık aktif çamur veya gıda atıkları gibi organik atık akışlarının asidojenik fermantasyonu sırasında da önemli

miktarlarda üretilir (Marang vd., 2013). Bütirik asidin bir ortam olarak kullanılması avantajlıdır çünkü bütirik asit, piruvat sentezi olmadan kolayca asetil birimlerine (PHB öncüsü) dönüştürülür ve bakteri metabolizmasını PHB üreten yola yönlendirir (Montiel Corona vd., 2017). Yapılan araştırmalarda en yüksek PHB verimine (% 33) bütirik asit, ardından asetik asit (%32), asit karışımı (bütirik asit ve asetik asit) ve propiyonik asit (% 11) varmıştır. Araştırmaya göre propiyonik asit düşük PHB üretti çünkü propiyonik asidin PHB'ye dönüşmesi yoğun metabolizma gerektiriyor (Singh Saharan vd., 2014). *Cupriavidus necator* 4H16 kullanılarak PHA üretimi üzerine yapılan bir araştırma, sağlam hücre büyümesi ve yüksek polihidroksiyalkanoat nedeniyle bütiratın en çok tercih edilen organik asit olduğunu bulmuştur (Yang vd., 2010). Asetat, bütirat ve p-kumarat üzerindeki büyüme sırasında öngörülen asetoasetil-CoA oluşum oranları, bütiratın en yüksek 5mmol/gDW/saat dönüşüm oranına sahip olduğunu ortaya çıkmıştır (Alsiyabi vd., 2021).

2.5 PHB Üretimi İçin Büyüme Koşulları

Genelde, PHB'nin birikmesi için önemli büyüme faktörleri arasında karbon kaynakları, pH, sıcaklık ve azot kaynağı bulunur. Bu parametreler hücre metabolizmasını ve hücre bölünmesini etkilemektedir. Karbon ve azot, tüm canlı mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu kritik besinlerdir ve optimum hücre büyümesi için besin bileşimi dengelenmelidir (Zhou vd., 2022; Montiel-Corona ve Buitrón, 2022). Bakteri üremesi için gerekli optimum koşullar varlığında, PHB içeriğinde bir artış gözlemlenebilmektedir. Ayrıca aerobik koşullarda iyi büyüebilir ve oksidatif fosforilasyon yoluyla PHA sentezi için yeterli ATP üretebilir (Montiel-Corona & Buitrón, 2021). PHB, ışık aerobik/anaerobik koşullara kıyasla karanlık aerobik koşullarda hücrelerde yaklaşık % 50'ye kadar daha fazla birikir (Lee vd., 2020). Polihidroksibütirat (PHB) üretimini optimize etmek için bakteri üremesi koşulları incelenirken, mikrobiyal konsorsiyumlar kullanılarak çok az çalışma yapılmıştır (Zhou vd., 2022). Büyüme koşulları, yüksek PHB miktarının elde edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

2.5.1 Azot kaynağı

Azot kaynağı da PHB birikimi için önemli bir parametredir (Singh Saharan vd., 2014). Trakunjae ve arkadaşları (2021), maya özü, malt özü, pepton, üre, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 ve KNO_3 gibi çeşitli azot kaynaklarının hücre büyümesi ve PHB üretimi

üzerindeki etkileri test edilmiştir. Montiel-Corona vd., (2017) bakterilerdeki azot sınırlamasının PHB üretimi için faydalı olduğunu göstermiştir. Daha büyük bir PHA miktarı üretmek için sınırlayıcı bir faktör olarak amonyum açlığı kullanılır (Zhou vd., 2022). Glutamat-Asetat ortamında büyüyen *C. sphaeroides* N20'de farklı azot kaynaklarının ve konsantrasyonlarının hücresel büyüme ve PHB üretimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. İncelenen tüm azot kaynaklarının (0.08, 0.1 ve 0.2g/L) daha yüksek konsantrasyonlarında hücre büyümesi (5.74-7.84 g/L) ve PHB konsantrasyonu (0.95-2.07 g/L) önemli ölçüde artmıştır (Sangkharak ve Prasertsan, 2008). Bununla birlikte, azot konsantrasyonundaki daha fazla artış, bakteriler tarafından biriken PHB'de bir azalmaya neden olmuştur. Biriken PHB'deki bir azalma, yalnızca azot konsantrasyonundaki bir artışa bağlı olarak karbon-azot oranındaki dengesizliğin bir sonucu olabilir. Bakterilerin PHB üretebilmesi için karbon-azot oranı dengesine ihtiyaç vardır. Fotosentetik bakterilerde PHB birikiminin genellikle büyüme ortamındaki azot mevcudiyeti, özellikle optimal C/N oranı ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (Sangkharak ve Prasertsan, 2008). NH_4NO_3 , NH_4Cl ve üre ile karşılaştırıldığında $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, *Alcaligenes eutrophus* (*Cupriavidus necator*) gibi diğer mikroplarda PHA sentezi için en iyi azot kaynağıdır. Organizmanın azot kaynağı amonyum klorürle sınırlandırıldığında, daha yüksek polimer verimleri rapor edilmiştir (Sangkharak & Prasertsan, 2008).

2.5.2 pH ve sıcaklık

Ortamın pH'ı da PHA verimliliğinde ve monomer bileşiminde çok önemli bir belirleyicidir. Bakteriler tarafından PHB üretimi için en iyi pH ve sıcaklık 7.0–7.5 ile 30–37°C arasındadır (Getachew ve Woldesenbet, 2016; Aryaraj ve Pramitha, 2021). Ek olarak, Zhou ve ark., pH'ın azot lim'e kıyasla PHB birikimi üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olduğundan bahsetmiştir (Zhou vd., 2022). En iyi performanslar, bu çalışmada kültür zenginleştirmesinin mikrobiyal aktivite için en uygun sıcaklık olan 30°C'de gerçekleştirilmiş olması olabilmektedir. Bir araştırmada, *A. indicus* tarafından maksimum PHB üretimi, karbon ve azot kaynakları olarak glikoz, pepton ile %2 NaCl varlığında ve 35°C'lik, 96 saatlik inkübasyondan sonra elde edilmiştir (Adnan vd., 2022).

Choonut ve ark., (2016) pH'ın *C. necator* tarafından PHB üretimi üzerindeki etkisini araştırmıştır ve 30°C'lik bir sıcaklıkta, *Cupriavidus necator*, optimum koşullar altında %50 kalıntılar ve 5g/L maya özü altında yetiştirilmiştir. Ph'ın PHB üretimi üzerindeki etkisi, farklı pH seviyelerinde (4, 7 ve 9) yetiştirilerek araştırılmıştır.

Sonuçlarına göre, maksimum PHB üretimi pH 7'de, ardından pH 9 ve pH 4'te kaydedilmiştir (Rajesh Banu vd., 2021). *C. sphaeroides* RV suşu anaerobik, fotoheterotrofik ve hafif pH koşulları (8.0-8.5) altında yetiştirildiğinde, RV suşunun nötr Ph'dan (7.0 veya 7.5) daha fazla PHB ürettiği keşfedildi. (Kobayashi ve Kondo, 2019).

2.5.3 Karbon kaynağı

Karbon kaynağı, biyopolimerlerin birikiminde ve sentezinde önemli bir faktördür ve farklı karbon kaynakları farklı PHA türlerine neden olur. Genellikle basit karbon monomerleri, metabolik yola kolayca asimile edildikleri için mikroorganizmalar tarafından tercih edilir. *Bacillus aryabhatai* 34°C`de, sırasıyla fruktoz, maltoz, nişasta ve gliserol içeren farklı karbon kaynaklarının varlığında 2.18g/L, 1.47g/L, 1.742g/L ve 1.786g/L olmak üzere maksimum PHB sergilenmiştir (Balakrishna Pillai vd., 2017). Mohanrasu ve arkadaşları ayrıca, pH 7'de glikoz içeren ortamlarda *Bacillus megaterium* kullanılarak 2.74 g/L'lik optimal PHB elde etmiştir (Hamdy vd., 2022). Uçucu yağ asitleri (VFA) gibi atık suların karanlık fermantasyonu sırasında açığa çıkan çözünür asit bakımından zengin atık ürünler bakteriler tarafından kullanılır ve hücre içi PHB birikir.

Uçucu yağ asitleri, diğerlerinin yanı sıra asetik asit, bütirat, propiyonik, laktat, valerik asit gibi farklı organik bileşiklerden oluşur ve zengindir. En bol bulunan organik asit, atık suyun asidojenik bakteriyel fermantasyonunun bir yan ürünü olan bütirattır. Rajesh-Banu ve diğ., *C. necator* H16 kullanılarak asetik asidin (3g/L⁻¹ asetik polihidroksibütirata (0.5g/L⁻¹) dönüştürüldüğünü bildirmiştir (Rajesh Banu vd., 2021). Polihidroksibütirat üretiminde farklı daha ucuz karbon kaynakları önerilmiştir. Bu karbon kaynakları arasında atık su, pekmez, gıda atığı, çamur, sentez gazı, peynir altı suyu, gliserol, restoran atığı, endüstriyel kalıntı ve atık yağlar bulunur. *Halomonas halophila*, kahve kalıntılarında% 61,95 CDW biriktirmiştir (Rajesh Banu vd., 2021). Narayanan vd., (2020) göre, *B. cereus* NDRMN001, pirinç kepeğini karbon kaynağı olarak tercih etti ve diğer karbon kaynakların kıyasla 52.6g/L CDW başına (% 75,25) 39.58 g/L PHB üretilmiştir.

2.6 Polihidroksibütirat (PHB) Ekstraksiyon Yöntemleri

PHB ekstraksiyonunun iki ana yöntemi çözücü ekstraksiyonu ve sindirim yöntemidir. Çözücü ekstraksiyonu, PHA'yı hücre kütesinden çıkarmak için en sık kullanılan yöntemdir, çünkü kolay, etkili, hızlı ve yüksek saf moleküler ağırlıklı PHB

üretilmektedir (Heinrich vd., 2012; Raza vd., 2018). PHA'nın ekstraksiyonu için kloroform, etanol, metanol, heksan, sodyum hipoklorit, etilen karbonat, 1.2-propilen karbonat ve asetik anhidrit gibi çeşitli çözücüler kullanılır (Samrot vd., 2021; McChalicher vd., 2010). Sindirim yöntemi, hücre biyokütlesinden PHA'nın çıkarılması için alternatif bir yaklaşımdır, çünkü çözücü yöntemi çevre için tehlikeli ve toksiktir. Bir hücre parçalandığında, zara bağlı PHA granülleri salınır ve hidrofilik PHA olmayan hücre kütlesi, suda çözünür bir madde oluşturmak üzere kimyasal veya enzimatik etki ile değiştirilir (Koller, 2020). Sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100, palmitoil karnitin ve betain prosedürde kullanılmaktadır (Samrot vd., 2021; Kunasundari & Sudesh, 2011).

2.6.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS) ile ekstraksiyon

Kloroform yerine sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi bir yüzey aktif madde kullanılabilir. SDS'nin P(3HB) ekstraksiyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. SDS, bakteri hücre zarını verimli bir şekilde parçaladığından, kirleticileri çözerken P(3HB) daha fazla zarar vermeden birikir (Marudkla vd., 2018). SDS, aerobik ve anaerobik koşullar altında hızla biyolojik olarak parçalanabilir ve moleküldeki tüm karbonlar, yenilenemeyen bir kaynaktan ziyade yenilenebilir bir kaynaktan elde edilir (Bondi vd., 2015). Hidrofilik materyali hücreden çözmek için yaygın olarak %0.025-0.2 SDS konsantrasyonu kullanılır. Daha yüksek bir SDS konsantrasyonu, PHA'nın çözünmesine neden olarak verimi düşürür (Kurian & Das, 2021). Bununla birlikte, toksik halojenli bileşikler üretme tehlikesinin yüksek olması nedeniyle, bu yaklaşım PHA'yı hücrelerden çıkarmak için yaygın olarak kullanılmamaktadır (Koller, 2020). Arikawa ve arkadaşları., (2017) tarafından yapılan bir araştırmada, SDS-sonikasyon tedavi prosedürü ile geri kazanılan PHA'nın tümü ölçülecek kadar saftır (%96 saflık). SDS-sonikasyon işlem prosedürünün kullanılması polimerin moleküler ağırlığını bozamaz, sonuç moleküler ağırlığın neredeyse aynı olduğunu gösterilmiştir.

2.6.2 Kloroform ile PHB ekstraksiyonu

Kloroform gibi düşük kaynama noktalı klorlu çözücülerin kullanılması, bozulmadan iyi PHA kalitesi ve ekstraksiyon verimi ile sonuçlanmıştır (Kshirsagar vd., 2013). Bununla birlikte, bu klasik ekstraksiyon işlemi, işletme maliyetleri ve çevresel etki üzerinde etkisi olan organik çözücülerini kapsamlı bir şekilde kullanır (Martínez-Herrera vd., 2020). Sodyum hipoklorit/kloroform kullanılarak P(3HB) ekstraksiyon

mekanizması, hücre zarının sindirilmiş P(3HB) olmayan bileşenlerle eşzamanlı olarak sodyum hipoklorit ile denatürasyonunu, ardından kloroformda çözünmesini içerir hem mükemmel P(3HB) geri kazanımı hem de saflığı sağlar (Marudkla vd., 2018). Sonuç olarak, maksimum %91 P(3HB) geri kazanılmıştır. Anack, dünya sağlık örgütü kloroformun hayvanlarda kanserojen olduğunu belirlemiştir, ayrıca havaya maruz kaldığında hızla buharlaşır, suda kolayca çözünür ve parçalanma ürünlerinin her ikisinde de çevreye zararlı fosgen ve hidrojen klorür bulunur (Marudkla vd., 2018).

2.6.3 Sodyum hipoklorit yöntemiyle ekstraksiyon

Hücresel biyokütle, sodyum hipoklorit kullanılarak fermantasyondan sonra santrifüjleme ile ekstrakte edilmektedir (Marudkla vd., 2018). Sodyum hipoklorit sindirim prosedürü, bakteri hücrelerinin parçalanmasına izin vererek PHB granüllerinin hücrelerin dışına salınmasına yol açarak kolay PHB ekstraksiyonuna izin verir (Darshan & Nishith, 2014). Sodyum hipoklorit, bakterilerin hücre duvarlarını parçalar ve PHB olmayan hücresel materyal (NPCM) çıkarılmasını sağlayarak PHB'a zarar vermeden hücre parçalanmasına neden olur. Daha önce bildirildiği gibi, sodyum hipoklorit (NaOCl) veya sıcak kloroform veya her ikisi kullanılarak bakteri hücrelerinden yüksek saflıkta P(3HB) geri kazanılmıştır (Marudkla vd., 2018). Araştırmalara göre, sodyum hipoklorit biyolojik olarak birikmez, çabuk bozulur ve çevrede birikmezdir.

2.7 Polihidroksibütirat Karakterizasyon Teknikleri

PHA üretimini başarılı bir şekilde doğrulamak için hızlı, basit ve güvenilir karakterizasyon yöntemleri esas ve önemlidir. PHA'nın taranması ve polihidroksibütiratın karakterizasyonu için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu teknikler Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Nile Red ve Sudan Black B boyaları ile boyama yöntemlerini içerir.

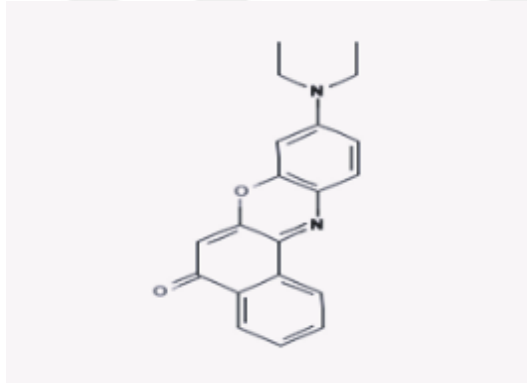
2.7.1 Sudan Black B ile boyama

Sudan Black B (SBB), nötr yağlar ve lipitler için son derece yüksek afiniteye sahip, yağda çözünen bir boyadır. PHA üreten bakterileri tanımlamaya yönelik geleneksel yaklaşımlar arasında Sudan Black B bulunur. Bununla birlikte, Sudan Black kullanıldığında, sadece PHA'yı değil, diğer lipit bileşiklerini de boyamaz. Sudan Black B boyası, bakteri hücrelerinde PHB granüllerinin varlığını belirlemek için ana tarama

yöntemi olarak kullanılmaktadır (Adnan vd., 2022). Sudan Black B boyası ile boyandığında PHB biriktirmeyen koloniler beyaz görünür, ancak PHB biriktiren koloniler mavimsi-siyah görünmüştür (Adnan vd., 2022), ve bu renk, PHB'nin bakteri tarafından üretildiğini göstermiştir. Sudan Black B lekesinin amacı lipitleri görselleştirmektir. Sudan Black B; fosfolipitler, steroller ve nötr trigliseritleri içeren geniş bir lipid spektrumunu boyar. Ayrıca kromozomları, golgi aparatını ve lökosit granüllerini de boyayabilir. Sudan Black boyaları, çözücüde çözünür bir lipid boya sınıfına aittir (<https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-sudan-black-b-stain-3954.html>) erişim tarihi 01-11-23. Sudan Black; güvenilir sonuçlar verdiği, çok daha hızlı, daha kolay, daha az toksik ve daha ucuz bir boyama yöntemi olduğu için mükemmel sonuçlara aday olarak belirlenmiştir.

2.7.2 Nile red ile boyama

Nil Red, 9 konumda bir dietilamino grubuna sahip 5H-benzo[a]fenoksazin-5-on'dan oluşan organik bir heterotetrasiklik bileşiktir. Histolojik bir boyanın yanı sıra florokrom işlevi görür ve siklik bir keton, aromatik bir amin ve üçüncül bir amino bileşiğidir (<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:52169>) [Şekil 2.13].



Şekil 2.13 Nile red moleküler yapısı <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65182#section=2D-Structure> erişim tarihi:30-10-23

Nil Red boyamayı kullanan bir mikroskopi yöntemi, hücre içi PHB'yi tanımlamanın hızlı, kolay bir yolu ve membranlar veya lipid benzeri kapanımlar gibi hidrofobik hücre özelliklerini görselleştirmek için kullanılan lipofilik bir floresan boyadır (Juengert vd., 2018). Nil Red çok çeşitli dalga boyları yayar ve 488nm veya 565nm lazerler kullanılarak uyarılabilir. Lipid damlacıklarındaki Nil Red floresan sinyali tipik olarak turuncu-kırmızı kanallarda gözlenir. Nil red, PHA tespiti için Sudan Black B'den

daha spesifik, üstün ve hücrelerin içindeki PHB'yi tespit edebilmektedir (Mesquita vd., 2015; Arikawa vd., 2017).

2.7.3 Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

NMR, bakteriler tarafından sentezlenen PHB'nin kimyasal yapısını gözlemlemek için gerçekleştirilir (Trakunjae vd., 2021; Hamdy vd., 2022). PHB sentezinin tamamlanması daha sonra NMR analizindeki tepe noktaları kontrol edilerek doğrulanabilmektedir (Al-Shok vd., 2023). Martinez ve arkadaşlar., (2019) tarafından yapılan bir araştırmada, PHB yapısı NMR kullanılarak analiz edilmiştir. PHB'nin yapısını doğrulamak için, ticari veya referans PHB'nin NMR spektrumları ve elde edilen PHB karşılaştırılmıştır (Martínez-Martínez vd., 2019). Önceki çalışmalarda NMR sinyaller, metil grubunun (-CH₃) 1.20-1.30 ppm arasında, metilen grubunun da (-CH₂) 2.20-2.60 ppm arasında çoklu tepe noktalarını göstermiştir (Martínez-Herrera vd., 2020; Gómez-Cardozo vd., 2020). Elde edilen sonuçlara göre, 4.90 ve 5.25ppm'lik bir sinyal olduğunda, bir (-CH) metil grubunun varlığını gösterir. PHB moleküllerinin fonksiyonel grubu NMR ve FTIR tarafından doğrulanırsa, ekstrakte edilen polimerin PHB olduğu ve polihidroksibütiratın kontaminasyonu ya da bozulmasının olmadığı anlamına gelir (Martínez-Herrera vd., 2020). Kimyasal yapıya dayanarak, spektrumun PHB moleküllerinin ayırt edici sinyalleriyle eşleştiği bulunmuştur.

2.7.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), saflaştırma derecesini belirlemek ve numunelerin moleküler yapısını belirlenmesi için kullanılan kalitatif bir analitik tekniktir (Shalin vd., 2014; Thapa vd., 2018; Trakunjae vd., 2021). FTIR spektroskopisi hem katı, sıvı hem de gaz örneklerin analizinde kullanılmaktadır. Novais ve Peixe göre, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisinin (FTIR) mikroorganizmaları ve bunların hücre bileşenlerini araştırmak için etkili bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır (Samrot vd., 2021). PHA'nın kimyasal yapısını ve monomerik birimini tanımlar. FTIR analizinde ekstrakte edilen bileşikler, PHB'nin karakteristik bir C=O zirvesini (pik) gösterecek ve böylece ekstrakte edilen izolatların PHB üreticileri olduğunu doğrulayacaktır (Thapa vd., 2018). CH₃, CH₂, C=O, CO, CH ve OH gibi belirgin fonksiyonel grupların varlığı, PHB'nin varlığının kritik bir belirleyicisidir (Thapa vd., 2018). Üretilen PHB'nin farklı fonksiyonel gruplarını araştırmak için Fourier Dönüşümlü

Kızılötesi Spektroskopisi yapılmaktadır (Trakunjae vd., 2021). Martinez-Herrera ve arkadaşları tarafından tarif edildiği gibi metilen (CH_2) ve metil (CH_3) gruplarının olağan spektrumları, 2500 ila 3500cm^{-1} bölgesinde, özellikle 2935 ve 2975cm^{-1} 'deki sinyallerde gözlemlenmiştir (Martínez-Herrera vd., 2020). Temel yoğunluk, bu analiz boyunca referans olarak kullanılan ticari PHB tarafından sağlanır. Çıkarılan PHB daha sonra nitel bir analiz olarak standartla karşılaştırılabilir.

Yapılan bir FTIR analizinde, PHB'de görülen O-H gerilmesine karşılık gelen tüm spektrumlarda $2361\text{-}2365\text{ cm}^{-1}$ 'de bantlar tespit edilmiştir (Hernández-Núñez vd., 2019). Ek olarak, $1720\text{-}1726\text{cm}^{-1}$ 'de kayda değer bir bant, varlığı 1730cm^{-1} 'in altında PHB homopolimerlerinin kristal bölgesi ile ilişkili olan ester karbonil grubu (C=O) ile ilişkilidir (Martínez-Herrera vd., 2020; Gómez-Cardozo vd., 2020). Bir çalışmada, polimer PHA'nın fonksiyonel grupları FT-IR spektroskopisi ile C=O grupları olarak doğrulanmıştır ve polihidroksibütirat, *Bacillus subtilis*'ten ekstrakte edilmiştir, bu çalışmada elde edilen sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından elde edilenlerle aynıydı (Shah, 2014). FTIR düşük algılama hassasiyetine sahip olduğundan ve PHA monomerik bileşimindeki değişiklikleri tanımlamada veya tespit etmede zayıf olduğundan, yarı nicel olarak sınıflandırılabilir (Samrot vd., 2021). FT-IR, PHA karışımları, kopolimerler ve heteropolimerler arasında ayırım yapmaz.

2.8 PHB Kullanmanın Avantajları

Petrokimyasallardan yapılan geleneksel plastiklerle karşılaştırıldığında, polihidroksibütiratların (PHB'ler) çeşitli faydaları vardır. PHB'ler, termoplastisite, biyolojik bozunabilirlik ve biyouyumluluk gibi istisnai özellikleri nedeniyle ticarileşme potansiyeli artan polimerlerdir ve yenilenebilir kaynaklardan üretilir (Acharjee vd., 2023; Carvalheira vd., 2022; Nygaard vd., 2021).

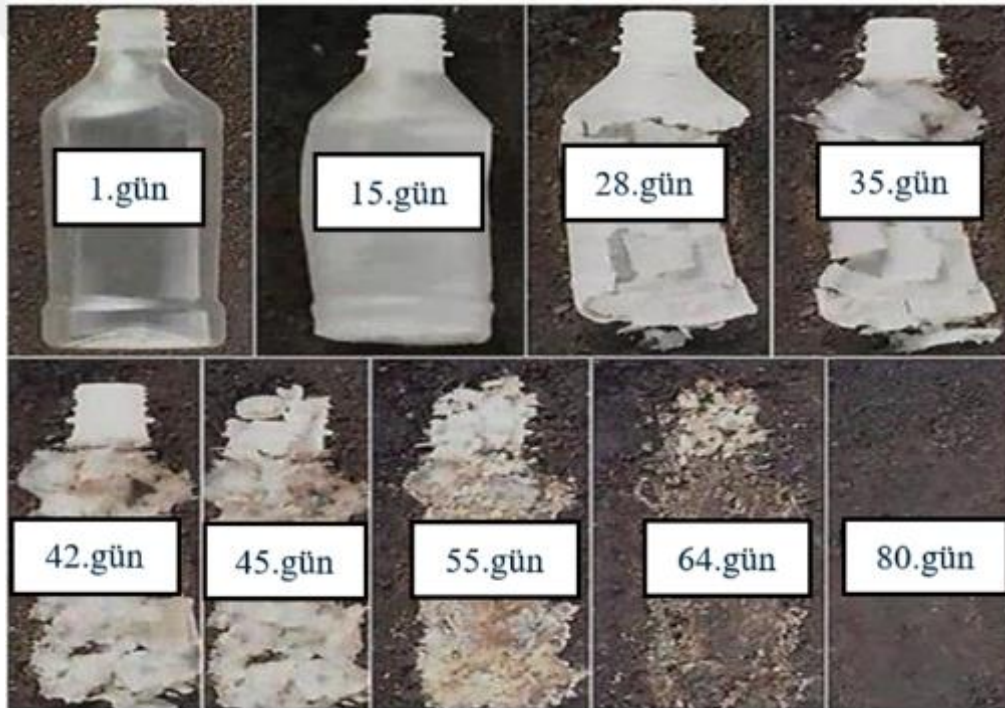
2.8.1. Biyouyumluluk

PHB'ler insan kemikleri ve dokuları ile biyouyumludur, bu nedenle enflamatuar bir reaksiyonu tetiklemeden insan vücuduna yerleştirilebilir. İnsan vücudunda yavaş bozulduğu için ilaç salınımlarında taşıyıcı olarak kullanılabilir (Acharjee vd., 2023; Shalin vd., 2014). Biyoplastikler toksik değildir ve gıda ambalajı uygulamaları için polipropilenden daha iyi fiziksel özelliklere sahiptir (Ansari & Fatma, 2016). Biyopolimer bazlı plastikler, petrol bazlı plastiklere göre bir takım avantajlar sağlar,

örneğin toksik olmayan kimyasallardır, geri dönüşümü kolaydır, fosil yakıt kullanımını azaltır, enerji gereksinimlerini düşürür, yenilenebilir ve çevre açısından güvenilirdir (Acharjee vd., 2023; Lee vd., 2023).

2.8.2. Parçalanabilirlik

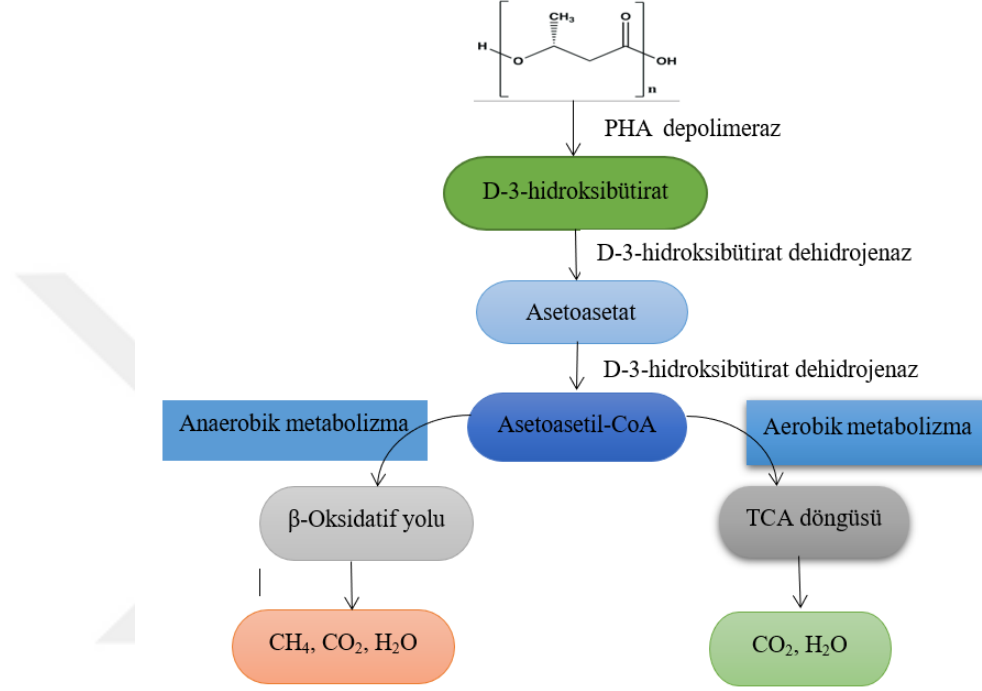
Biyoplastiklerin bir başka avantajı da biyolojik olarak parçalanabilirliktir, bu da son ürünlerin hammadde olarak geri dönüştürülebilmesidir (Şekil 2.14). Bu, yeni hammadde ihtiyacını ortadan kaldırır ve ürüne çeşitli alternatifler sunar (Nandakumar vd., 2021). Biyolojik bozunma, bakteri, mantar veya aktinomiset gibi mikroorganizmalar mevcut olduğunda hem anaerobik hem de aerobik ortamlarda gerçekleşebilmektedir (Lammi vd., 2019).



Şekil 2.14 Çamurda 80 günlük bir süre boyunca inkübasyon sırasında PHA şişelerinin biyolojik olarak parçalanması (Yousuf, 2017).

Bir PHB'nin bozulması, büyük ve karmaşık moleküllerin daha küçük moleküllere bölünmesiyle sonuçlanan bir süreç olarak karakterize edilebilir. Bozunma normal olarak polimer zincirinin veya bağlarının bölünmesi ve yapının kristal retikulumdaki kırılması ile gerçekleşir ve bu nedenle işlev kaybına yol açar (Calleja, 2020). PHB'nin bozunma süresi, polimerin bileşimine ve çevreye bağlıdır. Biyoplastikleri tüketebilecek ve parçalayabilecek çok sayıda bakteri varsa, bozulma birkaç ay sürebilir. Bununla birlikte, deniz gibi bir ortamda, biyoplastiklerin parçalanması muhtemelen bakteri eksikliği veya daha az bakteri nedeniyle daha uzun yıllar alır (Sharma & Dhingra, 2016).

Biyopolimerlerin bozulması, ışık, hava, ısı ve nem gibi birçok çevresel faktörden de etkilenir. Reaksiyonların başlama sürecine bağlı olarak, termodegradasyon, termomekanik bozunma, abiyotik bozunma ve biyolojik bozunma olarak kabul edilir (Dos-Santos vd., 2018). Şekil 2.15'te, aerobik koşullar altındaki son ürünler biyokütle, karbondioksit (CO₂) ve sudur, ayrıca anaerobik koşullar altındaki son ürünler biyokütle, CO₂, metan (CH₄) ve sudur (Zhou vd., 2023; Acharjee vd., 2023).



Şekil 2.15 Anaerobik ve aerobik koşullar altında hücre dışı PHB bozulması

PHB bozulma ürünleri çevreye zarar vermez ve özellikle CO₂ ve CH₄ elektrik santrallerinde elektrik üretmek için kullanılabilir (Kuciel vd., 2019, Bholra vd., 2021). Bununla birlikte, biyoplastiklerin biyolojik bozunması, polimerin kristalliği, yüzey morfolojisi ve yan zincir uzunluğunun yanı sıra sıcaklık, mevcut bakteri türleri, pH ve oksijen seviyeleri gibi çevresel faktörlerden etkilenebilir (Acharjee vd., 2023). Biyopolimerlerin kullanımı atık birikimini azaltmaya yardımcı olur ve bu nedenle atmosfere sera gazı emisyonlarını azaltabilmektedir (Garcia-Gonzalez ve De-Wever, 2018; Dietrich vd., 2017). Biyoplastiklerin biyolojik bozunması sırasında açığa çıkan karbondioksit, doğal bir ortamda karbondioksiti sabitleyen bakteriler tarafından bitkilere asimile edilebilir ve sera gazı miktarını azaltır. PHB, biyolojik bozunma, termal ve fotodegradasyon gibi 3 farklı yöntemle parçalanabilmektedir.

2.8.2.1 Biyolojik bozunma

Polihidroksibutiratın biyolojik olarak parçalanmasında enzimatik ve mikrobiyolojik olmak üzere iki yol vardır. Bakteriler, mantarlar ve algler dahil mikroorganizmalar, enzimatik aktivitelerini enzimler kullanarak biyolojik olarak parçalanabilen plastikleri parçalamak için kullanırlar. PHB'nin bozulması, çeşitli mikroorganizmalar tarafından salgılanabilen ve PHB'nin metabolizmasında önemli bir role sahip olan bir enzim olan PHB depolimerazın etkisiyle hücre içi olarak başlar. Bu enzim suda çözünmeyen polimeri suda çözünen bir polimere hidrolize eder. Bu tür bozulmada, polimerin kristal bölgeleri suya karşı geçirimsiz olduğu için PHB'nin kristallliği belirleyici bir faktördür. Özel PHB durumunda, polimer -COO- grubunun varlığından dolayı hidrolize daha duyarlıdır (Dos-Santos vd., 2018).

2.8.2.2 Termal bozulma

PHB'ler, biyolojik bozunmanın yanı sıra diğer işlemlerle de bozunabilir. Özellikle PHB'ler sıcaklık bozulmasına eğilimlidir. Termal bozunma, uzun polimer zincirindeki ana monomerik birimlerin termal olarak parçalanmasını içerir (Calleja, 2020; Acharjee vd., 2023). Moleküller arası etkileşimler, termal iletkenlik ve makromoleküllerin hareketliliği gibi bazı faktörler ayrışmayı başlatır. Faktörler, malzemenin birinci ve ikinci sırasının faz geçişinin sıcaklığına, kristallik derecesine ve işlendikten sonra polimerik malzemedeki kristal fazın konumuna bağlıdır. Bu, polimerin termal ayrışmasının başladığı sıcaklığı etkileyecektir (Dos-Santos vd., 2018). Ayrıca, maruz kalma süresindeki ve sıcaklığındaki artış, PHB'nin molar kütesinin azalmasını etkiler. Bu, polihidroksibutiratın molar kütesinin çeşitli sıcaklıklara bağımlılığını gösteren çizelge 2.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 PHB bozunumunun molar kütesinin farklı sıcaklıklara bağımlılığı (Dos-Santos vd., 2018)

	Bozulma sıcaklığı (°C)		Moleküler kütle ($\times 10^{-3}$ g/mol)		
	0	1dk	5dk	10dk	20dk
175	564	502	-	-	146
180	477	432	312	169	93
190	402	192	136	52	-
200	282	121	37	-	5

Termal bozunma, plastik atıkların bertaraf edilmesinde ve yeniden kullanılmasında önemlidir ve bozunma reaksiyonları, biyofiber üretim sürecinin önemli

bir parçasıdır. Termal bozunma işlemi, artan sıcaklığın bir sonucu olarak bir polimer özellikleri değiştiğinde meydana gelir. Bir ortamda yüksek bir sıcaklık olduğunda, polimerler daha hızlı bozulur ve yukarıdaki tabloda gösterildiği gibi moleküler ağırlık azalır.

2.8.2.3 Fotodegradasyon

Fotodegradasyon işlemi, polimerin ışıkla değiştirilmesini içerir. Daha küçük polimer parçacıkları, yüksek yoğunluklu foton parçacıkları tarafından parçalanır. Yüksek radyasyon yoğunluğu, biyopolimer molekülleriyle etkileşime girerek oksidasyona, zincir kırılmasına ve diğer bozulmalara yol açan elektronlar üretir. Güneş, dünya üzerindeki birincil ışık kaynağı olduğundan, fotodegradasyon çoğunlukla güneş ışığının varlığıyla başlatılır (Calleja, 2020).

2.8.3 PHB kullanımında limitasyonlar

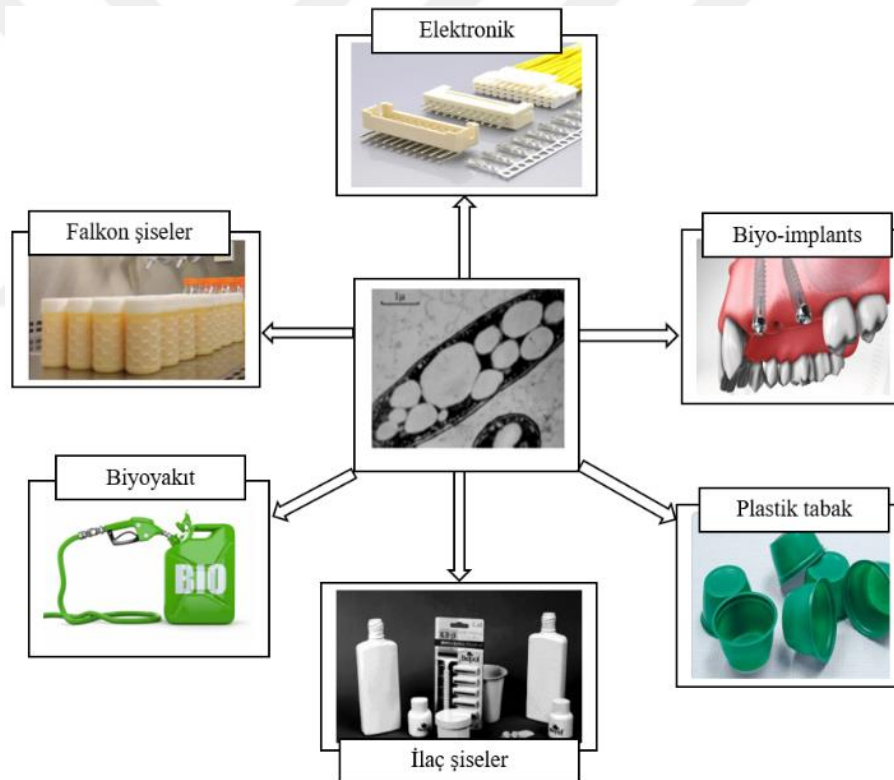
PHB'nin kullanımı ve üretimi dünyaya umut vermiştir. Bununla birlikte, PHB endüstriyel ölçekli kapasitelerde üretildiğinde şu anda birkaç sınırlama mevcuttur. Yüksek üretim maliyetleri, düşük verim, bozulmaya duyarlılık ve ekstraksiyon zorlukları da dahil olmak üzere teknoloji karmaşıklıkları, PHB üretiminin karşılaştığı zorluklar arasındadır (McAdam vd., 2020; Yun vd., 2013; Agnihotri vd., 2022; Yang vd., 2010). Belediye ve endüstriyel atık sular gibi düşük maliyetli karbon hammaddelerinin kullanılmasıyla biyopolimerlerin üretim maliyeti azaltılabilmektedir. Birkaç araştırmacı, endüstriyel atık akışlarından polihidroksialkanoat üretimini araştırmıştır ve endüstriyel atık sular, asetat, propiyonat ve bütirat gibi uçucu organik asitler üretmek için yabancı tip bakteriler tarafından anaerobik olarak fermente edilebilir. Fermentasyondan elde edilen organik asitler PHB üretimi için kullanılabilir. Birkaç çalışma aynı anda PHA sentezini ve atık su arıtımını incelemiştir (Agnihotri vd., 2022). Steril olmayan koşullar altında atıklardan (gıda atığı, atık su veya çamur) polyester üretebilen karışık mikrobiyal kültürler (MMC) kullanılarak yüksek üretim maliyetlerinden kaçınılabılır ve bu da onları tek suşlarından daha umut verici bir platform haline getirir (Parodi vd., 2021).

Endüstriyel atık suyun PHB üretiminde substrat olarak kullanılmasının faydalarının yanı sıra atık su, bakterileri engelleyen veya mikroorganizmaların metabolizma yolunu değiştiren başka tehlikeli kimyasal içerdiğinden arıtılmalıdır. PHB polimerini iyi bir seçenek haline getiren bu özelliklere rağmen PHB, iyileştirilmesi

gereken çok düşük mukavemete/direnme sahip bir polimerdir. PHA'nın fiziksel ve mekanik nitelikleri, valerik asit, propiyonat asit ve glikoz gibi farklı organik karbon kaynaklarının bir kombinasyonu kullanılarak polimere 3-hidroksivalerat (3HV) eklenerek geliştirilebilecektir. Mekanik işlemler sırasında PHB'nin kırılabilirliği, polimeri strese karşı dirençli hale getirir. Ayrıca, üretim maliyeti çok yüksektir ve işleme sırasında polimer termal olarak kararsızdır ve erime noktasına yakın olduğunda ayrışır (Dos-Santos vd., 2018; Rajesh Banu vd., 2021).

2.9 Uygulama Alanları

Şekil 2.16'da PHB, çok sayıda endüstride geniş bir kullanım alanına sahiptir. PHB, polipropilen (PP) için potansiyel bir yedek olarak araştırılmış ve geliştirilmiştir, çünkü çeşitli termoplastiklerle ortak birkaç niteliğe sahiptir.

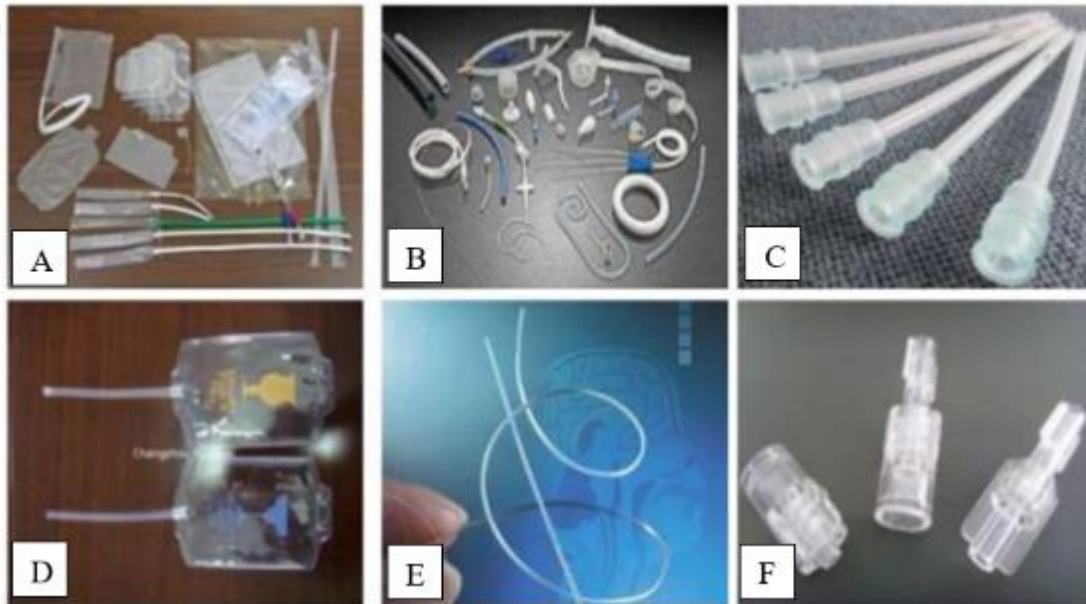


Şekil 2.16 Farklı alanlarda polihidroksibutirat (PHB) uygulamaları

Şekil 2.16'da gösterildiği gibi PHB farklı sektörlerde kullanılabilir. Örneğin, PHB gıda ambalajı için başarıyla test edilmiştir ve polipropilen'den daha sert olduğu bulunmuştur. PHB ayrıca şişe, lateks ve bir dizi tarımsal ve ambalaj ürünü üretiminde de çalışmaktadır. PHB, diaper destek levhaları, filmler ve kopolimerlerin üretiminde kullanılmıştır. Ayrıca, iyon ileten polimerler ve sıcak eriyik yapıştırıcıda bir toner olarak optimize edilmiştir (Markl vd., 2018).

2.9.1 Tıbbi kullanım

PHA'lar: ilaç taşıyıcı, doku mühendisliği, kalp kapakçıkları, cerrahi dikişler, tıbbi implantlar, suni deri, yapay organ rekonstrüksiyonu, kemoterapötikler, antibakteriyel, kanser önleyici ajanlar, hafıza arttırıcılar ve biyokontrol ajanları gibi çeşitli tıbbi kullanımlara sahiptir (Acharjee vd., 2023). Tıp alanında PHB polimeri esas olarak dikişler, implantlar, ürolojik stentler, kardiyovasküler doku mühendisliği, kırık fiksasyonu, narkolepsi ve alkol bağımlılığının tedavisi, ilaç verme vektörleri, hücre mikrokapsülasyonu, hipofizeal hücrelerin desteği ve moleküllerin öncüleri olarak kullanılır (Dos-Santos vd., 2018). PHB'nin tıp alanındaki bazı kullanımları şekil 2.17'de gösterilmiştir.



Şekil 2.17 PHB'nin çeşitli tıbbi uygulamaları (A) Tabakalar (B) İmplantlar (C) Tüpler (D) Damla şişesi (E) Ürolojik stentler (F) Vida (Calleja, 2020)

Biyopolimerler, biyouyumlulukları, çeşitli fizikomekanik özellikleri ve biyolojik olarak parçalanabilirlikleri nedeniyle rejeneratif tıp, ilaç dağıtımı (PHB nanopartiküller) ve doku mühendisliği için çok umut verici ve önemli bir malzeme sınıfıdır (Chernozem vd., 2022; Dos-Santos vd., 2018). İnsan kolon kanserinin tedavisinde porfirin gibi ilaçların transferinde PHA nanopartikülleri kullanılır. Bu özellikler nedeniyle polihidroksiyoalkanoatlar bilim adamları ve mühendisler tarafından önemli miktarda ilgi görmüştür. Poli-3-hidroksibutirat (PHB), çok yönlülüğü, uygun mekanik özelliklerin kombinasyonu, minimum doku toksisitesi ve biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle özellikle doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır [Çizelge 2.4] (Chernozem vd., 2022; Samrot vd., 2021).

Çizelge 2.4 PHB'nin in-vitro tıbbi implant uygulaması (Cheng ve Zhang, 2018) .

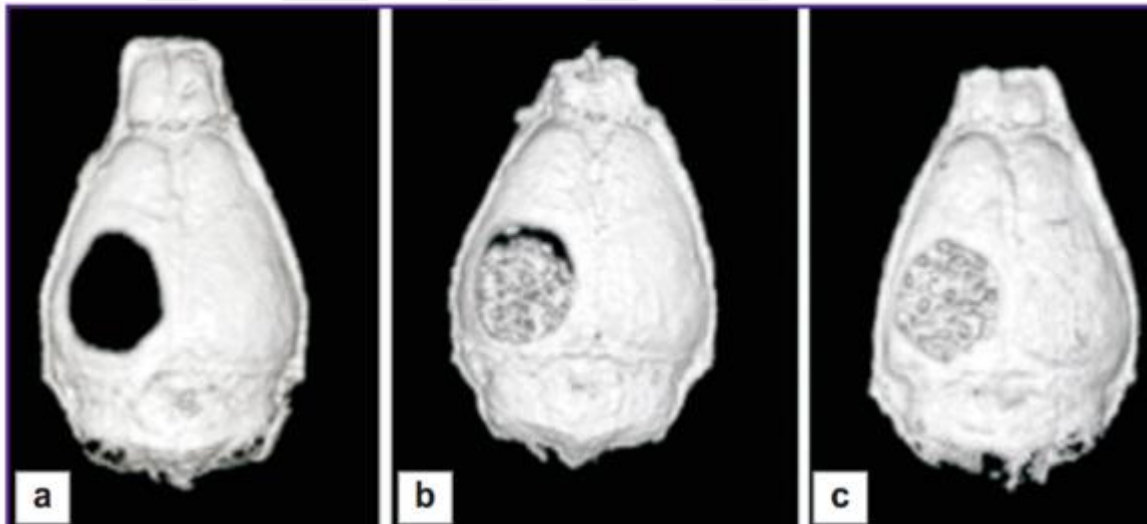
Polihidroksibütirat (PHB)	Kullanım
PHBHHx-PhaP-ligand, PHB-PhaC-GFP-A33scFv	Kanser hücrelerinde ilaç dağıtımı (kolon kanser hücreler; SW1222(A33+) ve HT29 (A33-))
PLA-PHB-PHBHHx (Polihidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat)	Kemik dokusu mühendisliği (tendon ve kemik)
PHA nanopartiküller	PHA antikanser ilaç salınımı
PHA iskeleleri ve nanobiyoglass	Kemik dokusu mühendisliği, MG63 hücresinde hücre çoğalmasını iyileştirir
NaOH ile tedavi edilen PHB, PHB-PHBHHx karışımı	Diş doku mühendisliği, antibakteriyel
PHBHHx, İnsülin, fosfolipid, PHB-PEG, insulin, ve PHB-PMLA (polimalik asit)	Hidrofilik ilaç dağıtımı, uzun süreli insülin ilaç salınımı ve hücre alım formülasyonları

Farmakolojik olarak aktif maddelerin hücrelere, dokulara ve organlara kontrollü olarak verilmesine olan yüksek talep nedeniyle, ilaç dağıtımları tıp alanında önemli araçlar haline gelmiş ve kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Shrivastav vd., 2013). Polimerleri ilaç için taşıyıcı olarak kullanan birçok ilaç verme yöntemi, ilacı bir hedef bölgeye etkili bir şekilde verebilmeleri ve böylece istenmeyen yan etkileri en aza indirirken terapötik faydayı artırabilmeleri nedeniyle geliştirilmiştir. Ayrıca, PHB'nin bozulması vücutta uzun bir süreç olduğundan, yavaş ilaç salım uygulamalarında taşıyıcı olarak faydalı olabilecektir (Rajan vd., 2019). İlaç dağıtımında PHB, diş eti iltihabının tedavisi için fareler, koyunlar, köpekler, tavşanlar ve insanlar üzerinde de test edilmiştir. Polimerik nanopartiküllerde kapsüllenmiş ilaçların veya biyoaktif bileşiklerin terapötik değeri arttırdığı gösterilmiştir. Bunun nedeni çözünürlüğün artması, vücutta salınan ilaçların oranının artması ve ilaç sürdürülebilirliğidir (Samrot vd., 2021). Bu biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerin avantajları, kapsamlı uygulamalar için faydalı olmaları ve büyük ölçekte üretilibilmeleridir.

PHB, şu anda endüstri tarafından kullanılan petrol bazlı plastiklerin değiştirilmesini sağlayacaktır (Adnan vd., 2022). PHA, biyomateryal olarak geniş bir uygulanabilirlik yelpazesine sahiptir; kemik, kırık, tendon, deri ve sinirlerin doku mühendisliğinde kullanılmıştır (Sabarinathan vd., 2018). PHA'lar, insan kemikleri ve dokuları ile biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen ve yüksek mekanik özelliklere sahip olduğu için olası bir tıbbi cihaz malzemesi olarak sunulmuştur (Acharjee vd., 2023). Doku mühendisliğinde PHB kullanımı, biyopolimerin özel özellikleri nedeniyle başarılı olmuştur. Doku mühendisliği, insan doku ve organlarının işlevlerini eski haline getirmeye yeni yaklaşımlar sağlamak için mühendislik, malzeme bilimi, hücre biyolojisi, biyokimya ve tıptaki en son gelişmeleri birleştiren multidisipliner bir bilimsel ve teknolojik çalışma

alanıdır (Bonartsev vd., 2022). PHB polimerlerinin piezoelektrik ekti/özelliik sergilediği bilinmektedir. Bu nedenle PHB, örneğin kırıktağ, kardiyovasküler doku, deri, kemik iliği ve sinir iletkenlerinin değiştirilmesi ve iyileşmesi için biyotıp alanında son derece umut vericidir (Chernozem vd., 2022). Doğal veya sentetik kökenli biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu polimerler olan polihidroksiyalkanoatların, kemik rejenerasyonu için iskele inşa etmek için en umut verici biyomalzemelerden biri olduğu düşünölmektedir (Voinova vd., 2019).

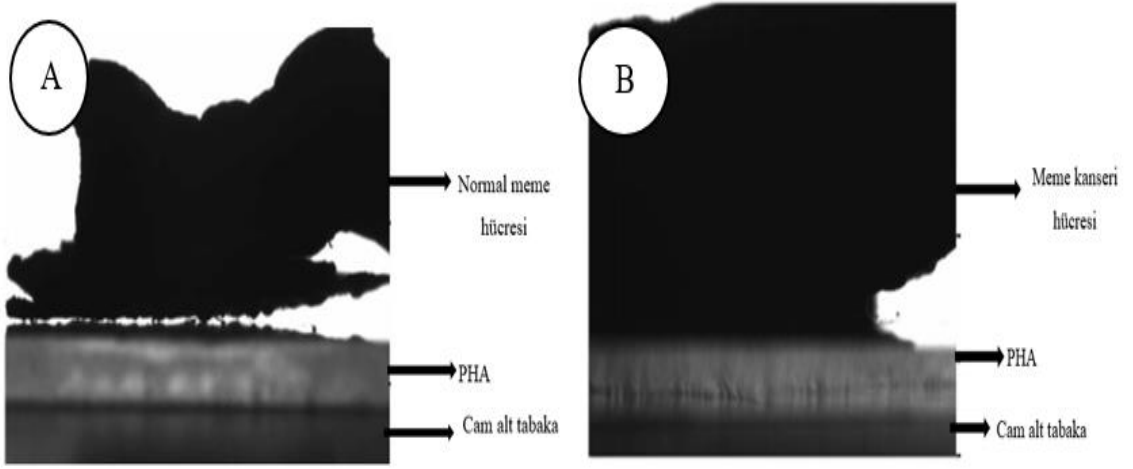
Elektrospinning, nanofiber iskeleler de dahil olmak üzere çeşitli polimerlerden ve bunların kompozitlerinden lifli iskeleler oluşturmak için aktif olarak araştırılmaktadır (Bonartsev vd., 2022) ve bu yöntemin en önemli avantajı, üretilen iskelelerin cildin lifli yapısı, yumuşak bağ dokusu, mukoza zarı ve kas dokusu ile karşılaştırılabilir biyomimetik bir yapıya sahip olmasıdır. Bir fare çalışmasında PHB iskeleleri ile implantasyonun doku üretimi için etkili bir yöntem olduğu bulunmuştur (Şekil 2.18).



Şekil 2.18 Farenin parietal kemiğinde kritik kusur (a) iskelesiz; (b) iskeleli (c) mezenkimal kök hücrelerle tohumlanmış iskeleli (Im vd., 2013)

PHB'ye dayalı aynı iskeleyi kullanan başka bir çalışmada, daha belirgin bir ektopik kemik dokusu oluşumu gösterilip iskele, çene kemiği dokusundan izole edilen primer osteoblastlarla tohumlanmıştır ve atimik sıçanlara implante edilen bir hidroksiapatit-kollajen kompozitten yapılmış bir iskele ile karşılaştırılmıştır (Bonartsev vd., 2022). PHB ve PHBV kopolimerleri, ekstrüzyon, enjeksiyon ve sıkıştırma kalıplama gibi geleneksel tekniklerle işlenebilir. PHBV polimerlerinin piezoelektrik sergilediği bilinmektedir. Elektriksel stimölasyonun kemik iyileşmesini ve onarımını desteklediği düşünöldüğünden, kırık fiksasyon cihazları, pimler ve plaka olarak kullanılmak üzere PHA tipi polimerler önerilmiştir (Sabinathan vd., 2018).

Mevcut yaklaşımlar, özellikle PHB'nin doğal biyoyumlu doğasını kullanarak kanser tespiti için sentezlenen PHB'nin tıbbi uygulamasını amaçlamaktadır (Sabarinathan vd., 2018). Normal hücreler PHB tabakalarına kolayca yapışmamıştır, aksine kanser hücreleri iyi bağlanmıştır ve temas açısı teknikleriyle kolayca tespit edilmiştir (Sabarinathan vd., 2018) (Şekil 2.19). Normal hücreler ile PHB tabakaları arasında, normal hücrelerin nötr kabiliyetinden kaynaklanabilecek bir çekim gözlenmemiştir. Kanser hücrelerinin tespiti için PHB tabakalarının kullanılması tıp alanında yeni bir yol olarak kabul edilmiştir.



Şekil 2.19 Kanser hücrelerinin tespiti için PHB tabakalarının kullanımı (a) PHB'ye bağlı olmayan normal meme epitel hücreleri için temas açısı görüntüsü. (b) PHB'ye bağlı meme kanseri hücreleri için temas açısı görüntüsü (Sabarinathan vd., 2018)

Poli-3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat(PHBV) kopolimeri, biyoyumluluğu, biyolojik olarak parçalanabilirliği ve toksik olmaması nedeniyle doku mühendisliği ve ilaç verme amaçları için potansiyel bir adaydır (Chernozem vd., 2022). Ek olarak, ilaç salım hızı, PHB'nin moleküler ağırlığı değiştirilerek kontrol edilebilmektedir. PHB ayrıca kalp kapak dokusunu tasarlamak için kullanılmıştır (Chernozem vd., 2022).

2.9.2 Paketleme

Gıda ambalajı, mekanik destek, geçiş, raf ömrünün uzatılması ve gıdaların korunmasını sağladığı için gıda zincirinde önemli bir adımdır (Khosravi-Darani & Bucci, 2015). PHA'ler, termoplastiklik, hidrofobiklik, yalıtım ve buhar bariyeri gibi nitelikleri nedeniyle önemli bir ambalaj malzemesi kaynağıdır. PHA türevi kavanozlar, tek kullanımlık bardaklar, tepsiler, kaplar ve köpük bazlı ambalaj kapları gıda endüstrisinde zaten mevcuttur (Acharjee vd., 2023). Biyopolimerler, iyi oksijen geçirgenliği (OP),

önemli gerilme mukavemeti, yüksek antioksidan aktivitesi, yüksek su buharı transfer hızı (WVTR) ve önemli antibakteriyel etkileri ile geleneksel ambalaj malzemelerinden ayırt edilebilir (Varghese vd., 2022). PHB şu anda küçük tek kullanımlık ürünlerde ve ambalajlama malzemelerinde kullanılmaktadır ve PHB'nin gıda ambalajında kullanımı son yıllarda belirgin hale gelmiştir.

Otomotiv sektörü, biyopolimer kullanımı gibi sürdürülebilirlik çabalarını sürdürür. Toyota, otomobil astarlarında ve bazı iç yüzeylerde şeker kamışı bazlı polietilen tereftalat (PET) kullanan ilk kişi olduğu iddia edilmiştir. Bir modelde Mazda motor, tamamen bitki kaynaklı biyofabrikten yapılmış koltuk kılıflarının yanı sıra %80'den fazla bitki kaynaklı içeriğe sahip bir iç donanım içeriğine sahip olduğu iddia edilmiştir (Acharjee vd., 2023).

2.9.3 Tarımsal uygulama

Biyoplastiklerin tarımsal uygulamaları oldukça sınırlıdır. Yetiştirme çuvalları, çiftlik ağları ve malç gibi tarımsal uygulamalar şimdiye kadar araştırılmıştır. Biyolojik olarak parçalanabilen fazlardan oluşan tarım ağları şu anda incelenmektedir (Varghese vd., 2022). Biyopolimerlerin toprağa uygulandığında biyolojik olarak parçalanabilirliği nedeniyle biyoplastiklerin bir gübre formu olarak kullanılmasına izin verir. Malç, nem içeriğini koruyabilir, mükemmel toprak yapısını koruyabilir, yabancı otları kontrol ederek kontaminasyonu önleyebilir ve plastik malçların tarımsal malçların % 40'ını oluşturduğunu belirtmekte fayda vardır (Rydz vd., 2015). Plastik tarımsal malçların, yabancı otlardan kaçınma ve daha yüksek toprak sıcaklığı da dahil olmak üzere sebzeler gibi özel mahsullerin büyümesinde sayısız avantajı vardır ve bu da mahsul üretiminin artmasına neden olur (Rydz vd., 2015; Amelia vd., 2019). Tarım alanında malç olarak kullanılan ana biyoplastikler polilaktittir. Biyoplastiklerin bozulması karbondioksit, metan, su, biyokütle, hümik madde ve birçok doğal kimyasal üretir, ardından ürünler bitkiler tarafından kolayca asimile edilir (Muhammad-Shamsuddin, 2017).

Tarımda torbalar kullanılan en yaygın plastik üründür. Gübre torbaları ve yetiştirme torbaları en yaygın tarım torbası türleridir. Polimer torbalar, genç mahsulleri açık alanlara aktarmadan önce fidanlıklarda fide yetiştirmek için tarımda yaygın olarak kullanılmaktadır (Amelia vd., 2019). Fide torbaları veya ekici torbaları olarak da bilinen yetiştirme torbaları, toprak sıcaklığını dengeler, toprak nemini korur, daha az sıklıkta

mahsul sulaması gerektirir ve belirli yetiştirme ortamlarının kullanılmasına izin verir (Amelia vd., 2019).

PHB miktarını arttırmanın yollarını sürekli araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle, yüksek miktarda PHB birikimi elde etmek için bir konsorsiyum kullanılmasına karar verildi. Bu araştırmada, yüksek miktarda PHB üretmek için bir fotosentetik bakteri konsorsiyumu kullanılmaktadır. Fotosentetik bakteri konsorsiyum için 3 farklı bakteri kullanılmıştır. Bir bakteri konsorsiyumu kullanmak, substrat dönüşümünü iyileştirip bakteriler tarafından daha yüksek bir PHB miktarı üretilebilmektedir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Suşları, Ortam ve Kültür Koşulları

Bu araştırmada *Cereibacter sphaeroides* O.U.001(DSM 5864), *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710 ve *Rhodospseudomonas palustris* (DSM 128) olmak üzere üç fotosentetik ve mor kükürtsüz bakteri kullanıldı. Çalışma hedefi, bütirik asit ortamı ile konsorsiyum olarak üç tür bakteri kullanarak yeterli miktarda PHB üretmek ve hangi bakterilerin PHB üretiminde daha verimli olduğunu karşılaştırmaktır. -80°C 'de stoklanmış olan 3 fotosentetik bakteriler Biebl ve Pfenning (BP) agar besiyerine ekilerek $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ de (96 saat) aktifleştirilmiştir. Tek saf koloniler elde edildikten sonra bakteriler, çalışmaya başlamadan önce adaptasyon ve aktifleştirmesi için karbon kaynağı olarak bütirik asit içeren sıvı bir ortama aktarıldı. Bir koloni, $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 250mL'lik erlenmeyer şişede 100mL sterilize edilmiş bütirat ortamında kültürlendi. Bütirik asit besiyeri içeriği aşağıda çizelge 3.1'de verilmektedir. Besiyeri hazırlandıktan sonra 5M NaOH kullanılarak pH 6.8'e sabitlendi.

Çizelge 3.1 Bütirik asit besiyeri içeriği (g/L)

K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl	2mM
Bütirik asit	30mM
NaCl	0.4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.05
Vitamin	1ml
Eser element çözeltisi	1ml
Demir sitrat	5ml

Çizelge 3.1'de verilen kompozisyonu hazırlandıktan sonra ortam sterilizasyonu 15 dakika süre 121°C de otoklavlama ile gerçekleştirildi ve besiyeri soğumasından sonra demir sitrat, eser element ve vitamin ilave edildi. Bütirik asidi hidrolize etme ve PHB biriktirme yeteneğine sahip mikroplar kullanılarak bir mikrobiyal konsorsiyum (%10 kültür) oluşturuldu. Ayrıca bu üç bakterinin her biri kontrol olarak da yetiştirilip konsorsiyumla karşılaştırıldı. Optimum bütirik asit konsantrasyonunu belirlemek için bir ön çalışma yapılmıştır. Ön çalışmada, beş farklı konsantrasyon (10, 20, 30, 40, 50mM) kullanılmıştır ve optik yoğunluk ölçümlerine göre optimum konsantrasyon 30mM olarak belirlenmiştir. Bütirik asit içeren ortamlarda yetiştirilen mor kükürt içermeyen kükürt

bakterileri kullanılarak yapılan bir araştırmada, optimum büyüme 30mM konsantrasyonda gözlenmiştir (Monroy & Buitrón, 2020). Aerobik karanlık koşullar sağlanarak çalkalamalı (Thermo-scientific MAXQ 4450 1CE) inkübatörde 150 rpm’de ve $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ büyütüldü. Deneyler, 100 mL çalışma hacmine sahip 250mL reaktör (erlenmeyer şişesi) kullanılarak üç tekrar (n=3) halinde gerçekleştirildi ve batch/toplu koşullarında çalıştırıldı (Sekil. 3.1).



şekil 3.1 Bütirik asit ortamda PHB üretimi aşamaları ve koşulları

3.2 Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması

Bütirik asit besiyerinde büyüme sırasında bakteri hücre yoğunluğunu (OD660nm) ölçmek için yaklaşık 24 saate aralıklarla bir örnek ($2000\mu\text{L}$) alınarak hücre yoğunluğu takip edildi. Konsorsiyumun yanı sıra her bir bakterinin bütirat ortamında zamana bağlı hücre yoğunluğu ölçüldü. Blank bir ortam kullanıldı ve hücre kültürleri 1/4'e seyreltildi, böylece OD okuması 0,8'in üzerine çıkmadı, bu da numuneden yansıyan ışık miktarını etkileyerek yanlış bir değer verebilir. Hücre büyümesi ölüm veya düşüş aşamasına kadar ölçüldü.

3.3 pH Eğrilerinin Oluşturulması

Bütirik asit ortamında bakteri üremesi sırasında pH ölçüldü. Kültürün pH değişimi yaklaşık olarak 24 saate bir örnek (2000 μ L) alınarak takip edildi. Bu çalışmada, pH için deney üç tekrar halinde yapılacaktır. Konsorsiyumun yanı sıra her bir bakterinin bütirat ortamındaki pH değişimi de ölçüldü. Sonuçlar hem birbirleriyle hem de konsorsiyum ile karşılaştırıldı ve pH'daki değişiklikler ölüm veya düşüş aşamasına kadar ölçüldü.

3.4 Üretilen PHB Granüllerinin Görüntülenmesi

Bakteriler aerobik koşullar altında ve karanlıkta 100 ml'lik bir erlenmeyer şişede çoğaltıldı. Çoğaltılan bakteriler (konsorsiyum ve her bir bakteri) 96 saatlik bir süre inkübe edilip PHB granüllerinin görüntülenmesi yapıldı (genellikle bu sırada bakteriler büyüme aşamasındadır ve durağan fazda PHB üretmeye başlamaktadır). Bakteriler tarafından üretilen PHB mikroskopi kullanılarak incelenebilmektedir. Bu çalışmada, bakteri izolatları ile PHB üretimi testi Sudan Black ve Nile Red kullanılarak boyama yöntemi ile yapıldı. Bu çalışmada da her bir bakteri ayrı ayrı kültüre edilerek PHB boyama işlemleri yapıp konsorsiyum ile yapılan çalışmalarla karşılaştırıldı.

3.4.1 Sudan Black B ile hücre içi PHB granüllerinin görüntülenmesi

Sudan Black boyama, bakteri koloniler mikroskobik slayt üzerine yayma yapılarak hazırlanmaktadır.

- 1 ml bakteri, 9 ml steril distile suda seyreltildi.
- 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 Sudan Black B boyası damlatılarak 20 dakika inkübasyon süresine bırakıldı.
- Boyanın uzaklaştırılması için çok kısa bir süre preparat ksilene daldırılıp çıkarıldı.
- Dekolorizasyon işleminde % 0,5'lik safranin çözeltisi preparat üzerine damlatıldı ve 10 saniye beklendi.

- Distile su ile yıkama yapılarak preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Hazırlanan slayt mikroskop 100X (Nikon esclipse E200) altında görüntülendi.

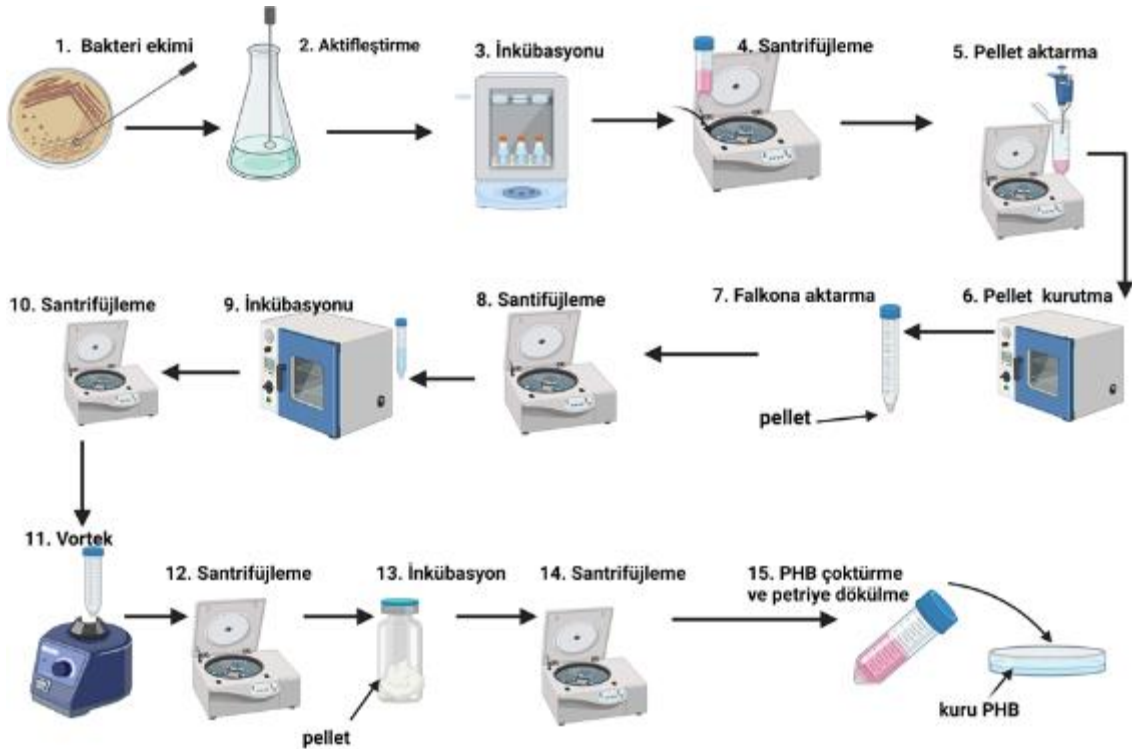
3.4.2 Nile red ile hücre içi PHB granüllerinin görüntülenmesi

Nil Red, hücre içi PHB'yi tespit etmek için kullanılan hızlı ve kolay tekniktir. Nil Red PHB granüllerine bağlanır ve floresan mikroskobu ile kolayca tespit edilir. Renkleri koyu kırmızıdan yoğun sarı-altın emisyonuna kadar değişmektedir. Bu çalışmada da bakteriler bütirat besiyerinde ayrı ayrı ve konsorsiyum şeklinde kültüre edilerek kullanıldı.

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

3.5 Kültürlerden PHB Ekstraksiyonu

Çizelge 3.1`de bütirik asit ortamının genel içeriği verilmiştir. PHB üretimi için bakteriler aerobik, karanlık koşullarda, 30°C sıcaklıkta ve 250mL hacimli erlenmayer flask şişelerde çoğaltıldı. Bu çalışmada, PHB üretimi için ortama %10 bakteri kültürü eklenmiştir. Çoğaltılan bakteri konsorsiyum 96 saatlik bir süre inkübe edilip üç bakterinin her biri kontrol olarak da kültüre edildi ve konsorsiyumla karşılaştırıldı. PHB ekstraksiyonları log fazındaki bakterilerden yapıldı. PHB ekstraksiyon işlemi şekil 3.2'de özetlendi. PHB ekstraksiyon adımları şunlardır;

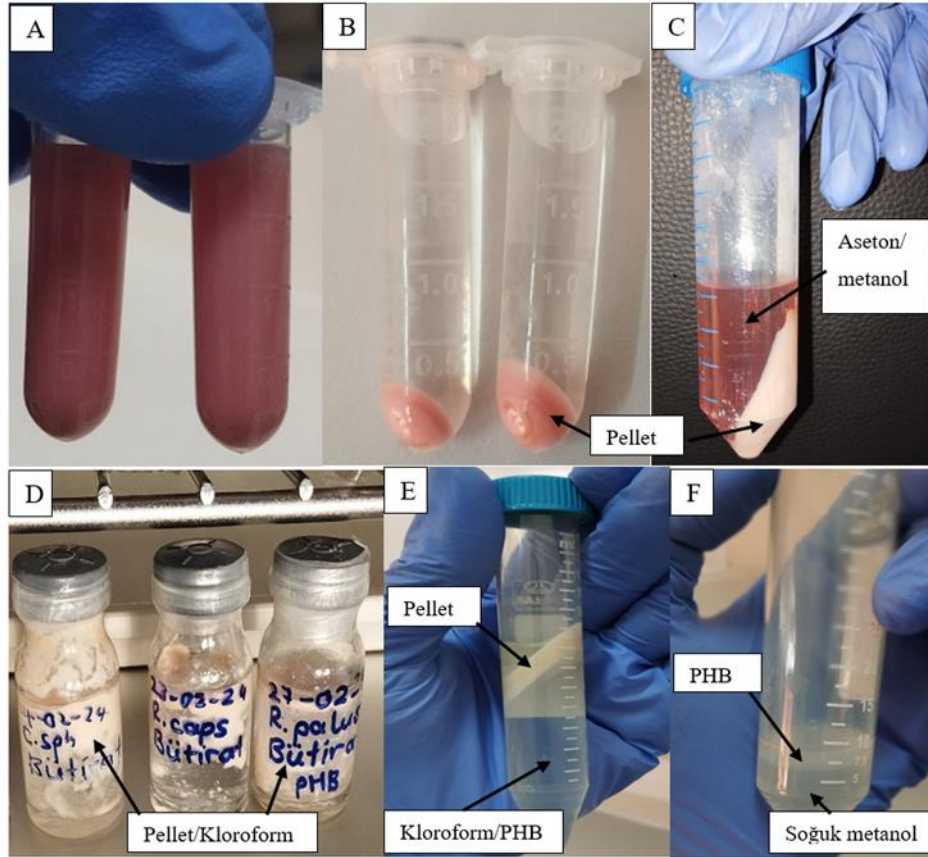


Şekil 3.2 PHB ekstraksiyon adımları, Birender'de yaratılmıştır. Manga, I. (2023)

<https://BioRender.com/y37g144>

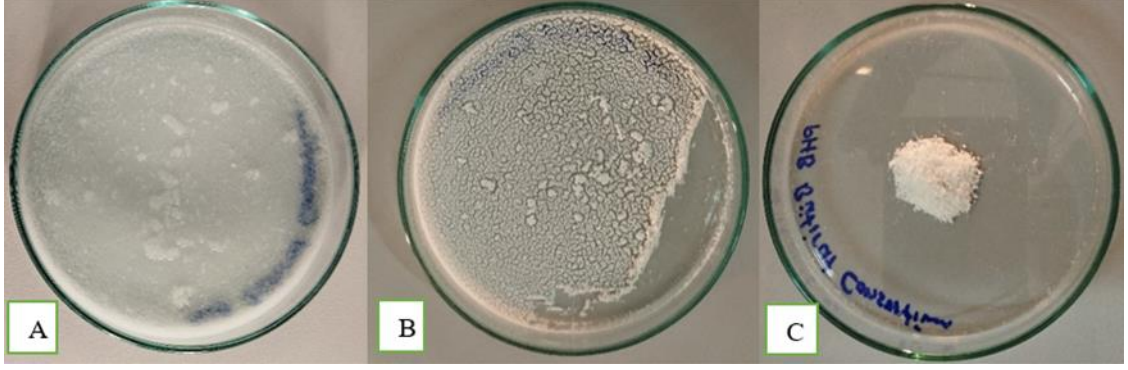
- Hücre kültürü 50 mL'lik falkonlara eşit şekilde bölünerek 5000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Bütün santrifüj işlemleri oda sıcaklığında gerçekleştirilir. Sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı.
- Falkonda bulunan pellet 1 mL distile suda çözündürülerek ependorfa aktarıldı.
- Üzerine 1 mL daha distile su ilave edilerek pipetaj işlemi yapılır, ardından 13.000 rpm'de 15 dk yapılır ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet tekrardan 1 mL distile suda çözündürülerek 50mL'lik falkonlara aktarıldı.
- Pigment ekstraksiyonu için üzerine aseton-metanol karışımı (9mL) homojenleştirilerek ilave edilip oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakıldı.
- Sonrasında 6000 rpm'de santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu aşamada 5 kere yapıldı. Bu prosedür bakteri hücrelerinin rengi tamamen değişene kadar birkaç kez tekrarlandı.
- Kalan suyun çıkarılması için pellet üzerine 10mL etanol ilave edildi ve 50°C'de 20 dk inkübasyona bırakıldı.
- Ardından 6000 rpm'de 15 dk santrifüj, süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücre duvarının parçalanıp PHB'nin geri kazanılması için pellet üzerine 6mL (%6) sodyum hipoklorit (NaClO) eklendi ve 10 dk vorteks yapıldı. Sonrasında 37 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı.

- 6000 rpm'de 15 santrifüj yapıldı, sonrasında süpernatant atıldı.
- PHB'nin elde edilmesi için pellet 1ml kloroformda çözdürüldü, 10mL'lik cam penisilin şişesine aktarıldı ve 4mL daha kloroform eklendi.
- Şişenin ağzı kapağı ile kapatılır, herhangi bir buharlaşma olasılığına karşı kapak kısmı parafilm ile sarılıp bir kaç gün 30°C'de inkübasyona bırakıldı.
- Tekrar santrifüj 9000rpm 15 dk 30°C de yapıldı ve pipet yardımı ile alttaki PHB içeren kloroform fazını yeni bir falkona aktarıldı.
- PHB çöktürmek için kloroform üzerinde eşit miktarda soğuk (%100) metanol (-20°C) eklendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Laboratuvar ortamında PHB ekstraksiyon işlemi (A) Flask'tan toplanan hücreler (B) Pelletin distile su ile yıkanması ve hücre toplanması (C) Aseton-metanol ile pellet yıkama ve pigmentlerin uzaklaştırılması (D) Pellet ve kloroform karışımı 30°C'de inkübe edildi (E) Kloroform içinde çözülmüş PHB'nin elde edilmesi (F) Kloroform içinde çözülmüş PHB'nin çökeltilmesi

Çökelti daha sonra kloroform ve metanolü buharlaştırmak için bir petri kabına döküldü (Şekil 3.4). Toz PHB elde etmek için bir kaç gün 30°C de inkübasyon bırakıldı, kurutma işlemi tamamlanıp tartıldı. PHB, sabit bir ağırlık gözlenene kadar kurutuldu.



Şekil 3.4 PHB kurutma aşamaları (A) Nemli PHB (metanol/kloroform) (B) Kuru PHB (C) Bir petri içinde toplanan saf PHB

3.6 Kuru Hücre Ağırlığı Ölçümü ve PHB Verimi Hesaplaması

Konsorsiyum ve tek bakteri suşlarının CDW'si 72 saatlik inkübasyondan sonra belirlendi. Hücreler santrifüjleme (13.000rpm, 15 dakika) ile toplandı, distile suyla yıkama işlemi yapıldı. Hücre pelletleri 80°C'de 1 saat 30 dakika kurutuldu. İlk önce boş eppendorf tartıldı ve kuru hücreli pelletler elektronik bir denge kullanılarak tartıldı. Bakteriler tarafından üretilen kuru PHB yüzdesini hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanılmıştır. Ayrıca üç bakterinin her biri kontrol olarak da tartıldı ve konsorsiyumla karşılaştırıldı. Elden edilen PHB hesaplamak için aşağıdaki denklem kullanıldı (Marudkla vd., 2018).

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

3.7 Üretilen PHB Polimerlerin Karakterizasyonu

3.7.1 NMR ile PHB karakterizasyonu

Ekstrakte edilen 20 mg PHB, 1 ml döteryum kloroform içinde çözüldü ve çözelti, ¹H-NMR analiz cihazı (Bruker Avance Neo 400 MHz) kullanılarak analiz edildi. Spektrumlar ticari olarak standart PHB ile karşılaştırıldı.

3.7.2 FTIR ile PHB karakterizasyonu

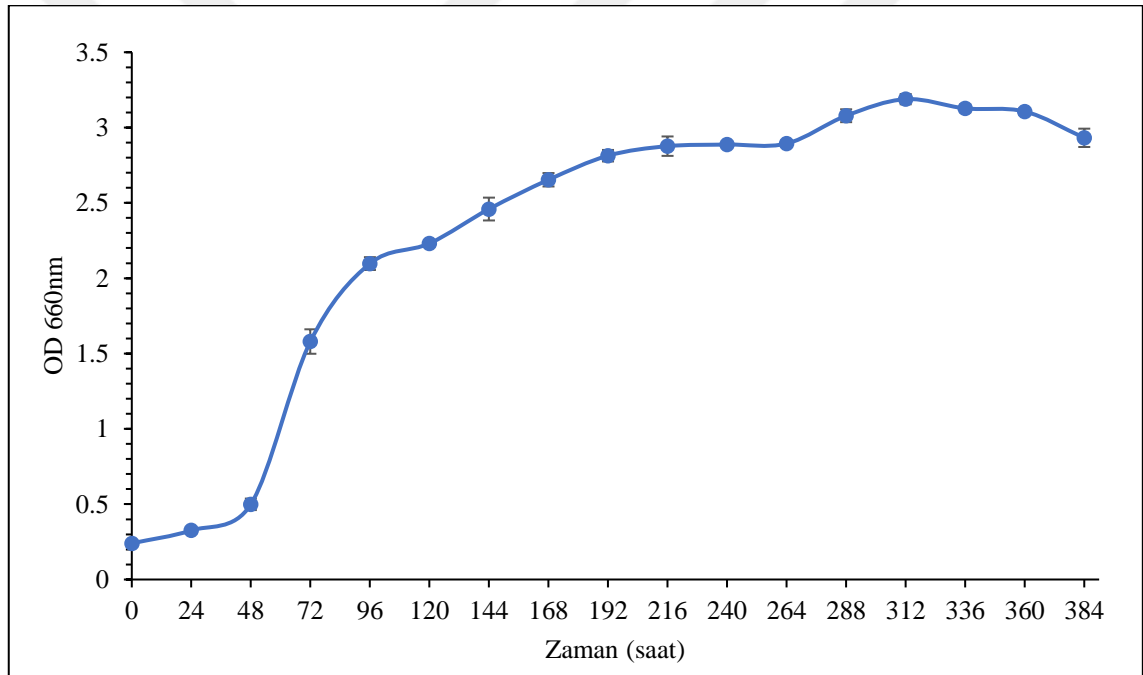
ZnSe kristali üzerinde PHB'nin FTIR analizi yapıldı. Pellete ZnSe eklenerek oluşturulduktan sonra, spektrumlar FTIR Thermo Scientific-Nicolet 1S20 spektrofotometresi ile 3900-500 cm⁻¹ aralığında analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

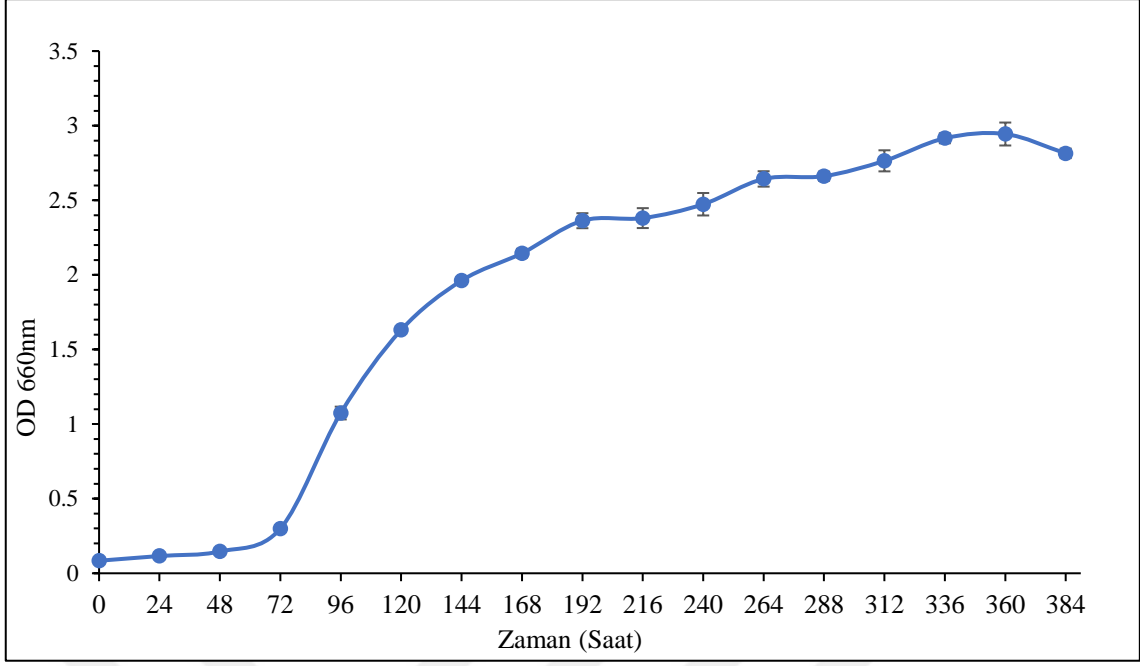
4.1. Büyüme Eğrileri (OD) ve pH Oluşturması

4.1.1. Büyüme eğrileri (OD 660nm)

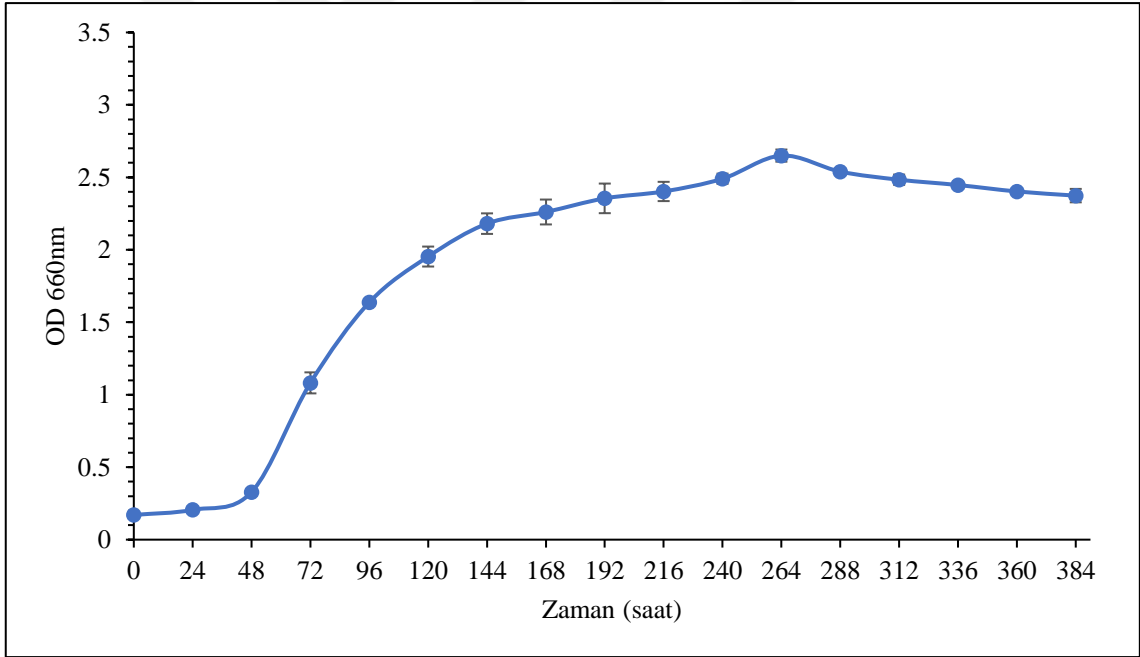
Bakteri kültürlerinin OD 660nm’de spektrofotometre ile ölçüldü. İstatiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edebilmek için deneyler 3 tekrar şekilde yapıldı ve hata çubukları grafiklerde eklendi. Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5` te, bütirik asitte yetiştirilen *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864), *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710, *Rhodospseudomonas palustris* (DSM 128) ve konsorsiyumun optik yoğunluk değerlerini göstermiştir.



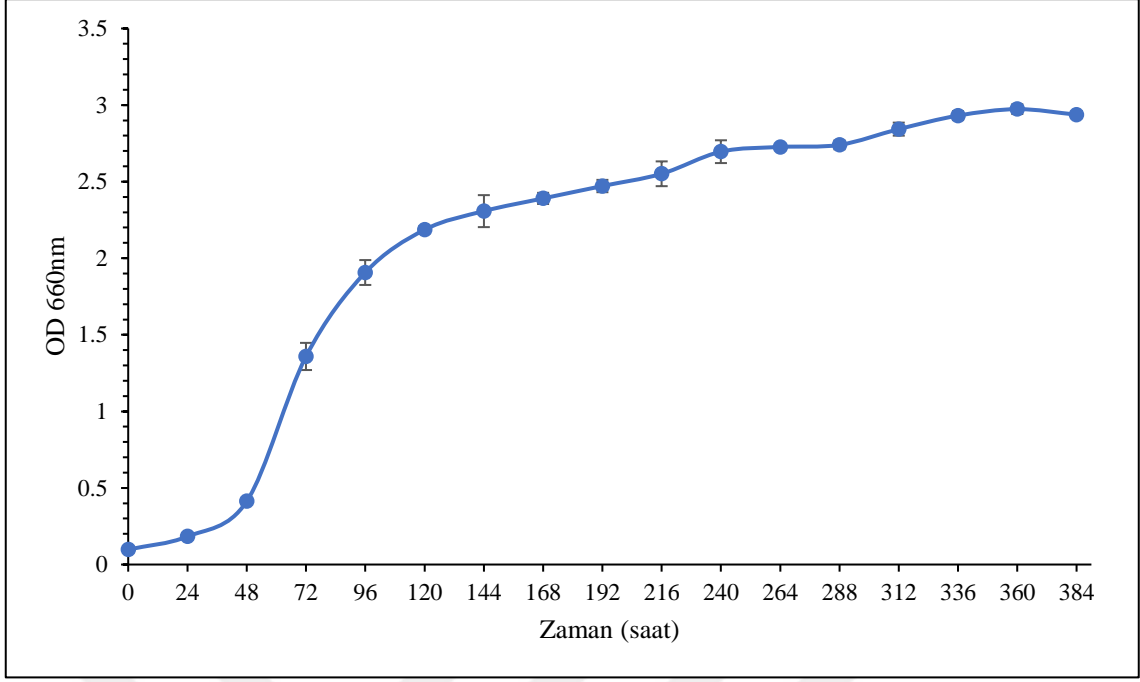
Şekil 4.1 *Cereibacter sphaeroides* O.U.001(DSM 5864) OD değerleri (660)



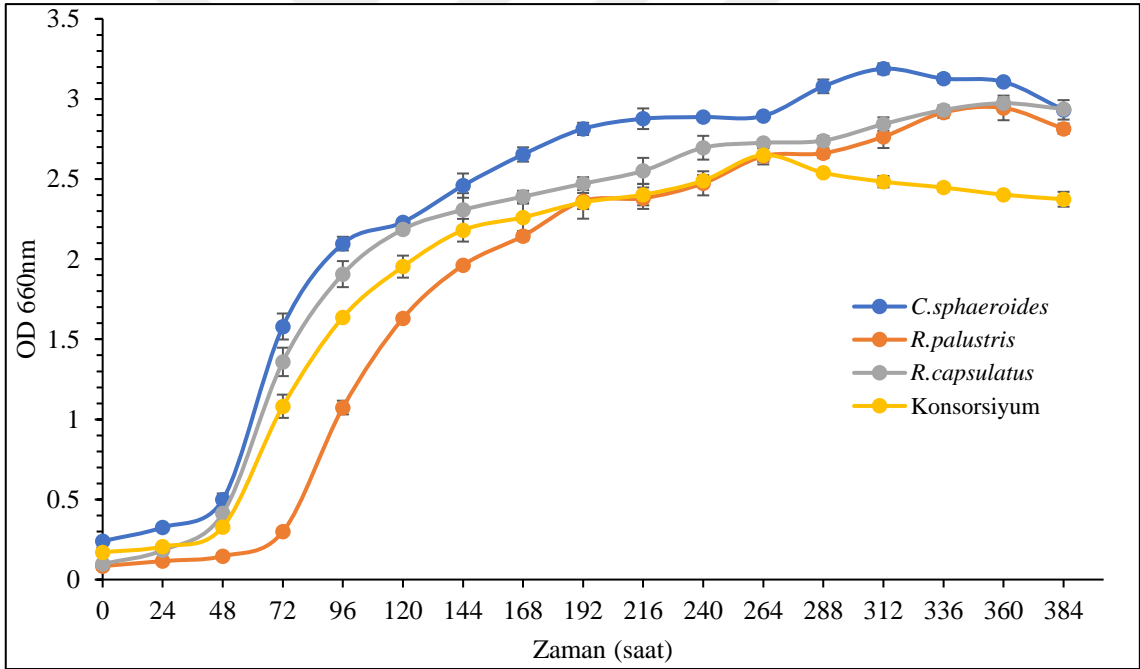
Şekil 4.2 *Rhodospseudomonas palustris* DSM 128 OD değerleri (660nm)



Şekil 4.3 Konsorsiyum OD değerleri (660nm)



Şekil 4.4 *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710 OD değerleri (660nm)



Şekil 4.5 Tek bakterileri ve konsorsiyumun optik yoğunluğunun karşılaştırılması

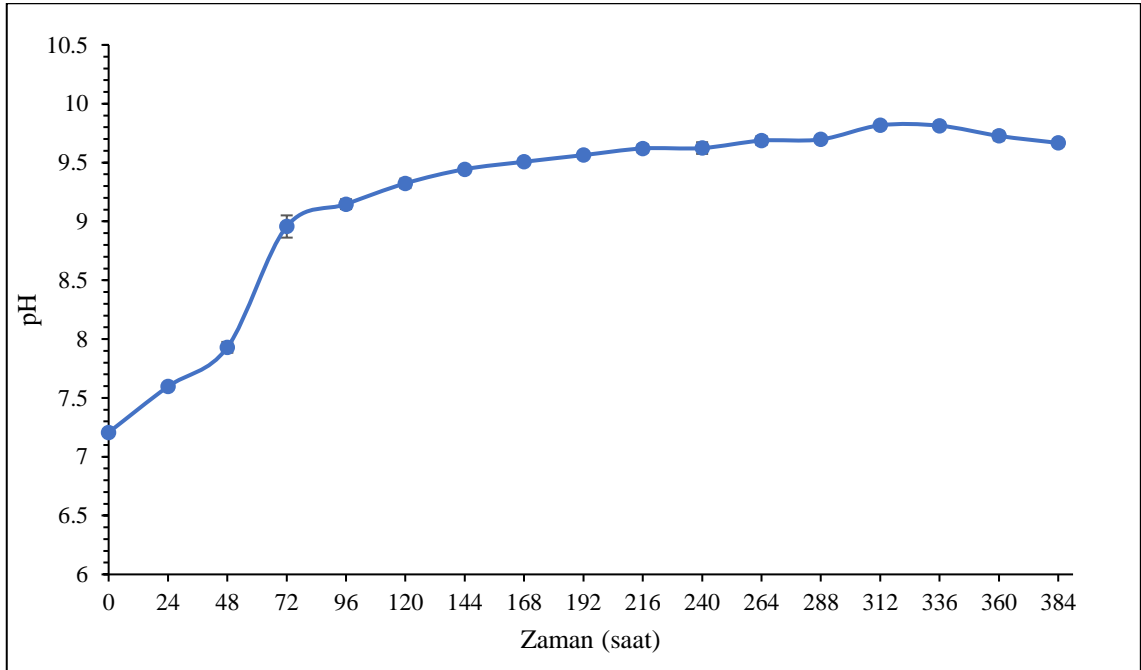
Rhodospseudomonas palustris, *Cereibacter sphaeroides* ve *Rhodobacter capsulatus* bakterilerinin ve konsorsiyumun OD (660nm) değerleri bir arada tek grafik üzerinden gösterilmiştir. Bütiratta yetişen bakteriler arasında *Cereibacter sphaeroides*'ten maksimum 3.18 ± 0.03 büyüme, ardından 2.97 ± 0.03 optik yoğunluğa sahip *Rhodobcater capsulatus*, *Rhodospseudomonas palustris*'in optik yoğunluğu 2.94 ± 0.07 ve en az bakteri üremesi 2.65 ± 0.04 optik yoğunluğa sahip konsorsiyumda gözlemlendi. Bu çalışmaya göre, 3 farklı bakteri içeren konsorsiyuma kıyasla tek bakteri en yüksek büyüme oranına sahiptir.

Tek bakteri ve konsorsiyumun optik yoğunlukları karşılaştırıldığında, monokültür bakterilerinde konsorsiyuma göre daha yüksek hücre yoğunluğu olduğu ve daha yüksek bir büyüme oranına ulaşıldığı gözlenmiştir.

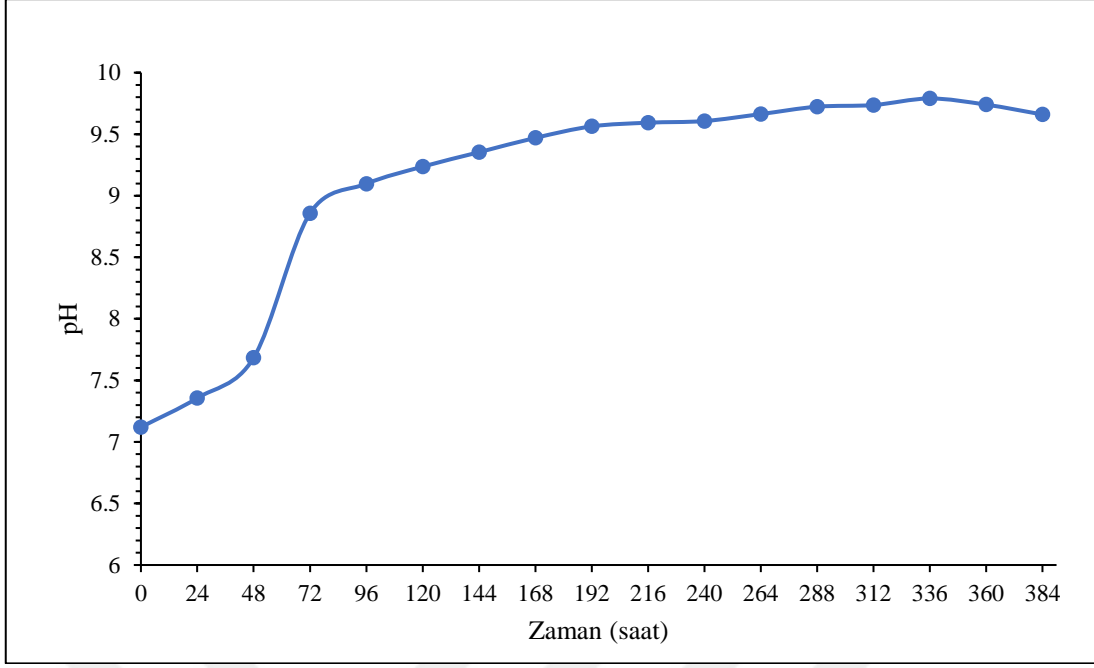
Log fazı 72 ile 96 saat arasında gözlendi ve daha sonra PHB'nin ekstraksiyonu log fazına göre belirlendi çünkü bu log fazında bakteriler hücre içi PHB granülleri biriktirmektedir. Bu sonuca göre, farklı bakteriler bütirik asit ortamında farklı metabolik aktiviteler gösterir ve farklı optik yoğunluklar gözlendi, bu bütirik asidi mikroorganizmalar tarafından asimile etmek için kullanılan metabolik yollardaki çeşitlilikten kaynaklanabilir. Kolayca bulunabilen bir karbon kaynağını kolayca kullanabilen bakteriler, daha yüksek bir optik büyüme oranına ulaşma potansiyeline sahiptir.

4.1.2. pH eğrileri oluşturması

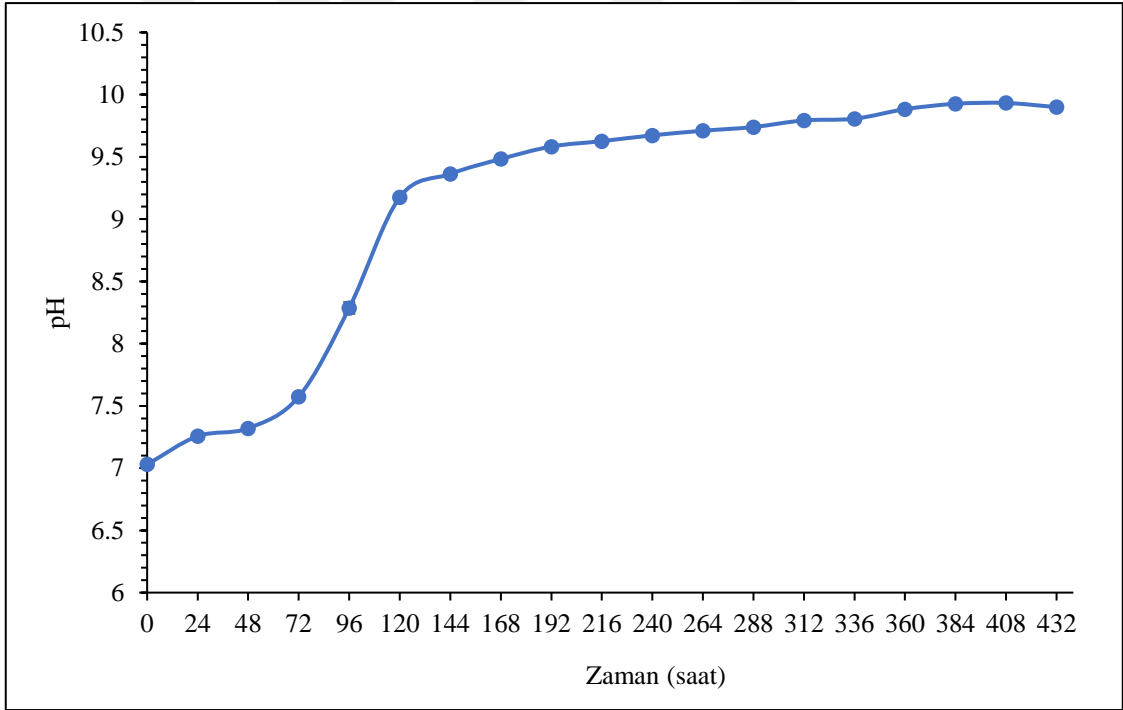
Deney başlangıcında ortamın pH değeri 6.80 olarak belirlenmiş ve kültürlenen bakterilerin pH değişimleri ölüm aşamasına kadar ölçülmüştür. Kültürün pH değişimi her 24 saatte bir örnek alınarak takip edildi. Bu çalışmada pH deneyi üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Konsorsiyuma ek olarak, her bakterinin bütirat ortamındaki pH değişimi de ölçüldü. Sonuçlar şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'de gösterilmiştir.



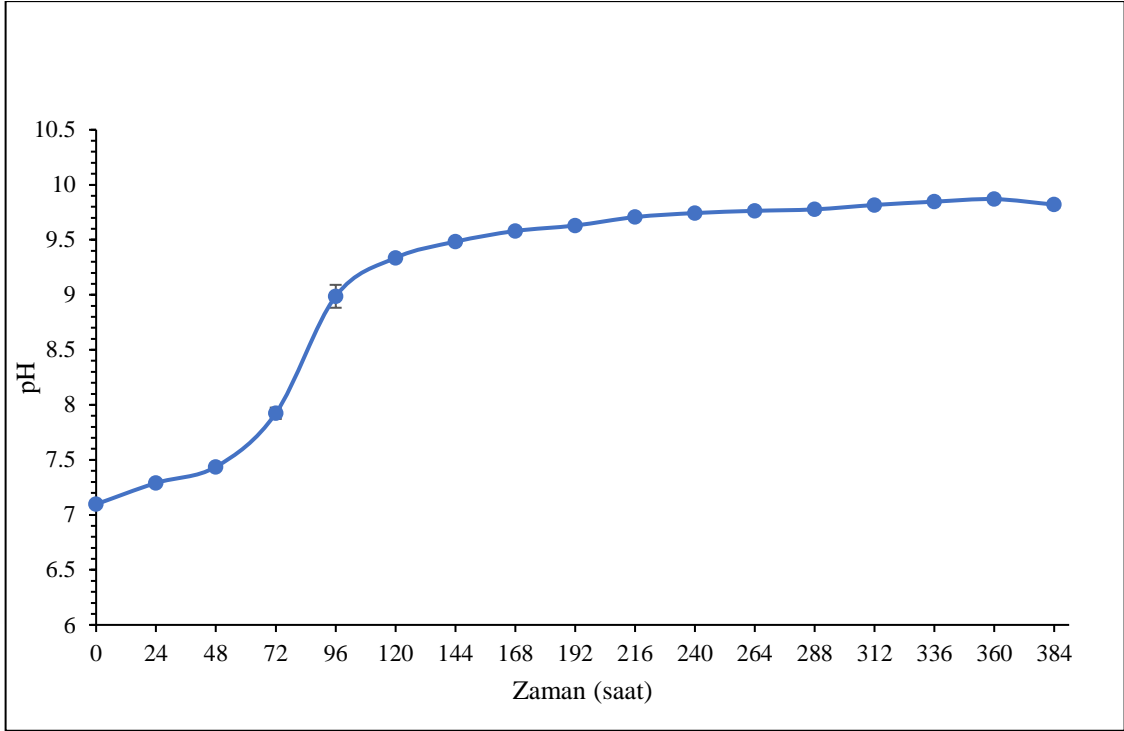
Şekil 4.6 *Cereibacter sphaeroides* pH değerleri



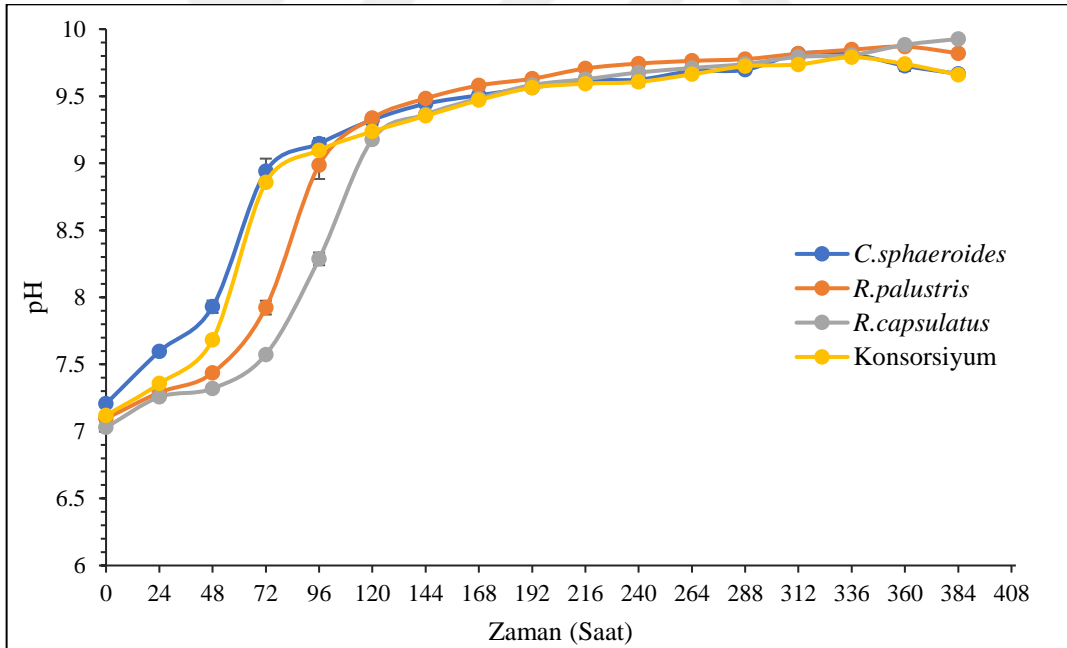
Şekil 4.7 Konsorsiyum pH değerleri



Şekil 4.8 *Rhodobacter capsulatus* pH değerleri



Şekil 4.9 *Rhodospseudomonas palustris* pH değerleri



Şekil 4.10 Tek bakteri ve konsorsiyumun pH'ının karşılaştırılması

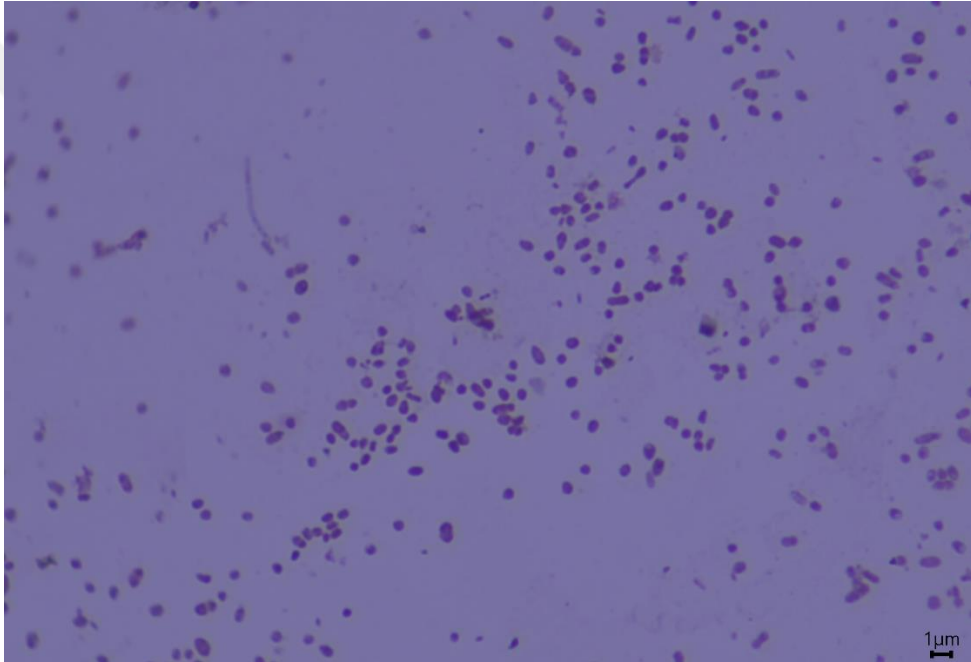
Kaydedilen sonuçlara göre pH eğrileri, tüm bakterilerin başlangıç pH'ının 7.0-7.2 civarında neredeyse aynı olduğunu göstermiştir. *R. capsulatus*'lu ortam kültürünün pH'ının 7.03'ten 9.93 ± 0.01 'e yükseldiği ve bütirik asit kullanılarak PHB üretiminde gözlenen en yüksek pH değeri olduğu gözlenmiştir. *Cereibacter sphaeroides*'in maksimum pH değeri 9.81 ± 0.01 , *R. palustris* 9.87 ± 0.01 ve konsorsiyumda 9.79 ± 0.01 pH değeri kaydedildi. Hafif alkali pH koşullarında (8.0-8.5) fotoheterotrofik fermantasyon

altında *C. sphaeroides* RV'nin daha yüksek miktarda PHB biriktirdiğini keşfetmiştir (Kobayashi & Kondo, 2019) ve Şekil 4.6'de göre log fazı, *C. sphaeroides* O.U.001 DSM 5464'de pH 8.0-8.5'te da gözlenmiştir.

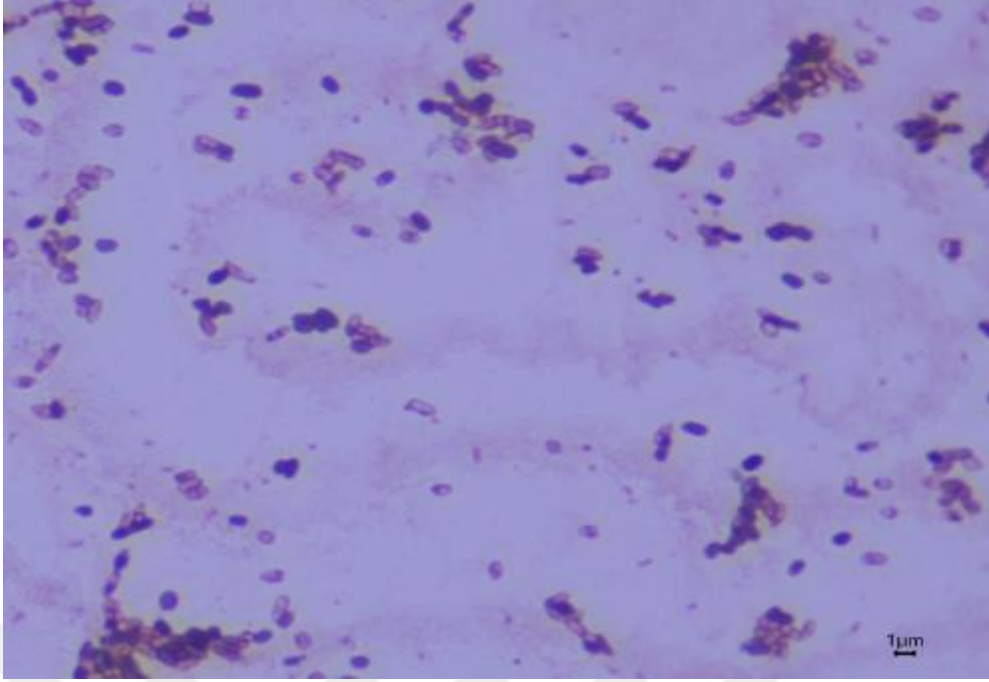
4.2. Üretilen PHB Granüllerinin Görüntülenmesi

4.2.1. Sudan black B ile hücre içi PHB granüllerinin görüntülenmesi

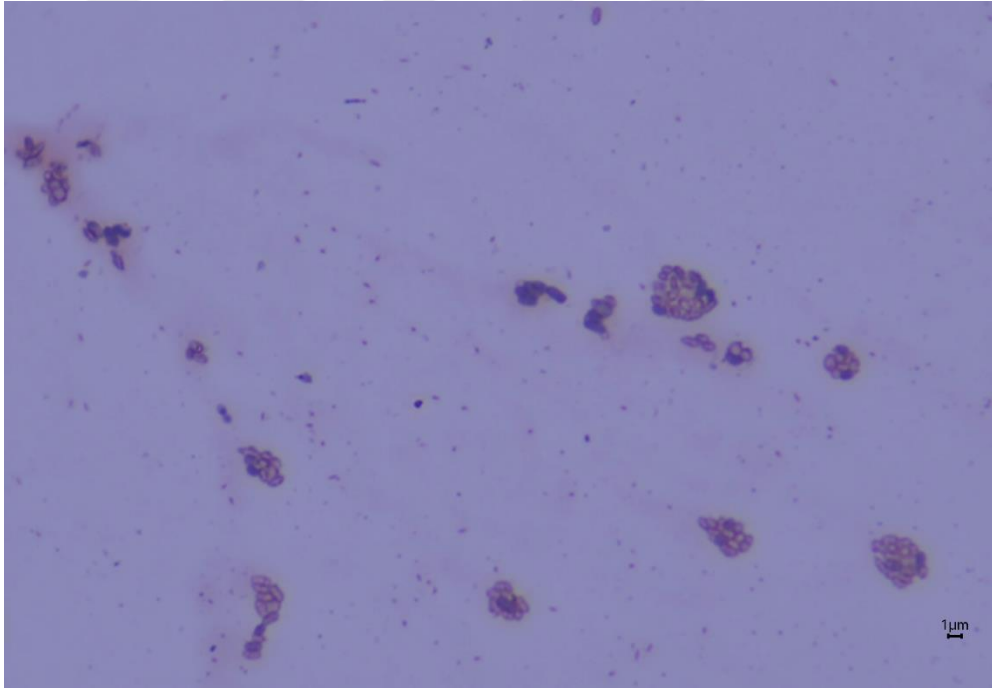
Maksimum PHB üretimi 72-96 saatte görülüp Sudan Black B boyama ile bakteriler boyandı. PHB üreten koloniler Sudan Black boyası ile mavimsi-siyaha boyanmıştır (Şekil 4.11, 4.12, 4.13 ve 4.14).



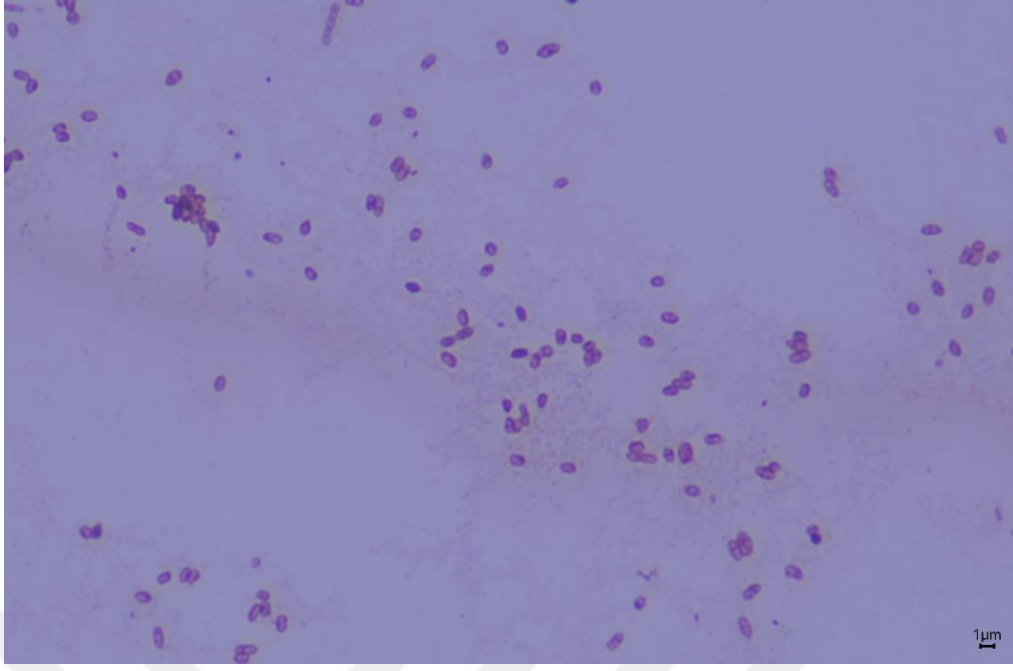
Şekil 4.11 *Cereibacter sphaeroides*'ten üretilen PHB granüllerinin 100X görüntüsü



Şekil 4.12 *Rhodobacter capsulatus*'tan üretilen PHB granüllerinin 100X görüntüsü



Şekil 4.13 *Rhodospseudomonas palustris*'ten üretilen PHB granüllerinin 100X görüntüsü

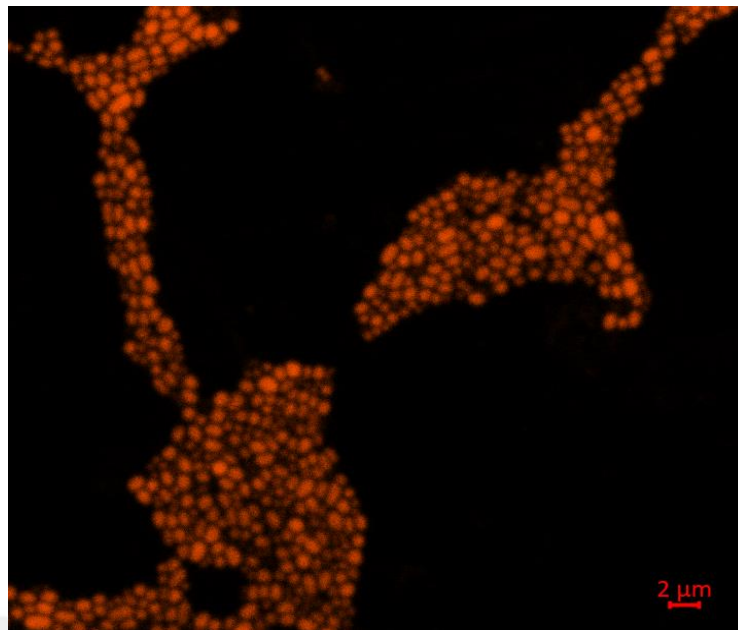


Şekil 4.14 Konsorsiyum bakterilerden üretilen PHB granüllerinin 100X görüntüsü

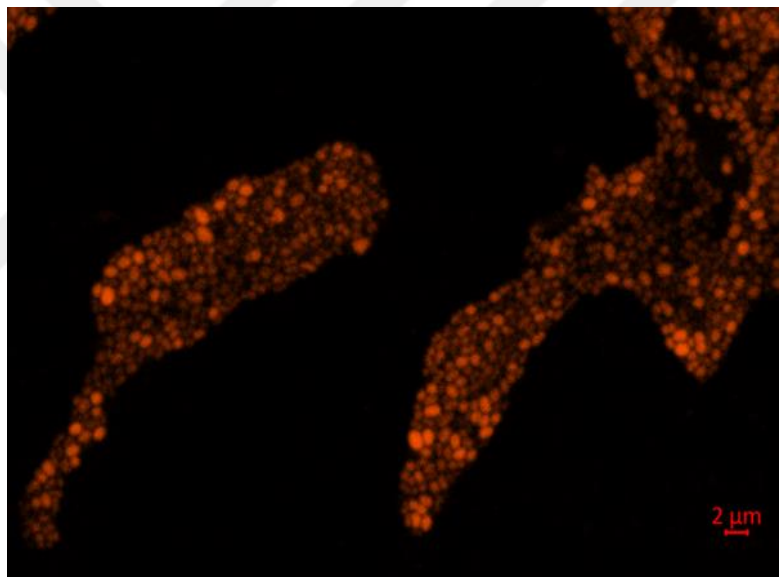
Sudan Black B boyası bakteri hücrelerinde PHB inklüzyon cisimlerini tespit etmek için temel bir tarama ve boyama tekniği kullanılmıştır (Adnan ve ark., 2022). PHB'den yoksun koloniler beyaz görünürken, PHB üreten koloniler Sudan Black B boyası ile boyandığında mavimsi-siyah görünür. Yukarıdaki şekillerde gösterildiği gibi, tüm bakteri suşları Sudan Black B ile boyandı ve pozitif sonuçlar göstermiştir, bakteriler PHB üretmektedir.

4.2.2. Nile red ile hücre içi PHB granüllerinin görüntülenmesi

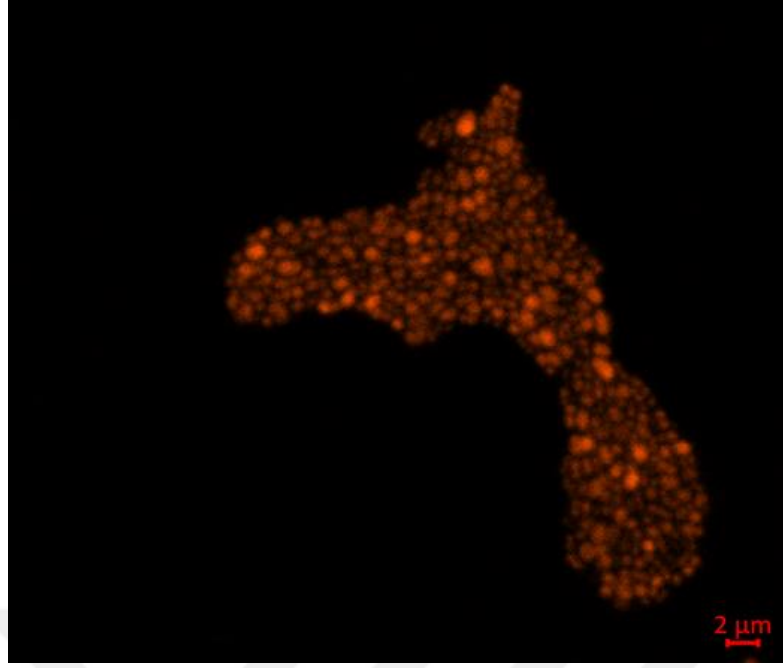
Nil Kırmızı boyama tekniği, hücre içi PHB, membranlar ve lipit inklüzyon cisimleri gibi hidrofobik moleküllerin görselleştirilmesinde kullanılan lipofilik floresan bir boyayı tanımlar. Bu boyama yöntemi hücre içi PHB'yi tanımlamak için hızlı ve kolay bir tekniktir (Juengert vd., 2018). Şekil 4.15, 4.16, 4.17 ve 4.18`de fotosentetik bakteriler üzerindeki Nil kırmızısı boyamasını göstermektedir, Nil Red boyamasının pozitif sonuçları kırmızı-altın rengini göstermektedir.



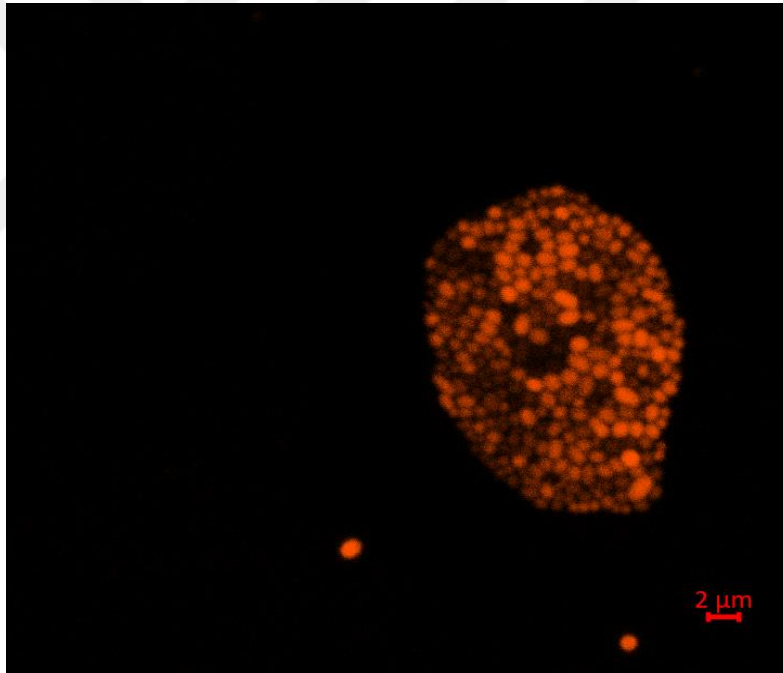
Şekil 4.15 *Rhodospseudomonas palustris* (DSM 128)



Şekil 4.16 *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)



Şekil 4.17 *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710

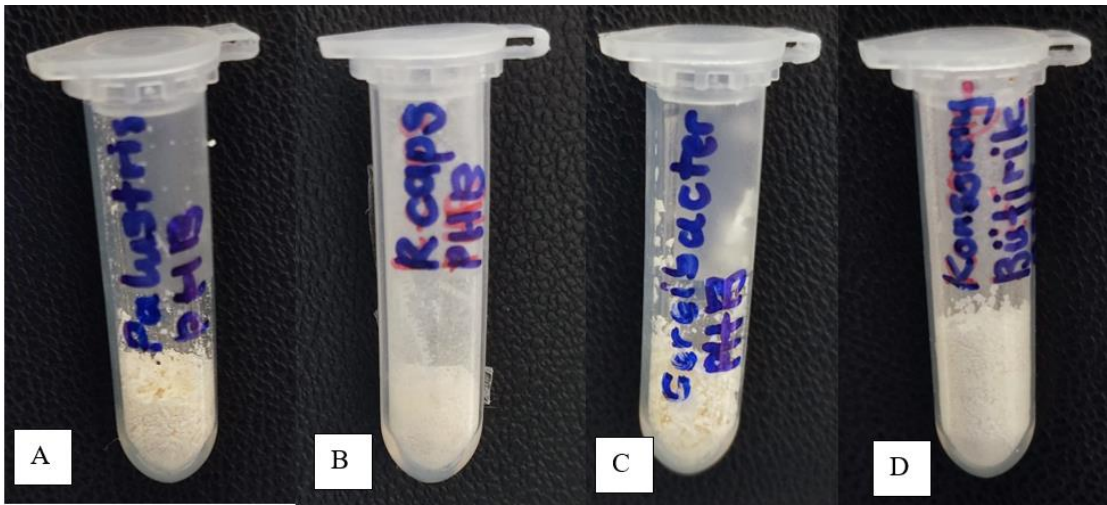


Şekil 4.18 Konsorsiyum bakteriler, floresan mikroskopunda görselleştirilen Nil Kırmızısı ile boyanmış PHB granüllerinin görüntüsü (63X)

Yukarıdaki şekillerde gösterildiği gibi, PHB üreten bakterilerin koyu kırmızı ile parlak sarı-altın rengi tespit edildi. Sonuçlara göre, fotosentetik mor kükürtsüz bakterilerin azot sınırlayıcı koşullar altında PHB biriktirebileceğini göstermektedir.

4.3 PHB Ekstraksiyonu

Fotosentetik bakteriler, besin sınırlayıcı koşullar ve fazla karbon kaynağı altında PHB biyopolimerini biriktirebilmektedir. Bu çalışmada besin sınırlayıcı (2mM azot) ve fazla karbon kaynağı (30mM bütirik asit) koşullarda PHB üretimi gerçekleştirilmiştir. Çözücüler yüksek ekstraksiyon verimliliğine sahip olduğundan, PHB çözücü ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Hücre kuru ağırlığı ölçüldü ve ekstrakte edilen PHB tartıldı ve daha sonra PHB verimi yüzdesi hesaplanmıştır. Şekil 4.19`da bakterilerden ekstrakte edilen saf PHB sergilemiştir.



Şekil 4.19 Bakterilerden ekstrakte edilen saf PHB (A) *Rhodospseudomonas palustris* (B) *Rhodobacter capsultus* (C) *Cereibacter sphaeroides* (D) Konsorsiyum

Ekstrakte edilen PHB ağırlıkları tartılmış ve farklı bakterilerden elde edilen PHB miktarı çizelge 4.1`de kaydedilmiştir.

Çizelge 4.1 Bütirik asit içeren bir ortamda yetiştirilen fotosentetik bakteriler tarafından üretilen hücre kuru ağırlığı, OD ve PHB içeriği

Bakteriler	Hücre kuru ağırlığı (CDW)g/L	PHB Miktar (g/L)	% PHB verimi (w/w)
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	1.8633	0.1330	7.14
<i>Cereibacter sphaeroides</i>	2.3637	0.1427	6.03
Konsorsiyum	2.7423	0.2208	8.05
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	1.4920	0.0875	5.86

Çizelge 4.1`de gösterildiği gibi, konsorsiyum en yüksek hücre kuru ağırlığına (2.7423g/L CDW) sahiptir, *Rhodospseudomonas palustris* (1.8633g/L CDW), *Cereibacter sphaeroides* (2.3637g/L CDW) ve en az hücre kuru ağırlığı *Rhodobacter capsulatus*'ta (1.4920g/L CDW) gözlenmiştir. *Rhodospseudomonas palustris*'ten ekstrakte edilen PHB

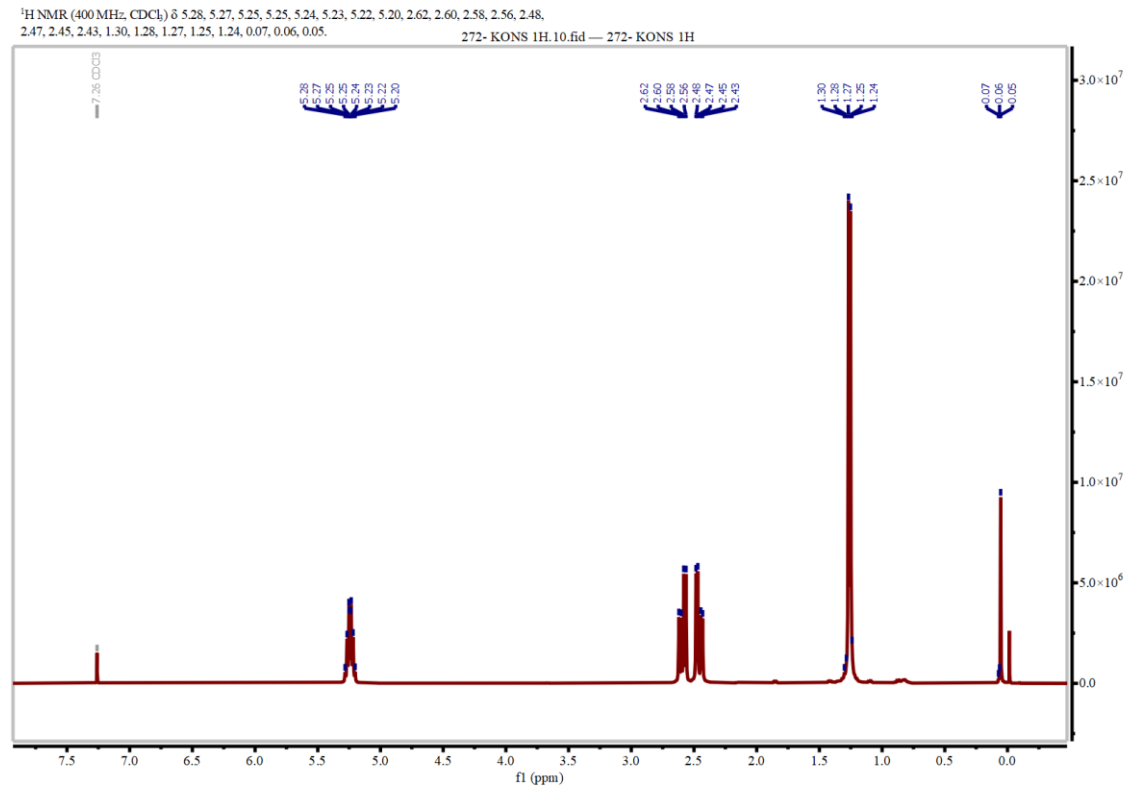
miktarı 0.1330g/L (%7.14 CDW), *Cereibacter sphaeroides* 0.1427g/L (% 6.03 CDW) ve *Rhodobacter capsulatus* 0.0875g/L (% 5.86 CDW) üretilmiştir. Bu çalışmada, en yüksek PHB miktarı 0.2208g/L (%8.05 CDW), 3 fotosentetik bakteriden oluşan bir konsorsiyumdan ekstrakte edildi. Bakteriler tarafından düşük PHB üretimini ele alma stratejilerinden biri mikrobiyal konsorsiyumların kullanılmasıdır (Duncker vd., 2021). Wei ve ark., önceki çalışmalarda, *P. putida* ve *S. cerevisiae*'nin bir konsorsiyum olarak olumlu etkileşimlere sahip olduğunu göstermiştir, *P. putida*, *S. cerevisiae*'nin oksotrofik suşunun hayatta kalması için ihtiyaç duyduğu besinleri sağlar (Wei vd., 2022), *S. cerevisiae*, *P. putida*'da mcl-PHA üretiminin metabolik yükünü azalttı. *P. putida*, oksotrofik *S. cerevisiae*'ye gerekli metiyonin, lösin ve histidin sağladı ve *S. cerevisiae*, sırayla, *P. putida*'ya ksiloz yerine tercih edilen laktik asit sağladı (Wei vd., 2022). Ayrıca, farklı bakteri popülasyonlarının metabolik bir yolda farklı adımlar attığı metabolik iş bölümü (DOL), bakterilerin aktivitesini artırıp biyokütlede bir artışa neden olabilmektedir (Wei vd., 2022). Konsorsiyum içinde bir bakteri türünün bütirat kullanarak oluşturduğu bir son ürün veya yan ürün konsorsiyumdaki bir başka bakteri için substrat olabilmektedir. Bu mekanizma metabolik iş bölümü (DOL) olarak da adlandırılmaktadır ve işbölümü, her bakterinin yükünü azaltabilir. Böylece substrat kullanım verimliliği (substrate conversion efficiency) ve ürün verimliliği (productivity) artmaktadır. Bhatia ve ark, karbon kaynağı kullanımını artırmak için bir mikrobiyal konsorsiyumu (*Bacillus subtilis* ve *C. necator*) kullanmıştır (Bhatia vd., 2018). Bir çalışmada, konsorsiyum tarafından üretilen PHA (295.7mg/L), fark önemli olmasa da, genellikle *P. putida* saf kültürden elde edilen PHA da miktar daha yüksekti (Wei vd., 2022).

Ketogulonicigenium vulgare ve *Bacillus megaterium* konsorsiyumu üzerinde yapılan araştırmaya göre sonuçlar, *B. megaterium*'un *K. vulgare*'nin üremesini başlatmaktan sorumlu olduğunu, bu arada *K. vulgare*'nin *B. megaterium*'un büyümesini destekleyebileceğini göstermiştir (Du vd., 2012). Her iki bakteri de birbirleri üzerinde olumlu etkiye sahiptir. *Bacillus megaterium*, *Ketogulonicigenium vulgare*'de trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü, nükleotid ve amino asit metabolizmasını destekledi (Du vd., 2012). Metabolitleri birbirleriyle değiştirerek iletişim kurabilmiştir. Bu çalışmada konsorsiyum, 3 farklı bakteri metabolik yolunun etkileşimi nedeniyle yüksek miktarda PHB üretebileceğini göstermiştir. Mikrobiyal konsorsiyumlar, bir ortamdaki metabolik etkileşimleri nedeniyle fermantasyonda büyük fırsatlar ve alternatifler sunmuşlardır.

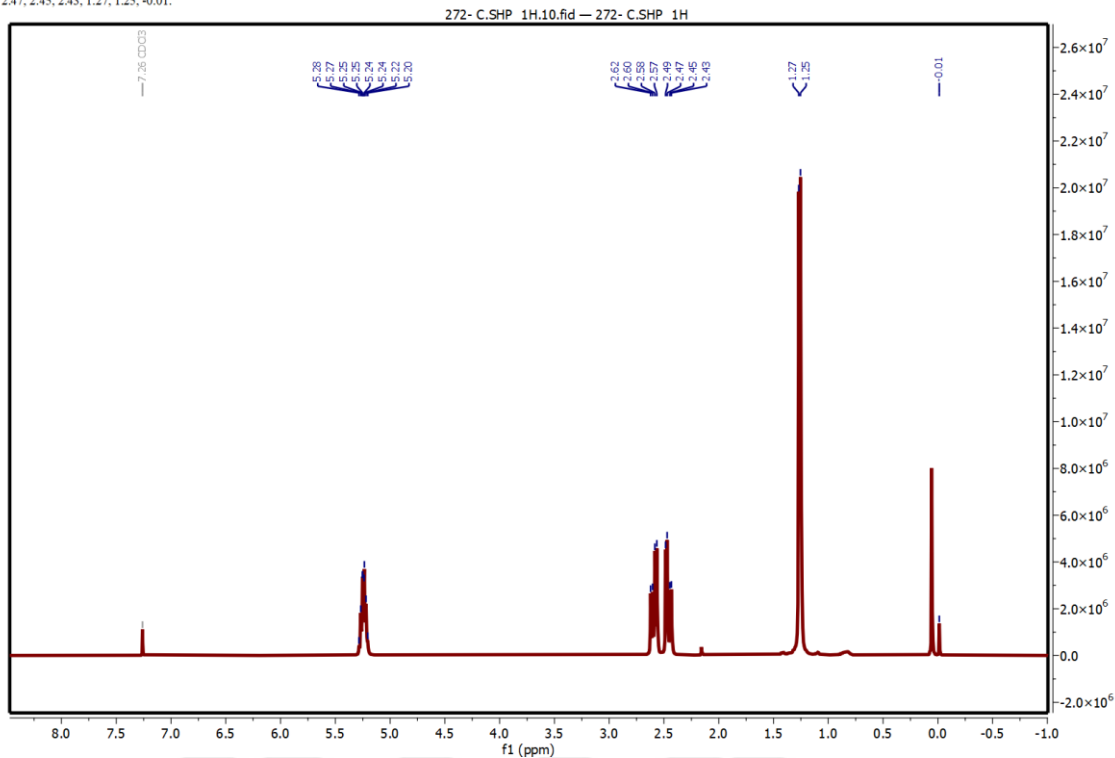
4.4. Bakterilerden Ekstrakte Edilen PHB'nin Karakterizasyonu

4.4.1 Nükleer Manyetik Resonans (NMR) analizi

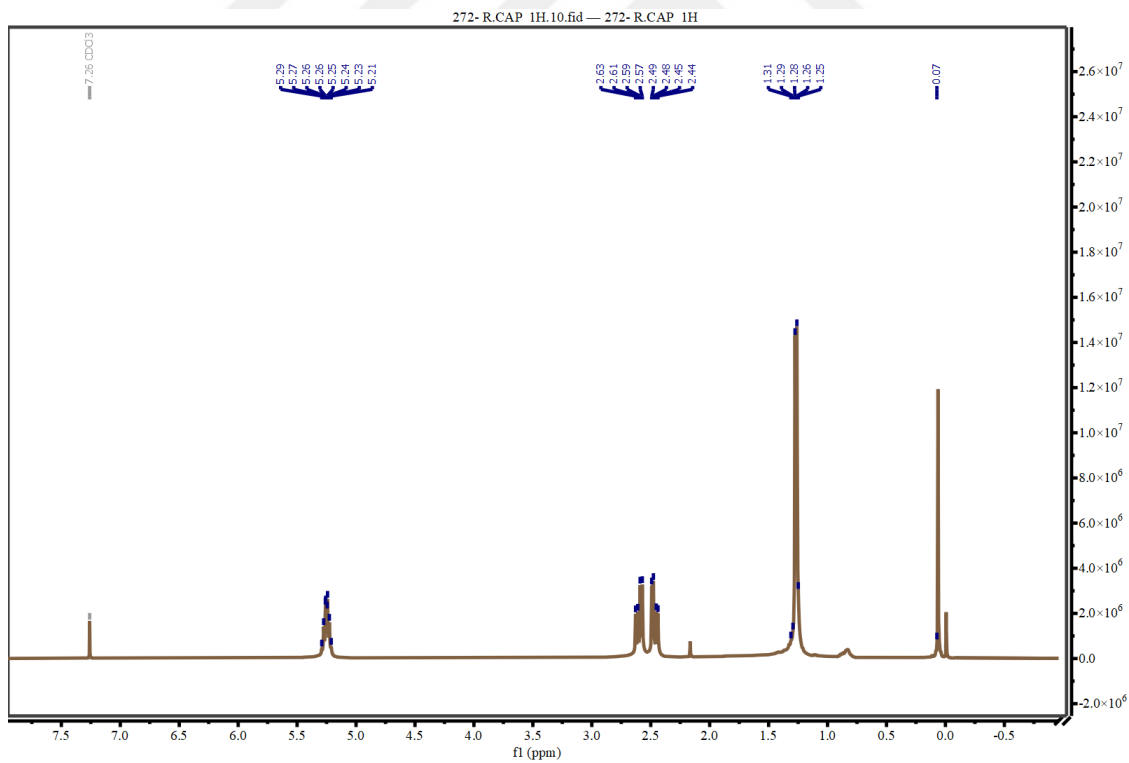
Bakterilerden ekstrakte edilen PHB, NMR spektroskopisi kullanılarak analiz edildi. Şekil 4.20, 4.21, 4.22, 4.23 ve 4.24'te gösterildiği gibi, NMR analizi, bakteriler tarafından üretilen polimerin polihidroksibutirat (PHB) olduğunu göstermiştir. Gözlenen ekstrakte edilmiş PHB pikleri standartla aynıdır, ayrıca ekstrakte edilen PHB'nin saf olduğunu ve kontaminasyon olmadığını doğrular.



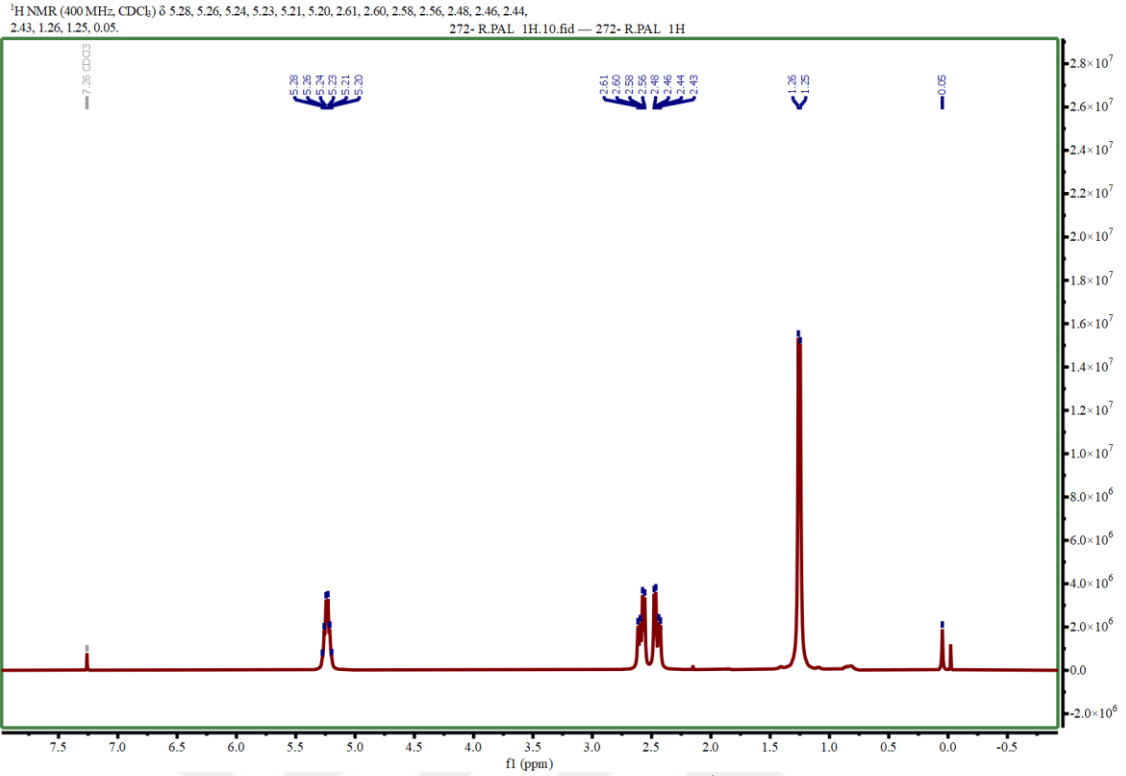
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.28, 5.27, 5.25, 5.25, 5.24, 5.24, 5.22, 5.20, 2.62, 2.60, 2.58, 2.57, 2.49, 2.47, 2.45, 2.43, 1.27, 1.25, -0.01.



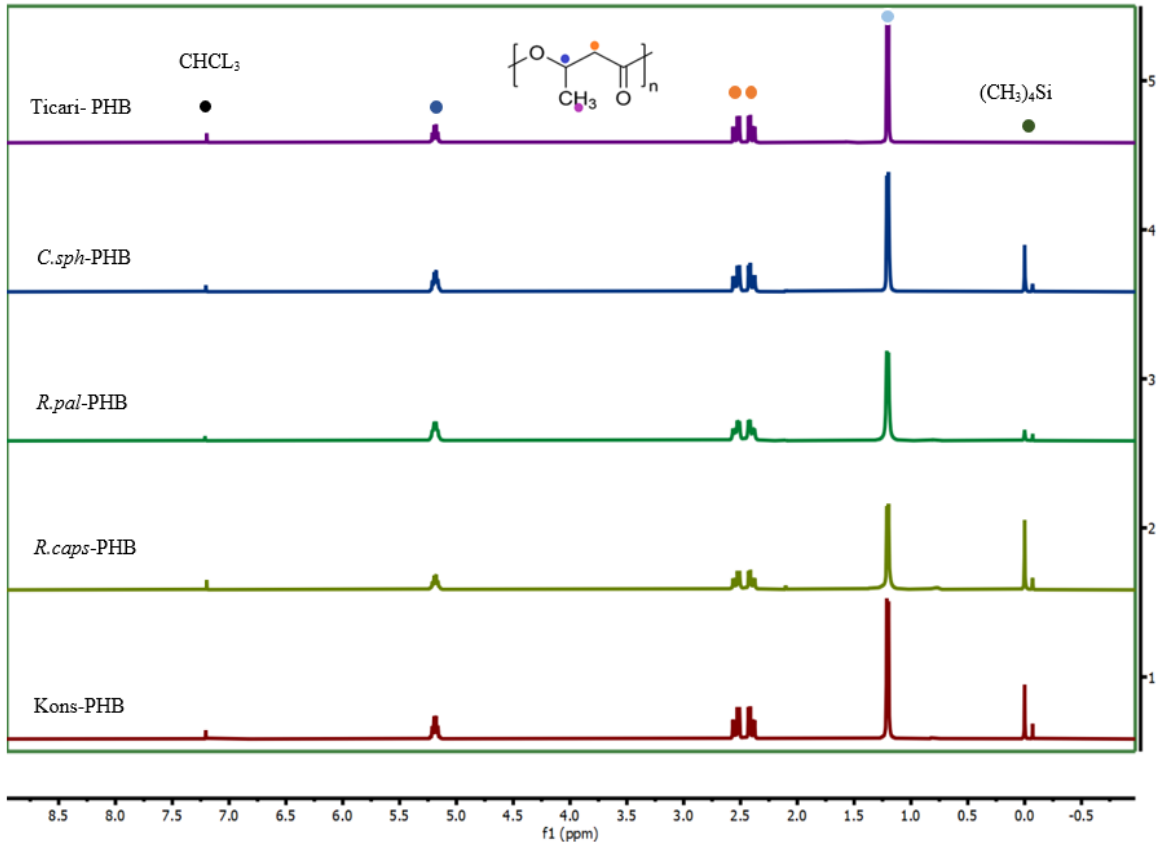
Şekil 4.21 *Cerebacter sphaeroides*'un ^1H NMR spektrumu



Şekil 4.22 *Rhodobacter capsulatus*'un ^1H NMR spektrumu



Şekil 4.23 *Rhodospseudomonas palustris*'un ¹H NMR spektrumu



Şekil 4.24 Standart ticari PHB ve ekstrakte edilmiş PHB NMR spektrumunun karşılaştırılması

Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi, NMR zirveleri önceki çalışmalarla tutarlıdır. Bu çalışmada, 1.20-1.31ppm arasındaki tepe, metil grubunun (-CH₃) varlığını ve 2.43-

2.63ppm arasındaki tepe, metilen grubunun (-CH₂) varlığını gösterdi. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Martínez-Herrera vd., (2020) yaptığı araştırmalarla desteklenmektedir. Çizelge 4.2`de gösterdiği gibi, 7.26 ppm'deki NMR zirvesi çözücü (CD₃Cl) temsil eder ve 0.0 ppm'deki zirveler dahili standardı (CH₃)₄Si'yi temsil eder.

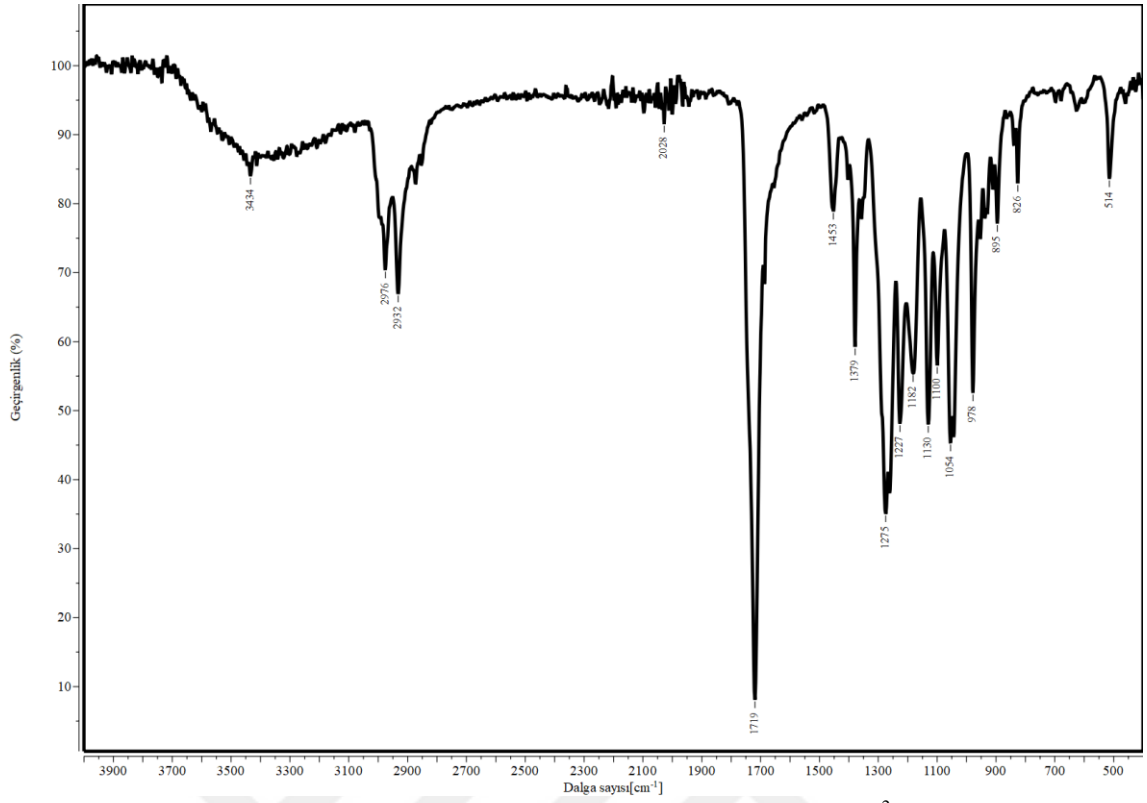
Çizelge 4.2 Bu çalışmada, bakteriden ekstrakte edilen ¹H NMR zirveleri (ppm) ve karşılık gelen PHB yapısı grubu

PHB yapısal grubu	¹ H NMR pikler (ppm)
CH ₃	1.20-1.31
CH ₂	2.43-2.63
CH	5.20-5.28
C=O	-----

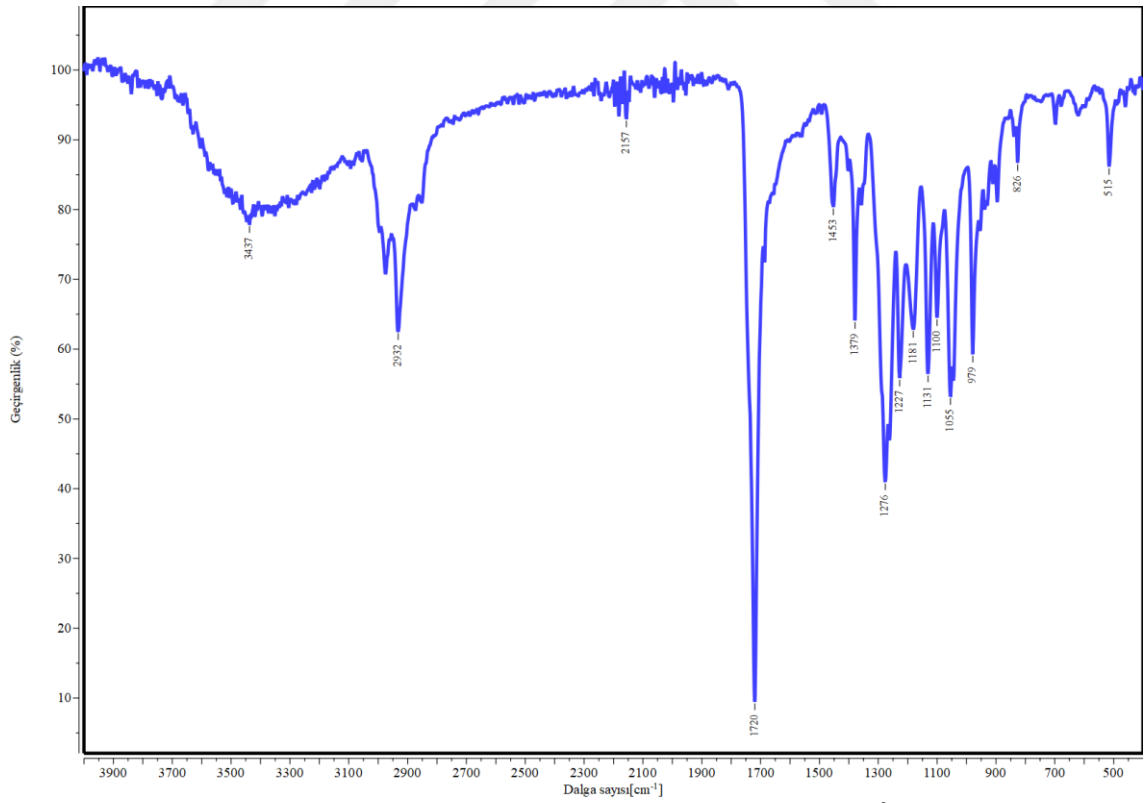
Karşılık gelen fonksiyonel grubu tanımlamak için bir referans tablosu kullanıldı ([https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(Wade\)_Complete_and_Semesters_I_and_II/Map%3A_Organic_Chemistry_\(Wade\)/12%3A_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/12.05%3A_Functional_Groups_and_Chemical_Shifts_in_H_NMR_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Wade)_Complete_and_Semesters_I_and_II/Map%3A_Organic_Chemistry_(Wade)/12%3A_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/12.05%3A_Functional_Groups_and_Chemical_Shifts_in_H_NMR_Spectroscopy)). Çizelge 4.2`de elde edilen 3 spektrum, Abd-El-Haleem ve arkadaşları tarafından bildirilen ¹H NMR spektrumu ile aynıydı (Devi vd., 2015). Ayrıca, *Bacillus cereus*'tan ekstrakte edilen PHB'in sinyal tepe noktaları 1.27, 2.35–2.71, 1.5–1.70, 5.21–5.30'a kadar gözlemlenmiştir (Devi vd., 2015). *Pseudomonas plecoglossicida* kullanılarak yapılan bir araştırmada NMR zirveleri 1.267 ppm'de gözlemlendi, bu tepe, metil (CH₃) grubuna karşılık gelir (Sabarinathan vd., 2018).

4.4.2 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) analizi

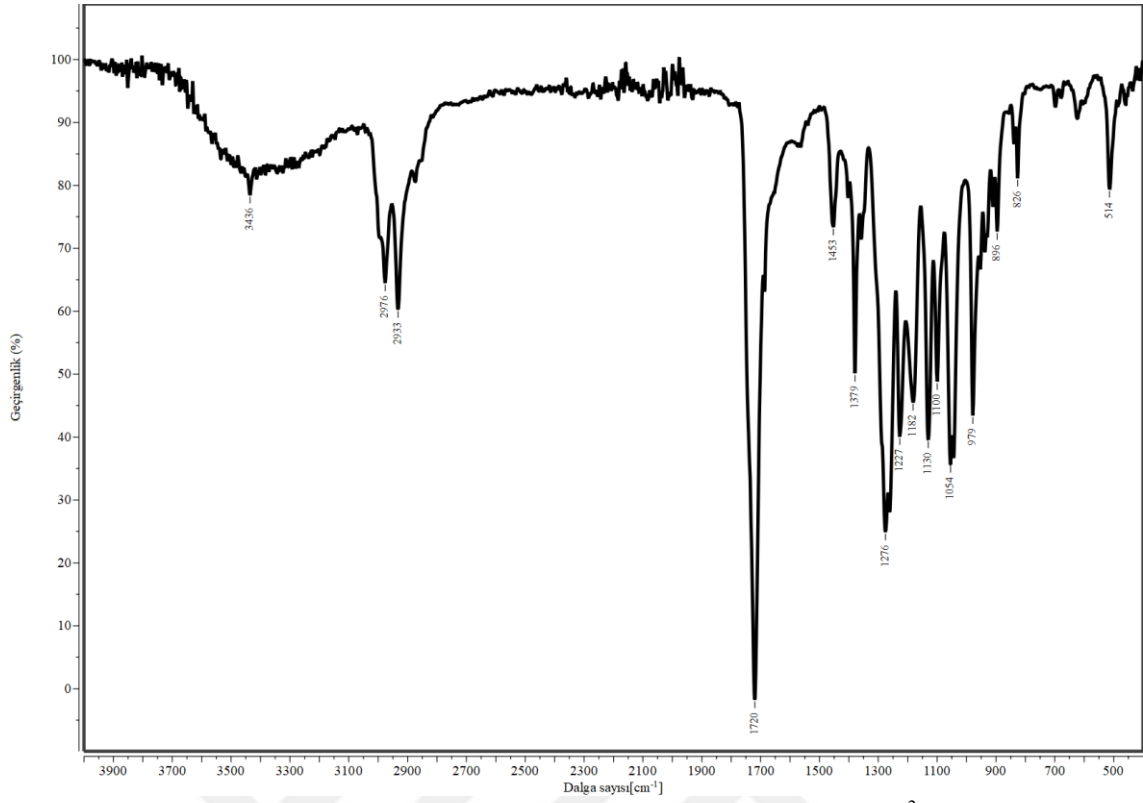
Bakterilerden ekstrakte edilen PHB polimeri, fonksiyonel gruplarını FT-IR ile tanımlamak için analiz edildi. Polihidroksibütirat fonksiyonel gruplar, farklı pik noktalarına karşılık gelen dalga boyu ile karşılaştırılarak tanımlandı. FT-IR pik dalga boyu sonuçları şekil 4.25, 4.26, 4.27, 4.28 ve 4.29'de gösterilmiştir. Ticari standart ve bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin FTIR spektrumu 3900 ile 500 cm⁻¹ arasında gözlemlenmiştir.



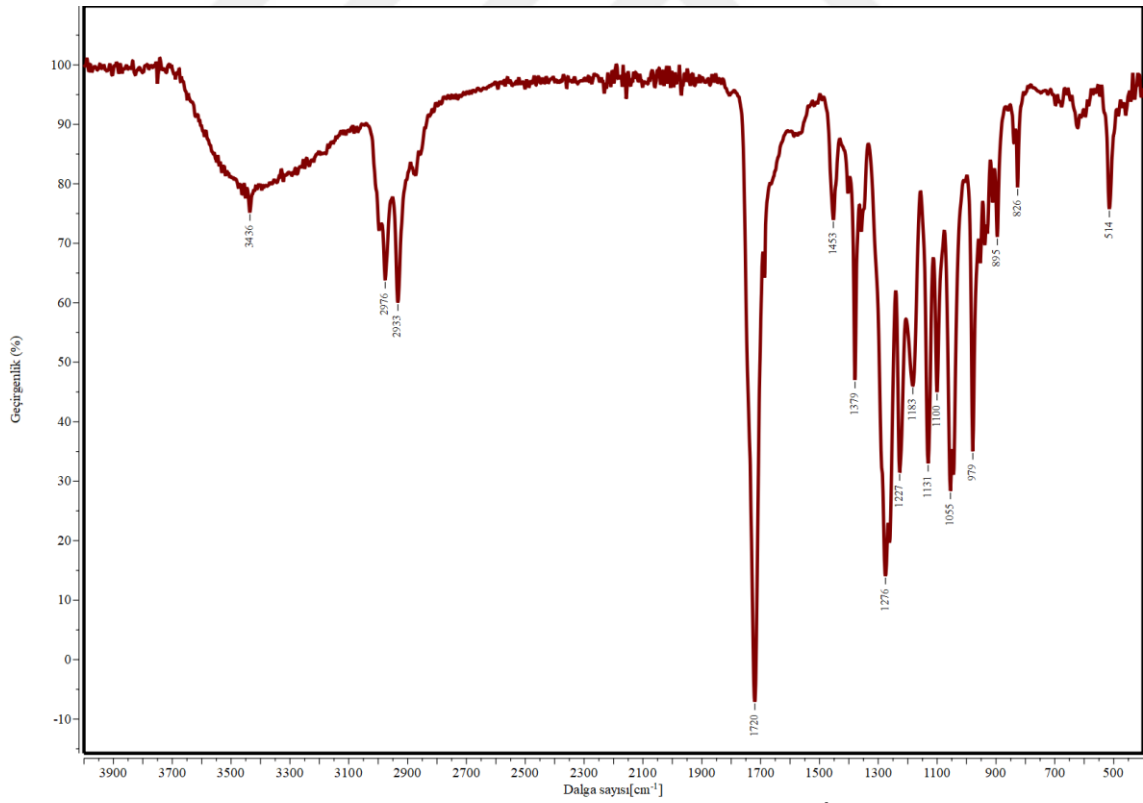
Şekil 4.25 *Cereibacter sphaeroides* FTIR dalga sayısı (cm⁻²)



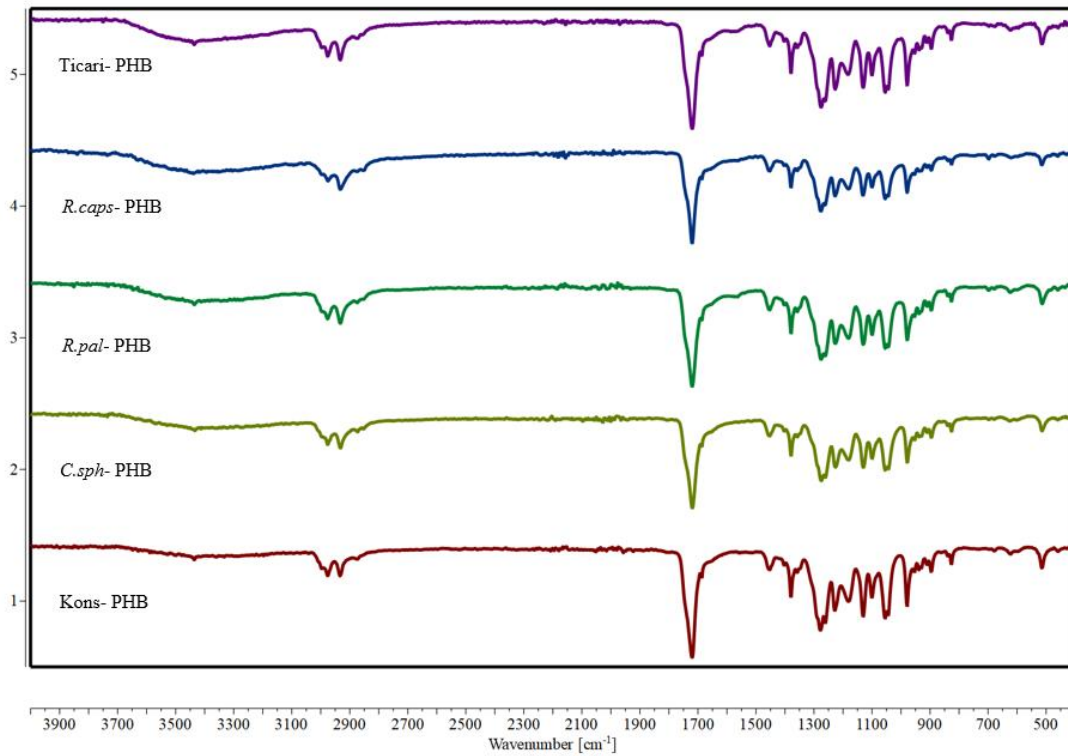
Şekil 4.26 *Rhodobacter capsulatus* FTIR dalga sayısı (cm⁻²)



Şekil 4.27 *Rhodospseudomonas palustris* FTIR dalga sayısı (cm⁻²)



Şekil 4.28 Konsorsiyum FTIR dalga sayısı (cm⁻²)



Şekil. 4.29 Ticari-Standart PHB ve ekstrakte edilmiş PHB FTIR dalga sayısı (cm^{-2}) karşılaştırması

Analizden elde edilen FTIR spektrumlarına karşılık gelen fonksiyonel PHB grupları bir referans tablosu kullanılarak tespit edildi ve doğrulanmıştır

(https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table erişim tarihi 8-6-2024). FTIR dalga boyuna karşılık gelen fonksiyonel PHB grupları çizelge 4.3'de gösterilmektedir.

Çizelge. 4.3 Bakterilerden ekstrakte edilen PHB'nin fonksiyonel grupları ve FTIR dalga sayısı (cm^{-1})

Fonksiyonel grup	FTIR pik dalga sayısı (cm^{-1})
CH ₃	1379
CH ₂	1453
C-H	2976-2932
C=O	1720-1719
C-O	1278-1275
O-H	3436

PHB'nin FTIR spektrumu, ekstrakte edilen molekülün polihidroksibutirat olduğunu gösteren çeşitli fonksiyonel grup pikleri gösterir. FTIR kullanılarak analiz edilen polimer, PHB'nin karakteristik bir C=O pikleri (ana fonksiyonel gruplar) gösterecek ve böylece ekstrakte edilen polimerin PHB olduğunu doğrulayacaktır (Thapa vd., 2018). Çizelge 4.3'de, 2976-2932 cm^{-2} 'deki absorpsiyon, CH grubunun varlığını gösterirken,

1720-1719 cm^{-2} 'deki dalga boyu zirvesi (pik), bir C=O fonksiyonel grubunun varlığını gösterdi. FTIR analizinde C=O ve CH tepe noktalarının varlığı PHB onayı ve belirteci olarak etiketlenmiştir (Thapa vd., 2018). Çizelge 4.3 ve Şekil 4.29`e göre, 1453 cm^{-2} 'deki absorpsiyon spektrumu, bir CH₂ fonksiyonel grubunun varlığını gösterirken, 1379 cm^{-2} 'deki dalga boyu spektrumu, CH₃ fonksiyonel grubu varlığını doğruladı ve 1278-1275 cm^{-2} 'deki absorpsiyon spektrumu ile C-O fonksiyonel grubunun varlığı tespit edildi ve O-H fonksiyonel grubu için ise spektrum 3437-3436 cm^{-2} 'dir (Şekil 4.25-28). Mekala ve Suganya, benzer bir PHB absorpsiyon spektrumu bildirmiştir (Mekala & Suganya, 2018). Bu çalışmadan elde edilen FTIR sonuçları ve (Trakunjae vd., 2021) tarafından bildirilen sonuçlarla aynıydı.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Fotosentetik mor kükürtsüz bakteriler, çeşitli metabolik yollara sahip mikroorganizmalardır, bu yollar, bir ortamda sağlanan çevresel büyüme durumuna bağlı olarak aktive edilir. Besin sınırlayıcı faktör altında mor kükürtsüz bakteriler polihidroksibütirat üretir. *Cereibacter sphaeroides*, *Rhodobcater capsulatus*, *Rhodospseudomonas palustris* ve konsorsiyum, ışık ve floresan mikroskobu altında bakıldığında PHB üretme yeteneğini göstermiştir. Benzer araştırmalarda bakterilere ve karbon kaynağına bağlı olarak farklı PHB miktarları bildirmektedir. Uçucu yağ asitleri (VFA) gibi atık suların karanlık fermantasyonu sırasında açığa çıkan çözünür asit bakımından zengin atık ürünler bakteriler tarafından kullanılır ve hücre içi PHB birikir. Bu çalışmada karbon kaynağı olarak bütirik asit (30mM), besin sınırlamasında azot kaynağı olarak NH₄CL (2mM) kullanılmıştır.

Karışık bakteri kültürlerine kıyasla saf tekli *C. sphaeroides* AV1b kültürlerinden daha yüksek PHB verimleri elde edilmiştir (Luongo vd., 2017). Bununla birlikte, karışık kültürlerin kullanılması, karanlık fermantasyon atıklarının arıtılmasında umut vericidir. Konsorsiyum, daha yüksek bir kimyasal oksijen talebi (COD) giderme verimliliği sağlar ve biyoremediasyon süreçlerine yardımcı olur. Şu anda araştırmacılar, bir büyüme ortamı elde etmek için gıda ve tarım atık akışlarını kullanmaya odaklanmıştır (Yousuf vd., 2018). Genellikle bu fotosentetik bakteriler, bütirik asit gibi uçucu yağ asitleri kullanabilir ve ekstra karbonu polihidroksibütirata dönüştürebilir. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek optik yoğunluk (3.18 ± 0.03) *C. sphaeroides*'te gözlenmiştir. Bu, bu bakterinin karbon kaynağı olarak bütirik asidi *R. capsulatus*, konsorsiyum ve *R. palustris*'e kıyasla kullanabileceğini göstermektedir.

Gözlenen optik yoğunluklar 2.97 ± 0.03 (*R. capsulatus*), 2.94 ± 0.07 (*R. palustris*) ve 2.65 ± 0.04 (konsorsiyum) şeklindedir. Ayrıca, konsorsiyum'da daha yüksek bir hücre kuru ağırlığı (2.7423g/L) gözlemlendi. Bu çalışmada, en yüksek PHB miktarı (0.2208g/L), 3 fotosentetik bakteriden oluşan bir konsorsiyumdan ekstrakte edildi. Bu, PHB miktar ile hücre kuru ağırlığı arasında bir korelasyon olduğunu gösterir. Bu çalışmadaki sonuçlar, Sawant ve arkadaşları tarafından yapılan önceki bir çalışma ile tutarlıdır (Wei vd., 2022). Bir konsorsiyumdaki literatüre göre, farklı bakteriler arasında iş bölümü nedeniyle artan fermantasyon aktivitesi vardır. Mikrobiyal konsorsiyumlar, çoklu ve simbiyotik

mikrobiyal popülasyonlara sahip topluluklardır. Mikrobiyal konsorsiyum, substrat kullanımının kapsamını genişleterek tek bir bakterinin düşük dönüşüm verimliliği sorunlarını çözebilmektedir (Zhu vd., 2022). Karışık mikrobiyal konsorsiyumların PHA birikimi için umut verici olduğu kanıtlanmıştır (Zhou, 2023). Konsorsiyum kullanımı avantajlıdır. PHA sentezi için karma mikrobiyal konsorsiyum (MMC'ler) kullanılır, çünkü sterilite gereksinimleri daha azdır ve tek saf kültürlerle göre biyo-rafineri ve atık su arıtma işlemlerine entegre edilmesi daha kolaydır (Huang vd., 2017; Policastro vd., 2021; Basset vd., 2016). Wei ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, *P. putida* F1, *P. putida* mt-2 ve *P. Putida* CA-3 birlikte yetiştirildi ve konsorsiyum, herhangi bir suya kıyasla 250mg/L PHA üretilmiştir (Wei vd., 2022). İncelenen konsorsiyumlarda bir arada bulunan çeşitli bakteri türlerinin substrat kullanımını iyileştirdiği bulunmuştur (Policastro vd., 2020).

R. capsulatus'ta en az PHB miktarı (0.0875g/L) gözlemlendi, ayrıca bu bakteri türünde düşük hücre kuru ağırlığı (1.4920g/L) gözlemlendi. Bu, düşük hücre kuru ağırlığının düşük miktarda PHB ile sonuçlandığı anlamına gelir. Ancak en yüksek pH (9.93±0.01) *R. capsulatus*'ta gözlemlendi. Literatüre göre daha yüksek pH, bakteri üremesini etkiler ve düşük hücre kuru ağırlığına ve dolayısıyla bakteriler tarafından üretilen düşük PHB'ye yol açar (Adnan vd., 2022). Rehman ve Aftab, (2016) pH, metabolit üretiminde, mikroorganizma büyümesinde ve PHB sentezinde çok önemli bir rol oynar.

Bakteri ekstrakte edilen PHB'nin karakterizasyonu NMR ve FTIR teknikleri kullanılarak yapıldı, kontrol ve standart referans olarak ticari PHB kullanıldı. Bakterilerden ekstrakte edilen PHB ile standart arasında fark gözlemlenmedi. Sonuç olarak, biyoplastik üretimi için bakteri kullanımı yeşil dünyada yeni bir alternatif yoldur. Ayrıca, biyopolimerlerin tıp alanında üretimi ve kullanımı, petrol bazlı plastikler yerine umut verici bir çözümdür. Konsorsiyum kullanımı, fotosentetik bakterilerden büyük miktarda PHB elde etmenin umut verici bir yoludur. Bununla birlikte, farklı bakteriler tarafından üretilebilecek biyopolimer miktarını artırmanın yolları hakkında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

5.2 Öneriler

- Karbon kaynağı olarak atık su kullanarak rekombinant suşlarla daha verimli PHB üretim prosesleri geliştirilebilir.
- PHB'ın ekstraksiyonu için zararlı çözücülerin kullanılmadığı ekstraksiyon yöntemleri tercih edilebilir.
- Karbon kaynağı olarak karbondioksit gazı, karışık organik asitler veya syngas kullanılabilir.
- Düşük maliyetle yüksek miktarda PHB üreten transgenik bitkilerin, rekombinant bakterilerin, alglerin ve ekstremofil organizmaların kullanımı verimliliği artırabilir.
- Bir konsorsiyum da PHB üreten ve PHB üretmeyen bakterilerin kullanımı ile verim artırılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Acharjee, S. A., Bharali, P., Gogoi, B., Sorhie, V., Walling, B., & Alemtoshi. (2023). PHA-Based Bioplastic: A Potential Alternative to Address Microplastic Pollution. *Çinde Water, Air, and Soil Pollution (C. 234, Sayı 1)*. *Institute for Ionics*. <https://doi.org/10.1007/s11270-022-06029-2>
- Adnan, M., Siddiqui, A. J., Ashraf, S. A., Snoussi, M., Badraoui, R., Alreshidi, M., Elaslali, A. M., Al-Soud, W. A., Alharethi, S. H., Sachidanandan, M., & Patel, M. (2022). Polyhydroxybutyrate (PHB)-Based Biodegradable Polymer from *Agromyces indicus*: Enhanced Production, Characterization, and Optimization. *Polymers*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/polym14193982>
- Agnihotri, S., Yin, D. M., Mahboubi, A., Sapmaz, T., Varjani, S., Qiao, W., Koseoglu-Imer, D. Y., & Taherzadeh, M. J. (2022). A Glimpse of the World of Volatile Fatty Acids Production and Application: A review. *Çinde Bioengineered (C. 13, Sayı 1, ss. 1249-1275)*. *Taylor and Francis Ltd*. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1996044>
- Albureikan, M. O. (2019). Classical and Molecular Detection of Polyhydroxybutyrate-Producing Bacteria obtained from Different Habitats. *Journal of American Science*, 15(3). <https://doi.org/10.7537/marsjas150319.01>
- Alshehrei, F. (2019). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by bacteria isolated from soil of Saudi Arabia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(2), 897-904. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.2.26>
- Al-Shok, L., Town, J. S., Coursari, D., Wilson, P., & Haddleton, D. M. (2023). Post-polymerisation modification of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) using thiol-ene and phosphine addition. *Polymer Chemistry*, 14(22), 2734-2741. <https://doi.org/10.1039/d3py00272a>
- Alsiyabi, A., Brown, B., Immethun, C., Long, D., Wilkins, M., & Saha, R. (2021). Synergistic experimental and computational approach identifies novel strategies for polyhydroxybutyrate overproduction. *Metabolic Engineering*, 68, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2021.08.008>
- Amelia, T. S. M., Govindasamy, S., Tamothran, A. M., Vigneswari, S., & Bhubalan, K. (2019). Applications of PHA in agriculture. *Çinde Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates (ss. 347-361)*. *Springer Singapore*. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8_13
- Angra, V., Sehgal, R., & Gupta, R. (2023). Trends in PHA Production by Microbially Diverse and Functionally Distinct Communities. *Çinde Microbial Ecology (C. 85, Sayı 2, ss. 572-585)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-01995-w>
- Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168>

- Arikawa, H., Sato, S., Fujiki, T., & Matsumoto, K. (2017). Simple and rapid method for isolation and quantitation of polyhydroxyalkanoate by SDS-sonication treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(2), 250-254. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.03.003>
- Aristya, G. R., Lin, Y. J., Chang, J. S., Chang, J. J., & Yen, H. W. (2022). Polyhydroxybutyrate (PHB) production from crude glycerol by genetic engineering of *Rhodotorula glutinis*. *Bioresource Technology Reports*, 18. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101048>
- Arora, Y., Sharma, S., & Sharma, V. (2023). Microalgae in Bioplastic Production: A Comprehensive Review. *Içinde Arabian Journal for Science and Engineering (C)*, 48, Sayı 6, ss. 7225-7241). Institute for Ionics. <https://doi.org/10.1007/s13369-023-07871-0>
- Aryaraj, D., & Pramitha, V. S. (2021). Extraction and Characterization of Polyhydroxybutyrate (PHB) From *Bacillus flexus* MHO57386.1 Isolated From Marine Sponge *Oceanopia arenosa* (Rao, 1941). *Marine Science and Technology Bulletin*, 10(2), 170-185. <https://doi.org/10.33714/masteb.829737>
- Asif, A., Mohsin, H., & Rehman, Y. (2021). Purple nonsulfur bacteria: An important versatile tool in biotechnology. *Içinde Recent Advancement in Microbial Biotechnology: Agricultural and Industrial Approach*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822098-6.00003-3>
- Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly β hydroxybutyrate from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Içinde Algal Research (C)*, 2, Sayı 3, ss. 278-285). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.002>
- Balakrishna Pillai, A., Jaya Kumar, A., & Kumarapillai, H. (2018). Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* and EDTA–microwave-assisted cell lysis for polymer recovery. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0672-6>
- Balakrishna Pillai, A., Jaya Kumar, A., Thulasi, K., & Kumarapillai, H. (2017). Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 451-460. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.005>
- Basset, N., Katsou, E., Frison, N., Malamis, S., Dosta, J., & Fatone, F. (2016). Integrating the selection of PHA storing biomass and nitrogen removal via nitrite in the main wastewater treatment line. *Bioresource Technology*, 200, 820-829. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.063>
- 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., & 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>
- Bhola, S., Arora, K., Kulshrestha, S., Mehariya, S., Bhatia, R. K., Kaur, P., & Kumar, P. (2021). Established and Emerging Producers of PHA: Redefining the Possibility. İçinde *Applied Biochemistry and Biotechnology* (C. 193, Sayı 11, ss. 3812-3854). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03626-5>
- Bonartsev, A. P., Voinova, V. V., Volkov, A. V., Muraev, A. A., Boyko, E. M., Venediktov, A. A., Didenko, N. N., & Dolgalev, A. A. (2022). Scaffolds Based on Poly(3-Hydroxybutyrate) and Its Copolymers for Bone Tissue Engineering (Review). *Sovremennyye Tehnologii v Medicine*, 14(5), 78-91. <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.5.07>
- Bondi, C. A. M., Marks, J. L., Wroblewski, L. B., Raatikainen, H. S., Lenox, S. R., & Gebhardt, K. E. (2015). Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products. İçinde *Environmental Health Insights* (C. 9). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.4137/EHI.S31765>
- Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules have no phospholipids. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep26612>
- Brown, B., Immethun, C., Alsiyabi, A., Long, D., Wilkins, M., & Saha, R. (2022). Heterologous phasin expression in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 for bioplastic production from lignocellulosic biomass. *Metabolic Engineering Communications*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2021.e00191>
- Brown, B., Wilkins, M., & Saha, R. (2022). *Rhodopseudomonas palustris*: A biotechnology chassis. İçinde *Biotechnology Advances* (C. 60). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108001>
- Cabecas Segura, P., De Meur, Q., Alloul, A., Tanghe, A., Onderwater, R., Vlaeminck, S. E., Wouwer, A. Vande, Wattiez, R., Dewasme, L., & Leroy, B. (2022). Preferential photoassimilation of volatile fatty acids by purple non-sulfur bacteria: Experimental kinetics and dynamic modelling. *Biochemical Engineering Journal*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108547>
- Calleja, S. (2020). State of the art in the purification of PHB's from biomass and new harmless extraction methods. Technische Universität Berlin, Masters Thesis, 1-66.
- Carlozzi, P., Giovannelli, A., Traversi, M. L., Touloupakis, E., & Di Lorenzo, T. (2019). Poly-3-hydroxybutyrate and H₂ production by *Rhodopseudomonas sp.S16-VOGS3* grown in a new generation photobioreactor under single or combined nutrient deficiency. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 821-828. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.220>

- Carpine, R., Olivieri, G., Hellingwerf, K., Pollio, A., & Marzocchella, A. (2015). The cyanobacterial route to produce poly- β -hydroxybutyrate. *Chemical Engineering Transactions*, 43. <https://doi.org/10.3303/CET1543049>
- Carvalho, M., Hilliou, L., Oliveira, C. S. S., Guarda, E. C., & Reis, M. A. M. (2022). Polyhydroxyalkanoates from industrial cheese whey: Production and characterization of polymers with differing hydroxyvalerate content. *Current Research in Biotechnology*, 4, 211-220. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.03.004>
- Chek, M. F., Hiroe, A., Hakoshima, T., Sudesh, K., & Taguchi, S. (2019). PHA synthase (*PhaC*): Interpreting the functions of bioplastic-producing enzyme from a structural perspective. *Çinde Applied Microbiology and Biotechnology* (C. 103, Sayı 3, ss. 1131-1141). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9538-8>
- Cheng, J., Ding, L., Xia, A., Lin, R., Li, Y., Zhou, J., & Cen, K. (2015). Hydrogen production using amino acids obtained by protein degradation in waste biomass by combined dark- and photo-fermentation. *Bioresource Technology*, 179, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.109>
- Chen, G. Q., & Zhang, J. (2018). Microbial polyhydroxyalkanoates as medical implant biomaterials. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(1), 1-18. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1371185>
- Chernozem, R. V., Pariy, I. O., Pryadko, A., Bonartsev, A. P., Voinova, V. V., Zhuikov, V. A., Makhina, T. K., Bonartseva, G. A., Shaitan, K. V., Shvartsman, V. V., Lupascu, D. C., Romanyuk, K. N., Kholkin, A. L., Surmenev, R. A., & Surmeneva, M. A. (2022). A comprehensive study of the structure and piezoelectric response of biodegradable polyhydroxybutyrate-based films for tissue engineering applications. *Polymer Journal*, 54(10), 1225-1236. <https://doi.org/10.1038/s41428-022-00662-8>
- Chernozem, R. V., Surmeneva, M. A., Shkarina, S. N., Loza, K., Epple, M., Ulbricht, M., Cecilia, A., Krause, B., Baumbach, T., Abalymov, A. A., Parakhonskiy, B. V., Skirtach, A. G., & Surmenev, R. A. (2019). Piezoelectric 3-D Fibrous Poly(3-hydroxybutyrate)-Based Scaffolds Ultrasound-Mineralized with Calcium Carbonate for Bone Tissue Engineering: Inorganic Phase Formation, Osteoblast Cell Adhesion, and Proliferation. *ACS Applied Materials and Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b04936>
- Choonut, A., Paichid, N., Yunu, T., & Sangkharak, K. (2016). World Congress on Sustainable Technologies (WCST-2016), The Production of Polyhydroxybutyrate from Liquid Stillage and Its Application. *World congress on Sustainable Technology*, 36-39. [https://doi.org/978-1-908320-70/4/\\$31.00](https://doi.org/978-1-908320-70/4/$31.00)
- Coats, E. R., Watson, B. S., & Brinkman, C. K. (2016). Polyhydroxyalkanoate synthesis by mixed microbial consortia cultured on fermented dairy manure: Effect of aeration on process rates/yields and the associated microbial ecology. *Water Research*, 106, 26-40. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.09.039>

- Colombo, B., Favini, F., Scaglia, B., Sciarria, T. P., D'Imporzano, G., Pognani, M., Alekseeva, A., Eisele, G., Cosentino, C., & Adani, F. (2017). Enhanced polyhydroxyalkanoate (PHA) production from the organic fraction of municipal solid waste by using mixed microbial culture. *Biotechnology for Biofuels*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0888-8>
- Costa, S., Ganzerli, S., Rugiero, I., Pellizzari, S., Pedrini, P., & Tamburini, E. (2017). Potential of *Rhodobacter capsulatus* grown in anaerobic-light or aerobic-dark conditions as bioremediation agent for biological wastewater treatments. *Water (Switzerland)*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/w9020108>
- Darshan, M., & Nishith, D. (2014). Recovery and characterization of poly(3-Hydroxybutyric acid) synthesized in *Staphylococcus epidermidis*. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8(6), 319-329. <https://doi.org/10.5897/ajest2014.1645>
- Davenport, E. J., & Bose, A. (2022). Taxonomic Re-Evaluation and Genomic Comparison of Novel Extracellular Electron 2. *www.preprints.org*, 1-38. <https://doi.org/10.20944/preprints202205.0070.v1>
- De-Sousa Junior, R. R., dos Santos, C. A. S., Ito, N. M., Suqueira, A. N., Lackner, M., & dos Santos, D. J. (2022). PHB Processability and Property Improvement with Linear-Chain Polyester Oligomers Used as Plasticizers. *Polymers*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/polym14194197>
- Devi, B., Nachiyar, C. V., Kaviyarasi, T., & Samrot, A. V. (2015). Characterization of polyhydroxybutyrate synthesized by *Bacillus cereus*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*, 7(3), 140-144. *International journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*,
- Dietrich, K., Dumont, M. J., Del Rio, L. F., & Orsat, V. (2017). Producing PHAs in the bioeconomy — Towards a sustainable bioplastic. *Sustainable Production and Consumption*, 9, 58-70. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2016.09.001>
- Dos-Santos, A. J., Oliveira Dalla Valentina, L. V., Hidalgo Schulz, A. A., & Tomaz Duarte, M. A. (2017). From Obtaining to Degradation of PHB:Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia*, 13(26), 269-298. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.13.26.10>
- Dos-Santos, A. J., Oliveira Dalla Valentina, L. V., Hidalgo Schulz, A. A., & Tomaz Duarte, M. A. (2018). From obtaining to degradation of PHB: A literature review. Part II. *Ingeniería y Ciencia*, 14(27), 207-228. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.14.27.9>
- Du, J., Zhou, J., Xue, J., Song, H., & Yuan, Y. (2012). Metabolomic profiling elucidates community dynamics of the *Ketogulonigenium vulgare*-*Bacillus megaterium* consortium. *Metabolomics*, 8(5), 960-973. <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0392-2>

- Duncker, K. E., Holmes, Z. A., & You, L. (2021). Engineered microbial consortia: strategies and applications. İçinde *Microbial Cell Factories* (C. 20, Sayı 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01699-9>
- Fradinho, J. C., Oehmen, A., & Reis, M. A. M. (2014). Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. *Journal of Biotechnology*, 185, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.035>
- Franco-León, J. de J., Arriola-Guevara, E., Suárez-Hernández, L. A., Toriz, G., Guatemala-Morales, G., & Corona-González, R. I. (2021). Influence of supplemented nutrients in tequila vinasses for hydrogen and polyhydroxybutyrate production by photofermentation with *Rhodospseudomonas pseudopalustris*. *Bioresource Technology*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124865>
- Garcia-Gonzalez, L., & De Wever, H. (2018). Acetic acid as an indirect sink of CO₂ for the synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA): Comparison with PHA production processes directly using CO₂ as feedstock. *Applied Sciences (Switzerland)*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/app8091416>
- Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
- Goldberg, I., & Rokem, J. S. (2009). Organic and Fatty Acid Production, Microbial Defining Statement Introduction Organic Acids Fatty Acids Conclusions Further Reading. İçinde *Applied Microbiology: Industrial* (ss. 422-442).
- Goldberg, I., & Stefan Rokem, J. (2019). Organic and fatty acid production, microbial. İçinde *Encyclopedia of Microbiology* (ss. 358-382). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13083-3>
- Gómez-Cardozo, J. R., Velasco-Bucheli, R., Marín-Pareja, N., Ruíz-Villadiego, O. S., Correa-Londoño, G. A., & Mora-Martínez, A. L. (2020). Fed-batch production and characterization of polyhydroxybutyrate by *Bacillus megaterium lvn01* from residual glycerol. *DYNA (Colombia)*, 87(214), 111-120. <https://doi.org/10.15446/DYNA.V87N214.83523>
- Guerra-Blanco, P., Cortes, O., Poznyak, T., Chairez, I., & García-Peña, E. I. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) production by photoheterotrophic microbial consortia: Effect of culture conditions over microbial population and biopolymer yield and composition. *European Polymer Journal*, 98, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.11.007>
- Hamdy, S. M., Danial, A. W., Gad El-Rab, S. M. F., Shoreit, A. A. M., & Hesham, A. E. L. (2022). Production and optimization of bioplastic (Polyhydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* strain SH-02 using response surface methodology. *BMC Microbiology*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02593-z>

- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2012). Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB Express*, 2(1). <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-59>
- Hermawan, S., & Jendrossek, D. (2007). Microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 266(1), 60-64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00506.x>
- Hernández-Núñez, E., Martínez-Gutiérrez, C. A., López-Cortés, A., Aguirre-Macedo, M. L., Tabasco-Novelo, C., González-Díaz, M. O., & García-Maldonado, J. Q. (2019). Physico-chemical Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate) Produced by *Halomonas salina*, Isolated from a Hypersaline Microbial Mat. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(5), 1105-1111. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01417-y>
- Huang, L., Chen, Z., Wen, Q., & Lee, D. J. (2017). Enhanced polyhydroxyalkanoate production by mixed microbial culture with extended cultivation strategy. *Bioresource Technology*, 241, 802-811. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.192>
- Im, J.-Y., Min, W.-K., You, C., Kim, H.-O., Jin, H.-K., & Bae, J. (2013). Bone regeneration of mouse critical-sized calvarial defects with human mesenchymal stem cells in scaffold. *Laboratory Animal Research*, 29(4), 196. <https://doi.org/10.5625/lar.2013.29.4.196>
- Jiang, Y., Marang, L., Kleerebezem, R., Muyzer, G., & van Loosdrecht, M. C. M. (2011). Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(9), 2022-2035. <https://doi.org/10.1002/bit.23148>
- Jiye, L., Park, H. J., Moon, M., Lee, J. S., & Min, K. (2021). Recent progress and challenges in microbial polyhydroxybutyrate (PHB) production from CO₂ as a sustainable feedstock: A state-of-the-art review. *Çinde Bioresource Technology* (C. 339). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125616>
- Juengert, J., Bresan, S., & Jendrossek, D. (2018). Determination of Polyhydroxybutyrate (PHB) Content in *Ralstonia eutropha* Using Gas Chromatography and Nile Red Staining. *Bio-protocol*, 8(5). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2748>
- Kars, G., & Gündüz, U. (2010). Towards a super H₂ producer: Improvements in photofermentative biohydrogen production by genetic manipulations. *Çinde International Journal of Hydrogen Energy* (C. 35, Sayı 13, ss. 6646-6656). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.037>
- Kars, G., Gündüz, U., Rakhely, G., Yücel, M., Eroğlu, I., & Kovacs, K. L. (2008). Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 3056-3060. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.01.037>

- Kedia, G., Passanha, P., Dinsdale, R. M., Guwy, A. J., & Esteves, S. R. (2014). Evaluation of feeding regimes to enhance PHA production using acetic and butyric acids by a pure culture of *Cupriavidus necator*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 19(6), 989-995. <https://doi.org/10.1007/s12257-014-0144-z>
- Kemavongse, K., Prasertan, P., Upaichit, A., & 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 condi, Characterization , purification and immobilization of cell-bound and extracellular yeast yeast lipases and their application in bio-diesel production View project. İçinde Article in Songklanakarin *Journal of Science and Technology*. <https://www.researchgate.net/publication/26484981>
- Ke, Y., Liu, C., Zhang, X., Xiao, M., & Wu, G. (2017). Surface Modification of Polyhydroxyalkanoates toward Enhancing Cell Compatibility and Antibacterial Activity. İçinde *Macromolecular Materials and Engineering* (C. 302, Sayı 11). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mame.201700258>
- Khosravi-Darani, K., & Bucci, D. Z. (2015). Application of poly(hydroxyalkanoate) in food packaging: Improvements by nanotechnology. İçinde *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* (C. 29, Sayı 2, ss. 275-285). Assoc. of Chemists and Chemical Engineers of Croatia. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2014.2260>
- Kobayashi, J., & Kondo, A. (2019). Disruption of poly (3-hydroxyalkanoate) depolymerase gene and overexpression of three poly (3-hydroxybutyrate) biosynthetic genes improve poly (3-hydroxybutyrate) production from nitrogen rich medium by *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1088-y>
- Koch, M., & Forchhammer, K. (2021). Polyhydroxybutyrate: A Useful Product of Chlorotic Cyanobacteria. İçinde *Microbial Physiology* (C. 31, Sayı 2, ss. 67-77). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000515617>
- Koller, M. (2020). Established and advanced approaches for recovery of microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters from surrounding microbial biomass. İçinde *Eurobiotech Journal* (C. 4, Sayı 3, ss. 113-126). De Gruyter Open Ltd. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2020-0013>
- Kootstra, M., Elissen, H., & Huurman, S. (2017, Şubat). PHA's (Polyhydroxyalkanoates): General information on structure and raw material for their production, A running document for ``Kleinschalige Bioraffinage WP9: PHA `` Task 5. ACRRES; ACRRES Application Center for Renewable Resources.
- Kshirsagar, P. R., Kulkarni, S. O., Nilegaonkar, S. S., Niveditha, M., & Kanekar, P. P. (2013). Kinetics and model building for recovery of polyhydroxyalkanoate (PHA) from *Halomonas campisalis*. *Separation and Purification Technology*, 103, 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.10.007>

- Kuciel, S., Mazur, K., & Jakubowska, P. (2019). Novel Biorenewable Composites Based on Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with Natural Fillers. *Journal of Polymers and the Environment*, 27(4), 803-815. <https://doi.org/10.1007/s10924-019-01392-4>
- Kumka, J. E., & Bauer, C. E. (2015). Analysis of the FnrL regulon in *Rhodobacter capsulatus* reveals limited regulon overlap with orthologues from *Rhodobacter sphaeroides* and *Escherichia coli*. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2162-4>
- Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Çinde Express Polymer Letters* (C. 5, Sayı 7, ss. 620-634). <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2011.60>
- Kurian, N. S., & Das, B. (2021). Comparative analysis of various extraction processes based on economy, eco-friendly, purity and recovery of polyhydroxyalkanoate: A review. *Çinde International Journal of Biological Macromolecules* (C. 183, ss. 1881-1890). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.007>
- Lammi, S., Gastaldi, E., Gaubiach, F., & Angellier-Coussy, H. (2019). How olive pomace can be valorized as fillers to tune the biodegradation of PHBV based composites. *Polymer Degradation and Stability*, 166, 325-333. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.06.010>
- Lathwal, P., Kiran, N., Manpreet, S., Jamdagni, P., & Rana, J. S. (2015). Optimization of Culture Parameters for Maximum Polyhydroxybutyrate Production Selected Bacterial Strains from *Rhizospheric* Soils. *Polish Journal of Microbiology*, 64(3), 227-239. <http://doi.org/10.56004/01.3001.0009.2118>
- Lee, H. J., Jung, H. J., Kim, B., Cho, D. H., Kim, S. H., Bhatia, S. K., Gurav, R., Kim, Y. G., Jung, S. W., Park, H. J., & Yang, Y. H. (2023). Enhancement of polyhydroxybutyrate production by introduction of heterologous phasin combination in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 225, 757-766. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.138>
- Lee, Y. R., Nur Fitriana, H., Lee, S. Y., Kim, M. S., Moon, M., Lee, W. H., Lee, J. S., & Lee, S. (2020). Molecular profiling and optimization studies for growth and phb production conditions in *Rhodobacter sphaeroides*. *Energies*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/en13236471>
- Luongo, V., Ghimire, A., Frunzo, L., Fabbicino, M., d'Antonio, G., Pirozzi, F., & Esposito, G. (2017). Photofermentative production of hydrogen and poly-B-hydroxybutyrate from dark fermentation products. *Bioresource Technology*, 228, 171-175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.079>
- Majerczak, K., Wadkin-Snaith, D., Magueijo, V., Mulheran, P., Liggat, J., & Johnston, K. (2022). Polyhydroxybutyrate: a review of experimental and simulation studies of the effect of fillers on crystallinity and mechanical properties. *Çinde Polymer International* (C. 71, Sayı 12, ss. 1398-1408). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/pi.6402>

- Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, 142, 232-239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.031>
- Markl, E., Grünbichler, H., & Lackner, M. (2018). PHB - Bio Based and Biodegradable Replacement for PP: A Review. *Novel Techniques in Nutrition & Food Science*, 2(5), 206-209. <https://doi.org/10.31031/ntnf.2018.02.000546>
- Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Almaguer-Cantú, V., Rosas-Flores, W., Martínez-Gómez, V. J., Quintero-Zapata, I., Rivera, G., & Rutiaga-Quiñones, O. M. (2020). Efficient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 771-782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.101>
- Martínez-Martínez, M. de los A., González-Pedrajo, B., Dreyfus, G., Soto-Urzúa, L., & Martínez-Morales, L. J. (2019). Phasin *PhaPI* is involved in polyhydroxybutyrate granules morphology and in controlling early biopolymer accumulation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0876-4>
- Marudkla, J., Patjawit, A., Chuensangjun, C., & Sirisansaneeyakul, S. (2018). Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator* DSM 545 using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite. *Agriculture and Natural Resources*, 52(3), 266-273. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.09.009>
- Mayet, C., Deniset-Besseau, A., Prazeres, R., Ortega, J. M., & Dazzi, A. (2013). Analysis of bacterial polyhydroxybutyrate production by multimodal nanoimaging. *Biotechnology Advances*, 31(3), 369-374. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.003>
- McAdam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. İçinde *Polymers* (C. 12, Sayı 12, ss. 1-20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- McChalicher, C. W. J., Srienc, F., & Rouse, D. P. (2010). Solubility and degradation of polyhydroxyalkanoate biopolymers in propylene carbonate. *AIChE Journal*, 56(6). <https://doi.org/10.1002/aic.12087>
- Mekala, M., & Suganya, K. (2018). Characterisation of drug loaded with poly-beta-hydroxyl-butyrates (PHB) nanoparticles onto the cotton gauze for tuberculosis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 12(11), 142-150. <https://doi.org/10.5897/ajpp2017.4865>
- Merugu, R., Rudra, M. P. P., Girisham, S., & Reddy, S. M. (2012). PHB (Polyhydroxy butyrate) production under nitrogen limitation by *Rhodobacter capsulatus* KU002 isolated from tannery effluent. İçinde *International Journal of ChemTech Research* CODEN(USA (C. 4, Sayı 3).

- Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M. A. M., & Ferreira, E. C. (2015). Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica Chimica Acta*, 865(1), 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.018>
- Mezzolla, V., D'Urso, O. F., & Poltronieri, P. (2018). Role of *PhaC* type I and type II enzymes during PHA biosynthesis. *Polymers*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/polym10080910>
- Monroy, I., & Buitrón, G. (2020). Production of polyhydroxybutyrate by pure and mixed cultures of purple non-sulfur bacteria: A review. İçinde *Journal of Biotechnology* (C. 317, ss. 39-47). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.04.012>
- Montiel-Corona, V., & Buitrón, G. (2021). Polyhydroxyalkanoates from organic waste streams using purple non-sulfur bacteria. İçinde *Bioresource Technology* (C. 323). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124610>
- Montiel-Corona, V., & Buitrón, G. (2022). Polyhydroxybutyrate production in one-stage by purple phototrophic bacteria: Influence of alkaline pH, ethanol, and C/N ratios. *Biochemical Engineering Journal*, 189. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108715>
- Montiel Corona, V., Le Borgne, S., Revah, S., & Morales, M. (2017). Effect of light-dark cycles on hydrogen and poly- β -hydroxybutyrate production by a photoheterotrophic culture and *Rhodobacter capsulatus* using a dark fermentation effluent as substrate. *Bioresource Technology*, 226, 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.021>
- Montiel-Corona, V., Revah, S., & Morales, M. (2015). Hydrogen production by an enriched photoheterotrophic culture using dark fermentation effluent as substrate: Effect of flushing method, bicarbonate addition, and outdoor-indoor conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(30), 9096-9105. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2015.05.067>
- Muhammad Shamsuddin, I. (2017). Bioplastics as Better Alternative to Petroplastics and Their Role in National Sustainability: A Review. *Advances in Bioscience and Bioengineering*, 5(4), 63. <https://doi.org/10.11648/j.abb.20170504.13>
- Müller-Santos, M., Koskimäki, J. J., Alves, L. P. S., De Souza, E. M., Jendrossek, D., & Pirttilä, A. M. (2021). The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. İçinde *FEMS Microbiology Reviews* (C. 45, Sayı 3). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa058>
- Nandakumar, A., Chuah, J. A., & Sudesh, K. (2021). Bioplastics: A boon or bane? İçinde *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (C. 147, Sayı 111237). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111237>
- Narayanan, M., Kandasamy, S., Kumarasamy, S., Gnanavel, K., Ranganathan, M., & Kandasamy, G. (2020). Screening of polyhydroxybutyrate producing indigenous bacteria from polluted lake soil. *Heliyon*, 6(10). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05381>

- Nygaard, D., Yashchuk, O., & 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>
- Okeke, E. S., Olagbaju, O. A., Okoye, C. O., Addey, C. I., Chukwudozie, K. I., Okoro, J. O., Deme, G. G., Ewusi-Mensah, D., Igun, E., Ejeromedoghene, O., Odii, E. C., Oderinde, O., Iloh, V. C., & Abesa, S. (2022). Microplastic burden in Africa: A review of occurrence, impacts, and sustainability potential of bioplastics. *Içinde Chemical Engineering Journal Advances* (C. 12). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100402>
- Özsoy Demiriz, B., Kars, G., Yücel, M., Eroğlu, İ., & Gündüz, U. (2019). Hydrogen and Poly-B-hydroxybutyric acid production at various acetate concentrations using *Rhodobacter capsulatus* DSM 1710. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(32), 17269-17277. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.02.036>
- Padovani, G., Carlozzi, P., Seggiani, M., Cinelli, P., Vitolo, S., & Lazzeri, A. (2016). PHB-rich biomass and BioH₂ production by means of photosynthetic microorganisms. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 55-60. <https://doi.org/10.3303/CET1649010>
- Parodi, A., D'Ambrosio, M., Mazzocchetti, L., Martinez, G. A., Samorì, C., Torri, C., & Galletti, P. (2021). Chemical Recycling of Polyhydroxybutyrate (PHB) into Bio-Based Solvents and Their Use in a Circular PHB Extraction. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(37), 12575-12583. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c03299>
- Penloglou, G., Chatzidoukas, C., & Kiparissides, C. (2012). Microbial production of polyhydroxybutyrate with tailor-made properties: An integrated modelling approach and experimental validation. *Içinde Biotechnology Advances* (C. 30, Sayı 1, ss. 329-337). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.021>
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2014). PhaM Is the Physiological Activator of Poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) Synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(2), 555-563. <https://doi.org/10.1128/AEM.02935-13>
- Policastro, G., Luongo, V., & Fabbricino, M. (2020). Biohydrogen and poly-β-hydroxybutyrate production by winery wastewater photofermentation: Effect of substrate concentration and nitrogen source. *Journal of Environmental Management*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111006>
- Policastro, G., Panico, A., & Fabbricino, M. (2021). Improving biological production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) co-polymer: a critical review. *Içinde Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (C. 20, Sayı 2, ss. 479-513). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11157-021-09575-z>

- Rai, P. K., Singh, S. P., Asthana, R. K., & Singh, S. (2014). Biohydrogen production from sugarcane bagasse by integrating dark- and photo-fermentation. *Bioresource Technology*, 152, 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.117>
- Rajan, K. P., Thomas, S. P., Gopanna, A., & Chavali, M. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB): A Standout Biopolymer for Environmental Sustainability. İçinde *Handbook of Ecomaterials* (ss. 1-23). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48281-1_92-2
- Rajesh Banu, J., Ginni, G., Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Kumar, V., Adish Kumar, S., Gunasekaran, M., Tyagi, V. K., & Kumar, G. (2021). Polyhydroxyalkanoates synthesis using acidogenic fermentative effluents. İçinde *International Journal of Biological Macromolecules* (C. 193, ss. 2079-2092). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.040>
- Ranaivoarisoa, T. O., Singh, R., Rengasamy, K., Guzman, M. S., & Bose, A. (2019). Towards sustainable bioplastic production using the photoautotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris TIE-1*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46(9-10), 1401-1417. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02165-7>
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. İçinde *International Biodeterioration and Biodegradation* (C. 126, ss. 45-56). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Rehman, A., & Aftab, M. N. (2016). Production and characterization of a thermostable bioplastic (Poly-s-hydroxybutyrate) from *Bacillus cereus* NRRL-b-3711. <https://www.researchgate.net/publication/299387198>
- Rehm, B. H. A. (2021). Polyhydroxyalkanoates. The American Oil Chemists' Society.
- Rydz, J., Sikorska, W., Kyulavska, M., & Christova, D. (2015). Polyester-based (bio)degradable polymers as environmentally friendly materials for sustainable development. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 564-596. <https://doi.org/10.3390/ijms16010564>
- Sabarinathan, D., Chandrika, S. P., Venkatraman, P., Easwaran, M., Sureka, C. S., & 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>
- Samrot, A. V., Samanvitha, S. K., Shobana, N., Renitta, E. R., Kumar, P. S., Kumar, S. S., Abirami, S., Dhiva, S., Bavanilatha, M., Prakash, P., Saigeetha, S., Shree, K. S., & Thirumurugan, R. (2021). The synthesis, characterization and applications of polyhydroxyalkanoates (Phas) and PHA-based nanoparticles. *Polymers*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/polym13193302>
- Sangkharak, K., & Prasertsan, P. (2008). Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(3). <https://doi.org/10.2225/vol11-issue3-fulltext-2>

- Shah, K. R. (2014). Optimization and production of Polyhydroxybutyrate(PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil. İçinde *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (C. 3, Sayı 5). <http://www.ijcmas.com>
- Shakeri, S., Roghanian, R., & Emtiazi, G. (2011). Comparison of intracellular polyhydroxybutyrate granules formation between different bacterial cell subpopulations by flow cytometry. İçinde *Microbiol* (C. 4, Sayı 4). <http://jjm.ajums.ac.ir>
- Shalin, T., Sindhu, R., Binod, P., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2014). Mixed cultures fermentation for the production of poly- β -hydroxybutyrate. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), 644-652. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013005000016>
- Sharma, M., & Dhingra, H. (2016). Poly- β -hydroxybutyrate: A Biodegradable Polyester, Biosynthesis and Biodegradation. *British Microbiology Research Journal*, 14(3), 1-11. <https://doi.org/10.9734/bmrj/2016/25430>
- Shimizu, T., Teramoto, H., & 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). <https://doi.org/10.1128/aem.00507-22>
- Shrivastav, A., Kim, H. Y., & Kim, Y. R. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. İçinde *BioMed Research International* (C. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/581684>
- Singh, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Mala, J. (2017). Progress and challenges in producing polyhydroxyalkanoate biopolymers from cyanobacteria. İçinde *Journal of Applied Phycology* (C. 29, Sayı 3, ss. 1213-1232). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1006-1>
- Singh Saharan, B., Grewal, A., & Kumar, P. (2014). Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology*, 2014, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2014/802984>
- Suwansaard, M. (2010). Production of Hydrogen and 5-Aminolevulinic Acid by Photosynthetic Bacteria from Palm Oil Mill Effluent [Doctor of Philosophy]. Prince of Songkla University.
- Tănase, E. E., Popa, M. E., Râpă, M., & Popa, O. (2015). PHB/Cellulose Fibers Based Materials: Physical, Mechanical and Barrier Properties. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6, 608-615. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.099>
- Thapa, C., Shakya, P., Shrestha, R., Pal, S., & Manandhar, P. (2018). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture

Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. *Nepal Journal of Biotechnology.*, 2(1), 62-68.

- Touloupakis, E., Poloniataki, E. G., Casciana, M., Ghanotakis, D. F., & Carlozzi, P. (2021). Poly- β -hydroxybutyrate production by *Rhodopseudomonas sp.* Grown in semi-continuous mode in a 4 l photobioreactor. *Symmetry*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/sym13091609>
- Trakunjae, C., Boondaeng, A., Apiwatanapiwat, W., Kosugi, A., Arai, T., Sudesh, K., & Vaithanomsat, P. (2021). Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production by newly isolated rare actinomycetes *Rhodococcus sp. strain BSRT1-1* using response surface methodology. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81386-2>
- Varghese, S., Dhanraj, N. D., Rebello, S., Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A., Jisha, M. S., & Awasthi, M. K. (2022). Leads and hurdles to sustainable microbial bioplastic production. *Chemosphere*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135390>
- Vlaeminck, E., Quataert, K., Uitterhaegen, E., De Winter, K., & Soetaert, W. K. (2022). Advanced PHB fermentation strategies with CO₂-derived organic acids. *Journal of Biotechnology*, 343, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.11.010>
- Voinova, V., Bonartseva, G., & Bonartsev, A. (2019). Effect of poly(3-hydroxyalkanoates) as natural polymers on mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 11(10), 764-786. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V11.I10.764>
- Vu, D. H., Mahboubi, A., Root, A., Heinmaa, I., Taherzadeh, M. J., & Åkesson, D. (2022). Thorough Investigation of the Effects of Cultivation Factors on Polyhydroalkanoates (PHAs) Production by *Cupriavidus necator* from Food Waste-Derived Volatile Fatty Acids. *Fermentation*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/fermentation8110605>
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., & Jendrossek, D. (2012). PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-262>
- Wang, X., Oehmen, A., Freitas, E. B., Carvalho, G., & Reis, M. A. M. (2017). The link of feast-phase dissolved oxygen (DO) with substrate competition and microbial selection in PHA production. *Water Research*, 112, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.064>
- Wei, Y. H., Chen, W. C., Huang, C. K., Wu, H. S., Sun, Y. M., Lo, C. W., & Janarthanan, O. M. (2011). Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 252-265. <https://doi.org/10.3390/ijms12010252>
- Wei, Z., Zhu, Y., Ai, M., Liu, C., & Jia, X. (2022). Construction and analysis of a *Pseudomonas-Saccharomyces* microbial consortium for mcl-PHA production from

- xylose and octanoate. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, 101(7), 3680-3692. <https://doi.org/10.1002/cjce.24751>
- Yang, Y. H., Brigham, C. J., Budde, C. F., Boccazzi, P., Willis, L. B., Hassan, M. A., Yusof, Z. A. M., Rha, C., & Sinskey, A. J. (2010). Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2037-2045. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2699-8>
- Yousuf, R. G. (2017). Novel polyhydroxybutyrate (PHB) production using a waste date seed feedstock [Doctor of Philosophy, University of Manchester]. <https://doi.org/10836887>
- Yousuf, R. G., Webb, C., & Winterburn, J. (2018). Novel Polyhydroxybutyrate (PHB) Production Using a Waste Date Seed Feedstock. İçinde PQDT - Global. <https://www.proquest.com/dissertations-theses/novel-polyhydroxybutyrate-phb-production-using/docview/2116952378/se-2?accountid=159111>
- Yun, J. H., Sawant, S. S., & Kim, B. S. (2013). Production of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha* from volatile fatty acids. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 30(12), 2223-2227. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0190-9>
- Zher Neoh, S., Fey Chek, M., Tiang Tan, H., Linares-Pastén, J. A., Nandakumar, A., Hakoshima, T., & Sudesh, K. (2022). Polyhydroxyalkanoate synthase (*PhaC*): The key enzyme for biopolyester synthesis. *Current Research in Biotechnology*, 4, 87-101. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.002>
- Zhou, W. (2023). Microbial synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) [University of Groningen]. <https://doi.org/10.33612/diss.574741105>
- Zhou, W., Bergsma, S., Colpa, D. I., Euverink, G. J. W., & Krooneman, J. (2023). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesis and degradation by microbes and applications towards a circular economy. İçinde *Journal of Environmental Management* (C. 341). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118033>
- Zhou, W., Colpa, D. I., Geurkink, B., Euverink, G. J. W., & Krooneman, J. (2022). The impact of carbon to nitrogen ratios and pH on the microbial prevalence and polyhydroxybutyrate production levels using a mixed microbial starter culture. *Science of the Total Environment*, 811. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152341>
- Zhu, Y., Ai, M., & Jia, X. (2022). Optimization of a Two-Species Microbial Consortium for Improved Mcl-PHA Production From Glucose–Xylose Mixtures. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794331>
- Zviagin, A. S., Chernozem, R. V., Surmeneva, M. A., Pyeon, M., Frank, M., Ludwig, T., Tutacz, P., Ivanov, Y. F., Mathur, S., & Surmenev, R. A. (2019). Enhanced piezoelectric response of hybrid biodegradable 3D poly(3-hydroxybutyrate)

scaffolds coated with hydrothermally deposited ZnO for biomedical applications. *European Polymer Journal*, 117. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.016>

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_\(Wade\)_Complete_and_Semesters_I_and_II/Map%3A_Organic_Chemistry_\(Wade\)/12%3A_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/12.05%3A_Functional_Groups_and_Chemical_Shifts_in_H_NMR_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Wade)_Complete_and_Semesters_I_and_II/Map%3A_Organic_Chemistry_(Wade)/12%3A_Nuclear_Magnetic_Resonance_Spectroscopy/12.05%3A_Functional_Groups_and_Chemical_Shifts_in_H_NMR_Spectroscopy)

<https://genome.jgi.doe.gov/portal/rhosp/rhosp.home.html>

<https://genome.jgi.doe.gov/portal/rhosp/rhosp.home.html>

<https://bacdive.dsmz.de/strain/13806>

<https://www.clinisciences.com/en/buy/cat-sudan-black-b-stain-3954.html>

<http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:52169>

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65182#section=2D-Structure>

https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table

EKLER**EK-1** Eser element çözeltisi

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

EK-2 Vitamin çozeltesi.

Vitamin	mg/L
Thiamine	500
Niacin	500
Biotin	15

