

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİHİDROKSİALKANOAT (PHA) ÜRETİCİSİ YEREL *Bacillus*
SOYLARININ TARANMASI VE *Bacillus sp.* A19'DAN ELDE
EDİLEN POLİHİDROKSİALKANOATIN ÜRETİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU

GİZEM KUGU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POLİHİDROKSİALKANOAT (PHA)
ÜRETİCİSİ YEREL *Bacillus* SOYLARININ
TARANMASI VE *Bacillus sp.* A19'DAN ELDE
EDİLEN POLİHİDROKSİALKANOATIN
ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

GİZEM KUGU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE

2022

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

SCREENING OF
POLYHYDROXYALKANOATE (PHA)
PRODUCING LOCAL *Bacillus* STRAINS
AND PRODUCTION AND
CHARACTERIZATION OF
POLYHYDROXYALKANOATE FROM
Bacillus sp. A19

GİZEM KUGU
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSIST. PROF. SALİHA İŞSEVER ÖZTÜRK

GEBZE
2022



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/072022 tarih ve 2022/34 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 01/08/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Gizem KUGU' nun tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Dr. Öğr. Üyesi Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Yosun MATER

ÜYE

: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI EFELİ

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Petrol temelli plastik ürünlerin artan kullanımı ve sebep olduğu çevresel kirlilik gün geçtikçe daha yıkıcı boyutlara ulaşmaktadır. Biyobozunur özelliğe sahip olmayan geleneksel plastiğin sebep olduğu toksik etkiler ve çevresel endişeler bilim insanlarını alternatif çözümler aramaya itmiştir. Bir tür biyobozunur polyester olan polihidroksialkanoatlar (PHA) çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenebilmeleri, biyo-uyumlu, biyo-bozunur, termoplastik ve elastomerik olmaları gibi özellikleri sayesinde petrol temelli plastiğe bir alternatif olarak görülmektedir. Ancak PHA sentezinde kullanılan hammaddelerin yüksek maliyetli olması nedeniyle geleneksel plastik kadar yaygın kullanılamamaktadır. Tez çalışmasında kullanılan yerel *Bacillus* soyları da PHA sentezleyebilen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. Yerel *Bacillus* izolatlarının taranarak PHA üretimi açısından pozitif soyların moleküler yöntemlerle belirlenmesi, bu soylardan PHA ekstraksiyonunun yüksek verimle gerçekleştirilebilmesi için optimal şartların oluşturulması ve elde edilen PHA'nın karakterize edilmesiyle biyoplastik üretimindeki temel sorunlara literatür katkısı sağlanmıştır. Bu çalışmayla PHA üretiminden sorumlu enzimlere ait genlerin yerel soylardaki varlığı gösterilmiş, üretici soylar hem çeşitli boyama teknikleri hem de moleküler yöntemler yardımıyla tanımlanmıştır. Yerel izolatlar arasından seçilen *Bacillus sp.* A19 örneğinden PHA ekstraksiyonu yapılmış, ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş ve elde edilen biyopolimer FTIR ve NMR aracılığıyla nitelendirilmiştir. Yerel izolatlarda PHA sentezinden sorumlu genlerin varlığının gösterilmesi ve eldesinin, PHA üretiminde kullanılabilen enzimlerin daha sonra yapılabilecek protein mühendisliği ile geliştirilerek daha verimli hale getirilmesi konusunda literatüre katkı sağlayacak olmasının yanı sıra elde edilecek PHA'nın, daha ileri çalışmalarla nitelendirilmesi sonrasında ticarileştirilme potansiyeli de bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoplastik, *Bacillus*, Polihidroksialkanoat (PHA), Polihidroksibütirat (PHB), Karakterizasyon.

SUMMARY

The increasing use of petroleum-based plastic products and the environmental pollution caused by them are reaching more and more destructive dimensions day by day. Toxic effects and environmental concerns caused by non-biodegradable conventional plastics have led scientists to seek alternative solutions. Polyhydroxyalkanoates (PHAs), which is a kind of biodegradable polyester, are seen as an alternative to petroleum-based plastics, thanks to its properties such as being synthesized by various microorganisms, being biocompatible, biodegradable, thermoplastic and elastomeric. However, due to the high cost of raw materials used in PHA synthesis, it cannot be used as widely as traditional plastic. Local *Bacillus* strains used in the thesis study are also among the microorganisms that can synthesize PHA. By screening local *Bacillus* isolates, determining positive strains for PHA production by molecular methods, creating optimal conditions for high efficiency PHA extraction from these strains, and characterizing the obtained PHA, literature can contribute to the basic problems in bioplastic production. In this study, PHA-producing local isolates were determined by molecular techniques. In addition, by showing the presence of genes belonging to enzymes responsible for PHA production in local lines, producer isolates were defined molecularly. PHA was extracted from *Bacillus* sp. A19 sample selected from local isolates, extraction conditions were optimized and the obtained biopolymer was characterized by FTIR and NMR. Demonstrating and obtaining the genes responsible for PHA synthesis in local isolates will contribute to improve the enzymes that can be used in PHA production and making them more efficient with later protein engineering.

Key words: Bioplastic, *Bacillus*, Polyhydroxyalkanoate (PHA), Polyhydroxybutyrate (PHB), Characterization.

TEŞEKKÜR

Araştırma sürecim boyuncaengin bilgilerini benimle paylaşan, desteğini, güvenini ve hoşgörüsünü esirgmeden çalışmalarımdayana yol gösteren değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Saliha İŞSEVER ÖZTÜRK' e teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca her zaman yanımda olan, yardımını ve fikirlerini hiçbir zaman esirgemeyen, deneysel bilgi birikiminin oluşmasında en büyük katkıyı sağlayan değerli hocam Dr. Hüseyin BALCI' ya teşekkürü borç bilirim.

Tanıştığımız günden beri desteğini hep yanımda hissettiğim, iyi ve kötü her anımda yanımda olan, fikirlerini ve bilgilerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Ayyüce SEVER' e teşekkür ederim.

Bana olan güvenini, desteğini ve sevgisini her zaman derinden hissettiğim, sahip olduğu değerli bilgileri benimle paylaşıp ihtiyacım olan her anda yardıma koşan, tanıştığım en değerli insanlardan biri olan sevgili arkadaşım Burçin ÖZBEKLE' ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca olduğu gibi beni hayatımın her safhasında koşulsuz destekleyen, varlıklarıyla bana güç olan, yol gösteren, bugün olduğum kişi olmamı sağlayan sevgili babam Şenol ve sevgili annem Gülay'a; bana her zaman yardımcı ve neşe kaynağı olan kardeşlerim Onur Alp ve Beren' e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyoplastik	3
2.1.1. Biyoplastik Çeşitleri	3
2.1.2. Biyoplastiğin Önemi ve Kullanım Alanları	4
2.2. Polihidroksialkanoat	5
2.2.1. Polihidroksialkanoatın Özellikleri	5
2.2.2. Polihidroksialkanoat (PHA) Çeşitleri	7
2.2.3. PHA Üretiminden Sorumlu Enzim ve Genler	9
2.2.4. Polihidroksialkanoat Üretim Yolağı	11
2.2.5. Polihidroksialkanoat Üreticisi Mikroorganizmalar	12
2.2.6. Polihidroksialkanoat Üretiminde <i>Bacillus</i>	13
2.2.7. Polihidroksialkanoatın Nitelendirilmesi	14
2.2.8. PHA Karakterizasyonunda FTIR Analizi	14
2.2.9. PHA Karakterizasyonunda NMR Analizi	15
2.2.10. PHA'nın Kullanım Alanları ve Geleceğı	16
3. GEREÇLER	19
3.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri	19
3.2. Kullanılan Cihazlar	20
4. YÖNTEM	22
4.1. Kullanılan Besiyeri ve İçerikleri	23

4.2. Çalışmada Kullanılan İzolatlar	23
4.3. Farklı Besiyerlerinde PHA Üretimi	24
4.4. PHA Üreticisi Soyların Kalitatif Olarak Belirlenmesi	24
4.4.1. Sudan Siyahı ile Üretici Soyların Taranması	24
4.4.2. Nile Kırmızısı ile Üretici Soyların Taranması	25
4.5. <i>phaC</i> ve <i>phaR</i> Genlerinin Tespit Edilmesi	26
4.5.1. Genlere Ait Dizilerin Elde Edilmesi ve Çoklu Dizi Analizi	26
4.5.2. MEME Suite Programı ile Genlerde Motif Taraması	26
4.6. Genomik DNA İzolasyonu	27
4.6.1. CTAB Yöntemi ile gDNA İzolasyonu	27
4.6.2. "PureLink/Invitrogen gDNA İzolasyon Kiti" ile gDNA İzolasyonu	28
4.6.3. "QIAGEN gDNA İzolasyon Kiti" ile gDNA İzolasyonu	29
4.7. Primer Tasarımı	29
4.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	30
4.9. PHA Ekstraksiyonu	31
4.10. PHA Üretim Koşullarının Optimizasyonu	33
4.10.1. Sıcaklığın PHA Üretimine Etkisi	33
4.10.2. İnkübasyon Zamanının PHA Üretimine Etkisi	33
4.10.3. Aşılama Oranının PHA Üretimine Etkisi	34
4.10.4. Havalandırma Oranının PHA Üretimine Etkisi	34
4.10.5. Çalkalama Hızının PHA Üretimine Etkisi	35
4.10.6. Farklı Karbon Kaynaklarının PHA Üretimine Etkisi	35
4.10.7. Farklı Nitrojen Kaynaklarının PHA Üretimine Etkisi	35
4.10.8. FTIR Analizi	36
4.10.9. ¹ H- NMR Analizi	36
5. BULGULAR	37
5.1. Boyama Yöntemleri ile PHA Üreticisi Soyların Belirlenmesi	37
5.2. Çoklu Dizi ve Motif Analizi Sonuçları	41
5.3. <i>phaC</i> ve <i>phaR</i> Genlerinin PZR ile Taranması	45
5.4. PHA Özütlemesi	49
5.5. Üretim Koşullarının Optimizasyonu	50
5.5.1. Sıcaklığın PHA Üretimi Üzerine Etkisi	50

5.5.2. İnkübasyon Zamanının PHA Üretimi Üzerine Etkisi	52
5.5.3. Aşılama Oranının PHA Üretimi Üzerine Etkisi	55
5.5.4. Havalandırma Oranının PHA Üretimi Üzerine Etkisi	56
5.5.5. Çalkalama Hızının PHA Üretimi Üzerine Etkisi	57
5.5.6. Farklı Karbon Kaynaklarının <i>Bacillus sp.</i> A19 PHA Üretimine Etkisi	59
5.5.7. Farklı Nitrojen Kaynaklarının <i>Bacillus sp.</i> A19 PHA Üretimine Etkisi	60
5.5.8. Yerel <i>Bacillus</i> İzolatı A19'dan Üretilen Biyopolimerin FTIR ile Nitelendirilmesi	62
5.5.9. Yerel <i>Bacillus</i> İzolatı A19'dan Üretilen Biyopolimerin NMR ile Nitelendirilmesi	65
6. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	79
EKLER	80

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge ve

Kısaltmalar

Açıklamalar

α	: Alfa
β	: Beta
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat Derece
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
bç	: Baz çifti
dk	: Dakika
g	: Gram
kb	: (kilo) Baz
kDa	: (kilo) Dalton
M	: Molar
mg	: Miligram
Mg^{+2}	: Magnezyum iyonu
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
sn	: Saniye
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volyaj
3HB	: 3-hidroksibütirat
3HDD	: 3-hidroksidodekanoat
3HHx	: 3-hidroksiheksanoat
3HO	: 3-hidroksioktanoat
3HV	: 3-hidroksivalerat
CaCl_2	: Kalsiyum Klorür
CDCl_3	: Döterokloroform

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit Trifosfat
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
EtOH	: Etanol
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
FDA	: Food and Drug Administration
HCl	: Hidroklorik Asit
¹ H-NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KCl	: Potasyum Klorür
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
N ₂ -Def	: N ₂ -Deficient (Azot Kaynağı Azaltılmış Besiyeri)
NaAc	: Sodyum Asetat
NaCl	: Sodyum Klorür
NH ₄ Cl	: Amonyum Asetat
OD	: Optik Yoğunluk
PA	: Poliamid
PBAT	: Poli (bütilenadipat-ko-tereftalat)
PBS	: Polibütilen süksinat
PCL	: Polikaprolakton.
PE	: Polietilen
PET	: Polietilen teraflat
PHA	: Polihidroksialkanoat
PHA _{SCL}	: Kısa Zincirli PHA
PHA _{MCL}	: Orta Zincirli PHA
PHB	: Polihidroksibütirat
PHV	: Polihidroksivalerat
PLA	: Polilaktik asit,
PZR/PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	: Dakika Başına Rotasyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Biyoplastiklerin basit sınıflandırılması.	4
2.2: Bakteri içindeki PHA granülleri ve granül oluşumuyla ilişkili proteinlerin şematik gösterimi.	7
2.3: Sahip oldukları karbon sayısına göre PHA'ların sınıflandırılması.	8
2.4: (a) PHA'ların genel formülü. (b) PHA _{SCL} ve PHA _{MCL} 'ye örnek olarak verilebilecek en yaygın PHA monomerleri.	8
2.5: PHA üretiminden sorumlu başlıca genlerin yerleşimi.	10
2.6: Bakteriler tarafından PHA _{SCL} ve PHA _{MCL} sentezi için kullanılan yolaklar.	12
2.7: Farklı bakteri kaynaklarından ekstrakte edilmiş polihidroksialkanoatların FTIR analizi.	15
2.8: Kloroform kullanılarak hazırlanmış PHA ¹ H-NMR sonucu.	16
2.8: PHA'nın sahip olduğu temel özellikler ve entegre edilebileceği alanlar.	17
4.1: Tez çalışması boyunca izlenen temel basamaklar ve içerikleri.	22
5.1: Sudan siyahı (üst) boyaması sonrasında negatif kontrol (E. coli JM109) ve PHA üreticisi Bacillus izolatının petrideki görüntüsü. Örnek: Bacillus sp. A19.	38
5.2: Nile kırmızısı boyası kullanılarak yapılan tarama sonuçları.	39
5.3: On iki farklı Bacillus türüne ait phaR geni sekanslarının çoklu dizi hizalama ve motif analizi sonuçları.	43
5.4: On iki farklı Bacillus türüne ait phaC geni sekanslarının çoklu dizi hizalama ve motif analizi sonuçları.	44
5.5: B. megaterium'a ait phaR geni dizisi. Sarı kutucuklar ileri ve geri primerlerin tasarlandığı lokasyonları temsil etmektedir.	45
5.6: phaC geninin tespiti için yapılan PZR'ye ait agaroz jel profili.	47
5.7: phaR geninin PZR ile taranması sonucunda elde edilen agaroz jel profili.	48
5.8: Mikrosantrifüj tüplerinde ekstrakte edilen PHAların görüntüsü.	49

5.9:	<i>Bacillus</i> sp. A19'dan elde edilen biyopolimerler.	50
5.10:	Sıcaklığın PHA akümülayonu üzerine etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109	51
5.11:	Sıcaklığın hücre büyümesine etkisi.	51
5.12:	<i>Bacillus</i> sp. A19 PHA akümülayonunun zamana bağı değışimi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	52
5.13:	<i>Bacillus</i> sp. A19 suşunun zamana bağı büyüme grafiğı.	53
5.14:	<i>Bacillus</i> sp. A19 PHA akümülayonunun zamana bağı olarak gözlemlenmesi.	54
5.15:	Aşılama oranının <i>Bacillus</i> sp. A19 PHA akümülayonuna etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	53
5.16:	Aşılama oranının <i>Bacillus</i> sp. A19 izolatının büyümesine etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	55
5.17:	Havalandırma oranının <i>Bacillus</i> sp. A19 PHA akümülayonuna etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	57
5.18:	Havalandırma oranının <i>Bacillus</i> sp. A19 izolatının büyümesine etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	57
5.19:	Çalkalama hızının <i>Bacillus</i> sp. A19 PHA akümülayonuna etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	58
5.20:	Çalkalama hızının <i>Bacillus</i> sp. A19 izolatının büyümesine etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	58
5.21:	Farklı karbon kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. A19 PHA akümülayonuna etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109.	60
5.22:	Farklı karbon kaynaklarının <i>Bacillus</i> sp. A19 hücre büyümesine etkisi. C(-): <i>E. coli</i> JM109. İnkübasyon koşulları: 30 °C, %1 aşılama, 1:2 havalandırma, 100 rpm, 72 saat.	60
5.23:	Farklı nitrojen kaynaklarının kullanıldığı besiyerlerinde <i>Bacillus</i> sp. A19 PHA akümülayonu.	61
5.24:	Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı besiyerlerinde 72.saatte <i>Bacillus</i> sp. A19 örneğinin OD ₆₀₀ değıerleri.	61
5.25:	Standart PHB (Sigma) ve <i>Bacillus</i> sp. A19 için gerçekleştirilen FTIR analizi sonuçları.	63

5.26	Standart PHB (Sigma) ve <i>Bacillus</i> sp. A19 suşundan elde edilen PHA'nın FTIR analizi sonuçlarının karşılaştırılması.	64
5.27	<i>Bacillus</i> sp, A19 suşundan elde edilen biyopolimerin NMR analizi sonuçları.	65
5.28	Standart olarak kullanılan ticari PHB'nin NMR analizi sonuçları.	36



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: PHA sentez yolağında kullanılan başlıca genler ve kodladıkları proteinler.	10
2.2: Gerçekleştirilen bazı PHA uygulamaları.	18
3.1: Kullanılan sarf malzemeleri.	19
3.2: Kullanılan cihazlar.	20
4.1: <i>phaC</i> ve <i>phaR</i> genlerinin PZR çoğaltılması için kullanılan primerler.	30
4.2: PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve kullanılan miktarlar.	31
4.3: PZR’da kullanılan sıcaklıklar ve döngü sayıları.	31
5.1: Sudan Black B boyası ile gerçekleştirilen tarama sonucu.	39
5.2: NCBI/GenBank veri bankasından elde edilen <i>phaC</i> ve <i>phaR</i> genlerinin tanımlayıcıları ve ilgili bakteri isimleri.	40
5.3: PZR sonrasında örneklerin <i>phaC</i> ve <i>phaR</i> genlerine sahiplik durumları.	44
5.4: Ekstraksiyon sonrası elde edilen veriler.	47

1. GİRİŞ

Petrol türevi plastik, günlük yaşamda sıklıkla kullanılan malzemelerin oluşumunda kullanılan bir çeşit polyesterdir. Özellikle ambalaj, tekstil, kozmetik malzemeleri gibi ürünlerin paketlenmesinde çok büyük oranda petrol bazlı geleneksel plastik kullanılmaktadır. Ancak Dünya üstündeki petrol rezervlerinin kısıtlı olması, petrol temelli plastiğin neden olduğu çevre kirliliği ve canlıların sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri sebebiyle bilim insanları sentetik plastiklere alternatif olarak, en az geleneksel plastiğinki kadar ulaşılabilir fiziksel ve kimyasal özellikler taşıyan biyomalzemelerin geliştirilmesine yoğun ilgi duymaya başlamıştır. Bu ilgi geleneksel plastiğe çevreci bir alternatif olarak görülen ve biyolojik araçlarla üretilen biyoplastiklerin keşfedilmesiyle sonuçlanmıştır.

Polihidroksialkanoat (PHA) olarak isimlendirilen bir çeşit biyolojik polyester, biyoplastik malzemelerin üretiminde kullanılan hammaddelerin başında gelmektedir. İlk olarak bir PHA türevi olan poli(3-hidroksibütirat) [P(3HB)]'ın 1926 yılında *Bacillus megaterium* tarafından sentezlendiğinin keşfedilmesiyle [1] PHA ve türevlerinin sentezinden sorumlu farklı canlıların keşif süreci başlamıştır. Bu canlıların temel besin elementlerinin eksikliğinden kaynaklanan stres koşullarında çeşitli karbon kaynaklarını kullanarak PHA üretimi yaptığı bilinmektedir. 300'den fazla mikroorganizma PHA sentezlemekte ve hücre içinde ya da dışında akümüle edebilmektedir [2]. PHA'nın bileşenini oluşturabilecek 100'den fazla monomer tipi bulunmaktadır. Bu durum her biri farklı kimyasal ve fiziksel özellikler gösterebilen çok çeşitli PHA tiplerinin oluşmasına ve bu PHA'ların farklı alanlarda endüstriyel olarak kullanılmasına izin vermektedir [3].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

PHA üretimi ve kullanımı petrol temelli plastiğin kullanımına karşı biyoyoumlu ve biyobozunur bir yaklaşım getirmesi nedeniyle biyoplastik araştırmalarının odağında olmuştur. Literatürde farklı mikroorganizmalardan PHA eldesine dair çalışmalar bulunmaktadır. Öte yandan üretimi kolay, toksik özellik göstermeyen gram (+) *Bacillus* izolatları da PHA üretimi için oldukça elverişli canlılardır. Daha önce

yapılmış olan ve halen devam eden çalışmalarla farklı *Bacillus* türlerinin PHA üretimindeki verimleri değerlendirilmeye devam etmektedir.

Yapılan çalışmalarla PHA üretimi açısından pozitif oldukları doğrulanan farklı *Bacillus* türleri bulunmasına karşın *Bacillus* soylarının büyük bir kısmı PHA üretimi açısından nitelendirilmemiştir. Bu tez çalışmasında çeşitli yerel habitatlardan elde edilen *Bacillus* izolatları PHA üretimi açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca moleküler doğrulama yöntemi olarak *phaC* ve *phaR* genlerinin bu izolatlardaki varlıkları taranmıştır.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar sonucu yerel izolatlar arasından PHA üretimi yapabilen yerel *Bacillus* türleri belirlenmiştir. Bu türler arasından seçilen bir yerel *Bacillus* izolatından PHA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen PHA karakterize edilmiştir. *Bacillus* soylarında PHA üretiminden sorumlu olan *phaC* ve *phaR* genlerinin varlığı da polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aracılığıyla taranmıştır. Elde edilen sonuçların özellikle yerel *Bacillus* türleriyle biyoplastik üretimi konusunda literatür katkısı sağlaması öngörülmektedir. Bunun yanı sıra çevre kirliliğinin giderek artması, ekolojik dengenin bozulması nedeniyle çeşitli alanlarda daha çevreci bir yaklaşım olan biyomalzemelerin kullanımının giderek yaygınlaştığı bilinmektedir. Çevre dostu bir polimer olarak görülen PHA, ham madde olarak çeşitli üretim atıkları kullanılarak da elde edilebilmektedir. Bu malzemelerin Türkiye’de üretilmesi ve çeşitli alanlara entegre edilecek şekilde geliştirilmesi mümkündür. Ülkemizde özellikle şeker melası, buğday ve ayçiçeği üretimi atıkları gibi PHA üretiminde ham madde olarak kullanılacak biyokütle üretiminin yüksek olduğu düşünüldüğünde bu tez çalışması kapsamında elde edilen PHA’nın ticarileştirilerek ülke ekonomisine katkı sağlama potansiyeli yüksektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyoplastik

Plastikler kolay işlenebilir yapıları nedeniyle özellikle endüstriyel alanda kullanımı oldukça yaygın olan materyallerdir. Petrol bazlı plastiğin çevre ve canlılık üzerindeki olumsuz etkileri insanlığı geleneksel plastiğe alternatif olarak kullanılabilecek materyal arayışına itmiştir. Bu durum biyoplastik gibi birçok biyolojik materyalin keşfini beraberinde getirmiştir. Biyoplastik farklı ortam koşullarında farklı mikroorganizmalar tarafından anabolize ve katabolize edilebilen biyolojik polyesterlerdir. Stres koşullarında kullanmak üzere genellikle lipit yapıda olacak şekilde ilgili mikroorganizmalar tarafından hücre içinde ya da hücre dışında depolanırlar [4]. Petrol bazlı plastiğin aksine biyoplastikler birçok yenilenebilir kaynak kullanılarak elde edilebilir. Mısır nişastası, bitkisel yağlar ya da yağ atıkları ve geri dönüştürülmüş gıda atıkları biyoplastik eldesinde kullanılabilen kaynaklardan bazılarıdır.

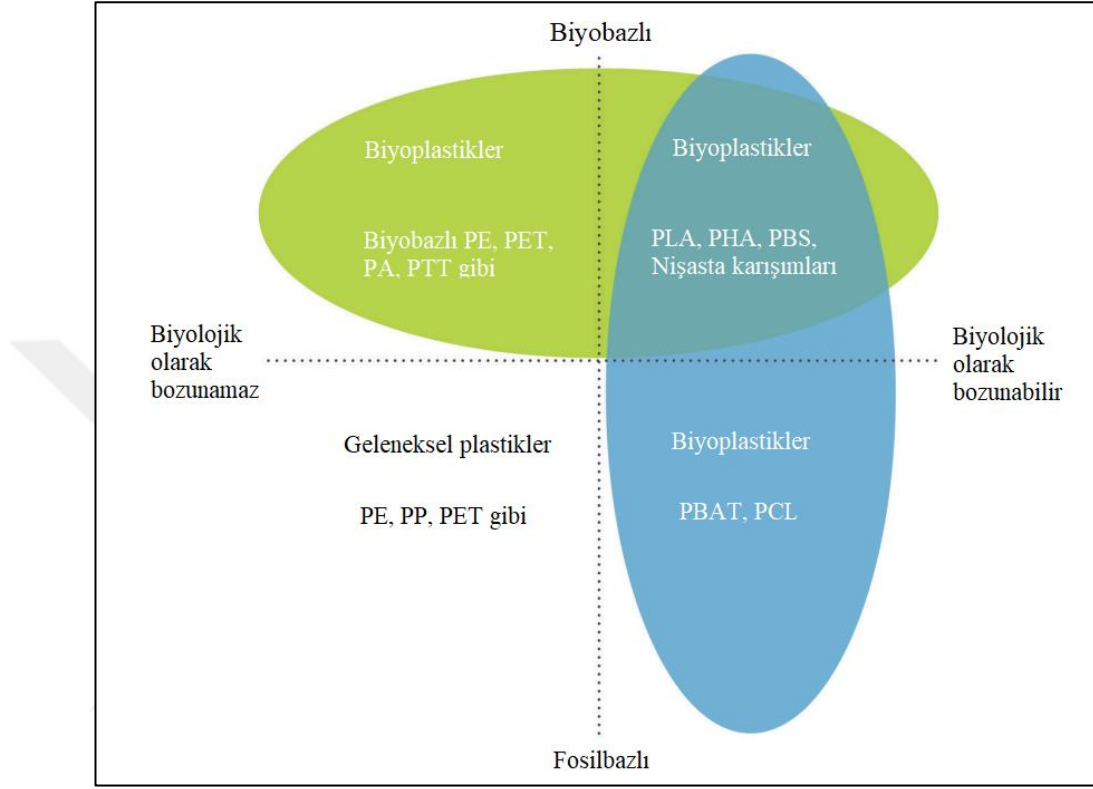
2.1.1. Biyoplastik Çeşitleri

Belirli doğal koşullar altında ve yeterli süre dahilinde birçok madde biyolojik olarak bozunabilir. Ancak bu maddelerin biyobozunur olarak adlandırılabilmesi için bu sürenin nispeten kısa olması gereklidir. Biyoplastikler de biyobozunur maddeler olarak kabul edilirler ancak bozunma süreleri ele alındığında biyoplastikler üçü ana grup altında incelenebilir. Bunlar; bozunabilir plastikler, biyobozunabilir plastikler ve kompozit plastiklerdir [5]. Petrol temelli plastikleri de içermek üzere tüm plastikler doğada bozunabilir, ancak birçoğu tamamıyla yok olmaz ve ardında mikro ölçekli toksinler bırakır. Ancak biyobozunur ve kompozit plastikler bozunma sürecinin ardından çevreye daha az toksin bırakma ve çevre dostu tavır sergileme eğilimindedir.

Biyoplastikler meydana geldikleri ham madde ve sahip oldukları fonksiyona göre de üç ana başlık altında sınıflandırılabilirler [6], [7].

- *Biyolojik temelli ya da yarı biyolojik temelli biyoplastikler:* Biyobazlı polietilen (PE), polipropilen (PP), polivinil siloksan (PVS) ya da polietilen tereftalat (PET).

- *Biyobazlı ve biyobozunur biyoplastikler*: Nişasta polimeri, polihidroksialkanoat (PHA) ya da polilaktik asit gibi alifatik polyesterler.
- *Fosil kaynaklara dayalı biyobozunur biyoplastikler*: Polibütilen adipat tereftalat (PBAT), polibütilen süksinat (PBS) ya da polikaprolakton (PCL).



Şekil 2.1: Biyoplastiklerin basit sınıflandırması. PE: polietilen, PET: Polietilen tereftalat, PA: Poliamid, PTT: Politrimetilen tereftalat, PLA: Polilaktik asit, PHA: Polihidroksialkanoat, PBS: Polibütilen süksinat, PBAT: Poli (bütilenadipat-kotereftalat), PCL: Polikaprolakton.

2.1.2. Biyoplastiklerin Önemi ve Kullanım Alanları

Dünya üzerindeki petrol kaynaklarının limitli olması ve petrol temelli plastik türevlerinin çevreye vereceği zararların endişesi biyoyumlu ve biyobozunabilir biyoplastiklerin önemini artırmıştır. Petrol bazlı geleneksel plastiğin aksine biyoplastikler, doğada daha hızlı ve mikroorganizmalar vasıtasıyla bozunabilmeleri nedeniyle daha sürdürülebilir ve doğa dostu olarak kabul edilmektedir [8]. Şimdiye kadar biyoplastiğin petrol bazlı plastiğe oranla daha az toksik olduğu görüşü kabul edilmiş olsa da yapılan son çalışmalar biyoplastiklerin de en az geleneksel plastikler kadar toksik olabileceğini göstermiştir [9]. Yine de özellikle medikal gereçler, ve

paketleme alanında umut verici sonuçların elde edildiği bir çok çalışma yapılmıştır [10], [11].

Geleneksel plastik, düşük üretim maliyeti ve kolay işlenebilirlik gibi özellikleri nedeniyle çok geniş bir alanda kullanılmaktadır. Fakat biyolojik tabanlı plastikler de gerekli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olduğunda birçok alanda kullanılabilir. Ambalajlama, yemek servisleri, otomotiv, tarım, kaplama malzemeleri ve inşaat sektörü gibi alanlarda biyoplastik kullanımı görülmektedir [12].

2.2. Polihidroksialkanoat

Bir çeşit biyobozunur plastik olan polihidroksialkanoat (PHA) ilk olarak Lemoigne [1] tarafından 1926 yılında bir bakteri türü olan *Bacillus megaterium*'da gösterilmiştir. Hidroksialkanoatların bir polimeri olarak çeşitli mikroorganizmalar tarafından azot, oksijen, fosfor ve kükürt gibi besin elementlerinin yokluğunda doğal olarak sentezlenir. Farklı karbon kaynaklarının stres koşulları altında bu bakteriler tarafından PHA granüllerine dönüştürüldüğü ve organizma tarafından enerji depolamak için kullanıldığı bilinmektedir. 300'den fazla mikroorganizmanın doğal olarak polihidroksialkanoat sentezi yapabildiği ve PHA granüllerini hücre içinde biriktirebildiği gösterilmiştir [13]. PHA, yapısal olarak farklı türevlere sahiptir. Çeşitli yapısal özellik gösteren PHA'lar farklı erime sıcaklığı, kristallik ve esneklik düzeyi, iletkenlik seviyesi gibi özelliklerde birbirlerinden ayrılırlar. Bu türevler sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çeşitli alanlarda kullanılmak üzere özelleştirilebilir.

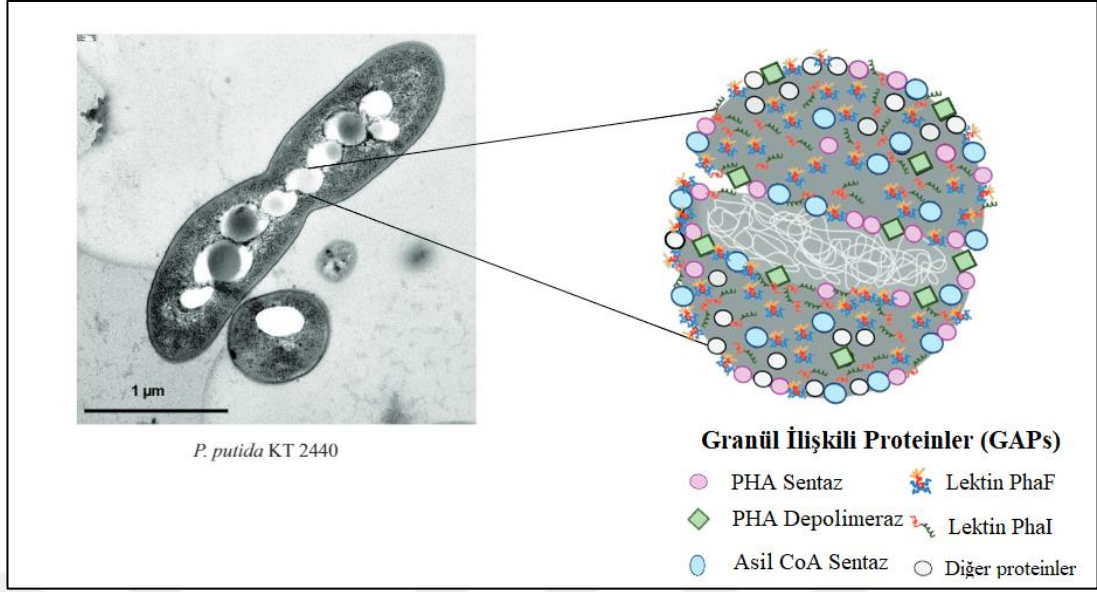
2.2.1. Polihidroksialkanoatın Özellikleri

Polihidroksialkanoat granülleri suda çözünmeyen yapıları nedeniyle hücre içinde intraselüler yağ granülleri şeklinde biriktirilmektedir. Hücre içinde biriktirilen PHA oranı, bazı organizmalarda hücre kuru ağırlığının %90'ına ulaşabilmektedir [14]. Bir polihidroksialkanoat molekülü çeşitli yan zincirlere ve 4-,5- konumlarında hidroksil gruplarına sahip yağ asidi monomerlerinden oluşmaktadır. PHA, türevine göre 300-35,000 yağ asidi monomeri içerebilir. Her bir monomer birimi genelde bir alkil grubuyla doyurulmuş R grubuna sahiptir. Aynı zamanda daha az yaygın

görülmesi koşuluyla doyurulmamış alkil grupları ve dallanmış alkil grupları da yan zincirlere dahil olabilmektedir [15], [16]. PHA, tek çeşit 3-hidroksi (3HA) yağ asidinden oluşuyorsa homopolimer; iki çeşit 3HA monomerinden oluşuyorsa kopolimer; birçok farklı 3HA monomerinden oluşuyorsa heteropolimer olarak isimlendirilir [17]. Oluşan polimerin moleküler ağırlığı sentezi yapan mikroorganizmaya göre farklılık göstermek üzere 2×10^5 - 3×10^6 dalton arasında değişmektedir [18].

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda PHA'nın granüler yapısı tam anlamıyla belirlenemese de PHA granüllerinin, molekül dışında tabaka oluşumundan ve yıkımından sorumlu çeşitli proteinlerle birlikte bir fosfolipit tabakayla kaplanmış şekilde bulunduğu bilinmektedir (Şekil 2.2), [21]. Bu durumun PHA granüllerinin su ile temasının önüne geçmek ya da hücre içi yapılar ve sitozolik proteinlerle etkileşime geçmesini engellemek için meydana geldiği varsayılmaktadır [14]. Sahip olduğu polyester çekirdek *in vivo* olarak amorf bir yapı sergilemektedir. Yapı belirlemeye dayalı yapılan çalışmalarda elektron mikroskopları da kullanılmış ve çekirdek yapısının 4 nm kalınlığında ve lipitten oluşan bir tabaka ile kaplı olduğu belirtilmiştir. PHA'nın camsı geçiş sıcaklıkları -50 ila 4 °C arasında değişirken erime sıcaklığı 40 ila 180 °C arasındadır.

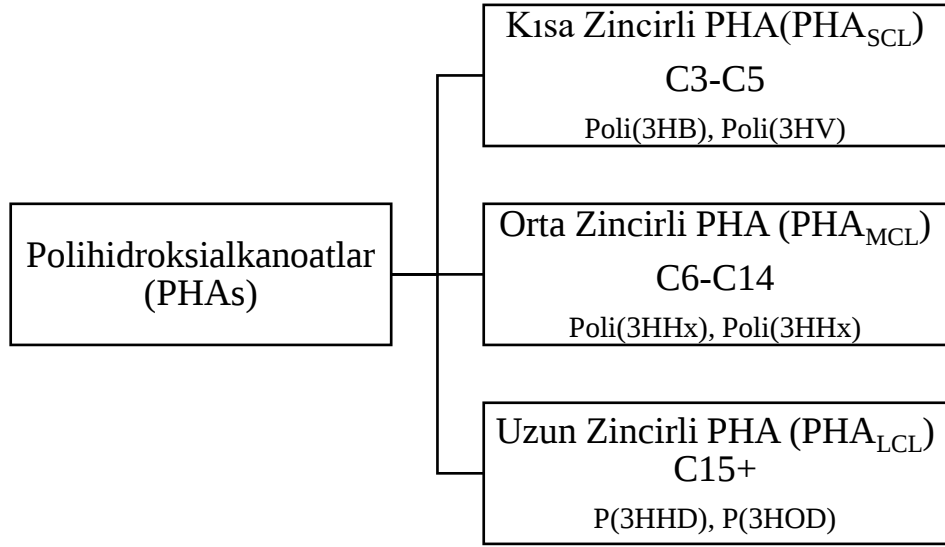
Bakteri içindeki PHA granüllerinin varlığı granüllerin çeşitli boyalarla boyanmasının ardından kolayca ortaya çıkarılabilmektedir. Lipit yapıdaki bu granüller Sudan siyahı (Sudan Black B), Nile kırmızısı (Nile Red) [19] ya da Nile mavisi (Nile Blue A) [20] gibi boyalar kullanılarak görünür hale getirilebilir. Optik ve floresan mikroskoplar kullanılarak boyama sonrasında kolay ve hızlı şekilde kalitatif sonuçlar elde edilebilmektedir.



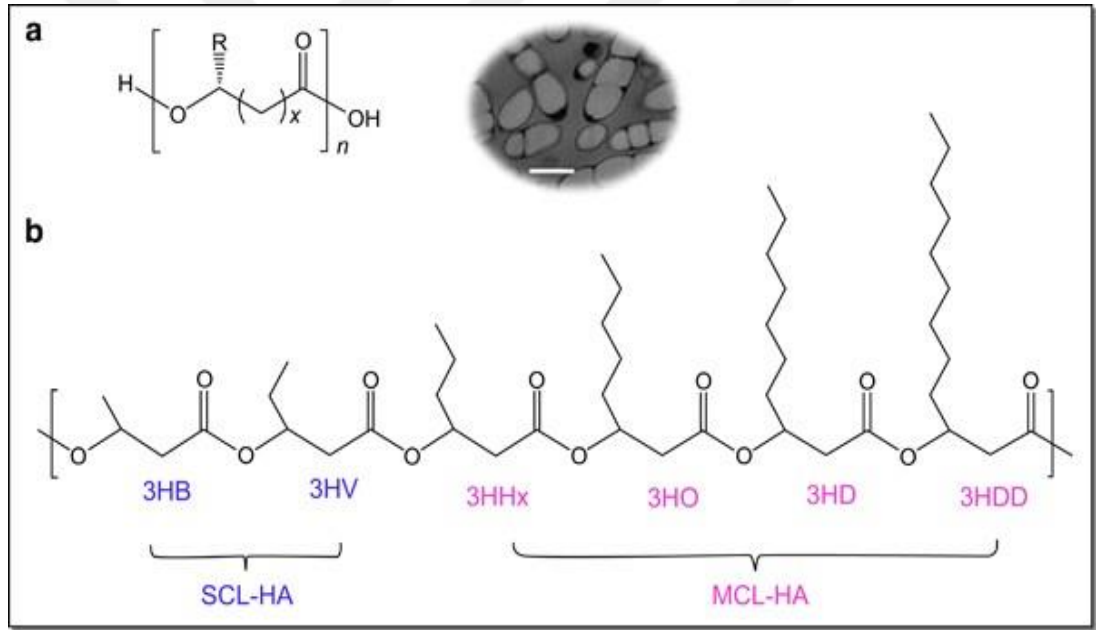
Şekil 2.2: Bakteri içindeki PHA granülleri ve granül oluşumuyla ilişkili proteinlerin şematik gösterimi.

2.2.2. Polihidroksialkanoat (PHA) Çeşitleri

PHA çeşitleri monomer tipleri, monomerlerin sıralanması, moleküler ağırlık gibi parametrelerden etkilenmektedir. PHA'lar sınıflandırılırken bir PHA molekülünün yapısında bulunan karbon atomunun sayısı baz alınır. Buna göre genelde “kısa zincir uzunluğuna sahip PHA’lar (scl-PHA)” ve “orta zincir uzunluğuna sahip PHA’lar (mcl-PHA)” olmak üzere iki ana grup altında incelenirler. Ancak “uzun zincir uzunluğuna sahip PHA (lcl-PHA)” olarak değerlendirilen PHA tipleri de bulunmaktadır [22]. Genellikle kısa zincirli PHA’lar (özellikle PHB doğada en sık rastlanılan çeşididir) yüksek kristal yapı ve düşük gerilme direncine sahiptir [23]. Kısa zincirli PHA’lar 3-5 karbon atomu ve orta zincirli PHA’lar 6-14 karbon atomundan oluşurken, uzun zincirli PHA’lar on beşten daha fazla karbon atomu içermektedir [16]. PHA’ların sınıflandırılması Şekil 2.3’te şematik olarak sunulmuştur. Şimdiye kadar 150’den fazla hidroksialkanoik asit, yapılan çalışmalarla PHA olarak tanımlanmıştır [24]. Bu PHA’ların basit yapıları Şekil 2.4’te [25] gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Sahip oldukları karbon sayısına göre PHA'ların sınıflandırılması.



Şekil 2.4: (a) PHA'ların genel formülü. (b) PHA_{SCL} ve PHA_{MCL}'ye örnek olarak verilebilecek en yaygın PHA monomerleri. 3HB: 3-hidroksibütirat, 3HV: 3-hidroksivalerat, 3HHx: 3-hidroksihekzanoat, 3HO: 3-hidroksioktanoat, 3HD: 3-hidroksidekanoat, 3HDD: 3-hidroksidodekanoat.

2.2.3. Polihidroksialkanoat Üretiminden Sorumlu Enzim ve Genler

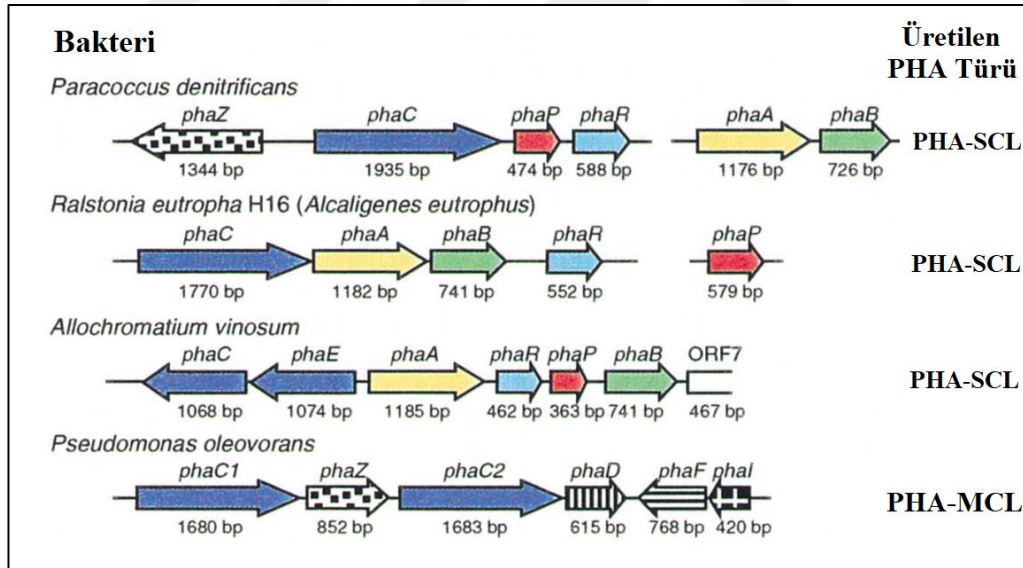
Hidroksialkanoat monomerlerinin polimerizasyonunu katalizleyen enzime “PHA sentaz” ismi verilmektedir. PHA polimerizasyon işleminde temel enzim olan PHA sentaz, PHA sentezi için substrat olarak R-(3) hidroksiasil-CoA'yı kullanır. Bu enzim PHA sentezinde görev alan temel enzimdir. PHA sentaz operonunun 1988’de keşfedilmesinden [26] sonra farklı mikroorganizmalara ait birçok PHA sentaz enzimi belirlenmiştir. PHA sentaz birincil yapısına, alt birimlerinin kompozisyonuna ve substrat spesifitesine göre dört temel sınıfa ayrılır [27]. Birçok farklı PHA sentaz, oldukça farklı hidroksialkanoat polimerleri üretir ve bu enzimlerin bazıları ısı direnci ve tuzluluk toleransı gibi özellikler gösterebilirler [28].

Sınıf I ve Sınıf II PHA sentaz 60-70 kDa moleküler ağırlığa sahip olup, yalnızca, PhaC olarak isimlendirilen, tek bir alt birimden oluşmaktadır. PhaC, Sınıf II’de PhaC1 ve PhaC2 olmak üzere iki alt birime daha ayrılır. Sınıf I PhaC, PHA_{SCL} üretiminden sorumluyken Sınıf II PhaC çoğunlukla PHA_{MCL} üretiminden sorumludur. PhaC, ilk keşfedilen ve üzerinde en çok çalışılan alt birimdir. Bir diğer grup olan Sınıf III PHA sentaz, heterodimer yapıya sahip olup PhaC ve PhaE olmak üzere iki alt birimden oluşur. Bu alt birimlerin her biri yaklaşık 40 kDa ağırlığa sahiptir ve *Allochromatium vinosum* ’dan elde edilmiştir. Kısa zincirli PHA’ların *in vivo* ve *in vitro* üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [29]. Sınıf IV’e ait PHA Sentaz enzimi heterodimer yapıya sahiptir. Yaklaşık 20 kDa ağırlığa sahip PhaC ve PhaR olarak isimlendirilen iki alt birimden oluşur. Sınıf IV PHA sentaz diğer sınıflara ait enzimlerden farklı olarak alkol kilivaj özelliği göstermektedir. Bu özellik, oluşan PHA’nın moleküler ağırlığının modifiye edilmesini sağlayabilir [30]. Sınıf IV PHA sentaz *Bacillus megaterium* tarafından temsil edilmektedir [31].

Yapılan çalışmalar 45 farklı bakteri türünde 59’dan fazla genin PHA sentezinde rol aldığını göstermiştir [32]. Bu genlerin en bilinen ve çalışılanları Tablo 2.1’de [32] gösterilmiştir. Genlerin bazı bakteri türlerindeki yerleşimi Şekil 2.5’de [27] gösterilmiştir [33]. PHA üretiminden sorumlu başlıca gen *phaC* olarak isimlendirilmektedir. Bu gen ne kadar korunmuş olsa da PHA sentazlardaki *phaC* geninin benzerliği sınırlıdır.

Tablo 2.1: PHA sentez yolağında kullanılan başlıca genler ve kodladıkları proteinler.

Gen İsmi	Kodlanan Protein
<i>phaA</i>	β -ketotiyolaz
<i>phaB</i>	NADPH-bağımlı asetoasetik-CoA redüktaz
<i>phaC</i>	PHA Sentaz
<i>phaD</i>	PHA _{MCL} üretiminde regülatör
<i>phaE</i>	PHA Sentaz Altünitesi
<i>phaF</i>	PHA _{MCL} granül üretim proteini
<i>phaJ</i>	(R)-Enoil-CoA hidrataz
<i>phaP</i>	PHA _{SCL} granül üretim proteini
<i>phaR</i>	PHA Sentaz Altünitesi
FabD	Malonil-CoA : ACP trans asilaz
FabG	NADHP bağımlı 3-ketoasil redüktaz



Şekil 2.5: PHA üretiminden sorumlu başlıca genlerin yerleşimi.

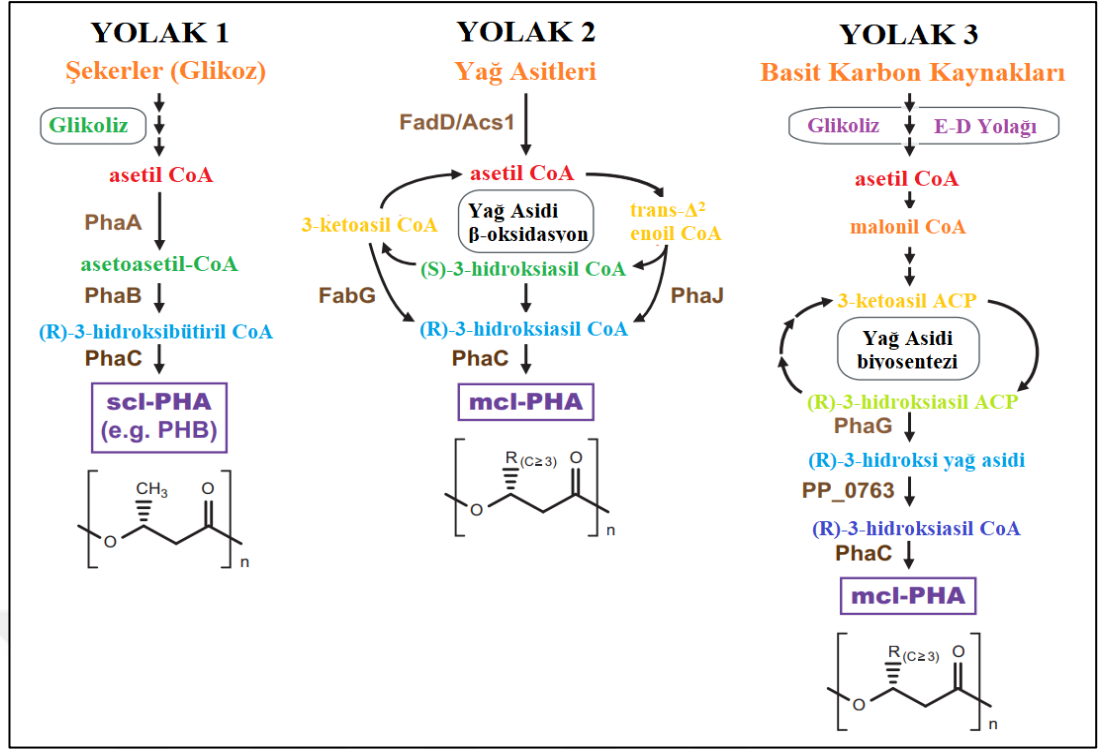
2.2.4. Polihidroksialkanoat Üretim Yolağı

PHA üretiminde 3 temel yolak bulunmaktadır. Bu yolaklar PHA üretiminde kullandıkları karbon kaynağına göre birbirlerinden ayrılırlar. İlk yolak kısa zincirli PHA (PHA_{SCL}) üretimi için kullanılır ve karbon kaynağı olarak çeşitli şeker moleküllerinin glikolize edilmesini içerir. Tipik olarak *Cupriavidus necator* tarafından kullanılan bir üretim yolağıdır. PHA_{SCL} elde etmek için phaABC operonunun yönettiği birkaç aşamalı yolak vasıtasıyla asetoasetil CoA sentezi sağlanır. Burada β-ketotiyolaz (*phaA*) devreye girer ve öncü iki asetil CoA molekülünü birleştirir. Oluşan asetoasetil CoA daha sonra asetoasetil CoA redüktaz (*phaB*) enzimi tarafından 3-hidroksibütiril CoA (3HB) molekülüne indirgenir. Ardından bu monomerler PHA sentaz (*phaC*) tarafından polimerize edilerek PHA_{SCL} üretim yolağı tamamlanır.

Diğer iki yolak, ilk yolağın aksine orta zincirli PHA (PHA_{MCL}) üretimi için kullanılmaktadır. Bu yolaklar genel olarak *Pseudomonas* sp. tarafından kullanılır. PHA_{MCL} yapısındaki uzun karbon gruplarını elde etmek için β-oksidasyon yolağı kullanılarak yağ asitlerinin bozunması sağlanır. Yolağın son aşamasında ilk yolakta olduğu gibi *phaC* aracılığıyla polimerleşme sağlanarak PHA oluşturulur.

Yolak 3, *de novo* yağ asitleri biyosentezini temel alarak PHA üretimini kapsar. Bu yolakta glikoz, fruktoz, gliserol, asetat ve etanol gibi basit karbon kaynakları kullanılır. Kaynakların çeşitliliği oluşacak olan 3-hidroksiasil türevlerinin de sayısının artmasını sağlamaktadır [34], [35].

Kısa ve orta zincirli PHA (PHA_{SCL}, PHA_{MCL}) sentezinde anahtar olarak değerlendirilen PHA sentaz, her üç yolakta da polimerizasyon görevini üstlenir ve sürecin olmazsa olmaz enzimidir. Süreçte yer alan tüm enzimler ve görevleri aydınlatılamasa da üretimde kullanılan yolaklar Şekil 2.6'da [34] sunulmuştur.



Şekil 2.6: Bakteriler tarafından PHA_{SCL} ve PHA_{MCL} sentezi için kullanılan yollar. Birinci yolak PHA_{SCL} sentezinde kullanılırken, kalan iki yolak PHA_{MCL} elde etmek için kullanılır.

2.2.5. Polihidroksialkanoat Üreticisi Mikroorganizmalar

PHA üretimi yapan mikroorganizmalar yer altı suları ve su tortuları, rizosfer, sediment, nehirler ve nehir çökeltileri gibi çok geniş alanlarda yayılım göstermektedir. Çeşitli karbon kaynaklarının kullanılmasıyla 70'den fazla bakteri ve arke cinsi, PHA üretimi yapabilmektedir [36]. Bu karbon kaynakları sakkaritleri, n-alkanları, n-alkanoik asitleri ve n-alkollerini içermektedir. Şimdiye kadar PHA üretiminin en çok görüldüğü bakteri grubu gram-negatif bakteriler olarak belirlenmiştir. Buna rağmen gram-pozitif bakterilerin de PHA ürettiği bilinmektedir. Ayrıca gram-negatif bakterilerle karşılaştırıldığında gram-pozitif bakterilerin PHA_{SCL} üretmeye daha yatkın oldukları gözlemlenmiştir. Gram-negatif bakteriler PHA üretiminde verim olarak daha avantajlı olsalar da lipopolisakkarit içermeleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda tercih edilmezler. PHA üreticisi gram-pozitif bakterilere örnek olarak *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microbunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* cinsleri

verilebilir. PHA üreticisi gram-negatif bakterilere ise *Azohydromonas*, *Burkholderia* ve *Cupriavidus* cinsleri örnek gösterilebilir [37].

PHA üretimi yalnızca bakterilerde değil arkelerde de görülebilmektedir. Ancak şimdiye kadar yapılan çalışmalarda yalnızca haloofil arkelerde PHA üretimine dair kanıtlar elde edilebilmiştir. *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Natrinema*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas*, ve *Natronorubrum* cinsi arkelerin PHA üretimi yapabildiği bilinmektedir. Büyük oranda homopolimer ya da heteropolimer PHA_{SCL} üretimini tercih ettikleri belirlenmiştir [37].

Doğal olarak PHA üretimi yapabilen çeşitli mikroorganizmaların yanı sıra *Escherichia coli* gibi genetik manipülasyona uygun bakteriler kullanılarak da PHA üretimi mümkündür. *E. coli*' de yapılan genetik manipülasyonla PHA biyosentezi ve yıkımından sorumlu genler ile inşa edilmiş plazmit kullanılarak verimli şekilde PHA üretimi yapılabileceği kanıtlanmıştır [38].

2.2.6. Polihidroksialkanoat Üretiminde *Bacillus*

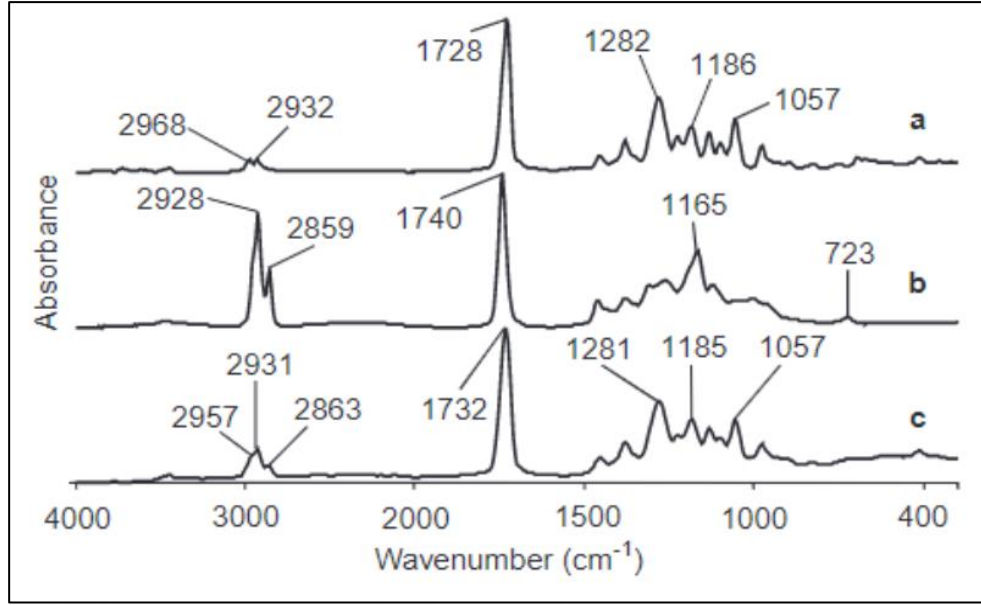
Bacillus cinsi bakteriler FDA (Food and Drug Administration) tarafından güvenli mikroorganizma olarak tanımlanmışlardır. Bu özellikleri sayesinde biyomedikal gereçlerin yapımı, ilaç taşıma sistemleri gibi özellikle biyolojik uygulamalarda kullanımları yaygındır [39]. *Bacillus* cinsi bakteriler, daha hızlı üretim süreleri, genomik kararlılıkları ve endotoksin içermeyen PHA'ların üretimi için uygun özellikler sergilemeleri nedeniyle biyoplastik üretim araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. *Bacillus* aracılığıyla PHA üretimi yapıldığında verim %10-%70 arasında değişmektedir. *Bacillus* cinsleri substrat olarak farklı kaynaklar kullanıldığında kopolimer üretimi de yapabilmektedir. *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B.sphaericus*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *B.mycoides* gibi türlerle de PHA üretimi daha önceden çalışılmıştır. Singh ve arkadaşları tarafından yayınlanan derlemede *Bacillus* aracılı PHA üretimi genel hatlarıyla değerlendirilmiştir [40].

2.2.7. Polihidroksialkanoatın Nitelendirilmesi

Bakteriyel PHA'nın nitelendirilmesi için birçok farklı yöntem kullanılabilmektedir. Bu yöntemlerin bazıları kimyasal tanı yöntemleri iken bazıları moleküler tanı yöntemleri olarak değerlendirilebilir. PHA'nın mikroorganizmadaki varlığının kanıtlanması için kullanılan yöntemler; çeşitli boyama metotları, elektron mikroskopisi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), FISH ya da flow sitometri, UV spektroskopisi, fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), raman spektroskopisi, biyosensörler, gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS), nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve iyon değişim kromatografisidir (IEC) [41]. Bu yöntemler arasında en sık kullanılanları Sudan siyahı (Sudan Black B) ve Nil kırmızısı (Nile Red) boyaları kullanılarak yapılan boyamalar, FTIR, NMR, DSC ve HPLC analizleridir.

2.2.8. PHA Karakterizasyonunda FTIR Analizi

FTIR analizi organik bileşiklerin yapı çözümlemesinde sıklıkla başvuru alan yöntemlerden biridir. Bakteriyel üretiminden sonra elde edilen bileşiğin PHA olarak nitelendirilmesi ve farklı yapıdaki PHA'ların birbirinden ayrılması için de kullanılmaktadır [42]. Elde edilen bileşiğin FTIR ile PHA olarak değerlendirilebilmesi için analiz sonucunda elde edilmesi gereken karakteristik pik noktaları bulunmaktadır. Bu pik noktalarından en ayırt edicisi karbonil grubudur. Yapılan çalışmalara göre PHA_{SCL} için 1732 cm⁻¹, PHA_{MCL} için 1744 cm⁻¹, PHA_{SCL-MCL} içinse 1739 cm⁻¹ noktasında alınan pikler karakterizasyon için anahtar rol oynar (Şekil 2.7) [43].

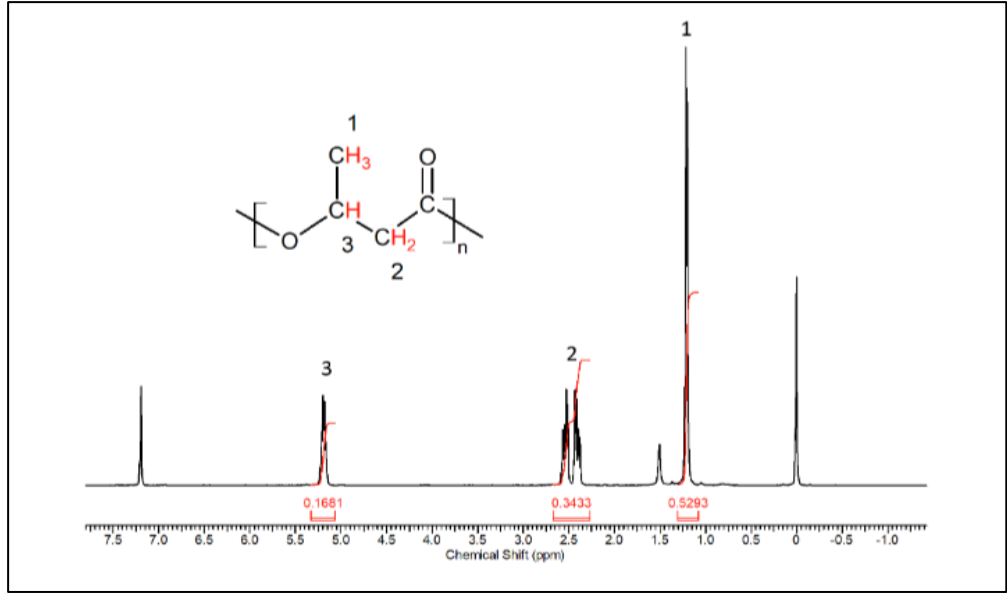


Şekil 2.7: Farklı bakteri kaynaklarından ekstrakte edilmiş polihidroksialkanoatların FTIR analizi. Ekstraksiyonun yapıldığı bakteriler a: *Azotobacter vinelandii*; b: *Pseudomonas mendocina*; c: *Pseudomonas pseudoalkaligenes*.

2.2.9. PHA Karakterizasyonunda NMR Analizi

PHA'nın monomerik yapısı ve dağılımı NMR ile karakterize edilebilmektedir. Bunun için ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR olmak üzere başlıca iki NMR tekniği kullanılmaktadır. Doğada proton atomunun fazla bulunması nedeniyle ^1H -NMR daha hızlı ve hassas sonuçlar vermektedir. Analiz süresi uzun olmasına rağmen ^{13}C -NMR, uzun karbon zincirlerine sahip PHA monomerlerinin incelenmesinde daha iyi sonuçlar vermektedir. PHA için yapılan NMR analizlerinde çözücü olarak döterokloroform CDCl_3 kullanılmaktadır [37].

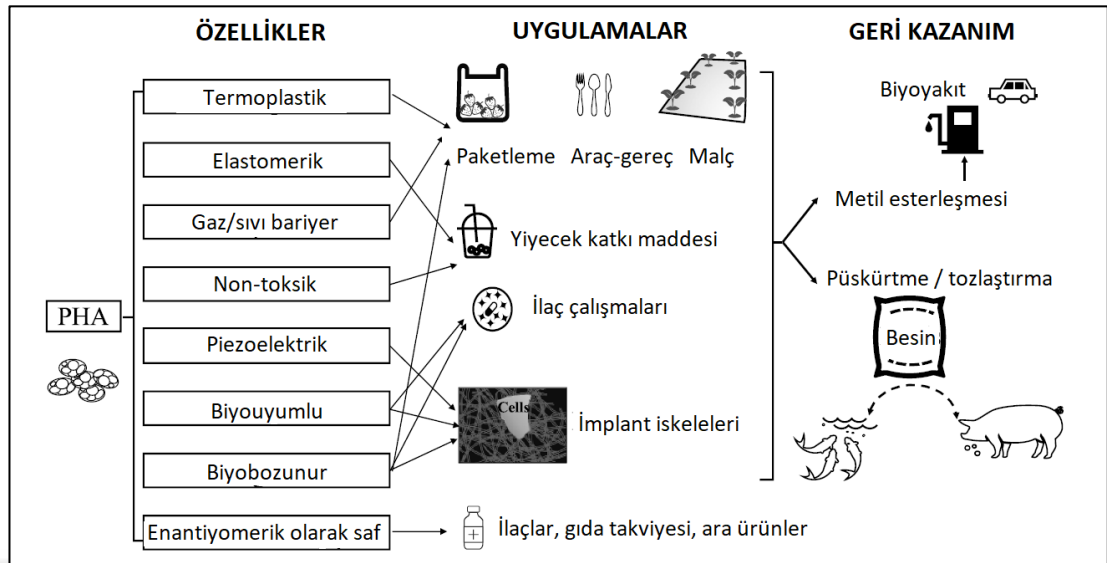
NMR analizinde PHA'nın karakteristik piklerinden ilki 1.20 ppm'de görülen ve 3-hidroksibütiratın yan zincirlerinden olan metil protonlarına aittir. 2.24-2.69 aralığında ise diastereotopik proton atomlarından gelen karakteristik pik gözlemlenir. Bir diğer pik ise 5.19 ppm'de bulunur ve metilen grubuyla ilişkili dörtlü yapıya karşılık gelir (Şekil 2.8) [44], [45].



Şekil 2.8: Kloroform kullanılarak hazırlanmış PHA ¹H-NMR sonucu.

2.2.10. PHA'nın Kullanım Alanları ve Geleceği

Biyolojik olarak elde edilen ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, elektronik, kozmetik, biyomedikal, tarım ve ambalaj endüstrisi gibi farklı türdeki uygulamalar için uygun özellikler sergilerler. Özellikle biyoyuymumluluğu yüksek olan PHA'lar yapılarına farklı polimer ve inorganik enzimler eklenip mekanik özellikleri iyileştirilerek çok çeşitli alanlarda kullanılabilmektedir. Bu durum, biyolojik olarak parçalanabilen plastiklere yönelik küresel talebin neredeyse 700.000 ton değerine ulaşmasını sağlamıştır [46]. PHA, tarım ve sağlık endüstrisi gibi temel birçok alanda kullanılabilmektedir. Biyoyumlu yapısı nedeniyle, bu çeşitli uygulama alanları arasında en çok ilgi gösterilenleri ve üzerinde çalışılanları ise sağlık ve farmasötiktir. PHA'nın sahip olduğu temel özellikler [47] ve ilişkili PHA uygulamaları Şekil 2.9'da gösterilmiştir. Farklı PHA kopolimerlerinin termal özelliklerinin değişken olması nedeniyle farklı uygulama alanlarına özelleşmiştir. Genel erime sıcaklıkları olan 170 °C'ın üzerinde yapılarında bozulma meydana gelir ve krotonik asit oluşturma ihtimallerinde artış gözlemlenir [46]. Bu durum yüksek sıcaklıklara maruz kalmaları durumunda PHA temelli plastiğin kullanımını engeller niteliktedir. Ancak yüksek ısıya dayanıklı diğer plastikleştirici malzemelerle güçlendirildiklerinde bu durumun önüne geçilebilmektedir. PHA'nın çeşitli uygulama alanları Tablo 2.2'de [47] özetlenmiştir.



Şekil 2.9: PHA'nın sahip olduğu temel özellikler ve entegre edilebileceği alanlar.

PHA üretimi son yıllarda kayda değer şekilde önem kazansa da üretim maliyetlerinin çok yüksek olması ve elde edilen materyalin kimi zaman gerekli fiziksel ve kimyasal özellikleri gösterememesi biyoplastik üretiminin hala geliştirilebilir olduğunu göstermektedir. Üretim maliyetini düşürmek ve alternatif PHA türevleri oluşturmak için bir çok firma çalışmalar yapmış ve yapmaya devam etmektedir [48].

Tablo 2.2: Gerçekleştirilen bazı PHA uygulamaları.

Ürün	Bakteri / Kaynak	Uygulama	Referans
Polihidroksibütirat (PHB)	Bilinmiyor	Mide duvarı yaması	[48]
Polihidroksialkanoat (PHA _{MCL})	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	İlaç taşıyıcı sistem, protein pürifikasyonu	[49]
PHA boncukları (PHA-bead)	<i>Escherichia coli</i>	Rekombinant protein üretimi	[50]
Polihidroksibütirat-valerat	<i>Lactococcus lactis</i>	Hepatit-C ilaç taşıyıcı sistem	[51]
	<i>Ralstonia eutropha</i> B5785	Medikal dikiş ipi	[52]
	Sigma-Aldrich Company	Miyokardiyal yama	[53]
Polihidroksibütirat (PHB)	Biomer and Roth	Doku mühendisliği için iskele	[54]
Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat	Bilinmiyor	Yapay kan damarı ve kalp kapakçığı	[55]

3.GEREÇLER

3.1 Kullanılan Sarf Malzemeleri

Tablo 3.1: Kullanılan Sarf Malzemeleri.

Kullanılan Malzemeler	Üretici Firmalar
1000 bp DNA belirteci	Thermo Scientific SM0243
Agar	BD 214010
Agaroz	SIGMA A6013
Akrilamit	SIGMA A8099
Aseton	MERCK 100013
Asetonitril	CARLO ERBA 401201
CaCl ₂	SIGMA C3306
CoCl ₂	SIGMA C2644
CTAB (setil trimetil amonyum bromid)	SIGMA H6269
CuCl ₂	SIGMA C6641
DMSO (Dimetil sülfoksit)	SIGMA D5879
Etanol	J. T. BAKER 8228
Filtre kâğıdı (Whatman no.1)	WHATMAN
Fruktoz	SIGMA
Galaktoz	BIOCHEMIKA 48260
Glukoz	SIGMA G8270
KH ₂ PO ₄	MERCK 1.04877.1000
Maltoz	SIGMA M2250
Maya özütü	MERCK 1.03753
MgCl ₂	MERCK 105832
MgSO ₄ .7H ₂ O	SIGMA M2773
MnCl ₂ .4H ₂ O	MERCK 1.05917
NaCl	MERCK 1.06400.1000
NaMO ₄ . 2H ₂ O	SIGMA M1651
NH ₄ Ac	SIGMA A7262

Tablo 3.1: Devam.

NaHCO ₃	SIGMA S-7277
Na ₂ HPO ₄	SIGMA S9763
NaOH	MERCK 1.06462.1000
NiCl ₂ .6H ₂ O	SIGMA 654507
Nutrient broth	DIFCO 234000
N-ZAmin A	SIGMA C0626
Pepton	MERCK 107214
Rnase	INVITROGEN AP223
Sukroz	SIGMA S0389
My Taq DNA polimeraz	BIOLINE 201105

3.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2: Kullanılan cihazların listesi.

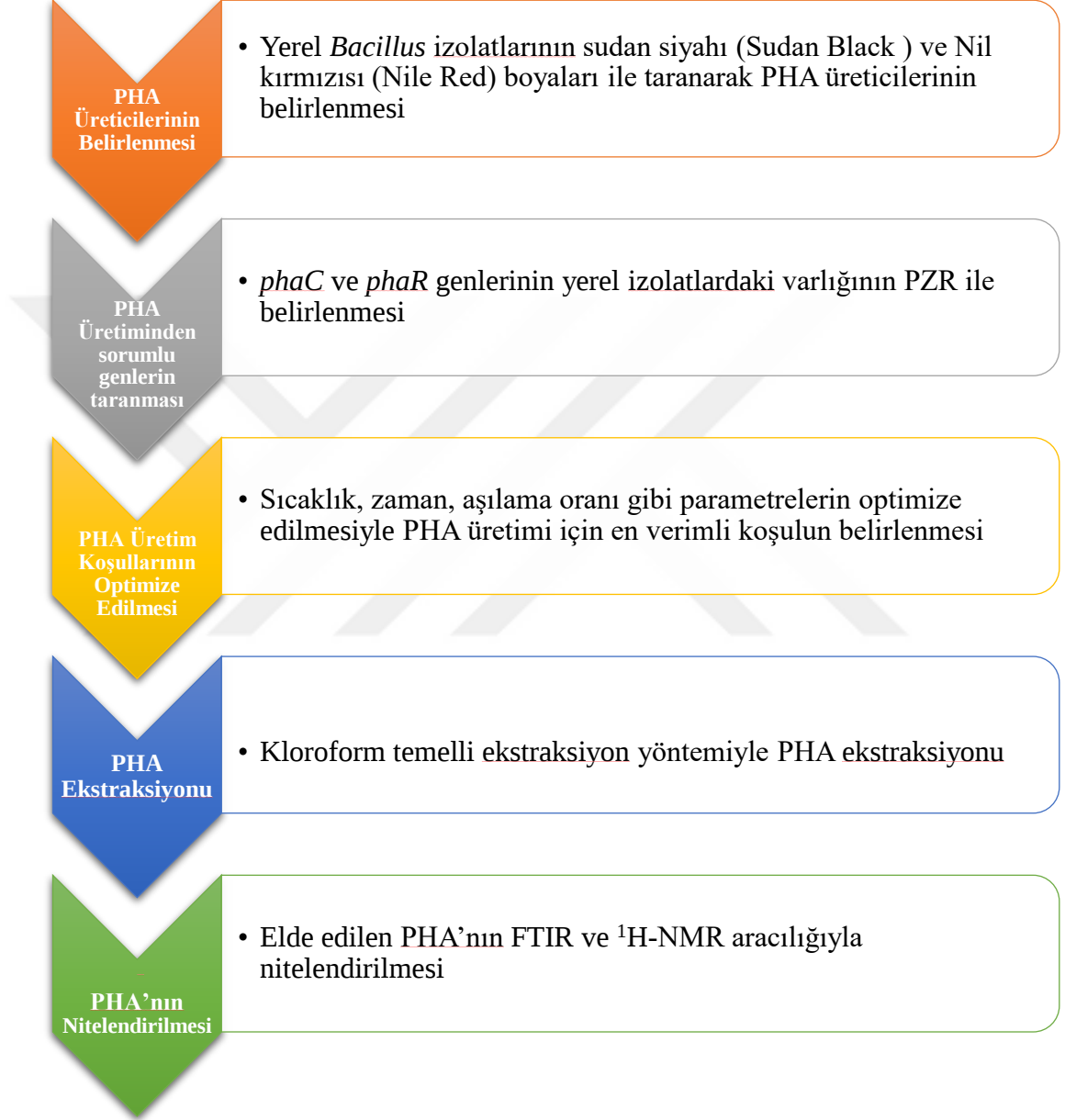
Kullanılan Cihazlar	Üretici Firmalar
+4 °C soğutucu	ARİSTON Nofrost
-20 °C dondurucu	ARİSTON Nofrost
-80 °C dondurucu	HERAEUS INSTRUMENT
96-kuyulu mikrolaka	TPP 92097
Agaroz jel elektroforez sistemi	BIOMETRA Agagel Mini
Buz makinesi	BREMA Ice Flaker
Çalkalamalı su banyosu	JULABO SW 21
Çalkalamalı su banyosu	GFL 1083
Etüv	BINDER ED115
Hassas terazi	SARTORIUS BL 210S
İnkübatör	EDMUND BÜHLER KS15/ TH15
Jel görüntüleme sistemi	VILBER LOURMAT
Jel kurutucu	BIORAD 583
Liyofilizatör	JOUAN RC 10.10

Tablo 3.2: Devam.

Liyofilizatör soğutucu motoru	JOUAN RCT 90
Liyofilizatör vakum motoru	ALCATEL Pascal 2005 C1
Manyetik karıştırıcı	HEIDOLPH MR 3001
Masa üstü soğutmalı mikrosantrifüj	HERAEUS Sepatech Biofuge 15R
Masa üstü soğutmalı santrifüj	BECKMAN COULTER Allegra 25R
Mikroplaka okuyucu	BMG Labtech Fluostar Omega
Mikrodalga fırın	BEKO 1550
Mikropipet 2 µl	GILSON
Mikropipet 20 µl	GILSON
Mikropipet 200 µl	GILSON
Mikropipet 1000 µl	GILSON
Mikrosantrifüj	BECKMAN COULTER Microfuge 18
Otoklav	HIRAYAMA Hiclave HVE 50
Otoklav	HIRAYAMA Hiclave HV 110L
pH metre	WTW Inolab pH Level 1
Pipet tutucu (şarjlı pipetör)	GILSON
Soğutmalı mikrosantrifüj	BECKMAN Coulter Microfuge 22R
Soğutmalı su banyosu	VWR 1160S
Spektrofotometre	BIORAD Smartspec 3000
Steril kabin	HERAEUS Herasafe HS 12
Tek kullanımlık steril filtre (0.22 µm)	SARTORIUS STEDİM 17597
Tek kullanımlık steril filtre (0.45 µm)	SCHLEİCHER&SCHUELL 10462200
Terazi	SARTORIUS BL 3100
Terazi	PRECISA 1200C
Termal döngü cihazı	BIOMETRA T3
Tüpler için soğutmalı santrifüj	HERAEUS Labofuge 400R
UV monitör (saflaştırma sistemi)	BIORAD
UV transillüminatör	VILBER LOURMAT TFX 20M
Vorteks	VORTEX GENIE 2

4.YÖNTEM

Çalışma boyunca uygulanacak olan yöntem bir şema halinde Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: Tez çalışması boyunca izlenen temel basamaklar ve içerikleri.

4.1. Kullanılan Besiyerleri ve İçerikler

Çalışmada kullanılan *Bacillus* soylarından PHA elde edebilmek için farklı besiyerleri ile çalışılmıştır. Besiyerleri kullanılmadan önce 121 °C’de 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Deneysel çalışma planına göre besiyerlerinin petri kaplarına aktarılması gerektiğinde otoklav işleminden önce %1,5 oranında agar eklenmiştir. Çalışma boyunca kullanılan besiyerlerinin içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

- Luria-Bertani (LB) Besi yeri (g/L):
 - Nutrient Broth 10g, Maya Ekstraktı 5g, NaCl 8g, Tris-Base 0,52g.
- Azot kaynağı azaltılmış Besi yeri (N2-Deficient) (g/L) [49]:
 - Glikoz 10g, Pepton 2.5g, Maya Ekstraktı 2.5g, NaCl 0.1g, KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄ 0.2g, pH 7.0
- Minimal Besi yeri (Mineral Salt Medium/ MSM) (g/L):
 - Glikoz 2g, NH₄Cl 0.5g, KH₂PO₄ 2.3g, Na₂HPO₄ 2.3g, MgSO₄.7H₂O 0.5g, NaHCO₃ 0.5g, CaCl₂ 0.01g, Ferrik Asit 0.5g, Eser element solüsyonu 5ml.
 - Eser Element Solüsyonu (g/L): ZnSO₄.7H₂O 0.01g, MnCl₂.4H₂O 0.003g, H₃BO₄ 0,003g, CoCl₂.7H₂O 0.02g, CuCl₂. 2H₂O 0.001g, NiCl₂.6H₂O 0.002g, NaMO₄. 2H₂O 0.003g.

4.2. Çalışmada Kullanılan İzolatlar

Çalışma kapsamında daha önce Türkiye’nin çeşitli yerel ekosistemlerinden elde edilmiş olup amilaz, proteaz veya lipaz üretkenlikleri bağlamında "A", "L" veya "P" şeklinde gruplandırılmış olan *Bacillus* izolatları kullanılmıştır. Yerel izolatların tamamı klasik mikrobiyolojik yöntemlerle tiplendirilmiş, seçilmiş bir kısmı ise TÜBİTAK projesi (105T-188) kapsamında moleküler yöntemler kullanılarak tiplendirilmiştir [50]. Bu izolatların PHA üreticisi olup olmadıkları değerlendirilirken pozitif kontrol olarak *Bacillus megaterium* DSM 32 suşu [51] negatif kontrol olarak ise *Escherichia coli* JM109 suşu kullanılmıştır.

4.3. Farklı Besi yerlerinde PHA Üretimi

PHA üretiminin gerçekleştiği besi yerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen ilk çalışmalarda “LB”, “azot kaynağı azaltılmış besiyeri (N₂-Def) ve “MSM” denenmiştir. Besiyerlerinin içerikleri 4.1. numaralı başlık altında belirtilmiştir. Karbon kaynakları eklenmeyen besiyerleri kullanılmadan önce otoklav cihazında steril edilmiştir. Otoklav işleminden sonra besiyerlerine eklenecek olan karbon kaynakları 0.22 µm por genişliğine sahip filtreler kullanılarak steril hale getirilmiş ve besiyerlerine eklemiştir. Optimizasyon aşamasına kadar PHA üretimi için kullanılan her besiyerinde üretim koşulları şu şekildedir:

- 150 ml hacme sahip steril erlenmeyere 30 ml ilgili steril besiyeri eklenmiştir.
- Hazırlanan ön kültürlerden %1 aşılama oranı kullanılarak aşılama yapılmıştır.

Örnekler 30°C’de, 150 rpm’de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir

4.4. PHA Üreticisi Soyların Kalitatif Olarak Belirlenmesi

Üretici soylar belirlenirken bakterilerin üretmiş olduğu lipid bazlı biyoplastiği boyamak için özelleşmiş boyalar kullanılmaktadır. Bu çalışmada da üretici soyların görsel olarak taranabilmesi için daha önce de çalışılmış olan sudan siyahı (Sudan Black B) ve nil kırmızısı (Nile Red) [52] boyaları kullanılmıştır.

4.4.1. Sudan Siyahı ile Üretici Soyların Taranması

Sudan Black B boyasının hazırlanması için 0.5 g Sudan Black B tozu tartılmış ve ışık geçirmeyen cam bir şişeye aktarılmıştır. Üstüne 100 ml %70 etanol eklenmiş ve boya tozu çözülene kadar karıştırılmıştır. Solüsyon ışık geçirmeyecek şekilde saklanmıştır [53].

Yerel *Bacillus* izolatları arasından PHA üreticisi olanların ayırt edilmesi amacıyla hazırlanan Sudan Black B boyası kullanılmıştır. Bunun için öncelikle steril LB Agar çözeltisi hazırlanarak petri kaplarına dökülmüş, besiyerinin donmasının ardında 76 adet *Bacillus* izolatının -20 °C gliserol stoklarından 10 µL alınarak agar üstüne çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Petriler 30°C’de 48 saat boyunca

inkübasyona bırakılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol C(+) olarak *B. megaterium* DSM32, negatif kontrol C(-) olarak *E. coli* JM109 suşları kullanılmıştır. 48 saatlik inkübasyonun ardından oluşan bakteri kolonileri Sudan Black B ile muamele edilmiştir. Bunun için petriye oluşan kolonilerin üstünü kaplayacak kadar (~10ml) sudan siyahı solüsyonu dökülmüştür. Petriler ışık geçirmeyecek şekilde kapatıldıktan sonra 30 dk boyunca sabit bir şekilde oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından solüsyon dikkatlice petri kabından uzaklaştırılmış ve yıkama işlemi için %96 EtOH hazırlanarak kolonilerin üstünü kaplayacak kadar petri kabına dökülmüştür. Petriler bu şekilde 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından EtOH ortamdan uzaklaştırılarak kolonilerin renk değişimi gözlemlenmiştir. PHA üretici soyların lacivert / siyah gözlemlenmesi, PHA üreticisi olmayan soyların ve negatif kontrolün de gri / beyaz gözlemlenmesi beklenmiştir.

4.4.2. Nile Kırmızısı ile Üretici Soyların Taranması

Nile kırmızısı boyasının hazırlanması: Konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde Nile kırmızısı tozu, DMSO içinde çözülmüş ve stok solüsyon hazırlanmıştır.

Nile kırmızısı ile PHA üreticisi soyların belirlenmesi için öncelikle azot kaynağı azaltılmış besiyerine (N₂-Def) %1 oranında agar eklenmiş ve otoklavlanarak steril hale getirilmiştir. Bu besiyerinden her petri kabını için 20 ml olacak şekilde ayrılmıştır. Besiyeri el yakmayacak sıcaklığa geldiğinde içine son konsantrasyonu 3.1 µg/ml olacak şekilde Nile kırmızısı solüsyonundan eklenmiştir. Boya ve besiyeri homojen olana kadar karıştırılmış ve besiyeri petrilere dökülmüştür. Besiyeri katılaştıktan sonra çalışılacak bakteri izolatlarının -20 °C gliserol stoklarından 10 µl alınarak çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Petri kaplarının üstü alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık bir ortam sağlanmıştır. Ardından petriler karanlık ortamda 72 saat boyunca 30°C’de inkübasyona bırakılmıştır [54].

4.5. *phaC* ve *phaR* Genlerinin Tespit Edilmesi

4.5.1. Genlere Ait Dizilerin Elde Edilmesi ve Çoklu Dizi Analizi

(Bu çalışmada gerçekleştirilen protokoller *phaC* ve *phaR* geni için ayrı ayrı uygulanmıştır.)

Bacillus türlerinde *phaC* ve *phaR* genlerinin varlığı, şimdiye kadar yapılmış çalışmalardan elde edilen bu genlere ait bilgiler doğrultusunda NCBI/GenBank veritabanı kullanılarak taranmıştır. Tarama sonucunda elde edilen *phaC* ve *phaR* genlerine ait nükleik asit sekansları FASTA formatında indirilmiştir.

Bu sekanslar EMBL-EBI/ MUSCLE / Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), Multiple Sequence Alignment programı kullanılarak birbiriyle hizalanmıştır. Bu işlem *phaC* ve *phaR* genleri için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

MUSCLE / Clustal Omega [55] programından elde edilen sonuçlarda bir gene ait farklı *Bacillus* izolatlarından elde edilen sekansların birbiriyle olan “benzerlik” (similarity) ve “özdeşlik” (identity) oranları analiz edilmiştir. Dejenere primer hazırlanacağı için yüksek “özdeşlik” bulunan bölgeler belirlenmiştir. Tasarlanacak primerlerin, aynı anda taranacak farklı suşların sekansına komplementer olabilmesi için bu bölgelerden hazırlanmasına dikkat edilmiştir.

4.5.2. MEME Suite Programı ile Genlerde Motif Taraması

Bu genlerin farklı *Bacillus* suşlarında sahip olduğu tekrarlı dizileri (motif) bulmak amacıyla NCBI / MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>) [56] programı kullanılmıştır. Programa, her gen için elde edilen sekanslar FASTA formatında yüklenmiştir. Programa ait veri gönderme formunda “Classic Mode”, “DNA, RNA or Protein”, “One Occurrence Per Sequence (oops)” seçenekleri tercih edilmiş ve 4 adet motif tarayacak şekilde program çalıştırılmıştır.

4.6. Genomik DNA İzolasyonu

4.6.1. CTAB Yöntemi ile gDNA İzolasyonu

gDNA ekstraksiyonu için çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatlarının -20°C gliserol stoklarından 2ml LB besiyerine %1 aşılama yapılmış ve bir gece boyunca 37°C’de büyümeye bırakılmıştır.

- Bir gece büyütülen bakteri kültürü 8000g’de 5 dakika santrifüj edilip üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Elde edilen pelet 567 µl TE Buffer ile pipetlenerek çözülmüştür.
- Çözeltinin üstüne 30 µl %10 SDS; 3 µl 20mg/ml konsantrasyona sahip Proteinase K enzimi eklenmiştir. Proteinase K enziminin son konsantrasyonunun 100 µg/ml; SDS çözeltisi içinse son konsantrasyonun %0,5 olmasına dikkat edilmiştir.
- Karışım 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyonun ardından 100 µl 5M NaCl eklenmiş ve karıştırılmıştır. Ardından 65°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Çözeltiye eşit hacimde (700 µl) kloroform/isoamilalkol (24:1) eklenmiş ve karıştırılmıştır.
- Çözelti 13,000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve akışkan üst sıvı temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Karışımın üstüne eşit miktarda fenol/kloroform/isoamilalkol (25:24:1) eklenmiş ve tüp alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Karışım 13,000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve oluşan fazlardan üst faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
- Elde edilen üst fazın 0.6 hacmi kadar izopropanol eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 13,000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Oluşan pelete zarar vermeden üst sıvı vakum yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Elde edilen gDNA 50 µl %100 EtOH ile yıkanmış ve EtOH ortamdan uzaklaştırılmış.
- Pelet evaporatörde 15 dakika kurutulduktan sonra 50 µl ampul su içinde çözülmüş ve -20°C’de stoklanmıştır.

4.6.2. “PureLink/Invitrogen gDNA İzolasyon Kiti” ile gDNA İzolasyonu

gDNA ekstraksiyonu için çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatlarının -20°C gliserol stoklarından 3ml LB Broth besiyerine %1 aşılama yapılmış ve bir gece boyunca 37°C’de büyümeye bırakılmıştır.

PureLink gDNA İzolasyon Prosedürü:

- Bir gece büyütülen kültür 4000rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir.
- Üst sıvı uzaklaştırılmış ve kalan pelet 180µl “lysozyme digestion buffer” ile pipetaj yapılarak çözülmüştür.
- Çözelti 37°C’de 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- 20 µl “Proteinase K” eklenmiş ve tüp alt üst edilerek karışım homojen hale getirilmiştir.
- Bu karışıma 200 µl “PureLink Genomic Lysis-Binding Buffer” eklenip tüp alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Homojen hale getirilen karışım 55°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Karışıma %96-100 EtOH eklenmiş ve homojen olana kadar karıştırılmıştır.
- Hazırlanan lizat “PureLink Spin Column”a aktarılmıştır.
- Kolon 10,000g’de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. (Tüm materyal “collection tube (toplama tüpü)” içinde birikene kadar işlem tekrar edilmiştir.)
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmıştır.
- Kolona 500 µl “Wash Buffer 1” eklenmiş ve 10,000g’de 1dk boyunca santrifüj edilmiştir.
- Toplama tüpü uzaklaştırılmış ve kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Ardından 500 µl “Wash Buffer 2” eklenmiş ve maksimum hızda 3 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve üstüne 50 µl “Elution Buffer” eklenmiştir. Oda sıcaklığında 3-4 dakika inkübe edilmiş ardından maksimum hızda 3dk santrifüj edilmiştir.

4.6.3. “QIAGEN gDNA İzolasyon Kiti” ile gDNA İzolasyonu

gDNA ekstraksiyonu için çalışmada kullanılan *Bacillus* izolatlarının -20°C gliserol stoklarından 3ml LB Broth besiyerine %1 aşılama yapılmış ve bir gece boyunca 37°C’de büyümeye bırakılmıştır.

- Bir gece büyütülen kültür 7500 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Oluşan pelet 180 µl TE-Lizozim (20 mg/ml) içinde pipetlenerek çözülmüş ve 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Inkübasyon sonrasında 20 µl Proteinase K enzimi ve 200 µl “AL Buffer” eklenip karıştırılmış ve short-spin yapılmıştır.
- 200 µl %96-100 EtOH eklenmiş ve karıştırılmış ve short-spin yapılmıştır.
- İçinde presipitat oluşan karışım “Collection tube (toplama tüpü)” ile bütünleşmiş haldeki “QIAGEN Spin Column”a aktarılmıştır. Ardından 6000g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon, yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve kolona 500 µl “AW1 Buffer” eklenip 6000g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon tekrar yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiş kolona 500 µl “AW2 Buffer” eklenip maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilip üzerine 50 µl “AE Buffer” eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Ardından 6000g’de 2 dakika santrifüj edilip elde edilen gDNA -20°C’de stoklanmıştır.

4.7. Primer Tasarımı

phaR ve *phaC* genlerinin çalışmada kullanılan suşlardaki varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılması için birden fazla suşda kullanılmak üzere dejenere primer tasarlanmıştır. Tasarım yapılırken dikkat edilmesi gereken noktalar şu şekildedir:

- Tasarlanan primerlerin uzunluğu yaklaşık 15-30 baz kadar olmalıdır.

- Primerlerdeki G ve C baz oranının %30'un altına düşmemesine ve %60'ın üzerine çıkmamasına dikkat edilmelidir.
- Tasarlanan primer çiftlerinin erime sıcaklıklarının (T_m) birbirine eş ya da aralarında maksimum 5-8 °C fark olmasına dikkat edilmelidir.
- Primerlerin 3' ucunda üçten fazla G ya da C bazı bulunmamasına dikkat edilmelidir.
- Primerlerin kendi içinde ya da İleri ve Geri Primer arasında ikincil bir yapı oluşturmaması için baz dizilimlerine dikkat edilmelidir.
- Primerin 3' ve 5' uçlarında dejenerasyon olmamasına dikkat edilmelidir.

Dejenere primer tasarımı sırasında MUSCLE/Clustal Omega programı kullanılarak yapılan hizalamanın ardından her bir gen için *Bacillus* cinsine ait farklı suşlardan elde edilen dizilerdeki en korunmuş bölgeler tercih edilmiştir. Kullanılan primer çiftleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: *phaC* ve *phaR* genlerinin PZR çoğaltılması için kullanılan primerler.

Primer	Dizi (5'-3')	Baz Sayısı	T_m (°C)	GC (%)
<i>phaC</i> - CF	CGYGGTTTTGATGTRTATWTGC	22	54.7	36.3
<i>phaC</i> - CR	GATARAARTCACGAATCCAYTG	22	52.8	31.8
<i>phaR</i> - RF	GTGATTGATCAAAAATTCGATCC	23	55.3	34.8
<i>phaR</i> - RR	GTTTHGCTAGTACTGCATTTTGC	23	57.1	39.1
<i>phaR</i> - RFM	GTAAATGAAGTAACGGGGCGCT	22	61.2	50
<i>phaR</i> - RRM	CTTCTGCCTTTGGCTTTTCAGC	22	60.8	50

4.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

phaC ve *phaR* genlerinde çoğaltılmak istenen bölgeler termal döngü cihazı kullanılarak PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PZR reaksiyonunda kullanılan reaksiyon tamponu gerekli dNTP ve $MgCl_2$ içeriğine sahiptir. PZR reaksiyonu için kullanılan bileşikler ve miktarları Tablo 4.2'de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.2: PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve kullanılan miktarlar.

Bileşenler	Kullanılan Miktar
5X TaqPolimeraz Buffer	5 µl
İleri Primer (5 µM stok)	1 µl
Geri Primer (5 µM stok)	1 µl
MyTaq DNA Polimeraz (0.5 U)	1 µl
Kalıp DNA* (10 ng)	1 µl
Steril dH ₂ O	16 µl

*Kalıp DNA 100 ng konsantrasyona dilüe edilip kullanılmaktadır.

PZR için gerekli döngü ve sıcaklık koşulları optimize edilmiş ve şu şekilde kullanılmıştır:

Tablo 4.3: PZR’da kullanılan sıcaklıklar ve döngü sayıları.

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürleme	94°C	5 Dakika	1
Denatürleme	94°C	1 Dakika	25
Tutunma	50°C	30 Saniye	
Uzama	72°C	1 Dakika	
Uzama	72°C	10 Dakika	1
	4°C	∞	1

4.9. PHA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon yöntemini belirlemek amacıyla Law ve Slepecky [57] tarafından uygulanan ekstraksiyon yöntemi modifiye edilmiştir. Protokol şu şekildedir:

Protokolün ön aşaması olarak PHA ekstraksiyonu yapılacak olan suşa ait -20 C gliserol stoğundan LB Agar üzerine çizgi ekim yapılmıştır. Bir gece 37°C’de inkübe edilen petride oluşan tek kolonilerden biri seçilerek 2 ml LB içinde ön kültür başlatılmış ve 37°C’de 150 rpm’de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün 150 ml hacme

sahip erlenmeyere 1/5 havalandırma oranını elde edecek şekilde 30 ml N₂-Def besi yeri eklenmiş ve ön kültürden %1 aşılama yapılarak, kültür 30°C’de 150 rpm’de 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ekstraksiyon protokolü [57]:

- Kültürden 10 ml örnek PHA ekstraksiyonu için, 10 ml de kuru ağırlık belirlenmesi için uygun tüplere ayrılmıştır.
- Örnekler 8000g’de 15 dakika ya da 4000g’de 30 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı pelete zarar vermeden vakum yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Kuru ağırlık ölçümünde kullanılacak olan pelet 2 ml distile H₂O içinde çözülmüş ve boş ağırlığı önceden bilinen bir kaba aktararak 60°C’de 48 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır.
- Ekstraksiyon için kullanılacak pelet 3 ml %5 konsantrasyona sahip sodyum hipoklorit içinde homojen hale gelene kadar çözülmüş ve 37°C’lik su banyosunda 1 saat 15 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyonun ardından örnekler 10,000g’de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Pelet sırasıyla 300 µL distile H₂O, aseton ve dietil eter ile yıkanmıştır.
- Yıkamanın ardından pelet, kloroform 600 µL ile çözülüp arada vortekslenerek 60°C’lik su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir.
- Ardından karışım şırınga yardımıyla 0.45 µm’lik PTFE filtreler kullanılarak boş ağırlıkları önceden tartılmış mikrosantrifüj tüplerine filtre edilmiştir.
- Tüplerdeki kloroform, 60°C’lik evaporatör kullanılarak buharlaştırılmıştır.
- Tüplerin ağırlığı bu işlem后会 sonra tekrar ölçülmüştür.

Örneklerdeki PHA akümülayon miktarını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$[\text{Elde edilen PHA ağırlığı (g/L)} / \text{Kuru hücre ağırlığı (g/L)}] \times 100 = \% \text{ PHA Akümülayonu} \quad (4.1)$$

4.10. PHA Üretim Koşullarının Optimizasyonu

4.10.1. Sıcaklığın PHA Üretimine Etkisi

Sıcaklığın bakteriyel PHA üretimi üzerindeki etkisini görmek amacıyla 30°C, 37°C ve 40°C’de büyütülmek üzere bakteri kültürleri hazırlanmıştır. İlgili bakterinin ön kültürü 3 ml LB içinde 37°C’de 150 rpm’de bir gece inkübasyona bırakılarak hazırlanmıştır.

Çalışılan her bir sıcaklık değeri için 3 tekrarlı deney düzeneği kurulmuştur. 150 ml hacme sahip erlenmeyerlere 30 ml N₂-Def besi yeri eklenmiş ve ilgili ön kültür ile %1 oranında aşılama yapılmıştır. Kültürler 30°C, 37°C ve 40°C’de 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 72. saatte ilgili örneklerden PHA ekstraksiyonu yapılmış ve akümülayon oranları hesaplanmıştır.

4.10.2. İnkübasyon Zamanının PHA Üretimine Etkisi

İnkübasyon zamanının PHA üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla her 24 saatte bir değerlendirilmek üzere 24-120 saat aralığında deney düzeneği tasarlanmıştır. Deneyler tek bir ön kültürden başlatılmıştır. Ön kültür, petride büyütülen kolonilerden bir tanesinin LB içine aşılama ve 37 °C’de 150 rpm’de bir gece boyunca inkübe edilmesiyle elde edilmiştir.

Her bir 24 saatlik deney düzeneği için üç tekrarlı olmak üzere 150 ml hacme sahip erlenmeyerlere 30 ml N₂-Def besi yeri eklenmiştir. Ön kültürden %1 aşılama yapıldıktan sonra kültürler 30°C’de ve 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Her yirmi dört saatte bir ilgili örneklerden PHA ekstraksiyonu yapılmıştır.

4.10.3. Aşılama Oranının PHA Üretimine Etkisi

Aşılama oranının PHA akümülayonuna etkisini değerdendirmek amacıyla %1-10 aşılama aralığına sahip deney düzenekleri hazırlanmıştır. Bunun için ön költür önceki deneylerle eş koşullarda hazırlanmıştır. Bu optimizasyon deneyi için %1, %2, %5 ve %10 aşılama oranları kullanılmıştır. Her aşılama oranı için üç tekrar yapılmıştır. Költürler 30°C’de ve 150 rpm’de inkübasyona bırakılmış ve 72 saat sonra alınan örneklerden PHA ekstraksiyonu yaparak akümülayon değerdleri hesaplanmıştır.

4.10.4. Havalandırma Oranının PHA Üretimine Etkisi

Havalandırma oranının PHA akümülayonuna etkisini araştırmak amacıyla tasarlanan bu çalışmada deney düzenekleri hazırlanırken 1:2, 1:5 ve 1:8 havalandırma oranlarına sahip olacak şekilde erlenmeyerlere besiyeri eklenmiştir. Buna göre,

- 1:2 havalandırma için 150 ml hacme sahip erlenmeyere 75 ml N₂-Def
- 1:5 havalandırma için 150 ml hacme sahip erlenmeyere 50 ml N₂-Def
- 1:8 havalandırma için 150 ml hacme sahip erlenmeyere 20 ml N₂-Def besi yeri eklenmiştir.

Ardından költürler, ön költürler ile %1 oranında aşıllanmış ve 30°C’de 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. 72 saat sonra alınan örneklerden PHA ekstraksiyonu yapılarak akümülayon değerdleri hesaplanmıştır. Her örnek üç tekrar olacak şekilde hazırlanmıştır.

4.10.5. Çalkalama Hızının PHA Üretimine Etkisi

Çalkalama hızının PHA akümülyasyonuna etkisini değerlendirmek amacıyla 100 rpm, 150 rpm ve 200 rpm çalkalama hızlarına sahip deney düzenekleri hazırlanmıştır. Her bir deney düzeneği için üç tekrar kullanılmıştır. Kùltürler önceki deneylerden farklı olarak, havalandırma oranındaki optimizasyondan sonra 1:2 havalandırma oranı olacak şekilde hazırlanmıştır. Kùltürler farklı çalkalama hızlarında, 30°C’de ve 150 rpm’de inkübasyona bırakılmış ve 72 saat sonra alınan örneklerden PHA ekstraksiyonu yapılarak akümülyasyon değerleri hesaplanmıştır.

4.10.6. Farklı Karbon Kaynaklarının PHA Üretimine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının PHA üretimindeki etkisini araştırmak amacıyla beş farklı karbon kaynağı kullanılmıştır. Bunlar; glikoz, süktroz, galaktoz, laktoz ve maltozdur. Karbon kaynakları gerekli miktarlarda tartılmış daha sonra distile H₂O içinde çözülmüştür. Ardından sterilizasyon için 0.22 µm’lik steril filtrelerden geçirilmiş ve stoklanmıştır. Karbon kaynaklarının optimizasyon çalışması için hazırlanan kùltürler için üretim koşulları, önceki optimizasyon çalışmalarından sonra elde edilen en optimal şartlara göre seçilmiştir. Her karbon kaynağı için üç tekrarlı bir deney tasarlanmıştır. 100 ml hacme sahip erlenmeyerlere karbon kaynağı içermeyen 50 ml N₂-Def besi yeri ve son konsantrasyon %1 olacak şekilde karbon kaynakları eklenmiş, kùltürler ön kùltürler ile %1 oranında aşılanmış ve 30°C’de, 100 rpm’de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

4.10.7. Farklı Nitrojen Kaynaklarının PHA Üretimine Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının PHA üretimindeki etkisini araştırmak amacıyla organik ve inorganik azot kaynakları kullanılmıştır.

- Organik azot kaynakları: Pepton, maya ekstraktı, üre, proteaz pepton, tripton, NZ-Amin A.
- İnorganik azot kaynakları: Amonyum klorür, amonyum asetat, sodyum asetat, sodyum nitrat.

Azot kaynakları gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra distile H₂O içinde çözülmüştür. Ardından sterilizasyon için 0.45 µm'lik steril filtrelerden geçirilip stoklanmıştır. Her azot kaynağı için üç tekrarlı deney hazırlanmıştır. 100 ml hacme sahip erlenmeyerlere azot kaynağı içermeyen 50 ml N₂-Def besi yeri ve son konsantrasyon %1 olacak şekilde azot kaynakları eklendikten sonra kültürler ön kültürler ile %1 oranında aşılanmış ve 30 °C'de, 100 rpm'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

4.10.8. FTIR Analizi

Elde edilen biyopolimerin yapısını belirlemek amacıyla örneklerde Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi analizi yapılmıştır. Analiz için 10 mg PHA örneği kullanılmıştır. Analiz Gebze Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü bünyesindeki "Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR Spectrometer" cihazında 600-4000 cm⁻¹ spektrumunda gerçekleştirilmiştir.

4.10.9. ¹H- NMR Analizi

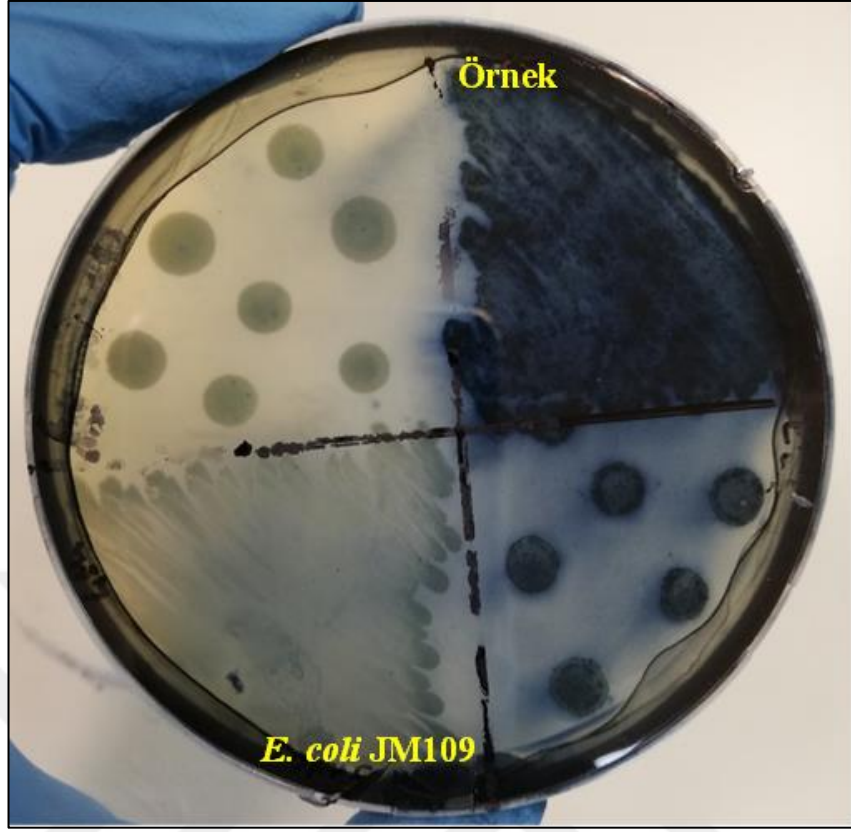
Elde edilen biyopolimerin yapısal özelliklerini analiz etmek amacıyla 10 mg PHA örneği kullanılarak Gebze Teknik Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı bünyesinde bulunan NMR cihazında ¹H-NMR analizi gerçekleştirilmiştir.

5. BULGULAR

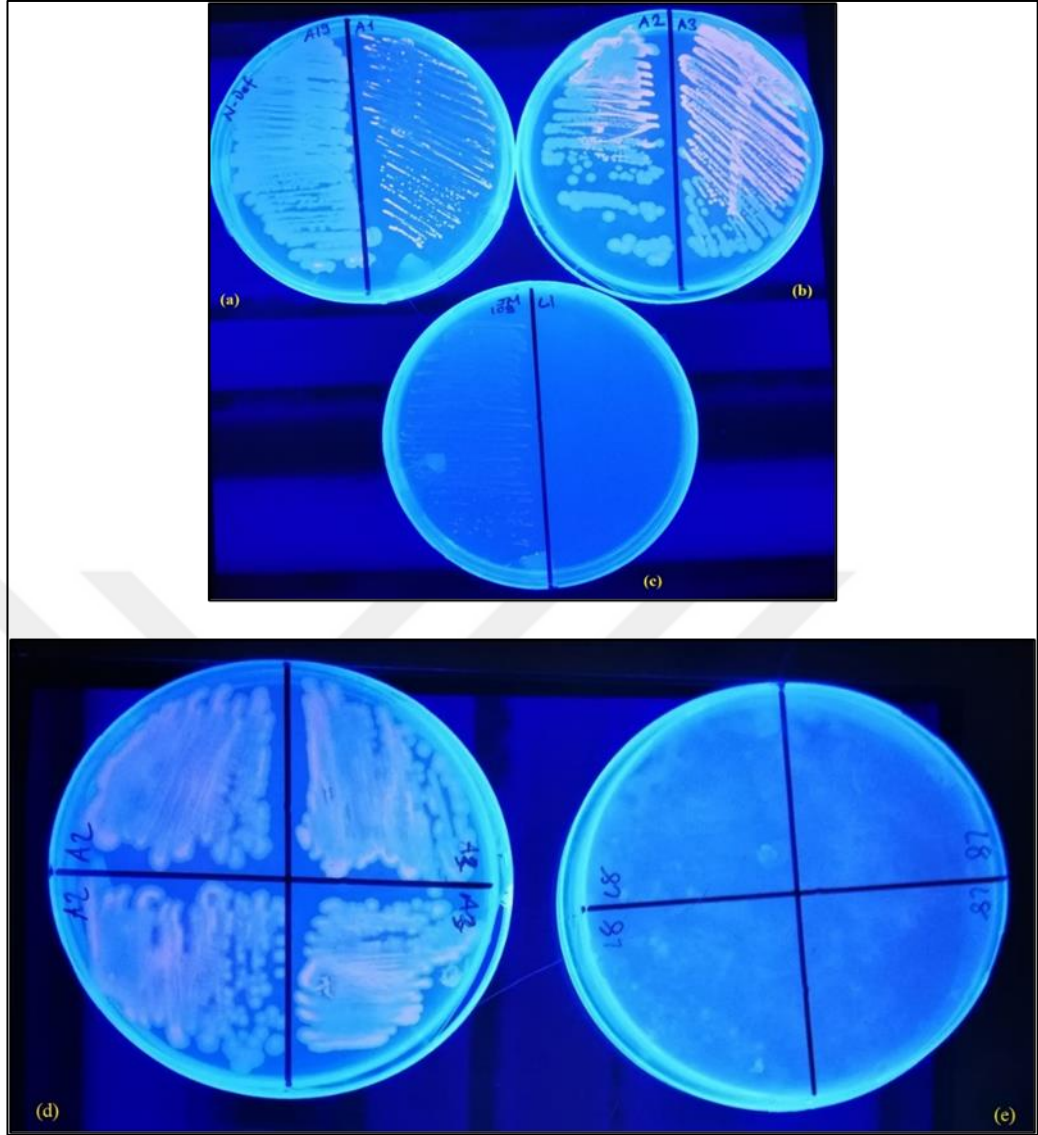
Bu çalışmada GTÜ-Enzim Moleküler Genetiği laboratuvarı bünyesinde bulunan yerel *Bacillus* izolatlarının polihidroksialkanoat üretme kabiliyetleri araştırılmıştır. Üretici soylar çeşitli boyama yöntemlerinin yanı sıra PZR gibi temel moleküler yöntemler de kullanılarak belirlenmiştir. Üretim verimini artırmak amacıyla inkübasyon sıcaklığı, çalkalama hızı gibi fiziksel değişkenler ile karbon ve azot kaynakları gibi besi yeri içerikleri optimize edilmiştir. Farklı lipid boyama yöntemleri ve PZR ile gen taramaları sonrasında 76 yerel soydan, boyamalarda pozitif sonuç veren ayrıca *phaC* ve *phaR* genlerine sahip olan 38 tanesi PHA üreticisi olarak değerlendirilmiştir.

5.1. Boyama Yöntemleri ile PHA Üreticisi İzolatların Belirlenmesi

Sudan siyahı ve Nil kırmızısı ile yapılan boyama işleminin ardından petrilerdeki bakteri kolonileri aldığı renge göre “üretici” ve “üretici değil” şeklinde değerlendirilmiştir. Sudan siyahı boyası bakteri içinde biriktirilen lipid yapılı PHA granüllerini siyah/mavi görünecek şekilde boyamaktadır. Böylece PHA üretimi gerçekleştiren bakteri kolonileri boyama işleminin ardından agar üstünde mavi şekilde görünürken, negatif kontrol olarak kullanılan *E. coli* JM109’a ait koloniler gri renkte gözükmemektedir. Boyamaya ait örnek bir görsel Şekil 5.1’de gösterilmiştir. Nil kırmızısı ile yapılan tarama sonuçları Şekil 5.2’de sunulmuştur. PHA üreticisi izolatlar UV ışık altında pembe şekilde parlarken negatif soylarda parlama gözlemlenmemektedir.



Şekil 5.1: Sudan siyahı (üst) boyaması sonrasında negatif kontrol (*E. coli* JM109) ve PHA üreticisi *Bacillus* izolatının petrideki görüntüsü. Örnek: *Bacillus* sp. A19.



Şekil 5.2: Nile, kırmızısı boyası kullanılarak yapılan tarama sonuçları. (a) *Bacillus* sp. A19 ve *Bacillus* sp. A1. (b) *Bacillus* sp. A2 ve *Bacillus subtilis* A3. (c) Negatif kontrol olarak kullanılan *E. coli* JM109 ve *Bacillus pumilus* L1. (d) *Bacillus* sp. A2 ve *Bacillus subtilis* A3. (e) *Bacillus subtilis* L8.

Tablo 5.1: *Bacillus* izolatlarının Sudan siyahı ile taranması sonucunda belirlenen PHA üreticisi soylar. Olası PHA üreticisi *Bacillus* izolatları (+) ile, üretici olmayanlar (-) ile gösterilmiştir.

A Grubu Örnekleri	Mavi Koloni	L Grubu Örnekleri	Mavi Koloni	P Grubu Örnekleri	Mavi Koloni
A1	+	L1	-	P1	-
A2	+	L2	-	P2	+
A3	+	L3	+	P3	-
A4	+	L4	+	P4	+
A5	+	L5	-	P5	-
A6	+	L6	+	P6	+
A7	-	L7	-	P7	+
A8	-	L8	+	P8	-
A9	+	L9	+	P9	-
A10	+	L10	-	P10	-
A11	+	L11	-	P11	-
A12	+	L12	-	P12	-
A13	+	L13	+	P13	+
A14	+	L14	+	P14	-
A15	+	L15	+	P15	-
A16	-	L16	-	P16	+
A17	+	L17	-	P17	-
A18	-	L18	-	P18	-
A19	+	L19	-	P19	+
A20	-	L20	+	P20	+
A21	-	L21	-	P21	-
A22	-	L22	+	P22	-
A23	-	L23	+	P23	-
A24	-			P24	+
A25	-				
A26	-				
A27	+				
A28	+				
A29	-				

Sudan siyahı boyama yönteminin 76 adet yerel *Bacillus* izolatına uygulanmasının ardından elde edilen verilere göre PHA üreticisi olabilecek soylar Tablo 5.1’de gösterilmiştir. “Mavi Koloni” olarak değerlendirilen izolatlar potansiyel PHA üreticisi olarak öngörülürken, boyanmayan koloni olarak değerlendirilenlerin PHA üretim potansiyeli olmadığı öngörülmüştür.

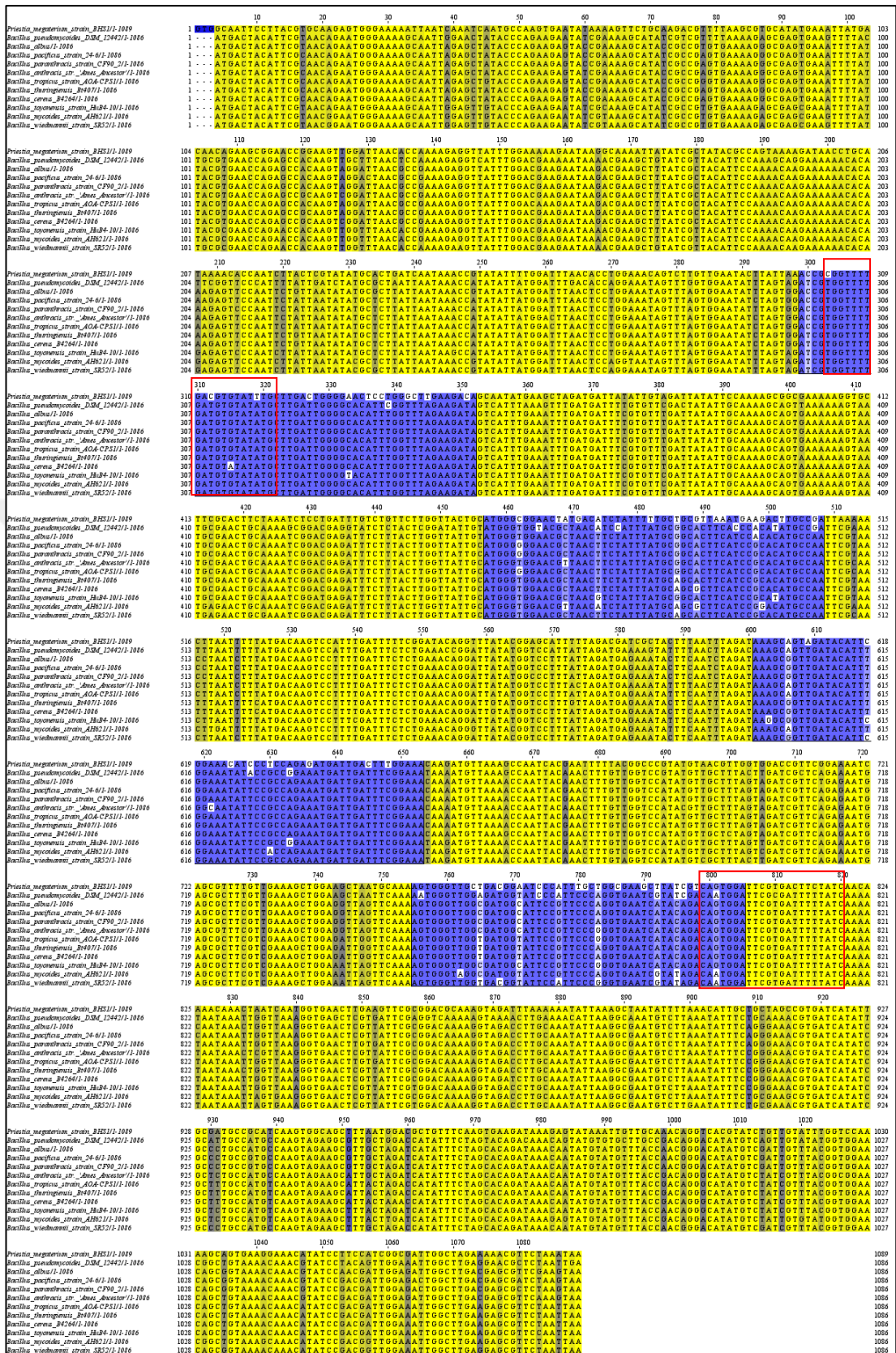
5.2. Çoklu Dizi ve Motif Analizi Sonuçları

NCBI GenBank'ta yapılan tarama sonucunda 12 adet farklı *Bacillus* suşuna ait *phaC* ve *phaR* genlerinin nükleotit dizileri elde edilmiştir. Bakteri suşlarına ait bilgiler Tablo 5.2'de gösterilmiştir. Genler, Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [58] çoklu hizalama programı kullanılarak hizalanmış ve ardından NCBI/MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>) programı [59] ile genlerde motif analizleri gerçekleştirilmiştir. *phaR* geni için yapılan tarama sonuçları Şekil 5.3'te gösterilmiştir. Şekil üzerinde sarı renk ile belirtilen bölgeler aynı gen için farklı suşlarda baz değişiminin olmadığı noktaları ifade etmektedir. Sarı rengin koyulaştığı bölgelerde baz değişimleri meydana gelmiştir ve değişen baz sayısı koyuluğun arttığı bölgelerde daha fazladır.

Tablo 5.2: NCBI/GenBank veri bankasından elde edilen *phaC* ve *phaR* genlerinin tanımlayıcıları ve ilgili bakteri isimleri.

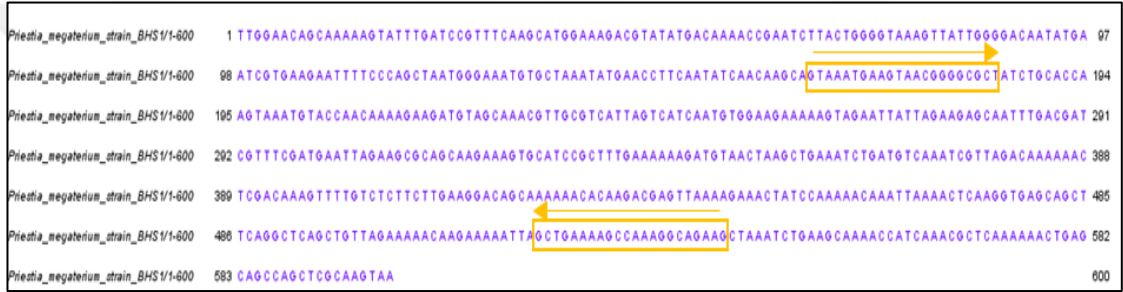
Bakteri İsmi	NCBI Gen ID (<i>phaC</i>)	NCBI Gen ID (<i>phaR</i>)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	67465809	67465807
<i>Bacillus pseudomyoides</i>	34218639	34218077
<i>Bacillus mycoides</i>	66263637	66263639
<i>Bacillus tropicus</i>	56651176	56651174
<i>Bacillus anthracis str. 'Ames Ancestor'</i>	45021322	45021320
<i>Bacillus pacificus</i>	69533169	69533171
<i>Bacillus cereus</i>	67506021	67506019
<i>Bacillus paranthracis</i>	64200005	64200007
<i>Bacillus toyonensis</i>	64182710	64182708
<i>Bacillus wiedmannii</i>	51132918	51132916
<i>Bacillus albus</i>	58156896	58156898
<i>Priestia megaterium (Bacillus megaterium)</i>	64144793	64144795

Çoklu dizi hizalama analizinin sonuçları değerlendirildiğinde hem *phaC* hem de *phaR* genlerine ait dizilerin, aynı gen için suşlar arasında yüksek oranda benzediği ve korunduğu görülmüştür. Yapılan çoklu dizi analizinde kullanılan programın bir özelliği olarak birbiriyle özdeşliği en yüksek olan diziler en altta bulunan iki satırda gösterilmektedir. Program tarafından yapılan sıralamada en alt satırdan üst satıra doğru ilerledikçe dizilerin birbirleri arasındaki özdeşlikleri azalır. Bu bilgi doğrultusunda Şekil 5.3 ve Şekil 5.4 incelendiğinde her iki gen için de dizisi birbirine en yakın *Bacillus* suşları *Bacillus wiedmannii* ve *Bacillus mycoides* olarak belirlenmiştir. *Priestia megaterium* (*Bacillus megaterium*) ise her iki gen için de diğer suşların gen dizisine en az benzerlik gösteren diziye sahiptir. *phaC* geni için yapılan motif analizi ve çoklu dizi hizalama sonuçları Şekil 5.4'te gösterilmiştir. Şekillerde sarı renkli nükleotitler farklı suşlar arasında değişime uğramamışken, nükleotit değişiminin arttığı lokasyonlarda sarı renk koyulaşmaktadır. Dizilerdeki mavi bölgeler motiflerin bulunduğu lokasyonları temsil etmektedir. Mavi bölgelerde baz değişimi olan noktalar beyaz olarak gösterilmiştir. Her iki gen için de dörder motif belirlenmiştir. Motifler MEME Suite programı kullanılarak belirlenmiş olup literatürde motiflere dair bilgi bulunamamıştır. PZR için primer tasarlanırken oluşacak PZR ürününün bu bölgeleri kapsamamasına dikkat edilmiştir. Amaç bu bölgeleri çoğaltarak ilgili genlerin yerel suşlardaki varlığının tanımlanmasını sağlamaktır. Primerlerin tasarlandığı lokasyonlar şekil üzerinde kırmızı kutu içine alınarak sunulmuştur.



Şekil 5.4: On iki farklı *Bacillus* türüne ait *phaC* gen dizisinin çoklu dizi hizalama ve motif analizi sonuçları. Tasarlanan primerlerin lokasyonu kırmızı kutu ile belirtilmiştir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *Bacillus megaterium* (strain: 22-2) suşuna ait *phaR* geni, NCBI GenBank'tan elde edilen diğer suşlara ait *phaR* genlerine ait dizilerle karşılaştırıldığında daha farklı bir gen dizisine sahip olduğu görülmüştür. *Bacillus megaterium* haricinde *phaR* gen dizilimine sahip suşlarda *phaR* gen uzunluğu 483 bp iken, *B. megaterium* suşunda bu uzunluk 600 bp uzunluğundadır. *B. megaterium*'un fazladan sahip olduğu nükleotitler nedeniyle diğer suşlarla yeterli özdeşlik gösterememiş ve dejenere primer tasarımına uygun olmadığı görülmüştür. Bu nedenle *B. megaterium*'a ait *phaR* geninin tespiti için ayrı bir primer çifti tasarlanmıştır. Suşa ait dizi ve tasarlanan primerlerin lokasyonu Şekil 5.5'te gösterilmiştir.



Şekil 5.5: *B. megaterium*'a ait *phaR* gen dizisi. Sarı kutucuklar ileri ve geri primerlerin tasarlandığı lokasyonları temsil etmektedir.

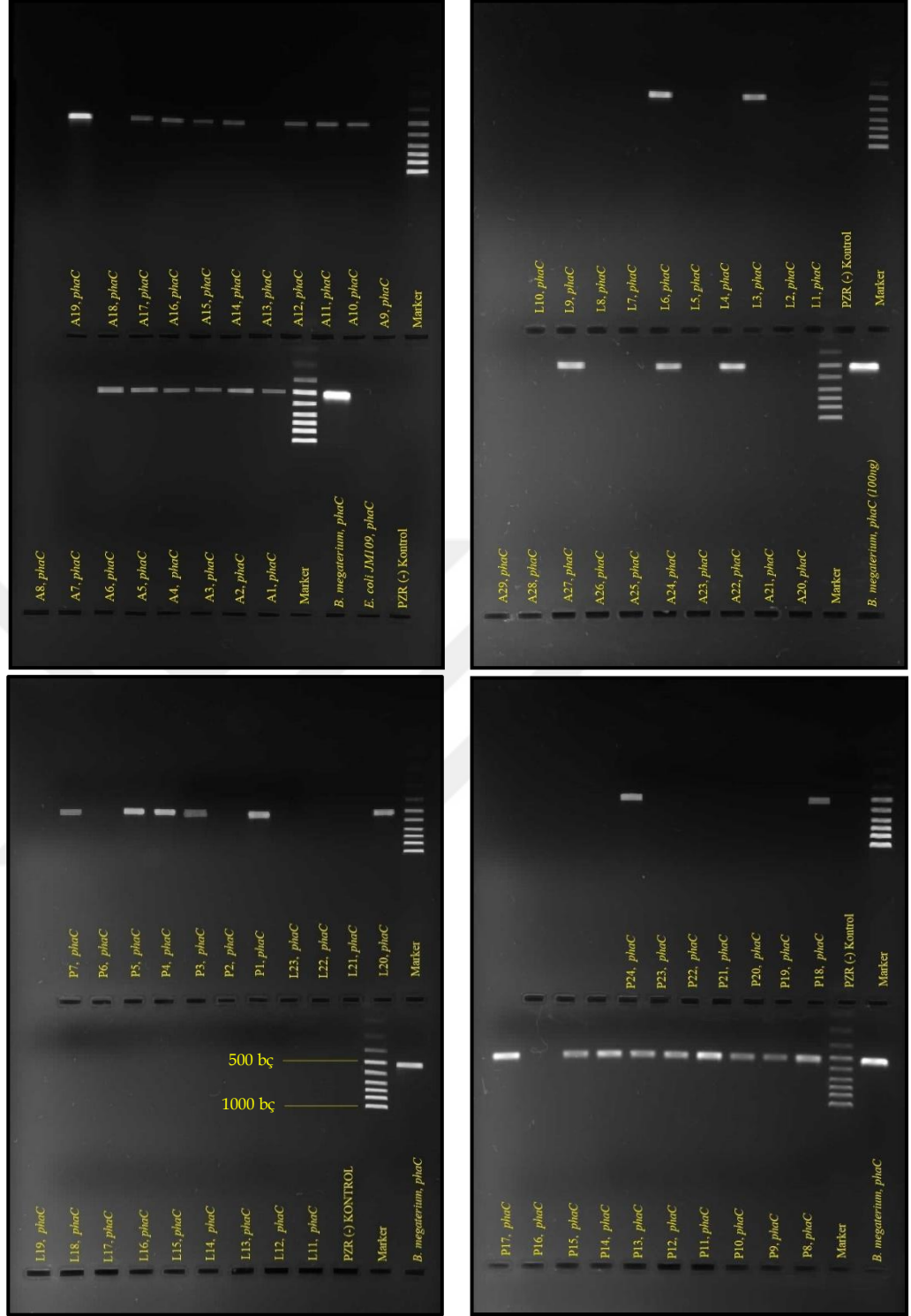
5.3. *phaC* ve *phaR* Genlerinin PZR ile Taranması

Çalışmada kullanılan izolatlardan genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu için bu gDNA'lar kullanılmıştır. *phaC* ve *phaR* genlerinin PZR ile taranması amacıyla yerel *Bacillus* izolatlarının genomik DNA'ları izole edilmiş *phaR* ve *phaC* genlerinin, PHA sentaz enziminin çalışmasında anahtar rol oynadığı diğer çalışmalarca gösterilmiştir [60]. Bu nedenle kullanılan izolatların PZR analizinden sonra *phaC* ve *phaR* genlerine aynı anda sahip olup olmadıkları değerlendirilmiş ve sahip olan suşların PHA sentezleyebileceği öngörülmüştür. Sonuçlar Tablo 5.3'te gösterilmiştir.

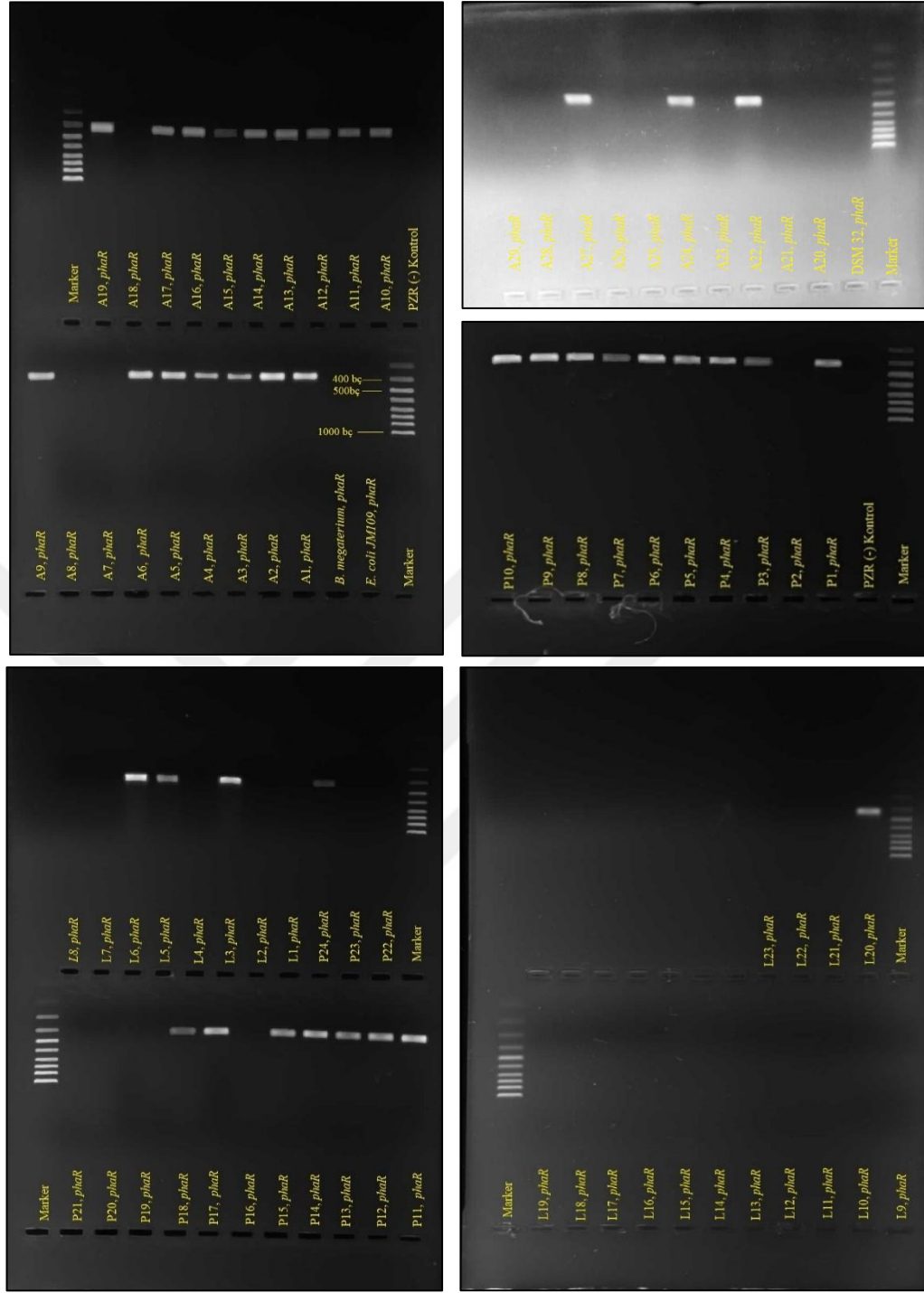
Tablo 5.3: Yerel *Bacillus* izolatlarında *phaC* ve *phaR* genlerinin varlığının PZR ile taranması.

İzolat	<i>phaC</i>	<i>phaR</i>	İzolat	<i>phaC</i>	<i>phaR</i>	İzolat	<i>phaC</i>	<i>phaR</i>
A1	+	+	L1	-	-	P1	+	+
A2	+	+	L2	-	-	P2	-	-
A3	+	+	L3	+	+	P3	+	+
A4	+	+	L4	-	-	P4	+	+
A5	+	+	L5	+	+	P5	+	+
A6	+	+	L6	+	+	P6	+	+
A7	-	-	L7	-	-	P7	+	+
A8	-	-	L8	-	-	P8	+	+
A9	+	+	L9	-	-	P9	+	+
A10	+	+	L10	-	-	P10	+	+
A11	+	+	L11	-	-	P11	+	+
A12	+	+	L12	-	-	P12	+	+
A13	+	+	L13	-	-	P13	+	+
A14	+	+	L14	-	-	P14	+	+
A15	+	+	L15	-	-	P15	+	+
A16	+	+	L16	-	-	P16	-	-
A17	+	+	L17	-	-	P17	+	+
A18	-	-	L18	-	-	P18	+	+
A19	+	+	L19	-	-	P19	-	-
A20	-	-	L20	+	+	P20	-	-
A21	-	-	L21	-	-	P21	-	-
A22	+	+	L22	-	-	P22	-	-
A23	-	-	L23	-	-	P23	-	-
A24	+	+				P24	+	+
A25	-	-						
A26	-	-						
A27	+	+						
A28	-	-						
A29	-	-						

PZR'den elde edilen ürünler %1 agaroz jelde yürütülmüş ve jel görüntüleri *phaC* için Şekil 5.6'da *phaR* içinse Şekil 5.7'de verilmiştir. PZR ürünlerinin beklenen boyu *phaC* için 524 bp, *phaR* içinse 424 bp'dir. DNA belirteci ile karşılaştırıldığında beklenen boyda PZR ürünlerinin elde edildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 5.6: *phnC* geninin tespiti için yapılan PZR'ye ait agaroz jel profili. PZR sonrası elde edilmesi beklenen ürün boyu 524 bp (*phnC*), DNA belirtecinin (Thermo Scientific SM0243) fragman boyları 100-1000 bp arasındadır. A1-A29, L1-L23 ve P1-P24: *Bacillus* izolatları.



Şekil 5.7: *phaR* geninin PZR ile taranması sonucunda elde edilen agaroz jel profili. PZR sonrası elde edilmesi beklenen ürün boyu 424 bp (*phaC*), DNA belirtecinin fragman boyları 100-1000 bp arasındadır. İlgili bantların boyları şekil üzerinde gösterilmiştir. Örneklerin isimleri agaroz jel görüntülerinde kuyuların üzerinde gösterilmiştir. A1-A29, L1-L23 ve P1-P24: *Bacillus* izolatları; *B. megaterium* DSM32: pozitif kontrol; *E. coli* JM109: negatif kontrol; PZR (-) kontrol: kalıp içermeyen PZR negatif kontrol reaksiyonu; Marker: DNA belirteci (Thermo Scientific SM0243).

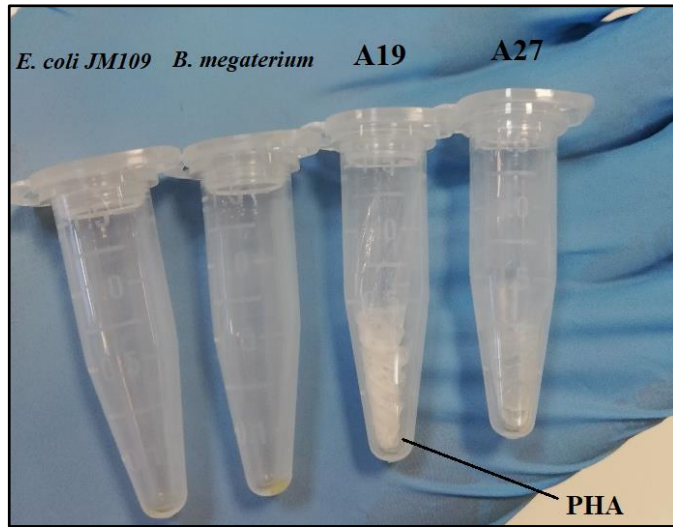
5.4. PHA Özütleme

Sudan siyahı boyaması ve PZR sonuçları karşılaştırılmış ve izolatlar arasından iyi üreticiler olduğu düşünülen “A19 ve A27” örneklerinden PHA ekstraksiyonları yapılmıştır. Bölüm 4'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen PHA özütlemeleri sırasında alınan tartım sonuçları ve hesaplanan PHA yüzdeleri Tablo 5.4'te verilmiştir. Ekstraksiyonların ardından elde edilen PHA'ların görüntüsü Şekil 5.8 ve 5.9' da verilmiştir. PHA akümülyasyon oranlarının hesaplanması için kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$[\text{Elde edilen PHA ağırlığı (g/L)} / \text{Kuru hücre ağırlığı (g/L)}] \times 100 = \% \text{ PHA Akümülyasyonu} \quad (5.1)$$

Tablo 5.4: PHA Ekstraksiyonu sonrasında elde edilen kuru hücre ağırlıkları ve PHA miktarları.

Örnek	Tüp Ağırlığı (BOŞ)	Tüp Ağırlığı (Evaporasyon sonrası)	Fark (PHA Ağırlığı)	Kuru Hücre Ağırlığı	PHA Akümülyasyonu (%)
<i>E. coli</i> JM109	0,959 g	0,9613 g	0,0022 g	0,01 g	20
<i>B. megaterium</i> DSM 32	0,9583 g	0,9602 g	0,0018 g	0,01 g	18
<i>Bacillus</i> sp. A27	0,9588 g	0,9718 g	0,013 g	0,04 g	32,5
<i>Bacillus</i> sp. A19	0,9577 g	0,9648 g	0,007 g	0,02 g	35,15



Şekil 5.8: Mikrosantrifüj tüplerinde ekstrakte edilen PHA'ların görüntüsü.

Sudan siyahı taraması, PZR ve ekstraksiyon çalışmalarının ardından çalışmada kullanılan izolatlar arasından PHA üretimi için en verimli olabilecek örnek *Bacillus* sp. A19 olarak belirlenmiştir. Bundan sonra yapılan optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları *Bacillus* sp. A19 örneği ile sürdürülmüştür.



Şekil 5.9: *Bacillus* sp. A19'dan elde edilen biyopolimerler.

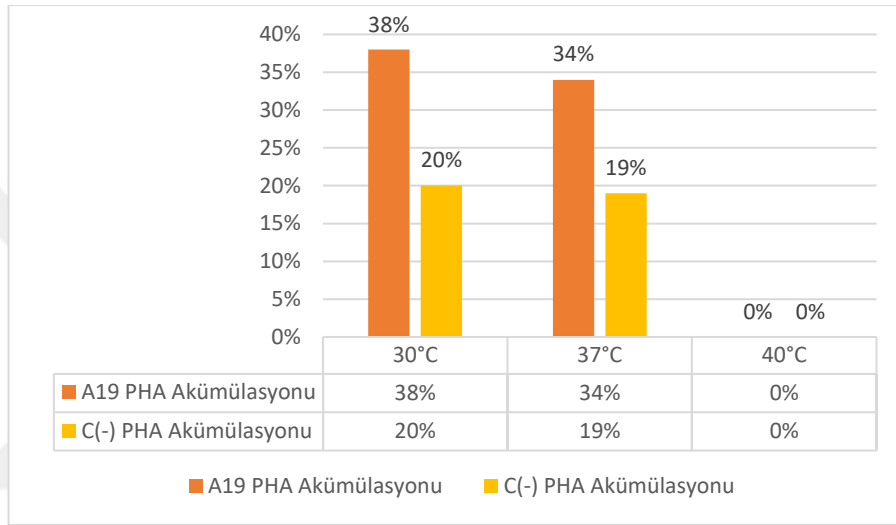
5.5. Üretim Koşullarının Optimizasyonu

Tez çalışması kapsamında yerel *Bacillus* izolatlarından A19'da PHA akümüülasyonunu arttırmak amacıyla sıcaklık, zaman, aşılama oranı, havalandırma oranı, çalkalama hızı, besiyerindeki karbon ve azot kaynakları gibi parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarına başlamadan önce kullanılan koşullar; 30 °C sıcaklık, 48 saat inkübasyon, %1 aşılama, 150 rpm çalkalama hızı ve 1:5 havalandırma olacak şekilde ayarlanmıştır.

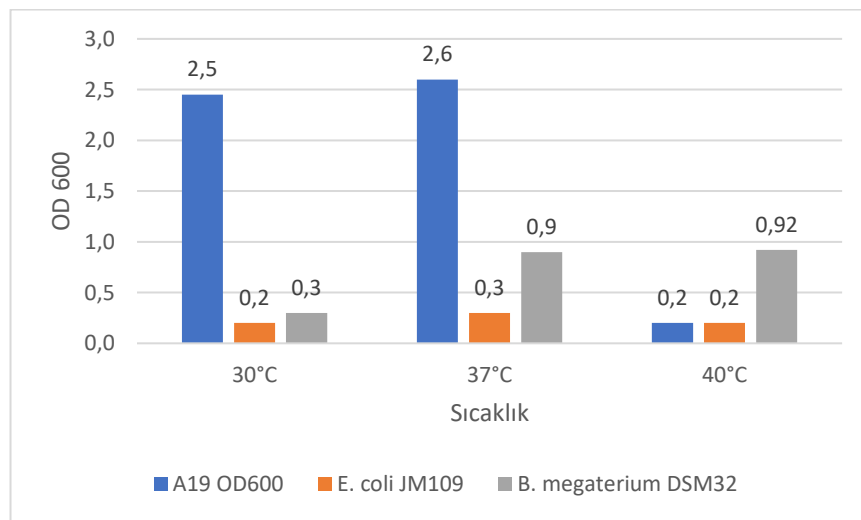
5.5.1. Sıcaklığın PHA Üretimi Üzerine Etkisi

Sıcaklığın *Bacillus* sp. A19 suşunda PHA akümüülasyon verimine etkisinin araştırıldığı bu deney kapsamında 30 °C, 37 °C ve 40 °C sıcaklıklarda hücre büyümesi ve üretim verimi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 5.10 ve Şekil 5.11'de verilmiştir.

72. saatteki hücre büyümlerinin 30 ve 37°C'ta birbirine çok yakın olduğu görülmüş (Şekil 5.10), buna karşın kültürlerin 72. saatinde alınan örneklerden ekstrakte edilen PHA'lar verim olarak değerlendirildiğinde yerel *Bacillus* suşlarının optimal büyüme sıcaklığı olan 30°C'ın, aynı zamanda PHA üretimi için de optimal sıcaklık olduğu değerlendirilmiştir (Şekil 5.10). 30°C'de *Bacillus* sp. A19 suşundan elde edilen PHA miktarı, değerler negatif kontrole görece normalize edildikten sonra, %18, 37°C'de ise %15 olarak belirlenmiştir. 40°C'de hücre büyümesi olmadığından PHA üretimi de gözlemlenmemiştir.



Şekil 5.10: Sıcaklığın PHA akümülayonu üzerine etkisi. C(-): *E. coli* JM109.

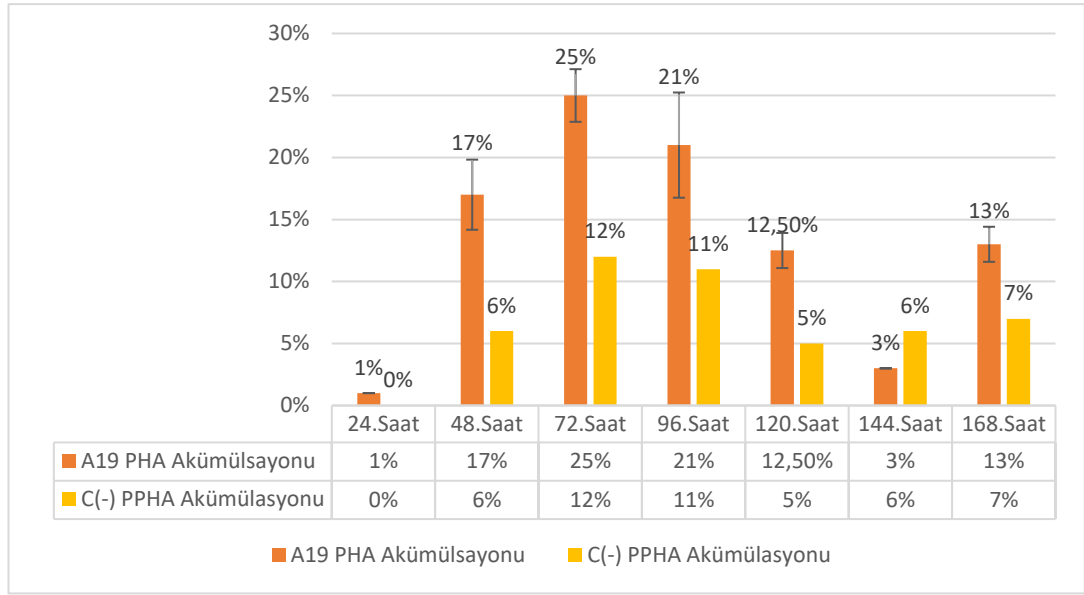


Şekil 5.11: Sıcaklığın hücre büyümesine etkisi.

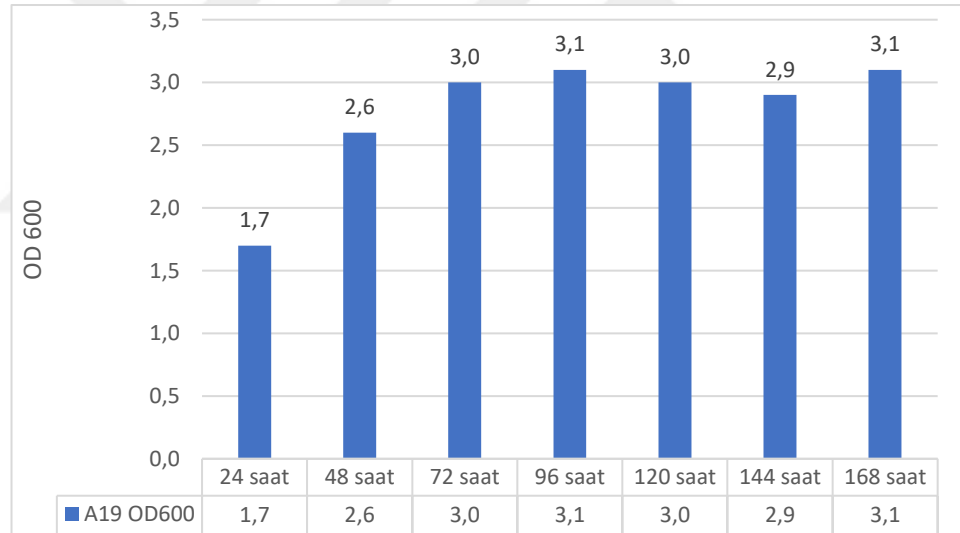
5.5.2. İnkübasyon Zamanının PHA Üretimi Üzerine Etkisi

İnkübasyon zamanının yerel izolatlardan *Bacillus* sp. A19 suşunun PHA üretimi üzerine etkisinin irdelendiği bu çalışmada bakteri kültürleri 30 °C'ta 168 saat inkübe edilmiş ve her yirmi dört saatte bir alınan örneklerden PHA ekstraksiyonları Bölüm 4.9'da verilen protokole göre yapılmıştır. PHA akümülyasyonunun zamana bağlı olarak değişimini gösteren grafik Şekil 5.12'de ekstraksiyon sonrasında elde edilen PHA'ların mikrosantrifüj tüplerindeki görselleri ise Şekil 5.14'te verilmiştir. Ekstraksiyon protokolü sırasında tüp içinde PHA harici hücresel kalıntılar da kalabilmektedir (Şekil 5.8). Bu kalıntılar nedeniyle akümülyasyon miktarları hesaplanırken negatif kontrolde de sayısal olarak anlamlı değerler elde edilmiştir. Bu değerler asıl örnekteki PHA akümülyasyon miktarından çıkartılarak hücresel kalıntıların ya da kloroform kalıntısının oluşturmuş olabileceği ağırlık farkı elimine edilmiştir. Buna göre; PHA üretiminin 48. saatten itibaren başladığı ve PHA üretimi için en verimli zamanın %13 PHA akümülyasyon (w/w) oranıyla 72. saat olduğu tespit edilmiştir.

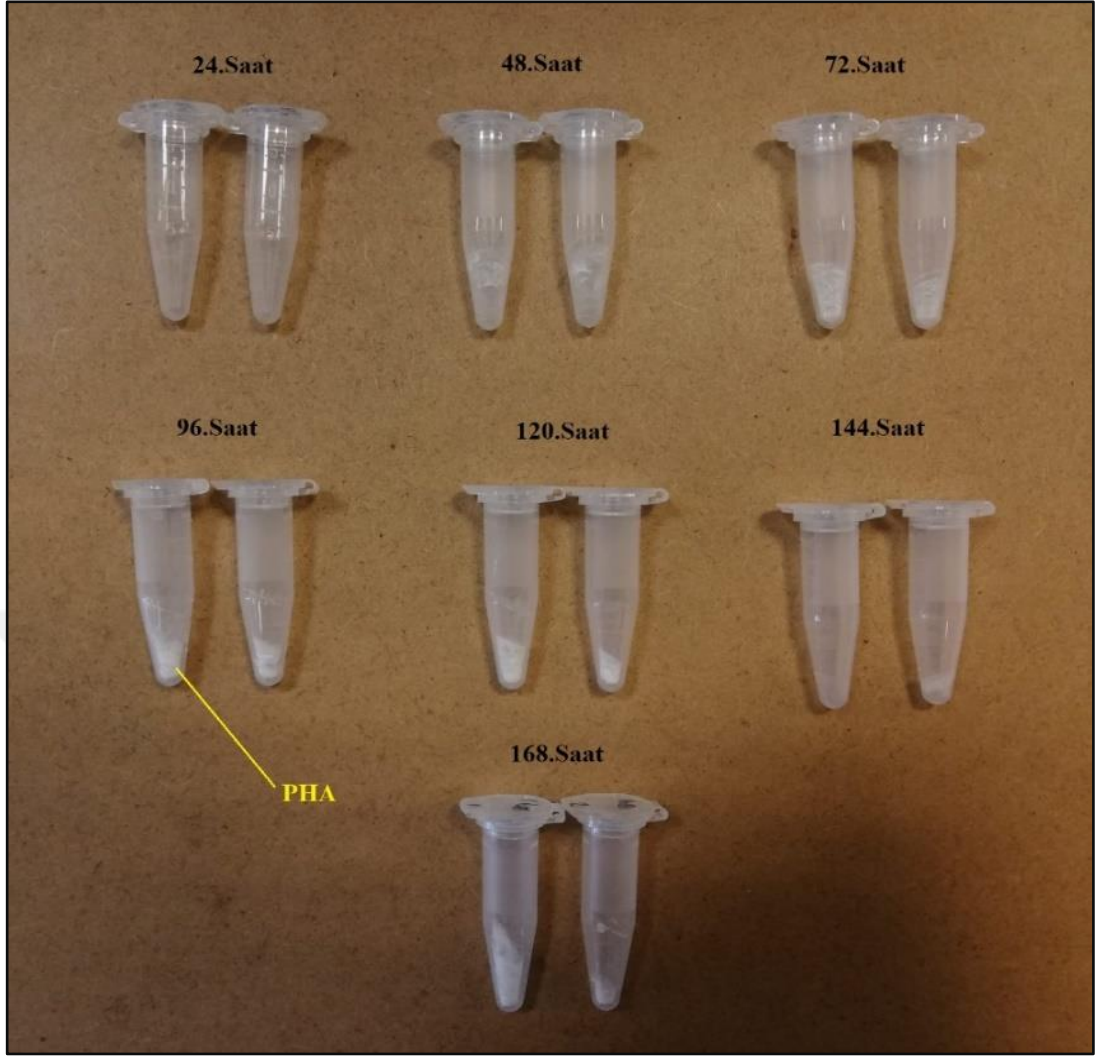
Üretim 168. saate kadar devam etmiştir. 144. saatte alınan örnekte gözle görülür miktarda PHA elde edilememiştir. Ancak 168. saatte yapılan ekstraksiyonda hala PHA elde edilebildiği görüldüğü için, 144. saat örneğinde PHA elde edilememesine deney sırasında yaşanmış olabilecek aksaklıkların neden olduğu düşünülmektedir. (Şekil 5.124). Şekil 5.13'te sunulan *Bacillus* sp. A19 suşunun zamana bağlı büyüme eğilimi incelendiğinde 48. saatten itibaren büyümenin durduğu ve bu saatten sonra kültürün optik yoğunluğunun düşmeye başladığı gözlemlenmiştir. Bu durum PHA akümülyasyonu ile karşılaştırıldığında 48. saat haricindeki zaman dilimlerine ait sonuçların birbirine paralel olduğu gözlemlenmiştir. Optik yoğunluk süre geçtikçe artmıştır ancak PHA akümülyasyonunun en yüksek olduğu zaman 72. saat olarak belirlenmiştir. Zaman içinde OD₆₀₀ değeriyle paralel bir artış gözlemlenmemiştir. 72. saat sonrasında elde edilen PHA miktarları düşmektedir.



Şekil 5.12: *Bacillus* sp. A19 PHA akümülsayonunun zamana bağlı değişimi.
C(-): *E. coli* JM109.



Şekil 5.13: *Bacillus* sp. A19 suşunun zamana bağlı büyüme grafiği.

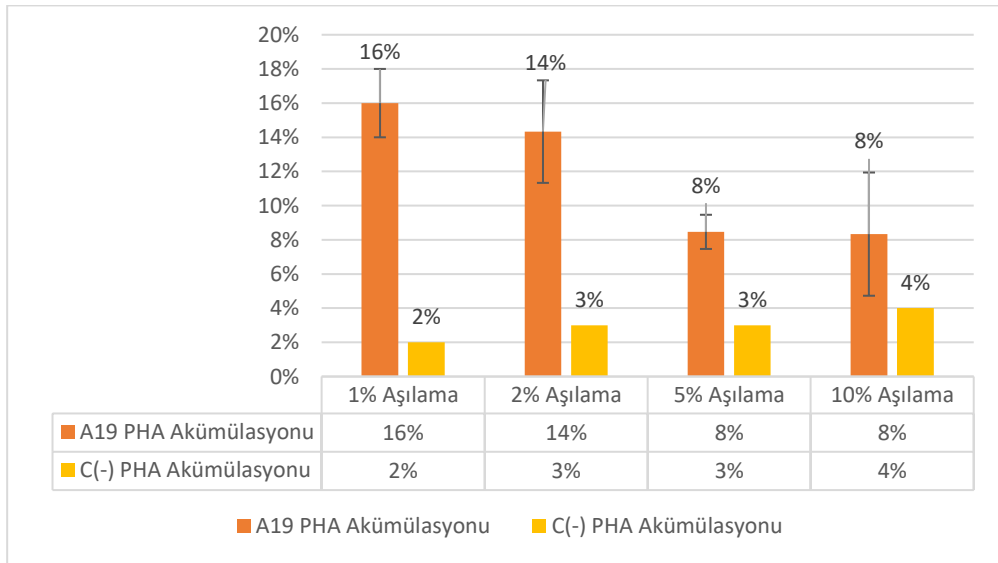


Şekil 5.14: *Bacillus* sp. A19 PHA akümülayonunun zamana bağı olarak gözlemlenmesi.

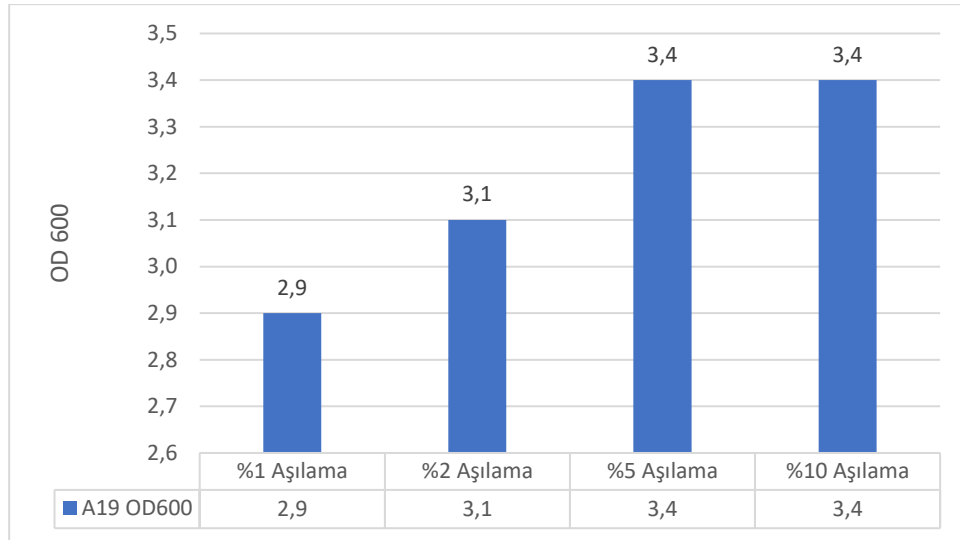
5.5.3. Aşılama Oranının PHA Üretimi Üzerine Etkisi

Aşılama oranının *Bacillus* sp. A19 PHA'sının üretimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla %1, %2, %5 ve %10 inokülasyon oranlarına sahip deney düzenekleri hazırlanmıştır. 72. saatte alınan örneklerden PHA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra PHA miktarları daha önce verilen (Bölüm 4.9. PHA Ekstraksiyonu) formül kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen verilerle hazırlanan grafik, Şekil 5.15'te verilmiştir. Sonuçlar negatif kontrole görece normalize edilerek değerlendirildiğinde %1 aşılama oranının PHA akümülyasyonunda %14 ile en yüksek verimin elde edilmesini sağladığı görülmüştür. En yakın ikinci değer %11 verimle %2 aşılama oranıdır.

Hücre büyümesinin belirlenebilmesi için kültürlerden 72. saatte örnek alınarak OD₆₀₀ değerleri kontrol edilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.16'da sunulmuştur. Buna göre, hücre büyümesinin %5 aşılama oranına paralel olarak arttığı, bundan sonra ise aşılamanın hücre büyümesini etkilemediği görülmüştür. Hücre büyümesi sonuçları PHA akümülyasyon oranlarıyla karşılaştırıldığında aralarında pozitif bir korelasyon görülmemiştir. %1, %2 ve %5 aşılama oranlarının kullanıldığı kültürlerde hücre büyümesi artmasına rağmen biyoplastik üretiminin düştüğü gözlemlenmiştir. %5 ile %10 aşılama oranlarının kullanıldığı kültürlerde ise hücre büyümelerinin ve PHA akümülyasyonlarının, her iki kültürde de aynı düzeylerde olduğu görülmüştür.



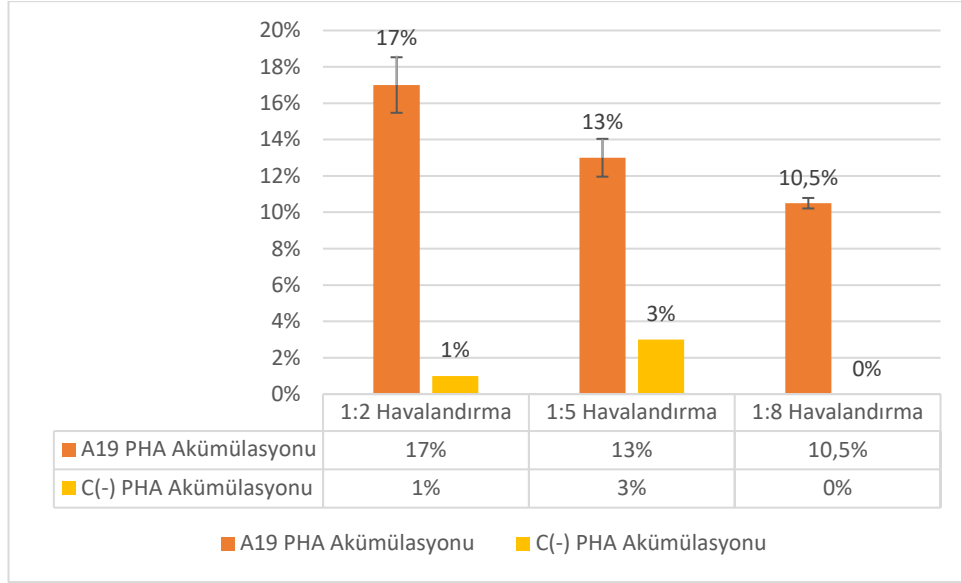
Şekil 5.15: Aşılama oranının *Bacillus* sp. A19 PHA akümülyasyonuna etkisi. C(-): *E. coli* JM109.



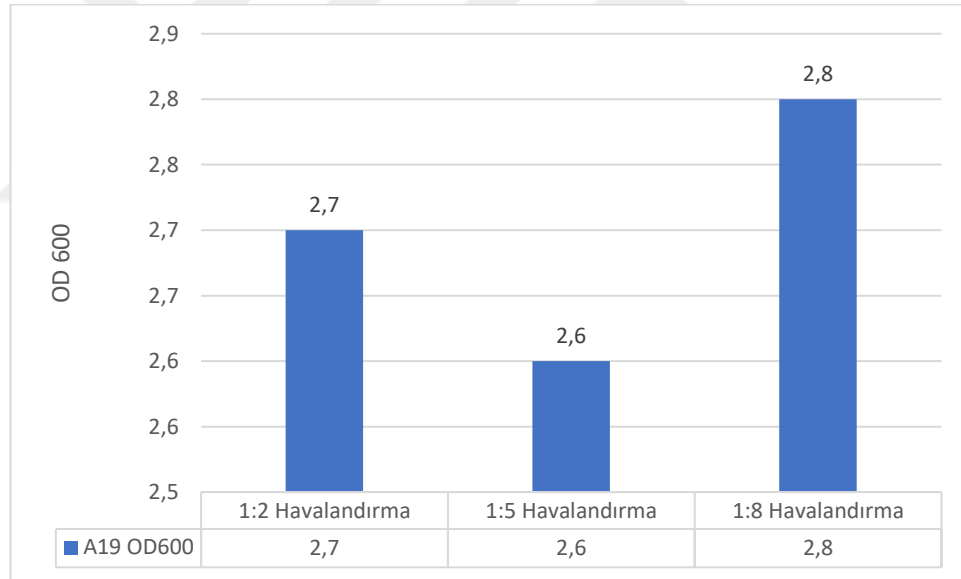
Şekil 5.16: Aşılama oranının *Bacillus* sp. A19 izolatının büyümesine etkisi. C(-): *E. coli* JM109.

5.5.4. Havalandırma Oranının PHA Üretimi Üzerine Etkisi

Bacillus sp. PHA üretimine havalandırma oranının etkisini araştırmak amacıyla 1:2, 1:5 ve 1:8 havalandırma oranlarına sahip deney düzenekleri tasarlanmıştır. Optimal havalandırma koşulunu belirlemek için 72. saatte PHA ekstraksiyonu yapılmış, PHA akümüülasyon oranları hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 5.17'de gösterilmiştir. Buna göre 1:2 havalandırma oranının %16 PHA akümüülasyonu ile en yüksek verimin elde edilmesine yol açtığı tespit edilmiştir (Şekil 5.17). Farklı havalandırma oranlarının hücre büyümesine etkisi Şekil 5.18'de gösterilmiştir. Literatürde yer alan diğer çalışmalarda genel olarak 1:5 havalandırma oranı kullanılırken, bu tez kapsamında yerel izolatlarla yaptığımız çalışmada havalandırma oranının azalmasının akümüülasyon oranını pozitif şekilde etkilediği, havalandırma miktarı arttıkça elde edilen verimin düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışmalara 1:2 havalandırma oranı ile devam edilmiştir.



Şekil 5.17: Havalandırma oranının *Bacillus* sp. A19 PHA akümülayyonuna etkisi.
C(-): *E. coli* JM109.

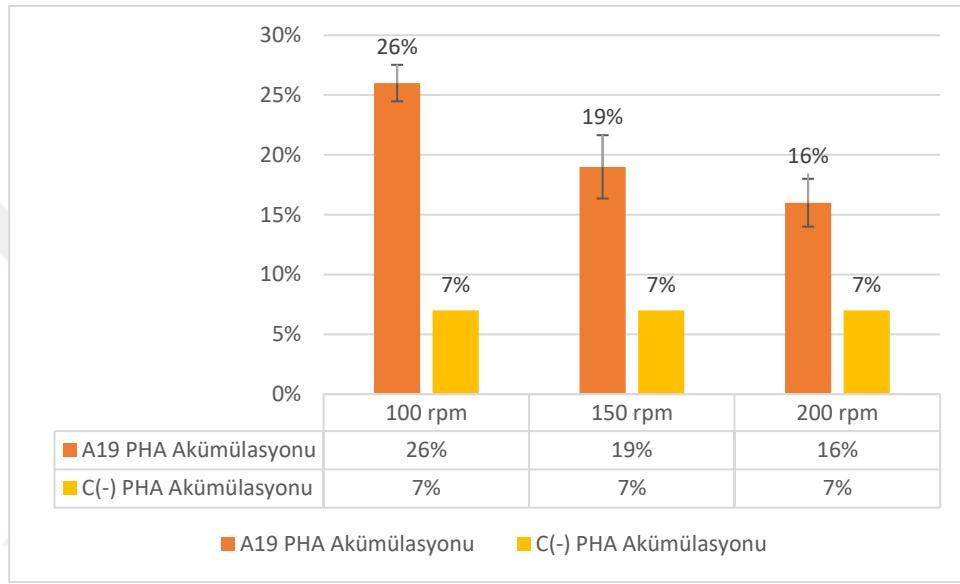


Şekil 5.18: Havalandırma oranının *Bacillus* sp. A19 izolatının büyümesine etkisi.
C(-): *E. coli* JM109.

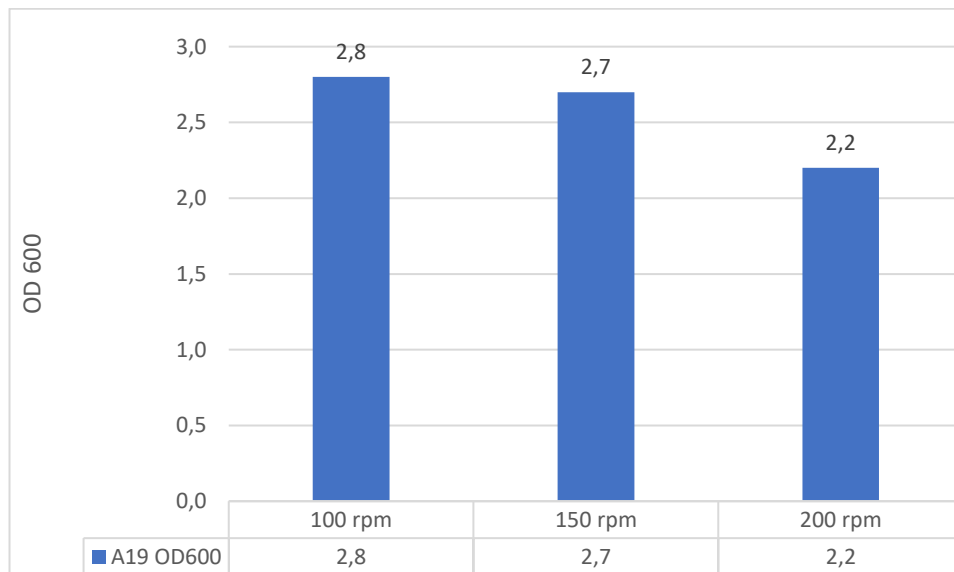
5.5.5. Çalkalama Hızının *Bacillus* sp. A19 PHA Üretimine Etkisi

Çalkalama hızının PHA akümülayyonuna etkisini gözlemlemek için optimal çalkalama hızını belirlemeye yönelik deney kurgulanmıştır. Bu deneyde buraya kadar yapılan çalışmalarla belirlenen optimize edilmiş koşullarla çalışılmıştır (30 °C, 72 saat,

1:2 havalandırma, %1 aşılama). Kùltürlerden 72.saatte alınan örneklerden ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve PHA akùmlasyon oranları hesaplanarak en verimli çalkalama hızı belirlenmiştir. şekil 5.19'da görùlen sonuçlara göre en yüksek PHA akùmlasyonunun %19 verimle 100 rpm'de olduğu görùlmüř ve bundan sonraki çalışmalara bu çalkalama hızında devam edilmesine karar verilmiştir. PHA akùmlasyonu 150 rpm ve 200 rpm çalkalama hızlarında, sırasıyla, %12 ve %9 olarak belirlenmiştir. Hücre büyümesine ait grafik şekil 5.20'de verilmiştir.



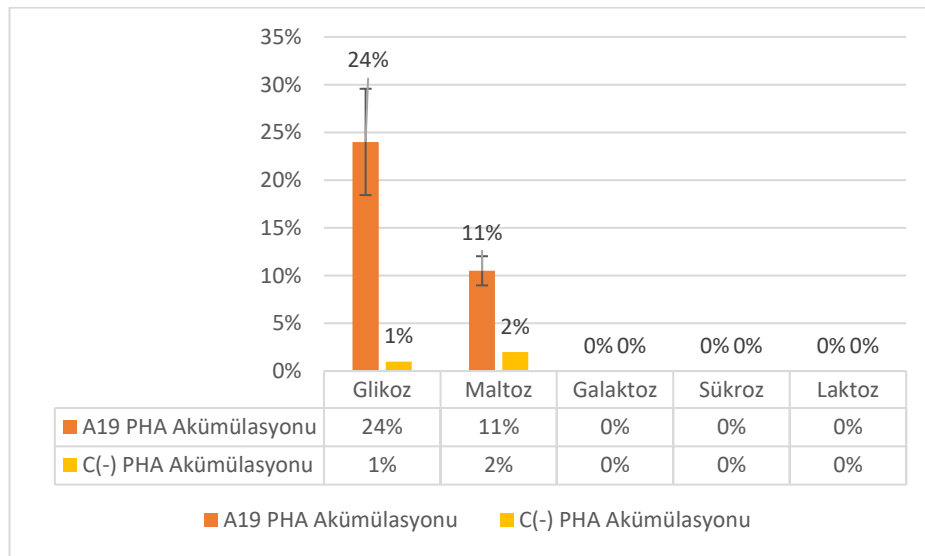
şekil 5.19: Çalkalama hızının *Bacillus* sp. A19 PHA akùmlasyonuna etkisi.
C(-): *E. coli* JM109.



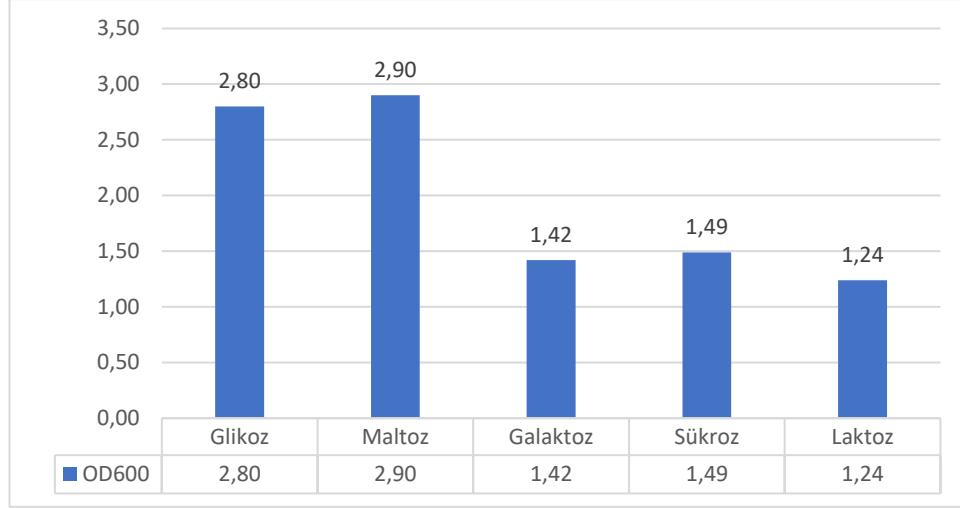
şekil 5.20: Çalkalama hızının *Bacillus* sp. A19 izolatının büyümesine etkisi.

5.5.6. Farklı Karbon Kaynaklarının *Bacillus* sp. A19 PHA Üretimine Etkisi

Bakteriyel PHA'nın üretiminde karbon kaynağı anahtar rol oynamaktadır. Yerel suşlardan biri olan *Bacillus* sp. A19 örneğinden PHA elde edilirken karbon kaynaklarının üretim verimi üzerindeki katkısını araştırmak amacıyla karbon kaynağı olarak glikoz, galaktoz, fruktoz, sükroz ve maltoz kullanılmıştır. Bu karbon kaynaklarını içeren besi yerlerinde büyütülen bakterilerin 72. saat OD₆₀₀ değerleri kontrol edilmiş (Şekil 5.22) ve 72. saatte alınan örneklerden PHA ekstraksiyonları yapıldıktan sonra PHA akümülyasyon oranları hesaplanmıştır (Şekil 5.21). Buna göre glikoz %23 PHA akümülyasyon oranıyla, üretime en çok etki eden karbon kaynağı olarak belirlenmiştir. Onu %10 verim ile maltoz takip ederken, galaktoz, sükroz ve laktoz kullanılarak hazırlanan besi yerlerinden PHA elde edilememiştir. Hücre büyümelerinin glikoz ve maltoz içeren besi yerlerinde birbirine yakın (sırasıyla 2,80 ve 2,90 OD₆₀₀) ve en yüksek değerde olduğu; galaktoz ve sükrozun hücre büyümesine etkilerinin benzer düzeylerde (sırasıyla 1,42 ve 1,49 OD₆₀₀) olduğu ve en düşük (1,24 OD₆₀₀) hücre büyümesinin ise laktoz içeren besi yerinde olduğu görülmüştür (Şekil 5.22). Maltoz içeren besi yerinde bakterilerin üreme miktarı glikoz içeren besi yerindeki ile benzer düzeylerde olmasına karşın, bu durumun PHA üretimine pozitif bir etkisi gözlemlenmemiştir.



Şekil 5.21: Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. A19 PHA akümülyasyonuna etkisi. C(-): *E. coli* JM109.

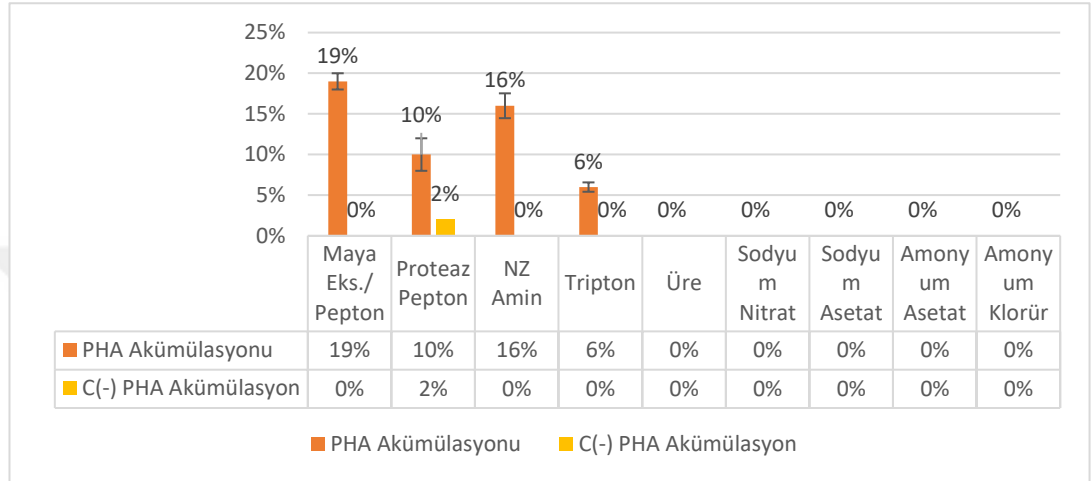


Şekil 5.22: Farklı karbon kaynaklarının *Bacillus* sp. A19 hücre büyümesine etkisi. C(-): *E. coli* JM109. İnkübasyon koşulları: 30 °C, %1 aşılama, 1:2 havalandırma, 100 rpm, 72 saat.

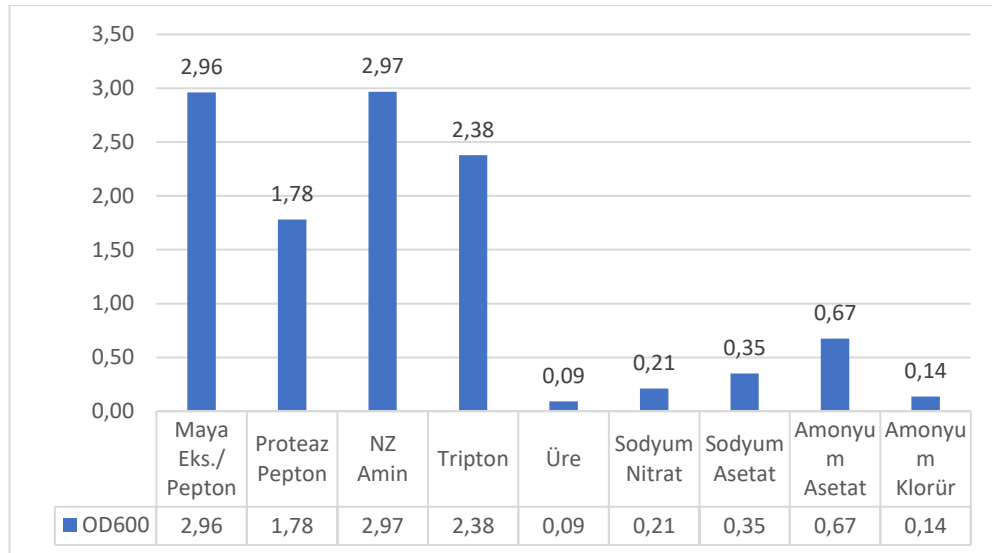
5.5.7. Farklı Nitrojen Kaynaklarının *Bacillus* sp. A19 PHA Üretimine Etkisi

PHA üretiminde nitrojen kaynaklarının farklılığı üretilen PHA'nın verimine etki etmektedir. Bu nedenle yerel *Bacillus* izolatlarıyla PHA üretiminde farklı nitrojen kaynakları denenmiş ve en yüksek verimin elde edildiği nitrojen kaynağı tespit edilmiştir. Besi yeri optimizasyonları öncesinde yapılan ilk çalışmalarda azot kaynağı olarak maya özütü ve pepton kullanılmıştır. Optimizasyon için bunların yanı sıra farklı organik ve inorganik azot kaynakları da denenmiştir. Kültürler buraya kadar belirlenen optimal koşullarda 72 saat boyunca inkübe edilmiş, 72. saatte alınan örneklerin hücre büyümleri OD₆₀₀ değerleri ölçülerek belirlenmiş (Şekil 5.24) ve PHA ekstraksiyonları yapılmıştır. PHA akümülyasyon oranları Şekil 5.23'te verilmiştir. Buna göre üre ve inorganik azot kaynaklarının kullanıldığı kültürlerde hücre büyümesi gözlemlenmemiş ve alınan örneklerden PHA elde edilememiştir. Organik azot kaynaklarının kullanıldığı kültürlerde en yüksek PHA akümülyasyonu maya özütü ve peptonun bir arada kullanıldığı kültürde %19 olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla %16 verimle NZ-Amin A, %8 verimle proteaz pepton ve %6 verimle tripton takip etmektedir. Bu sonuçlar hücre büyümeyle karşılaştırıldığında; PHA akümülyasyonlarının hücre büyümlerine paralel olarak gelişmediği görülmüştür. En yüksek (2,96 OD₆₀₀) hücre büyümesinin PHA üretiminin en yüksek olduğu, maya ekstraktı ve peptonun bir arada kullanıldığı kültürde olduğu belirlenmiş olmakla

birlikte, aynı düzeylerde (2,97 OD₆₀₀) hücre büyümesinin görüldüğü N-Z Amin A içeren besi yerinde PHA verimi daha düşük (%16) bulunmuştur. Benzer şekilde, 2,38 OD₆₀₀ hücre yoğunluğunun görüldüğü tripton içeren besi yerinde PHA akümülayon oranı ancak %6 düzeylerinde kalmıştır. Buna karşın, hücre büyümesinin en düşük düzeylerde olduğu proteoz pepton içeren besi yerinde de %8 PHA akümülayonu belirlenmiştir.



Şekil 5.23: Farklı nitrojen kaynaklarının kullanıldığı besiyerlerinde *Bacillus* sp. A19 PHA akümülayonu.

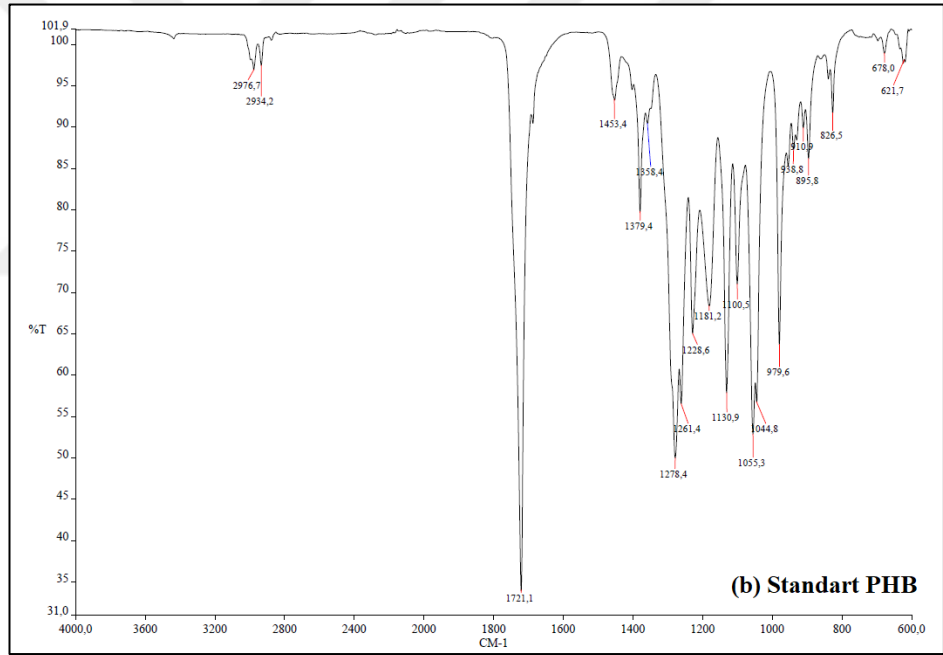
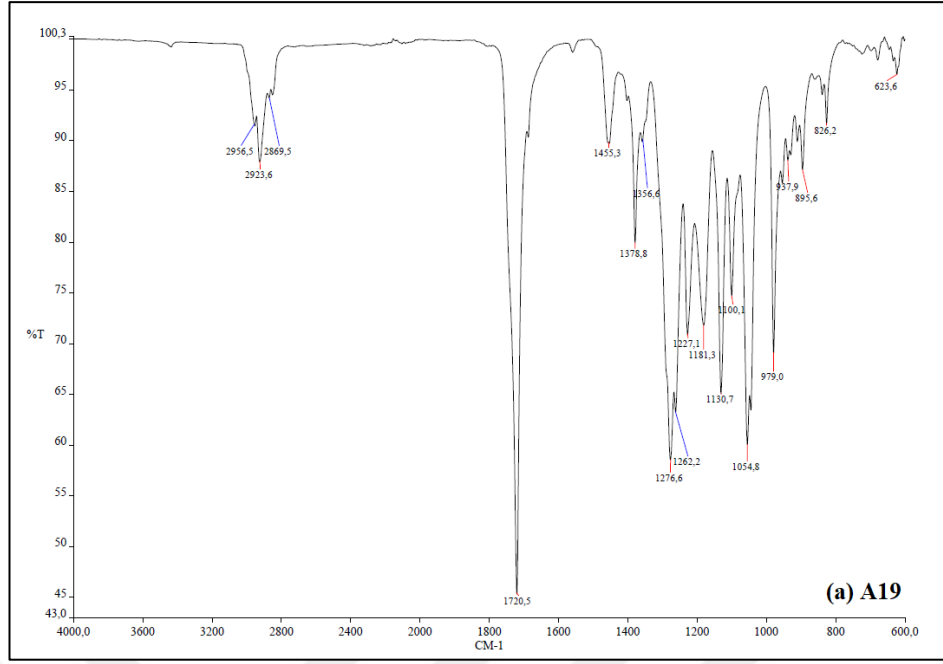


Şekil 5.24: Farklı karbon kaynaklarının kullanıldığı besiyerlerinde 72.saatte *Bacillus* sp. A19 örneğinin OD₆₀₀ değerleri.

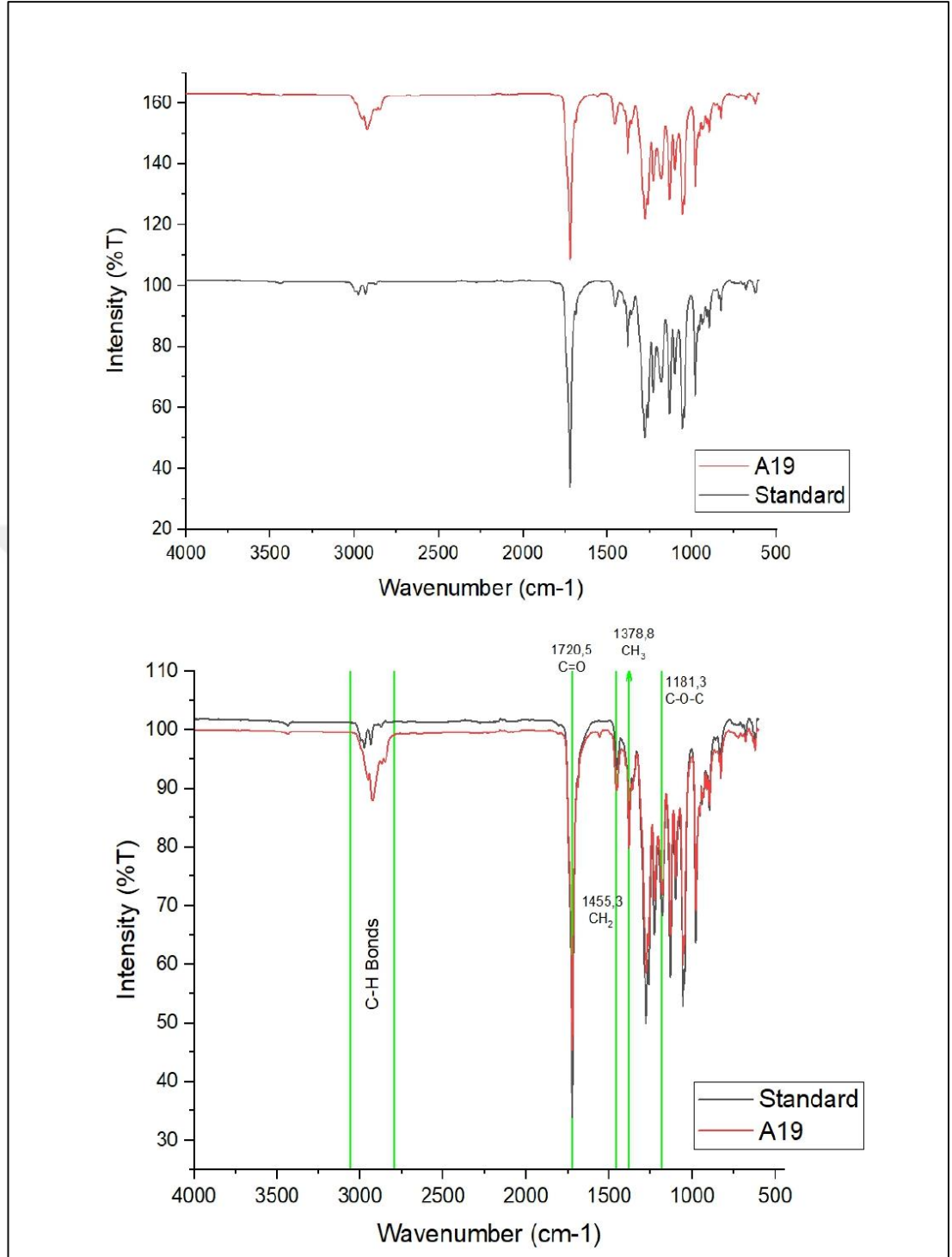
5.5.8. Yerel *Bacillus* İzolatı A19'dan Elde Edilen Biyopolimerin FTIR ile Nitelendirilmesi

Yerel *Bacillus* izolatları arasından seçilen A19 örneğiyle yapılan çalışmalarla elde edilen PHA polimerleri Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) aracılığıyla nitelendirilmiştir. Nitelendirmede standart olarak Poli[(R)-3-hidroksibütirik asit] (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

Elde edilen PHA ve standart örneği Perkin Elmer marka FTIR cihazı kullanılarak GTÜ-Kimya Bölümü bünyesinde analiz edilmiştir (Şekil 5.25). PHA için karakteristik olan karbonil grubu ($\text{C} = \text{O}$) standartta $1721,1\text{ cm}^{-1}$, A19'da ise $1720,5\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenmiştir. A19 örneğine ait FTIR sonucundaki $2956,5\text{ cm}^{-1}$, $2923,6\text{ cm}^{-1}$ ve $2869,5\text{ cm}^{-1}$ noktalarında elde edilen tepe pikler CH_3 ve CH_2 gruplarına ait germe titreşimleri olarak tayin edilebilir. $1378,8\text{ cm}^{-1}$ noktasında alınan pik terminal CH_3 , $1262,2\text{ cm}^{-1}$ noktasındaki pik ise asimetrik germe C-O-C gruplarına karşılık gelmektedir. $1181,3\text{ cm}^{-1}$ ve $623,6\text{ cm}^{-1}$ arasındaki tepe noktaları serisinin amorf fazdaki C-C ve C-O germe titreşimlerini temsil ettiği düşünülmektedir [61], [62]. A19 ve standart örnekleri için yapılan FTIR analizi sonuçları birbiriyle karşılaştırılmış ve sonuçlar Şekil 5.26'da gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde standart olarak kullanılan ticari polihidroksibütirat (PHB) ile A19'dan elde edilen biyopolimerin çok benzer noktalarda pik verdiği görülmektedir. FTIR sonuçlarındaki ana karakteristik pikler de elde edilen maddenin bir PHA türevidir olduğunu kanıtlar niteliktedir. Buna göre standart ve elde edilen örnek karşılaştırıldığında *Bacillus* sp. A19 izolatı tarafından üretilen biyopolimerin polihidroksibütirat olduğu düşünülmektedir.



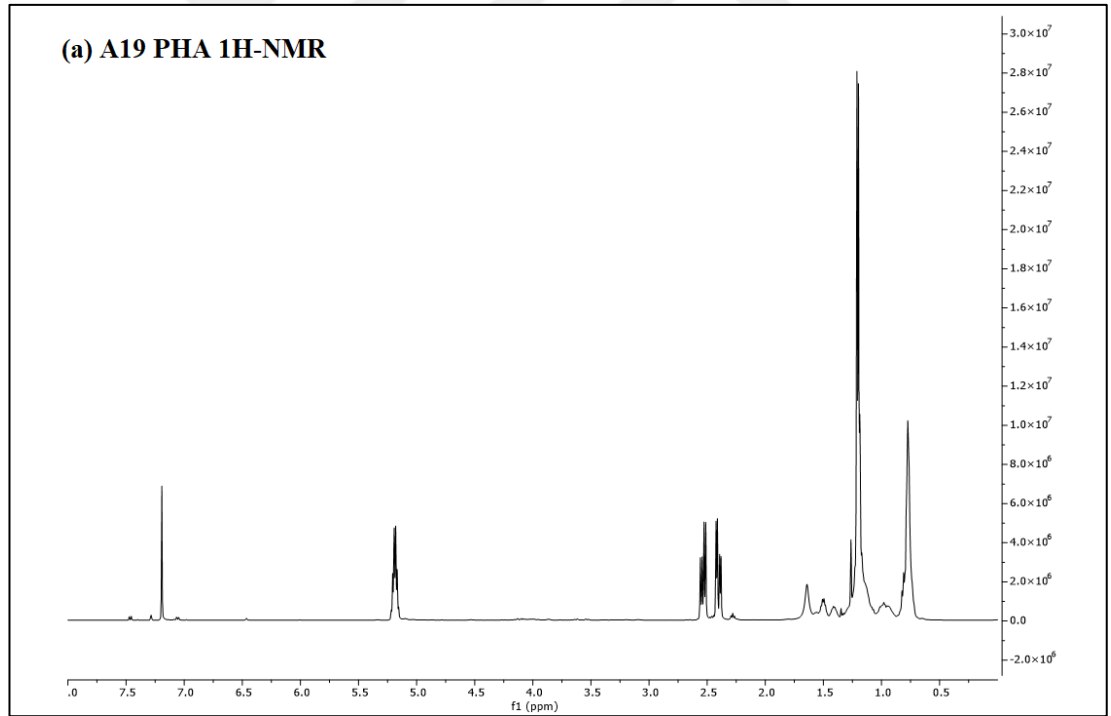
Şekil 5.25: Standart PHB (Sigma) ve *Bacillus* sp. A19 ile gerçekleştirilen FTIR analizi sonuçları. (a) *Bacillus* sp. A19 örneğinden elde edilen biyopolimerin FTIR sonucu. (b) Standart olarak kullanılan ticari PHB'nin FTIR sonucu.



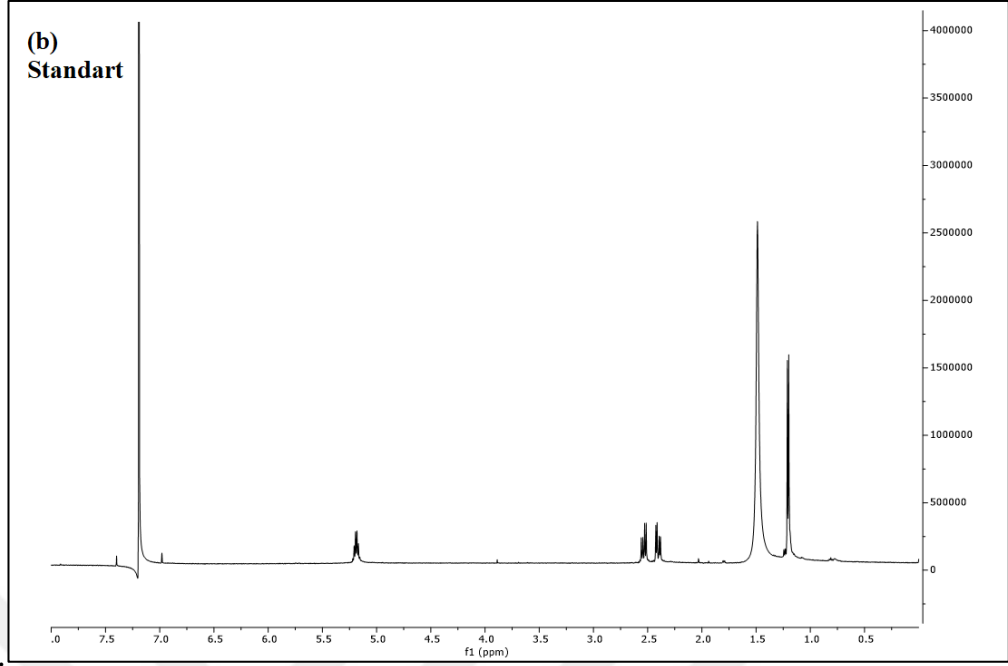
Şekil 5.26: Standart PHB (Sigma) ve *Bacillus* sp. A19 suşundan elde edilen PHA'nın FTIR analizi sonuçlarının karşılaştırılması.

5.5.9. Yerel *Bacillus* İzolatı A19'dan Elde Edilen Biyopolimerin NMR ile Nitelendirilmesi

Bacillus sp. A19 ve standart PHB örneklerine ait Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) analizi Gebze Teknik Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda (MAR) gerçekleştirilmiştir. NMR ile PHA doğrulaması yaparken üç önemli sinyal anahtar rol onar. İlk yapı PHA yapısındaki protona bağlı metil grubu olup NMR analizinde 1.29 ppm'de duplet (doublet) şekilde gözlemlenebilir. İkincil önemli sinyal asimetrik karbon atomundan gelmektedir ve 2.58 ppm'de gözlenir. Son anahtar sinyal dörtlü çift yapı gösteren metilen grubuna aittir ve 5.27 ppm değerine sahiptir. Örneklerin analizinde çözücü olarak kullanılan CDCl_3 'e ait pik ise 7.25 ppm'de gözlemlenmiştir [63]. Sonuçlar Şekil 5.27 ve Şekil 5.28'de sunulmuştur. NMR görüntüleri ve elde edilen piklerin lokasyonu karşılaştırıldığında A19'dan elde edilen PHA'nın polihidroksibütirat (PHB) olduğu NMR analiziyle de doğrulanmıştır.



Şekil 5.27: *Bacillus* sp, A19 suşundan elde edilen biyopolimerin NMR analizi sonuçları.



Şekil 5.28: Standart olarak kullanılan ticari PHB'nin NMR analizi sonuçları.

6. TARTIŞMA

Plastik, hayatın her alanında kullanımına sıklıkla başvurulmuş önemli bir materyaldir. Ancak geleneksel plastiğin petrol tabanlı bir üretime sahip olması canlılık ve çevre üzerinde toksik etkilere sebep olabilmektedir. Bunun yanı sıra tamamıyla geri dönüştürülemez ve sürdürülebilir de değildir. Bu noktada biyoplastikler biyoyoumlu yapıları, geleneksel plastiğe göre daha az toksisite göstermeleri, plastik gibi çeşitli alanlara entegre olabilme kapasiteleri ve mikrobiyal kaynaklı olduklarından sürdürülebilir olmaları nedeniyle çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Polihidroksialkanoatlar da bu amaç doğrultusunda en çok çalışılan biyopolimerlerin başında gelir.

Bacillus cinsi bakteriler PHA üretimi yapabildiği kanıtlanmış ve çalışılmaya en elverişli mikroorganizmalardandır. Yerel *Bacillus* soylarının da PHA üretimi açısından değerlendirilmesi potansiyellerinin ortaya konması açısından önemlidir. Bu tez çalışmasında öncelikle GTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Enzim Moleküler Genetiği Laboratuvarı bünyesinde bulunan *Bacillus* izolatları PHA üretimi açısından çeşitli boyama teknikleri kullanılarak taranmıştır. Bu tekniklerin arasından en hızlı ve kolay olanı bakteri tarafından üretilen lipit yapılı PHA granüllerinin boyanması temeline dayanmaktadır ve kalitatif sonuçlar elde edilmektedir. Bu nedenle yerel izolatların taranması için öncelikle lipit yapıların boyanmasından sorumlu Sudan siyahı [64] ve Nil kırmızısı [20] boyaları kullanılmıştır. Sudan siyahı ile yapılan tarama sonucunda 76 adet yerel *Bacillus* suşundan 38 tanesi PHA üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Daha sonra görsel olarak iyi sonuç elde edilen suşların bazıları tanılama açısından daha hassas olan Nil kırmızısı ile boyanarak floresan ışık altında incelenmiştir. Sudan siyahı boyaması ile yapılan çalışma ile Nil kırmızısı boyama yöntemi birbiriyle korelasyon içindedir. *Bacillus* cinsi bakterilerde PHA üreticisi soylar belirlenirken bu boyama tekniklerinin verimli ve etkili bir şekilde kullanılabileceği bu çalışmada da gösterilmiştir. Kalitatif yöntemlerle PHA üreticisi örnekler belirlenebilmekle birlikte elde edilen sonuçların güvenilirliği çok yüksek değildir. Moleküler yöntemlerle suşların taranması kantitatif sonuçlar alınarak üreticilerin kesin olarak belirlenmesini sağlayabilmektedir. PHA üretiminde anahtar enzim olan PHA sentaz enziminin varlığının moleküler tanı yöntemleriyle gösterilmesi PHA üreticisi soyların belirlenmesi için başvurulmuş yöntemlerden biridir [65]. Ayrıca *Bacillus* cinsi bakterilerde PHA üretiminin gerçekleşmesi ve akümülyasyonun

sağlanabilmesinde *phaC* ve *phaR* genlerinin önemli rol üstlendiği ve elzem olduğu gösterilmiştir [66]. Bu doğrultuda tez çalışması kapsamında *Bacillus* cinsi bakterilerde PHA üretiminden sorumlu olan Sınıf IV PHA sentaz enziminin temel iki alt ünitesini kodlayan *phaC* ve *phaR* genlerinin yerel izolatlardaki varlığı taranmıştır. Tarama çalışması sonucunda 76 adet yerel *Bacillus* izolatından 42 tanesinin *phaC* ve *phaR* genlerine aynı anda sahip olduğu gösterilmiştir. NCBI/GenBank veribankasında *Bacillus pumilus* türüne ait *phaC* ve *phaR* genlerine dair sekans bilgisi bulunmamasına rağmen çalışmada kullanılan ve *B. pumilus* olduğu moleküler tanı yöntemleriyle kesinleştirilmiş olan L3 izolatında bu genlerin varlığı PZR ile doğrulanmıştır. Bu doğrulama, *B. pumilus* L3 izolatında *phaC* ve *phaR* genlerine ait amino asit dizisinin belirlenmesi ve dizinin literatüre kazandırılması için ön çalışma olarak kabul edilebilir. Bu genlerin yerel izolatlardaki varlığının belirlenmesinin, soyların üretkenliğinin arttırılması ya da özelliklerinin iyileştirilmesi için yapılabilecek protein mühendisliği çalışmalarına da katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Boyama yöntemleriyle pozitif soy olarak gösterilen 38 örneğin tamamı *phaC* ve *phaR* genlerine de sahiptir. Bunun yanı sıra boyama yöntemiyle belirlenemeyen 5 örneğin daha bu genlere sahip olduğu görülmüştür. PZR sonuçları ve boyama sonuçları beraber değerlendirildiğinde aralarında pozitif korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Ancak PZR sonrasında 76 adet örnekten 42 tanesi PHA pozitif olarak belirlenirken, boyama yöntemleriyle yapılan taramalarda yalnızca 38 adet suş pozitif olarak değerlendirilebilmiştir. Bu durum, boyama yöntemlerinin PHA pozitif bakterileri belirlemedeki hassasiyetinin moleküler teknikler kadar yüksek olmadığını ve bazı PHA üreticisi soyların bu şekilde gözden kaçırılabilceğini göstermektedir. Bu nedenle PHA üreticisi soylar belirlenirken PZR gibi moleküler tanı yöntemlerinin kullanılmasının daha hassas ve kesin sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Literatürde yer alan diğer çalışmalarda *Bacillus* suşlarında PHA üretimini tetiklemek için minimal besiyeri (Mineral Salt Medium/ MSM) kullanıldığı bilinmektedir [67]. Bu besi yerinin tercih edilme sebebi büyüme ortamındaki temel besin elementlerinin eksikliğini sağlayarak stres koşulu oluşturmak ve bakterilerin PHA üretimini tetiklemektir. Bu tez çalışmasında da *Bacillus* cinsi bakterilerde PHA üretimi için en uygun besi yerinin seçilmesi kapsamında yapılan çalışmalarda MSM, LB ve azotdan yoksun besiyerlerinde bakteri kültürleri hazırlanmıştır. Ancak MSM besi yerinde ne yerel *Bacillus* izolatlarında ne de negatif kontrol olan *E. coli* JM109 suşunda hücre büyümesi gözlemlenememiştir. Bu nedenle, bu çalışma kapsamında

PHA üretimini tetiklemek için gerekli olan stres şartları, MSM yerine “Azot Kaynağı Azaltılmış Besi yeri (N₂-Deficient)” [49] kullanılarak ortamdaki azot kaynağının azaltılması yoluyla sağlanmış ve bu yolla PHA akümülayonunun tetiklendiği görülmüştür.

Sudan siyahı boyasıyla yapılan tarama sonuçlarına göre PHA ekstraksiyonu için A19, A27 ve L23 olmak üzere üç farklı soy belirlenmiş ve PHA üretiminde en verimli suşu belirlemek için ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. PHA ekstraksiyonu için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden başlıcaları çözücü temelli ekstraksiyon, sindirim (digestion) ve mekanik parçalamadır. Bu yöntemler arasından en eskisi ve en sık kullanılan çözücü temelli ekstraksiyondur. Hızlı sonuç elde etmenin yanı sıra yüksek seviyede saflık (%98-%100) ve kazanım sağlamaktadır. Sindirim (digestion) metodundaysa elde edilen biyoplastığın saflığı çözücü bazlı yöntemde elde edilenlere göre daha düşüktür [68]. Bu nedenle denemeler sırasında PHA ekstraksiyon yöntemlerinden çözücü temelli olanlar tercih edilmiştir. Bunlardan PHA'nın kloroform ile ekstrakte edilmesini içeren, John H. Law ve R. A. Slepecky [57] tarafından kullanılan PHA ekstraksiyon yöntemi ve dispersiyon yöntemi [69] kullanılmıştır. Kullanılan iki yöntemde de gözle görülür bir biyoplastik oluşumu olmamıştır. Bunun yerine Law ve Slepecky tarafından gerçekleştirilen protokol modifiye edilerek çalışma mikrosantrifüj tüplerinde uygulanmıştır. Bu protokolde kullanılan falkon tüpleri mikrosantrifüj tüpleriyle değiştirilmiş ve protokolde kullanılan oranlar buna göre tekrar düzenlenerek modifiye edilmiştir. Modifiye edilmesinin ardından tüpler içinde biyoplastik oluşumu gözlemlenmiştir. Böylece gözle görülür şekilde biyoplastik oluşumu sağlayan ve kolay bir uygulamaya sahip olan bir protokol elde edilmiştir.

Denemeler sırasında *B. megaterium* DSM32 suşu pozitif kontrol, *E. coli* JM109 suşu ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda L23 suşundan PHA ekstrakste edilemezken, A27 suşunda %12,5 ve A19 suşunda %15 oranında PHA akümülayonu görülmüştür. Negatif kontrolde gözle görülebilen bir biyoplastik oluşumu gerçekleşmemiştir, ancak PHA akümülayonunu belirlemek için kullanılan formül negatif kontrol için uygulandığında yaklaşık %20 oranında akümülayon oranı elde edilmiştir. Bu durumun ekstraksiyon sırasında tüp içinde ortaya çıkan pelet ve kloroform kalıntılarının tüp ağırlığına etki etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı sebepten, A19 suşunda %35 olarak belirlenen PHA akümülayonunun da daha düşük (%15) olabileceği göz ardı edilmemelidir. Sonuçlar

değerlendirildiğinde optimizasyon aşamasına A19 suşu ile devam edilmesi kararlaştırılmıştır.

Çeşitli çalışmalarda *Bacillus* suşunda PHA üretimi için farklı inkübasyon saatleri denenmiştir. 24 saat [70], 48 saat [71] ve 72 saat [72] en çok kullanılan inkübasyon süreleridir. PHA üretiminde inkübasyon süresini 24-120 saat aralığında deneyerek değerlendirme yapan çalışmalar da mevcuttur [73]. Literatür taramalarının ardından karar verilen ve optimizasyon aşamasına kadar kullanılan üretim koşulları %1 aşılama oranı, 1:5 havalandırma, 30 °C sıcaklık, 150 rpm hız ve 48 saat inkübasyon şeklindedir. Daha sonra sıcaklık, zaman, çalkalama hızı, aşılama oranı, besiyerindeki karbon ve nitrojen kaynakları üzerine optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmalarından sonra; üretim sıcaklığı, aşılama oranı, temel karbon ve nitrojen miktarları değişmemiş, çalkalama hızı 100 rpm'e havalandırma oranı 1:2'ye düşürülmüş, inkübasyon süresi 72 saate çıkarılmıştır. Ayrıca PHA üretiminin inkübasyonun kaçınıcı saatinde başlayıp sonlandığını görmek amacıyla 24-168 saatlik bir deney düzeneği daha hazırlanmış ve değerlendirilmiştir. Buna göre PHA üretimi yerel *Bacillus* izolatlarında 48. saatte başlayıp 72. saatte en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. 96. saatten sonra PHA üretiminin azaldığı ancak 168. saate kadar ortamda hala PHA bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Sriyapai ve arkadaşları [73] tarafından yapılan çalışmayla uyumluluk göstermektedir. Tüm bu optimizasyon aşamalarının ardından A19 suşundaki maksimum PHA akümülyasyon oranının %24 olduğu tespit edilmiştir (akümülyasyon oranı negatif suşa görece normalize edildikten sonra belirlenmiştir). *Bacillus* cinsi bakterilerde PHB üretimindeki verimin %1 ila %70 arasında değiştiği birçok çalışmayla gösterilmiştir [32]. Başka araştırmacılar tarafından yapılan ve karbon kaynağı olarak glikozun kullanıldığı diğer çalışmalarda *B. megaterium* ATCC 14945 suşunda %10 [74], *B. cereus* suşunda %13,7 [75] ve *B. thuringiensis* suşunda %11.3 [76] oranında PHB üretimi gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında PHA akümülyasyon veriminin %24 olduğu yerel bir *Bacillus* izolatı olan A19 suşunun PHA üretimi için bu örneklerden daha iyi bir aday olduğu görülmektedir.

A19 örneğinden ekstrakte edilen biyopolimeri nitelendirmek amacıyla FTIR ve NMR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında standart olarak ticari polihidroksibütirat (PHB; Sigma) kullanılmıştır. A19 örneğinden elde edilen FTIR sonuçları standarta ait FTIR sonucuyla karşılaştırıldığında A19'dan ekstrakte edilen biyopolimerin PHB olduğu doğrulanmıştır. PHB, biyoplastik çalışmalarında en çok

kullanılan PHA türevidir. Özellikle sağlık endüstrisine entegrasyonu üzerine çalışmalar yapılmakta ve bu alanda kullanımı yaygınlaşmaktadır. Çalışmadan elde edilen biyopolimerin PHB olarak ön nitelendirilmesinin yapılması, yerel soylardan özellikle medikal alanlarda ticarileştirilebilir bir biyoplastik elde edilebileceğini göstermektedir. Bu tez çalışması kapsamında yerel *Bacillus* izolatlarının PHB üretme kabiliyetlerinin olduğu hem moleküler hem de mikrobiyolojik yöntemlerle gösterilmiştir.

PHA, petrol bazlı plastiğe çevreci alternatif olarak görülen bir çeşit biyoplastiktir. Bu nedenle yerel *Bacillus* izolatlarından PHA üretimi gerçekleştirilmesi ve nitelendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışması kapsamında ön nitelendirmeler FTIR ve NMR analizleriyle tamamlanmıştır ancak elde edilen biyoplastik ileri nitelendirilmeler için de değerlendirilmeye uygundur. DSC ve HPLC gibi farklı karakterizasyon yöntemleri kullanılarak nitelendirme çalışmaları tamamlanacaktır. PHA, dünya genelinde ticari kullanımı yaygın olan bir biyopolimerdir ve bu tez kapsamında yerel bir *Bacillus* soyu olan *Bacillus* sp. A19'dan elde edilen PHA da ticarileştirilmeye uygundur. Daha sonra gerçekleştirilecek protein mühendisliği çalışmalarıyla PHA üretiminden sorumlu enzim geliştirilerek elde edilecek olan PHA'nın kalitesi ve verimi arttırılabilir. Bu sayede yerel izolatlardan elde edilebilen ve ülke ekonomisine katkı sağlayabilecek nitelikte enzim eldesi ve biyoplastik üretimi sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Lemoigne M., (1926), “Produits de déshydratation et de polymérisation de l’acide β -oxobutyrique”, Bulletin de la Societe de chimie biologique, 8, 770.
- [2] Lee S. Y., Choi J. Il, Wong H. H., (1999), “Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: Mini-review”, International Journal of Biological Macromolecules, 25, 31–36.
- [3] Reddy C. S. K., Ghai R., Rashmi, Kalia V. C., (2003), “Polyhydroxyalkanoates: An overview”, Bioresource Technology, 87 (2), 137–146.
- [4] Luengo J. M., García B., Sandoval A., Naharro G., Olivera E. R., (2003), “Bioplastics from microorganisms”, Current Opinion in Microbiology, 6 (3), 251–260.
- [5] Web 1, (2022), <https://greenbusinessbureau.com/green-practices/products/5-types-of-bioplastics-starch-cellulose-protein-organic-aliphatic-polyesters>, (Eriřim tarihi: 11/4/2022).
- [6] Garrido R., Cabeza L. F., Falguera V., Khan M. A., Csaba G., Oláh J., (2021), “An Overview of Bioplastic Research on Its Relation to National Policies”, Sustainability, 13 (14), 7848.
- [7] Web 2, (2022), <https://www.european-bioplastics.org/bioplastics/>, (Eriřim tarihi: 22/4/2022).
- [8] Soroudi A., Jakubowicz I., (2013), “Recycling of bioplastics, their blends and biocomposites: A review”, European Polymer Journal, 49 (10), 2839–2858.
- [9] Zimmermann L., Dombrowski A., Völker C., Wagner M., (2020), “Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition”, Environment International, 145, 1060.
- [10] Ray S., Kalia V. C., (2017), “Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates”, Indian Journal of Microbiology, 57 (3), 261.
- [11] Poltronieri P., Kumar P., (2017), “Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Industrial Applications”, 1st Edition, Springer.
- [12] Moshood T. D., Nawanir G., Mahmud F., Mohamad F., Ahmad M. H., AbdulGhani A., (2022), “Biodegradable plastic applications towards sustainability: A recent innovations in the green product”, Cleaner Engineering and Technology, 18 (11), 2319-2333.
- [13] Lee S. Y., Choi J., Wong H. Ho., (1999), “Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review”, International Journal of Biological Macromolecules, 25, 31-36.

- [14] Anna Kynadi T. V. S., (2014), "Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Plastics for Environmental Conservation", In: Pramanik K., Patra J.K., Editors, "Industrial & Environmental Biotechnology", Ed. Studium Press (India) Pvt. Ltd.
- [15] Visakh P. M., (2015), "Polyhydroxyalkanoates (PHAs), their blends, composites and nanocomposites: State of the art, new challenges and opportunities", RSC Green Chemistry, 30, 1–17.
- [16] Tan G.-Y.A , Chia Lung C., Ling L., Liya G., Wang L., Razaad I. M. N., (2014), "Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review", Polymers (Basel), 6, 706–754.
- [17] Sharma P. K., Munir R.I., Blunt W., Dartiailh C., Cheng J., Charles T.C., Levin D.B., (2017), "Synthesis and Physical Properties of Polyhydroxyalkanoate Polymers with Different Monomer Compositions by Recombinant *Pseudomonas putida* LS46 Expressing a Novel PHA SYNTHASE (PhaC1 16) Enzyme", Applied Sciences, 7(3), 242.
- [18] Ojumu, T.V., Yu, J. and Solomon, B.O., (2004), "Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer", African Journal of Biotechnology, 3 (1), 18–24.
- [19] Spiekermann P., Rehm B. H. A., Kalscheuer R., Baumeister D., Steinbüchel A., (1999), "A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds", Archives of Microbiology, 171 (2), 73–80.
- [20] Ostle A. G., Holt J. G., (1982), "Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate", Applied and Environmental Microbiology, 44 (1), 238.
- [21] Mato A., Blanco F. G., Maestro B., Sanz J. M., Pérez-Gil J., Prieto M. A., (2020), "Dissecting the polyhydroxyalkanoate-binding domain of the PhaF phasin: Rational design of a minimized affinity tag", Applied and Environmental Microbiology, 86, 12.
- [22] Kellerhals M. B., Kessler B., Witholt B., Tchouboukov A., Brandl H., (2000), "Renewable long-chain fatty acids for production of biodegradable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at laboratory and pilot plant scales", Macromolecules, 33 (13), 4690–4698.
- [23] De Koning G., (1995), "Physical properties of bacterial poly((R)-3-hydroxyalkanoates)", Canadian Journal of Microbiology, 41 (1), 303–309.
- [24] Chou M. E., Chang W. T., Chang Y. C., Yang M. K., (2009), "Expression of four pha genes involved in poly- β -hydroxybutyrate production and accumulation in *Rhodobacter sphaeroides* FJ1", Molecular Genetics and Genomics, 282, 97–106.

- [25] Li Z., Yang J., Loh X. J., (2016), “Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future”, *NPG Asia Materials*, 8, 265.
- [26] Kichise T., Fukui T., Yoshida Y., Doi Y., “Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 25, 69–77.
- [27] Rehm B. H. A., (2003), “Polyester synthases: natural catalysts for plastics” *Biochemical Journal*, 376 (1), 15–33.
- [28] Zou H., Shi M., Zhang T., Li L., Li L., Xian M., (2017), “Natural and engineered polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: key enzyme in biopolyester production”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 7417–7426.
- [29] Han J., Lu Q., Zhou L., Zhou J., Xiang H., (2007), “Molecular Characterization of the phaECHm Genes, Required for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in the Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*”, *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 73, 19.
- [30] Tsuge T., Hyakutake M., Mizuno K., (2015), “Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 15, 6231–6240.
- [31] Tsuge T., (2016), “Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis”, *Polymer Journal*, 48, 1051–1057.
- [32] Mohapatra S., Maity S., Dash H.R., Das S., Pattnaik S., Rath C.C., Samantaray D., (2017), “*Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges”, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 206–213.
- [33] Rehm B. H. A., (2003), “Polyester synthases: natural catalysts for plastics”, *Biochemical Journal*, 376 (1), 15–33.
- [34] Kniewel R., Revelles Lopez O., Prieto M. A., (2017), “Biogenesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates”, 1st Edition, Springer.
- [35] Mitra R., Xu T., Xiang H., Han J., (2020), “Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory”, *Microbial Cell Factories*, 19 (1), 1–30.
- [36] Poli A., Di Donato P., Abbamondi G. R., Nicolaus B., (2011), “Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea”, *Archaea*, 2011, 1-13.
- [37] Tan G-Y.A., Chen C-L., Li L., Ge L., Wang L., Razaad I.M.N., Li Y., Zhao L., Mo Y., Wang J-Y., (2014), “Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review”, *Polymers Basel*, 6 (3), 706–754.

- [38] Lee S. Y., Lee Y., “Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Production of Enantiomerically Pure (R)-(-)-Hydroxycarboxylic Acids”, *Applied and Environmental Microbiology Journal*, 69 (6), 421.
- [39] Apetroaie-Constantin C., Mikkola R., Andersson M.A., Teplova V., Suominen I., Johansson T., Salkinoja-Salonen M., (2009), “*Bacillus subtilis* and *B. mojavensis* strains connected to food poisoning produce the heat stable toxin amyloisin”, *Journal of Applied Microbiology*, 106 (6), 1976–1985.
- [40] Singh M., Patel S. K., Kalia V. C., (2009), “Microbial Cell Factories *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates”, *Microbial Cell Factories*, 8, 38.
- [41] Koller M., Rodríguez-Contreras A., (2015), “Techniques for tracing PHA-producing organisms and for qualitative and quantitative analysis of intra- and extracellular PHA”, *Engineering in Life Sciences*, 15 (6), 558–581.
- [42] Bhuwal A. K., Singh G., Aggarwal N. K., Goyal V., Yadav A., (2013), “Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes”, *International Journal of Biomaterials*, 2013, 1-10.
- [43] Hong K., Sun S., Tian W., Chen G. Q., Huang W., (1999), “SHORT CONTRIBUTION A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 523–526.
- [44] Geethu M., Chandrashekar H. R., Divyashree M. S., (2021), “Statistical optimisation of polyhydroxyalkanoate production in *Bacillus endophyticus* using sucrose as sole source of carbon”, *Archives of Microbiology*, 203, 5993–6005.
- [45] Jiang G., Johnston B., Townrow D.E., Radecka I., Koller M., Chaber P., Adamus G., Kowalczyk M., (2018), “Biomass extraction using non-chlorinated solvents for biocompatibility improvement of polyhydroxyalkanoates”, *Polymers Basel*, 10 (7), 731.
- [46] Poltronieri P., Kumar P., (2017), “Polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Industrial Applications”, 1th Edition, Springer.
- [47] Zheng Y., Chen J. C., Ma Y. M., Chen G. Q., (2020), “Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction”, *Metabolic Engineering*, 58, 82–93.
- [48] Wang Y., Chen G.-Q., (2017), “Polyhydroxyalkanoates: Sustainability, Production, and Industrialization”, 2nd Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [49] Pal A., Prabhu A., Kumar A.A., Rajagopal B., Dadhe K., Ponnammam V., Shivakumar S., (2009), “Optimization of process parameters for maximum

poly(-beta-)hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077.,” *Polish Journal of Microbiology*, 58 (2), 149–154.

- [50] Gümüşel F., İşsever Öztürk S., Tuzlakoglu Öztürk M., Akbulut N., Cayman S. S., (2008), “Endüstriyel Enzim Üreticisi Yerel *Bacillus* izolatlarının Moleküler Tiplendirme Yöntemleriyle Tanımlanması”, 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 25-28 Haziran 2008.
- [51] Alvarado-Cordero E., Montes De Oca-Vásquez G., Pereira-Reyes R., Vega-Baudrit J., Esquivel-Alfaro M., (2017), “Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus megaterium* DSM 32 from Residual Glycerol of the Bioenergy Industry”, *Journal of Renewable Materials*, 5, 3–4.
- [52] Spiekermann P., Rehm B. H. A., Kalscheuer R., Baumeister D., Steinbüchel A., (1999), “A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds”, *Archives of Microbiology*, 171 (2), 73–80.
- [53] Lathwal P., Nehra K., Singh M., Jamdagni P., Rana J.S., (2015), “Optimization of culture parameters for maximum polyhydroxybutyrate production by selected bacterial strains isolated from rhizospheric soils”, *Polish Journal of Microbiology*, 64 (3), 227–239.
- [54] Spiekermann P., Rehm B. H. A., Kalscheuer R., Baumeister D., Steinbüchel A., (1999), “A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds,” *Archives of Microbiology*, 171 (2), 73–80.
- [55] Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Weizhong L., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J. D., Higgins D. G., (2011), “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega”, *Molecular Systems Biology*, 7 (1), 539.
- [56] Bailey T. L., Johnson J., Grant C. E., Noble W. S., (2015), “The MEME Suite”, *Nucleic Acids Research*, 43 (1), 39-49.
- [57] Law J. H., Slepecky R. A., (1961), “Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid ”, *Journal of Bacteriology*, 82 (1), 33–36.
- [58] Edgar R. C., (2004), “MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput,” *Nucleic Acids Research*, 32 (5), 1792–1797
- [59] Bailey T. L., (2009), “MEME SUITE: tools for motif discovery and searching,” *Nucleic Acids Research*, 37, 202-208.
- [60] McCool G. J., Cannon M. C., (2001), “PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*,” *Journal of Bacteriology*, 183 (14), 4235–4243.

- [61] Gumel A. M., Annuar M. S. M., Heidelberg T., (2012), "Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by *Pseudomonas putida* Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent", PLoS One, 7, 9.
- [62] Shivakumar S., Israni N., (2016), "Polyhydroxyalkanoates: Cost-Effective Production Strategies", 1st Edition, Taylor and Francis.
- [63] Sindhu R., Ammu B., Binod P., Deepthi S. K., Ramachandran K. B., Soccol C.R., Pandey A., (2011), "BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate from Crude Glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and Improving Its Thermal Properties by Blending with Other Polymers", Brazilian Archives of Biology and Technology, 54 (4), 783-794.
- [64] Sel L. H. G., (1970), "The Isolation of Mutants not Accumulating Polyhydroxybutyric Acid", Archives of Microbiology, 71, 283-294.
- [65] Lane C. E., Benton M. G., (2015), "Detection of the enzymatically-active polyhydroxyalkanoate synthase subunit gene, *phaC*, in cyanobacteria via colony PCR", Molecular and Cellular Probes, 29 (6), 454-460.
- [66] McCool G. J., Cannon M. C., "PhaC and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in *Bacillus megaterium*", Journal of Bacteriology, 183 (14), 235.
- [67] Ramsay B. A., Lomaliza K., Chavarie C., Dube B., Bataille P., Ramsay J. A., (1990), "Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids", Applied and Environmental Microbiology, 56 (7), 2093-2098.
- [68] Jacquelin N., Lo C. W., Wei Y. H., Wu H. S., Wang S. S., (2008), "Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)" Biochemical Engineering Journal, 39 (1), 15-27.
- [69] Hahn S. K., Chang Y. K., Kim B. S., Lee K. M., Chang H. N., (1993), "The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform", Biotechnology Techniques, 7 (3), 209-212.
- [70] Gomaa E. Z., (2014), "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol", Brazilian Archives of Biology and Technology, 57 (1), 145-154.
- [71] Thammasittirong A., Saechow S., Thammasittirong S. N. R., (2017), "Efficient polyhydroxybutyrate production from *Bacillus thuringiensis* using sugarcane juice substrate", Turkish Journal of Biology, 41 (6), 992-1002.

- [72] Mohapatra S., Pattnaik S., Maity S., Mohapatra S., Sharma S., Akhtar J., Mohapatra S., (2020), “Comparative analysis of PHAs production by *Bacillus megaterium* OUAT 016 under submerged and solid-state fermentation”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27 (5), 1242–1250.
- [73] Sriyapai T., T. Chuarung, K. Kimbara, S. Samosorn, and P. Sriyapai, (2022), “Production and optimization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Paraburkholderia* sp. PFN 29 under submerged fermentation”, *Electronic Journal of Biotechnology*, 56, 1–11.
- [74] Vu D. H., Wainaina S., Taherzadeh M. J., Åkesson D., Ferreira J. A., (2021), “Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus megaterium* using food waste acidogenic fermentation-derived volatile fatty acids”, *Bioengineered*, 12 (1), 2480-2498.
- [75] S. K. S. Patel, M. Singh, and V. C. Kalia, (2011), “Hydrogen and Polyhydroxybutyrate Producing Abilities of *Bacillus* spp. From Glucose in Two Stage System”, *Indian Journal of Microbiology*, 51 (4), 418–423.
- [76] Abinaya V. R., Balasubramanian V., Ramesh N., Natrajan K., Rajeshkannan V., (2012), “Exploration of polyhydroxyalkanoates production from rhizosphere soil bacteria.”, *ENVIS Newsletter*, 10, 1–6.

ÖZGEÇMİŞ

Gizem KUGU lisans eğitimine 2015 yılında Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde başlamış ve 2019 yılında eğitimini başarıyla tamamlamıştır. Aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başlamıştır. Yüksek lisans tezinde biyoplastik üretimi üzerine çalışmıştır.



EKLER

Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Kugu G., İşsever Öztürk S., (2021), " Screening of Polyhydroxyalkanoate (PHA)-Producing Local Bacillus Strains and Production of PHA from *Bacillus* sp. A19", 6th International Congress on Applied Biological Science, Online, Türkiye, 08-09 Aralık 2021.

