

**POLİHİDROKSİALKANOATLARIN
GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ
BAKTERİLERDE ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE
MATEMATİKSEL MODELLENMESİ**

**PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND
MATHEMATICAL MODELING OF
POLYHYDROXYALKANOATES BY
GENETICALLY MODIFIED BACTERIA**

MURAT AKDOĞAN

DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

POLİHİDROKSİALKANOATLARIN GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BAKTERİLERDE ÜRETİMİ, KARAKTERİZASYONU VE MATEMATİKSEL MODELLENMESİ

MURAT AKDOĞAN

Doktora, Kimya Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Şubat 2021, 154 sayfa

Fosil yakıt türevli plastikler, doğada parçalanmalarının uzun sürmesi, ayrıca içerdikleri kanserojen bileşenler nedeniyle, insan ve çevre üzerinde ciddi sağlık sorunları oluşturmaktadır. Fosil yakıt rezervlerinin tükenmeye başlamasıyla birlikte bu tür plastiklerin yerini alabilecek alternatif malzemelerden birisi de biyoparçalanabilirlik ve biyoyumluluk gibi avantajları nedeniyle polihidroksialkanoatlar (PHA)'dır. Polihidroksialkanoatlar (PHA), çeşitli mikroorganizmalarda, fosfor, azot ve oksijen gibi belirli bileşenler yönünden zayıf, fakat karbon açısından zengin bir besi yerinde, hücre içi enerji ve karbon rezervi olarak sentezlenen polyesterlerdir.

Tez kapsamında, *Bacillus megaterium* mikroorganizması kullanılarak bakteriyel yolla biyopolimer üretimi ve biyopolimer üretiminde etkili biyoproses tasarım parametrelerinin incelenmesiyle, *Bacillus megaterium* NRRL B-14308 suşundan PHA'nın yüksek verimlilikte üretimi amaçlanmıştır. Ayrıca, *B. megaterium*'un

genomunda PHA sentezinden sorumlu *phaC* geni bir ekspresyon vektörüne klonlanarak, PHA-sentaz enziminin (PhaC) üretiminin artırılması ve bu sayede PHA üretiminin artırılması hedeflenmiştir. Elde edilen rekombinant suşlar ile laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretiminin optimizasyonu, genomik ölçekte metabolik modellemesi, üretilen biyopolimerlerin saflaştırılması ve karakterizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılan PHA biyopolimerlerinin yapısal ve termal özellikleri Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), Gaz Kromatografisi (GC-FID), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS), Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizleri ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen PHA biyopolimerlerinin kopolimer (PHB-co-PHV) yapısında olduğu ve 3-hidroksibütirat (3HB) ve 3-hidroksivalerat (3HV) monomer birimlerinden meydana geldiği belirlenmiştir. PHA üretim verimini arttırmak için kontrollü biyoreaktörde yarı kesikli besleme çalışmaları, önceden belirlenmiş 3 farklı üstel besleme hızında ($\mu=0,05$; $\mu=0,075$ ve $\mu=0,1$ sa^{-1}) gerçekleştirilmiştir. Buna göre, rekombinant *B. megaterium* hücrelerinden $\mu=0,1$ sa^{-1} besleme hızında en yüksek hücre derişimine (7,7 g/L) ve PHA derişimine (6,15 g/L) ulaşılmış; üstel yarı kesikli besleme stratejisi ile kesikli sisteme göre 2,2 kat daha fazla PHA üretilmiştir. Ayrıca, *B. megaterium* için literatürde yer alan güncel *JA1121* modeline 7 gen, 6 metabolit ve 7 reaksiyon eklenerek genomik ölçekte yeni bir metabolik model (*BM1128*) oluşturulmuş ve model akı denge analizi (FBA) yöntemi ile çözülmüştür.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, tanımlanmış ortamda ve herhangi bir öncül metabolit ilave etmeksizin, *Bacillus* suşlarında yüzde mol bazında en yüksek 3HV monomer içeriğine sahip (%58 3HV) PHB-co-PHV kopolimerleri üretilmiştir. Ayrıca bu çalışma, yüksek ürün verimine sahip ($Y_{P/X} = 0,74$ g g^{-1}) *B. megaterium* NRRL B-14308 suşunda daha da gelişmiş bir biyopolimer üretim sürecine giden yolu açmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyopolimer, polihidroksialkanoat, rekombinant *B. megaterium*, biyoproses, karakterizasyon, metabolik modelleme

ABSTRACT

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND MATHEMATICAL MODELING OF POLYHYDROXYALKANOATES BY GENETICALLY MODIFIED BACTERIA

MURAT AKDOĞAN

Doctor of Philosophy, Department of Chemical Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

February 2021, 154 pages

Owing to their poor degradation rates and their carcinogenic components, fossil-resource based plastics pose serious health problems on humans and the environment. Along with the depletion of fossil fuel reserves, polyhydroxyalkanoates (PHAs) are one of the eco-friendly alternatives to conventional plastics, because of their advantages such as biodegradability and biocompatibility. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters accumulated in a wide variety of microorganisms as intracellular carbon and energy storage material for the cells, under nutrient-limited conditions such as phosphorus, nitrogen and oxygen, and excess carbon source in the growth medium.

The present study aims to produce PHA biopolymers from *Bacillus megaterium* NRRL B-14308 strain with a higher production efficiency, by investigating the bioprocess design parameters. Also, *phaC* gene was cloned into an expression vector, aiming to increase the production of PHA-synthase enzyme (PhaC) and thereby, increase the PHA production. Additionally, optimization of PHA production,

metabolic modeling, purification and characterization studies were investigated using the recombinant strains. Structural and thermal properties of PHA purified by solvent extraction were characterized by FTIR, ¹H-NMR, GC-FID, GC-MS, TGA and DSC analyses. The PHA characterization studies revealed that the PHA biopolymers were in PHB-co-PHV copolymer structure, consisted of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) monomer units. Fed-batch cultivations were performed in controlled bioreactors at pre-determined specific growth rates ($\mu=0.05$, $\mu=0.075$ and $\mu=0.1 \text{ h}^{-1}$) to achieve a higher PHA yields. Accordingly, rec-*B. megaterium* cells in fed-batch fermentation with a pre-determined growth rate $\mu=0.1 \text{ h}^{-1}$ produced the highest CDW (7.7 g L^{-1}) and PHA concentration (6.15 g L^{-1}). Moreover, an exponential glucose feeding profile resulted in 2.2-fold increase in PHA yield compared to batch cultivation. Also, the reconstructed genomic scale metabolic model for *B. megaterium* named *BM1128*, with 7 genes, 6 metabolites, and 7 reactions added to the current *iJA1121* model, was solved using metabolic flux balance analysis (FBA) technique.

As a result, this study is significant for the production of PHB-co-PHV copolymer with a high 3HV content (58 mol% 3HV) by *Bacillus* strains from an unrelated, simple carbon source, glucose, with a defined medium and no need for precursor addition. Overall, this study paves the way to an enhanced biopolymer production process in *B. megaterium* cells, where the highest product yield on cell was obtained as $Y_{P/X} = 0.74 \text{ g g}^{-1}$.

Keywords: Biopolymer, polyhydroxyalkanoate, recombinant *B. megaterium*, bioprocess, characterization, metabolic modeling

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarım süresince desteğini bir an olsun eksik etmeyen çalışmanın en zor anlarında engin bilgi birikimi ile her türlü yardımı gösteren hem akademik anlamda hem de hayata dair kendisinden çok şey öğrendiğim saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR'a,

Tez çalışmalarım boyunca doktora tez izleme komitemde olup değerli katkılarını benimle paylaşan ve ilgilerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. S. Ali TUNCEL ve Sayın Doç. Dr. Erhan BAT hocalarıma,

Tez çalışmamı, FBB-2016-11851 numaralı Üstün Genç Bilim İnsanı Projesi ile destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne sağladığı desteklerden dolayı,

Tez çalışmalarımın ilerlemesi sırasında SDS-PAGE ve Western Blot deneylerinde yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşım Araş. Gör. İlkay KOÇER KULOĞLU'na,

Modelleme çalışmalarında bana yardımcı olan Ece ANTURAN'a,

Doktora çalışmalarım sırasında yorucu laboratuvar ortamını daha eğlenceli hale getiren aynı laboratuvarı paylaştığım arkadaşlarım; Dilek ŞAHİNBAŞ'a, Haliuka TSOGTBAATAR'a, Sena KILIÇ'a, Emine ALTUN'a ve Batuhan DOĞAN'a,

Yaşamım boyunca beni her an destekleyen, ilgilerini ve sevgilerini esirgemeyen aileme,

2017 Mayıs'ından beri hep yanımda olan, hayatıma kattığı saymakla bitmeyecek her güzellik için 'iyi ki yanımdasın' diyeceğim sevgili eşim Çağrı Zeynep SÜNGÜ AKDOĞAN'a ve

asla unutulmayacak olan BARTUŞ'a

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	3
2.1. Plastikler	3
2.2. Biyoplastikler.....	4
2.3. Polihidroksialkanoatlar (PHA)	7
2.3.1. Polihidroksialkanoatların genel fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri .	10
2.4. Polihidroksialkanoatların biyosentezi	13
2.5. PHA üreten organizmalar.....	19
2.6. Doğal PHA üreticisi olarak <i>Bacillus</i>	22
2.7. PHA'nın ticari üretimi	26
2.8. PHA'nın hücre ortamından saflaştırılması.....	28
2.9. Polihidroksialkanoatların kullanım alanları	33
2.10. Biyoreaktörler ve çalışma modları	35
2.10.1. Yarı kesikli sistemde tasarım eşitlikleri.....	36
2.11. PHA üretiminin matematiksel modellemesi	39
2.11.1. PHA üretiminin metabolik modellemesi.....	39

2.11.2. Akı denge analizi (FBA)	40
2.11.3. <i>Bacillus megaterium</i> ve genomik ölçekli metabolik modelleme	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı ve plazmidler	44
3.2. Genetik mühendisliği metotları	45
3.2.1. Agaroz jel elektroforezi	47
3.2.2. DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu	47
3.2.3. Primer tasarımı	48
3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	49
3.2.5. PZR sonrası DNA'nın saflaştırılması	49
3.2.6. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi	50
3.2.7. Kesim sonrasında DNA'nın saflaştırılması	50
3.2.8. Ekleme reaksiyonu (Ligasyon)	50
3.3. <i>E. coli</i> 'nin CaCl ₂ metodu ile transformasyonu	51
3.4. DNA dizi analizi	52
3.5. <i>B. megaterium</i> protoplast transformasyonu	52
3.6. Rekombinant <i>B. megaterium</i> hücrelerinde PHA üretimi	53
3.7. Rekombinant protein analizi	54
3.7.1. Bradford yöntemi	54
3.7.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve western blotlama	54
3.8. PHA üretiminde kullanılan mikroorganizma, besi ortamı ve çoğalma koşulları	55
3.8.1. PHA üretiminde kullanılan minimal besi ortamı optimizasyonu	56
3.8.2. C/N molar derişim oranının PHA üretimine etkisi	57

3.8.3. Biyoreaktörde çözünmüş oksijen derişiminin (% DO) PHA üretimine etkisi ve oksijen transfer parametrelerinin belirlenmesi	57
3.9. Biyoreaktörde yarı kesikli besleme ile PHA üretimi	58
3.10. PHA üretim miktarının Nile red floresan spektroskopisi ile tayini.....	58
3.11. DNS yöntemi ile artık glikoz miktar tayini.....	59
3.12. PHA ekstraksiyonu	59
3.13. PHA karakterizasyonu.....	59
3.13.1. Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	59
3.13.2. Termogravimetrik analiz (TGA)	60
3.13.3. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC).....	60
3.13.4. ¹ H-NMR.....	60
3.13.5. Gaz kromatografisi analizi (GC-FID)	60
3.13.6. Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS)	61
3.14. <i>B. megaterium</i> genom ölçekli metabolik model rekonstrüksiyonu ve akı denge analizi (FBA)	61
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	63
4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile <i>phaC</i> geninin çoğaltılması	63
4.2. Vektör ve gen kasetlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	64
4.3. Rekombinant plazmidlerin <i>E. coli</i> 'ye aktarılması	66
4.4. Rekombinant <i>B. megaterium</i> hücrelerinde PHA üretimi	67
4.5. <i>Bacillus megaterium</i> 'da rekombinant PhaC protein ekspresyonu.....	71
4.6. PHA ekstraksiyonu ve çeşitli dehidrasyon tekniklerinin PHA üretimine etkisi	72
4.7. Çeşitli dehidrasyon teknikleri ve çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılan PHA polimerlerinin karakterizasyonu	74
4.8. PHA üretiminde kullanılan minimal besi ortamı optimizasyonu	82

4.8.1. C/N molar derişim oranının PHA üretimine etkisi	84
4.9. Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> ve rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları ile biyoreaktörde PHA üretimi ve karakterizasyonu	86
4.9.1. Gaz kromatografisi (GC-FID) ve ¹ H-NMR analizleri	91
4.10. Biyoreaktörde çözünmüş oksijen derişiminin (%DO) PHA üretimine etkisi	96
4.11. Biyoreaktörde farklı %DO değerlerinde oksijen transfer parametrelerinin belirlenmesi	101
4.12. Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> ve rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları ile yarı kesikli biyoreaktörde PHA üretimi	102
4.13. Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> ve rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları ile yarı kesikli biyoreaktörde PHA üretiminde oksijen transfer parametrelerinin belirlenmesi	106
4.14. Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> ve rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları ile yarı kesikli biyoreaktörde üretilen PHA karakterizasyonu	109
4.15. <i>B. megaterium</i> genom ölçekli metabolik model rekonstrüksiyonu ve akı denge analizi (FBA)	113
5. SONUÇLAR.....	116
KAYNAKLAR.....	121
EKLER	146
ÖZGEÇMİŞ	153

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Plastik türleri	5
Çizelge 2.2.	PHB, PHBV ve çeşitli sentetik polimerlerin fiziksel ve termal özellikleri [41-44].....	13
Çizelge 2.3.	PHA homopolimerleri ve farklı yapıda PHA kopolimerleri [55]	17
Çizelge 2.4.	PHA biyosentezinde görev alan enzimler [54, 68]	17
Çizelge 2.5.	PHA polimeraz enzimleri.....	19
Çizelge 2.6.	PHA üreten <i>Bacillus</i> türleri, kullanılan karbon kaynağına göre üretilen PHA miktarı ve çeşidi	23
Çizelge 2.7.	Ticari PHA üretiminde dünya çapında en önemli firmalar, ürünleri, üretim kapasiteleri ve kullandıkları hammaddeler	27
Çizelge 2.8.	PHA saflaştırmasında kullanılan yöntemlerin başlıca avantaj ve dezavantajları [156, 169].....	30
Çizelge 2.9.	PHA biyopolimerlerinin kullanım alanları ve potansiyel uygulamaları [174].....	34
Çizelge 2.10.	<i>Bacillus</i> türleri için genom ölçekli metabolik modeller	43
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan suşlar ve plazmidler	44
Çizelge 3.2.	Çalışmada kullanılan primerler	48
Çizelge 3.3.	PZR reaksiyon parametreleri	50
Çizelge 3.4.	Ligasyon karışımı.....	51
Çizelge 3.5.	Hyp besi ortamı bileşenleri [212].....	53
Çizelge 3.6.	Farklı minimal besi ortamı bileşenleri.....	56
Çizelge 4.1.	Primerlerin erime sıcaklıkları ve uzunlukları.....	63
Çizelge 4.2.	Kesme reaksiyonu	66
Çizelge 4.3.	Ligasyon ürünleri	66
Çizelge 4.4.	DNA dizini doğrulanmış rekombinant klonlar	68
Çizelge 4.5.	Maksimum dehidre edilmiş biyokütle miktarı, maksimum PHA birikimi, kurutulmuş biyokütlenin PHA içeriği (%CDW) ve hacimsel verimlilik değerleri	74

Çizelge 4.6.	Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden sentezlenen ve liyofilizasyon (-L), etanol/ısı işlem (-E) ve mikrodalga yardımı ile kurutma (-M) dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin (PHB-C) termal özellikleri	80
Çizelge 4.7.	Farklı minimal besi ortamlarında PHA üretimi sonucunda elde edilen kinetik parametreler	83
Çizelge 4.8.	Farklı C/N molar derişim oranlarında elde edilen kinetik parametreler	86
Çizelge 4.9.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 (-rec) ve doğal fenotip NRRL B-14308 (-w.t.) bakteriyel hücrelerinin orbital çalkalamalı biyoreaktör (O-) ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörde (B-) PHA üretimi kinetik parametreleri.....	88
Çizelge 4.10.	Biyoreaktörde üretilen PHA'ların PHB-co-PHV içeriği.....	93
Çizelge 4.11.	Farklı %DO değerlerinde doğal fenotip <i>B. megaterium</i> bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretimi kinetik parametreleri.....	97
Çizelge 4.12.	Farklı %DO değerlerinde zamana bağlı oksijen transfer parametreleri.....	102
Çizelge 4.13.	Doğal fenotip ve rekombinant <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 suşlarının laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda zamana bağlı oksijen transfer parametreleri.....	107
Çizelge 4.14.	Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 ve rekombinant <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 suşundan laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde kesikli ve yarı kesikli fermentasyonlarla elde edilen PHA polimerlerinin termal özellikleri.....	112
Çizelge 4.15.	Doğal fenotip (w.t) ve rekombinant (rec) <i>B. megaterium</i> mikroorganizmalarından laboratuvar ölçekli biyoreaktörde kesikli fermentasyon (-B) çalışmalarındaki çoğalma hızlarının deneysel ve <i>in silico</i> (FBA) analiz sonuçları.....	114

Çizelge 4.16. Doğal fenotip (w.t) ve rekombinant (rec) *B. megaterium* mikroorganizmalarından laboratuvar ölçekli biyoreaktörde yarı kesikli fermantasyon (-FB) çalışmalarındaki çoğalma hızlarının deneysel ve *in silico* (FBA) analiz sonuçları..... 115

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Biyoplastiklerin temel sınıflandırılması [2].	5
Şekil 2.2.	2018-2024 yılları arasında küresel biyoplastik üretim miktarı [9].	6
Şekil 2.3.	PHA beşikten beşiğe yaşam döngüsü [9].	7
Şekil 2.4.	PHA'ların genel kimyasal yapısı. R: alkil grup, n: karbon zincir uzunluğu, m:monomer sayısı.	8
Şekil 2.5.	Çeşitli PHA kopolimerlerinin genel kimyasal yapısı [20].	9
Şekil 2.6.	PHA granüllerinin hücre içerisindeki lokalizasyonu [28].	10
Şekil 2.7.	PHB'nin genel kimyasal yapısı	11
Şekil 2.8.	PHBV'nin genel kimyasal yapısı	12
Şekil 2.9.	PHA biyosentezinde yer alan metabolik yollar [55]	16
Şekil 2.10.	PHA granül yapısının şematik gösterimi [69].	18
Şekil 3.1.	Klonlama prosedürünün şematik gösterimi	46
Şekil 4.1.	<i>phaC</i> gen kaseti (insert DNA)'nin <i>SpeI</i> ve <i>SphI</i> -HF restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü. M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı; 1: GGS bağlayıcı (linker) peptidi kodlayan sekansı içeren gen kaseti (1145 bç).	64
Şekil 4.2.	pC-HIS1623hp vektörünün <i>SpeI</i> ve <i>SphI</i> restriksiyon enzimleri ile teker teker kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb DNA ladder. 1: <i>SpeI</i> ile kesilmiş pC-HIS1623hp vektör görüntüsü. 2: <i>SphI</i> ile kesilmiş pC-HIS1623hp vektör görüntüsü.	65
Şekil 4.3.	Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş rekombinant pC-HIS1623hp plazmidlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1: 1 kb DNA moleküler ağırlık standardı. 4: Seçilen L1 plazmidi 6: Seçilen L2 plazmidi.	67
Şekil 4.4.	DNA dizini doğrulanmış rekombinant <i>B. megaterium</i> suşlarının Nile red ile boyama sonrası floresan spektroskopisi deney verileri. Nile red boyası spesifik olarak hücre içi lipidleri boyamakta olup, floresan yoğunluğu üretilen PHA ile doğru orantılıdır.	69

Şekil 4.5.	Çeşitli ksiloz indüksiyon derişimlerinde Nile red ile boyama sonrası floresan spektrofotometre ölçüm değerleri.....	70
Şekil 4.6.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> bakteriyel hücrelerinin üretim ortamındaki hücre derişimi değerleri.....	71
Şekil 4.7.	Doğal fenotip ve rekombinant <i>B. megaterium</i> hücrelerinde rekombinant PhaC proteini analizi. Sol panel: SDS-PAGE; sağ panel: anti-His antikoruna ile Western Blot.	72
Şekil 4.8.	Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden orbital çalkalamalı biyoreaktörde PHA üretiminde zamana bağlı glikoz tüketimi (Cs, kesikli çizgi), hücre derişimi (Cx, gri çizgi) ve PHA birikimi (koyu çizgi).....	73
Şekil 4.9.	Çeşitli dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin (PHB-C) FTIR analizi.....	75
Şekil 4.10.	Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden sentezlenen ve çeşitli dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin ¹ H-NMR spektrumu a) PHB-C, b) PHA-L, c) PHA-E, d) PHA-M.....	78
Şekil 4.11.	Doğal fenotip <i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden sentezlenen ve çeşitli dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin TGA analizi.....	79
Şekil 4.12.	GC-MS kromatogramı a) 3HB metil ester b) 3HV metil ester.....	81
Şekil 4.13.	<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerin farklı minimal besi ortamlarında hücre derişimi değerleri.....	83
Şekil 4.14.	<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin farklı C/N molar derişim oranlarındaki minimal besi ortamlarında hücre derişimi değerleri.....	84
Şekil 4.15.	Orbital çalkalamalı biyoreaktörde çeşitli C/N molar derişim oranlarının hücre içi PHA birikimi ve hücre kuru ağırlığına etkisi	85

- Şekil 4.16. Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 ve doğal fenotip NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin orbital çalkalamalı biyoreaktör ve laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki inkübasyonu süresince hücre derişimleri..... 87
- Şekil 4.17. Rekombinant ve doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretiminde zamana bağlı glikoz tüketimi (Cs, kesikli çizgi), hücre çoğalması (Cx, gri çizgi) ve PHA birikimi (koyu çizgi) a) B-w.t b) O-w.t c) B-rec d) O-rec. 90
- Şekil 4.18. GC-FID kromatogramları a) Doğal fenotip hücrelerden elde edilen PHA b) Rekombinant hücrelerden elde edilen PHA 92
- Şekil 4.19. GC-FID analizi için PHA kalibrasyon eğrisi 92
- Şekil 4.20. Doğal fenotip (-w.t) ve rekombinant (-rec) *B. megaterium* NRRL B-14308 suşlarından orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde (O-) ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörde (B-) ve elde edilen PHA polimerlerinin ¹H-NMR spektrumu a) B-w.t b) B-rec c) O-w.t d) O-rec. 95
- Şekil 4.21. Farklı %DO değerlerinde doğal fenotip *B. megaterium* bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktörde inkübasyon süresince zamana bağlı hücre derişimi değerleri 97
- Şekil 4.22. Farklı %DO değerlerinde doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretiminde zamana bağlı glikoz tüketimi (Cs, kesikli çizgi), hücre çoğalması (Cx, gri çizgi) ve PHA birikimi (koyu çizgi). a) %10 DO b) %20 DO c) %30 DO..... 99
- Şekil 4.23. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretimi süresince %DO profilleri 100
- Şekil 4.24. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda, PHA üretimi süresince hücre derişimi değerleri 104

- Şekil 4.25. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda PHA birikimi..... 105
- Şekil 4.26. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücreleriyle laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda elde edilen kinetik ve stokiyometrik parametreler..... 106
- Şekil 4.27. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşlarından laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde kesikli (B) ve yarı kesikli (FB) fermentasyonlarla elde edilen PHA polimerlerinin ¹H-NMR spektrumu a) PHA-B-wt b) PHA-B-rec c) PHA-FB-wt d) PHA-FB-rec..... 111

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μm	Mikrometre
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram
μg	Mikrogram
ng	Nanogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
mM	Milimolar
M	Molar
MPa	Megapaskal
GPa	Gigapaskal
V	Volt
s	Saniye
dk	Dakika
sa	Saat
$Y_{X/S}$	Substrat başına hücre verimi
$Y_{P/S}$	Substrat başına ürün verimi
q	Hacimsel verimlilik
μ	Spesifik çoğalma hızı
μ_{max}	Maksimum spesifik çoğalma hızı
$k_{L\alpha}$	Volumetrik oksijen kütle transfer katsayısı
$k_{L\alpha 0}$	Fiziksel oksijen kütle transfer katsayısı
E	Gelişme faktörü
Q_s	Substrat besleme hızı

C_{x0}	Başlangıç anındaki hücre derişimi
C_{s0}	Başlangıç anındaki substrat derişimi
V_0	Başlangıç anındaki biyoreaktör hacmi
T_d	Bozunma sıcaklığı
T_m	Erime sıcaklığı
T_g	Camsı geçiş sıcaklığı
kDa	Kilodalton

Kısaltmalar

3HB	3-Hidroksibütirat
3HBME	3-Hidroksibütirat metil ester
3HV	3-Hidroksivalerat
3HVME	3-Hidroksivalerat metil ester
Amp	Ampisilin
B	Biyoreaktör
-B	Kesikli biyoreaktör
Bio-PE	Biyo-Polietilen
Bio-PET	Biyo-Polietilen tereftalat
BSA	Sığır Serum Albümin
CDW	Kuru Hücre Ağırlığı
DNS	3,5-dinitrosalisilik asit
DO	Çözünmüş Oksijen
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
-E	Etanol
-FB	Yarı kesikli biyoreaktör
FBA	Akı Denge Analizi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
GC-FID	Gaz kromatografisi-Alev İyonlaşma Dedektörü
GC-MS	Gaz kromatografisi Kütle Spektroskopisi

GGS	Glisin Glisin Serin
KoA	Koenzim A
-L	Liyofilize
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolisakkarit
-M	Mikrodalga
MM	Minimal Besi Ortamı
¹ H-NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
-O	Orbital Çalkalamalı Biyoreaktör
OAH	Oksijen Alım Hızı
OD	Optik Yoğunluk
OTH	Oksijen Transfer Hızı
PBA	Polibütilen adipat
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PE	Polietilen
PET	Polietilen tereftalat
PHA	Polihidroksialkanoat
mcl-PHA	Orta zincir uzunluklu polihidroksialkanoat
scl-PHA	Kısa zincir uzunluklu polihidroksialkanoat
PhaA	β-ketotiaz enzimi
PhaB	asetoasetil-KoA redüktaz enzimi
PhaC	PHA sentaz enzimi
PHB	Polihidroksibütirat
PHB-co-PHV	Polihidroksibütirat-ko-hidroksivalerat
PHBV	Polihidroksibütirat-ko-hidroksivalerat
PHHx	Poli (3-hidroksiheksanoat)
PHO	Poli (3-hidroksioktanoat)
PK	Pozitif Kontrol
PLA	Polilaktik asit
PP	Polipropilen

PS	Polistiren
PVC	Polivinilklorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rec	Rekombinant
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit
	Jel Elektroforezi
TCA	Trikarboksilik Asit
Tet	Tetrasiklin
TGA	Termogravimetrik Analiz
w.t.	Doğal Fenotip

1. GİRİŞ

Hayatımızın her anında var olan ana maddelerden biri olan plastikler, günümüzde çoğunlukla kömür ve petrol gibi fosil yakıtlardan elde edilmektedir. Fosil yakıtlardan elde edilen plastikler doğada uzun yıllar yok olmayarak çevre kirliliğine neden olmakta, ayrıca içerdikleri kanserojen maddeler nedeniyle de canlılar üzerinde ciddi sağlık sorunları oluşturmaktadır. Fosil yakıtların tükenmeye başlamasıyla birlikte, insanoğlunun fosil yakıtlara olan bağımlılığını azaltmak için geleneksel plastiklerle benzer fizikokimyasal özelliklere sahip, yenilenebilir polimerler üzerine araştırma çalışmaları son yıllarda artan bir ilgiye sahiptir. Biyoplastikler, yenilenebilir biyolojik kaynaklardan ve mikroorganizmalardan elde edilen biyobozunur polimerlerdir. Polihidroksialkanoatlar (PHA) oksijen, azot, fosfor, kükürt, demir ya da magnezyum gibi besin eksikliğinin bulunduğu sınırlı çoğalma koşullarında *Cupriavidus necator*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas*, *Bacillus megaterium* ve rekombinant *E. coli* gibi birçok bakteride hücre içi karbon ve enerji kaynağı olarak sentezlenen, biyobozunur ve biyoyumlu polyesterlerdir.

Bakteriyel PHA granülleri, fonksiyonelleştirilmiş kürecik yapısı nedeniyle biyoteknoloji ve biyomedikal uygulamalar için son yıllarda büyük bir potansiyel göstermektedir. PHA, hücre sitoplazmasında hücre içi yağ granülleri şeklinde yer almakta olup; birçok bakteride PHA biyosentezindeki anahtar enzim PHA sentaz (PhaC) enzimidir. PhaC enzimi; koenzim A salınımını sağlayarak R-3-hidroksiasil-KoA tioster monomerlerinin polyester yapı içerisinde polimerizasyonunu sağlamaktadır.

Günümüzde PHA üretim miktarını arttırma çalışmaları, temel olarak hücrelerin genetik yapılarında ve besi ortamında yapılan modifikasyonlar ile gerçekleştirilmektedir. Besi ortamındaki azot, oksijen ve temel elementlerin azlığı, bakterinin karbon ve enerji rezervi olarak PHA biriktirmesine neden olmaktadır.

Doğal bir PHA üreticisi ve Gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus megaterium*, patojen özellik göstermeyip; Gram-negatif bakterilerin hücre dışı membranında bulunan

lipopolisakkarit (LPS) ya da lipoglikan olarak adlandırılan endotoksinler bulundurmaz. Lipopolisakkaritlerin giderimi, PHA üretim maliyetini arttırmakta olup PHA polimer özelliklerinde de (polidispersite, molekül ağırlığında azalma, vb.) değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca, *B. megaterium* suşlarının alkalın proteaz enzimi içermemesi sebebiyle yabancı proteinlerin hücre dışına salınımı sonrası parçalanma oranı oldukça düşüktür.

Bu tez kapsamında; ilk olarak doğal bir PHA üreticisi olan *Bacillus megaterium* NRRL B-14308 mikroorganizması kullanılarak bakteriyel yolla PHA üretimi incelenmiştir. Daha sonra, *B. megaterium*'un genomunda PHA sentezinden sorumlu *phaC* geni bir overekspresyon vektörüne klonlanmış, elde edilen rekombinant *B. megaterium* suşları ile PHA üretiminin artırılması hedeflenmiştir. SDS-PAGE ve Western Blot analizleri ile rekombinant *phaC* protein ekspresyonu incelenmiştir. Ayrıca, bu şekilde rekombinant suşların elde edilmesi literatürde ilk kez gerçekleştirilmiştir. Doğal fenotip *B. megaterium* ve rekombinant *B. megaterium* suşları ile laboratuvar ölçekli biyoreaktörde hem kesikli hem yarı kesikli fermantasyon deneyleri gerçekleştirilerek PHA üretiminin optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde üretilen PHA polimerlerinin çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılmasında liyofilizasyon, etanol/ısı işlem, mikrodalga yardımı ile kurutma gibi dehidrasyon teknikleri ile toz haline getirme gibi ön işlemlerin ekstraksiyon işlemine etkisi incelenmiş ve bundan sonraki çalışmalar için en uygun PHA saflaştırma protokolü oluşturulmuştur. Doğal fenotip *B. megaterium* ve rekombinant *B. megaterium* suşları ile kesikli ve yarı kesikli biyoreaktörlerde üretilen PHA polimerlerinin yapısal ve termal karakterizasyonları Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H-NMR), Gaz Kromatografisi (GC-FID), Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (GC-MS), Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizleri ile incelenmiştir. Son olarak, *B. megaterium* için genom ölçekli akı denge analizi (FBA) yardımıyla biyokütle ve PHA üretiminin metaboliksel modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Plastikler

Plastikler, kalıplamaya uygun anlamına gelen Yunanca “plaktikos” teriminden türetilmiş olup geleneksel olarak fosil kaynaklardan elde edilen geniş bir özellik ve kullanım alanına sahip olan büyük bir polimer ailesidir [1]. Günümüzde plastik üretimi, dünya genelinde petrol tüketiminin yaklaşık %4-8'ini oluşturmaktadır ve bunun 2050 yılına kadar %20 seviyelerine ulaşması beklenmektedir [2]. Fosil kaynaklardan elde edilen plastikler; sertlik, dayanıklılık, hafiflik ve esneklik gibi özellikleri nedeniyle ev, ilaç ve ticari sektörde geniş uygulama alanları nedeniyle modern toplumda önemli bir ürün haline gelmiştir [3]. Dünya nüfusunun hızlı artışı ve modern hayat nedeniyle plastik malzemelere olan talep gittikçe artmakta, dünya çapında 2018 yılında yaklaşık 359 milyon ton olan plastik malzeme miktarının, sonraki 20 yıl içinde 2 kat artması beklenmektedir [2]. Ayrıca, plastik ve plastik türevli ürünlerin atıkları ciddi çevre sorunlarına neden olmaktadır. Örneğin, her yıl okyanuslara yaklaşık 10 milyon ton sentetik plastiğin sızdığı ve bu sızıntının okyanus sistemi üzerinde zararlı etki yarattığı tahmin edilmektedir [4]. Ayrıca, fosil yakıt türevli sentetik plastiklerin birçoğu yalnızca bir defa kullanılmakta ve ardından çöp sahalarına atılmaktadır.

Plastikler, furanlar, poliflorlu bileşikler, bisfenol A (BPA), antimon trioksit gibi çevre ve insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere sahip kanserojen bileşenlere sahiptir [5]. Sentetik plastiklerin doğada bozunmaları için geçen ömürlerinin yüksek olması ve açığa çıkan toksik yan ürünleri nedeniyle çevre ve insan sağlığı için ciddi sorun teşkil etmesi sebebiyle, günümüzde plastik atıkların azaltılmasına yönelik uygulanan mevcut stratejiler (yakma ve geri dönüşüm) ile hala belirgin hedeflere ulaşamamıştır. Avrupa Birliği 7. Çevre Eylem Planı kapsamında, tüm üye ülkelerin geri dönüştürülebilir malzemelerin yakılmasını sonlandırması ve 2020 yılı sonuna kadar %50 geri dönüşüm oranına ulaşması gerektiğini belirtmiştir. Ancak, heterojen malzemeler, dolgu maddeleri ve renklendirici maddeler gibi katkı maddelerinin varlığı, sentetik plastiklerin geri dönüşümünü sınırlandırmaktadır [6].

Fosil yakıtlardan elde edilen sentetik plastiklerin neden olduğu çevre kirliliği, toksik madde birikimi ve yenilenemeyen bir kaynak olan fosil yakıtlardaki fiyat dalgalanmaları nedeniyle oluşan ekonomik problemleri azaltabilmek için petrol kökenli plastiklerin yerini alabilecek biyolojik olarak parçalanabilen alternatif malzemelerin araştırma ve geliştirme çalışmaları son yıllarda büyük önem kazanmıştır.

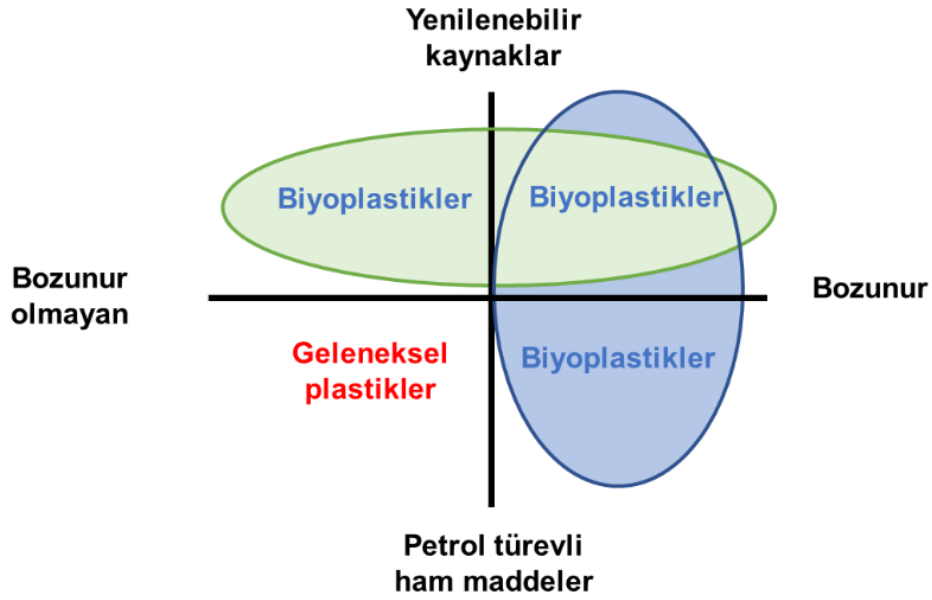
Günümüzde, polietilen tereftalat (PET), polietilen (PE), polipropilen (PP) ve polistiren (PS) gibi termoplastikler, dünyadaki plastik talebinin yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır. Petrol türevli termoplastiklerin yerini alabilecek alternatif malzemelerden birisi de yenilenebilir kaynaklardan elde edilen biyoplastiklerdir.

2.2. Biyoplastikler

Biyobazlı, biyobozunur veya hem biyobazlı hem biyobozunur plastikler olarak tanımlanan biyoplastikler, petrol türevli plastiklerle benzer özelliklere sahiptir ve biyolojik kökenli üretim teknolojileri sayesinde CO₂ emisyonlarını azaltmaya katkıda bulunmaktadır [7]. Biyoplastikler, genel olarak biyobozunabilirliklerine, monomer yapılarına ve hammadde kaynaklarına göre 3 temel grupta sınıflandırılmaktadır:

- i) Bozunur fosil yakıt-bazlı plastikler
- ii) Bozunur biyo-bazlı biyopolimerler
- iii) Bozunur olmayan biyo-bazlı biyopolimerler (Şekil 2.1 ve Çizelge 2.1)

Günümüzde, biyoplastik üretimi toplam plastik üretiminin sadece %1'ni oluşturmaktadır. 2018 yılında 3,02 milyar dolar olan küresel biyoplastik pazarının 2025 yılına kadar 6,73 milyar dolar değerine ulaşacağı tahmin edilmektedir. Bu dramatik artışın ana nedenlerinden biri de Hindistan, Brezilya ve Çin gibi gelişmekte olan ülkelerde biyobozunur polimerlere olan talebin artmasıdır [8].

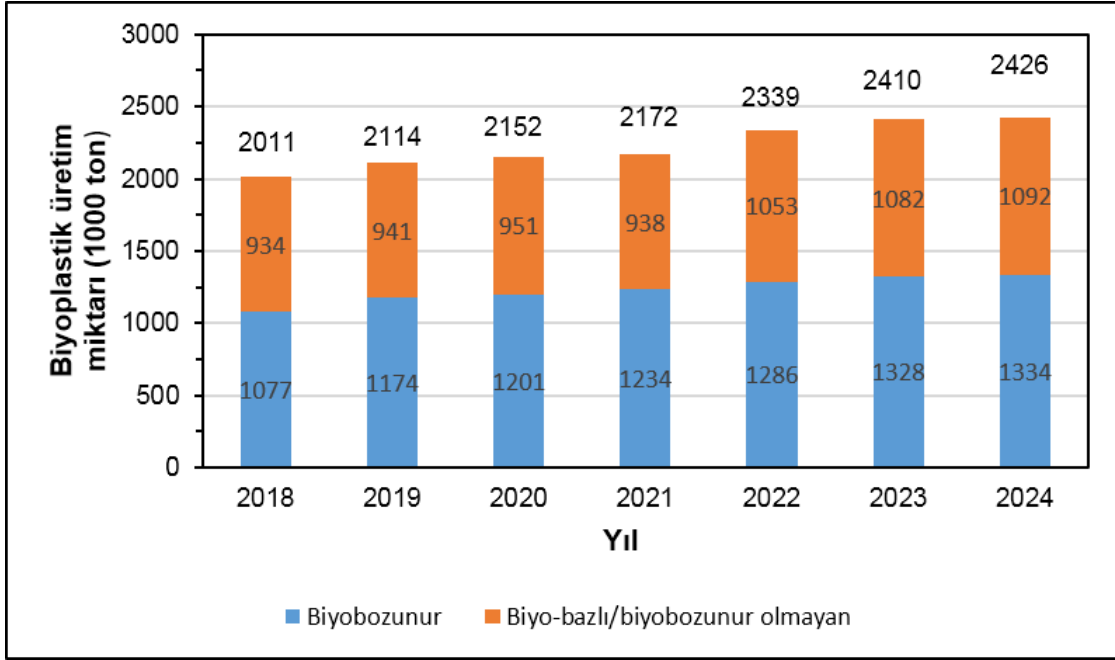


Şekil 2.1. Biyoplastiklerin temel sınıflandırılması [2].

Çizelge 2.1. Plastik türleri

	Biyo-bazlı Plastikler	Petrol-bazlı Plastikler
Biyobozunur Plastikler	Polihidroksialkanoat (PHA)	Polikaprolakton (PCL)
	Polilaktik asit (PLA)	Polibütilen sükkinat (PBS)
	Selüloz	Polibütilen adipat (PBA)
	Nişasta	
Biyobozunur olmayan plastikler	Biyo-Polibütilen sükkinat (Bio-PBS)	
	Biyo-Polietilen tereftalat (Bio-PET)	Polietilen tereftalat (PET)
	Biyo-Polietilen (Bio-PE)	Polietilen (PE)
	Biyo poliamid(PA)	Polisitren (PS)
	Polyol-poliüretan (P)	Polipropilen (PP)
		Polivinil klorür (PVC)

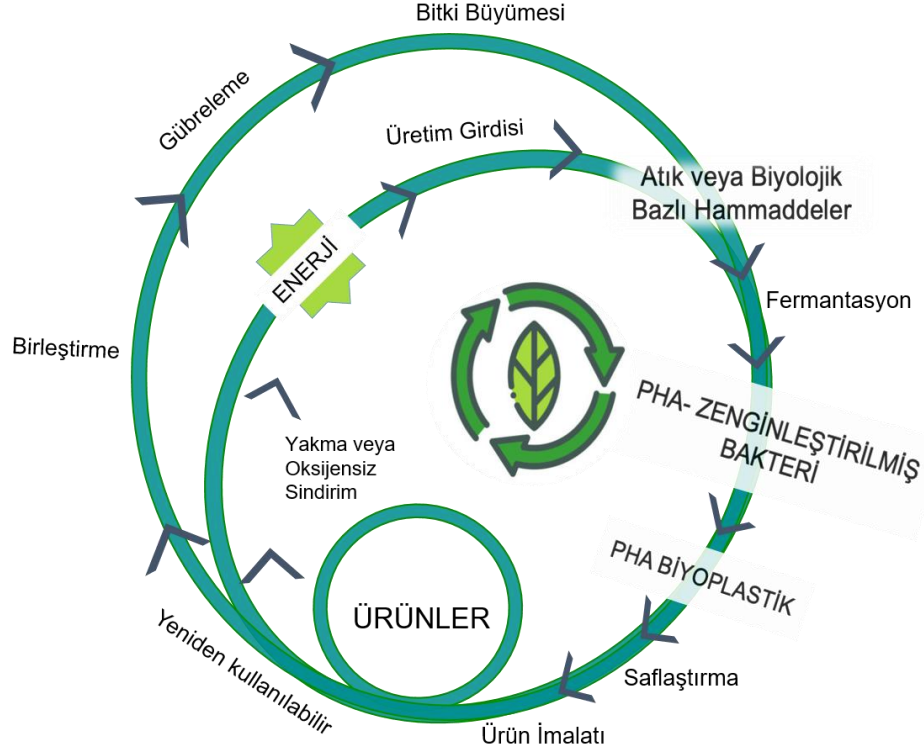
Polihidroksialkanoat (PHA) ve polilaktik asit (PLA), biyo-bazlı biyobozunur plastik pazarının büyümesini sağlayan en önemli ana malzemelerdir. PHA ve PLA, 2019 yılındaki 2,11 milyon tonluk biyoplastik üretiminde sırasıyla %1,2 ve %13,9 pazar payına sahip olmalarına rağmen, toplam küresel PHA üretiminde 2024 yılına kadar 6,3 kat civarında bir artış beklenmektedir [9]. 2019 yılında 2,11 milyon ton olan toplam biyoplastik üretiminin de 2024 yılında 2,43 milyon ton değerine ulaşması beklenmektedir (Şekil 2.2). Ayrıca, küresel biyoplastik üretimindeki artış, potansiyel uygulama alanlarındaki artışla beraber firmalar ve tüketiciler tarafından sürdürülebilir ürünlere yönelik talebin sürekli artmasından kaynaklanmaktadır. Bunun nedeni de, çevre konusundaki artan farkındalık, gelişmiş özelliklere ve yeni işlevlere sahip yeni malzemelerdeki biyoplastik endüstrisinin gelişmesi ve fosil kaynaklara olan bağımlılığı azaltma ihtiyacından kaynaklanmaktadır.



Şekil 2.2. 2018-2024 yılları arasında küresel biyoplastik üretim miktarı [9].

Fosil yakıt türevli geleneksel plastiklerin yerini alabilecek alternatif maddelerden birisi de mikrobiyal metabolik aktivitelerle elde edilen yeni nesil biyo-bazlı bir polimer olan polihidroksialkanoatlardır (PHA). PHA, beşikten beşiğe yani biyo-bazlı-

biyobozunur yaşam döngüsünü (Şekil 2.3) sağlayan, tamamen biyolojik olarak parçalanabilen ve katkı maddesi içermeden %100 yenilenebilir kaynaklardan elde edilen bir biyopolimer olup, tamamen biyo bazlı ve biyobozunur tek plastik olarak kabul edilmektedir.

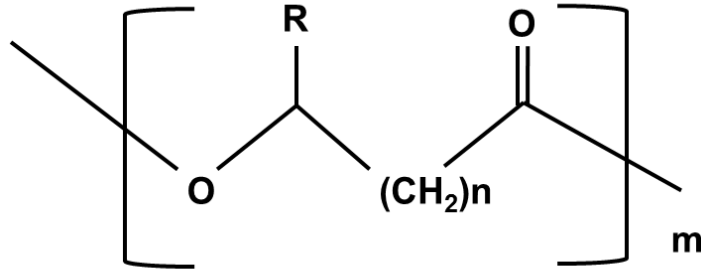


Şekil 2.3. PHA beşikten beşiğe yaşam döngüsü [9].

2.3. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Polihidroksialkanoatlar, genellikle aşırı karbon kaynağı varlığında, azot, oksijen ve fosfor gibi hücre çoğalması için sınırlayıcı beslenme koşullarında, çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenen, enerji ve karbon temini için hücre içi rezervuar görevi gören doğrusal polyesterlerdir [10, 11]. Ayrıca, PHA'lar açlık, pH ve sıcaklık dalgalanmaları, ozmotik basınç, çözülmüş oksijen derişimi gibi olumsuz koşullar ile oksidatif veya indirgeyici ajanlar ve organik çözücülerin olduğu

durumlarda bakterilerin hayatta kalmasını sağlayan bir mekanizmadır [12]. Ortamdaki beslenme koşullarının sınırlandırılması, çoğalma ortamında bulunan besinlerin mikroorganizmanın çoğalmasını destekleyebilmesi, ancak ortamdaki yüksek karbon yüzdesine kıyasla çok düşük derişimlerde olması gerektiği anlamına gelmektedir. PHA üretimi için gerekli bu besi ortamı koşulları; hücre çoğalması oranında bir azalmaya neden olmakta ve hücresel metabolizmayı PHA biyosentezine yönlendirmektedir [13]. Polihidroksialkanoatlar, genel olarak 3-hidroksialkanoik asit monomerlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.4). Polimerize edici enzim olan PHA sentaz enziminin stereo-spesifikliğinden dolayı, PHA monomerik birimlerinin R-konfigurasyonunda bulunduğu β-hidroksialkanoatların doğrusal polyeşterleridir.

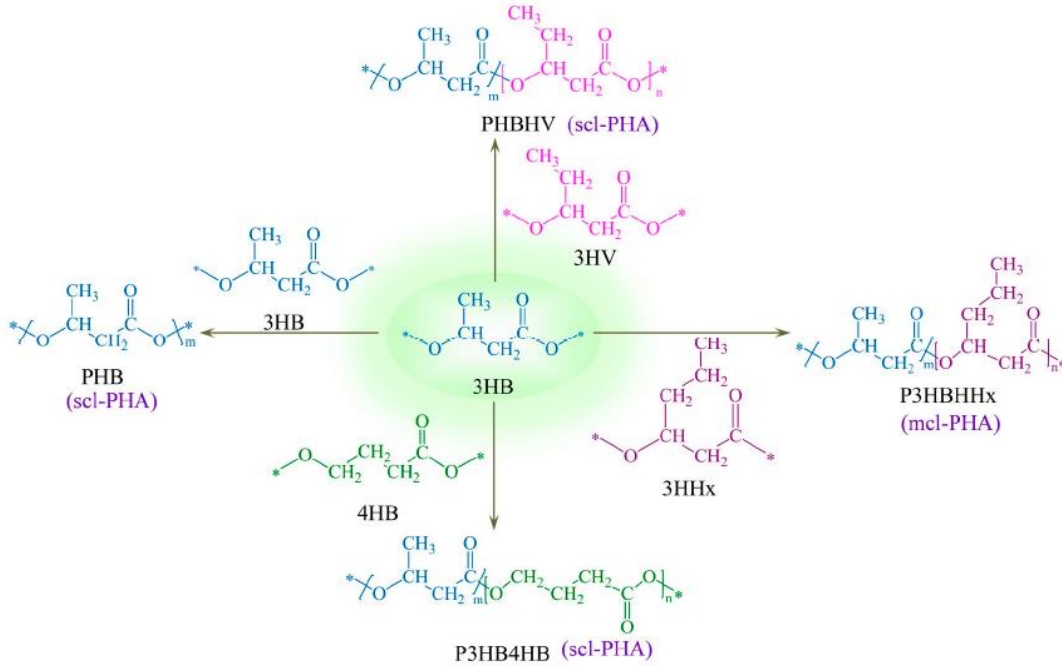


Şekil 2.4. PHA'ların genel kimyasal yapısı. R: alkil grup, n: karbon zincir uzunluğu, m:monomer sayısı.

Bir PHA monomer ünitesi; halojenlenmiş, epoksilenmiş ve dallanmış monomerler, alifatik ya da aromatik yan gruplar içeren doymuş, doymamış, düz veya dallanmış olabilen alkil yan zincir R ile tanımlanmaktadır. R grubuna ve polimerin üretildiği mikroorganizmalara bağlı olan m ifadesi ise genellikle 100 ile 30000 arasında değişmektedir [14].

PHA'lar, monomerlerindeki karbon atomlarının sayısına bağlı olarak; *Ralstonia eutropha* ve *Bacillus megaterium* gibi pek çok bakteri tarafından üretilen, monomer

başına 3-5 karbon atomu içeren kısa zincirli PHA'lar (scl-PHA), *Pseudomonas oleovorans* ve diğer *pseudomonadlar* tarafından üretilen, monomer başına 6-14 karbon atomu içeren orta zincirli PHA'lar (mcl-PHA) olmak üzere 2 gruba ayrılırlar [15]. Örneğin, poli(3-hidroksibütirat) (PHB), poli(3-hidroksivalerat) (PHV) ve kopolimer yapısındaki poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) en bilinen kısa zincir uzunluklu PHA'lar olup, poli (3-hidroksiheksanoat) (PHHx), poli (3-hidroksioktanoat) (PHO) ve kopolimer yapısındaki poli (3-hidroksiheksanoat-ko-3-hidroksioktanoat) (PHHx-HO) en tipik orta zincir uzunluklu PHA'lardır [16]. Çeşitli PHA kopolimerlerinin genel kimyasal yapısı Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Günümüzde, 150'den fazla PHA türünün olduğu belirlenmiştir ve bu da PHA'ların en büyük doğal polyeater ailesi olduğunu göstermektedir [17]. PHA üreten mikroorganizmaların çoğu kısa zincir uzunluklu PHA (scl-PHA) veya orta zincir uzunluklu PHA (mcl-PHA) sentezlemektedir. Sadece birkaç mikroorganizmanın scl-mcl PHA yapısında kopolimerler oluşturabildiği belirlenmiştir [18, 19].



Şekil 2.5. Çeşitli PHA kopolimerlerinin genel kimyasal yapısı [20].

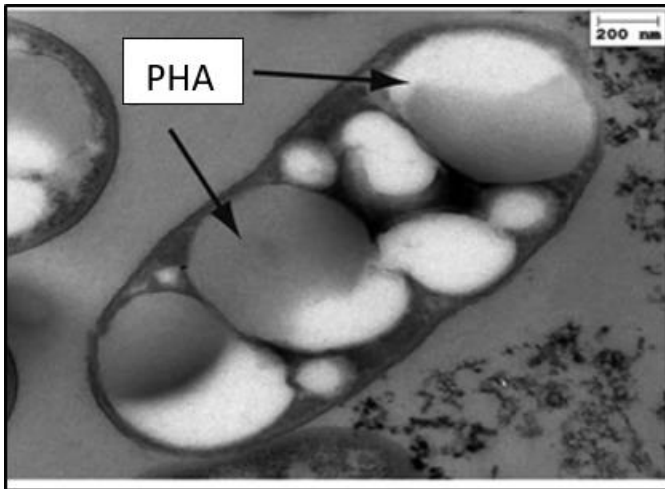
PHA'ların kısa ve orta zincir uzunluklu PHA'lar olarak sınıflandırılıyor olması, monomer büyüklükleri ve bu monomerleri tanıyan PHA polimeraz enzimlerinin

substrat spesifitesi ile ilişkilidir. Bu durum, mikroorganizmaya ve substrat kombinasyonlarındaki değişikliklere bağlı olarak çeşitli tiplerde polimerler üretilebileceğini göstermektedir [21].

2.3.1. Polihidroksialkanoatların genel fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri

Polihidroksialkanoatlar, fiziksel ve termal özellikleri polietilen (PE), polipropilen (PP) ve polistiren (PS) gibi sentetik termoplastiklere benzeyen tamamen doğal biyopolyesterlerdir ve sahip olduğu biyobozunurluk, biyouyumluluk ve termoplastiklik gibi değerli özellikler sayesinde fosil yakıt türevli sentetik termoplastiklerin yerini alabilecek en uygun aday haline gelmiştir [22, 23].

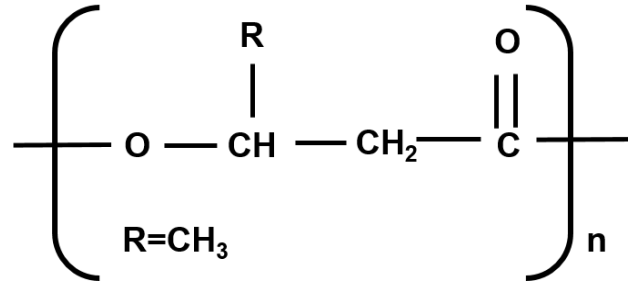
PHA polimerlerinin fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri esas olarak monomerik bileşenlerin yapılarına ve molekül ağırlıklarına bağlıdır. Bir PHA zincirinde, bir 3-hidroksi yağ asidi monomerinin karboksil grubu ile bir sonraki monomerin hidroksil grubu ester bağı yapar ve üretici mikroorganizmaya bağlı olarak 50 kDa ile 1000 kDa arasında değişen molekül ağırlığına sahip polimerler oluşmaktadır [24, 25]. PHA molekülleri hücre sitoplazmasında 0,2-0,5 µm çapında, amorf yapıda, kapalı inklüzyonlar halinde birikmekte [26], yüksek kırılma indisi nedeniyle elektron mikroskopu altında gözlemlenebilmektedir (Şekil 2.6) [27].



Şekil 2.6. PHA granüllerinin hücre içerisindeki lokalizasyonu [28].

Fosil yakıt türevli sentetik plastiklerin yerini alabilecek alternatif malzemeler arasında PHA'lar oldukça geniş bir erime sıcaklığı (T_m), camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve termal bozunma sıcaklığı (T_d) ile esnek bir Young modülü, kopma uzaması ve gerilme mukavemeti gibi mekanik özelliklere sahiptir [29].

PHA'ların bilinen ilk örneği polihidroksibütirat (PHB) olup, bir gram-pozitif bakteri türü olan *Bacillus megaterium*'da Fransız mikrobiyolog Lemoigne tarafından 1920'li yıllarda keşfedilmiş, o günden günümüze kadar farklı karbon atomu sayısına ve farklı tipte yan gruba sahip birçok PHA türü bulunmuştur [30]. Scl-PHA biyopolimerleri arasında, PHB doğrusal polimer zincir yapısına sahip, en bilinen biyobozunur, biyouyumlu ve toksik olmayan alifatik polyesterdir (Şekil 2.7) [31].



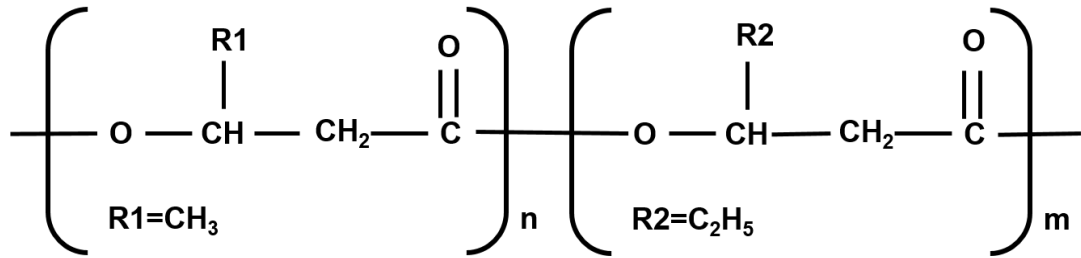
Şekil 2.7. PHB'nin genel kimyasal yapısı

Fiziksel özelliklerine bakıldığında, kısa zincir uzunluklu (scl) PHA biyopolimerlerinin sert, kırılğan ve yüksek kristallenme derecesine sahip olduğu görülürken, orta zincir uzunluklu (mcl) PHA biyopolimerleri ise daha esnek ve daha düşük kristallenme derecesine, gerilme kuvvetine ve erime noktasına sahiptir [32]. Bu nedenle, scl-PHA biyopolimerleri termoplastik özellik göstermekte olup, polipropilen (PP) veya polietilen (PE) gibi geleneksel plastiklere benzer fiziksel özelliklere sahiptir. mcl-PHA biyopolimerleri ise amorf yapıda olup, elastomerik özellik göstermektedir [33].

PHB aynı zamanda optik olarak aktif bir malzeme olup suda çözünmemekte, UV ışınına karşı yüksek direnç göstermekte, iyi bir oksijen geçirgenliğine sahip olmakta,

fakat asit-baz uygulamalarına karşı zayıf bir direnç göstermektedir [34, 35]. PHB biyopolimerleri erime sıcaklığı (T_m) 177°C, camsı geçiş sıcaklığı 4°C olan, zayıf elastisite ve oldukça yüksek bir kristal yapıya sahip malzemelerdir [36]. Bu özelliklerle birlikte PHB yüksek kırılma gücü ve yüksek erime noktası nedeniyle sınırlı uygulama alanlarına sahiptir [31, 37]. Özetle, PHB'nin geleneksel sentetik termoplastiklerin yerini alabilmesi için erime sıcaklığının düşürülmesi, gerinim mukavemetinin artırılması ve kristalinitesinin azaltılması gerekmektedir [38].

Bu kapsamda, PHB'nin fiziksel özellikleri diğer hidroksi asit monomerleri ile birleştirilip elde edilen P(HB-ko-HA) kopolimerleri ile geliştirilebilir. PHBV kopolimerleri (Şekil 2.8) scl-PHA polimerleri arasında ikinci en bilinen PHA türü olup PHBV kopolimerlerinin kristalinitesi, yapıdaki farklı yan zincir gruplarının varlığı nedeniyle artan yapısal karmaşıklıkla birlikte azalmaktadır [39]. PHBV kopolimerlerinin fiziksel özellikleri, içeriğindeki 3HV molar oranına bağlı olarak değişmektedir. PHBV kopolimer yapısındaki 3HV içeriği arttıkça, çarpma dayanıklılığı artmakta, daha esnek olmakta, böylece Young modülü değeri azalmakta ve kopma uzamasındaki artışla birlikte gerilme dayanıklılığı artış göstermektedir [40]. PHB, PHBV ve çeşitli sentetik polimerlerin fiziksel ve termal özellikleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. PHBV'nin genel kimyasal yapısı

Çizelge 2.2. PHB, PHBV ve çeşitli sentetik polimerlerin fiziksel ve termal özellikleri
[41-44]

	Kristalinite (%)	Young Modülü (GPa)	Gerilme direnci (MPa)	Kopma uzaması (%)	Tm (°C)	Tg (°C)
PHB	80	3,5-4	40-50	3-10	175-180	4
PHBV (% 3-HV yüzdesine göre)						
%3	-	2,9	38	-	170	-
%9	58	1,9	37	-	162	-
%14	55	1,5	35	-	150	-
%20	50	1,2	32	27	145	-
%25	-	0,7	30	-	137	-
PP	50-70	1,1-1,6	31-41	100-600	160-175	45
PS	-	3,1	50	3-5	110	21
LDPE	-	0,2	10	620	130	-30

2.4. Polihidroksialkanoatların biyosentezi

Polihidroksialkanoatlar, birçok mikroorganizma tarafından besi ortamında fazla miktarda karbon kaynağının varlığında ve aynı zamanda mikroorganizma çoğalması için gerekli azot, oksijen ve temel elementler (N, S, P, Mg, K ve Fe, vb) gibi bileşenlerin sınırlandırıcı olarak bulunduğu çoğalma koşullarında meydana gelen metabolik stresin sonucu olarak hücre içi lipid granülleri şeklinde sentezlenen mikrobiyal polyesterlerdir. PHA biyosentezi, glikoliz, TCA Döngüsü, β -oksidasyon, de novo yağ asitleri sentezi, amino asit katabolizması, Calvin Döngüsü ve serin metabolik yolu da dâhil olmak üzere merkezi karbon metabolik yollarıyla bağlantılı karmaşık bir süreçtir [45-50]. PHA biyosentezinde kullanılan metabolik yolak mikroorganizmaya ve besi ortamında kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişmektedir [51]. PHA biyosentezi ile merkezi karbon metabolik yolları arasındaki en önemli ortak ara madde asetil-koenzimA (-KoA) olup, 3-hidroksialkanoil-KoA monomerlerinin biyosentezindeki temel bileşendir. *Bacillus*

megaterium, *Cupriviadus necator*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi bazı PHA üretici mikroorganizmalarda asetil-KoA'dan PHA'ya olan metabolik akı büyük ölçüde besi ortamı koşullarına bağlı olmaktadır [52]. Sınırlayıcı bir besi ortamı olmadığında, yani zengin besi ortamı koşullarında, TCA döngüsünden elde edilen yüksek miktarda koenzim A üretimi, 3-ketotiolazı inhibe ederek asetil-KoA'yı enerji üretimi ve hücre çoğalması için TCA döngüsüne yönlendirmektedir. Ancak, dengesiz besin koşullarında, yani aşırı karbon substratı varlığında azot ve fosfor gibi temel bir besin maddesi sınırlandırıldığında, koenzim A, asetil-KoA'yı hücre içerisinde enerji ve karbon rezervi olarak PHA birikimi için PHA metabolik yollarına yönlendirmektedir [53]. Bu metabolik regülasyon stratejisi, PHA üreten mikroorganizmaların çevresel koşullara adaptasyonunda besin kaynaklarını en etkin şekilde kullanmasına imkan tanımaktadır [54].

PHA biyopolimerleri birçok mikroorganizmada 3 basamaklı bir reaksiyon ile sentezlenmektedir. Başlangıçta, karbon kaynağı difüzyon veya spesifik taşıyıcılar ile hücre içerisine alınmakta, asetil-KoA veya propionil-KoA gibi PHA öncül maddelerine metabolize edilmekte ve daha sonra sırasıyla R-3-hidroksibütiril-KoA veya R-3-hidroksivaleril-KoA'ya dönüştürülmektedir. Son olarak, bu moleküller PHA sentaz enzimi ile PHA polimerlerini meydana getirmektedir [52].

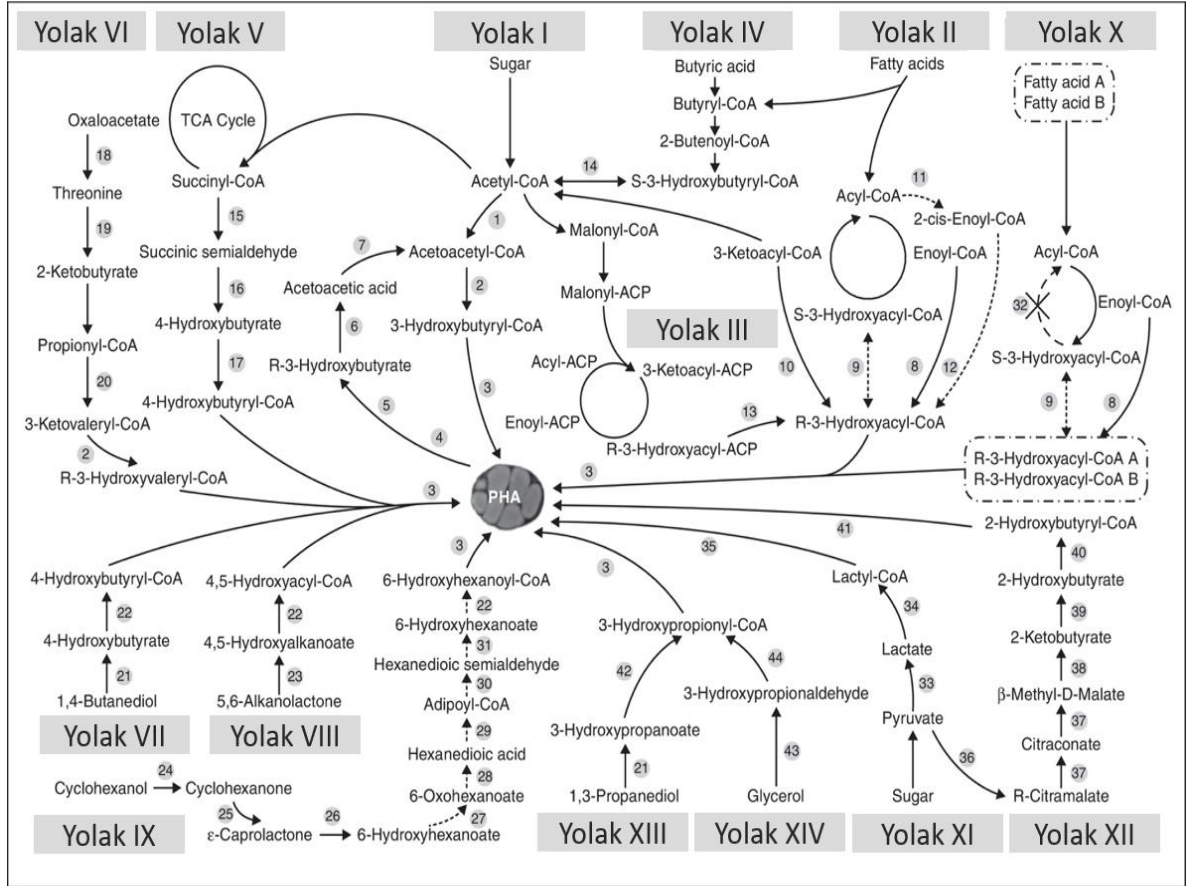
Bugüne kadar, scl-PHA ve mcl-PHA biyosentezi için toplam 14 farklı metabolik yolk tanımlanmıştır (Şekil 2.9) [55]. Yolk l'de, PHA sentezi için karbon kaynağı olarak şekerler kullanılmaktadır. Yolk l, piruvat oluşturmak için şekerlerin glikoliz reaksiyonu ile başlamaktadır. Oluşan piruvat, piruvat dehidrojenaz (PDH) oksidasyon yolu ile asetil-KoA'ya dönüştürülmektedir. Daha sonra iki asetil-KoA molekülü, β -ketotiolaz enzimi (PhaA) varlığında asetoasetil-KoA meydana gelmektedir. Asetoasetil-KoA molekülleri asetoasetil-KoA redüktaz enzimi (PhaB) ile indirgenerek R-3-hidroksibütiril-KoA oluşturmaktadır. Son aşamada, PHA sentaz enzimi (PhaC) ile R-3-hidroksibütiril-KoA'nın PHA'ya polimerizasyonunu içermektedir.

Karbon kaynağı olarak şekerlerin yanında, asetat, propionat, bütirat ve valerat gibi genellikle uçucu yağ asitleri olarak bilinen kısa zincirli yağ asitlerinden de PHA sentezlenebilir (Yolak II) [56-60]. Yolak II genellikle scl-PHA'ların biyosentezi için kullanılmaktadır. Asetat ve propionat gibi basit uçucu yağ asit molekülleri, doğrudan asetil-KoA ve propionil-KoA oluşturmak için aktive edilirken, diğer uçucu yağ asitleri, asetil-KoA ve propionil-KoA oluşturmak için β -oksidasyon reaksiyonuna girmektedir. Propionil-KoA, asetil-KoA ile yoğunlaştığında 5 karbonlu hidroksivalerat (HV) elde edilmektedir. Hidroksivalerat-KoA, PHA (PHBV ya da P(3HB-ko-3HV)) sentezinde veya enerji ihtiyacı ve hücre çoğalması için asetil-KoA ve propionil-KoA üretmek için kısmen parçalanır [61]. Yolak III, asetil-KoA'yı malonil-KoA-ACP transasilaz (FabD) enzimi ile malonil-KoA'ya ve daha sonra 3-hidroksiasil-ACP-KoA transferaz (PhaG) varlığında 3-hidroksiasil-KoA ve PHA oluşturabilen 3-hidroksiasil-ACP'ye dönüştürmektedir [62]. Yolak IV, bütirik asidi kullanarak β -oksidasyon yoluna uğramadan NADH-bağımlı asetoasetil-KoA redüktaz enzimi kullanarak 3-hidroksibütiril-KoA'yı oksitlemektedir [63]. Yolak 5-Yolak 14, geleneksel olmayan PHA sentezinde görevli tasarlanmış metabolik yollardır. Sentezlenen PHA, sadece monomer tedarik yollarının yanında PHA sentaz enzimlerinin özgülüğüne de bağlıdır [55].

PHA biyosentez kinetiği oldukça hızlı gerçekleşmekte olup, biyolojik sistemlerdeki yüksek çeşitlilik sayesinde birçok mikroorganizma tarafından çok çeşitli PHA polimer zincirleri sentezlenebilmektedir. Bu yüzden, sentezlenen son ürün, rastgele diziliimli kopolimerlerin ve/veya homopolimerlerin ve blok kopolimerlerin karmaşık bir karışımı şeklinde olabilmektedir (Çizelge 2.3) [55, 64].

PHA granülleri, PHA sentaz (PhaC), fazinler (örn., PhaP ve PhaF), regülatör proteinler ve PHA depolimerazlar ile çevrili amorf bir hidrofobik PHA çekirdeğinden oluşmakta olup yaklaşık olarak %98 PHA, %2 protein ve tek katmanlı fosfolipid tabakası içermektedir (Çizelge 2.4) (Şekil 2.10) [65, 66]. PHA sentaz enzimleri (PhaC), granül oluşumu için anahtar enzimler olup hidroksi asil-KoA'nın asil grubunun yüksek molekül ağırlıklı PHA'ya polimerizasyonunu katalizleyen enzimdir. PhaC enzimleri alt ünite kompozisyonu ve substrat seçiciliğine bağlı olarak dört

sınıfa ayrılmaktadır (Çizelge 2.5). Sınıf I ve Sınıf II PHA sentaz enzimleri tek bir alt birimden oluşurken, Sınıf II PHA sentaz enzimleri, PHA depolimerazı kodlayan phaZ enzimi ile ayrılmış iki farklı phaC geninden (phaC1 ve phaC2) meydana gelmektedir. Sınıf III PHA sentaz enzimleri katalitik alt birim PhaC (40-53 kDa) ve PhaEC kompleks yapısını oluşturan ikinci alt birim PhaE'den (~20-40 kDa) oluşmaktadır. Sınıf IV PHA sentaz enzimleri phaC (~40 kDa) ve phaRC kompleksini oluşturan PhaR (~20 kDa) alt birimlerinden meydana gelmektedir. Sınıf I, III ve IV PHA sentaz enzimleri tercihien kısa zincir uzunluklu KoA tiyoesterleri kullanırken, Sınıf II PHA sentaz enzimleri orta zincir uzunluklu KoA tiyoesterlerin polimerizasyonunu katalize etmektedir [67].



Şekil 2.9. PHA biyosentezinde yer alan metabolik yollar [55]

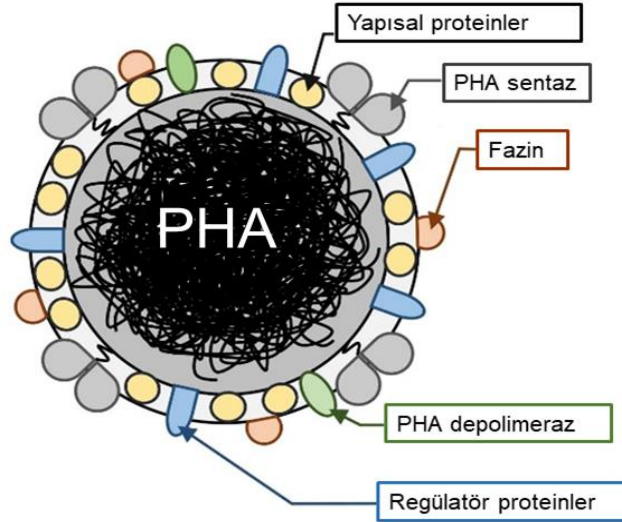
Çizelge 2.3. PHA homopolimerleri ve farklı yapıda PHA kopolimerleri [55]

Polimer Yapısı	PHA türü
Homopolimerler	PHB, P3HP, P4HB, PHV, P3HHx, P3HHp, P3HO, P3HD, P3HDD, P3HPhV, P3HPE, PHU
Rastgele dizimli kopolimerler	P(3HB-ko-3HV), P(3HB-ko-4HB), P(3HB-ko-3HHx), P(3HP-ko-4HB), P(3HB-ko-3HP), P(3HB-ko-mcl 3HA), P(3HHx-ko-3HO-3HD-3HDD), P(3HB-ko-LA)
Blok kopolimerler	P3HB-b-P3HBV, P3HB-b-4HB, P3HP-b-4HB, P3HB-b-3HHx, P3HB-b-3HP, P3HHx-b-P(3HD3HDD)
Graft kopolimerler	PS-g-PHA, PMMA-g-PHA, PHA-g-PAA, PHA-g-AA-CS, PHA-g-selüloz, PEG-g-PHA, PEGMA-g-PHO, PLA-g-PHA, PHBV-g-PA

Çizelge 2.4. PHA biyosentezinde görev alan enzimler [54, 68]

Enzim	İşlevi
PhaA	Asetil-KoA asetil transferaz (β -ketotiaz)
PhaB	Asetoasetil-KoA redüktaz
PhaC	PHA sentaz
PhaE	PHA sentaz (Sınıf III PHA sentaz alt birimi)
PhaR	PHA sentaz (Sınıf IV PHA sentaz alt birimi)
PhaZ	PHA depolimeraz
PhaY	PHA oligomer hidrolaz
PhaP	Fazin, PHA granüllerinin boyutunu ve sayısını kontrol etmek, phaC gen transkripsiyonunu düzenlemek ve PHA sentezini teşvik etmek
PhaF	Fazin, hücre bölünmesi sırasında hücre içi yerleşim ve PHA granüllerinin segragasyonunda rol almak ve phaC gen transkripsiyonunu düzenlemek

PhaI	Fazin, PhaF ile etkileşime girerek PHA biyosentezini etkilemek
PhaJ	(R)-Enoil-KoA hidrataz
PhaG	3-Hidroksiasil-ACP:KoA transasilaz
GA14	Fazin, PHA granüllerinin boyutunu ve sayısını kontrol etmek
ApdA	Fazin, PHA granüllerinin boyutunu ve sayısını kontrol etmek ve PHB depolimerazı aktive etmek
Mms16	Fazin, PHA granüllerinin boyutunu ve sayısını kontrol etmek
PhaM	Hücre bölünmesi sırasında hücre içi yerleşim ve PHA granüllerinin segragasyonunda rol almak ve PHA sentazı aktive etmek
PhaR	PHB biyosentezini düzenlemek, Fazin transkripsiyonel regülatörü
PhaQ	Fazin transkripsiyonel regülatörü
ACC	Asetil-KoA karboksilaz
FabD	Malonil-KoA:ACP transaksilaz
FabH	3-ketoasil taşıyıcı protein sentaz
FabG	NADPH-bağımlı 3-Ketoasil redüktaz
FadA	3-Ketoasil-KoA tiolaz

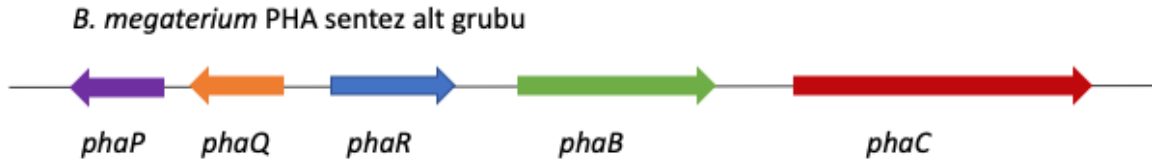


Şekil 2.10. PHA granül yapısının şematik gösterimi [69].

Çizelge 2.5. PHA polimeraz enzimleri

Sınıf	Alt ünite	Tür	Substrat seçiciliği
I	phaC	<i>Cupriviadus necator</i>	scl-PHA
		<i>Aeromonas caviae</i>	scl-mcl-PHA
II	phaC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	mcl-PHA
		<i>Pseudomonas sp</i>	scl-mcl-PHA
III	phaC/phaE	<i>Allochromatium vinosum</i>	scl-PHA
IV	phaC/phaR	<i>Bacillus megaterium</i>	scl-PHA

Bu tez çalışmasında, doğal bir PHA üreticisi olan *B. megaterium* suşu kullanılmaktadır. *B. megaterium* Sınıf IV kategorisinde yer alan PHA sentaz enzimlerine sahiptir. *B. megaterium*'da PHA üretimi, ters yönde sıralanmış phaRBC operonuna sahiptir. Burada PHA üretiminde phaR enzimi, phaC'nin bir aktivatörü olarak görev yapmaktadır (Şekil 2.11) [70].



Şekil 2.11. *B. megaterium* PHA sentez operonu

2.5. PHA üreten organizmalar

PHA, bitkiler, mayalar, algler ve hayvan hücreleri gibi genetik olarak tasarlanmış organizmalar ile 300'den fazla Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteri tarafından, hücre içi sitoplazmik inklüzyonlar şeklinde sentezlenmektedir [41]. Ancak, *Cupriviadus necator*, *Alcaligenus latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas*

oleovorans, *Paracoccus denitrificans* ve *Protomonas extorquens*, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus megaterium* gibi sadece birkaç tür, pilot ölçekli üretim için yeterli miktarda PHA üretebilmektedir [71, 72].

PHA üreten bakteriler, besin sınırlaması gerekliliğine göre iki grupta sınıflandırılmaktadır. *B. megaterium*, *C. necator*, *P. oleovorans* ve *P. extorquens* gibi bakteriler doğal olarak PHA sentezleyebilmektedir. *A. latus*, *A. vinelandii* ve rekombinant *E. coli* gibi bakteriler ise hücre çoğalması aşamasında PHA biriktirebildikleri için sınırlayıcı besin ortamına ihtiyaç duymamaktadır [73].

PHA üreten bakterilerin büyük bir kısmını oluşturan *Azohydromonas*, *Burkholderia* ve *Cupriavidus* gibi Gram-negatif bakteriler genellikle scl-PHA sentezlemektedir. Literatürde Gram-negatif bakterilerin glikoz, früktoz ve sükroz gibi çeşitli şekerlerden, n-alkanoik asitlerden ve bitkisel yağlardan, kuru hücre ağırlığı (CDW) cinsinden yaklaşık %50-88 oranında scl-PHA ürettikleri belirtilmiştir [74-77].

Pseudomonas cinsi Gram-negatif bakteriler ise mcl-PHA sentezlemektedir. *Pseudomonas* suşlarının farklı karbon kaynakları ile fermentasyonu sonucunda 150'den fazla mcl-PHA monomerinin üretildiği belirlenmiş olup *Pseudomonas* suşları, hem alkanlar, alkenler ve aldehitler gibi yapısal olarak bağımlı karbon kaynaklarından hem de glikoz ve sükroz gibi bağımsız karbon kaynaklarından mcl-PHA sentezleyebilmektedir [78]. *P. putida* mt-2 (NCIMB 10432) ve *P. putida* KT2440 (ATCC 47054) mikroorganizmaları oktanoik ve nonanoik asitlerden kuru hücre ağırlığı cinsinden %75-80 oranında mcl-PHA üretmektedir [79, 80]. *Pseudomonas* cinsi bakteriler, orta zincir uzunluklu PHA'ların yanı sıra, kopolimer yapıda scl-mcl-PHA üretmektedir [81, 82].

Gram-negatif bakterilerle ticari PHA üretimindeki ana endişe, PHA ekstraksiyonu sırasında ham PHA ile birlikte saflaştırılabilen bakterinin dış hücre zarındaki LPS endotoksinleridir. Bu endotoksinler, PHA biyopolimerlerinin biyomedikal uygulamalarına engel teşkil etmektedir. LPS endotoksinlerinin uzaklaştırılması için kullanılan yöntemler (ozon, hidrojen peroksit, benzil peroksit gibi oksitleyiciler ile

muamele) PHA üretim maliyetini arttırmakta ve PHA'nın polimer özelliklerinde değişikliklere neden olmaktadır [54].

Bacillus, Caryophanon, Clostridium, Corynebacterium, Micrococcus, Rhodococcus, Streptomyces gibi Gram-pozitif bakterilerin doğal PHA üreticisi olduğu bilinmektedir [83]. Gram-negatif bakterilerle kıyaslandığında, Gram-pozitif bakteriler daha düşük bir PHA içeriğine sahip scl-PHA üretmektedir [84].

Son yıllarda, PHA'lar *Haloferax, Haloarcula, Halobacterium, Natrococcus, Natromonas* ve *Natronorubrum* gibi alglerde de üretilmektedir. Yüksek tuz derişimlerinde (6 M NaCl'ye kadar) bile normal enzim aktivitesini gösterebilen bu halofilik alglerin, PHA üretimindeki en meşhur üyesi *Haloferax mediterranei*'dir. *H. mediterranei*, yaklaşık 2-5 M NaCl içeren çoğalma ortamlarında kuru hücre ağırlığı bakımından yaklaşık %80 PHA ürettiği belirlenmiştir. *H. mediterranei* çoğalma ve PHA fermentasyonu için hipersalin ortamlara ihtiyaç duymaktadır. Hipersalin ortamlarda kontamine edici mikroorganizmalar yaşayamadığından, PHA üretiminde sterilizasyon ekipmanları ve ona bağlı sterilizasyon masrafları bulunmamaktadır [85].

Mikrobiyal metabolik mühendisliği ve moleküler klonlama teknolojileri kullanılarak elde edilen rekombinant mikroorganizmalar son yıllarda endüstriyel ölçekte PHA üretiminde de kullanılmaktadır. Rekombinant mikroorganizmalar iyi-tanımlanmış mikroorganizmalar olup optimizasyon için daha da geliştirilebilmektedir. Ayrıca, rekombinant mikroorganizmaların fermentasyonu, biyoreaktörlerde daha hızlı hücre çoğalması ve daha hızlı biyoreaktör geri dönüş süresine olanak tanımaktadır [86]. PHA üretimi için rekombinant mikroorganizma oluşturulmasında çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bunlar, PHA üreticisi mikroorganizmalara ucuz substratları metabolize etmesini sağlayacak genlerin aktarılması, doğal PHA üreticisi mikroorganizmalarda bulunan depolimeraz mekanizmasının uzaklaştırılması, PHA sentaz genlerinin PHA üretemeyen ve ucuz substratları kullanabilen mikroorganizmalara aktarılması ve PHA sentaz genlerinin yine aynı doğal üretici suşa aktarılarak genlerin overekspresyonunun sağlanması gibi tekniklerdir [87-89].

E. coli genetik mühendisliği çalışmalarında en sık kullanılan mikroorganizmadır ve son yıllarda PHA üretiminde de sıklıkla kullanılmaktadır. *E. coli* yüksek hücre yoğunluklu fermentasyonlara ulaşmak, istenilen PHA bileşimine sahip polimerleri üretmek ya da PHA'yı dış ortama salgılamak için doğal PHA üreten mikroorganizmaların metabolize edemediği çeşitli atıkları karbon kaynağı olarak kullanabilmektedir [90-96]. Ancak, *E. coli* gibi rekombinant bakteriler genetik kararsızlık gösterebilmekte ve aktarılan PHA genlerinin tutarsız gen ekspresyonu veya kaybı sıklıkla gözlenebilmektedir [46].

2.6. Doğal PHA üreticisi olarak *Bacillus*

Bacillus cinsine ait bakteriler Gram-pozitif bakteriler olup, çubuk şekilli, endospor oluşturabilen zorunlu veya fakültatif aerob ve çok hızlı çoğalan mikroorganizmalardır. Oldukça çeşitli substrat kaynaklarında hızlı bir şekilde çoğalabilme, yüksek sıcaklık ve yüksek ozmotik basınçlara dayanabilme gibi özelliklerinden dolayı, endüstriyel uygulamalar için oldukça önemli bir yere sahiptirler [97]. Polihidroksibütirat (PHB) ilk olarak 1926 yılında Fransız bilim adamı Maurice Lemoigne tarafından topraktan izole ettiği *B. megaterium* bakterisinde gözlemlenmiştir [98].

Bacillus cinsi bakteriler, homopolimer ve kopolimer yapıda PHA üretmek için başta şekerler, uçucu yağ asitleri, alkoller ve biyo-atık malzemeler olmak üzere çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilmektedirler. *Bacillus* türleri (*B. amyloliquefaciens*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* ve *Bacillus* sp.) arasında geniş bir aralıkta değişik PHA verimleri (%2-90) elde edilmektedir. Bu değişkenlik, temel olarak kullanılan suşun türü ve substrat kaynağından kaynaklanmaktadır (izelge 2.6) [99].

İlk olarak 1884 yılında De Bary tarafından keşfedilen *B. megaterium*, endüstriyel açıdan önemli fitohormonlar, 2-pentilfuran, piruvat, vitamin B12 ve

polihidroksialkanoatlar (PHA) gibi birçok biyomolekülü ve ayrıca ekonomik açıdan önemli kitosanaz, penisilin G asilaz, amilaz, glikoz dehidrojenaz, gibi proteinleri de üretebilmektedir [100-105]. 2011 yılında DNA dizilimi tamamlanan *B. megaterium*, rekombinant DNA teknolojisinde de önemli bir yere sahip olup, spesifik enzimlerin ve proteinlerin üretimlerinin geliştirilmesi çalışmalarında da kullanılmaktadır [106, 107].

B. megaterium patojen özellik göstermeyip, hücre dışı çeperlerinde LPS endotoksinleri bulundurmaması sayesinde gıda endüstrisinde ve biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir [84]. Ayrıca, rekombinant proteinleri kısa peptitlere veya serbest aminoasitlere parçalayan belirgin bir alkalın proteaza sahip olmadığından, son yıllarda rekombinant protein üretiminde *B. megaterium* özellikle tercih edilmektedir. Böylece, çok az veya hiç parçalanma ürünü olmadan, büyük miktarda, fonksiyonel protein elde edilebilmektedir [108]. *B. megaterium*'un ürettiği protein veya biyomolekülleri direkt olarak çoğalma ortamına salgılaması, rekombinant protein üretiminde tercih edilmesindeki diğer önemli bir faktördür [109]. Son yıllarda, *B. megaterium*, tek bir karbon kaynağı veya ucuz karbon kaynakları varlığında homopolimer ve kopolimer yapısında PHA üretebildiğinden, Gram-pozitif mikroorganizmalar arasında endüstriyel ölçekte PHA üretiminde ümit verici bir bakteri olarak ifade edilmektedir [110].

Çizelge 2.6. PHA üreten *Bacillus* türleri, kullanılan karbon kaynağına göre üretilen PHA miktarı ve çeşidi

<i>Bacillus</i> türü	Substrat	%PHA	PHA çeşidi	Ref.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	Glikoz	11,0	PHB	[111]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	Propionik asit	22,2	3HB-co-3HV	[111]
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7	Valerik asit	33,5	3HB-co-3HV	[111]
<i>Bacillus aryabhatai</i>	Sükroz, glikoz ve fruktoz	57,6	PHA	[112]
<i>Bacillus brevis</i> M6	NB ortamı	41,7	PHB	[113]

<i>Bacillus cereus</i> DC3	Glikoz ve pepton	35,6	PHB	[114]
<i>Bacillus cereus</i> CFR06	Glikoz ve pepton	46,0	PHB	[115]
<i>Bacillus cereus</i> EGU3	Glikoz	66,6	PHB	[116]
<i>Bacillus cereus</i> EGU44	Fruktoz	28,0	PHB	[117]
<i>Bacillus cereus</i> EGU44	Sükroz	47,0	PHB	[117]
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Glikoz	38,0	3HB-co-3HV	[118]
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Şeker kamışı melası	61,1	PHB	[119]
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Asetat	2,4	PHB	[120]
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Fruktoz	40,3	3HB-co-4HB	[121]
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Sükroz	38,4	3HB-co-3HV	[121]
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Nonanoat	47,4	3HB-co-3HV	[121]
<i>Bacillus cereus</i> SPV	Glukonat	41,9	3HB-co-3HV-co-4B	[121]
<i>Bacillus cereus</i> UW85	Dekanoat	80,1	PHB	[120]
<i>Bacillus cereus</i> UW85	Dodekanoat	61,8	PHB	[120]
<i>Bacillus cereus</i> VIT-SSR1	Melas	41,1	PHB	[122]
<i>Bacillus circulans</i> DSM 1529	Glikoz	34,8	PHB	[111]
<i>Bacillus endophyticus</i> TMR1.22	Glikoz	39,4	PHA	[123]
<i>Bacillus flexus</i>	Glikoz	45,0	PHA	[124]
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 394	Glikoz	21,4	PHB	[111]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Glikoz	53,0	PHB	[125]
<i>Bacillus macerans</i> DSM 7068	Glikoz	28,2	PHB	[111]
<i>Bacillus megaterium</i> BBST4	Glikoz	59,0	PHB	[126]
<i>Bacillus megaterium</i> BBST4	Gliserol	60,0	PHB	[126]
<i>Bacillus megaterium</i> BBST4	Nişasta	24,0	PHB	[127]
<i>Bacillus megaterium</i> CCM 2037	Peynir altı suyu	51,6	PHB	[128]
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 90	Glikoz	59,1	PHB	[129]

<i>Bacillus megaterium</i> DSM 90	Gliserol	62,4	PHB	[129]
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 90	Laktoz	42,1	PHB	[130]
<i>Bacillus megaterium</i> DSM 319	Glikoz	30,0	PHB	[131]
<i>Bacillus megaterium</i> uyuni S29	Glikoz	70,0	PHB	[132]
<i>Bacillus megaterium</i> strain H16	Glikoz	39,0	PHB	[133]
<i>Bacillus megaterium</i> OUAT016	Glikoz	62,0	PHB	[134]
<i>Bacillus megaterium</i> OU303A	Gliserol	62,4	PHB	[135]
<i>Bacillus megaterium</i> OU303A	Glikoz	58,6	PHB	[135]
<i>Bacillus megaterium</i> NRRL B-14308	Glikoz	72,0	PHB-co-PHV	[136]
<i>Bacillus megaterium</i>	Glikoz	54,6	PHB	[137]
<i>Bacillus megaterium</i> Ti3	Glikoz	-	3HB-co-3HHp	[138]
<i>Bacillus megaterium</i> NCIM 5472	Peynir altı suyu	75,5	PHB	[139]
<i>Bacillus megaterium</i> NCIM 5472	Peynir altı suyu ve propionik asit	86,6	3HB-co-3HV	[140]
<i>Bacillus mycoides</i> DFC1	Glikoz	76,3	PHB	[141]
<i>Bacillus</i> sp.	Glikoz	68,9	PHB	[142]
<i>Bacillus</i> sp.	Rafinoz	60,6	PHB	[143]
<i>Bacillus</i> sp	Glikoz	80,0	PHA	[144]
<i>Bacillus</i> sp. BBP-14	Glikoz	49,5	PHA	[145]
<i>Bacillus</i> sp. SW1-2	Glikoz	36,0	PHB	[146]
<i>Bacillus subtilis</i>	Glikoz	69,0	PHB	[147]
<i>Bacillus subtilis</i> MTCC 144	Tarım atığı	85,6	PHB	[148]
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Mısır koçanı	21,1	PHA	[149]
<i>Lysinibacillus</i> sp. 3HHX	Glikoz	-	PHA	[150]
<i>Paenibacillus</i> <i>dendritiformis</i> 30A2	Glikoz	19,0	PHA	[123]

2.7. PHA'nın ticari üretimi

Endüstriyel ölçekte PHA üretimi için kullanılacak mikroorganizmanın seçimi; mikroorganizmanın stabilitesi ve güvenliği, çoğalma ve birikim hızı, istenilen hücre yoğunluğu ve PHA miktarına ulaşabilmesi, polimerin kolayca saflaştırılabilmesi, polimerin molekül ağırlığı, substrat olarak çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme, karbon kaynağı ve diğer besinlerin maliyeti ile PHA üretimi sırasında yan ürünlerin oluşumu gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir [151].

Günümüzde 150'den fazla PHA polimeri tanımlanmasına rağmen sadece poli [(R)-3-hidroksibütirat] (PHB), poli [(R)-3-hidroksibütirat-ko-(R)-3-hidroksivalerat] (PHBV), poli [(R)-3-hidroksibütirat-ko-4-hidroksibütirat] (P3HB4HB) ve poli [(R)-3-hidroksibütirat-ko-(R)-3-hidroksihekzanoat] (PHBHHx), birçok firma tarafından pilot ve endüstriyel ölçekte üretilmektedir [152].

Sentetik termoplastiklerle benzer fiziksel ve termal özellikleri nedeniyle PHA'lar fosil yakıt türevli bu tür sentetik plastiklerin yerini alabilecek en uygun adaylardan birisi olmasına rağmen, büyük ölçekte üretimleri, 1,0 €/kg'dan daha düşük maliyetli geleneksel fosil yakıt türevli plastiklere kıyasla yüksek üretim maliyetleri nedeniyle sınırlı olmaktadır. PHA'nın üretim maliyeti polimer içeriğine bağlı olarak 2,2-5,0 €/kg arasında değişmektedir [153].

Dünya çapında PHA üretimi gerçekleştiren firmalar, ürünleri, üretim kapasiteleri, kullandıkları hammadde ve ticari marka isimleri Çizelge 2.7'de gösterilmiştir. PHA'ların endüstriyel ölçekte üretilmesinin ve fosil yakıt türevli plastiklerinin yerini alabilmesinin önündeki en büyük engel, yüksek üretim maliyetleri olmasına rağmen, biyobozunurluk, biyouyumluluk ve geniş aralıkta değişen fiziksel özellikleri, PHA üretiminin önünde parlak bir gelecek olduğunu göstermektedir. Ucuz ve yenilenebilir karbon kaynaklarının kullanılması, saf bakteri kültürlerinin fermentasyonu için gereken sterilizasyon maliyetlerini azaltmak için sterilizasyona ihtiyaç duymayan suşlar ve karıştırılmış mikroorganizma kültürlerinin kullanılması ve PHA saflaştırma

proseslerinin geliştirilmesi gibi birçok strateji, PHA üretim maliyetini azaltmak için uygulanmaktadır [154, 155].

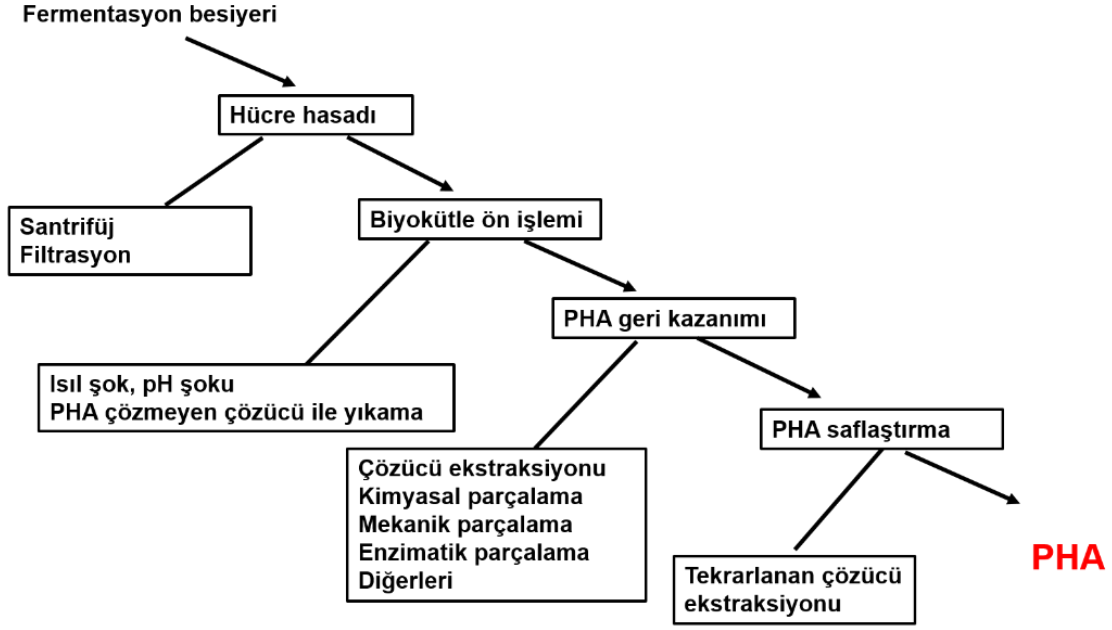
Çizelge 2.7. Ticari PHA üretiminde dünya çapında en önemli firmalar, ürünleri, üretim kapasiteleri ve kullandıkları hammaddeler

Firma	Ülke	Kapasite (ton/yıl)	Hammadde	Marka adı	PHA çeşidi
Newlight Technologies	ABD	23000	Biyogaz ve CO ₂	AirCarbon™	-
Danimer Sci.	ABD	13600	Kanola yağı	Nodax™	-
Bio-On	İtalya	10000	Şeker pancarı ve kamışı	Minerv®	PHB, PHBV
Tianjin Green Bio Materials	Çin	10000	Şekerler	SoGreen™	P(3HB-co-4HB)
Ecomann Biotechnology	Çin	3000	Şekerler	AmBio®	-
TianAn Biopolymers	Çin	2000	Mısır şekeri	ENMAT™	P3HB, PHBV
Kaneka	Japonya	1000	Bitkisel yağ	Aonilex®	PHH
PHB Industrial S.A.	Brezilya	500	Şeker pancarı	Biocycle®	P3HB, PHBV
Biomer	Almanya	500	Mısır nişastası	Biomer®	P3HB
Tepha Inc.	ABD	<10	Şekerler ve 4HB öncü madde	TephaFLEX®	P4HB, P(3HB-co-4HB)
Polyferm Canada	Kanada	<10	Bitkisel yağlar ve şekerler	VersaMer™	PHOHHx, PHNHHp
Terra Verdae Bioworks	Kanada	bilinmiyor	Metanol	-	-
Yield10 Bioscience*	ABD	bilinmiyor	Mısır şekeri	Mirel™	P3HB
Mango Materials	ABD	bilinmiyor	Metan	-	PHB
SIRIM	Malezya	bilinmiyor	Palm yağı	-	-
Novamont	İtalya	bilinmiyor	Doğal atık/Kompost	Mater-BI	PHA

2.8. PHA'nın hücre ortamından saflaştırılması

PHA üretim maliyetini arttıran en önemli etkenlerden bir tanesi de PHA'ların hücre ortamından saflaştırılmasıdır. Birçok saflaştırma yöntemi olmasına rağmen, hem ekonomik hem de çevresel açıdan güvenli bir saflaştırma işlemi henüz geliştirilememiştir [23]. Seçilen saflaştırma tekniği, ürün verimini ve ürün kalitesini etkileyen önemli bir parametredir.

PHA, birçok mikroorganizmada enerji ve karbon rezervi olarak hücre içi lipid granülleri şeklinde sentezlendiği için, bu biyopolimerlerin saflaştırılması işlemleri genellikle hücre zarı/hücre duvarı parçalanması, PHA moleküllerinin çözünmesi, saflaştırılması ve PHA biyopolimerlerinin çöktürülmesi aşamalarından oluşmaktadır (Şekil 2.12) [54]. PHA'yı saflaştırabilmek için ilk olarak bakteri hücre çeperini parçalayarak PHA granüllerini çevreleyen protein tabakasını uzaklaştırmak gereklidir. Bunun için de ısıtma işlemi, dondurma ve alkali ile çözme gibi ön işlemler uygulanmaktadır. Bu ön işlemler, çoğunlukla belirli bir mikroorganizma için ayrı ayrı geliştirilen süreçler olduğundan, ilgili bakterinin karakteristik yapısına bağlı olup, PHA üreten bütün bakterilerde uygulanmamaktadır [156]. Isıtma işlemi genetik materyali ve proteinleri denatüre ederken dış hücre çeperini destabilize etmektedir. Isıtma işlemi için sıcaklık ve süre, uygulanacak bakteriye göre değişmektedir.



Şekil 2.12. PHA saflaştırma prosesinin şematik gösterimi

Genellikle sodyum hidroksit çözeltisinin kullanıldığı alkali ön işleminde, hücreler tuzlu bir çözeltiliye daldırılarak hücrelere ozmotik basınç uygulanmakta ve hücrelerin buruşmasına ve dehidrasyonuna neden olmaktadır [86]. Dondurma ve çözme de, hücreleri parçalamak için ön işlem olarak uygulanmaktadır. Bu ön işlemin en büyük dezavantajı yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duymasıdır. Bu nedenle büyük ölçekli üretimde ve endüstride yüksek maliyetinden dolayı tercih edilmemektedir [157].

Ayrıca, PHA üretim ortamı (karbon kaynağı ve mikronutrientler), hücre çoğalma fazı ile fermentasyon süresi de hücre çeperini parçalayacak en uygun ön işlem seçimini etkilemektedir [158].

Ön işlemlerle hücre çeperi parçalandıktan sonra PHA granüllerini saflaştırmak için çeşitli saflaştırma yöntemleri uygulanmaktadır. Günümüzde mikrobiyal biyokütleden PHA saflaştırılması için şimdiye kadar kullanılmış olan başlıca yöntemler çözücü ekstraksiyonu, sodyum hipoklorit ile parçalama, sürfaktanlar ile parçalama, enzimatik parçalama, boncuk bilyalı öğütücü ile parçalama, yüksek basınçla homojenizasyon, süperkritik akışkanlar, hücre kırılabilirliği, ultrasonikasyon ile

parçalama, çözülmüş oksijen ile flotasyon ve PHA dışındaki hücresel materyalin asitler ile çözündürülmesi yöntemleridir [159-168]. PHA saflaştırılması için kullanılan bu yöntemlerin başlıca avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8. PHA saflaştırmasında kullanılan yöntemlerin başlıca avantaj ve dezavantajları [156, 169].

Saflaştırma Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Çözücü ekstraksiyonu	-Gram-negatif bakterilerden elde edilen PHA’lardaki endotoksinler uzaklaştırılır. -Yüksek saflık ve yüksek moleküler ağırlık elde edilir. -Polimer degradasyonu oldukça azdır.	-Ekonomik açıdan yüksek maliyetlidir. -Çevre dostu değildir. -Laboratuvar ölçekli çalışmalar için uygundur. -Fazla miktarda toksik ve uçucu çözücü kullanımı gerektirir.
Sodyum hipoklorit ile parçalama	-Yüksek saflıkta ürün elde edilir. -Büyük ölçekte kullanım için uygundur. -Hücrelerin kurutulmuş olmasına gerek yoktur.	-Polimer degradasyonuna neden olarak polimer moleküler ağırlığında azalmaya neden olur.
Sümfaktanlar ile parçalama	-PHA doğrudan besi ortamından saflaştırıldığı için polimer degradasyonu oldukça azdır.	-Ekonomik açıdan yüksek maliyetlidir. -Düşük saflıkta ürün elde edilir. -Sümfaktanların ortamdan uzaklaştırılması için fazla su tüketimi gerekmektedir.
Enzimatik parçalama	-Yüksek saflıkta ürün elde edilir. -İlımlı çalışma koşulları bulunmaktadır.	-Kompleks bir proses olup ekonomik açıdan yüksek maliyetlidir.
Boncuk bilyalı öğütücü ile parçalama	-Kimyasal kullanılmamaktadır.	-Uzun bir işlem olup birçok parametrenin kontrol edilmesi gerekmektedir. -Etkili bir soğutma işlemi gerekmektedir.

Yüksek basınçla homojenizasyon	-Kimyasal kullanılmamaktadır. -Büyük ölçekli çalışmalar için uygundur.	-Proses ve mikroorganizmaya bağımlıdır.
Süper kritik akışkanlar	-Basit, ucuz ve çevre dostu bir yöntemdir.	-Proses parametrelerine oldukça sıkı bir şekilde bağlıdır.
Hücre kırılabilirliği	-Etkili ve basit bir yöntemdir. -Yüksek saflıkta ürün elde edilir. -Birçok bakteride uygulanabilir.	-Hücre duvarı bütünlüğünün dengelenmesi gerekmektedir.
Ultrasonikasyon ile parçalama	-Diğer saflaştırma yöntemleri ile birlikte uygulandığında yüksek saflıkta ürün elde edilir.	-Büyük ölçekte kullanım için uygun değildir.
Çözünmüş oksijen ile flotasyon	-Kimyasal kullanılmamaktadır.	-Birçok flotasyon basamağı gereklidir.
PHA dışındaki hücre materyallerin asitler ile çözündürülmesi	-Düşük maliyetli bir saflaştırma işlemi olup yüksek saflıkta ürün elde edilir.	-KontROLSÜZ koşullarda asitler PHA'yı parçalayabileceğinden, PHA moleküler ağırlığında azalmaya neden olur.

Çözücü ekstraksiyonu, PHA saflaştırılmasında uygulanan en yaygın yöntemdir. Çözücü ekstraksiyonu basit ve hızlı bir yöntem olduğu için laboratuvar ölçekli çalışmalarda yaygın bir şekilde uygulanmaktadır. Kloroform, 1,2-dikloroetan ve metilen klorür gibi bazı klorlu hidrokarbonlar ile propilen ve etilen karbonatlar gibi bazı siklik karbonatlar ve karbonik esterler, PHA saflaştırmasında başarıyla kullanılan organik çözücülerdir. Hücre membranının geçirgenliğinin değiştirilmesi ve PHA'nın organik çözücülerde çözünmesinden sonra, PHA'nın çözücülerden uzaklaştırılabilmesi için çözücü evaporasyonu veya PHA'yı çözmeyen metanol veya aseton gibi başka bir kimyasal ile polimerin çöktürülmesi gerekmektedir [170].

Diğer saflaştırma yöntemleri ile karşılaştırıldığında polimer degradasyonu çözücü ekstraksiyonunda yok denecek kadar az olup, çözücü ekstraksiyonu ile Gram-

negatif bakterilerde bulunan LPS yapısındaki endotoksinler tamamen uzaklaştırıldığından, saflaştırılan PHA'lar biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. Ayrıca, çözücü ekstraksiyonunun etkinliğini arttırabilmek için öğütme ve liyofilize hale getirme gibi ön işlemler gerekmektedir. Çözücü ekstraksiyonu, fazla miktarda organik çözücü kullanımı nedeniyle çevre dostu bir yöntem olmayıp, yüksek çözücü maliyetlerinden dolayı büyük ölçekli üretimde tercih edilmemektedir [158].

Sodyum hipoklorit ile kimyasal parçalama işleminde bakteri hücre duvarı parçalanarak, hücre içeriği ortama salınmaktadır. PHA, sodyum hipoklorit içerisinde çözünmediğinden ortamdaki filtreleme veya santrifüjleme işlemi ile kolaylıkla ayrılabilir. Ayrıca, sodyum hipoklorit ile parçalama işleminde hücrelerin liyofilize halde olması gerekmemektedir; böylece zaman ve enerji tasarrufu sağlanmaktadır. Ancak sodyum hipoklorit ile parçalama işleminde polimer degradasyonu oldukça fazla olup, düşük moleküler ağırlıklara sahip polimerler elde edilmektedir [171]. Bu sorunu çözebilmek için, sodyum hipoklorit ve kloroform çözeltilerinin birlikte kullanıldığı bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu yaklaşımda, sodyum hipoklorit, hücre çözünürlüğü için kullanılırken, kloroform çözeltisi ise hücrelerden salınmasından sonra PHA polimerlerinin degrade olmasını önlemektedir [172].

Çözücü ekstraksiyonu ve kimyasal parçalama ile karşılaştırıldığında biyolojik bir yöntem olan enzimatik parçalama daha ılımlı çalışma koşullarına sahip olup, sadece ihmal edilebilir düzeyde bir polimer degradasyonuna neden olmaktadır. Fermantasyon ortamının kısa bir süre sterilizasyonu ile enzimatik parçalama için gerekli ısı şok elde edilebilmektedir [173]. Enzimatik parçalamadan sonra PHA santrifüj ile ortamdaki ayrılabilir. Bu biyolojik yöntem ile %90'a varan polimer saflık derecesi elde edilebilmektedir. Ayrıca, enzimatik parçalama ile PHA saflaştırması, diğer saflaştırma yöntemlerine göre daha kolay bir işlem olup, hem insan hem de çevre sağlığı açısından daha güvenlidir [173].

Son olarak günümüzde bakteriyel hücrelerden PHA'yı saflaştırmak için farklı yöntemler geliştirilmesine rağmen, bu yöntemler hala çok pahalı olup, büyük ölçekte PHA üretimi için yetersizdir. Bu nedenle, toplam PHA üretim maliyetinin %50'sini ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri oluşturduğundan, büyük ölçekli üretimde de kullanılabilir ucuz ve güvenli saflaştırma yöntemlerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [86].

2.9. Polihidroksialkanoatların kullanım alanları

Petrol bazlı plastiklerle benzer özelliklere sahip olması ve geliştirilen yeni üretim teknikleri ile yeni ve istenen özelliklere sahip PHA biyopolimerlerinin elde edilebilmesi sayesinde PHA'ların uygulama ve kullanım alanları genişlemektedir. PHA'ların uygulama alanları biyobozunurluk, termoplastik özellikler, piezoelektrik özellikler ve PHB'nin monomerik D(-)-3-hidroksibütirik aside depolimerize olabilmesi ile doğrudan bağlantılıdır. Bu özellikleri sayesinde, biyoplastikler, fiberler, biyomedikal malzemeler ve ilaç taşıyıcılar olarak kullanılabilir. Enjeksiyonla kalıplanmış ve ekstrüde edilmiş PHA ürünleri, çatal bıçak takımı, ambalaj, tarım sanayi malzemeleri, kişisel bakım, ofis malzemeleri, oyuncaklar ve çeşitli ev eşyaları gibi çok çeşitli tüketici uygulamalarında kullanılabilir. PHA ayrıca yüksek gerilme mukavemetine sahip fiberler olarak da kullanılabilir ve otomotiv endüstrisinde, diş ipi ve sigara filtrelerinde ve dokumasız uygulamalarda kullanılmaktadır. PHA'nın insan dokusu ile biyouyumluluğu nedeniyle PHA, doku mühendisliği, yara iyileşmesi, kardiyovasküler, ortopedi ve ilaç taşınımı gibi tıbbi ve biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir [20, 174, 175]. PHA biyopolimerlerinin yaygın kullanım alanları ve potansiyel uygulamaları Çizelge 2.9'da verilmiştir.

Çizelge 2.9. PHA biyopolimerlerinin kullanım alanları ve potansiyel uygulamaları [174].

Uygulama Alanı	Örnekler
Ambalajlama	Alışveriş poşetleri, yemek kapları, filmler, günlük sarf malzemeler, vb.
Baskı ve fotoğrafçılık	PHA kolayca boyanabilen bir polyester olduğu için baskı ve fotoğrafçılıkta kullanılabilir.
Kimyasallar	Isıya duyarlı yapıştırıcılar, lateks ve akıllı jeller
Blok kopolimerizasyon	PHA diğer polimerlerle blok kopolimerizasyonla PHA diollere dönüştürülebilir.
Plastik işleme	PHA, plastik işlemede işleme yardımcıları olarak kullanılabilir.
Tekstil endüstrisi	PHA, naylonlar gibi fiber yapılara dönüştürülebilir.
Kimyasal sanayi	PHA monomerleri kiral R-formda olup, antibiyotiklerin ve diğer ince kimyasalların kiral başlangıç materyalleri olarak kullanılabilir.
Tıbbi implant biyomateryaller	PHA biyobozunurluk ve biyouyumluluk gibi özellikleri sayesinde tıbbi implant malzemelerinde ve kontrollü ilaç salımı sistemlerinde kullanılabilir.
Tıbbi	PHA monomerleri özellikle R-3HB, Alzheimer, Parkinson hastalıkları, osteoporoz ve hatta hafıza gelişimi üzerinde terapötik etkilere sahiptir.
Sağlıklı yiyecek	PHA oligomerleri keton yapıların elde edilebilmesi için gıda takviyeleri olarak kullanılabilir.
Endüstriyel mikrobiyoloji	PHA sentez operonu, endüstriyel mikrobiyal suşların performansını arttırmak için bir metabolik regülatör veya direnç artırıcı olarak kullanılabilir.
Biyoyakıt veya yakıt katkı maddeleri	PHA yanıcı özellikte hidroksialkanoat metil esterleri oluşturmak üzere hidrolize edilebilir.

Protein saflaştırma	Fazin PhaP rekombinant proteinleri saflaştırmada kullanılabilir.
Spesifik ilaç taşınımı	PhaP ve spesifik ligandların koekspresyonu ile hastalıklı dokulara spesifik ilaç hedeflemesi yapılabilir.

2.10. Biyoreaktörler ve çalışma modları

Biyoreaktörler, biyolojik ve biyokimyasal proseslerin tanımlı besi ortamı, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen derişimi ve basınç gibi kontrollü ortamlarda ve çalışma koşullarında gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Biyoreaktörler işletim koşullarına göre kesikli, yarı kesikli ve sürekli sistem olmak üzere sınıflandırılmaktadır.

Mikroorganizmalarda PHA biyosentezi çok aşamalı bir proses olduğu için, PHA üretimi hem besleme stratejisinin hem de biyoreaktör işletim koşullarının optimizasyonu ile birlikte geliştirilebilir [176].

Kesikli işletim modu PHA üretimi için en basit ve birincil strateji olmasına rağmen, yarı kesikli beslemeli işletim modu ile yüksek hacimsel verimliliğe sahip yüksek hücre yoğunluklu mikroorganizma kültürleri elde edilebilmektedir [177]. Kesikli işletim sisteminde, biyoreaktör ilk önce istenilen miktarlarda fermantasyon besi ortamı ile doldurulmakta ve fermantasyon süresince besleme yapılmamaktadır.

PHA üretimi için yarı kesikli işletim modunda fermantasyon süresince biyoreaktöre substrat beslemesi yapılmakta olup yarı kesikli işletim süresince PHA üretiminde karbon substrat derişimini kontrol etmek için uygun bir substrat besleme stratejisinin seçilmesi gerekmektedir. iteratürde yarı kesikli sistemde PHA üretimi için puls besleme [178, 179], tanımlanmış besleme hızıyla sürekli besleme [180, 181], üstel besleme [182-184], çözünmüş oksijen derişimi [185, 186] ve pH kontrolü [187, 188] ile beslemenin kontrolü gibi çeşitli besleme stratejileri uygulanmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, *Bacillus megaterium* NRRL B-14308 suşundan laboratuvar ölçekli biyoreaktörde yarı kesikli sistemde üstel glikoz besleme stratejisi ile PHA fermantasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.10.1. Yarı kesikli sistemde tasarım eşitlikleri

Yarı kesikli sistemler, genellikle kesikli işletim modunda başlayıp belirli bir hücre derişimi veya substrat tüketiminden sonra substrat çözeltisinin çeşitli besleme stratejileri ile biyoreaktöre eklendiği fermantasyon sistemleridir. Spesifik çoğalma hızı (μ), fermantasyon sistemlerinde mikrobiyal çoğalmayı karakterize eden önemli bir parametre olup, yarı kesikli sistemlerde üstel besleme stratejisinde maksimum spesifik çoğalma hızına (μ_{max}) yakın bir çoğalma hızında biyoreaktöre substrat beslemesi amaçlanmaktadır.

Yarı kesikli bir sistemde, hücre için kütle denklığı eşitlik 2.1 ile ifade edilebilir.

$$\frac{d(C_x V)}{dt} = r_x V \quad (2.1)$$

Burada, r_x hücre çoğalma hızını ($g L^{-1} sa^{-1}$), V biyoreaktör hacmini (L), C_x ise hücre derişimini ($g L^{-1}$) göstermektedir.

Hücre çoğalma hızı, hücre derişimi ve spesifik çoğalma hızı ile ilişkisi eşitlik 2.2 de verilmiştir.

$$r_x = \mu C_x \quad (2.2)$$

Eşitlik 2.1 ve 2.2 yi birleştirdiğimizde eşitlik 2.3 elde edilmektedir.

$$\frac{d(C_x V)}{dt} = r_x V = \mu C_x V \quad (2.3)$$

Yarı kesikli sistemlerde substrat beslemesine bağlı olarak sabit yoğunlukta hacim değışikliğı sadece Q_s , substrat besleme hacimsel akış hızına ($L sa^{-1}$) eşit olup eşitlik 2.4'de gösterilmiştir.

$$\frac{dV}{dt} = Q_S \quad (2.4)$$

Eşitlik 2.3 ve 2.4'ü birleştirip düzenlediğimizde, yarı kesikli sistemlerde spesifik çoğalma hızı eşitlik 2.5'de verilmiştir.

$$\mu = \frac{1}{C_x} \frac{dC_x}{dt} + \frac{1}{V} Q_S \quad (2.5)$$

Yarı kesikli bir sistemde zamanla biyoreaktöre substrat beslemesi gerçekleştirildiğinden substrat için kütle denklığı eşitlik 2.6 ile gösterilmiştir.

$$\frac{d(C_S V)}{dt} = Q_S C_{S0} + r_S V \quad (2.6)$$

Burada, r_S , substrat tüketim hızını, Q_S ise substrat besleme akış hızını ifade etmektedir.

Eşitlik 2.2 ile benzer şekilde substrat tüketim hızının, hücre derişimi ve spesifik substrat tüketim hızı (q_S) ile ilişkisi eşitlik 2.7'de gösterilmiştir.

$$-r_S = q_S C_x \quad (2.7)$$

Biyoreaktörde glikoz substrat birikimi olmadığından ve hacim değişikliği ihmal edilebilir düzeyde olduğundan substrat denklığı eşitlik 2.8'deki gibi düzenlenmektedir.

$$\frac{Q_S}{V} C_{S0} - q_S C_x = 0 \quad (2.8)$$

Spesifik substrat tüketim hızı eşitlik 2.9'da verilmiştir.

$$q_s = \left(\frac{Q_s C_{s0}}{V C_x} \right) \quad (2.9)$$

Substrat tüketim hızı, r_s , substrat başına hücre verimi ($Y_{x/s}$) cinsinden ifade edilirse,

$$-r_s = (r_x/Y_{x/s}) \quad (2.10)$$

ve biyoreaktörde zamanla substrat birikiminin olmadığı varsayıldığında ($dC_s/dt=0$) eşitlik 2.6 ile eşitlik 2.10 birleştirip düzenlendiğinde, eşitlik 2.11 elde edilmektedir.

$$Q_s C_{s0} - \frac{r_x V}{Y_{x/s}} = C_s \frac{dV}{dt} \quad (2.11)$$

Eşitlik 2.11 düzenlendiğinde; eşitlik 2.12 elde edilmektedir.

$$Q_s C_{s0} - \frac{\mu C_x V}{Y_{x/s}} = C_s Q_s \quad (2.12)$$

Üstel besleme stratejisi eşitlik 2.13 ile ifade edilmektedir.

$$C_x V = C_{x0} V_0 e^{\mu t} \quad (2.13)$$

Eşitlik 2.12 ve 2.13 birleştirildiğinde, Q_s substrat besleme akış hızı eşitlik 2.14'de gösterilmiştir.

$$Q_s = \frac{\mu C_{x0} V_0}{Y_{x/s}(C_{s0} - C_s)} e^{\mu t} \quad (2.14)$$

Substrat, biyoreaktör üretim ortamında birikmiyorsa ($C_s=0$) ya da $C_{s0} \gg C_s$ durumunda eşitlik 2.15 elde edilmektedir [189].

$$Q_s = \frac{\mu C_{x0} V_0}{Y_{X/S} C_{S0}} e^{\mu t} \quad (2.15)$$

Literatürde, yarı kesikli sistemler için üstel substrat besleme stratejisi sıklıkla uygulanan bir tekniktir [190-194].

2.11. PHA üretiminin matematiksel modellemesi

Matematiksel modelleme, doğa olaylarının ve deneysel sonuçların yorumlanması ve tahmininde fizik, kimya, biyoloji ve mühendislikte sıklıkla kullanılan çok güçlü bir araçtır [195]. Matematiksel modelleme ve süreç optimizasyonu, PHA üreten mikroorganizmaların verimliliğini ve özelliklerini geliştirmek için son yıllarda oldukça fazla yararlanılan sistemlerdir. PHA üretimini inceleyen temel matematiksel modeller kinetik, düşük yapılandırılmış, dinamik, metabolik (yüksek yapılandırılmış), sibernetik ve sinir ağları olarak sınıflandırılabilir [196].

2.11.1. PHA üretiminin metabolik modellemesi

Metabolik modeller, metabolik yolların yeniden yapılandırılmasıyla hücrenin fizyolojik durumunu tanımlamaya çalışmaktadır [197]. Metabolik modeller, metabolik yolun iki veya üç enzimatik reaksiyon içerdiği basit durumlardan, hücresel metabolizmanın ana katabolik ve anabolik yollarını temsil eden daha karmaşık metabolik ağlara kadar çeşitlilik göstermektedir. PHA üreten mikroorganizmaların hücresel metabolizmasını tanımlayan metabolik matematiksel modeller, mevcut suşların metabolizma ve substrat taşıma özelliklerinin aydınlatılmasında merkezi bir rol oynamasının yanında, metabolik mühendislik yöntemleriyle yeni türlerin geliştirilmesinde de kullanılmaktadır.

Metabolik modeller arasında, literatürde temel olarak, kinetik modeller (genellikle hem enzim hem de mikrobiyal kinetiğin yanı sıra metabolik reaksiyonların stokiyometrisine dayalı), stokiyometrik modeller (metabolik ağların zamanla

değişmeyen özelliklerine dayalı) ve sibernetik modeller (optimal doğaya dayalı) yer almaktadır [198].

Kinetik modelleme ile metabolit derişimleri, enzim seviyeleri ve enzim devir hızı, doygunluğu gibi parametrelerin fonksiyonu olarak reaksiyon akıları ölçülebilmektedir. Kinetik modellemede, Michaelis-Menten veya Hill denklemi gibi mekanistik eşitlikler ile reaksiyon hızları ölçülmektedir. Tüm kinetik ifadelerin birleştirilmesinden sonra, metabolit derişimlerinin ve reaksiyon akılarının zamana bağlı profilini elde etmek için her metabolite ait kütle korunumunu temsil eden doğrusal olmayan sıradan diferansiyel denklemler sistemi çözülmektedir [199]. Kinetik modeller genellikle metabolizmanın yalnızca sınırlı bir bölümünü kapsadığından, şu anda bu tip modeller yalnızca sınırlı sayıda ve iyi çalışılmış mikroorganizmalar için bulunmaktadır. Bunun temel nedeni, derişim ve akı için mevcut deneysel verilerin gerekli ölçekte bulunmamasıdır [200].

Stokiyometrik modelleme, kinetik modellemenin aksine, öncelikle stokiyometrik bilgileri kullanarak kararlı durumda her bir metabolit için kütle korunumunu tanımlayan doğrusal denklem sistemine dayanmaktadır. Akı denge analizi (FBA), metabolitlerin bir metabolik ağ üzerinden akışını analiz etmek için en yaygın olarak kullanılan stokiyometrik tabanlı matematiksel hesaplama yöntemidir.

2.11.2. Akı denge analizi (FBA)

Akı denge analizi (FBA), bir organizmadaki bilinen tüm metabolik reaksiyonları ve her bir enzimi kodlayan genleri içeren metabolik ağları incelemek için yaygın olarak kullanılan kısıtlama tabanlı bir matematiksel yaklaşımdır [201]. Kısıtlama tabanlı modelleme yaklaşımı ile termodinamiksel, sözde kararlı durum varsayımı gibi çeşitli fizikokimyasal kısıtlamalar altındaki metabolik akı dağılımları incelenmektedir [202]. FBA, metabolitlerin akışını metabolik ağ üzerinden hesaplayarak bir organizmanın çoğalma hızını veya biyoteknolojik açıdan önemli bir metabolitin üretim hızını tahmin edebilmektedir.

FBA'da ilk olarak her reaksiyonun stokiyometrik katsayılarının sayısal matris şeklinde tablolandırılmasıyla metabolik reaksiyonlar matematiksel olarak temsil edilmektedir. Bu stokiyometrilere, metabolik ağ üzerinden metabolitlerin akışına sınırlamalar getirebilmektedir. FBA'da kısıtlamalar, sistemin stokiyometrisinden kaynaklanan denge kısıtlamaları ve her bir reaksiyonun maksimum ve minimum izin verilebilir akılarını tanımlayan üst ve alt sınırla sınırlandırıldığı akı kısıtlamaları olarak iki şekilde ifade edilmektedir.

FBA, üstel çoğalma koşullarında doğrusal programlama tabanlı optimizasyon yoluyla genom ölçekli metabolik ağdaki tüm reaksiyonların metabolik akılarını hesaplayabilmektedir. Üstel çoğalma aşamasında, metabolitlerin birikimi olmadan dengeli bir çoğalma gerçekleşmektedir. Böylece, sözde kararlı durum varsayımı ile diferansiyel kütle denklemleri doğrusal denklemlere dönüşebilmektedir. Sistem yetersiz belirlendiğinde (örneğin, hesaplanacak akı sayısının kütle denklemlerinin sayısından daha büyük olduğu durumlarda) FBA, biyokütle oluşum hızını maksimize veya minimize etmek, ürün üretim hızını maksimize veya minimize etmek, ATP kullanımını maksimize veya minimize etmek veya yan ürün oluşum hızını minimize etmek gibi biyolojik bir amaç fonksiyonunun kısıtlamalarla belirlenen çözüm uzayındaki optimizasyonunu incelemektedir [203, 204].

Akı denge analizi;

min / max (Z)

s.t. $S \cdot v = 0$

$v^{ub} \geq v \geq v^{lb}$

S, modelin stokiyometrik matrisi olup akı oranları, v akı matrisindeki her bir akının alt ve üst sınırları ile sınırlı olduğunu ifade etmektedir [203].

2.11.3. *Bacillus megaterium* ve genomik ölçekli metabolik modelleme

Çok yönlü metabolik yetenekleri ve biyoteknolojik uygulamalara uygun fizikokimyasal özellikleri nedeniyle Gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus megaterium* üzerine yapılan araştırmalar son yıllarda ivme kazanmıştır. Çok çeşitli karbon kaynakları üzerinde çoğalma yeteneği sayesinde birçok *B. megaterium* suşu, penisilin amidaz, amilaz, amino asit dehidrojenaz gibi çeşitli enzimler, rekombinant proteinler, vitaminler, piruvat ve polihidroksialkanoat gibi biyopolimerlerin üretiminde alternatif bir mikroorganizma olarak kullanılmaktadır. Bu önemli endüstriyel mikroorganizmanın özelliklerini daha da keşfetmek için, metabolizmasının kapsamlı bir şekilde anlaşılması büyük önem taşımaktadır [205]. Günümüze kadar, üç *B. megaterium* suşunun, QM B1551, DSM 319 ve WSH002'nin, tüm genomları sekanslanmıştır [106, 206]. Sekanslanmış mevcut genomda, metabolik genler, konumları ve bunlara karşılık gelen hücresel fonksiyonlar belirtilmektedir. Ancak, *B. megaterium* mikroorganizmasında genetiği, enzimleri, metabolik aktiviteleri ve hücre çoğalması arasındaki ilişkileri aydınlayabilecek bütüncül bir yaklaşım bulunmamaktadır. Genomik ve deneysel olarak elde edilen biyokimyasal verilerin yardımıyla, genom ölçekli metabolik modeller, hücrelerin ve organizmaların fiziksel özelliklerini tahmin edebilen bir matematiksel hesaplama çerçevesi sağlamaktadır [207]. Genom ölçekli metabolik modeller, endüstriyel suşların potansiyelini belirlemek ve bilinmeyen metabolik yeteneklerini keşfetmek için kullanılmaktadır [208]. Kısıt tabanlı tahminler ile birlikte genom ölçekli metabolik modelleme, hücre çoğalmasını arttırmak için eklenmesi gereken anahtar metabolitleri belirleyerek besi ortamı kompozisyonunun iyileştirilmesi için kullanılmasının yanında çeşitli metabolit üretim akışlarını tahmin etmek ve metabolik mühendisliğinde gen silme stratejilerini tanımlamak için de kullanılmaktadır [209, 210].

Bacillus türleri için genom ölçekli metabolik model oluşturma çalışmaları, hücre metabolizmasının bütünsel ve kapsamlı bir şekilde tam olarak tanımlanması yönünde biyokimya, genetik, biyoinformatik ve genom bilimindeki ilerlemelerle birlikte gelişmektedir. *Bacillus* türleri için ilk genom ölçekli metabolik model *B. subtilis*

168 suşu için 2007 yılında Oh ve arkadaşları tarafından oluşturulmuştur [211]. İlerleyen yıllarda, başta *B. subtilis* olmak üzere, *B. licheniformis* WX02, *B. megaterium* WSH002 ve *B. megaterium* DSM319 suşları için genom ölçekli metabolik modeller geliştirilmiştir (Çizelge 2.10).

Çizelge 2.10. *Bacillus* türleri için genom ölçekli metabolik modeller

Model	iJA1121	iMZ1055	iBsu1147	iBsu1103	Oh ve ark, 2007	iWX1009
Suş türü	<i>B. meg.</i> DSM319	<i>B. meg.</i> WSH002	<i>B. subt.</i> 168	<i>B. subt.</i> 168	<i>B. subt.</i> 168	<i>B. lichen.</i> WX02
Reaksiyon	1709	1112	1742	1443	1020	1762
Metabolit	1349	993	1456	1145	988	1141
Gen	1121	1055	1147	1103	844	1009
Transport Reaksiyonlar	190	196	290	205	232	176
Kaynak	[212]	[205]	[213]	[214]	[211]	[215]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan bakteriler, çoğalma ortamı ve plazmidler

Klonlama çalışmalarında *E. coli* DH5 α suşu, biyopolimer üretim çalışmalarında ise *B. megaterium* NRRL-B 14308, *B. megaterium* MS941 ve bunların rekombinant suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.1). *B. megaterium* genomundan elde edilen *phaC* genini klonlamak için *B. megaterium*'da ticari pC-HIS1623hp plazmidi (EK-1) kullanılmıştır.

E. coli suşlarını çoğaltmak için Lysogeny Broth (LB: 10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L maya ekstraktı) besi ortamı kullanılmıştır. 20 g/L agar katı çoğalma ortamı oluşturmak için LB ortamına eklenmiştir. Hazırlanan ortamlar, otoklav sterilizasyonu sonrası oda koşullarında saklanmıştır. Plazmidin stabilitesi için *E. coli* çoğalma ortamlarına 100 μ g/mL ampisilin (Amp), *B. megaterium* çoğalma ortamlarına ise 10 μ g/mL tetrasiklin (Tet) eklenmiştir. Mikroorganizmaların uzun süre depolanması için %15 gliserol (v/v) içeren 1 mL LB ortamında, -86°C'de saklanmıştır.

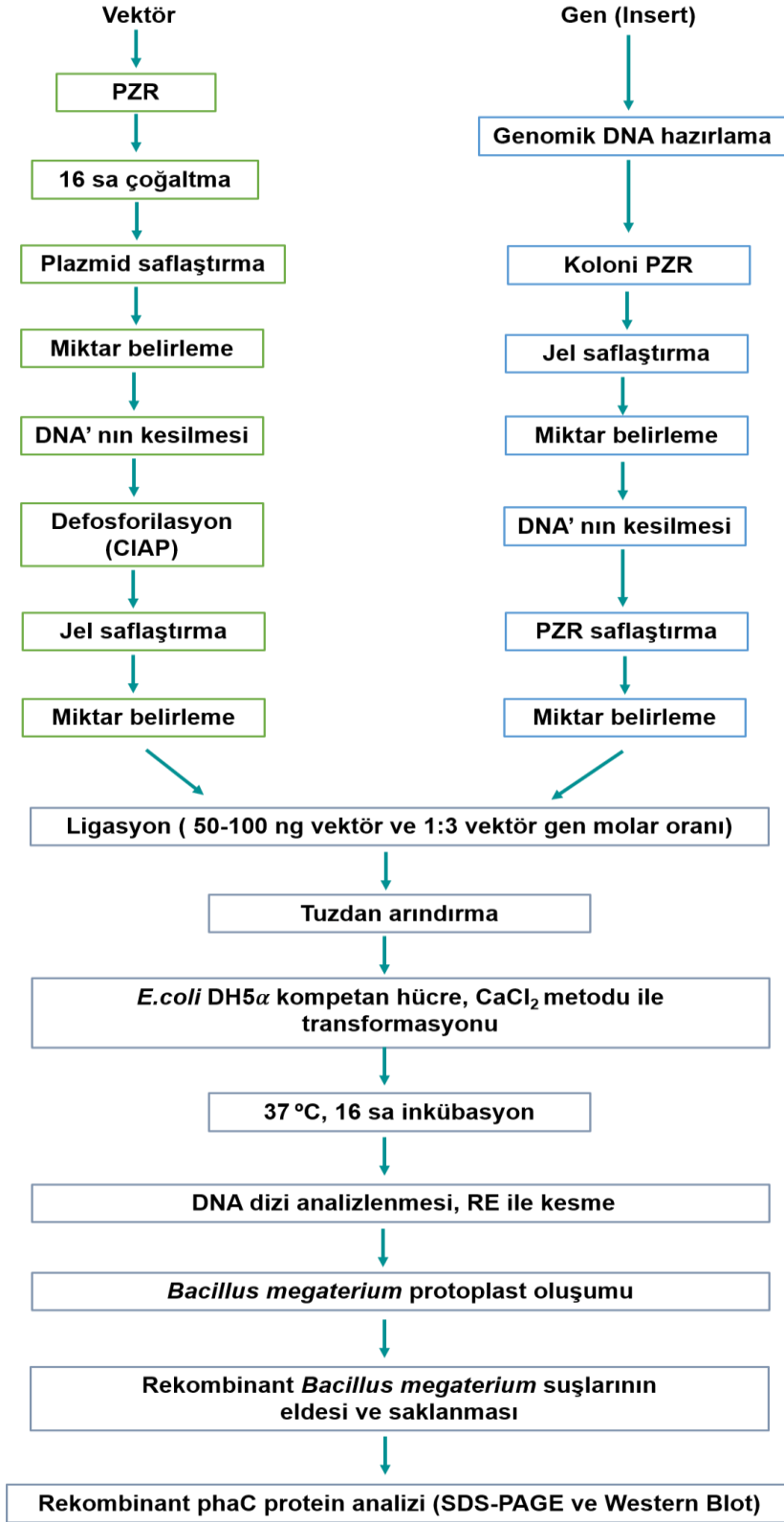
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan suşlar ve plazmidler

Suşlar	Genotip/Açıklama	Kaynak
<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308	Doğal fenotip (wild type) suş	Ulusal Kültür Koleksiyonu, ABD
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ (f80dlacZ Δ M15) Δ (lacIZYA ⁻ argF) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>supE44, thi-1, gyrA96, relA1</i>	Ticari firma, ABD
<i>B. megaterium</i> MS941	Doğal fenotip (wild type) suş	Dr. Dieter Jahn, Almanya
<i>B. megaterium</i> MS941- <i>pCHIS1623hp-phaC-6His</i>	<i>B. megaterium</i> MS941 mikroorganizmasında ekspresyon vektörü ile <i>phaC</i> gen aktarımı	Bu çalışma

<i>B. megaterium</i> MS941- <i>pCHIS1623hp-phaC- GGs-6His</i>	<i>B. megaterium</i> MS941 mikroorganizmasında GGS bağlayıcı eklenmiş ekspresyon vektörü ile <i>phaC</i> gen aktarımı	Bu çalışma
<i>B. megaterium</i> MS941- <i>pCHIS1623hp</i>	<i>B. megaterium</i> MS941 mikroorganizmasında ekspresyon vektörü	Bu çalışma
<i>B. megaterium</i> NRRL B- 14308- <i>pCHIS1623hp- phaC-6His</i>	<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 mikroorganizmasında ekspresyon vektörü ile <i>phaC</i> gen aktarımı	Bu çalışma
<i>B. megaterium</i> NRRL B- 14308- <i>pCHIS1623hp- phaC-GGS-6His</i>	<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 mikroorganizmasında GGS bağlayıcı eklenmiş ekspresyon vektörü ile <i>phaC</i> gen aktarımı	Bu çalışma
<i>B. megaterium</i> NRRL B- 14308- <i>pCHIS1623hp</i>	<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308 mikroorganizmasında ekspresyon vektörü	Bu çalışma
Plazmidler		
<i>pC-HIS1623hp</i>	Ekspresyon vektörü Amp ^R	Ticari firma, Almanya

3.2. Genetik mühendisliği metotları

Genetik mühendisliği metotları standard protokoller [216] doğrultusunda uygulanmış, klonlama ile ilgili yapılan çalışmalar Şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Klonlama prosedürünün şematik gösterimi

3.2.1. Agaroz jel elektroforezi

DNA moleküllerini tanımlamak ve ayırmak için jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Bunun için öncelikle, %1 lik agaroz jel 100 mL TBE tamponunda (89 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8.3) hazırlanmış, mikrodalga fırında agaroz karışımı homojen görünüm alana kadar ısıtılmıştır. Karışım yeterli sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra, son derişimi 0,5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklenmiş ve çözelti kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek jel tepsisine dökülmüştür. Yükleme kuyularının oluşması için uygun tarak yerleştirilmiş, jelin katılaşması beklenmiş ve jel tankı TBE tamponu ile doldurulmuştur. Katılaştıran jel, tarak çıkarıldıktan sonra, elektroforez haznesine yerleştirilmiştir. Yükleme tamponuyla karıştırılan DNA örnekleri ve DNA standardı jele yüklenmiştir. 100 V'da 45 dk koşuturulan DNA, transillüminatör cihazının üstünde incelenmiş ve jel görüntüleme kabininde fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.2. DNA'nın agaroz jelden ekstraksiyonu

Klonlama çalışmalarında kullanılacak gen DNA'sını içeren bantlar UV ışığı altında jelden kesilmiştir. Jel ekstraksiyon kiti ile DNA'nın agaroz jelden geri kazanımı üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu protokole göre, öncelikle istenen DNA molekülünü içeren jel parçasına QG tamponu (5.5 M guanidine thiocyanate, 20 mM Tris-HCl pH 6.6) eklenerek 65°C'de jelin çözünmesi sağlanmıştır. Eriyen jel üzerine PB tamponu (5 M Gu-HCl, 30% isopropanol) eklenerek, santrifüj kolonuna aktarılmış ve 13000 devir/dk hızında santrifüjlenmiştir. Daha sonra kolona PE tamponu (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% etanol) eklenerek yıkanmış, santrifüjlenmiş, elüent uzaklaştırılmış ve DNA, 35 µL elüsyon tamponu EB tamponu (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ile kolondan saflaştırılmıştır. Saflaştırılan DNA örnekleri daha sonraki adımlar için -20°C'de saklanmıştır.

3.2.3. Primer tasarımı

Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) ile gen derişiminin arttırılabilmesi için gerekli olan primerlerin tasarımında dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda verilmiştir:

1. İdeal bir primer, 16-60 baz nükleotit uzunluğunda olmalıdır.
2. Primerin toplam G ve C baz içeriği %40-60 arasında olmalıdır.
3. Primerin 3' ucu, bir ya da iki G veya C bazlarını içermelidir ve tasarlanan primerin özgül olabilmesi için 3' ucunda üçten fazla G veya C bulunmamalıdır.
4. "Saç tokası" (hairpin) oluşturmaması için, primer kendi içinde karşılıklı eşlenik baz dizileri içermemelidir (en fazla 8).
5. Primer çiftleri, dimer oluşumuna neden olmayacak şekilde 8'den fazla birbirleri ile eşlenik baz içermemelidir.
6. Primer çiftlerinin erime sıcaklık (T_m) değerleri birbirine denk veya aralarında en fazla 5°C'lik bir fark olmalıdır.

Bu tez çalışmasında kullanılan primerler ve dizileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Tercih edilmeyen primer dimerlerinin oluşması, primerin kendini tamamlayıcı sekansları içermesi olasılığı ve erime sıcaklığı gibi parametreler, ücretsiz web tabanlı bir yazılım ile kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler

Primer	Dizi (5'-> 3')
phaC-seq-F	gatagttgatggataaactgttcac
SpeI-RBS-phaC-F	atgact <u>actag</u> taaggaggtgaatatacaatggcaattccttacgtgcaag
SphI-Stop-Histag-GGS-phaC-R	atgatcgcatgcttagtgatggtgatggtgatgagaaccgccttagagcgttttctagc
phaC-seq-R	cacagttctccgcaagaattg

SphI-Stop-Histag- phaC-R	atgtcagcatgcttagtgatggtgatggtgatggttagagcgttttctagc
-----------------------------	---

3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

DNA dizisinin PZR ile çoğaltılması, termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. 50 µL hacmindeki reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlanmış olup, içeriği aşağıda verilmiştir:

10X PZR reaksiyon tamponu	: 5 µL
dNTP (10 mM stok)	: 1 µL
İleri primer (5µM stok)	: 1 µL
Geri primer (5µM stok)	: 1 µL
Şablon DNA	: 1 µL (~100 ng)
Vent DNA polimeraz (1U µL ⁻¹)	: 1 µL
Steril dH ₂ O	: 40µL

PZR işleminde gerekli döngü sayısı ve sıcaklık değerleri Çizelge 3.3'de verilmiştir. Daha sonra, 10 µL PZR karışımı %1'lik agaroz jelde analiz edilmiş, jelin görüntüsü alınmıştır.

3.2.5. PZR sonrası DNA'nın saflaştırılması

PZR sonrasında, PZR Saflaştırma Kiti ile üretici firmanın protokolüne göre primerlerin, nükleotidlerin, polimerazın ve tuzların uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir. 50 µL'lik EB tampon ile saflaştırılan DNA örneklerinin elüsyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR reaksiyon parametreleri

1 döngü	$T_1 = 98^\circ\text{C}$	3 dakika
35 döngü	$T_1 = 98^\circ\text{C}$	30 saniye
	$T_2 = 56^\circ\text{C}-59.5^\circ\text{C}$ (Her döngüde 0.1°C artarak)	30 saniye
	$T_3 = 72^\circ\text{C}$	70 saniye
1 döngü	$T_3 = 72^\circ\text{C}$	10 dakika
1 döngü	$T_4 = 8^\circ\text{C}$	∞

3.2.6. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi

Restriksiyon enzimleri (*SpeI* ve *SphI-HF*) ile kesme reaksiyonu için, mikrosantrifüj tüpünde hazırlanmış örnekler 37°C 'de 1 sa ısıtıcı blokta tepkimeye bırakılmış ve ardından agaroz jelde koşturulmuştur.

3.2.7. Kesim sonrasında DNA'nın saflaştırılması

Restriksiyon enzimleriyle kesimden sonra, Jel Ekstraksiyon Kiti ile üretici firmanın protokolüne göre primerlerin, enzimlerin, tuzların ve nükleotidlerin ayrıştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Protokolün sonunda saflaştırılmış DNA, $50\ \mu\text{L}$ EB tamponu ile santrifüj kolonundan ayrılmıştır.

3.2.8. Ekleme reaksiyonu (Ligasyon)

Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ligasyon karışımı

	L1	L2	L3 (Kontrol)
10x Ligasyon tamponu (NEB Inc, ABD)	2 µL	2 µL	2 µL
Gen (insert) DNA (1145-1196 bç)	6,6 µL	3,3 µL	-
İki kez kesilmiş vektör DNA (6547bç)	7,1 µL	7,1 µL	7,1 µL
T4 DNA ligaz	1 µL	1 µL	1 µL
Steril dH ₂ O	3,3 µL	6,6 µL	9,9 µL

$$gen\ miktarı(ng) = 100\ ng\ vektör \times \frac{genin\ büyüklüğü\ (bç)}{vektörün\ büyüklüğü\ (bç)} \times \frac{3}{1} \quad (3.1)$$

Gen miktarı yukarıda verilen eşitliğe göre belirlenmiştir (Eşitlik 3.1). Kontrol reaksiyonu ise gen (insert) DNA dışında yukarıda verilen diğer tüm maddeleri içerecek şekilde oluşturulmuştur. Ligasyon reaksiyonu 16 sa, 16°C'de gerçekleştirilmiş, daha sonra 65°C'de 20 dk tutularak reaksiyon durdurulmuştur. Ligasyon ürünü 0,45 µm'lik membran üzerinde damla-diyaliz yöntemiyle tuzdan arındırıldıktan sonra, 5 µL'si *E. coli* transformasyon reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.3. *E. coli*'nin CaCl₂ metodu ile transformasyonu

E. coli DH5α hücreleri, kimyasal-kompetan hücre olarak, plazmidin çoğaltılması için kullanılmıştır. Bunun için LB agar plakalara -86°C'de saklanan *E. coli* DH5α suşundan ekim yapılarak 37°C'de 16 sa inkübe edilmiştir. 6 mL LB ortamı içerisine plakalardan seçilen tekil bakteri kolonisi eklenerek çalkalayıcı karıştırıcıda 37°C, 150 devir/dk karıştırma hızında 16 sa inkübe edilmiştir. Bu örnekten 5 mL LB ortamı içerisine 1:100 aşılama oranına göre 50 µL alınarak optik yoğunluk (OD₆₀₀) değeri 0,3-0,4 olana kadar çalkalayıcı karıştırıcıda inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 3000xg, 4°C'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 0,1 M CaCl₂ ile resüspanse edilmiştir. Hücrelerin içine 100 ng plazmid

eklenmiş ve 30 dk buzda bekletilmiştir. Isıl şoklama ile, 42°C'de 90 sn, plazmid DNA'nın hücrelerin içine alımı sağlanmıştır. Buz üzerinde 5 dk bekletilen hücrelerin üzerine 400 µL SOC ortamı ilave edilmiş ve 37°C'de 45 dk, 200 devir/dk'da inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 100-150 µL transformasyon karışımı, seçici antibiyotik içeren katı ortama yayılmış ve 37°C'de 16 sa inkübe edilmiştir.

3.4. DNA dizi analizi

Sentezlenen plazmid dizisi, DNA dizi analizi için tasarlanmış primerler kullanılarak dizinlenmiştir (PRZ Biotech, Ankara). Elde edilen veriler, ücretsiz yazılımlar (ApE-plasmid-editor ve BLAST yazılımları, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak analizlenmiştir.

3.5. *B. megaterium* protoplast transformasyonu

Hücreler 5 mL LB ortamında 37°C, 200 devir/dk'da 1 gece çoğaltılmıştır. LB ortamında çoğaltılan mikroorganizmalardan 250 µL'si 25 mL Hyp besi ortamı içeren yeni ortama aktarılarak (1:100 aşılama oranı) OD₆₀₀=0,8-1 değerine ulaşana kadar inkübe edilmiştir. 2600xg, 4°C'de 15 dk santrifüjlenerek ayrılmış hücreler 2,5 mL Hyp besi ortamı (Çizelge 3.5) içerisinde resüspanse hale getirilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen hücre pelleti, Hyp besi ortamı ile hazırlanmış ve filtre sterilizasyonuna tabi tutulmuş lizozim çözeltisi (100 µL, 5 mg/mL) ile resüspanse edilerek, protoplast oluşumu için 37°C, 100 devir/dk karıştırma hızında 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra protoplast hücreleri 30 dk buz içinde bekletilmiştir. 1400xg, 4°C'de 10 dk santrifüjlenerek toplanan protoplast hücreleri 2,5 mL Hyp besi ortamı ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi, fazla lizozimin uzaklaştırılabilmesi için üç defa tekrar edilmiştir. Yıkama işleminden sonra 500 µL protoplast süspansiyonu yeni bir deney tüpüne aktarılmış ve içerisine 50 µL plazmid DNA (3-5 µg) eklenmiştir. %35 PEG-P (MA=8000) çözeltisi (1,5 mL) eklenmiş protoplast hücreler 37°C'de 2-4 dk inkübe

edilmiş, 4°C'de bekletilmiş 5 mL Hyp-besi ortamı ile seyreltilen hücreler 1400xg, 4°C'de 4 dk santrifüjlenmiştir. Hücre pelleti 1 mL Hyp-besi ortamı ile tekrar resüspanse hale getirilerek 37°C, 100 devir/dk karıştırma hızında 2 sa inkübe edilmiştir. 100 µL ve 900 µL olarak ayrılan hücre süspansiyonları 7 mL %0,9 agar içeren Hyp besi ortamı-Agar çözeltisi ile karıştırılarak tetrasiklinli %1,7 agar içeren Hyp besi ortamı petri kabına dökülmüş ve 37°C'de 24 sa inkübe edilmiştir. Seçilen koloniler tekrar tetrasiklin antibiyotigi içeren LB agara ekilmiştir [217].

Çizelge 3.5. Hyp besi ortamı bileşenleri [217]

Hyp besi ortamı (pH 7.5)	Derişim (g/L)
NH ₄ Cl	1,0
Tris bazı	12,0
KCl	0,035
NaCl	0,058
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,267
MgCl ₂ .6H ₂ O	4,67
Maya ekstraktı	0,6
KH ₂ PO ₄	0,136
Sükroz	68,46
Glikoz	2,0
MnSO ₄	0,0002

3.6. Rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde PHA üretimi

DNA dizini doğrulanmış rekombinant plazmidler, saflaştırılarak *B. megaterium*'a protoplast transformasyonu yöntemiyle aktarılmış, elde edilen çeşitli rekombinant *B. megaterium* suşları uzun süre depolanabilmesi için -86°C'de saklanmıştır.

PHA üretimini arttıracak en uygun klonlar (Çizelge 3.1), LB ve uygun antibiyotik içeren ortama inoküle edilerek, 30°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalamalı karıştırıcıda bir gece bekletilerek çoğaltılmıştır. 1:100 aşılama oranına göre çoğaltılan bakteri kültüründen alınan 200 µL hücre, 20 mL LB ve uygun antibiyotikli ortama eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak seçilen doğal fenotip *B. megaterium* NRRL

B-14308 ve MS941 mikroorganizmalarında antibiyotik kullanılmamıştır. $OD_{600}=0,8$ 'e ulaşan bakteri kültüründen, 1:100 aşılama oranı ile 250 mL'lik erlenlerde bulunan 40 mL hacmindeki minimal besi ortamına aşılınmış, 30°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalayıcıda 66 sa süreyle hücreler inkübe edilmiştir. Rekombinant *phaC* gen ekspresyonunu gerçekleştirmek için $OD_{600}=0,3-0,4$ 'e geldiğinde çoğalma ortamına %0,5 ksiloz çözeltisi eklenerek indüksiyon gerçekleştirilmiştir. Hücre derişimini incelemek için ksiloz indüksiyonundan sonra belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak optik yoğunluk (OD_{600}) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.7. Rekombinant protein analizi

3.7.1. Bradford yöntemi

Rekombinant *B. megaterium* suşlarından PHA üretimi çalışmalarında ksiloz indüksiyonundan sonra belirli saatlerde alınan örneklerdeki toplam protein ve rekombinant protein miktarlarını belirlemek amacıyla kolorimetrik bir metot olan Bradford Yöntemi kullanılmıştır [218]. Bu yöntemde, protein konsantrasyonları standart olarak saf sığır serum albümin proteini (BSA) ve Bradford reaktifi kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre iki tekrar şeklinde 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuyucu ile belirlenmiştir. Çalışmada temel alınan BSA protein standart eğrisi EK-2'de verilmiştir.

3.7.2. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve western blotlama

Protein konsantrasyonu belirlenmiş PhaC protein örneklerini moleküler büyüklüklerine göre ayırmak amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılmıştır. Ayrım yapılacak proteinin moleküler büyüklüğüne göre hazırlanması gereken jel yüzdesi ve formülasyonu değişkenlik göstermektedir. *B. megaterium* PhaC proteini 42,5 kDa büyüklüğünde olması sebebiyle %12'lik SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. SDS-PAGE analizinde protein merdiveni varlığında jel üzerinde koşturulan her bir proteinin ve alt ünitelerinin jelde

tek bant oluşturacak şekilde moleküler büyüklüklerine göre ayrımı gerçekleştirilmektedir. Ayrılan proteinler, Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanmış ve GelDoc EZ görüntüleme sisteminde görselleştirilmiştir. Örneklerin SDS-PAGE jelinde yürütülmesinden sonra, rekombinant proteinin yürütülen örneklerdeki varlığını belirleyebilmek için western blotlama analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, yürütülen jeldeki PhaC proteinleri PVDF membranlarına 50 V'da 3 sa süreyle transfer edilmiş, oda sıcaklığında bloke edici reaktif ile bloklanmış ve %1 BSA-PBST çözeltisi içerisindeki anti-His (1:1000) ve ardından anti-rabbit-HRP (1:2500) antikorları ile inkübe edilmiştir. Son olarak elde edilen immünoreaktif bantlar, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde Opti-4CN kolorimetrik kit kullanılarak görüntüleme sisteminde görselleştirilmiştir [182].

3.8. PHA üretiminde kullanılan mikroorganizma, besi ortamı ve çoğalma koşulları

-86°C'de stokları saklanan *B. megaterium* suşu, LB ortamına inoküle edilerek, 37°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalamalı karıştırıcıda 16 sa çoğaltılmıştır. 1:100 aşılama oranına göre çoğaltılan bakteri kültüründen alınan 400 µL hücre, 40 mL LB ortamına eklenmiştir. Büyük ölçekli üretimde kullanılacak hücrelerin çoğalma evresinin logaritmik fazda olması için belirli saatlerde optik yoğunluk (OD₆₀₀) ölçümleri alınmıştır. OD₆₀₀=0,8'e ulaşan bakteri kültüründen, 1:100 aşılama oranı ile 250 mL'lik erlenlerde bulunan 50 mL hacmindeki minimal besi ortamına aşılanmıştır; 37°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalayıcıda 48-66 sa süreyle hücreler inkübe edilmiştir. Minimal besi ortamı (pH 7.0); 10 g/L glikoz, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L MgSO₄.7H₂O, 3,6 g/L KH₂PO₄, 7,2 g/L Na₂HPO₄.2H₂O ve 1 mL/L iz element çözeltisinden oluşmaktadır. İz element çözeltisi; 5 g/L FeSO₄.7H₂O, 0,03 g/L MnSO₄.5H₂O, 0,1 g/L ZnSO₄.7H₂O, 0,025 g/L CuSO₄.5H₂O, 0,015 g/L CaCl₂, 0,12 g/L H₃BO₃, 0,03 g/L Na₂MoO₄.2H₂O, 0,2 g/L CoCl₂.6H₂O ve 0,03 g/L NiSO₄.6H₂O içermektedir. Hücre derişimi, belirli saatlerde alınan örneklerin 1xPBS çözeltisi ile seyreltilmesiyle 600 nm dalga boyundaki UV-görünür spektrofotometrede optik yoğunluğunun (OD₆₀₀) ölçülmesiyle hesaplanmıştır.

3.8.1. PHA üretiminde kullanılan minimal besi ortamı optimizasyonu

Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşları ile orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde üretim ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.6' da verilen değişik minimal besi ortamlarında ve verilen çoğalma koşullarında PHA üretimi gerçekleştirilmiş ve hücre derişimini incelemek için belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak, optik yoğunluk (OD_{600nm}) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Farklı minimal besi ortamı bileşenleri

Bileşen	Derişim (g/L)								
	MM-PK [136]	MM-1	MM-2	MM-3	MM-4	MM-5	MM-6	MM-7	MM-8
Glikoz	10	10	10	10	10	10	10	10	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
KH ₂ PO ₄	3,6	3,6	3	3,6	3	3,6	3	3	3,6
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	7,2	7,2	6	7,2	6	7,2	6	6	7,2
Bileşen	İzelement Çözeltisindeki Derişim (g/L)								
FeSO ₄ .7H ₂ O	5	5	5	10	5	10	10	10	5
MnSO ₄ .5H ₂ O	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CaCl ₂	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
H ₃ BO ₃	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NiSO ₄ .6H ₂ O	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
İzelement çözeltisinden eklenen miktar (mL/L)	1	1	1	1	1	1	1	1	2

3.8.2. C/N molar derişim oranının PHA üretimine etkisi

B. megaterium NRRL B-14308 suşu ile orbital çalkalamalı biyoreaktörde PHA üretiminde, tanımlanmış minimal besi ortamında farklı C/N molar derişim oranlarının etkisi glikoz derişimini sabit tutularak, farklı amonyum sülfat derişimlerinde (10, 20, 40, 60, 80 ve ∞ (N-içermeyen)) incelenmiştir. “N-içermeyen” durum için besi ortamına amonyum sülfat eklenmemiştir. *B. megaterium* NRRL B-14308 mikroorganizması yukarıda ifade edilen PHA üretiminde kullanılan hücre çoğalma koşulları ve aynı aşılama oranında 250 mL’lik erlenlerde bulunan 50 mL hacmindeki farklı C/N molar derişim oranlarındaki minimal besi ortamına aşılınmış; 37°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalayıcıda 66 sa süreyle inkübe edilmiştir. Hücre derişimini incelemek için belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak optik yoğunluk (OD_{600nm}) ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.8.3. Biyoreaktörde çözünmüş oksijen derişiminin (% DO) PHA üretimine etkisi ve oksijen transfer parametrelerinin belirlenmesi

B. megaterium NRRL B-14308 suşu ile PHA üretiminde farklı çözünmüş oksijen derişiminin (% DO) etkisini incelemek için fermantasyon çalışmaları, 300 mL çalışma hacmindeki 500 mL otoklavlanabilir tezgah üstü laboratuvar ölçekli biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. PHA üretim ortamı ile birlikte pH ve DO problemleri 121°C’de 20 dk sterilizasyona tabii tutulmuştur. Sterilizasyon işleminden sonra sıcaklık, pH ve DO problemleri biyoreaktör kontrol ünitesine bağlanmıştır. $OD_{600}=0,8-1$ ’e ulaşan bakteri kültüründen, %5 (hacim/hacim) aşılama oranı ile biyoreaktördeki minimal besi ortamına aşılınmış; 37°C, pH 7.0 ve 300 devir/dk karıştırma hızındaki biyoreaktörde farklı %DO (%10, %20 ve %30) değerlerinde 66 saat inkübe edilmiştir.

Farklı %DO değerlerinde oksijen transfer karakteristikleri dinamik yöntem ile belirlenmiştir. İlk olarak laboratuvar ölçekli biyoreaktörde mikroorganizmanın üretim ortamına aşılınmasından önce fiziksel kütle aktarım katsayısı (k_{La0}) dinamik yöntemle [219] belirlenmiştir. Mikroorganizmanın üretim ortamına aşılınmasından

sonra belirli zaman aralıklarında dinamik yöntemle oksijen transfer deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde ilk önce hava girişi tamamen kesilerek, yüzey havalandırmasının etkisini azaltmak için de karıştırma hızı 100 devir/dk'ya düşürülmüştür. Daha sonra tekrar hava girişi sağlanarak, istenilen %DO değerinde yatışkın duruma gelmesi sağlanmıştır.

3.9. Biyoreaktörde yarı kesikli besleme ile PHA üretimi

Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşları ile PHA üretiminde yarı kesikli fermantasyon çalışmaları yine tezgah üstü laboratuvar ölçekli biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. OD₆₀₀=0,8-1'e ulaşan bakteri kültüründen, %5 (hacim/hacim) aşılama oranı ile biyoreaktördeki minimal besi ortamına aşılanmış; 37°C, pH 7.0 ve 300 devir/dk karıştırma hızındaki biyoreaktörde t=42 sa'dan sonra 3 farklı çoğalma hızında ($\mu=0,05$; $\mu=0,075$ ve $\mu=0,1$ sa⁻¹) substrat beslemesi gerçekleştirilerek 66 saat inkübe edilmiştir.

3.10. PHA üretim miktarının Nile red floresan spektroskopisi ile tayini

B. megaterium NRRL B-14308 suşu ile PHA üretiminde inkübasyon süresince, minimal besi ortamından belirli zaman aralıklarında alınan hücrelerin PHA birikimleri; Nile red ile boyama işleminden sonra floresan spektroskopisinde analiz edilmiştir. Fermantasyon sonucunda santrifüj işlemi ile çöktürülen hücreler -86°C'de saklanmıştır. Daha sonra bu hücreler 1xPBS çözeltisi ile tekrar süspansiyon haline getirilerek santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır. 1 µg/mL derişiminde Nile red-PBS çözeltisi ile hücreler tekrar süspansiyon haline getirilmiş, çözeltinin hücrelere nüfuz edebilmesi için oda sıcaklığında, karanlık ortamda 120 dk inkübe edilmiştir. 12000xg'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmış, fazla boyanın uzaklaştırılması için hücreler 3 defa 1xPBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Distile su ile hacmi 3 mL'ye tamamlanan hücreler, 535 nm eksitasyon ve 605 nm emisyon dalga boyunda floresan spektrofotometrede analiz edilmiştir.

3.11. DNS yöntemi ile artık glikoz miktar tayini

Laboratuvar ölçekli biyoreaktörde ve orbital çalkalamalı biyoreaktörde fermantasyon süresince şeker (glikoz) tüketimi 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) kullanılarak modifiye DNS yöntemi [220] ile belirlenmiştir. DNS yöntemi, temel olarak 40 µL örnek ya da glikoz standardı içeren 96 kuyulu mikrotiter plakalarda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon; 40 µL örnek üzerine 80 µL DNS reaktifi eklenerek PZR cihazında 95°C'de 5 dk kaynatılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 100 µL'lik karışım üzerine 200 µL distile su eklenerek spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.12. PHA ekstraksiyonu

PHA granülleri ekstraksiyon işleminin etkinliği arttırmak için liyofilizasyon, etanol/ısı işlem, mikrodalga yardımı ile kurutma gibi dehidrasyon teknikleri [136] ve toz haline getirme gibi ön işlemlere tabii tutulmuştur. Dehidrasyon teknikleri ile kurutulan ve toz haline getirilen hücreler; kloroformun hücre içerisine daha iyi nüfuz edebilmesini sağlamak için %100 EtOH çözeltisi ile yıkanmıştır. Daha sonra hücreler 10000xg'de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Santrifüj işleminden sonra elde edilen pelletler üzerine 5 mL kloroform eklenerek 200 dev/dk, 30°C'de 24 sa süreyle çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Hücre-kloroform karışımı 0,22 µm şırınga ile filtre edilmiş ve üzerine 10 kat soğuk metanol eklenmiştir (metanol: kloroform= 9:1). Çöktürülen PHA polimerleri filtre edilerek çözülden uzaklaştırılmış ve biyoplastik içeren örnek 55°C etüvde kurutulmuştur.

3.13. PHA karakterizasyonu

3.13.1. Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılan PHA örneklerinin yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi analizi H.Ü. Kimya

Mühendisliği Bölümü Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda 4000-400 cm^{-1} spektral aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.13.2. Termogravimetrik analiz (TGA)

5-10 mg saflaştırılmış PHA örneklerinin TGA analizi, H.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda inert azot gazı akışı altında, 500°C sıcaklığa kadar 10°C/dk ısıtma hızı ile gerçekleştirilmiştir. TGA analizi sonucunda elde edilen termogramlar (termal bozunma eğrileri) ile PHA örneklerinin termal bozunma sıcaklıkları ve kütle kayıpları belirlenmiştir.

3.13.3. Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)

5-10 mg saflaştırılmış PHA örneklerinin DSC analizi, H.Ü. Kimya Mühendisliği Bölümü Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda inert azot gazı akışı altında -30°C'den 200°C sıcaklığa kadar 10°C/dk ile ısıtma, 200°C'den -30°C sıcaklığa kadar 10°C/dk ile soğutma ve daha sonra da 200°C sıcaklığa kadar 10°C/dk ısıtma ile gerçekleştirilmiştir. DSC analizi sonucunda elde edilen eğriler ile PHA örneklerinin erime sıcaklığı (T_m), kristallenme sıcaklığı (T_c) ve camsı geçiş sıcaklığı (T_g) değerleri belirlenmiştir.

3.13.4. $^1\text{H-NMR}$

Çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılan PHA örneklerinin yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla 20 mg saflaştırılmış PHA örneklerinin $^1\text{H-NMR}$ analizi, 25°C'de Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü NMR Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.13.5. Gaz kromatografisi analizi (GC-FID)

Liyofilize hücrelerin polyester yapısı ve polimer içeriğinin belirlenmesi amacıyla 10-15 mg liyofilize hücre örnekleri, 2 mL kloroform çözeltisi ve hacimce %3 H_2SO_4 içeren 2 mL asitleştirilmiş metanol, vida kapaklı deney tüpünde 100°C'de 4 sa metanoliz reaksiyonuna girmiştir. PHA polimerleri oda sıcaklığına soğutulduktan

sonra örneklere 1 mL distile su ilave edilerek reaksiyon karışımında faz ayrımı gözlenmiştir. 2 µL organik faz, Agilent Technologies 6890 N GC gaz kromatografisinde analiz edilmiştir. Gaz kromatografisi yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini arttırmak için iç standart olarak metil benzoat çözeltisi kullanılmıştır. Gaz kromatografisi analizi 25 m x 0.32 mm x 0.25 µm ölçülerindeki HP-5 kapiler kolonda ve alev iyonizasyon dedektörü (FID) ile donatılmış Agilent Technologies 6890 N GC gaz kromatografisinde gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dk akış hızında Helyum gazı kullanılmıştır. Gaz kromatografisi enjektör ve dedektör sıcaklıkları 300°C olup, fırın sıcaklığı ilk olarak 50°C den 5°C/dk ısıtma hızı 100°C ye daha sonra da 20°C/dk ısıtma hızı ile 300°C ye ısıtılmış ve 300°C'de 5 dk bekletilmiştir.

3.13.6. Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS)

Liyofilize hücrelerin veya çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılan PHA örneklerinin polyester yapısı ve polimer içeriğinin belirlenmesi amacıyla 10-15 mg liyofilize hücre veya saflaştırılmış PHA örnekleri, 2 mL kloroform çözeltisi ve hacimce %3 H₂SO₄ içeren 2 mL asitleştirilmiş metanol, vida kapaklı deney tüpünde 100°C'de 4 sa metanoliz reaksiyonuna girmiştir. PHA polimerleri oda sıcaklığına soğutulduktan sonra örneklere 1 mL distile su ilave edilerek reaksiyon karışımında faz ayrımı gözlenmiştir. 2 µL organik faz, Agilent Technologies 6890 N GC gaz kromatografisi, Agilent Technologies 5975B Inert XL EI-CI-MSD kütle spektroskopisinde analiz edilmiştir. Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini arttırmak için iç standart olarak metil benzoat çözeltisi kullanılmıştır.

3.14. *B. megaterium* genom ölçekli metabolik model rekonstrüksiyonu ve akı denge analizi (FBA)

Bu çalışmada, rekonstrüksiyon şablonu olarak *B. megaterium* DSM 319 suşu için oluşturulmuş *iJA1121* modeli [212] temel alınmıştır. *iJA1121* modeli, 1121 gen, 1709

reaksiyon ve 1349 metabolitten oluşmaktadır. *B. megaterium* NRRL B-14308 suşu için taslak metabolik ağ, temel alınan *iJA1121* modeli üzerine KEGG, MetaCyc, UniProt, BioCyc biyokimyasal veri tabanları kapsamlı ve detaylı bir şekilde taranmış ve *B. megaterium* genomunda bulunan ancak modelde yer almayan 7 gen, 7 reaksiyon ve 6 metabolit manuel bir şekilde eklenmiş ve düzenlenmiştir. Daha sonra, oluşturulan taslak metabolik ağ, COBRA Toolbox kullanılarak hesaplamalı forma dönüştürülmüştür [221]. Yarı kesikli besleme sisteminde kullanılan glikoz ve oksijen değerlerinde hücre çoğalması gibi fizyolojik özellikler, oluşturulan genom ölçekli metabolik model üzerinde akı denge analizi algoritması kullanılarak incelenmiştir [201].

Oluşturulan metabolik ağ, öncelikle MATLAB R2020b'de stokiyometrik matris formuna dönüştürülmüş, tüm model simülasyonları MATLAB R2020b'de gerçekleştirilmiş ve FBA, Gurobi Solver 9.0 ile birlikte COBRA Toolbox kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre çoğalması simülasyonu için, biyokütle denklemi, PHA üretimi için PHA sentez reaksiyonu amaç fonksiyon olarak belirlenmiştir.

FBA, hücre çoğalması sırasında metabolit birikiminin olmadığını varsayarak ($dC/dt = 0$), hücresel veya metabolitsel bir hedef belirleyerek çoğalma veya üretim hızını optimize etmeyi amaçlamaktadır. Amaç fonksiyonu olarak kullanılan biyokütle denklemi, hücre kuru ağırlığındaki bileşenlerin ağırlıklı oranını temsil edecek şekilde evrimsel varsayıma dayanılarak oluşturulmuştur. Çalışmada biyokütle denklemi olarak *iJA1121* metabolik modelinin biyokütle reaksiyonu kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

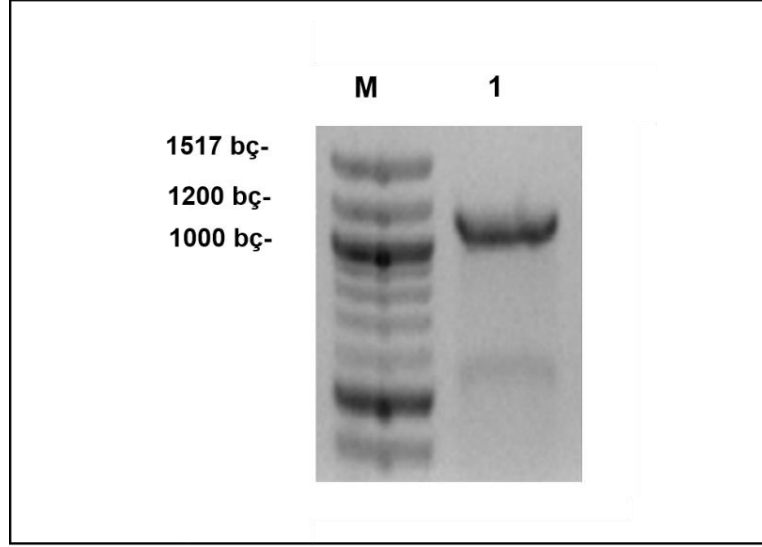
4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *phaC* geninin çoğaltılması

Bacillus megaterium NRRL-B 14308 suşundan *phaC* geninin çoğaltılması ve plazmidlere (*B. megaterium* pC-HIS1623hp) klonlanması için tasarlanan primerler Çizelge 3.2’de verilmiştir. Primer tasarım kurallarına dikkat edilerek tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları ve uzunlukları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Primerlerin erime sıcaklıkları ve uzunlukları

Primer Adı	T _m (°C)	Uzunluğu (bp)
phaC-seq-F	52,2	26
<i>SpeI</i> -RBS-phaC-F	64	51
<i>SphI</i> -Stop-Histag-GGS-phaC-R	68,7	61
phaC-seq-R	54,3	21
<i>SphI</i> -Stop-Histag-phaC-R	65,6	52

PhaC geni, yukarıda özellikleri belirtilen primerler ile, bileşenleri ve reaksiyon parametreleri Çizelge 3.3’de verilen PZR reaksiyonlarında çoğaltılmıştır. PZR ürünlerinin uzunlukları agaroz jelde yürütüldükten sonra UV-transilluminatörde kontrol edilmiştir (Şekil 4.1). Doğrulanmış bantlar jelden kesilip saflaştırılmıştır. DNA derişimi mikro hacimli spektrofotometre ile belirlenmiş, sonraki adımlara uygun derişimde elde edilen PZR ürünü 4°C’de saklanmıştır.



Şekil 4.1. *phaC* gen kaseti (insert DNA)'nin *SpeI* ve *SphI*-HF restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezdeki görüntüsü. M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı; 1: GGS bağlayıcı (linker) peptidi kodlayan sekansı içeren gen kaseti (1145 bç).

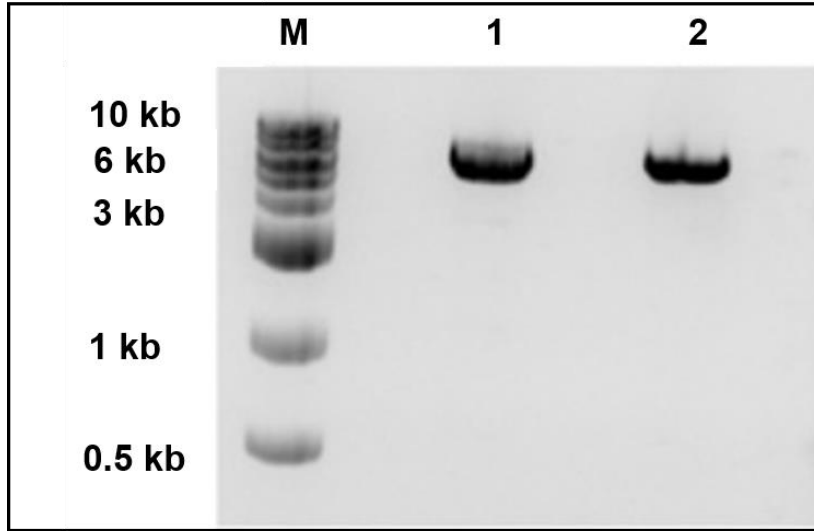
4.2. Vektör ve gen kasetlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi

PZR ile çoğaltılan gen kaseti ve vektörler, tasarıma uygun kesme enzimleri ile (*SpeI* ve *SphI*-HF) kesilmiştir. Vektörün kesme reaksiyonuna, ligasyon sırasında plazmid DNA'nın kendi kendine kapanmasını önlemek için 5' ucundaki fosfat grupları uzaklaştıran alkalın fosfataz enzimi (CIAP) eklenmiştir. Elde edilen DNA parçaları agaroz jelde yürütülerek, boyutlarının doğruluğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.2). Beklenen DNA büyüklükleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Şekil 4.2, pC-HIS1623hp vektörü ve *phaC* gen kasetlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsünü göstermektedir. Klonlamada kullanılacak olan (*SpeI* ve *SphI*-HF ile) kesilmiş pC-HIS1623hp vektöründen beklenen boyutta (6547 bç) bant elde edilmiştir. Klonlamada kullanılacak olan bantlar jelden kesilerek, jel ekstraksiyon kiti ile klonlamada kullanılacak bantlar saflaştırılmıştır. Nanodrop ile derişimleri belirlenmiş ve vektör ile gen, yeterli

derişimde elde edilmiştir. Ayrıca, vektör her iki enzimle teker teker de kesilerek kontrol edilmiştir.

SpeI ve *SphI* restriksiyon enzim konumlarından sırasıyla kesilerek, yapışkan uçlu hale getirilen gen kasetleri, aynı restriksiyon enzimleri ile kesilmiş pC-HIS1623hp plazmid vektörüne T4 DNA ligaz enzimi katalizörlüğünde klonlanmıştır. Ligasyon ürünü tuzdan arındırıldıktan sonra -20°C'de saklanmış ve 5 µL'si *E. coli*'nin CaCl₂ metodu ile transformasyonunda kullanılmıştır. Ligasyon ürünleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.2. pC-HIS1623hp vektörünün *SpeI* ve *SphI* restriksiyon enzimleri ile teker teker kesilmesinden sonra agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 1 kb DNA ladder. 1: *SpeI* ile kesilmiş pC-HIS1623hp vektör görüntüsü. 2: *SphI* ile kesilmiş pC-HIS1623hp vektör görüntüsü.

Çizelge 4.2. Kesme reaksiyonu

Reaksiyon No.	Vektör	İleri Kesme Enzimi	Geri Kesme Enzimi	Boyut
D1	<i>SpeI</i> -RBS-start-phaC-GGS-6xHistag-stop- <i>SphI</i>	<i>SpeI</i>	<i>SphI</i>	1145 bç
D2	<i>SpeI</i> -RBS-start-phaC-6xHistag-stop- <i>SphI</i>	<i>SpeI</i>	<i>SphI</i>	1196 bç
D3	pC-HIS1623hp	<i>SpeI</i>	<i>SphI</i>	6547 bç

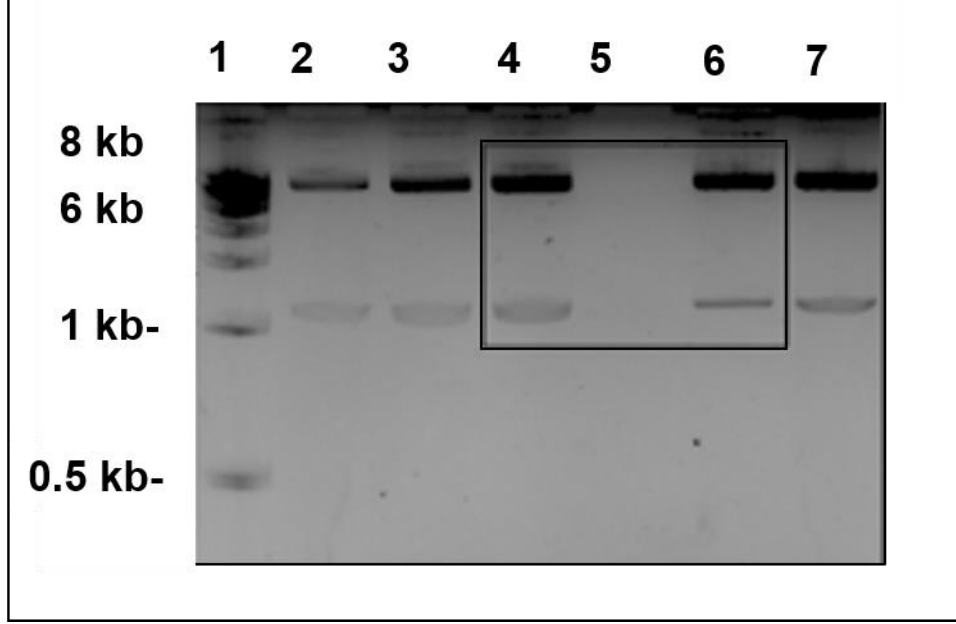
Çizelge 4.3. Ligasyon ürünleri

Ligasyon #	L1	L2	L3
Ligasyonda kullanılan kesme ürünleri	D1-D3	D2-D3	D3
Ürün	pC-HIS1623hp- <i>SpeI</i> -RBS-start-phaC-GGS-6xHistag-stop- <i>SphI</i>	pC-HIS1623hp- <i>SpeI</i> -RBS-start-phaC-6xHistag-stop- <i>SphI</i>	pC-HIS1623hp
Ürün boyutu	7692 bç	7743 bç	6547bç

4.3. Rekombinant plazmidlerin *E. coli*'ye aktarılması

Tuzlarından arındırılan ligasyon ürünleri, *E. coli* DH5 α suşuna CaCl₂ yöntemi ile aktarılmış, *E. coli* hücreleri, pC-HIS1623hp plazmidi için ampisilin antibiyotiği içeren katı LB agar ortamında çoğaltılmıştır. Ertesi gün beliren kolonilerden, antibiyotik içeren kültürlerin inoküle edilmesinden sonra rekombinant plazmidler saflaştırılmış, restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi klonlamanın başarılı olup olmadığını belirlemek amacıyla uygulanmıştır. Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş plazmidlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü alınmış olup beklenen büyüklüklerde DNA

molekölü gözlenmesi (Şekil 4.3) ve DNA dizi analiziyle (Ek 3-6) klonlamanın başarıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır. Ayrıca ligasyon sonucunda, yalnızca vektörü içeren kontrole kıyasla, rekombinant vektörü içeren örnekler 5-kat daha fazla koloni içermektedir.



Şekil 4.3. Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş rekombinant pC-HIS1623hp plazmidlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü. 1: 1 kb DNA moleküler ağırlık standardı. 4: Seçilen L1 plazmidi 6: Seçilen L2 plazmidi.

4.4. Rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde PHA üretimi

PHA-sentaz (PhaC) enzimini üretmek üzere tasarlanan ve sentezlenen DNA dizini doğrulanmış rekombinant plazmidler, saflaştırılarak *B. megaterium*'a protoplast transformasyonu yöntemiyle aktarılmış, elde edilen çeşitli rekombinant *B. megaterium* suşları uzun süre depolanabilmesi için -86°C 'de saklanmıştır. Kontrol

grubu olarak kullanılmak üzere, boş plazmidi taşıyan *B. megaterium* suşu da aynı şekilde elde edilmiş ve depolanmıştır.

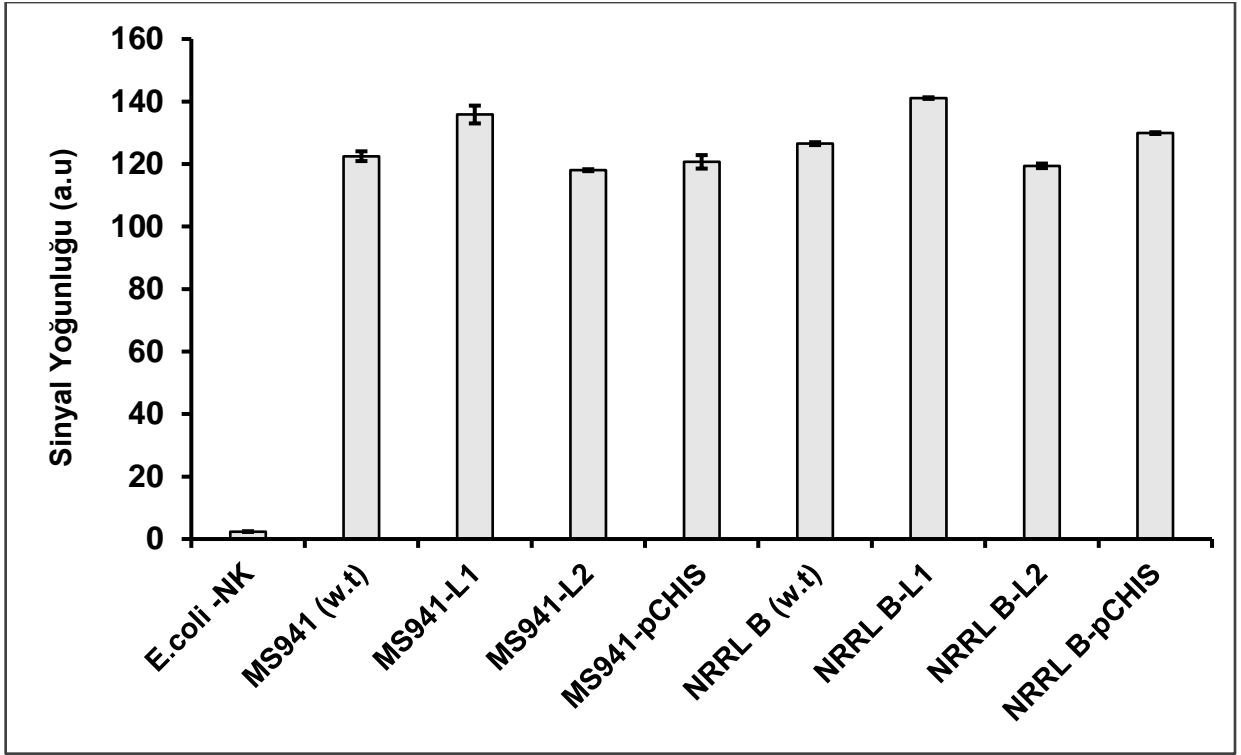
PHA üretimini arttıracak en uygun klonun seçimi için, suşların çoğalma hızları ve PHA üretim kapasiteleri kıyaslanmıştır. DNA dizisi doğrulanmış rekombinant klonlar (Çizelge 4.4) ile PHA üretimini arttıracak en uygun klonun seçimi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda, rekombinant mikroorganizmalar, orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde ve tanımlanmış besi ortamında çoğaltılmış ve PHA üretim kapasiteleri Nile red ile boyama sonrası floresan spektroskopisinde kıyaslanmıştır (Şekil 4.4). *B. megaterium* NRRL B-14308 (doğal fenotip), *B. megaterium* MS941 (doğal fenotip), *B. megaterium* NRRL B-L1 ve MS941-L1 suşları tanımlanmış minimal besi ortamında PHA üretim çalışmalarında kullanılacak en uygun klonlar olarak belirlenmiştir. L1 grubu suşların seçilmiş olması, tasarım aşamasında GGS amino asitlerinden oluşan ve 6xHis peptidini PhaC proteinine bağlayan serbest konformasyondaki peptidin, rekombinant proteinin yapısına eklenmesi ile PhaC enziminin aktivitesini olumsuz yönde etkilemediğini göstermektedir. Bu iki peptidin eklenmesi ile enzim aktivitesinde bir artış beklenmemektedir.

Çizelge 4.4. DNA dizini doğrulanmış rekombinant klonlar

DNA dizini doğrulanmış rekombinant klonlar

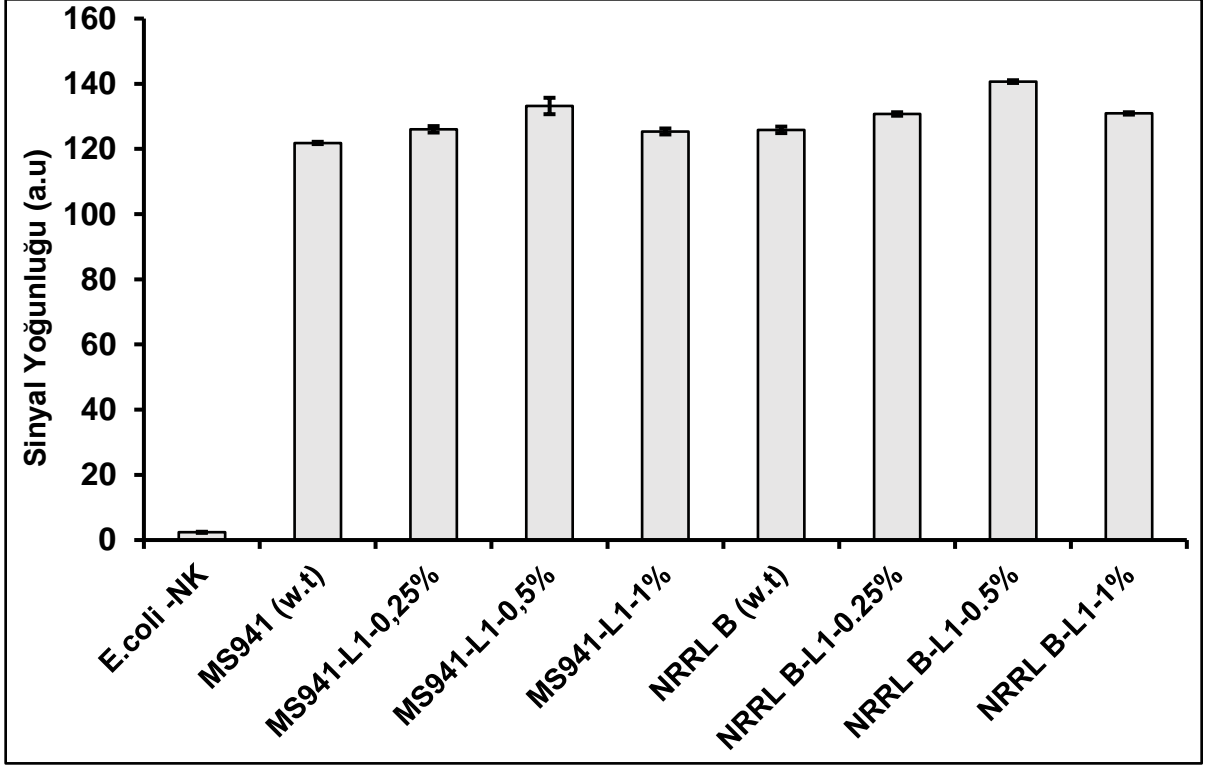
1. *B. megaterium* NRRL B-14308-pCHIS-phaC-GGS-6His (NRRL B-L1)
 2. *B. megaterium* NRRL B-14308-pCHIS-phaC-6His (NRRL B-L2)
 3. *B. megaterium* MS941-pCHIS-phaC-GGS-6His (MS941-L1)
 4. *B. megaterium* MS941-pCHIS-phaC-6His (MS941-L2)
 5. *B. megaterium* MS941-pCHIS
 6. *B. megaterium* NRRL B-pCHIS
 7. *B. megaterium* NRRL B-14308 (doğal fenotip)
 8. *B. megaterium* MS941 (doğal fenotip)
-



Şekil 4.4. DNA dizini doğrulanmış rekombinant *B. megaterium* suşlarının Nile red ile boyama sonrası floresan spektroskopisi deney verileri. Nile red boyası spesifik olarak hücre içi lipidleri boyamakta olup, floresan yoğunluğu üretilen PHA ile doğru orantılıdır.

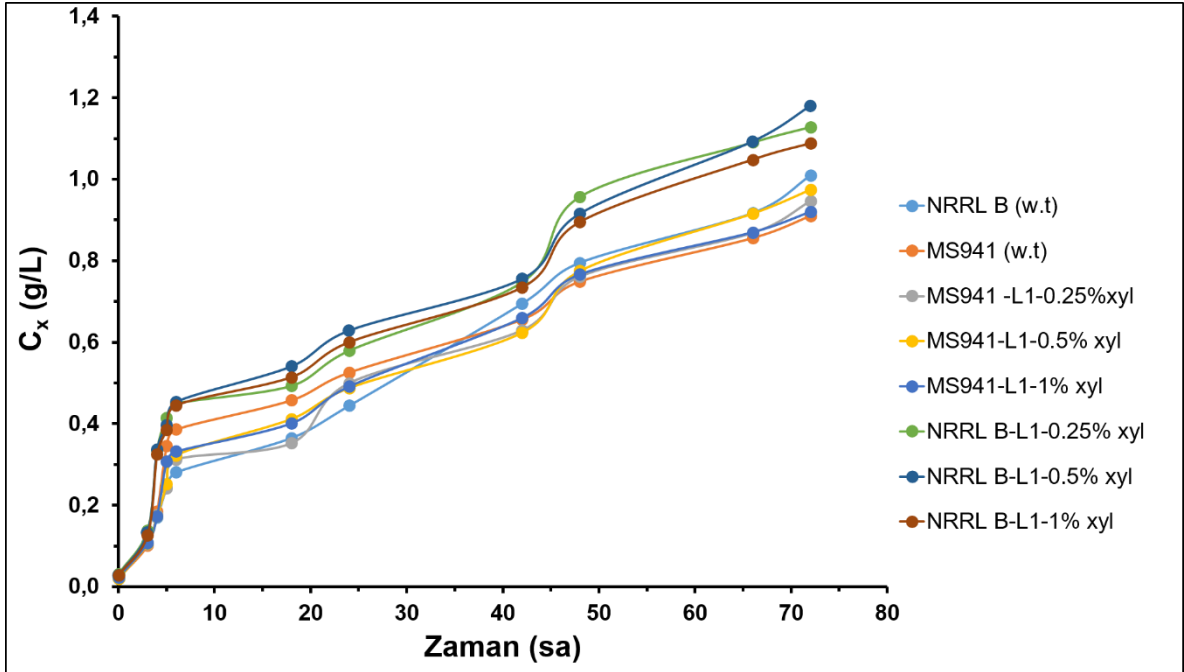
İndükleyici derişimi, rekombinant protein üretiminde en önemli parametrelerden birisidir. Rekombinant gen ekspresyonunda kullanılan pC-HIS1623hp plazmidi ksiloz indüksiyon bölgesine sahiptir. Bu çalışmada, PHA üretimini arttıracak rekombinant *phaC* gen ekspresyonunu gerçekleştirmek için OD₆₀₀=0,3-0,4'e geldiğinde çoğalma ortamına %0,25, %0,5 ve %1 ksiloz çözeltisi (ağırlık/hacim) eklenerek indüksiyon gerçekleştirilmiştir. İndükleyici derişiminin PHA üretime olan etkisini incelemek amacıyla orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde fermantasyon işlemi sonucunda çöktürülen hücreler, Nile red ile boyama sonrası floresan spektroskopisi ile kıyaslanmıştır. PHA üretiminde kullanılmak üzere *B. megaterium* NRRL B-14308 ve MS941 doğal fenotip suşlarının yanı sıra gen klonlama sonucunda elde edilen *B. megaterium* NRRL B-L1 ve *B. megaterium* MS941-L1 suşları PHA üretim

kapasiteleri açısından kıyaslanmıştır (Şekil 4.5). *B. megaterium* MS941 suşları indüklenme ile PHA üretiminde %9 luk bir artış gösterirken, NRRL B suşları ise %12,5'lik bir artış göstermiştir. Aktarılan gen sayesinde gözlemlenen bu anlamlı artış sonucunda NRRL B suşları ile üretime devam edilmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.5. Çeşitli ksiloz indüksiyon derişimlerinde Nile red ile boyama sonrası floresan spektrofotometre ölçüm değerleri.

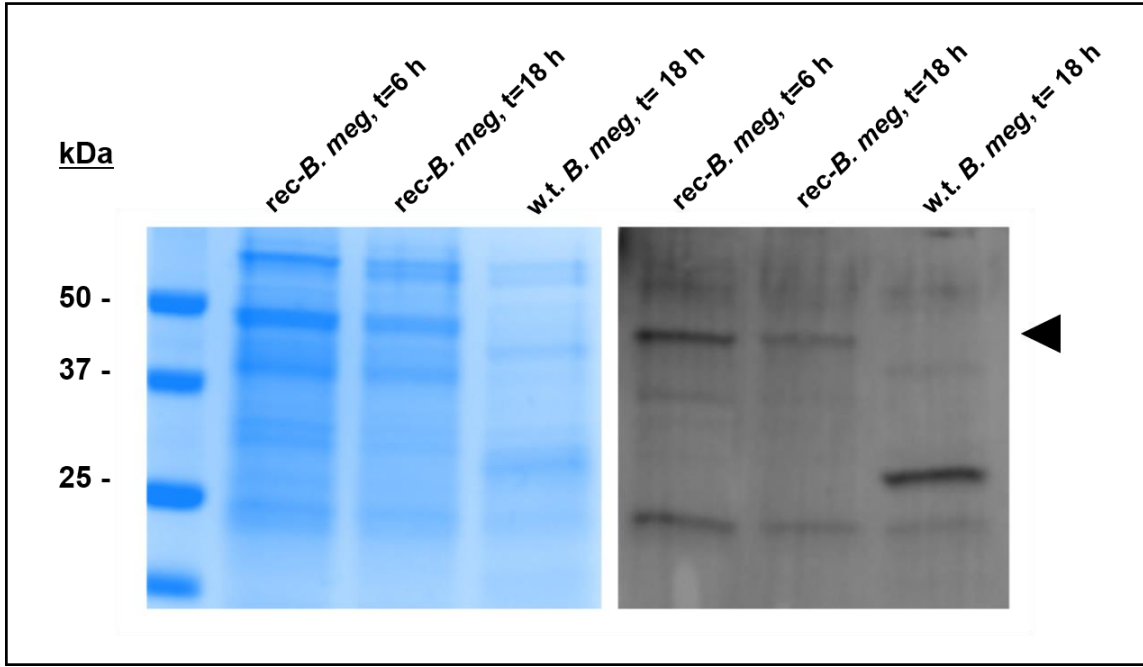
Rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde ksiloz indüksiyonundan sonra belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak hücre derişimleri belirlenmiştir (Şekil 4.6). Aynı derişimde indüklenen suşlar kıyaslandığında, NRRL B suşlarında yaklaşık %20 daha fazla hücre elde edilmiş, ksilozun PHA üretimi ve hücre çoğalmasına etkileri birlikte değerlendirildiğinde, %0,5 ksiloz ile indüklemenin en uygun koşul olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. Rekombinant *B. megaterium* bakteriyel hücrelerinin üretim ortamındaki hücre derişimi değerleri

4.5. *Bacillus megaterium*'da rekombinant PhaC protein ekspresyonu

Rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde %0,5 ksiloz indüksiyonundan sonra belirli zaman aralıklarında örnekler alınmış, santrifüjlenmiş, hücre pelleti ve süpernatant birbirinden ayrılmıştır. Hücre pelleti ile sonikasyon işleminden sonra SDS-PAGE ve Western Blotlama analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7). Yaklaşık 42.5 kDa'da görülen protein bandı, *phaC* geninin rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde ekspres edildiğini göstermektedir.



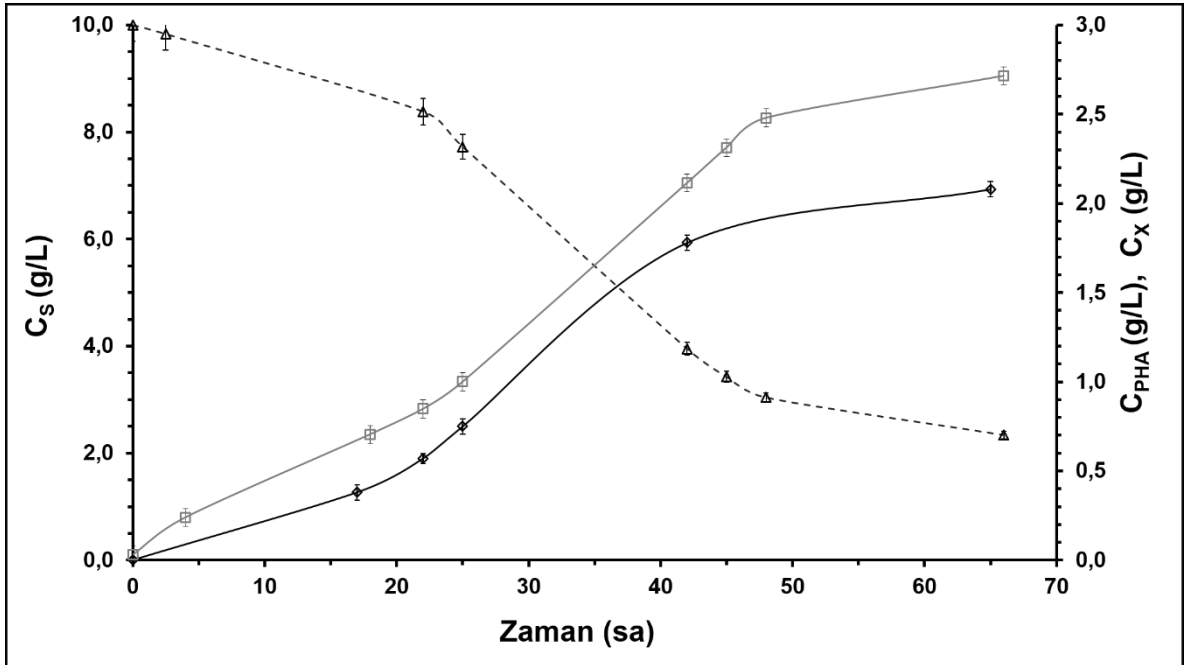
Şekil 4.7. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde rekombinant PhaC proteini analizi. Sol panel: SDS-PAGE; sağ panel: anti-His antikoru ile Western Blot.

4.6. PHA ekstraksiyonu ve çeşitli dehidrasyon tekniklerinin PHA üretimine etkisi

Orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde üretilen PHA granüllerinin biyokütleden saflaştırılmasında kloroform ile çözücü ekstraksiyonu uygulanmıştır. Bu amaçla PHA granülleri ekstraksiyon işleminin etkinliğini arttırmak için liyofilizasyon, etanol/ısı işlem, mikrodalga yardımı ile kurutma gibi dehidrasyon teknikleri ve toz haline getirme gibi ön işlemlere tabi tutulmuştur. Hücrelerin dondurularak vakum altında kurutulduğu liyofilizasyon işlemi, fiziksel ve kimyasal stabiliteyi korumak için biyo tabanlı malzemelerin kurutulmasında en sık kullanılan dehidrasyon tekniğidir. Ancak, liyofilizasyon düşük enerji verimliliği, yüksek işletme maliyetleri ve uzun işlem süreleri gibi dezavantajlara sahiptir [222, 223]. Sıcak hava ile kurutma, büyük ölçekli proseslerde alternatif bir yöntem olarak kullanılırken yüksek sıcaklıklarda birkaç saat kurutma, son ürünün kalitesini düşürebilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada PHA

içeren hücrelerden su moleküllerini uzaklaştırmak için etanol sıcak hava ile birlikte alternatif bir kurutma yöntemi olarak uygulanmıştır. Ayrıca, yüksek ısıtma hızı, seçici ve homojen ısıtma gibi avantajları ile mikrodalga yardımı ile kurutma tekniği de ayrı bir alternatif yöntem olarak uygulanmıştır. Mikrodalga yardımı ile kurutma işlemi hacimsel ısıtma yolu ile gerçekleştiği ve işlem süresi liyofilizasyon ve etanol/ısıtma işlemi ile kurutma tekniklerine göre daha kısa olduğundan PHA veriminde azalma olmaksızın enerji tüketimi açısından da oldukça verimli bir yöntemdir [224].

Burada; orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde PHA üretiminin yaklaşık 66 sa inkübasyon sonucunda yatışkın duruma geldiği; minimal besi ortamındaki glikozun PHA üretimi için besi ortamındaki sınırlayıcı bir bileşen olmadığı, ayrıca hücre çoğalmasının PHA birikimi ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden orbital çalkalamalı biyoreaktörde PHA üretiminde zamana bağlı glikoz tüketimi (C_s , kesikli çizgi), hücre derişimi (C_x , gri çizgi) ve PHA birikimi (koyu çizgi).

Orbital çalkalamalı biyoreaktörde 66 sa inkübasyon sonucunda en yüksek PHA birikimi mikrodalga yardımı ile dehidrasyon işleminde elde edilmiştir (PHA-M: 2,08 g/L). Maksimum dehidre edilmiş biyokütle miktarı, maksimum PHA birikimi, kurutulmuş biyokütlenin PHA içeriği (%CDW) ve hacimsel verimlilik değerleri Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Hücre başına PHA içeriği literatürdeki çalışmalara [132, 225, 226] benzer miktarlarda olup en yüksek PHA birikimi, hacimsel verimlilik değerleri mikrodalga yardımı ile kurutma işleminde elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Maksimum dehidre edilmiş biyokütle miktarı, maksimum PHA birikimi, kurutulmuş biyokütlenin PHA içeriği (%CDW) ve hacimsel verimlilik değerleri

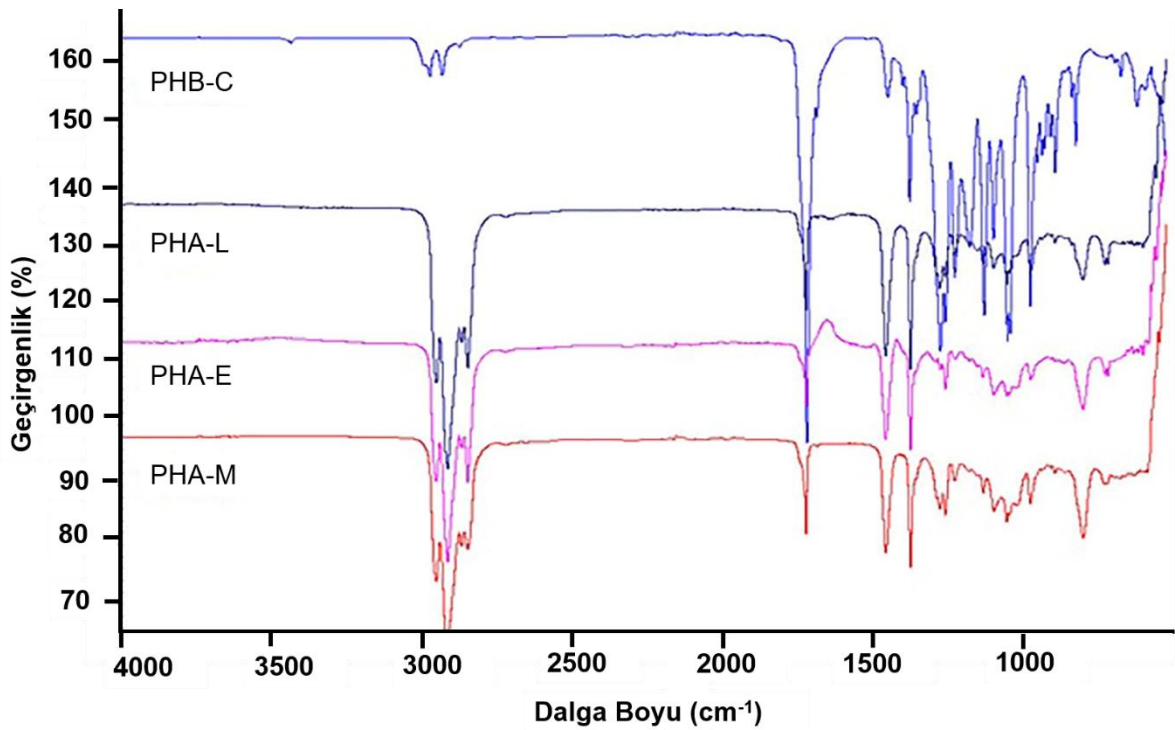
Biyopolimer	Dehidre Biyokütle_{max} (g)	PHA_{max} (g L⁻¹)	PHA (%CDW)	qPHA (g_{PHA} L⁻¹ h⁻¹)
PHA-L	0,52±0,03	1,36±0,05	74,3±4,6	0,15±0,01
PHA-E	0,61±0,05	1,55±0,05	71,2±3,8	0,17±0,01
PHA-M	0,79±0,05	2,08±0,07	73,5±3,7	0,23±0,01

4.7. Çeşitli dehidrasyon teknikleri ve çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılan PHA polimerlerinin karakterizasyonu

Çözücü ekstraksiyonundan önce farklı biyokütle dehidrasyon teknikleri kullanılarak *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan saflaştırılan PHA'ların yapısal ve termal özellikleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), ¹H-NMR, TGA ve DSC analizleri ile karakterize edilmiştir.

İlk olarak, *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan sentezlenen PHA polimerleri ile ticari PHB'nin kimyasal yapısı FTIR analizi ile incelenmiştir. FTIR spektrumunda (Şekil 4.9), 2846-2976 cm⁻¹'deki absorpsiyon tepe değerleri, PHB polimerlerinde C-H metil (CH₃) ve metilen (CH₂) gruplarının gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. 1722 cm⁻¹ ve 1261 cm⁻¹'deki belirgin emme tepe noktaları, sırasıyla karbonil (C = O)

ve asimetrik germe C-O-C gruplarını göstermektedir. 1456 cm^{-1} ve 1379 cm^{-1} 'deki emme zirveleri, sırasıyla metil (CH_3) grubunun gerilme ve asimetrik deformasyonuna karşılık gelmektedir. $1450\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ aralığında absorpsiyon tepe değerleri, CH_3 bükme, CH_2 salgılaması, CO, CC ve COC germe bantlarına karşılık gelmektedir [227-230]. Bu aynı zamanda, üretilen PHA polimerlerinde hidroksivalerat birimlerinin varlığını göstermektedir [227]. Ayrıca dehidrasyon tekniklerinin FTIR spektrumunda benzer ana fonksiyonel gruplara sahip olduğu görülmektedir.



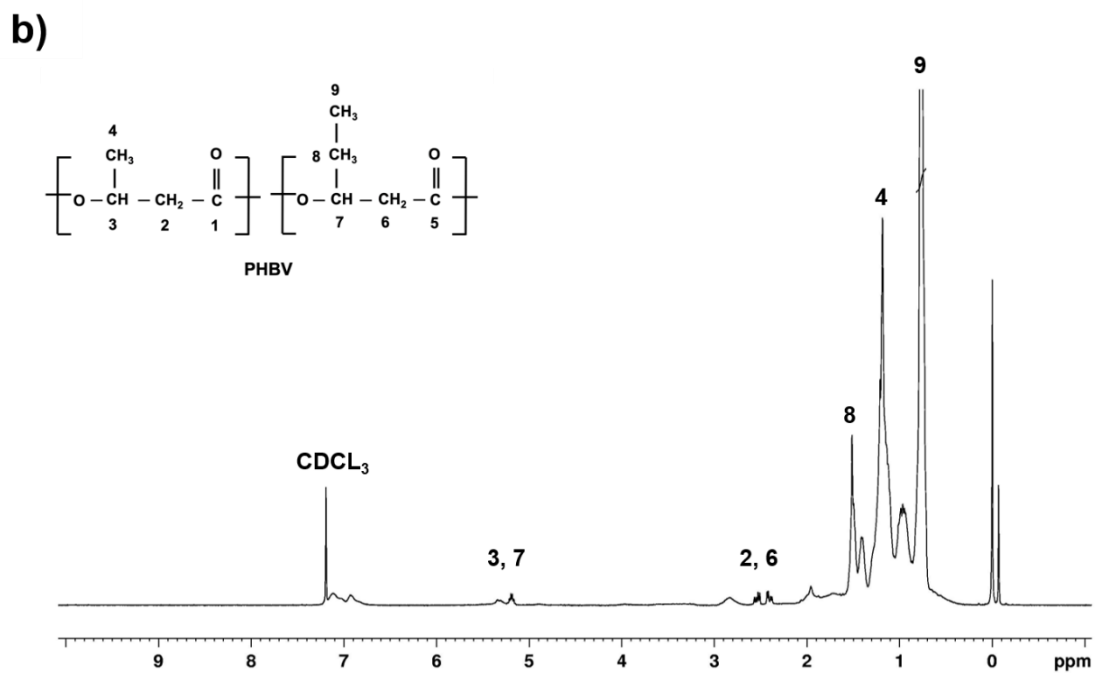
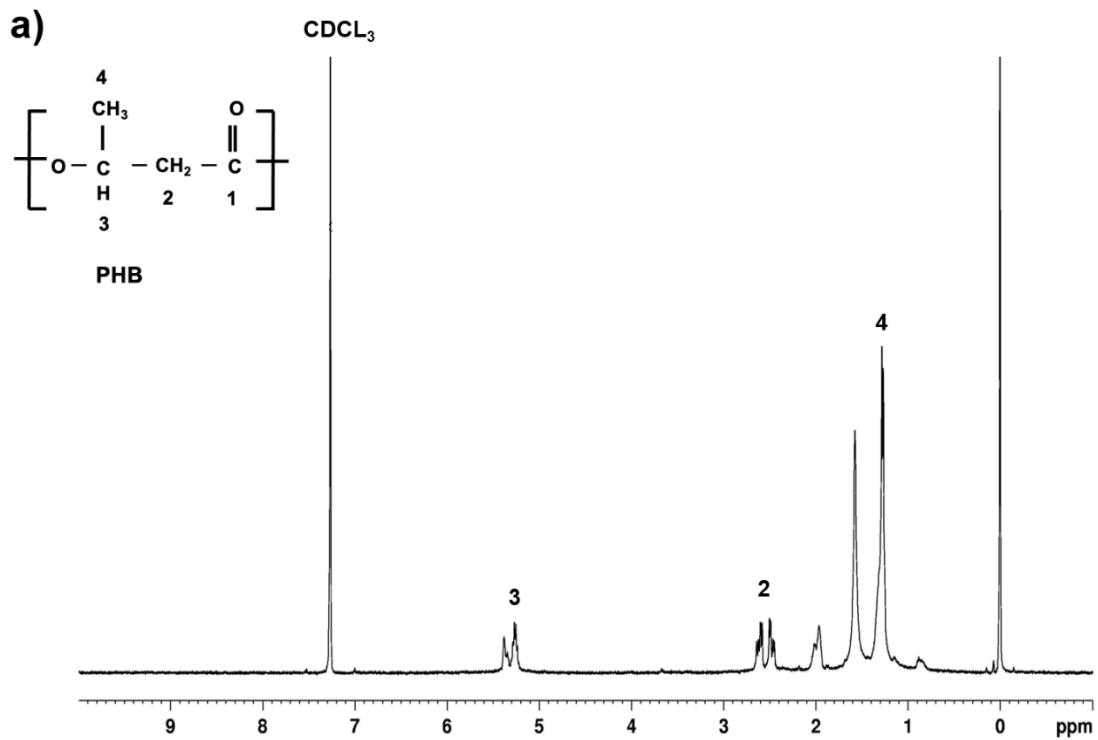
Şekil 4.9. Çeşitli dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin (PHB-C) FTIR analizi

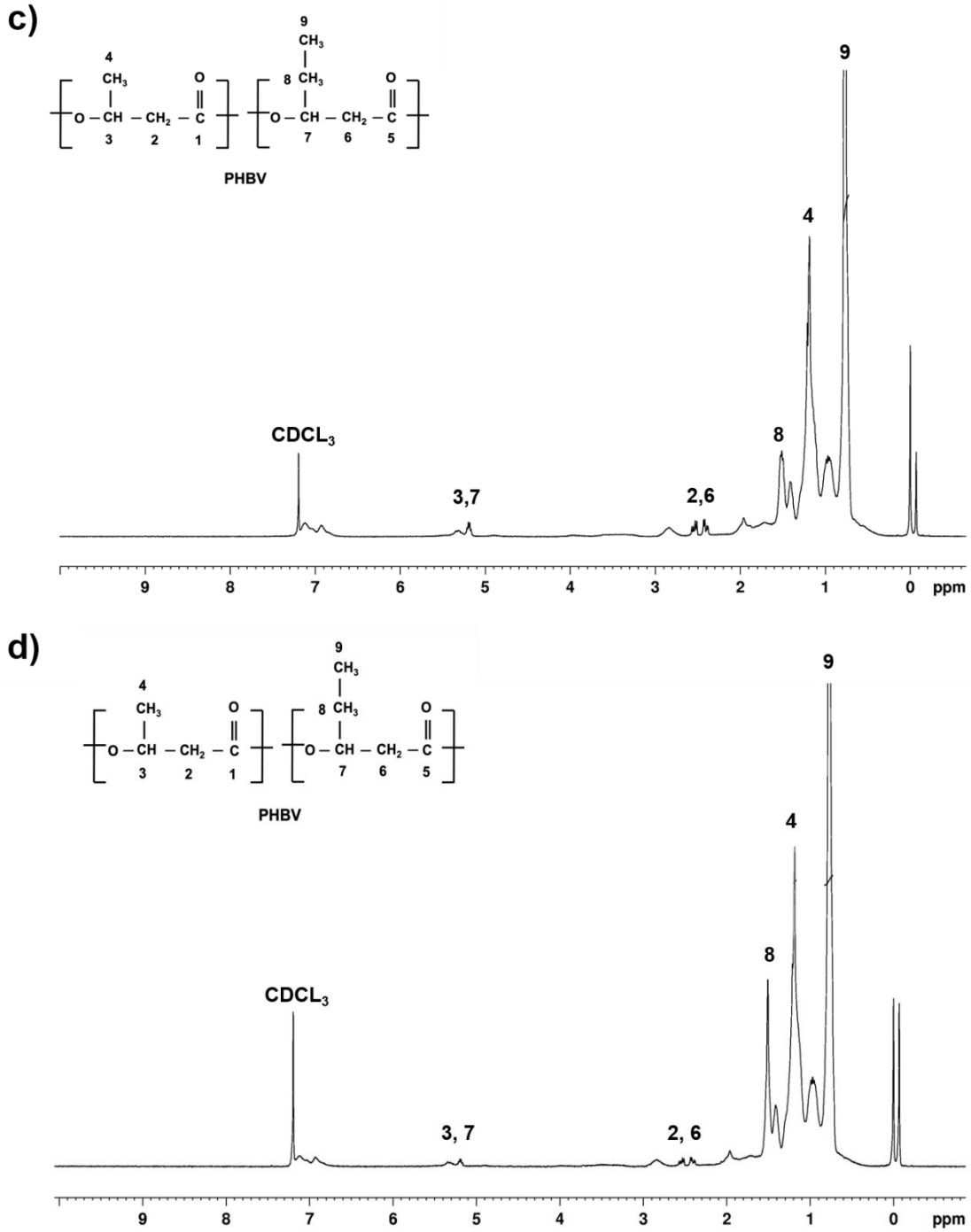
B. megaterium NRRL B-14308'de sentezlenen PHA polimerlerinin yapısal kompozisyonunu belirlemek için, $^1\text{H-NMR}$ analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.10). Ticari PHB polimerlerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu, PHB homopolimerinin üç karakteristik sinyal grubundan oluştuğunu göstermiştir. Bu gruplar; bir protona bağlanmış metil

grubu için 1.25 ppm'de bir pik, bir proton ile asimetrik karbon atomu ile komşu olan metilen grubu için 2.58 ppm'de dörtlü çift, metilen grubunun özelliği 5.27 ppm'de çoklu piklerdir. 7.29 ppm'de elde edilen pik noktası da kloroforma (CDCl_3) bağlanmaktadır (Şekil 4.10a) [231].

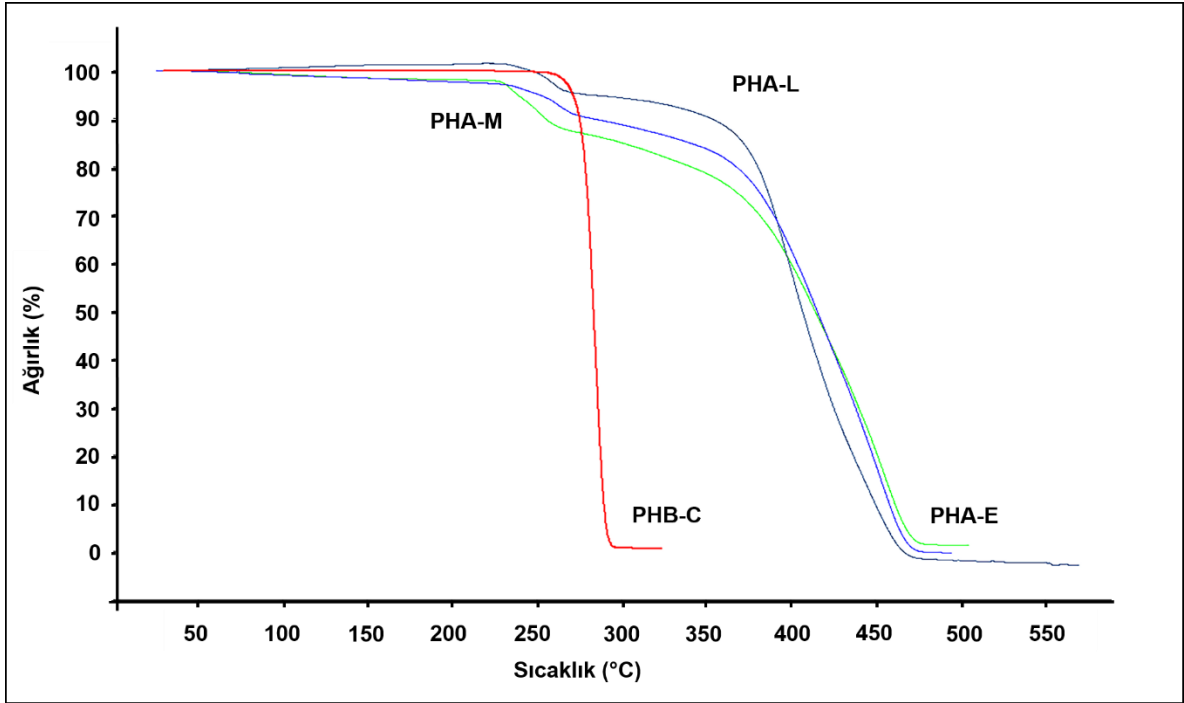
B. megaterium NRRL B-14308 suşundan elde edilen PHA polimerlerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (PHA-L, PHA-M, PHA-E), PHB-C'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ile karşılaştırıldığında, 0.9 ppm, 1.55 ppm ve 3.45-3.5 ppm'de 3 tane ekstra pik gözlenmiştir [132, 232]. Bu sinyaller, sırasıyla terminal metil gruplarının, iç metilen gruplarının ve zincirin sonundaki bir metilen grubunun, diğer pozisyonlarına karşılık gelmektedir. Dolayısıyla, *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan elde edilen PHA biyopolimerlerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu, PHA biyopolimerlerinin 3HB ve 3HV ünitelerinden oluştuğunu göstermektedir [233].

B. megaterium NRRL B-14308 suşundan sentezlenen PHA polimerlerinin termal özelliklerini belirlemek için, örnekler termogravimetrik analiz (TGA) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analiz edilmiştir. Polimerlerin termal stabilitesi, özellikle, polimerlerin termal bozulmadan önce dayanabilecekleri maksimum sıcaklık değerleri, polimer işleme için en önemli faktörlerden biridir [234]. PHA polimerlerinin bozunma sıcaklıkları (T_d), TGA analizi ile belirlenmiştir. Farklı dehidrasyon tekniklerinden sonra elde edilen PHA numunelerinin ısıl bozulması, esas olarak 250-261°C ila 452-457°C arasında değişen ayrışma sıcaklıkları olan iki aşamalı bir işlemde meydana gelmektedir (Şekil 4.11). İki ayrışma sıcaklığı, PHA numunelerine 3HV gibi farklı monomerlerin dâhil edilmesinden kaynaklanmaktadır. Farklı monomerlerin varlığının polimerin termal stabilitesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. PHB-C'nin termal degradasyonu, 287°C'de tek adımlı bir degradasyon ile olup sadece ana degradasyon olarak β -elimine edilerek rastgele bir zincir kesimi yoluyla gerçekleşmektedir [235].





Şekil 4.10. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden sentezlenen ve çeşitli dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu a) PHB-C, b) PHA-L, c) PHA-E, d) PHA-M.



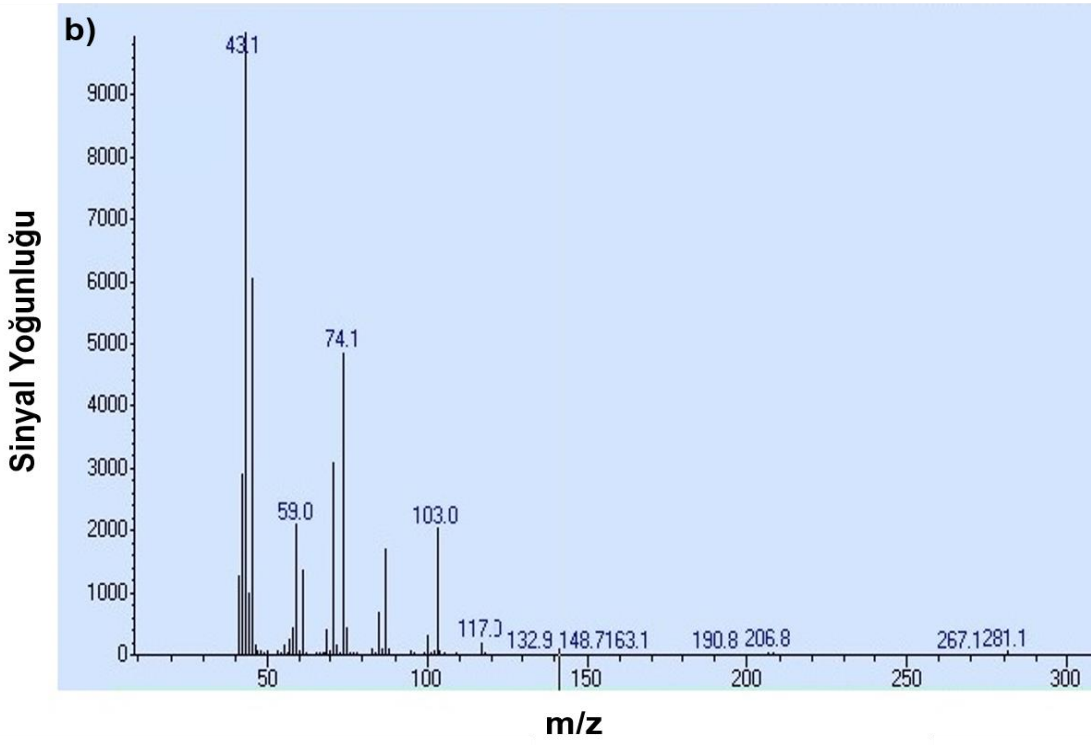
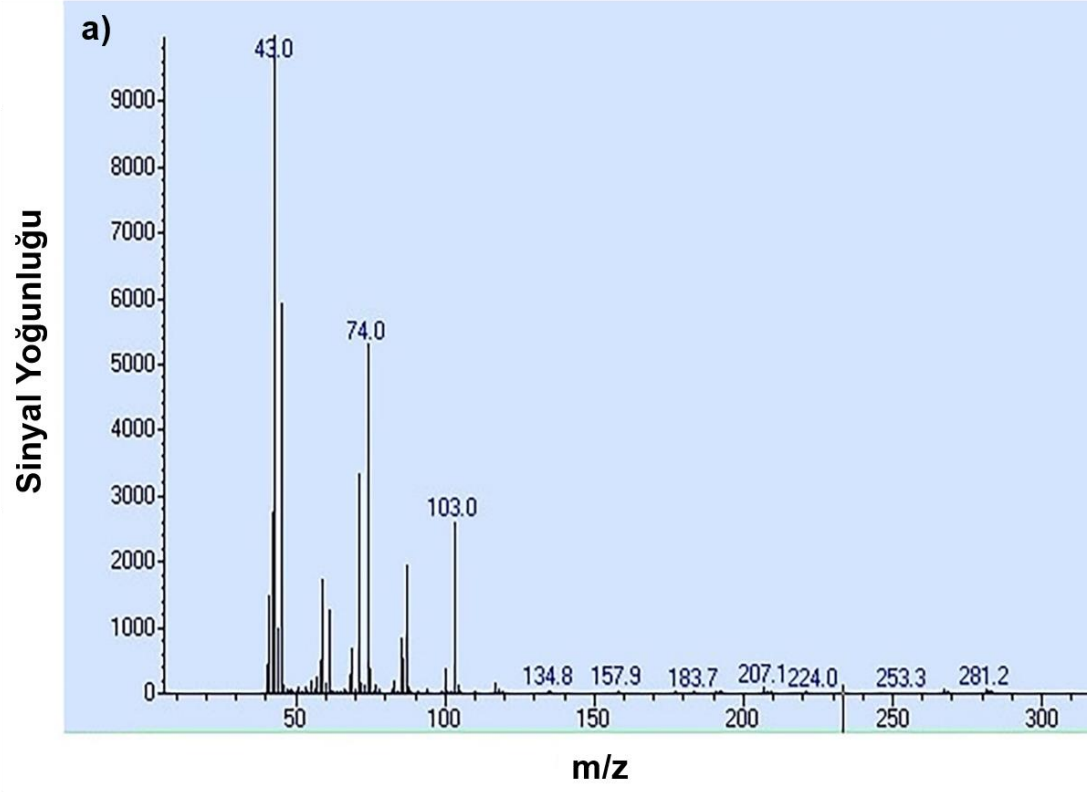
Şekil 4.11. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden sentezlenen ve çeşitli dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin TGA analizi.

B. megaterium NRRL B-14308 suşundan sentezlenen PHA polimerlerinin termal özellikleri Çizelge 4.6'da özetlenmiştir. Saflaştırılan PHA polimerlerinin erime sıcaklıklarını (T_m) karakterize etmek için diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi kullanılmıştır. *B. megaterium*'dan sentezlenen PHA polimerlerinin erime sıcaklıkları 168°C 'de gözlenmiştir. PHB-C'nin erime sıcaklığı ise 175°C olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Farklı dehidrasyon teknikleriyle saflaştırılan PHA polimerleri, PHB-C'ye kıyasla daha düşük T_m değerlerine sahip olup, bu durum, 3HV monomer birimlerinin polimer zincirine dâhil olduğunu göstermektedir. Biyopolimerde 3HV ünitesinin oranı arttıkça, polimerin erime sıcaklığı azalmakta, öte yandan kopolimer oluşumu darbe dayanımını ve polimer esnekliğini arttırmaktadır [227].

Çizelge 4.6. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden sentezlenen ve liyofilizasyon (-L), etanol/ısı işlem (-E) ve mikrodalga yardımı ile kurutma (-M) dehidrasyon teknikleri kullanılarak kloroform ekstraksiyonu ile elde edilen PHA örneklerinin ve ticari PHB'nin (PHB-C) termal özellikleri

Biyopolimer	T_{d1} (°C)	T_{d2} (°C)	T_m (°C)
PHB-C	287±2,1	-	175±2,1
PHA-L	259±7,1	400±7,1	166±2,1
PHA-E	250±6,4	455±3,5	168±3,5
PHA-M	261±5,7	452±3,5	168±3,5

Bakteri hücreleri içindeki PHA içeriğini ve monomer bileşimini belirlemek için, liyofilize hücrelerin metanolizinden sonra gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) analizi gerçekleştirilmiştir. 4.3 ve 5.5 dakikalık alıkonma süresinde iki farklı pik değeri, sırasıyla PHA numunesindeki 3HB ve 3HV metil esterleri gösterirken beklendiği gibi, PHB-C için sadece 3HB metil ester piki gözlenmiştir. 3HB metil esterinin (Şekil 4.12) kütle spektrumunda, m/z 43'teki pikler, molekülün C3 ve C4 arasındaki bağlarının parçalanmasından kaynaklanan hidroksil ucunu göstermektedir. m/z 74'teki pik, molekülün karbonil ucunu göstermektedir. Bu pik, hem 3HB hem de 3HV metil esterlerinin C3 ve C4 arasındaki bağ bölünmesinden sonra McLafferty yeniden düzenlemesinden kaynaklanmaktadır. m/z 59'daki pik ise 3HV metil esterinin kütle spektrumunda C3 ve C4 bağ klevajını temsil eden molekülün hidroksil ucunu göstermektedir [236, 237].



Şekil 4.12. GC-MS kromatogramı a) 3HB metil ester b) 3HV metil ester

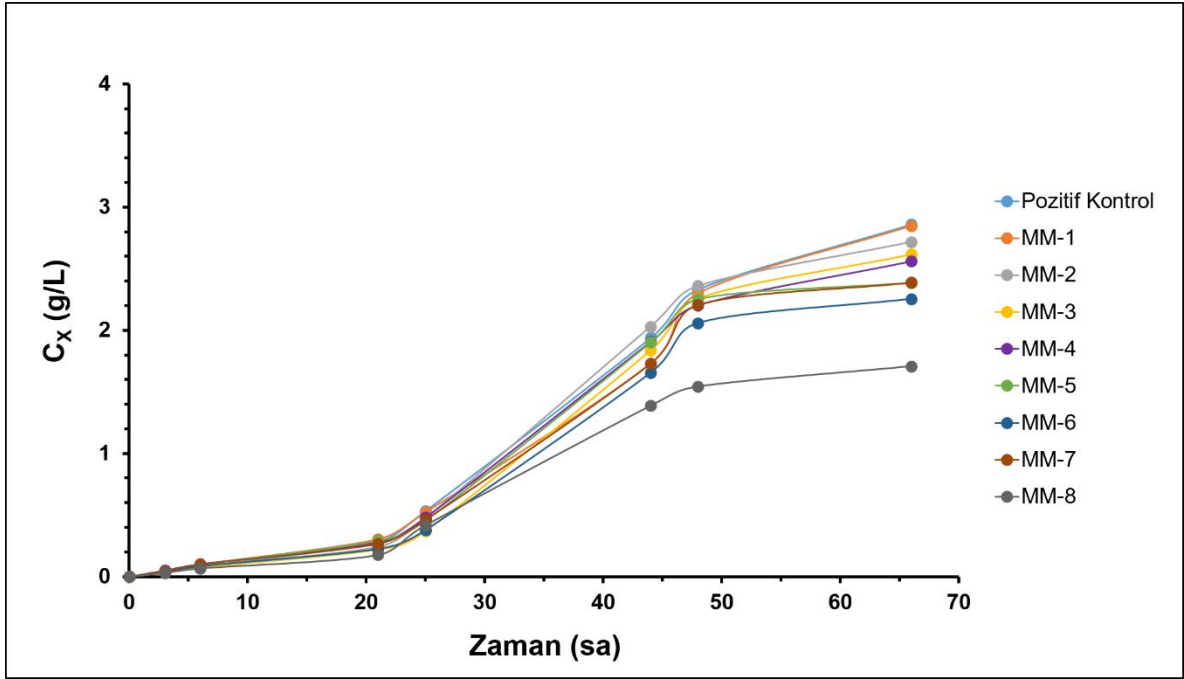
4.8. PHA üretiminde kullanılan minimal besi ortamı optimizasyonu

Polihidroksialkanoatlar (PHA), sınırlandırılmış çoğalma koşullarında birçok bakteri tarafından hücre içi karbon ve enerji kaynağı olarak sentezlenen ve sitoplazmada lipid granülleri halinde depolanan biyopolimerlerdir. Etkin bir PHA üretimi için proses kontrolü ve optimizasyonu oldukça önemlidir. PHA üretim prosesinin optimizasyonu için üretim ortamı bileşenlerinin ve fermantasyon koşullarının etkisi incelenmelidir. Üretim prosesinin kontrolü ve optimizasyonu sayesinde yüksek hücre yoğunluğu ve yüksek ürün verimi elde edilebilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, minimal besi ortamını optimize edebilmek için farklı bileşimlerde hazırlanan besi ortamlarında *B. megaterium* NRRL B-14308 suşu ile PHA üretimi gerçekleştirilmiş ve farklı karbon/azot derişimlerinin PHA üretimine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla Çizelge 3.6'da verilen üretim ortamlarında PHA üretimi gerçekleştirilerek, hücre derişimi ve PHA üretimi belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak incelenmiştir.

B. megaterium NRRL B-14308 suşu ile PHA üretimi, hücre çoğalması ile bağlantılı ("growth-associated") bir proses olması sebebiyle orbital-çalkalamalı biyoreaktörlerde 66 saatlik inkübasyon süresince elde edilen hücre derişim eğrilerine göre iz element çözeltisinde yer alan Fe^{+2} miktarı iki katına çıkarıldığında (MM-3) hücre derişiminin ve hücre içi PHA üretiminin arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.13).

Farklı bileşimlere sahip minimal besi ortamlarında, *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücreleri ile PHA üretimi sonucunda elde edilen kinetik parametreler Çizelge 4.7'de özetlenmiştir. En yüksek PHA birikim miktarı (g/L), %PHA birikimi, spesifik çoğalma hızı (μ , sa^{-1}) ve hacimsel verimlilik (q , g/L/sa) Fe^{+2} miktarının iki katına çıkarıldığı MM-3 besi ortamında elde edilirken, en yüksek kuru hücre ağırlığı ise üretim çalışmalarında kullandığımız ve tasarladığımız MM-PK [136] ortamında elde edilmiştir (Çizelge 4.7).



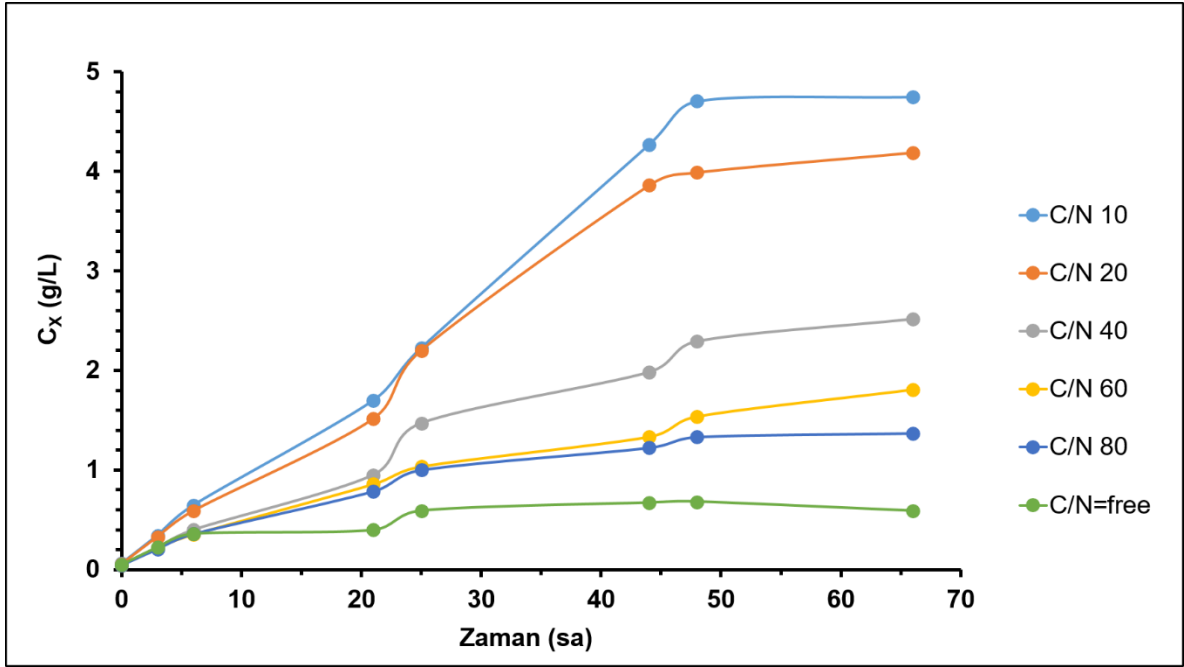
Şekil 4.13. *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerin farklı minimal besi ortamlarında hücre derişimi değerleri

Çizelge 4.7. Farklı minimal besi ortamlarında PHA üretimi sonucunda elde edilen kinetik parametreler

Besi ortamı	μ (sa ⁻¹)	Hücre kuru ağırlığı (g L ⁻¹)	PHA ağırlığı (g L ⁻¹)	PHA (%)	q (g L ⁻¹ sa ⁻¹)	Y _{PHS}	Y _{X/S}
MM-PK	0,205	2,86	2,06	72,3	0,423	0,26	0,36
MM-1	0,278	2,85	2,01	69,9	0,556	0,25	0,36
MM-2	0,268	2,72	1,92	70,6	0,515	0,24	0,34
MM-3	0,298	2,62	2,22	84,7	0,662	0,28	0,33
MM-4	0,236	2,56	1,88	73,4	0,444	0,24	0,32
MM-5	0,274	2,4	1,88	78,3	0,515	0,23	0,29
MM-6	0,295	2,26	1,76	77,9	0,519	0,22	0,28
MM-7	0,276	2,41	1,66	68,9	0,459	0,21	0,30
MM-8	0,260	1,71	1,15	67,3	0,303	0,14	0,21

4.8.1. C/N molar derişim oranının PHA üretimine etkisi

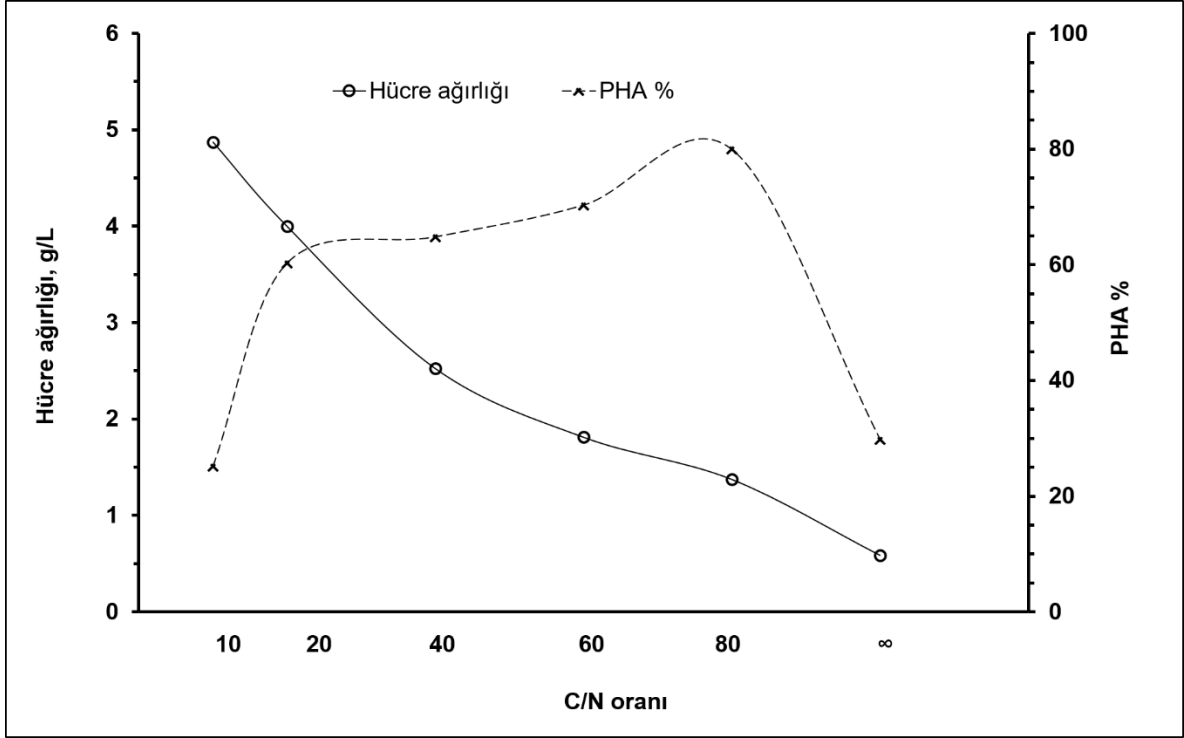
Bu çalışmada, yüksek hücre yoğunluğu ve yüksek PHA ürün verimi elde edebilmek için, çeşitli C/N molar derişim oranlarının PHA üretimine etkisi belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak hücre derişimleri UV-Vis spektrofotometrede incelenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin farklı C/N molar derişim oranlarındaki minimal besi ortamlarında hücre derişimi değerleri

Farklı C/N molar derişim oranlarının hücre kuru ağırlığı ve hücre içi PHA birikimine olan etkisi incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.15’de verilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücre kuru ağırlıkları, C/N 10, 20, 40, 60, 80 ve N-içermeyen koşullarda sırasıyla 4,88, 4,0, 2,52, 1,81, 1,37 ve 0,59 g/L olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre C/N oranı arttıkça, hücre kuru ağırlıklarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Yüksek C/N molar derişim oranları, çoğalma ortamında azot yoksunluğu meydana getirmiş ve karbon/azot dağılımındaki dengesizlik hücre kuru ağırlığındaki belirgin düşüşe neden olmuştur. Hücre içi PHA birikimleri

incelendiğinde C/N =10, 20, 40, 60, 80 ve N-içermeyen koşullarda sırasıyla %25,1, 60,3, 64,9, 70,3, 80 ve 29,8 olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.8). PHA birikimi C/N=10'dan 80'e doğru önemli ölçüde artış gösterirken, PHA birikimi azot içermeyen (N-free) ortamda ciddi biçimde azalmıştır. Buna göre yüksek C/N molar derişiminin hücre çoğalması için uygun olmadığı, fakat PHA birikimi için elverişli bir koşul olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.15. Orbital çalkalamalı biyoreaktörde çeşitli C/N molar derişim oranlarının hücre içi PHA birikimi ve hücre kuru ağırlığına etkisi

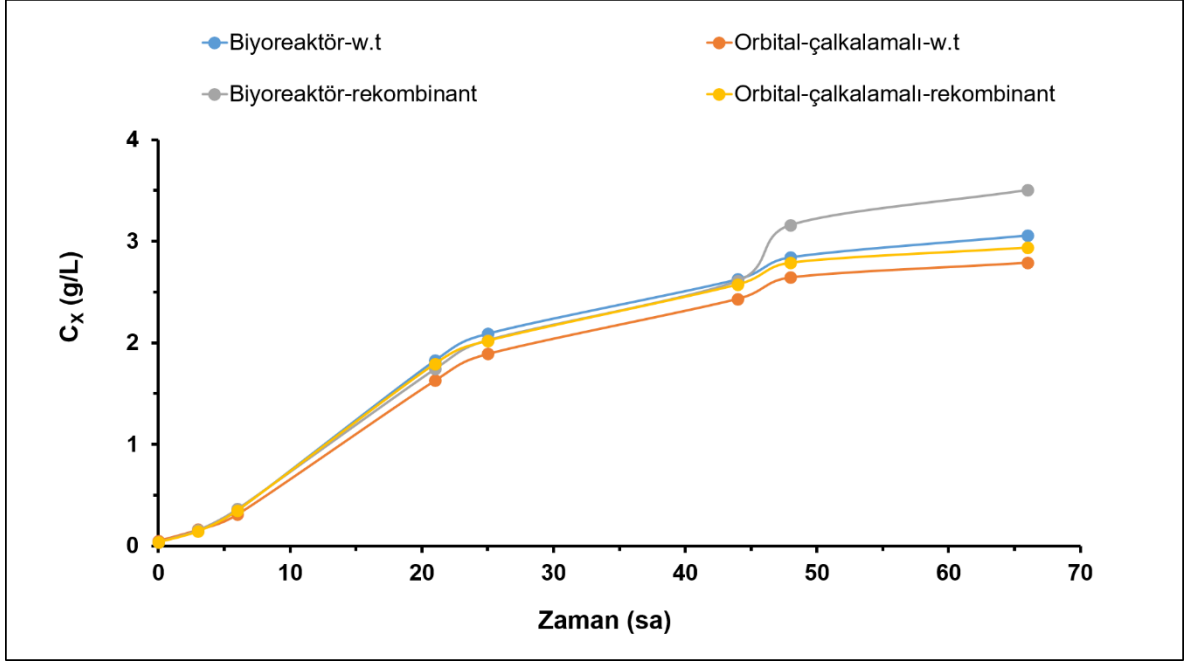
B. megaterium NRRL-B-14308 bakteriyel hücrelerinin farklı C/N molar derişim oranlarındaki PHA üretim kinetiği incelenmiş ve elde edilen kinetik parametreler Çizelge 4.8' de özetlenmiştir. Hücre kuru ağırlığı, PHA birikim miktarı ile hacimsel verimlilik birlikte düşünüldüğünde, PHA üretimi için en uygun C/N molar derişim oranının 20 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı C/N molar derişim oranlarında elde edilen kinetik parametreler

C/N oranı	μ (sa ⁻¹)	Hücre kuru ağırlığı (g L ⁻¹)	PHA derişimi (g L ⁻¹)	PHA (%)	q (g L ⁻¹ sa ⁻¹)	Y _{P/S}	Y _{X/S}
10	0,398	4,88	1,23	25,1	0,488	0,16	0,63
20	0,4	4,0	2,41	60,3	0,965	0,31	0,51
40	0,362	2,52	1,63	64,9	0,593	0,21	0,32
60	0,349	1,81	1,28	70,3	0,445	0,16	0,22
80	0,346	1,37	1,1	80,0	0,381	0,14	0,17
∞	0,327	0,59	0,18	29,8	0,057	0,02	0,07

4.9. Doğal fenotip *B. megaterium* ve rekombinant *B. megaterium* suşları ile biyoreaktörde PHA üretimi ve karakterizasyonu

PHA üretimi için en uygun minimal besi ortamı ve C/N molar derişim oranı belirlendikten sonra, doğal fenotip *B. megaterium* NRRL-B-14308 ve *phaC* gen overekspresyonu ile üretilen rekombinant *B. megaterium* NRRL-B-14308 suşlarının hem orbital çalkalamalı biyoreaktörde hem de laboratuvar ölçekli biyoreaktörde inkübasyon deneyleri gerçekleştirilmiş, belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak hücre derişimleri incelenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 ve doğal fenotip NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin orbital çalkalamalı biyoreaktör ve laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki inkübasyonu süresince hücre derişimleri

Aktarılan gen sayesinde rekombinant hücrelerin doğal fenotip hücrelere göre hem orbital çalkalamalı biyoreaktörde hem de laboratuvar ölçekli biyoreaktörde daha yüksek bir hücre derişimine sahip olduğu belirlenmiştir. PHA'nın hücre içi yağ granülleri şeklinde üretilen bir biyopolimer olması sebebiyle, hücre derişimi eğrisi ile PHA birikimi paralellik göstermektedir.

Rekombinant ve doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde PHA üretimi çalışmalarında elde edilen kinetik parametreler Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin, doğal fenotip bakteriyel hücrelere göre daha yüksek kuru hücre ağırlığı, PHA birikim miktarı, hacimsel verimlilik değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Hücrede PHA sentezinden sorumlu *phaC* gen overekspresyonu ile elde edilen rekombinant

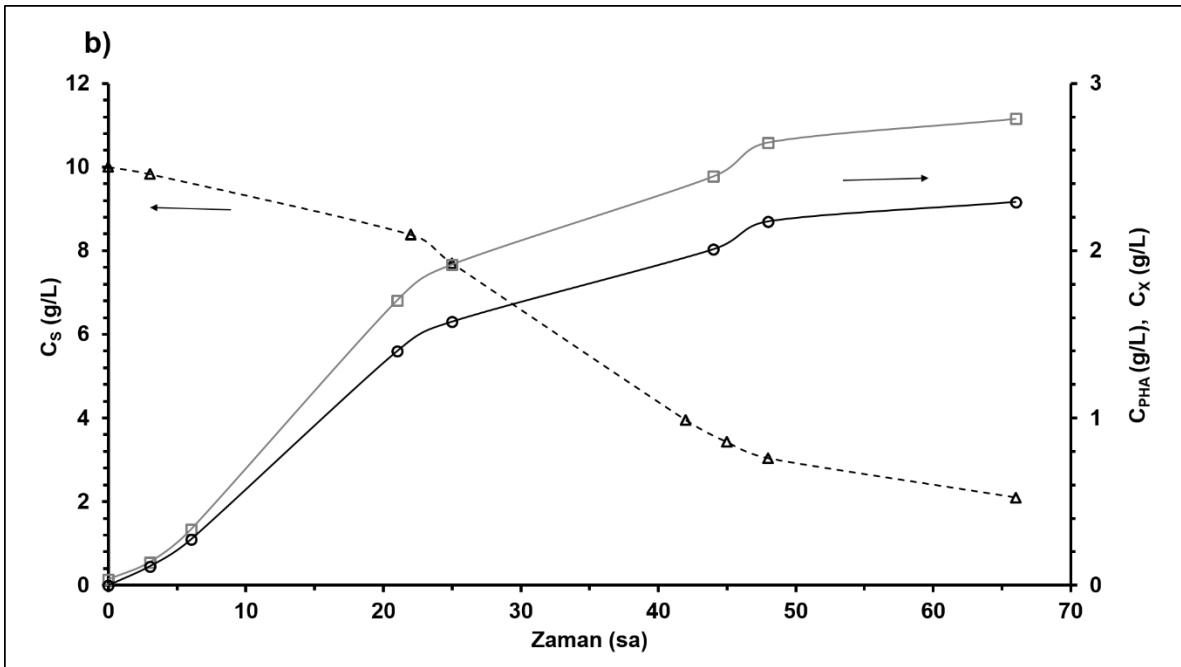
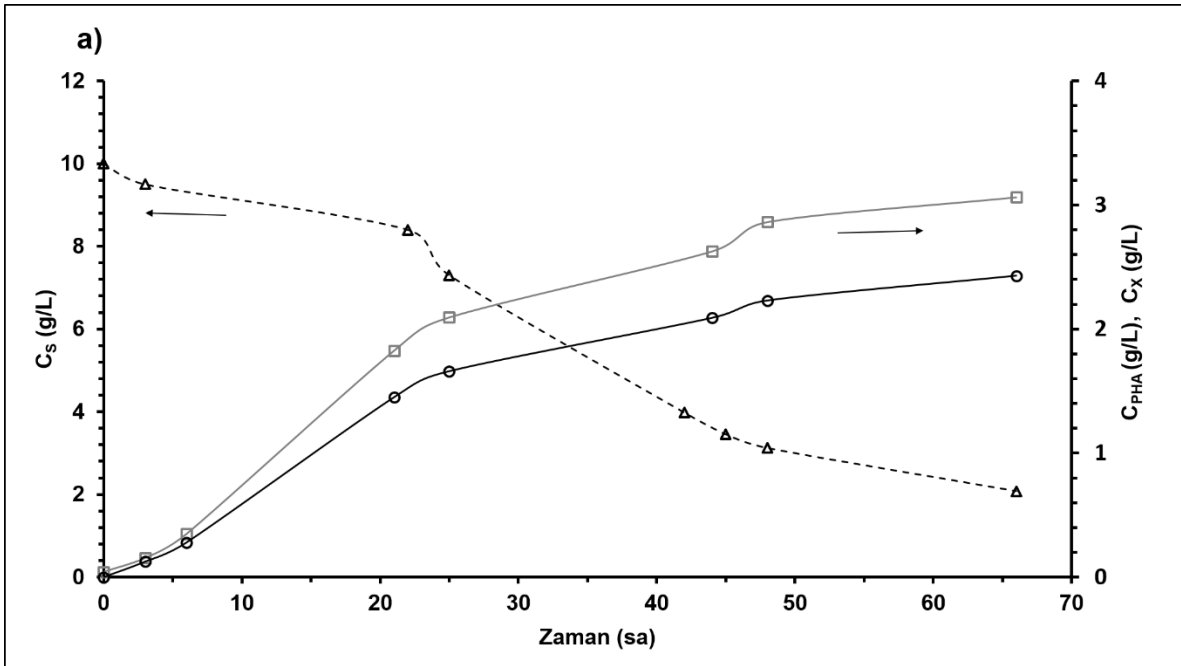
bakteriyel hücrelerin doğal fenotip bakteriyel hücelere göre her iki tür biyoreaktörde de yaklaşık %13 daha fazla PHA ürettiği belirlenmiştir.

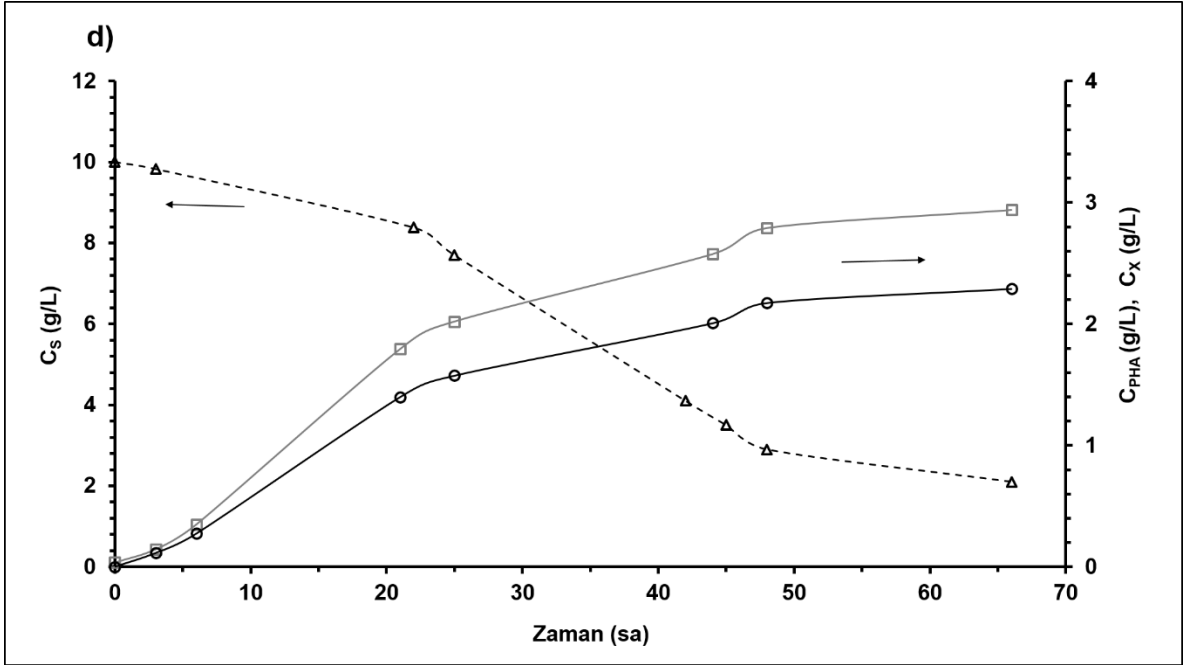
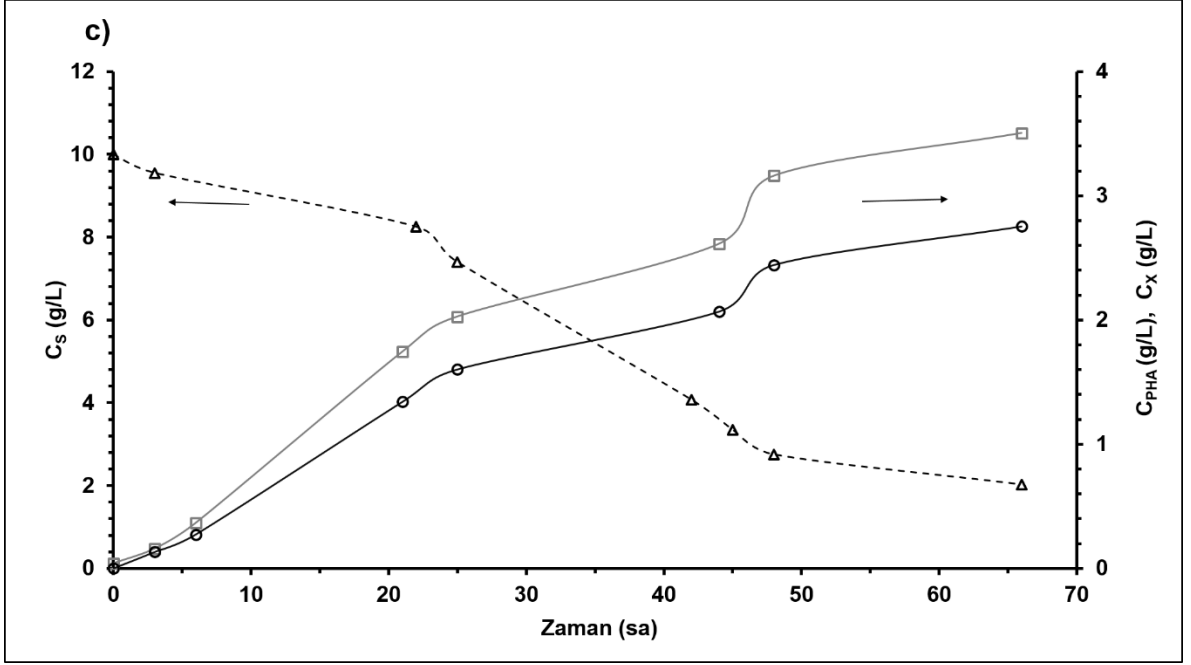
Ayrıca, laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde, orbital çalkalamalı reaktörlere göre biyokimyasal proseslerin daha kontrollü ortamlarda ve çalışma koşullarında (pH, sıcaklık, DO ve besi ortamı vb.) gerçekleştirilmesini sağlaması sebebiyle, daha yüksek bir PHA üretim miktarı, kuru hücre ağırlığı, %PHA birikimi, hacimsel verimlilik ve spesifik çoğalma hızı değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.9. Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 (-rec) ve doğal fenotip NRRL B-14308 (-w.t.) bakteriyel hücrelerinin orbital çalkalamalı biyoreaktör (O-) ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörde (B-) PHA üretimi kinetik parametreleri

Koşul	μ (sa^{-1})	Hücre kuru ağırlığı (g L^{-1})	PHA derişimi (g L^{-1})	PHA (%)	q ($\text{g L}^{-1} \text{sa}^{-1}$)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$
B-w.t	0,354	3,06	2,43	79,4	0,861	0,31	0,38
O-w.t	0,299	2,79	2,12	75,9	0,633	0,27	0,35
B-rec	0,371	3,51	2,75	78,4	1,022	0,35	0,44
O-rec	0,368	2,94	2,29	77,9	0,865	0,29	0,37

Hem orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde hem de laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretiminin yaklaşık 66 sa inkübasyon sonucunda yatışkın duruma geldiği, minimal besi ortamındaki glikoz derişiminin PHA üretimi için besi ortamındaki sınırlayıcı bir bileşen olmadığı, ayrıca hücre çoğalmasının PHA birikimi ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.17).

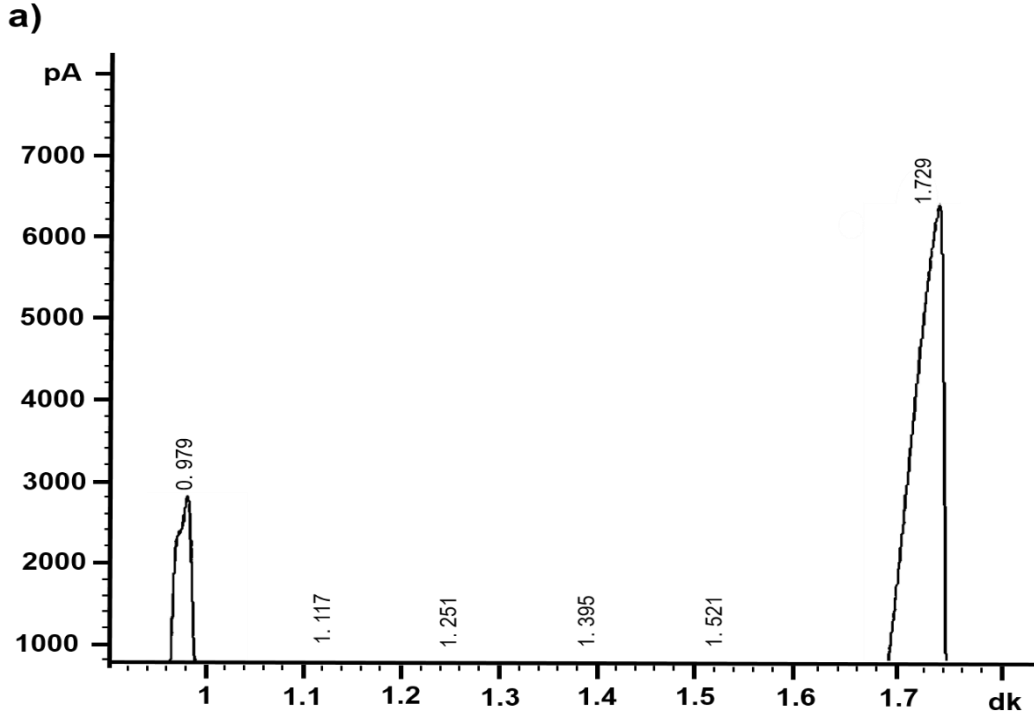


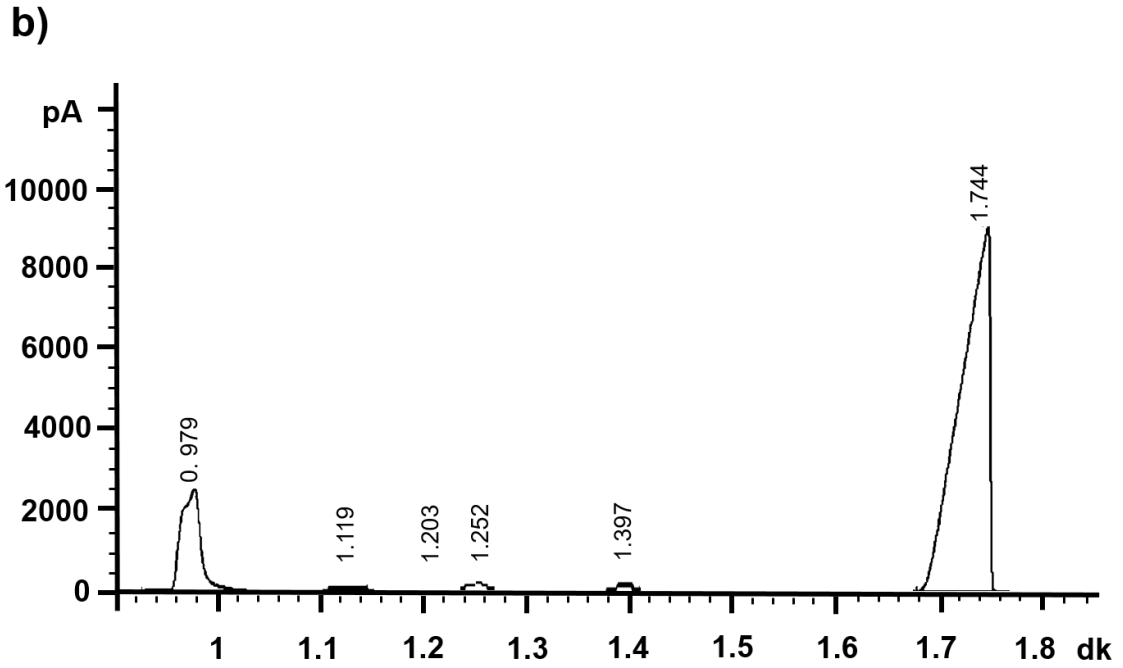


Şekil 4.17. Rekombinant ve doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretiminde zamana bağlı glikoz tüketimi (C_S , kesikli çizgi), hücre çoğalması (C_X , gri çizgi) ve PHA birikimi (koyu çizgi) a) B-w.t b) O-w.t c) B-rec d) O-rec.

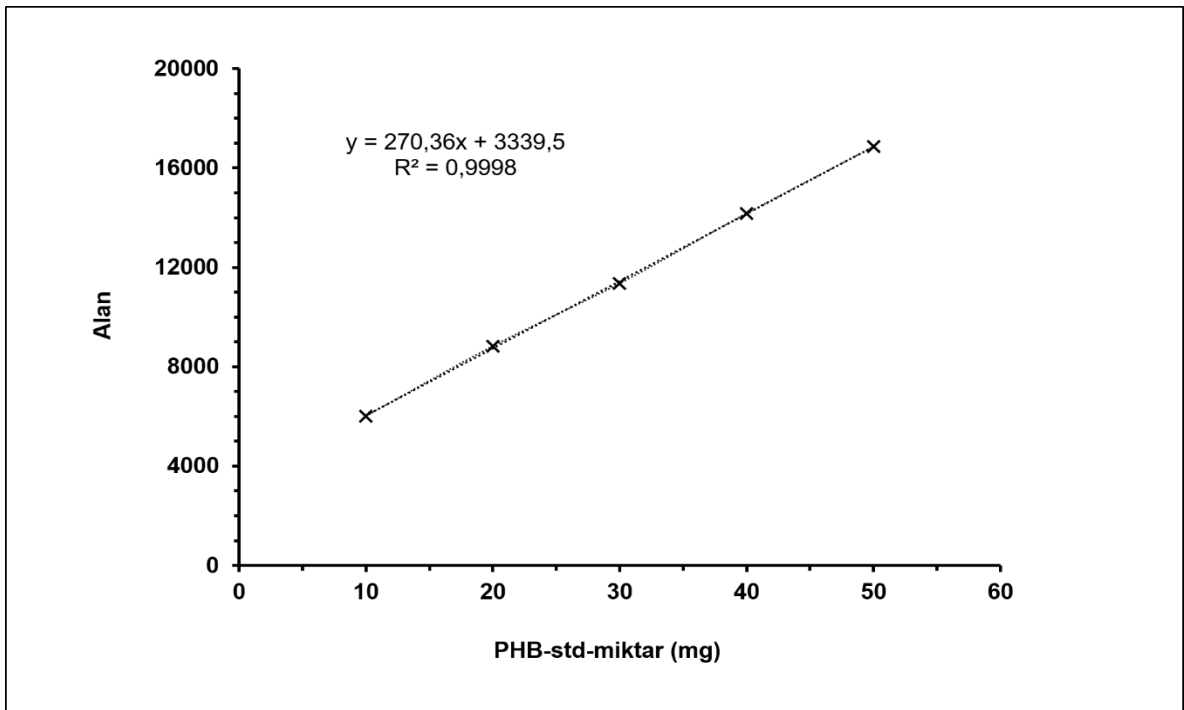
4.9.1. Gaz kromatografisi (GC-FID) ve ¹H-NMR analizleri

Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 ve doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde üretilen PHA biyopolimerlerinin içeriği ve monomer bileşimini belirlemek için GC-FID kromatogramları incelenmiştir. 0.97 ve 1.74 dk alıkonma sürelerinde elde edilen iki farklı pik, sırasıyla PHA örneğindeki 3-hidroksibütiril metil ester (3-HBME) ve 3-hidroksivalerat metil esterleri (3-HVME) göstermektedir (Şekil 4.18) [238]. PHA standart kalibrasyon eğrisini (Şekil 4.19) kullanarak bakteriyel hücrelerden elde edilen PHA polimerlerinin miktarı ve içeriği belirlenmiştir.





Şekil 4.18. GC-FID kromatogramları a) Doğal fenotip hücrelerden elde edilen PHA
b) Rekombinant hücrelerden elde edilen PHA



Şekil 4.19. GC-FID analizi için PHA kalibrasyon eğrisi

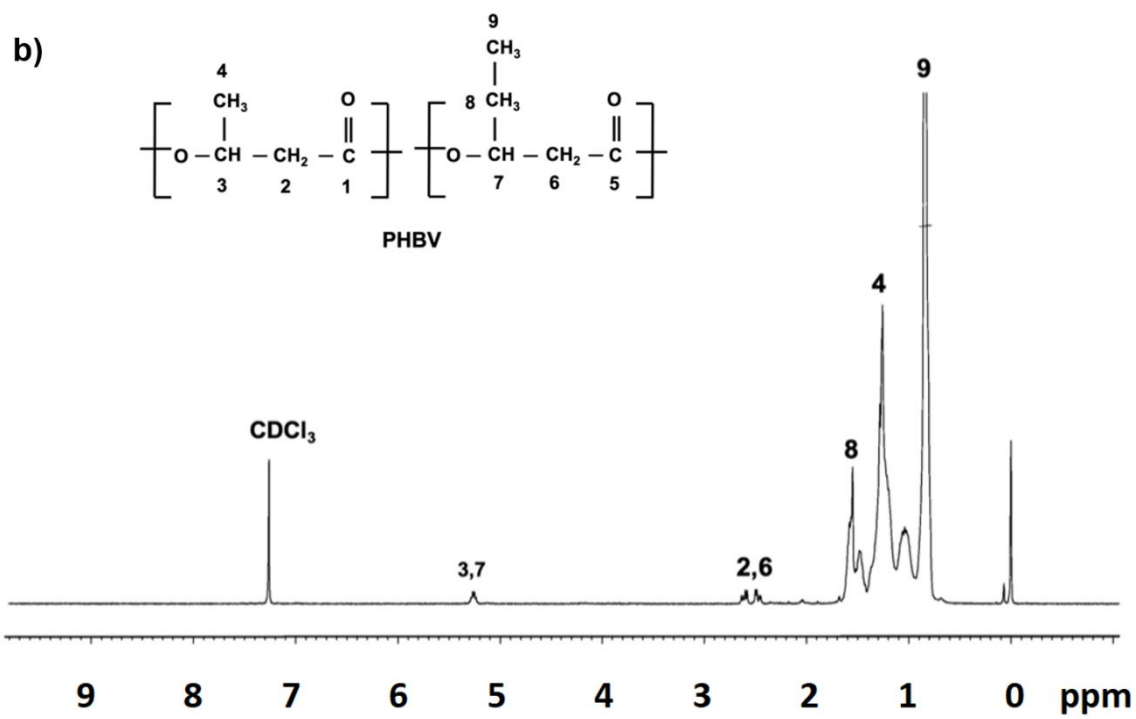
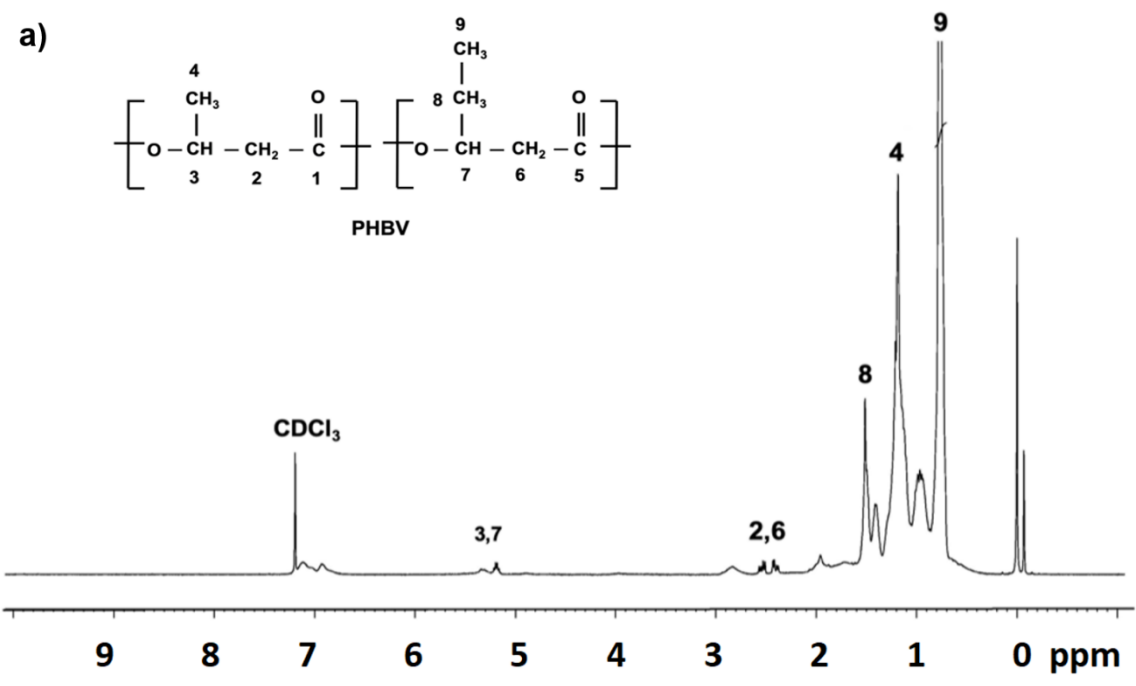
Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 ve doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan kontrollü ve kontrolsüz biyoreaktörlerde elde edilen biyopolimerlerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ¹H-NMR analizi gerçekleştirilmiştir. PHA biyopolimerlerinin ¹H-NMR spektrumunda görülen sinyal grupları; 0.9 ppm de HV polyester yapısına ait terminal metil grubu (CH₃, HV), 1.25 ppm de HB polyester yapısına ait bir protona bağlanmış metil grubu (CH₃, HB), 1.55 ppm de internal metilen grupları, 2.58 ppm de bir protona asimetric karbon atomu ile komşu metilen grubu ile 5.27 ppm deki karakteristik metilen grubudur. ¹H-NMR spektrumunda, çözücü kloroform piki 7.29 ppm de görülmüştür [231]. Laboratuvar ölçekli biyoreaktörde ve orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde, rekombinat ve doğal fenotip *B. megaterium* suşlarından elde edilen PHA biyopolimerleri ¹H-NMR analizine göre kısa zincir uzunluklu PHA polimerleri olup PHB-co-PHV kopolimerleri yapısındadır (Şekil 4.20). Elde edilen PHB-co-PHV kopolimerlerinin % HV ve % HB içeriği, eşitlik 4.1 ve 4.2 ile bulunmuştur (Çizelge 4.10) [239].

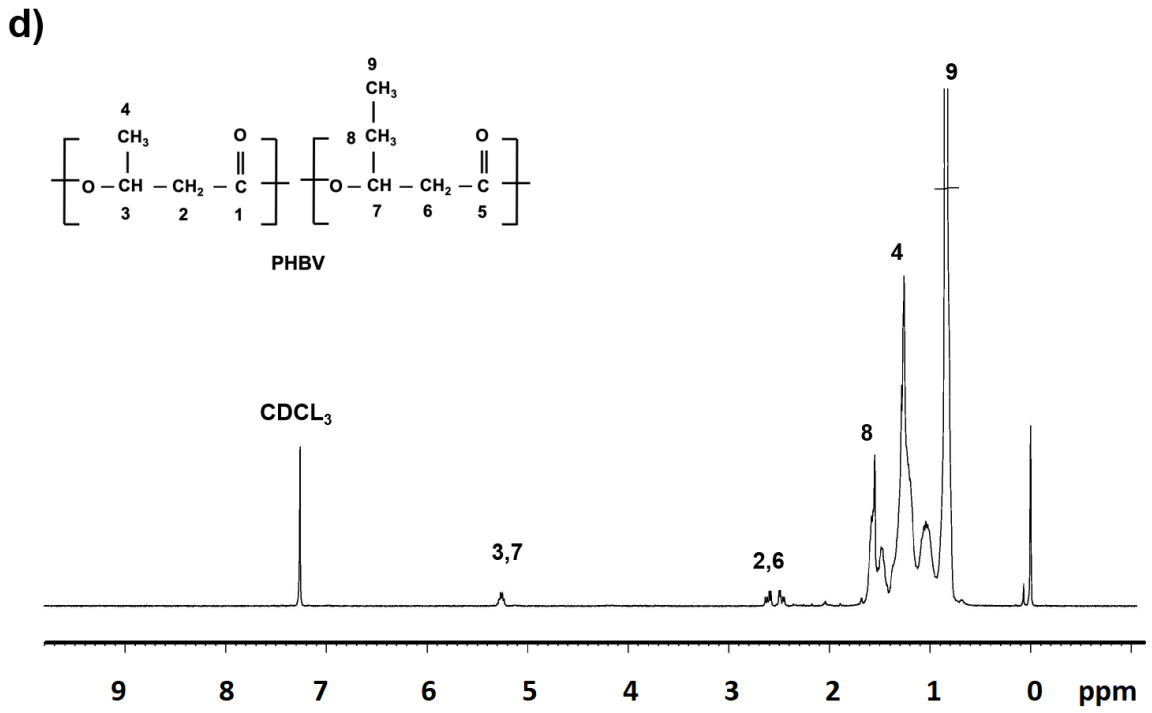
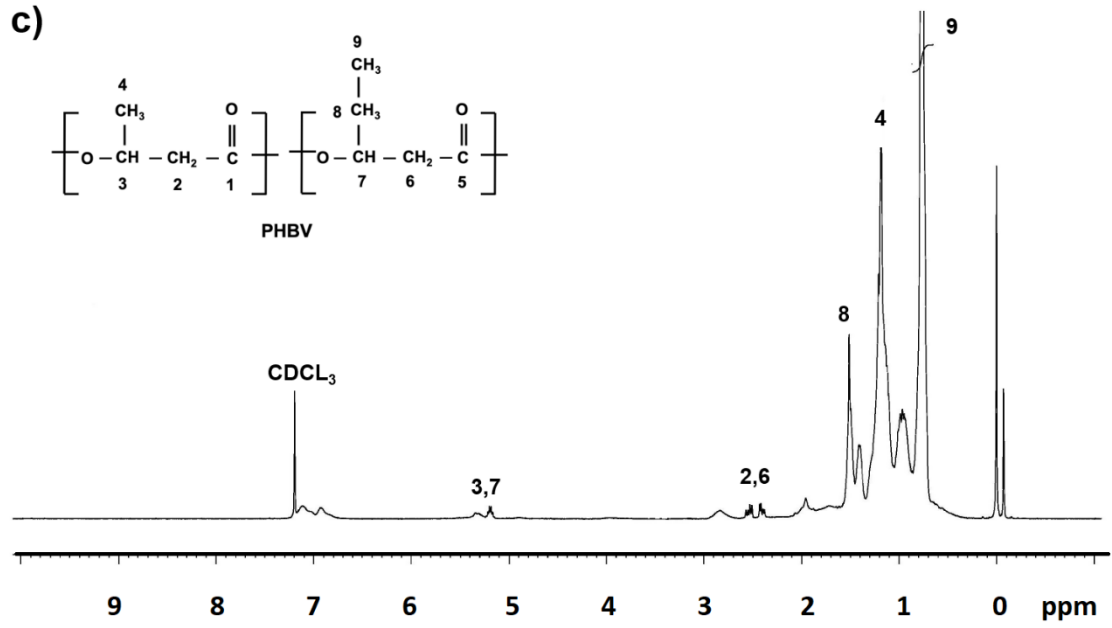
$$\%HV = \frac{\text{CH}_3(\text{HV})\text{pik alanı}}{\text{CH}_3(\text{HV})\text{pik alanı} + \text{CH}_3(\text{HB})\text{pik alanı}} * 100 \quad (4.1)$$

$$\%HB = \frac{\text{CH}_3(\text{HB})\text{pik alanı}}{\text{CH}_3(\text{HB})\text{pik alanı} + \text{CH}_3(\text{HV})\text{pik alanı}} * 100 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.10. Biyoreaktörde üretilen PHA'ların PHB-co-PHV içeriği

Kaynak	Biyopolimer	3HB %	3HV %
B-w.t	PHB-co-HV	57,3	42,6
O-w.t	PHB-co-HV	52,2	47,8
B-rec	PHB-co-HV	42,6	57,3
O-rec	PHB-co-HV	42,3	57,6
Ticari PHB	PHB	98	2





Şekil 4.20. Doğal fenotip (-w.t) ve rekombinant (-rec) *B. megaterium* NRRL B-14308 suşlarından orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde (O-) ve laboratuvar ölçekli biyoreaktörde (B-) ve elde edilen PHA polimerlerinin ¹H-NMR spektrumu a) B-w.t b) B-rec c) O-w.t d) O-rec.

Elde edilen sonuçlara göre, doğal fenotip *B. megaterium* hücreleri ile 3HB yönünden zengin PHB-co-PHV kopolimerleri üretilirken; rekombinant *B. megaterium* bakteriyel hücrelerinden ise 3HV yönünden zengin PHB-co-PHV kopolimerleri üretilmiştir. Kopolimer yapısında 3HV içeriği arttıkça, biyopolimerin erime sıcaklığı azalmakta ve elastikiyeti artmaktadır. Ticari PHB'nin ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde ise %98 HB, %2 HV yapısında olduğu belirlenmiştir.

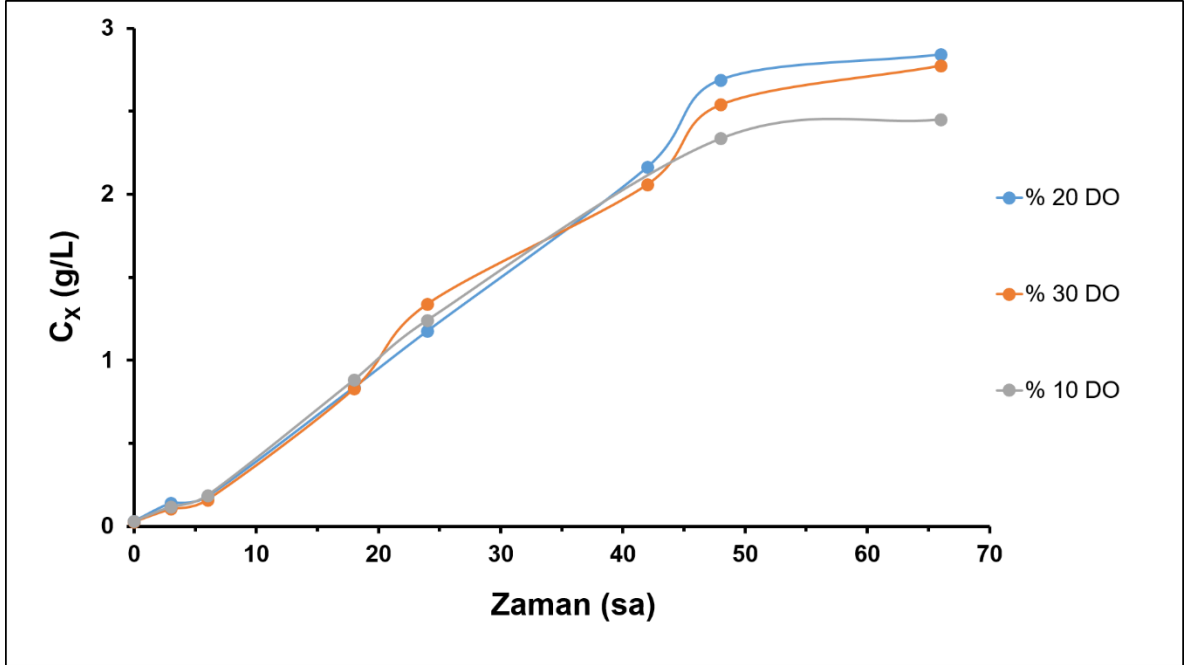
4.10. Biyoreaktörde çözülmüş oksijen derişiminin (%DO) PHA üretimine etkisi

Hücreler, solunum ve diğer yaşamsal faaliyetleri için oksijene ihtiyaç duymaktadır ve çözülmüş oksijen (DO) derişimi, biyoreaktörlerde aerobik prosesler için en önemli parametrelerden birisidir. Bakteriler için kritik oksijen değeri DO=%10-50 seviyesindedir [240]. *B. megaterium* mikroorganizmasından PHA üretimini arttıracak çalışmalardan birisi de biyoreaktör çalışma koşullarının optimizasyonudur. Oksijen transfer hızının belirlenmesi, PHA üretimi optimizasyonu çalışmalarında oldukça önemlidir; çünkü oksijenin sınırlı tutulduğu ortamlar hücrede PHA üretimini artırıcı bir etki göstermektedir [225]. Bu çalışmada da 3 farklı %DO seviyesinde doğal fenotip *B. megaterium* mikroorganizmasından laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretimi gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörde inkübasyon süresince %DO seviyesinin hücre çoğalmasına, PHA üretime ve PHA üretim kinetiğine etkisi incelenmiştir.

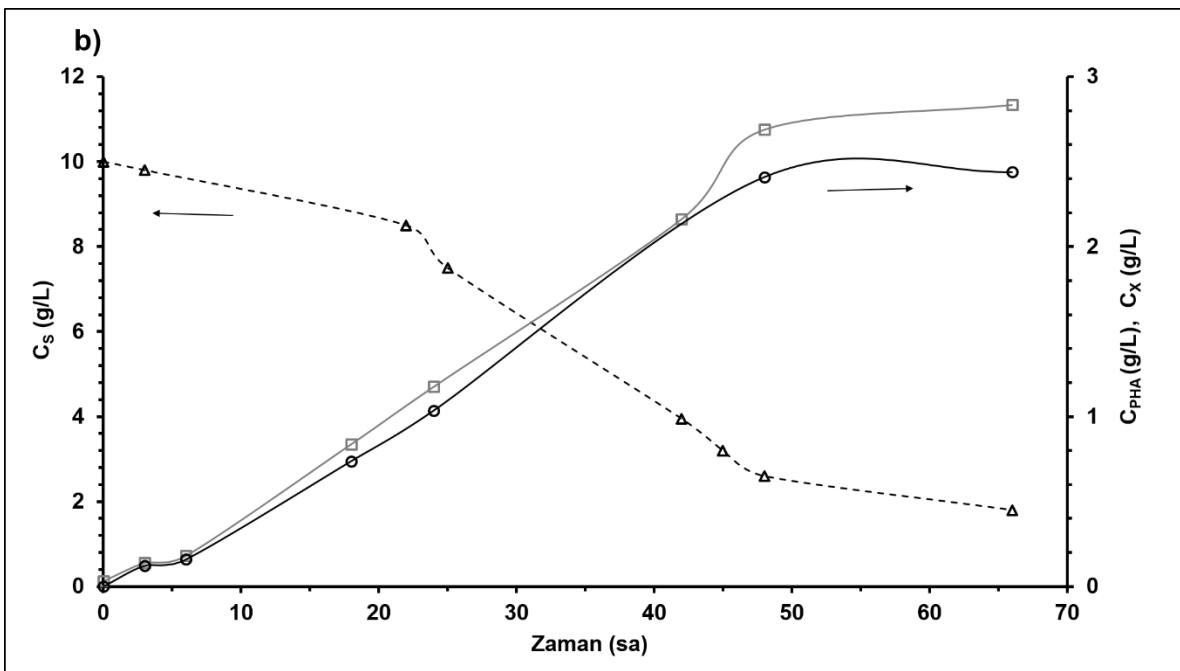
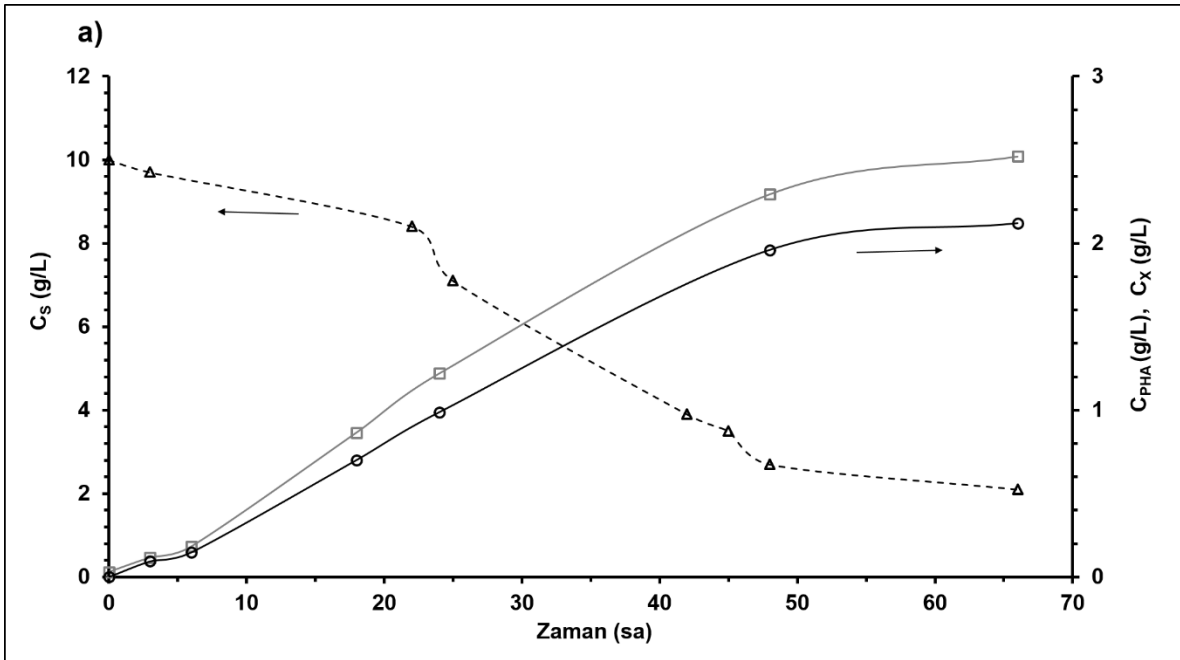
Hücre çoğalması, belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak UV-Vis spektrofotometrede incelenmiştir (Şekil 4.21). İlk 24 saatte hücre çoğalmasının her üç %DO değeri için benzer düzeylerde olduğu, hücre içinde PHA birikiminin artış gösterdiği saatlerde (24 saat sonrası) ise düşük %DO değerlerinde hücre çoğalmasının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Doğal fenotip *B. megaterium* bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktörde farklı %DO değerlerinde PHA üretimi çalışmalarında elde edilen kinetik parametreler Çizelge 4.11'de, zamana bağlı glikoz tüketimi, hücre çoğalması ve PHA birikimi Şekil 4.22'de verilmiştir.

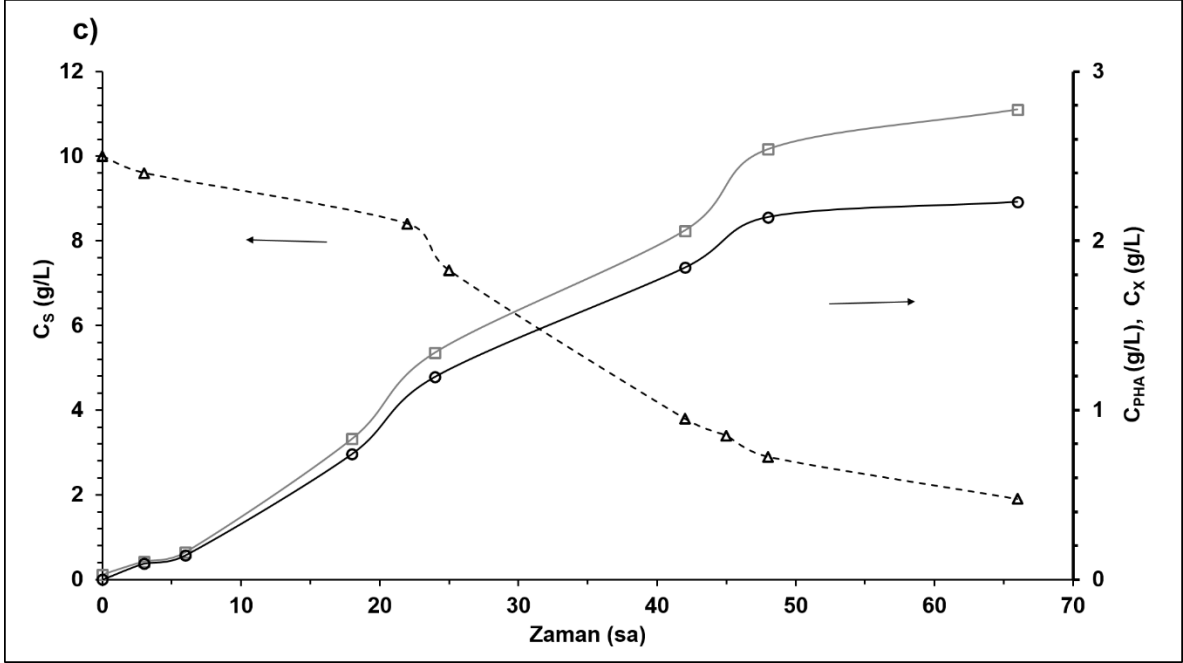
Çizelge 4.11. Farklı %DO değerlerinde doğal fenotip *B. megaterium* bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretimi kinetik parametreleri

% DO	μ (sa ⁻¹)	Hücre kuru ağırlığı (g L ⁻¹)	PHA derişimi (g L ⁻¹)	PHA (%)	q (g L ⁻¹ sa ⁻¹)	Y _{P/S}	Y _{X/S}
10	0,282	2,54	2,12	82,9	0,598	0,25	0,30
20	0,292	2,84	2,44	86,1	0,712	0,32	0,36
30	0,289	2,78	2,23	80,3	0,644	0,28	0,32



Şekil 4.21. Farklı %DO değerlerinde doğal fenotip *B. megaterium* bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktörde inkübasyon süresince zamana bağlı hücre derişimi değerleri



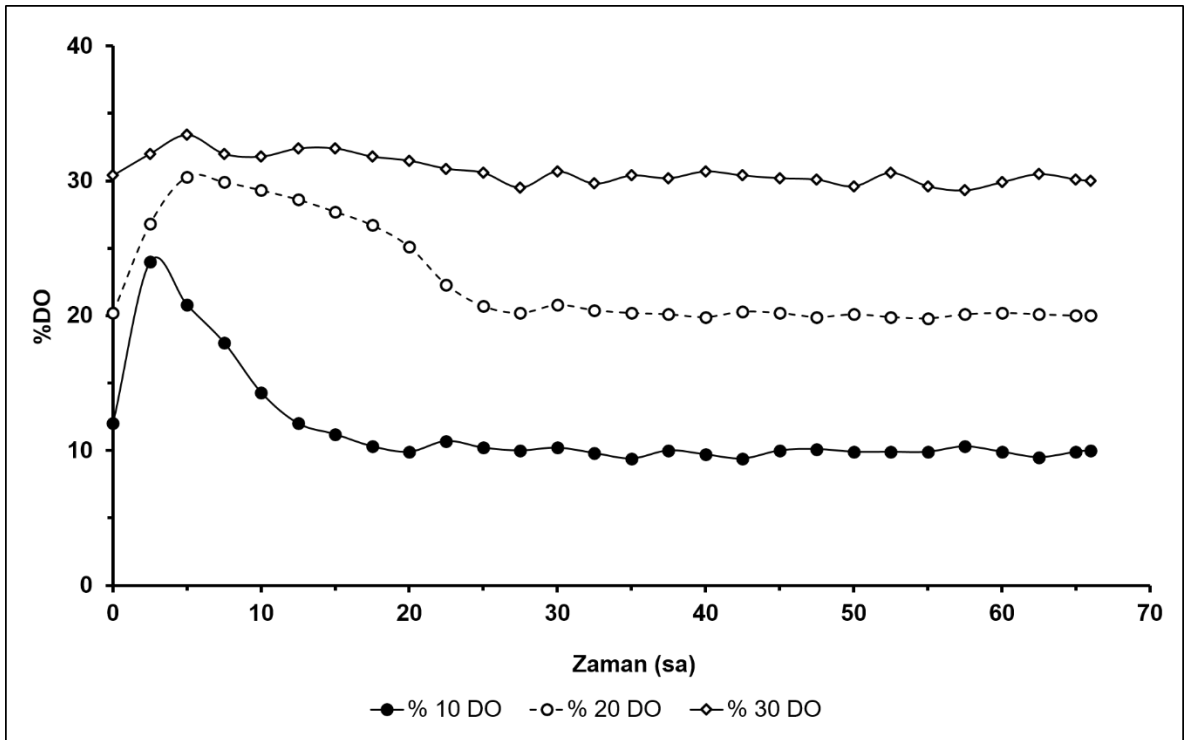


Şekil 4.22. Farklı %DO değerlerinde doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretiminde zamana bağlı glikoz tüketimi (C_s , kesikli çizgi), hücre çoğalması (C_x , gri çizgi) ve PHA birikimi (koyu çizgi). a) %10 DO b) %20 DO c) %30 DO.

Farklı %DO değerlerinde laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretiminin yaklaşık 66 sa inkübasyon sonucunda yatışkın duruma geldiği, minimal besi ortamındaki glikoz derişiminin PHA üretimi için besi ortamındaki sınırlayıcı bir bileşen olmadığı, ayrıca hücre çoğalmasının PHA birikimi ile paralellik gösterdiği, böylelikle PHA üretiminin hücre çoğalması ile ilişkili olduğu (growth-associated) belirlenmiştir (Şekil 4.22).

Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinden farklı %DO değerlerinde laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretim deneyi çalışmalarında literatür taraması sonucunda belirlenen diğer biyoreaktör işletim parametreleri (37°C, 300 devir/dk ve pH 7.0) sabit tutularak değişen %DO değerlerinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla biyoreaktörde inkübasyon süresince %DO değişimleri

sürekli kaydedilmiştir (Şekil 4.23). Üretim boyunca pH=7.0 değerinde tutabilmek için 1 M HCl ve 1 M NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Çözünmüş oksijen derişimini verilen set değerinde (%10, %20 ve %30) tutabilmek için de besi ortamına belirli zamanlarda kontrol sistemi tarafından hava veya oksijen, PID kontrol parametrelerine göre otomatik olarak ilave edilmiştir. Böylece kontrollü ortamda hücre çoğalması ve PHA birikimi; kontrolsüz ortam olan orbital çalkalamalı biyoreaktörlere göre %40-80 daha fazla hücre çoğalması ve yaklaşık %50 daha fazla PHA birikimi elde edilmiştir.



Şekil 4.23. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretimi süresince %DO profilleri

4.11. Biyoreaktörde farklı %DO değerlerinde oksijen transfer parametrelerinin belirlenmesi

Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 suşu ile laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretimi çalışmalarında, farklı %DO değerleri için oksijen transfer parametreleri belirlenmiştir. Bu amaçla belirli zaman aralıklarında dinamik yöntem ile volumetrik oksijen kütle transfer katsayısı (k_{La}), oksijen transfer hızı, oksijen alım hızı gibi parametreler belirlenmiştir. İlk olarak; PHA üretim ortamına mikroorganizma aşılardan önce fiziksel oksijen kütle transfer katsayısı (k_{La0}) ölçülmüştür. *B. megaterium* NRRL B-14308 mikroorganizmasından laboratuvar ölçekli biyoreaktörde farklı %DO değerlerinde PHA üretimi süresince belirli zaman aralıklarında elde edilen k_{La} , oksijen transfer hızı (OTH), oksijen alım hızı (OAH) ve gelişme faktörü ($E=k_{La}/k_{La0}$) değişimleri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi üç farklı %DO değerlerinde k_{La} , inkübasyon süresince azalmıştır. Ayrıca, E değerinin her zaman 1,0'den büyük olduğu belirlenmiştir.

Biyoreaktörlerde k_{La} değeri; sıcaklık, karıştırma hızı, üretim ortamı, gaz akış hızı, köpük oluşumu, köpük giderici, viskozite ve mikroorganizma morfolojisi gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir. Bu çalışmada, sıcaklık, karıştırma hızı, gaz akış hızı sabit tutulmuş, köpük giderici kullanılmamıştır. Bu durumda k_{La} değerindeki düşüşün nedeni, üretim süresince oluşan metabolitler nedeniyle ortam viskozitesindeki artış olarak düşünülmüştür. Çünkü artan ortam viskozitesi, hücrelerin yüzeyinde difüzyon bariyeri gibi görev yapan katman oluşturmuş, böylece oksijenin hücreye aktarılması zaman geçtikçe zorlaşmıştır [241-243].

PHA üretiminde ilk 24 saatte oksijen alım hızı, hücrelerin oksijen ihtiyacı nedeniyle ortamda oksijen birikmemesinden dolayı, neredeyse oksijen transfer hızına eşit olmuştur. İlk 4 saatten sonra ($t=18$ sa) hücre çoğalması logaritmik fazda olduğundan oksijen alım hızı, hücre çoğalma hızı ve fermantasyon ortamındaki substrat tüketim hızı artışına bağlı olarak artış eğilimindedir. %DO değerlerine göre kıyasladığımızda, %DO değeri arttıkça, k_{La} , oksijen transfer hızı ve oksijen alım hızının arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.12. Farklı %DO değerlerinde zamana bağlı oksijen transfer parametreleri

Zaman (sa)	k _{la} (s ⁻¹)	E (k _{La} /k _{La0})	OTH*10 ³ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	OTH _{max} *10 ³ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	OAH*10 ³ (mol m ⁻³ s ⁻¹)
%10 DO					
0	0,009	1,11	-	-	-
2	0,024	3,0	1,3	2,4	1,3
4	0,024	3,0	1,8	2,4	1,8
18	0,021	2,63	2,1	2,1	2,1
24	0,018	2,13	1,8	1,8	1,8
%20 DO					
0	0,009	1,0	-	-	-
2	0,027	3,0	3,4	5,4	3,4
4	0,026	2,89	4,2	5,2	4,2
18	0,024	2,67	4,8	4,8	4,8
24	0,020	2,22	4,0	4,0	4,0
%30 DO					
0	0,010	1,11	-	-	-
2	0,031	3,44	5,4	9,3	5,4
4	0,029	3,22	6,7	8,7	6,7
18	0,026	2,88	7,8	7,8	7,8
24	0,021	2,33	6,3	6,3	6,3

4.12. Doğal fenotip *B. megaterium* ve rekombinant *B. megaterium* suşları ile yarı kesikli biyoreaktörde PHA üretimi

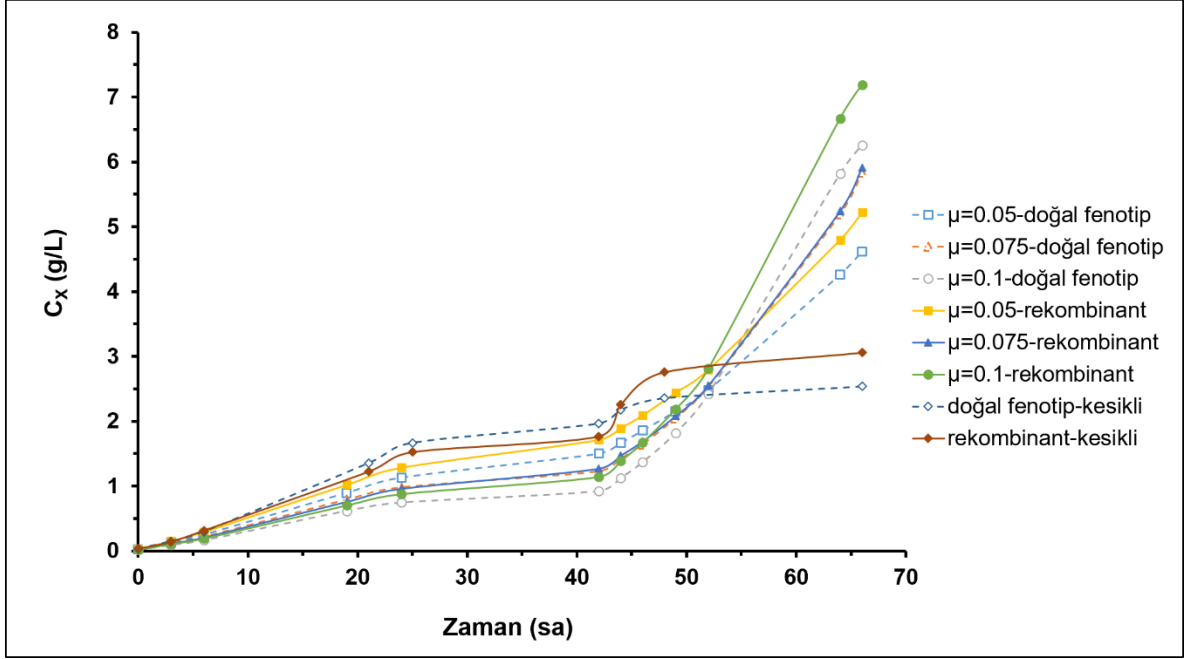
PHA üretimi için en uygun minimal besi ortamı ve C/N molar derişim oranı belirlendikten sonra, doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşları kullanılarak, laboratuvar ölçekli biyoreaktörde yarı kesikli besleme koşullarında inkübasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Yarı kesikli besleme sistemleri, yüksek hücre yoğunluğuna sahip kültürleri elde etmenin en etkili yollarından biri olup, aynı zamanda yüzdesel PHA verimi ile birlikte hacimsel verimliliği de maksimize etmeyi amaçlamaktadır [244]. Bu tip sistemlerde

besleme, genellikle derişimi kontrol edilen substratın doğrudan ölçülmesine dayanmaktadır. Fakat temel substratların otomatik analizi önemli bir zaman kaybı yaratmakta, maliyeti arttırmakta ve özel analitik cihazlar gerektirmektedir. Bu nedenle, yarı kesikli sistemlerde substrat beslemesi genellikle mikroorganizmanın önceden belirlenmiş çoğalma hızına göre gerçekleştirilmektedir. Bu yaklaşımda, maksimum spesifik çoğalma hızına (μ_{max}) yakın bir çoğalma hızı elde etmek için önceden belirlenmiş üstel besleme hızı yarı kesikli sistemlerde ve PHA üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır [245].

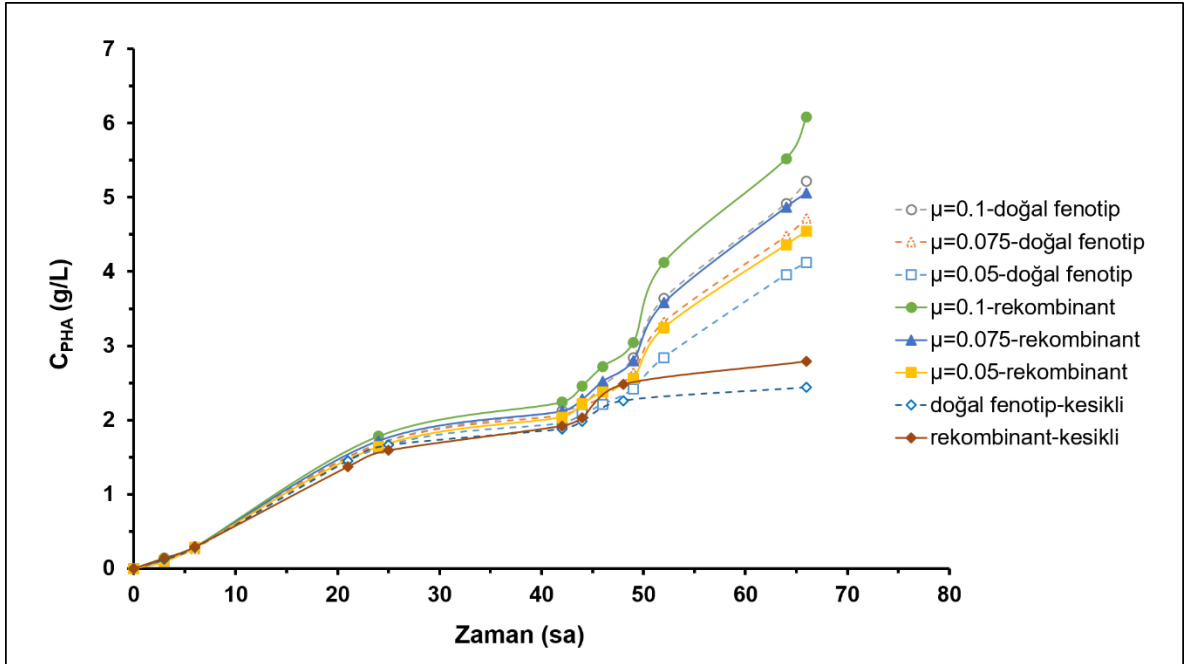
İlk olarak, laboratuvar ölçekli biyoreaktörde, doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 suşu ile, t=42 sa'dan sonra yarı kesikli besleme koşullarında PHA inkübasyonu gerçekleşmiş olup; 3 farklı üstel çoğalma hızında ($\mu=0,05$; $\mu=0,075$ ve $\mu=0,1$ sa⁻¹), eşitlik 2.15'e göre besleme süresince substrat besleme hızları belirlenmiştir.

Kesikli sistemde çalıştırılan ilk 42 saatte hücre çoğalmasının her üç durum için de benzer düzeylerde olduğu, yarı kesikli sisteme geçilerek önceden belirlenmiş üstel çoğalma hızlarında (42-66 sa) ise beklenildiği gibi besleme hızı arttıkça, hücre çoğalmasının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, üstel çoğalma hızı arttıkça, biyoreaktöre beslenen substrat besleme hızı da artmaktadır. Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşları ile yarı kesikli besleme koşullarında PHA inkübasyonu süresince belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak hücre derişimleri incelenmiştir (Şekil 4.24). Aktarılan PHA sentaz geni sayesinde rekombinant mikroorganizmalar, doğal fenotip hücrelere göre yarı kesikli sistemlerde 3 farklı üstel besleme hızlarında yaklaşık %12,5 daha yüksek bir hücre derişimine sahip olduğu belirlenmiştir. Daha yüksek bir hücre derişimi elde edildiğinden üstel çoğalma hızı arttıkça, paralel olarak biyoreaktöre beslenen substrat besleme hızı da artmıştır.



Şekil 4.24. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda, PHA üretimi süresince hücre derişimi değerleri

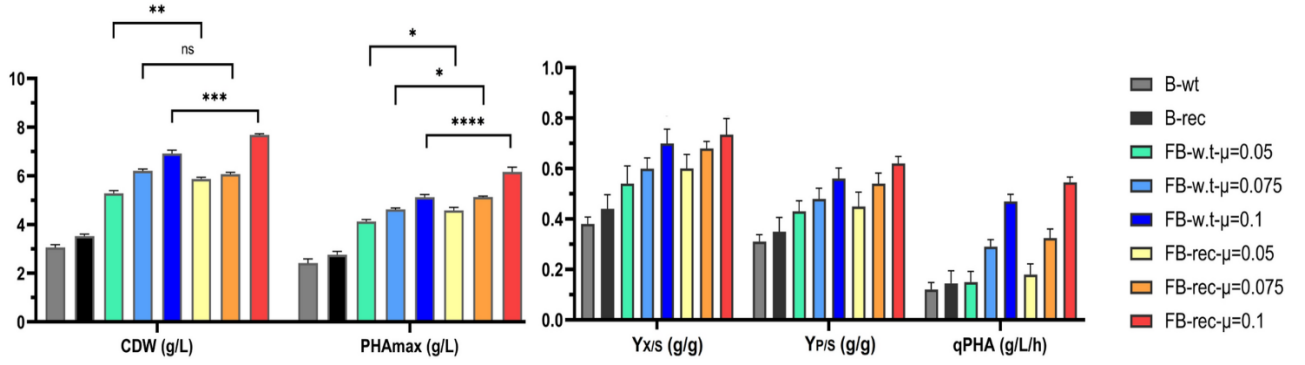
Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin yarı kesikli biyoreaktörde üç farklı üstel besleme hızındaki PHA üretimi çalışmalarında inkübasyon süresince belirli zamanlarda örnekler alınarak hücrelerin PHA birikimleri incelenmiştir (Şekil 4.25). Hücre çoğalması profilleri ile PHA üretim profilleri kesikli fazda birbirlerine paralellik gösterirken, üstel glikoz beslemesi ve azot sınırlandırılmasının sonucu olarak hücre içi PHA birikiminin artması ve biyokütle oluşumunun azalması nedeniyle yarı kesikli besleme fazında fermantasyon profillerinin birbirinden ayrıldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.25. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda PHA birikimi

Yarı kesikli besleme koşullarında rekombinant *B. megaterium* suşunda PHA derişiminin fermentasyon sonunda $6,15 \text{ g L}^{-1}$ seviyelerine ulaştığı belirlenmiştir. Rekombinant *B. megaterium* suşunda daha yüksek spesifik çoğalma hızında ($\mu=0,1 \text{ sa}^{-1}$) gözlenen yüksek PHA birikimi, çoğalma ortamındaki sınırlı azot derişimi ve üstel glikoz beslemesi nedeniyle elde edilmiştir.

Yarı kesikli biyoreaktörde üç farklı üstel besleme hızındaki PHA üretimi çalışmalarında elde edilen kinetik ve stokiyometrik parametreler Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Üstel yarı kesikli besleme stratejisi ile kesikli sisteme göre 2,2 kat daha fazla PHA üretilmiştir. Rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde $\mu=0,1 \text{ sa}^{-1}$ üstel spesifik çoğalma hızında en yüksek nihai hücre derişimi ($7,7 \text{ g L}^{-1}$), hücrelerin PHA içeriği (%80), hacimsel PHA verimliliği ($0,54 \text{ g L}^{-1} \text{ sa}^{-1}$), hücre ve ürün verimi ($0,74 \text{ g g}^{-1}$ ve $0,62 \text{ g g}^{-1}$) elde edilmiştir. Bu sonuç, gerçekleştirilen genetik modifikasyonun PHA biyosentezini pozitif yönde etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.26. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücreleriyle laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda elde edilen kinetik ve stokiyometrik parametreler.

Rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 bakteriyel hücrelerinin, doğal fenotip bakteriyel hücrelere göre daha yüksek kuru hücre ağırlığı, PHA birikim miktarı, hacimsel verimlilik değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hücre başına PHA miktarı ve %PHA içeriği, literatürdeki birçok çalışma ile benzer değerlerde olduğu görülmüştür [246-249].

4.13. Doğal fenotip *B. megaterium* ve rekombinant *B. megaterium* suşları ile yarı kesikli biyoreaktörde PHA üretiminde oksijen transfer parametrelerinin belirlenmesi

Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* bakteriyel hücrelerinden yarı kesikli biyoreaktörde PHA üretimi çalışmalarında, oksijen transfer parametreleri belirlenmiştir. Bu amaçla belirli zaman aralıklarında dinamik yöntem ile k_{La} , OTH ve OAH gibi parametreler belirlenmiştir. Elde edilen oksijen transfer parametreleri Çizelge 4.13'de verilmiş; k_{La} değerleri ilk önce artmış, sonra azalmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi bu çalışmada sıcaklık, karıştırma hızı, gaz akış hızı sabit tutulup, köpük giderici kullanılmadığından, üretim süresince oluşan metabolitler nedeniyle ortam viskozitesindeki artışın k_{La} değerindeki düşüşün nedeni olduğu düşünülmüştür.

Oksijen alım hızı (OAH), fermentasyon süreçlerindeki en temel parametrelerden biri olup hücrelerin metabolik aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Oksijen alım hızı ilk saatlerde üstel çoğalma aşamasında yüksek substrat tüketimi nedeniyle artmaktadır. Hücre canlılığı için yüksek spesifik oksijen ihtiyacı nedeniyle oksijen alım hızı fermentasyonun 18. saatinde maksimum değerine ulaşmıştır. Üstel çoğalma aşamasından sonra, hücrelerin metabolik aktivitesinin azalmasıyla oksijen alım hızı da azalmıştır [250].

Fermentasyon süreçlerinde OTH, k_{La} ve mikroorganizmanın oksijen tüketimine bağlı olarak değişmektedir. OTH, PHA biyosentezi için kritik bir faktördür; çünkü oksijen kısıtlaması altında oksijen transfer hızı, oksijen alım hızına eşittir. Böylece, hücresel solunumdaki varyasyon, PHA biyosentezi ve regülasyonunda önemli bir kofaktör olan NADPH/NADP⁺ oranını arttırmaktadır [251].

Çizelge 4.13. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşlarının laboratuvar ölçekli biyoreaktördeki 3 farklı yarı kesikli besleme koşulunda zamana bağlı oksijen transfer parametreleri

Yarı Kesikli Besleme	t (sa)	k_{La} (s ⁻¹)	E (k_{La}/k_{La0})	OTH*10 ³ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	OTH _{max} *10 ³ (mol m ⁻³ s ⁻¹)	OAH*10 ³ (mol m ⁻³ s ⁻¹)
Doğal fenotip <i>B. megaterium</i>						
$\mu_0=0,05 \text{ sa}^{-1}$	0	0,009	1,0	-	-	-
	2	0,027	3,0	3,40	5,40	3,40
	4	0,026	2,89	4,20	5,20	4,20
	18	0,024	2,67	4,80	4,80	4,80
	24	0,024	2,67	4,60	4,70	4,60
	42	0,021	2,33	4,20	4,20	4,20
	49	0,020	2,22	4,00	4,00	4,00
$\mu_0=0,075 \text{ sa}^{-1}$	0	0,010	1,11	-	-	-
	2	0,031	3,44	4,30	6,30	4,30
	4	0,029	3,22	5,20	6,00	5,20
	18	0,026	2,88	5,80	5,80	5,80
	24	0,025	2,77	5,40	5,40	5,40
	42	0,023	2,56	4,80	4,90	4,80
	49	0,021	2,33	4,50	4,50	4,50

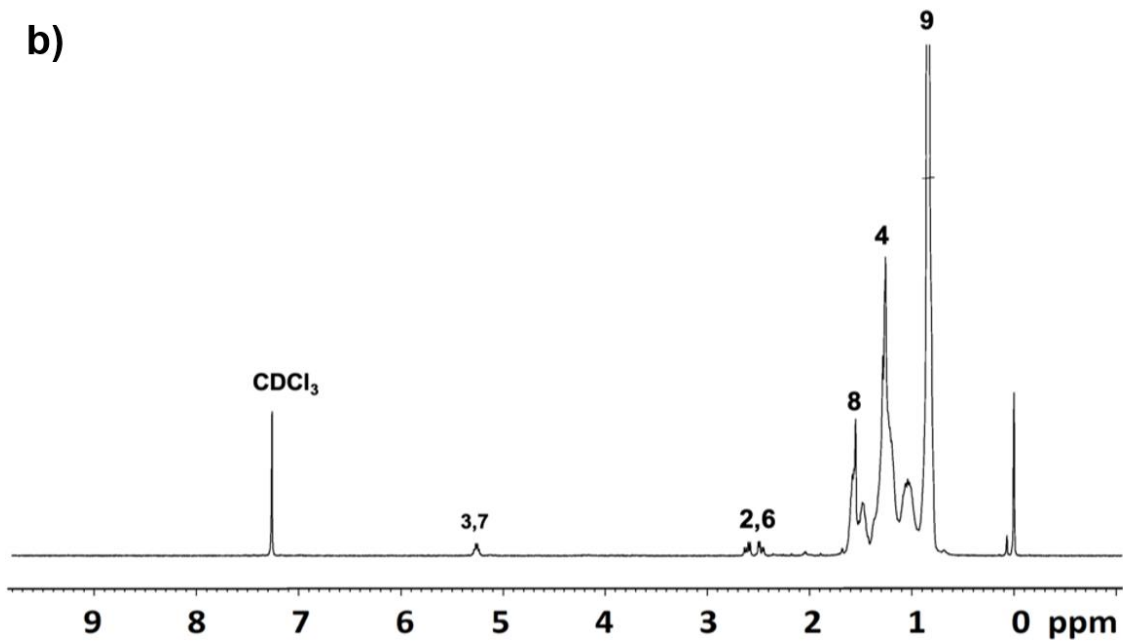
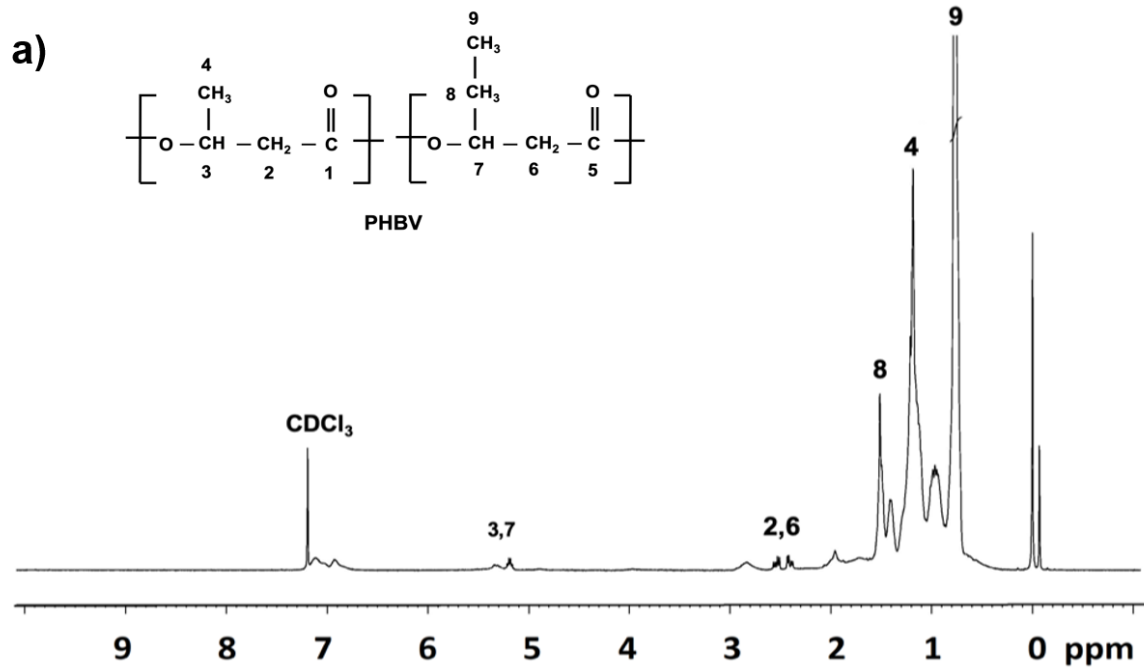
$\mu_0=0,1 \text{ sa}^{-1}$	0	0,010	1,0	-	-	-
	2	0,036	3,60	5,40	8,80	5,40
	4	0,032	3,20	6,70	8,10	6,70
	18	0,027	2,70	7,80	7,80	7,80
	24	0,027	2,70	7,20	7,20	7,20
	42	0,024	2,40	6,50	6,60	6,50
	49	0,021	2,10	5,90	5,90	5,90
Rekombinant <i>B. megaterium</i>						
$\mu_0=0,05 \text{ sa}^{-1}$	0	0,010	1,00	-	-	-
	2	0,030	3,00	3,80	6,20	3,80
	4	0,027	2,70	4,40	5,60	4,40
	18	0,026	2,60	4,90	4,90	4,90
	24	0,026	2,60	4,60	4,60	4,60
	42	0,023	2,30	4,20	4,20	4,20
	49	0,021	2,10	3,90	3,90	3,90
$\mu_0=0,075 \text{ sa}^{-1}$	0	0,011	1,10	-	-	-
	2	0,036	3,60	4,56	6,70	4,56
	4	0,030	3,00	5,40	6,20	5,40
	18	0,027	2,70	6,08	6,0	6,10
	24	0,025	2,50	5,75	5,80	5,75
	42	0,022	2,20	5,20	5,20	5,20
	49	0,020	2,00	4,80	4,80	4,80
$\mu_0=0,1 \text{ sa}^{-1}$	0	0,011	1,00	-	-	-
	2	0,039	3,54	5,90	9,54	5,90
	4	0,034	3,09	7,10	8,70	7,10
	18	0,029	2,64	8,30	8,30	8,30
	24	0,027	2,45	7,70	7,72	7,70
	42	0,024	2,18	6,54	6,54	6,54
	49	0,020	1,82	5,90	5,90	5,90

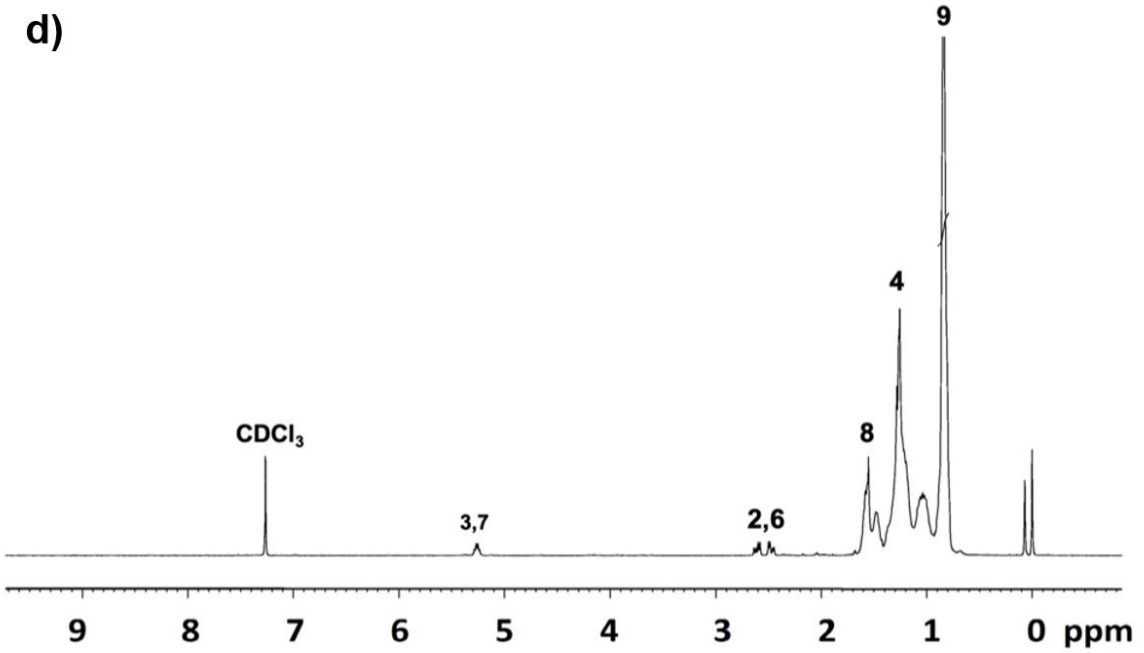
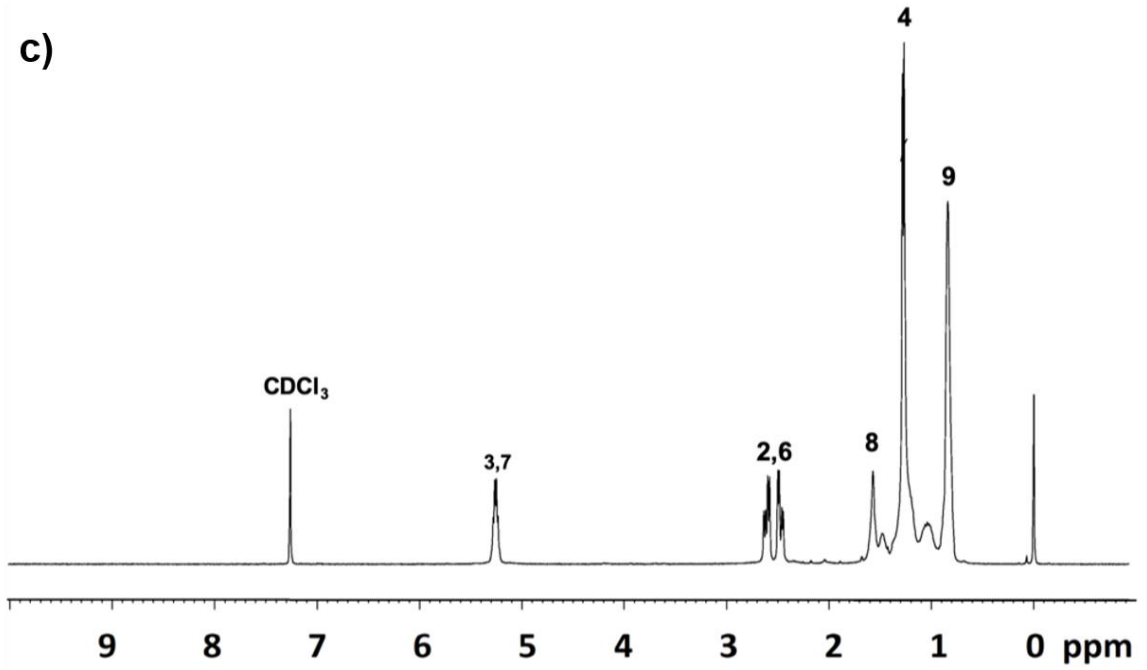
Ayrıca, rekombinant hücrelerde doğal fenotip hücrelere göre daha yüksek k_{LA} , OTH ve OAH değerleri elde edilmiştir. Bu durum rekombinant hücrelerin özellikle biyopolimer sentezinde daha yüksek bir metabolik aktiviteye sahip olmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, Çizelge 4.13'de görüldüğü gibi artan glikoz besleme hızları ile hücrelerin artan oksijen ihtiyaçları nedeniyle oksijen transfer parametrelerinde daha yüksek değerlere ulaşılmıştır.

4.14. Doğal fenotip *B. megaterium* ve rekombinant *B. megaterium* suşları ile yarı kesikli biyoreaktörde üretilen PHA karakterizasyonu

Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşlarından laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde kesikli ve yarı kesikli fermentasyonlarla elde edilen PHA biyopolimerlerinin yapısal özellikleri ¹H-NMR analiziyle belirlenmiştir (Şekil 4.27). ¹H-NMR analizine göre, rekombinant ve doğal fenotip *B. megaterium* suşlarından kesikli ve yarı kesikli biyoreaktörlerde elde edilen PHA biyopolimerleri kısa zincir uzunluklu PHA polimerleri olup, PHB-co-PHV kopolimerleri yapısındadır. Eşitlik 4.1 ve 4.2'de verilen denklemlere göre elde edilen PHB-co-PHV kopolimerlerinin mol bazında %58 3HV monomer birimlerinden oluştuğu belirlenmiştir. PHB-co-PHV kopolimerlerindeki 3HV içeriği endüstriyel uygulamalar için oldukça önemli olup, mol bazında %20'den fazla 3HV monomeri içeren PHB-co-PHV kopolimerleri, film ve fiber üretimi için uygun darbe dayanımı ve polimer esnekliği gibi üstün malzeme özellikleri sergilemektedir [227, 252]. Ayrıca, propionik asit, valerik asit, valerat gibi öncül substratlar kullanmadan *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan karbon kaynağı olarak sadece glikoz kullanarak *Bacillus* suşları arasında en yüksek 3HV içeriğine sahip PHB-co-PHV kopolimerleri elde edilmiştir.

PhaC gen overekspresyonu ile elde edilen rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde 3HV içeriğinin artışına ilişkin metabolik yolak üzerinde net bir kanıt bulunamamıştır. Ancak rekombinant hücrelerde artan hücre çoğalmasıyla birlikte organik asitlerin sindirilmesi sonucu 3HV üretimi için öncül metabolitler olarak kullanılan yağ asitlerinin salınması ile açıklanabilmektedir. Ayrıca, rekombinant hücrelerden elde edilen PHB-co-PHV kopolimerlerindeki 3HV içeriğinde gözlemlenen artış, *phaC* gen overekspresyonu ile daha yüksek bir PHA sentaz aktivitesinden kaynaklandığı da düşünülmektedir. Kısaca, rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde daha yüksek *PhaC* aktivitesi ortamdaki daha kısa C4 ara maddelerine göre daha fazla C5 ara maddelerini polimerleştirerek doğal fenotip suştan daha fazla 3HV içeriğine sahip PHB-co-PHV kopolimerlerini oluşturmuştur [253, 254].





Şekil 4.27. Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşlarından laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde kesikli (B) ve yarı kesikli (FB) fermentasyonlarla elde edilen PHA polimerlerinin ¹H-NMR spektrumu a) PHA-B-wt b) PHA-B-rec c) PHA-FB-wt d) PHA-FB-rec.

Ayrıca, saflaştırılan PHA biyopolimerlerinin termal özellikleri TGA ve DSC analizleri ile incelenmiştir (Çizelge 4.14). Elde edilen PHA polimerlerinin literatürdeki önceki çalışmalarla [255, 256] uyumlu şekilde iki ana degradasyon sıcaklığına (260°C ve 455°C) sahip olduğu belirlenmiştir. 3HV gibi farklı monomere sahip kopolimer yapısında üretilen PHA polimerlerinde iki aşamalı bozunma sıcaklıkları görülmektedir. Birinci aşama bozunma, çarpaz bağlı polimer zincirinin ayrışması, ikinci aşama bozunma ise PHB-co-PHV kopolimer zincirinin ana bloğunun ayrışmasından kaynaklanmıştır [257].

PHB-co-PHV kopolimerlerinin erime sıcaklıkları DSC analizi ile belirlenmiştir. DSC analizi ile PHB-co-PHV kopolimerlerinin iki erime sıcaklığına sahip olduğu görülmüştür. Bu iki değerin de, erime sıcaklığı yaklaşık 170°C olan ticari PHB'den düşük olduğu belirlenmiştir. PHB-co-PHV kopolimer zincirindeki 3HV içeriği arttıkça, polimerin erime sıcaklığı azalmakta, böylece elde edilen polimerin darbe dayanımı ve esnekliği artarak endüstride daha geniş uygulamalarda kullanılabilir. PHB-co-PHV kopolimerlerinde iki erime sıcaklığının oluşması, PHB-co-PHV kopolimerlerinin “erime-yeniden kristalleşme-yeniden erime” süreçleri ile açıklanabilir [258].

Çizelge 4.14. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 ve rekombinant *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan laboratuvar ölçekli biyoreaktörlerde kesikli ve yarı kesikli fermentasyonlarla elde edilen PHA polimerlerinin termal özellikleri

Polimer	T _{d1} (°C)	T _{d2} (°C)	T _{m1} (°C)	T _{m2} (°C)
PHA-FB-wt	274	452	124	156
PHA-B-wt	266	449	129	163
PHA-FB-rec	279	455	122	152
PHA-B-rec	261	441	126	159
Ticari PHB	287	-	-	170

4.15. *B. megaterium* genom ölçekli metabolik model rekonstrüksiyonu ve akı denge analizi (FBA)

B. megaterium NRRL B-14308 suşu için geliştirilmiş yeni bir metabolik model oluşturabilmek için, *iJA1121* modeli [212] temel alınmış olup, *iBM1128* metabolik modeli 1128 gen, 1355 metabolit ve 1716 reaksiyondan oluşacak şekilde geliştirilmiştir. *iJA1121* metabolik modeli ise 1121 gen, 1349 metabolit ve 1709 reaksiyondan oluşmaktadır. KEGG, MetaCyc, UniProt ve BioCyc biyokimyasal veritabanları kapsamlı ve detaylı bir şekilde taranarak, *B. megaterium*'un genomunda bulunan ancak *iJA1121* modelinde yer almayan 7 gen, 6 metabolit ve 7 reaksiyon, manuel olarak oluşturulan *iBM1128* modeline eklenmiştir. *iBM1128* metabolik modelinde eklenen yeni reaksiyonlar ve metabolitler EK-7'de verilmiştir.

Ayrıca, *iBM1128* metabolik modeli, *B. megaterium*'un çoğalmasını nicel olarak simüle etmek için kullanılmıştır. Bu kapsamda, *iBM1128* modeli COBRA Toolbox ve MATLAB R2020b ile stokiyometrik matrise dönüştürülmüştür. Akı denge analizi (FBA) algoritmasını kullanarak, lineer diferansiyel denklemlerden oluşan stokiyometrik matris Gurobi Solver 9.0 çözücüsü ile çözülmüştür.

İlk olarak, kesikli fermantasyon deneylerinde karbon kaynağı olarak 10 g L^{-1} derişiminde glikoz kullanılmıştır. Karbon kaynağı olarak sadece glikoz içeren minimal medium (MM) besi ortamındaki hücre çoğalma hızları, FBA ile tahmin edilmiş ve sonuçlar hem doğal fenotip hem de rekombinant *B. megaterium* mikroorganizmaları ile kesikli fermantasyon çalışmalarından elde edilen deneysel verilerle karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Doğal fenotip (w.t) ve rekombinant (rec) *B. megaterium* mikroorganizmalarından laboratuvar ölçekli biyoreaktörde kesikli fermantasyon (-B) çalışmalarındaki çoğalma hızlarının deneysel ve *in silico* (FBA) analiz sonuçları.

Fermantasyon	Glikoz Akısı (mmol gCDW ⁻¹ sa ⁻¹)	μ (sa ⁻¹)	
		<i>In silico</i>	Deneysel
B-w.t	7,5	0,357	0,354
B-rec	8	0,381	0,371

Çizelge 4.15'de gösterildiği gibi, akı denge analizi kullanılarak simülasyonlardan elde edilen çoğalma hızları ile deneysel sonuçlardan elde edilen çoğalma hızları birbiri ile uyumludur.

Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* hücreleri ile üç farklı üstel besleme hızında ($\mu=0,05$ sa⁻¹, $\mu=0,075$ sa⁻¹, $\mu=0,1$ sa⁻¹) gerçekleştirilen yarı kesikli beslemeli fermantasyon çalışmalarında elde edilen deneysel verilerle, FBA ile elde edilen simülasyon sonuçları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.16). FBA simülasyon sonuçlarına göre, *in silico* çoğalma hızlarının deneysel verilerle uyumlu olduğu görülmektedir. Buna göre, *B. megaterium* NRRL B-14308 suşu için oluşturulan iBM1128 metabolik modelinin hücre çoğalması simülasyonu için oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.16. Doğal fenotip (w.t) ve rekombinant (rec) *B. megaterium* mikroorganizmalarından laboratuvar ölçekli biyoreaktörde yarı kesikli fermantasyon (-FB) çalışmalarındaki çoğalma hızlarının deneysel ve *in silico* (FBA) analiz sonuçları

Fermantasyon	Glikoz Akısı (mmol gCDW ⁻¹ sa ⁻¹)	μ (sa ⁻¹)	
		<i>In silico</i>	Deneysel
FB-w.t- $\mu=0,05$	1,66	0,075	0,05
FB-w.t- $\mu=0,075$	1,74	0,083	0,075
FB-w.t- $\mu=0,1$	2,22	0,109	0,1
FB-rec- $\mu=0,05$	1,62	0,072	0,05
FB-rec- $\mu=0,075$	1,85	0,088	0,075
FB-rec- $\mu=0,1$	2,40	0,114	0,1

BM1128 modeli ile PHA üretimini optimizasyon çalışmalarında, PHA sentez reaksiyonu amaç fonksiyon olarak seçilmiştir. Ancak, model üzerinde farklı glikoz ve oksijen alım değerlerine ve PHA metabolik yolak üzerinde PHA üretime zorlayıcı değişikliklere rağmen olumlu sonuç elde edilememiştir. Bu olumsuz durumun nedeni olarak, temel alınan iJA1121 metabolik modeli çalışmasında, sekonder bir metabolit olan ve influenza A ve influenza B tedavisinde kullanılan antiviral bir ilaç olan oseltamivir sentezinin ana hammaddesi olan şikimat üretimini arttırabilmek için metabolizma üzerinde yapılmış olan değişiklikler nedeniyle akı dağılımının PHA birikimine engel olduğu düşünülmektedir.

Bu nedenle, ileriki çalışmalarda, Gen Bankasında genomu bulunan *B. megaterium* NRRL B-14308 suşunun genom sekansı temel alınarak, literatürde ve biyokimyasal veri tabanlarındaki veriler ışığında, gen-protein-reaksiyon ilişkileri teker teker ele alınıp *B. megaterium* suşları için oluşturulmuş model geliştirilecektir. Geliştirilecek yeni model stres koşullarında hücre metabolizmasında meydana gelen fizyolojik değişimleri açıklamak ve böylelikle mikroorganizmanın PHA üretim metabolizmasını açığa çıkarmada kullanılabilir.

5. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ana hatlarıyla aşağıda verilmiştir.

- *B. megaterium*'un genomunda yer alan PHA-sentaz (*phaC*) geni tasarlanan primerler yardımıyla PZR ile çoğaltılmış, agaroz jel elektroforezinden sonra UV-transilluminatörde kontrol edilip doğrulanan PZR bantları jelden kesilip saflaştırılmıştır.
- PZR ile çoğaltılan gen kaseti ve pC-HIS1623hp vektörü, tasarıma uygun olarak seçilen *SpeI* ve *SpHI-HF* restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.
- Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş vektör ve PZR ürünleri 16°C'de 16 sa ligasyon tepkimesiyle klonlanıp rekombinant plazmidler CaCl₂ transformasyonu ile *E. coli* DH5α suşuna aktarılmış ve hücreler çoğaltılmıştır.
- Çoğalan kolonilerden rekombinant plazmidler saflaştırılarak restriksiyon enzim kesimleri ile kontrol edilmiş, hem agaroz jel elektroforez görüntüsünde beklenen büyüklükte DNA ürünleri gözlenmesi hem de DNA dizi analizi ile klonlama çalışmasının başarılı olduğu belirlenmiştir.
- DNA dizini doğrulanmış rekombinant plazmidler, *B. megaterium*'a protoplast transformasyonu yöntemiyle aktarılmış ve tez çalışmalarında kullanılmak üzere çeşitli rekombinant *B. megaterium* suşları elde edilmiştir.
- Elde edilen rekombinant *B. megaterium* suşlarından PHA üretimini arttıracak en uygun klonlar seçilmiştir.
- Doğal fenotip *B. megaterium* ve *B. megaterium* NRRL B-14308-pCHIS-phaC-GGS-6His (NRRL-B-L1) suşları tanımlanmış minimal besi ortamında PHA üretim çalışmalarında kullanılacak en uygun suşlar olarak belirlenmiştir.

- SDS-PAGE ve western blot analizleri ile *phaC* geninin rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde ekspres edildiği kanıtlanmıştır.
- Rekombinant *B. megaterium* mikroorganizmalarında PHA üretimi için en uygun indükleyici derişimi %0,5 ksiloz çözeltisi olarak belirlenmiştir.
- Doğal fenotip *B. megaterium* ile orbital çalkalamalı biyoreaktörlerde üretilen ve çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılan PHA örneklerinin yapısal ve termal özellikleri Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FTIR), ¹H-NMR, GC-FID, GC-MS, TGA ve DSC analizleri ile karakterize edilmiştir.
- Karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen PHA biyopolimerlerinin kopolimer yapısında olduğu (PHB-co-PHV) ve 3-hidroksibütirat (3HB) ve 3-hidroksivalerat (3HV) monomer birimlerinden meydana geldiği belirlenmiştir.
- PHA saflaştırması sırasında çözücü işleminin etkinliğini arttırmak için liyofilizasyon, etanol/ısı işlem ve mikrodalga yardımı ile kurutma gibi çeşitli dehidrasyon tekniklerinin PHA üretimine olan etkisi incelenmiştir.
- Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* mikroorganizmaları kullanılarak laboratuvar ölçekli biyoreaktörde daha yüksek hücre yoğunluğu ve PHA ürün verimi elde edebilmek için, PHA üretim ortamının optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır.
- Minimal besi ortamındaki iz element çözeltisinde bulunan Fe⁺² derişimi 2 katına çıkarıldığında (10 g/L), 1,4 kat daha fazla PHA ürün verimi elde edilmiştir.
- PHA üretimini arttırmak için sınırlayıcı olarak azot seçilmiş ve hücre kuru ağırlığı, PHA birikim miktarı ile hacimsel verimlilik açısından en uygun C/N=20 molar derişimi belirlenmiştir.

- Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* mikroorganizmaları ile laboratuvar ölçekli biyoreaktörde PHA üretimi için en uygun çözünmüş oksijen derişimi seviyesi %20 olarak belirlenmiştir.
- Laboratuvar ölçekli kontrollü biyoreaktörlerde, kontrolsüz orbital çalkalamalı biyoreaktörlere göre yaklaşık %40-80 daha fazla hücre çoğalması ve %50 daha fazla PHA birikimi elde edilmiştir.
- Doğal fenotip ve rekombinant *B. megaterium* mikroorganizmalarından PHA fermentasyonu çalışmalarında laboratuvar ölçekli biyoreaktörde yarı kesikli besleme çalışmaları gerçekleştirilmiş; üç farklı üstel besleme hızında ($\mu=0,05$; $\mu=0,075$ ve $\mu=0,1$ sa⁻¹) en yüksek hücre derişimine ve PHA ürün verimine $\mu=0,1$ sa⁻¹ besleme hızında ulaşılmıştır.
- Rekombinant suşun, doğal fenotipe göre yarı kesikli sistemde 3 farklı üstel besleme hızında incelendiğinde, yaklaşık %12,5 daha fazla hücre derişimine (6,15 g L⁻¹) ulaştığı belirlenmiştir.
- Üstel yarı kesikli besleme stratejisi ile kesikli sisteme göre 2,2 kat daha fazla PHA üretilmiştir.
- Rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde $\mu=0,1$ sa⁻¹ üstel spesifik çoğalma hızında en yüksek nihai hücre derişimi (7,68 g L⁻¹), hücrelerin PHA içeriği (%80), hacimsel PHA verimliliği (0,54 g L⁻¹ sa⁻¹), hücre ve ürün verimi (0,74 g g⁻¹ ve 0,62 g g⁻¹) elde edilmiştir.
- Rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde doğal fenotip hücrelere göre daha yüksek oksijen transfer parametre değerleri elde edilmiştir. Bu durum rekombinant hücrelerin özellikle biyopolimer sentezinde daha yüksek bir metabolik aktiviteye sahip olmasıyla açıklanmıştır.

- *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan propionik asit, valerik asit, valerat gibi öncül substratlar kullanmadan karbon kaynağı olarak sadece glikoz kullanarak, ¹H-NMR ve GC-FID analizlerine göre, *Bacillus* suşları arasında rapor edilen en yüksek 3HV içeriğine sahip (%58 mol 3HV) PHB-co-PHV kopolimerleri elde edilmiştir.
- Literatürde *B. megaterium* mikroorganizması için mevcut en son metabolik model olan iJA1121 modeli temel alınarak, genomik ölçekte metaboliksel modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- iJA1121 modeli üzerine, KEGG, MetaCyc, UniProt, BioCyc biyokimyasal veri tabanları kapsamlı ve detaylı bir şekilde taranmış ve *B. megaterium* genomunda bulunan ancak modelde yer almayan 7 gen, 7 reaksiyon ve 6 metabolit manuel bir şekilde eklenmiş ve düzenlenmiştir (iBM1128).
- iBM1128 metabolik modelinde akı denge analizi algoritması kullanılarak yarı kesikli besleme sisteminde farklı üstel glikoz besleme hızlarının hücre çoğalması üzerine model simülasyonları gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında, genetik modifikasyonlarla elde edilen rekombinant *B. megaterium* mikroorganizması kullanılarak bakteriyel yolla biyopolimer üretimi ve biyopolimer üretiminde etkili biyoproses tasarım parametrelerinin incelenmesiyle *B. megaterium* NRRL B-14308 suşundan PHA'nın yüksek verimlilikte üretimi ve *B. megaterium* suşunun metaboliksel modellemesi gerçekleştirilmiştir. Literatürde ilk kez *B. megaterium*'un genomunda PHA sentezinden sorumlu *phaC* geni bir ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Böylece *B. megaterium* mikroorganizmasında PhaC enziminin üretiminin artırılmasıyla PHA üretimi arttırılmıştır. Ayrıca, literatürde tanımlanmış ortamda öncül substratlar kullanılmadan karbon kaynağı olarak sadece glikoz kullanarak *Bacillus* suşları arasında mol bazında en yüksek 3HV içeriğine sahip PHBV kopolimerleri üretilmiştir.

Yüksek 3HV içeriği, biyopolimerin esnekliğinin, dayanıklılığının ve bunlara bağlı olarak uygulama alanlarının artması açısından son derece önemlidir.

B. megaterium scl-PHA yapısında biyopolimerler üretirken, *Pseudomonas* cinsi mikroorganizmalar mcl-PHA yapısında biyopolimerler üretmektedir. Bundan sonraki çalışmalarda, *B. megaterium* genomunda gerçekleştirilecek genetik modifikasyonlarla, endüstriyel açıdan oldukça önemli olan scl-mcl-PHA yapısında biyopolimerler elde edilebilir. Ayrıca, *B. megaterium* suşları için oluşturulmuş genomik ölçekte metabolik modeller, stress koşullarında hücrenin PHA üretim metabolizmasını açığa çıkarmak ve PHA üretim verimini daha da arttırmak için kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] H. Millet, P. Vangheluwe, C. Block, A. Sevenster, L. Garcia, R. Antonopoulos, The Nature of Plastics and Their Societal Usage, in: R.E. Hester, R.M. Harrison (Eds.) *Plastics and the Environment*, Royal Soc Chemistry, Cambridge, pp. 1-20, **2019**.
- [2] T. Narancic, F. Cerrone, N. Beagan, K.E. O'Connor, Recent Advances in Bioplastics: Application and Biodegradation, *Polymers*, 12, 38, **2020**.
- [3] G.Q. Chen, M.K. Patel, Plastics Derived from Biological Sources: Present and Future: A Technical and Environmental Review, *Chemical Reviews*, 112, 2082-2099, **2012**.
- [4] G. Billard, J. Boucher, The challenges of measuring plastic pollution, *Field Action Science Reports*, 19, 68-75, **2019**.
- [5] R.U. Halden, Plastics and Health Risks, *Annual Review of Public Health*, 31, 179-194, **2010**.
- [6] R. Verma, K.S. Vinoda, M. Papireddy, A.N.S. Gowda, Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review, *Procedia Environmental Sciences*, 35, 701-708, **2016**.
- [7] R.A. Sheldon, M. Norton, Green chemistry and the plastic pollution challenge: towards a circular economy, *Green Chemistry*, 22, 6310-6322, **2020**.
- [8] G.V. Research:, *Biodegradable Plastics Market Size, Share|Industry Report, 2018-2025*, San Francisco, CA, USA, **2019**.
- [9] E. Bioplastics, *Bioplastics Market Development Update 2019*, European Bioplastics, Berlin, Germany, **2019**.
- [10] D. Jendrossek, Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes), *Journal of Bacteriology*, 191, 3195, **2009**.
- [11] R. Mitra, T. Xu, H. Xiang, J. Han, Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory, *Microbial Cell Factories*, 19, 86, **2020**.
- [12] N.I. López, M.E. Floccari, A. Steinbüchel, A.F. García, B.S. Méndez, Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters, *FEMS Microbiology Ecology*, 16, 95-101, **1995**.
- [13] T. Castillo, C. Flores, D. Segura, G. Espín, J. Sanguino, E. Cabrera, J. Barreto, A. Díaz-Barrera, C. Peña, Production of polyhydroxybutyrate (PHB)

of high and ultra-high molecular weight by *Azotobacter vinelandii* in batch and fed-batch cultures, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, 1809-1816, **2017**.

- [14] S.Y. Lee, Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 1-14, **1996**.
- [15] Z.B. Li, J. Yang, X.J. Loh, Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future, *Npg Asia Materials*, 8, **2016**.
- [16] D.Y. Kim, H.W. Kim, M.G. Chung, Y.H. Rhee, Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates, *Journal of Microbiology*, 45, 87-97, **2007**.
- [17] M. Kumar, A. Singhal, P.K. Verma, I.S. Thakur, Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoate from Lignin Derivatives by *Pandora sp.* ISTKB, *ACS Omega*, 2, 9156-9163, **2017**.
- [18] J.Y. Chen, G. Song, G.Q. Chen, A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates, *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 157-167, **2006**.
- [19] C.Y. Loo, W.H. Lee, T. Tsuge, Y. Doi, K. Sudesh, Biosynthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from Palm Oil Products in a *Wautersia eutropha* Mutant, *Biotechnology Letters*, 27, 1405-1410, **2005**.
- [20] S. Wang, W. Chen, H. Xiang, J. Yang, Z. Zhou, M. Zhu, Modification and Potential Application of Short-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate (SCL-PHA), *Polymers*, 8, 273, **2016**.
- [21] B. Panchal, A. Bagdadi, I. Roy, Polyhydroxyalkanoates: The Natural Polymers Produced by Bacterial Fermentation, *Advances in Natural Polymers: Composites and Nanocomposites*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 397-421, **2013**.
- [22] M. Ishii-Hyakutake, S. Mizuno, T. Tsuge, Biosynthesis and Characteristics of Aromatic Polyhydroxyalkanoates, *Polymers*, 10, 1267, **2018**.
- [23] G. Mannina, D. Presti, G. Montiel-Jarillo, M.E. Suárez-Ojeda, Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures, *Bioresource Technology*, 282, 361-369, **2019**.
- [24] A. Bera, S. Dubey, K. Bhayani, D. Mondal, S. Mishra, P.K. Ghosh, Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate using seaweed-derived crude levulinic

- acid as co-nutrient, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 487-494, **2015**.
- [25] R.A.J. Verlinden, D.J. Hill, M.A. Kenward, C.D. Williams, I. Radecka, Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates, *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1437-1449, **2007**.
- [26] E.A. Dawes, P.J. Senior, The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms, in: A.H. Rose, D.W. Tempest (Eds.) *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, pp. 135-266, **1973**.
- [27] K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi, Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters, *Progress in Polymer Science*, 25, 1503-1555, **2000**.
- [28] V. Martínez, C. Herencias, E. Jurkevitch, M.A. Prieto, Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates, *Scientific Reports*, 6, 24381, **2016**.
- [29] C. Velázquez-Sánchez, G. Espín, C. Peña, D. Segura, The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoates Metabolism to Improve Their Production, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 386-386, **2020**.
- [30] M.A. Prieto, From Oil to Bioplastics, a Dream Come True?, *Journal of Bacteriology*, 189, 289, **2007**.
- [31] Z.A. Raza, S. Noor, S. Khalil, Recent developments in the synthesis of poly(hydroxybutyrate) based biocomposites, *Biotechnology Progress*, 35, e2855, **2019**.
- [32] P.K. Sharma, R.I. Munir, W. Blunt, C. Dartailh, J. Cheng, T.C. Charles, D.B. Levin, Synthesis and Physical Properties of Polyhydroxyalkanoate Polymers with Different Monomer Compositions by Recombinant *Pseudomonas putida* LS46 Expressing a Novel PHA SYNTHASE (PhaC116) Enzyme, *Applied Sciences*, 7, 242, **2017**.
- [33] Muhammadi, Shabina, M. Afzal, S. Hameed, Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8, 56-77, **2015**.
- [34] E. Slaninova, P. Sedlacek, F. Mravec, L. Mullerova, O. Samek, M. Koller, O. Hesko, D. Kucera, I. Marova, S. Obruca, Light scattering on PHA granules protects bacterial cells against the harmful effects of UV radiation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 1923-1931, **2018**.

- [35] P. Sedlacek, E. Slaninova, M. Koller, J. Nebesarova, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca, PHA granules help bacterial cells to preserve cell integrity when exposed to sudden osmotic imbalances, *New Biotechnology*, 49, 129-136, **2019**.
- [36] T. Tsuge, Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94, 579-584, **2002**.
- [37] A.R. Muzaiyanah, A.A. Amirul, Studies on the Microbial Synthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Containing 4-Hydroxyvalerate Using γ -Valerolactone, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170, 1194-1215, **2013**.
- [38] M. Winnacker, Polyhydroxyalkanoates: Recent Advances in Their Synthesis and Applications, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121, 1900101, **2019**.
- [39] J. Conrad, The rheology, degradation, processing, and characterization of renewable resource polymers, *Doktora Tezi*, Clemson University, **2009**.
- [40] A.L. Rivera-Briso, Á. Serrano-Aroca, Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate): Enhancement Strategies for Advanced Applications, *Polymers*, 10, 732, **2018**.
- [41] E. Akaraonye, T. Keshavarz, I. Roy, Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 732-743, **2010**.
- [42] I.N. Gogotov, V.A. Gerasin, Y.V. Knyazev, E.M. Antipov, S.K. Barazov, Composite biodegradable materials based on polyhydroxyalkanoate, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46, 607-613, **2010**.
- [43] P.J. Hocking, R.H. Marchessault, Polyhydroxyalkanoates, *Biopolymers from Renewable Resources*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 220-248, **1998**.
- [44] S. Khanna, A.K. Srivastava, Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates, *Process Biochemistry*, 40, 607-619, **2005**.
- [45] J. Lu, R.C. Tappel, C.T. Nomura, Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates), *Polymer Reviews*, 49, 226-248, **2009**.
- [46] L.L. Madison, G.W. Huisman, Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 21, **1999**.

- [47] K. Peplinski, A. Ehrenreich, C. Döring, M. Bömeke, F. Reinecke, C. Huttmacher, A. Steinbüchel, Genome-wide transcriptome analyses of the 'Knallgas' bacterium *Ralstonia eutropha* H16 with regard to polyhydroxyalkanoate metabolism, *Microbiology*, 156, 2136-2152, **2010**.
- [48] M.M. Rothermich, R. Guerrero, R.W. Lenz, S. Goodwin, Characterization, Seasonal Occurrence, and Diel Fluctuation of Poly(hydroxyalkanoate) in Photosynthetic Microbial Mats, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4279, **2000**.
- [49] R. Shimizu, K. Chou, I. Orita, Y. Suzuki, S. Nakamura, T. Fukui, Detection of phase-dependent transcriptomic changes and Rubisco-mediated CO₂ fixation into poly (3-hydroxybutyrate) under heterotrophic condition in *Ralstonia eutropha* H16 based on RNA-seq and gene deletion analyses, *BMC Microbiology*, 13, 169, **2013**.
- [50] T. Yamane, Yield of poly-D(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: A theoretical study, *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 165-170, **1993**.
- [51] D. Jendrossek, A. Schirmer, H.G. Schlegel, Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 451-463, **1996**.
- [52] A. Steinbüchel, S. Hein, Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 71, 81-123, **2001**.
- [53] C. Ratledge, Kristiansen, B., *Basic Biotechnology*, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge, **2006**.
- [54] G.Y.A. Tan, C.L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I.M.N. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J.Y. Wang, Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review, *Polymers*, 6, 706-754, **2014**.
- [55] D.C. Meng, R. Shen, H. Yao, J.C. Chen, Q. Wu, G.Q. Chen, Engineering the diversity of polyesters, *Current Opinion in Biotechnology*, 29, 24-33, **2014**.
- [56] A. Burniol-Figols, C. Varrone, S.B. Le, A.E. Daugaard, I.V. Skiadas, H.N. Gavala, Combined polyhydroxyalkanoates (PHA) and 1,3-propanediol production from crude glycerol: Selective conversion of volatile fatty acids into PHA by mixed microbial consortia, *Water Research*, 136, 180-191, **2018**.
- [57] J.C. Fradinho, A. Oehmen, M.A.M. Reis, Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake, *Journal of Biotechnology*, 185, 19-27, **2014**.

- [58] D. Li, F. Yin, X. Ma, Towards biodegradable polyhydroxyalkanoate production from wood waste: Using volatile fatty acids as conversion medium, *Bioresource Technology*, 299, 122629, **2020**.
- [59] L. Miao, S. Wang, B. Li, T. Cao, F. Zhang, Z. Wang, Y. Peng, Effect of carbon source type on intracellular stored polymers during endogenous denitritation (ED) treating landfill leachate, *Water Research*, 100, 405-412, **2016**.
- [60] M. Zhang, Y. Wang, Y. Fan, Y. Liu, M. Yu, C. He, J. Wu, Bioaugmentation of low C/N ratio wastewater: Effect of acetate and propionate on nutrient removal, substrate transformation, and microbial community behavior, *Bioresource Technology*, 306, 122465, **2020**.
- [61] J.M.L. Dias, A. Oehmen, L.S. Serafim, P.C. Lemos, M.A.M. Reis, R. Oliveira, Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures, *BMC Systems Biology*, 2, 59, **2008**.
- [62] S. Klinke, Q. Ren, B. Witholt, B. Kessler, Production of Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) from Gluconate by Recombinant *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 540, **1999**.
- [63] S.N. Chohan, L. Copeland, Acetoacetyl Coenzyme A Reductase and Polyhydroxybutyrate Synthesis in *Rhizobium (Cicer) sp.* Strain CC 1192, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2859, **1998**.
- [64] C. McChalicher, F. Srienc, Investigating the structure–property relationship of bacterial PHA block copolymers, *Journal of Biotechnology*, 132, 296-302, **2007**.
- [65] N.A. Parlane, S.K. Gupta, P. Rubio-Reyes, S. Chen, M. Gonzalez-Miro, D.N. Wedlock, B. Rehm, Self-Assembled Protein-Coated Polyhydroxyalkanoate Beads: Properties and Biomedical Applications, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3, 3043-3057, **2017**.
- [66] R. Griebel, Z. Smith, J.M. Merrick, Metabolism of poly(β -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*, *Biochemistry*, 7, 3676-3681, **1968**.
- [67] Y. Nambu, M. Ishii-Hyakutake, K. Harada, S. Mizuno, T. Tsuge, Expanded amino acid sequence of the PhaC box in the active center of polyhydroxyalkanoate synthases, *FEBS Letters*, 594, 710-716, **2020**.
- [68] H.Y. Sagong, H.F. Son, S.Y. Choi, S.Y. Lee, K.J. Kim, Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis, *Trends in Biochemical Sciences*, 43, 790-805, **2018**.

- [69] J.X. Wong, K. Ogura, S. Chen, B. Rehm, Bioengineered Polyhydroxyalkanoates as Immobilized Enzyme Scaffolds for Industrial Applications, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, **2020**.
- [70] K. Mizuno, T. Kihara, T. Tsuge, B.R. Lundgren, Z. Sarwar, A. Pinto, C.T. Nomura, Cloning and heterologous expression of a novel subgroup of class IV polyhydroxyalkanoate synthase genes from the genus *Bacillus*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 81, 194-196, **2017**.
- [71] S. Chanprateep, Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110, 621-632, **2010**.
- [72] S. Mohapatra, S. Maity, H.R. Dash, S. Das, S. Pattnaik, C.C. Rath, D. Samantaray, *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 206-213, **2017**.
- [73] T. Keshavarz, I. Roy, Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda, *Current Opinion in Microbiology*, 13, 321-326, **2010**.
- [74] T. Fukui, Y. Doi, Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 333-336, **1998**.
- [75] J.G.C. Gomez, M.F.A. Rodrigues, R.C.P. Alli, B.B. Torres, C.L.B. Netto, M.S. Oliveira, L.F. daSilva, Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 785-791, **1996**.
- [76] B. Sonnleitner, E. Heinzle, G. Braunegg, R.M. Lafferty, Formal Kinetics of Poly-Beta-Hydroxybutyric acid (PHB) Production in *Alcaligenes Eutrophus* H16 and *Mycoplana Rubra* R14 with respect to the Dissolved Oxygen Tension in Ammonium Limited Batch Cultures, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 7, 1-10, **1979**.
- [77] H.E. Valentin, E.Y. Lee, C.Y. Choi, A. Steinbuchel, Identification of 4-Hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, 710-716, **1994**.
- [78] R. Rai, T. Keshavarz, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. Roy, Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 72, 29-47, **2011**.
- [79] S. Shahid, R. Mosrati, J. Ledauphin, C. Amiel, P. Fontaine, J.L. Gaillard, D. Corroler, Impact of carbon source and variable nitrogen conditions on bacterial biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Evidence of an atypical

- metabolism in *Bacillus megaterium* DSM 509, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116, 302-308, **2013**.
- [80] M.T. Vo, K. Ko, B. Ramsay, Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by a phaZ-knockout strain of *Pseudomonas putida* KT2440, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42, 637-646, **2015**.
- [81] R.G. Lageveen, G.W. Huisman, H. Preusting, P. Ketelaar, G. Eggink, B. Witholt, Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*- Effect of substrates on formation and composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-Hydroxyalkenoates, *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2924-2932, **1988**.
- [82] E.Y. Lee, D. Jendrossek, A. Schirmer, C.Y. Choi, A. Steinbuchel, Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-Butanediol or from 3-Hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp A33, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42, 901-909, **1995**.
- [83] J.N. Lu, R.C. Tappel, C.T. Nomura, Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates), *Polymer Reviews*, 49, 226-248, **2009**.
- [84] S.P. Valappil, A.R. Boccaccini, C. Bucke, I. Roy, Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 91, 1-17, **2007**.
- [85] J. Han, J. Hou, H.L. Liu, S.F. Cai, B. Feng, J.A. Zhou, H. Xiang, Wide Distribution among Halophilic Archaea of a Novel Polyhydroxyalkanoate Synthase Subtype with Homology to Bacterial Type III Synthases, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7811-7819, **2010**.
- [86] C.L. Nielsen, Investigations of polyhydroxyalkanoate secretion and production using sustainable carbon sources, *Yüksek Lisans Tezi*, Utah State University, **2018**.
- [87] L. Cai, M.Q. Yuan, F. Liu, J. Jian, G.Q. Chen, Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442, *Bioresource Technology*, 100, 2265-2270, **2009**.
- [88] C.S.K. Reddy, R. Ghai, Rashmi, V.C. Kalia, Polyhydroxyalkanoates: an overview, *Bioresource Technology*, 87, 137-146, **2003**.
- [89] S. Sato, C.T. Nomura, H. Abe, Y. Doi, T. Tsuge, Poly (R)-3-hydroxybutyrate formation in *Escherichia coli* from glucose through an enoyl-CoA hydratase-

- mediated pathway, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 38-44, **2007**.
- [90] J.L. Ienczak, W. Schmidell, G.M.F. de Aragão, High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40, 275-286, **2013**.
- [91] D.C. Meng, Z.Y. Shi, L.P. Wu, Q. Zhou, Q. Wu, J.C. Chen, G.Q. Chen, Production and characterization of poly(3-hydroxypropionate-co-4-hydroxybutyrate) with fully controllable structures by recombinant *Escherichia coli* containing an engineered pathway, *Metabolic Engineering*, 14, 317-324, **2012**.
- [92] J. Pais, I. Farinha, F. Freitas, L.S. Serafim, V. Martínez, J.C. Martínez, M. Arévalo-Rodríguez, M. Auxiliadora Prieto, M.A.M. Reis, Improvement on the yield of polyhydroxyalkanoates production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology, *Enzyme and Microbial Technology*, 55, 151-158, **2014**.
- [93] Y.J. Sohn, H.T. Kim, K.A. Baritugo, H.M. Song, M.H. Ryu, K.H. Kang, S.Y. Jo, H. Kim, Y.J. Kim, J.i. Choi, S.K. Park, J.C. Joo, S.J. Park, Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* strains, *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 593-599, **2020**.
- [94] R.C. Tappel, Q. Wang, C.T. Nomura, Precise control of repeating unit composition in biodegradable poly(3-hydroxyalkanoate) polymers synthesized by *Escherichia coli*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 480-486, **2012**.
- [95] L. Tripathi, L.P. Wu, D. Meng, J. Chen, G.Q. Chen, Biosynthesis and Characterization of Diblock Copolymer of P(3-Hydroxypropionate)-block-P(4-hydroxybutyrate) from Recombinant *Escherichia coli*, *Biomacromolecules*, 14, 862-870, **2013**.
- [96] M. Vastano, A. Casillo, M.M. Corsaro, G. Sannia, C. Pezzella, Production of medium chain length polyhydroxyalkanoates from waste oils by recombinant *Escherichia coli*, *Engineering in Life Sciences*, 15, 700-709, **2015**.
- [97] M. Waites, N. Morgan, J. Rockey, G. Higton, *Industrial microbiology An Introduction*, Blackwell Science, UK, **2001**.
- [98] M. Lemoigne, Produits de deshydratation et de polymerization de l'acide-b-oxobutyrique, *Bulletin de la Société de chimie biologique (Paris)*, 8, 770-782, **1926**.

- [99] P. Kumar, S. Patel, J.K. Lee, V. Kalia, Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications, *Biotechnology Advances*, 31, 1543-1561, **2013**.
- [100] S. Bleif, F. Hannemann, J. Zapp, D. Hartmann, J. Jauch, R. Bernhardt, A new *Bacillus megaterium* whole-cell catalyst for the hydroxylation of the pentacyclic triterpene 11-keto- β -boswellic acid (KBA) based on a recombinant cytochrome P450 system, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 1135-1146, **2012**.
- [101] J.S. He, A.J. Fulco, A Barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome-P450 genes of rodents and bacteria, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 7864-7869, **1991**.
- [102] Y. Khambhaty, K. Mody, B. Jha, Purification, characterization and application of a novel extracellular agarase from a marine *Bacillus megaterium*, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13, 584-591, **2008**.
- [103] M.G. Sokolova, G.P. Akimova, O.B. Vaishlya, Effect of phytohormones synthesized by rhizosphere bacteria on plants, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47, 274, **2011**.
- [104] J. Wang, Q. Zhang, H. Huang, Z. Yuan, D. Ding, S. Yang, W. Jiang, Increasing synthetic performance of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* by site-directed mutagenesis, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1023-1030, **2007**.
- [105] C. Zou, Z. Li, D. Yu, *Bacillus megaterium* strain XTBG34 promotes plant growth by producing 2-pentylfuran, *The Journal of Microbiology*, 48, 460-466, **2010**.
- [106] M. Eppinger, B. Bunk, M.A. Johns, J.N. Edirisinghe, K.K. Kutumbaka, S.S.K. Koenig, H.H. Creasy, M.J. Rosovitz, D.R. Riley, S. Daugherty, M. Martin, L.D.H. Elbourne, I. Paulsen, R. Biedendieck, C. Braun, S. Grayburn, S. Dhingra, V. Lukyanchuk, B. Ball, R. Ul-Qamar, J. Seibel, E. Bremer, D. Jahn, J. Ravel, P.S. Vary, Genome Sequences of the Biotechnologically Important *Bacillus megaterium* Strains QM B1551 and DSM319, *Journal of Bacteriology*, 193, 4199-4213, **2011**.
- [107] P.S. Vary, R. Biedendieck, T. Fuerch, F. Meinhardt, M. Rohde, W.-D. Deckwer, D. Jahn, *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 957-967, **2007**.

- [108] R. Biedendieck, *Bacillus megaterium*: Versatile Tools for Production, Secretion and Purification of Recombinant Proteins, Doktora tezi, Technical University of Braunschweig, **2007**.
- [109] F.G. Priest, Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*, *Bacteriological reviews*, 41, 711-753, **1977**.
- [110] F. Muneer, I. Rasul, F. Azeem, M.H. Siddique, M. Zubair, H. Nadeem, Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Efficient Replacement of Synthetic Polymers, *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 2301-2323, **2020**.
- [111] G.Q. Chen, K.H. König, R.M. Lafferty, Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*, *FEMS Microbiology Letters*, 84, 173-176, **1991**.
- [112] V. Tanamool, T. Imai, P. Danvirutai, P. Kaewkannetra, Biopolymer generation from sweet sorghum juice: screening, isolation, identification, and fermentative polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus aryabhatai*, *Turkish Journal of Biology*, 37, 259-264, **2013**.
- [113] M. Yilmaz, H. Soran, Y. Beyatli, Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 565-566, **2005**.
- [114] A. Narayanan, K.V. Ramana, Identification and Characterization of Polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains, *International Journal of Environmental Sciences*, 1, 744-756, **2011**.
- [115] P.M. Halami, Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 805-812, **2008**.
- [116] S. Porwal, T. Kumar, S. Lal, A. Rani, S. Kumar, S. Cheema, H.J. Purohit, R. Sharma, S.K. Singh Patel, V.C. Kalia, Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process, *Bioresource Technology*, 99, 5444-5451, **2008**.
- [117] T. Kumar, M. Singh, H.J. Purohit, V.C. Kalia, Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste, *Journal of Applied Microbiology*, 106, 2017-2023, **2009**.
- [118] S.P. Valappil, R. Rai, C. Bucke, I. Roy, Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved, *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1624-1635, **2008**.

- [119] E. Akaraonye, C. Moreno, J.C. Knowles, T. Keshavarz, I. Roy, Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source, *Biotechnology Journal*, 7, 293-303, **2012**.
- [120] S.P. Valappil, S.K. Misra, A.R. Boccaccini, T. Keshavarz, C. Bucke, I. Roy, Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV, *Journal of Biotechnology*, 132, 251-258, **2007**.
- [121] S.P. Valappil, D. Peiris, G.J. Langley, J.M. Herniman, A.R. Boccaccini, C. Bucke, I. Roy, Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp, *Journal of Biotechnology*, 127, 475-487, **2007**.
- [122] S. Evangeline, T.B. Sridharan, Biosynthesis and statistical optimization of polyhydroxyalkanoate (PHA) produced by *Bacillus cereus* VIT-SSR1 and fabrication of biopolymer films for sustained drug release, *International Journal of Biological Macromolecules*, 135, 945-958, **2019**.
- [123] P.K. Nayak, A.K. Mohanty, T. Gaonkar, A. Kumar, S.N. Bhosle, S. Garg, Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Primers for phaC Gene of *Bacillus megaterium*, *ISRN Bacteriology*, 2013, 12, **2013**.
- [124] M.S. Divyashree, T.R. Shamala, Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by *Bacillus flexus*, *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 147-152, **2009**.
- [125] S. Mohapatra, D.D. Samantaray, Production of Polyhydroxyalkanoates by Sugar Cane Rhizospheric Soil Bacterial Isolates, **2015**.
- [126] J.A. López, J.M. Naranjo, J.C. Higueta, M.A. Cubitto, C.A. Cardona, M.A. Villar, Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: Outlook on future developments with endospore forming bacteria, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 250-258, **2012**.
- [127] M.A. Porras, F.D. Ramos, M.S. Diaz, M.A. Cubitto, M.A. Villar, Modeling the bioconversion of starch to P(HB-co-HV) optimized by experimental design using *Bacillus megaterium* BBST4 strain, *Environmental Technology*, 40, 1185-1202, **2019**.
- [128] S. Obruca, I. Marova, S. Melusova, L. Mravcova, Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037, *Annals of Microbiology*, 61, 947-953, **2011**.

- [129] J.M. Naranjo, J.A. Posada, J.C. Higueta, C.A. Cardona, Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*, *Bioresource Technology*, 133, 38-44, **2013**.
- [130] L. Bora, Polyhydroxybutyrate Accumulation in *Bacillus megaterium* and Optimization of Process Parameters Using Response Surface Methodology, *Journal of Polymers and the Environment*, 21, 415-420, **2013**.
- [131] T. Godard, D. Zuhlke, G. Richter, M. Wall, M. Rohde, K. Riedel, I. Poblete Castro, R. Krull, R. Biedendieck, Metabolic Rearrangements Causing Elevated Proline and Polyhydroxybutyrate Accumulation During the Osmotic Adaptation Response of *Bacillus megaterium*, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, **2020**.
- [132] A. Rodriguez-Contreras, M. Koller, M.M.D. Dias, M. Calafell-Monfort, G. Braunegg, M.S. Marques-Calvo, High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain, *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1378-1387, **2013**.
- [133] B.B. Salgaonkar, K. Mani, J.M. Braganca, Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16, *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1347-1356, **2013**.
- [134] S. Mohapatra, S. Pattnaik, S. Maity, S. Mohapatra, S. Sharma, J. Akhtar, S. Pati, D.P. Samantaray, A. Varma, Comparative analysis of PHAs production by *Bacillus megaterium* OUAT 016 under submerged and solid-state fermentation, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 1242-1250, **2020**.
- [135] S.V. Reddy, M. Thirumala, S. Mahmood, Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 25, 391-397, **2009**.
- [136] M. Akdogan, E. Celik, Purification and characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) from a *Bacillus megaterium* strain using various dehydration techniques, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93, 2292-2298, **2018**.
- [137] K. Mohanrasu, R.G.R. Rao, G.H. Dinesh, K. Zhang, G.S. Prakash, D.-P. Song, S. Muniyasamy, A. Pugazhendhi, J. Jeyakanthan, A. Arun, Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*, *Fuel*, 271, 117522, **2020**.

- [138] N. Israni, S. Shivakumar, Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from directly valorized ragi husk and sesame oil cake by *Bacillus megaterium* strain Ti3: Statistical optimization and characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 20-30, **2020**.
- [139] S. Das, A. Majumder, V. Shukla, P. Suhazsini, P. Radha, Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) from Cheese Whey by *Bacillus megaterium* NCIM 5472, *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 4176-4187, **2018**.
- [140] P. Suhazsini, R. Keshav, S. Narayanan, A. Chaudhuri, P. Radha, A Study on the Synthesis of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Bacillus megaterium* Utilizing Cheese Whey Permeate, *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 1390-1405, **2020**.
- [141] A. Narayanan, K.V. Ramana, Polyhydroxybutyrate production in *Bacillus mycoides* DFC1 using response surface optimization for physico-chemical process parameters, *3 Biotech*, 2, 287-296, **2012**.
- [142] P.A. Joshi, S.R. Jaysawal, Isolation and characterization of poly- β -hydroxyalkanoate producing bacteria from sewage sample, *Journal of Cell and Tissue Research*, 10, 2165-2168, **2001**.
- [143] G. Yadav, A. Mittal, A. Bhuwal, V. Goel, N. Aggarwal, A. Yadav, Optimization of Poly- β -Hydroxybutyrate Production from *Bacillus* species, *European Journal of Biological Sciences*, 3, 112-116, **2011**.
- [144] S. Mohapatra, D.P. Samantaray, S.M. Samantaray, Phylogenetic heterogeneity of the rhizospheric soil bacterial isolates producing PHAs revealed by comparative analysis of 16s-rRNA, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 680-690, **2014**.
- [145] S. Mohammed, A.N. Panda, L. Ray, An investigation for recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Bacillus* sp. BPPI-14 and *Bacillus* sp. BPPI-19 isolated from plastic waste landfill, *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1085-1096, **2019**.
- [146] M.M. Berekaa, A.M. Al Thawadi, Biosynthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) biopolymer by *Bacillus megaterium* SW1-2: Application of Box-Behnken design for optimization of process parameters, *African Journal of Microbiology Research*, 6, 2101-2108, **2012**.
- [147] S. Mohapatra, P.R. Mohanta, B. Sarkar, A. Daware, C. Kumar, D.P. Samantaray, Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus* Strain Isolated from Waste Water and Its Biochemical Characterization, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 87, 459-466, **2017**.

- [148] A. Rao, S. Haque, H.A. El-Enshasy, V. Singh, B.N. Mishra, RSM-GA Based Optimization of Bacterial PHA Production and In Silico Modulation of Citrate Synthase for Enhancing PHA Production, *Biomolecules*, 9, **2019**.
- [149] O.A. Odeniyi, O.J. Adeola, Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates, *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 407-413, **2017**.
- [150] P. Lathwal, K. Nehra, M. Singh, J.S. Rana, Characterization of Novel and Efficient Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria Isolated from Rhizospheric Soils, *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 3437-3450, **2018**.
- [151] I.L. Garcia, Development of biorefineries using renewable raw materials for the production of biodegradable polymers, *Doktora Tezi, Universidad de Cordoba*, **2012**.
- [152] G.Q. Chen, Industrial Production of PHA, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, pp. 121-132, **2010**.
- [153] A. Gholami, M. Mohkam, S. Rasoul-Amini, Y. Ghasemi, Industrial production of polyhydroxyalkanoates by bacteria: Opportunities and challenges, *Minerva Biotechnologica*, 28, 59-74, **2016**.
- [154] I. Levett, G. Birkett, N. Davies, A. Bell, A. Langford, B. Laycock, P. Lant, S. Pratt, Techno-economic assessment of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from methane—The case for thermophilic bioprocessing, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4, 3724-3733, **2016**.
- [155] P.C. Sabapathy, S. Devaraj, K. Meixner, P. Anburajan, P. Kathirvel, Y. Ravikumar, H.M. Zayed, X. Qi, Recent developments in Polyhydroxyalkanoates (PHAs) production – A review, *Bioresource Technology*, 306, 123132, **2020**.
- [156] M.H. Madkour, D. Heinrich, M.A. Alghamdi, I. Shabbaj, A. Steinbuchel, PHA Recovery from Biomass, *Biomacromolecules*, 14, 2963-2972, **2013**.
- [157] J.O.M. Karlsson, E.G. Cravalho, M. Toner, Intracellular ice formation-Causes and consequences, *Cryo-Letters*, 14, 323-336, **1993**.
- [158] G. Braunegg, Sustainable poly(Hydroxyalkanoate) (PHA) production, *Degradable Polymers: Principles and Applications*, Springer Netherlands, pp. 235-293, **2002**.
- [159] Y. Elbahloul, A. Steinbuhel, Large-Scale Production of Poly(3-Hydroxyoctanoic Acid) by *Pseudomonas putida* GPo1 and a Simplified

- Downstream Process, Applied and Environmental Microbiology, 75, 643-651, **2009**.
- [160] S. Fidler, D. Dennis, Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*, FEMS Microbiology Letters, 103, 231-235, **1992**.
- [161] S. Harrison, H. Chase, J. S Dennis, The disruption of *Alcaligenes eutrophus* by high pressure homogenisation: key factors involved in the process, Bioseparation, 2, 155-166, **1991**.
- [162] D. Heinrich, M.H. Madkour, M.A. Al-Ghamdi, I. Shabbaj, A. Steinbuchel, Large scale extraction of poly(3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite, Amb Express, 2, **2012**.
- [163] P. Hejazi, E. Vasheghani-Farahani, Y. Yamini, Supercritical fluid disruption of *Ralstonia eutropha* for poly(beta-hydroxybutyrate) recovery, Biotechnology Progress, 19, 1519-1523, **2003**.
- [164] M. Kim, K.S. Cho, H.W. Ryu, E.G. Lee, Y.K. Chang, Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate, Biotechnology Letters, 25, 55-59, **2003**.
- [165] J.M. Merrick, M. Doudoroff, Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by intracellular enzyme system, Journal of Bacteriology, 88, 60-71, **1964**.
- [166] I.M. Tamer, M. Moo-Young, Y. Chisti, Disruption of *Alcaligenes latus* for Recovery of Poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis, Industrial & Engineering Chemistry Research, 37, 1807-1814, **1998**.
- [167] P. van Hee, A. Elumbaring, R. van der Lans, L.A.M. van der Wielen, Selective recovery of polyhydroxyalkanoate inclusion bodies from fermentation broth by dissolved-air flotation, Journal of Colloid and Interface Science, 297, 595-606, **2006**.
- [168] R.J. Van Wegen, Y. Ling, A.P.J. Middelberg, Industrial Production of Polyhydroxyalkanoates Using *Escherichia Coll*: An Economic Analysis, Chemical Engineering Research and Design, 76, 417-426, **1998**.
- [169] B. Kunasundari, K. Sudesh, Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates, Express Polymer Letters, 5, 620-634, **2011**.
- [170] D. Byrom, Polyhydroxyalkanoates: Plasric from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors, Hanser Munich, **1994**.
- [171] E. Berger, B.A. Ramsay, J.A. Ramsay, C. Chavarie, G. Braunegg, PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass, Biotechnology Techniques, 3, 227-232, **1989**.

- [172] S.K. Hahn, Y.K. Chang, B.S. Kim, H.N. Chang, Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform, *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 256-261, **1994**.
- [173] F.M. Kapritchkoff, A.P. Viotti, R.C.P. Alli, M. Zuccolo, J.G.C. Pradella, A.E. Maiorano, E.A. Miranda, A. Bonomi, Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*, *Journal of Biotechnology*, 122, 453-462, **2006**.
- [174] G.Q. Chen, A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry, *Chemical Society Reviews*, 38, 2434-2446, **2009**.
- [175] F. Masood, T. Yasin, A. Hameed, Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35, 514-521, **2015**.
- [176] Z.A. Raza, M.R. Tariq, M.I. Majeed, I.M. Banat, Recent developments in bioreactor scale production of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 901-919, **2019**.
- [177] M.V. Cruz, A.R. Gouveia, M. Dionísio, F. Freitas, M.A.M. Reis, A Process Engineering Approach to Improve Production of P(3HB) by *Cupriavidus necator* from Used Cooking Oil, *International Journal of Polymer Science*, 2019, 2191650, **2019**.
- [178] J.M.B. Domingos, S. Puccio, G.A. Martinez, N. Amaral, M.A.M. Reis, S. Bandini, F. Fava, L. Bertin, Cheese whey integrated valorisation: Production, concentration and exploitation of carboxylic acids for the production of polyhydroxyalkanoates by a fed-batch culture, *Chemical Engineering Journal*, 336, 47-53, **2018**.
- [179] P.-C. Ignacio, R. Andre Luis, L. Carolyn Ming Chi, Improved Production of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates in Glucose-Based Fed-Batch Cultivations of Metabolically Engineered *Pseudomonas putida* Strains, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 59-69, **2014**.
- [180] Z. Chen, L. Huang, Q. Wen, Z. Guo, Efficient polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation by a new continuous feeding mode in three-stage mixed microbial culture (MMC) PHA production process, *Journal of Biotechnology*, 209, 68-75, **2015**.
- [181] G. Kedia, P. Passanha, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, S.R. Esteves, Evaluation of feeding regimes to enhance PHA production using acetic and butyric acids by a pure culture of *Cupriavidus necator*, *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 989-995, **2014**.

- [182] M. Akdoğan, E. Çelik, Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biopolymer by recombinant *Bacillus megaterium* in fed-batch bioreactors, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44, 403-416, **2021**.
- [183] D. Nygaard, O. Yashchuk, D.G. Nosedá, B. Araoz, É.B. Hermida, Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose, *Heliyon*, 7, e05979, **2021**.
- [184] Z. Sun, J. Ramsay, M. Guay, B. Ramsay, Enhanced yield of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by co-feeding glucose in carbon-limited, fed-batch culture, *Journal of Biotechnology*, 143, 262-267, **2009**.
- [185] V. Gorenflo, G. Schmack, R. Vogel, A. Steinbüchel, Development of a Process for the Biotechnological Large-Scale Production of 4-Hydroxyvalerate-Containing Polyesters and Characterization of Their Physical and Mechanical Properties, *Biomacromolecules*, 2, 45-57, **2001**.
- [186] K. Shantini, A.R.M. Yahya, A.A. Amirul, Influence of Feeding and Controlled Dissolved Oxygen Level on the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate- co -3-Hydroxyvalerate) Copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 and Its Characterization, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 1315-1334, **2015**.
- [187] F. Huschner, E. Grousseau, C.J. Brigham, J. Plassmeier, M. Popovic, C. Rha, A.J. Sinskey, Development of a feeding strategy for high cell and PHA density fed-batch fermentation of *Ralstonia eutropha* H16 from organic acids and their salts, *Process Biochemistry*, 50, 165-172, **2015**.
- [188] S. Jae Park, J. Pil Park, S. Yup Lee, Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter, *Biotechnology Letters*, 24, 185-189, **2002**.
- [189] E. Çelik, P. Çalık, S.G. Oliver, Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol, *Yeast*, 26, 473-484, **2009**.
- [190] Z. Sun, J.A. Ramsay, M. Guay, B.A. Ramsay, Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates from nonanoic acid by *Pseudomonas putida* KT2440, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 69-77, **2007**.

- [191] S. Khanna, A.K. Srivastava, Optimization of nutrient feed concentration and addition time for production of poly(β -hydroxybutyrate), *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1145-1151, **2006**.
- [192] B.S. Kim, S.C. Lee, S.Y. Lee, Y.K. Chang, H.N. Chang, High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, 147-150, **2004**.
- [193] A. Hafuka, K. Sakaida, H. Satoh, M. Takahashi, Y. Watanabe, S. Okabe, Effect of feeding regimens on polyhydroxybutyrate production from food wastes by *Cupriavidus necator*, *Bioresource Technology*, 102, 3551-3553, **2011**.
- [194] M.S.I. Mozumder, H. De Wever, E.I.P. Volcke, L. Garcia-Gonzalez, A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production, *Process Biochemistry*, 49, 365-373, **2014**.
- [195] B. Sleeman, The nature of mathematical modeling, *Science*, 285, 842-842, **1999**.
- [196] M. Novak, M. Koller, G. Braunegg, P. Horvat, Mathematical Modelling as a Tool for Optimized PHA Production, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29, 183-220, **2015**.
- [197] G. Stephanopoulos, Metabolic engineering, *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 119-120, **1998**.
- [198] A.K. Gombert, J. Nielsen, Mathematical modelling of metabolism, *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 180-186, **2000**.
- [199] C.D. Maranas, *Optimization Methods in Metabolic Networks*, John Wiley & Sons, Inc., **2016**.
- [200] A.R. Zomorodi, J.G. Lafontaine Rivera, J.C. Liao, C.D. Maranas, Optimization-driven identification of genetic perturbations accelerates the convergence of model parameters in ensemble modeling of metabolic networks, *Biotechnology Journal*, 8, 1090-1104, **2013**.
- [201] J.D. Orth, I. Thiele, B.O. Palsson, What is flux balance analysis?, *Nature Biotechnology*, 28, 245-248, **2010**.
- [202] N.E. Lewis, H. Nagarajan, B.O. Palsson, Constraining the metabolic genotype-phenotype relationship using a phylogeny of in silico methods, *Nature Reviews Microbiology*, 10, 291-305, **2012**.
- [203] R.S. Costa, S. Nguyen, A. Hartmann, S. Vinga, Exploring the Cellular Objective in Flux Balance Constraint-Based Models, in: P. Mendes, J.O.

- Dada, K. Smallbone (Eds.) Computational Methods in Systems Biology, Cmsb 2014, Springer International Publishing Ag, Cham, pp. 211-224, **2014**.
- [204] Y.S. Ko, J.W. Kim, J.A. Lee, T. Han, G.B. Kim, J.E. Park, S.Y. Lee, Tools and strategies of systems metabolic engineering for the development of microbial cell factories for chemical production, *Chemical Society Reviews*, 49, 4615-4636, **2020**.
- [205] W. Zou, M. Zhou, L. Liu, J. Chen, Reconstruction and analysis of the industrial strain *Bacillus megaterium* WSH002 genome-scale in silico metabolic model, *Journal of Biotechnology*, 164, 503-509, **2013**.
- [206] L. Liu, Y. Li, J. Zhang, W. Zou, Z. Zhou, J. Liu, X. Li, L. Wang, J. Chen, Complete Genome Sequence of the Industrial Strain *Bacillus megaterium* WSH-002, *Journal of Bacteriology*, 193, 6389, **2011**.
- [207] A.M. Feist, M.J. Herrgård, I. Thiele, J.L. Reed, B.Ø. Palsson, Reconstruction of biochemical networks in microorganisms, *Nature Reviews Microbiology*, 7, 129-143, **2009**.
- [208] P. Babaei, S.A. Marashi, S. Asad, Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Molecular BioSystems*, 11, 3022-3032, **2015**.
- [209] J.M. Park, T.Y. Kim, S.Y. Lee, Prediction of metabolic fluxes by incorporating genomic context and flux-converging pattern analyses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 14931, **2010**.
- [210] K.R. Patil, M. Åkesson, J. Nielsen, Use of genome-scale microbial models for metabolic engineering, *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 64-69, **2004**.
- [211] Y.K. Oh, B.O. Palsson, S.M. Park, C.H. Schilling, R. Mahadevan, Genome-scale Reconstruction of Metabolic Network in *Bacillus subtilis* Based on High-throughput Phenotyping and Gene Essentiality Data*, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 28791-28799, **2007**.
- [212] J. Aminian-Dehkordi, S.M. Mousavi, A. Jafari, I. Mijakovic, S.A. Marashi, Manually curated genome-scale reconstruction of the metabolic network of *Bacillus megaterium* DSM319, *Scientific Reports*, 9, 18762, **2019**.
- [213] T. Hao, B. Han, H. Ma, J. Fu, H. Wang, Z. Wang, B. Tang, T. Chen, X. Zhao, In silico metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for improved production of riboflavin, Egl-237, (R,R)-2,3-butanediol and isobutanol, *Molecular BioSystems*, 9, 2034-2044, **2013**.

- [214] C.S. Henry, J.F. Zinner, M.P. Cohoon, R.L. Stevens, iBsu1103: a new genome-scale metabolic model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations, *Genome Biology*, 10, R69, **2009**.
- [215] J. Guo, H. Zhang, C. Wang, J.W. Chang, L.L. Chen, Construction and analysis of a genome-scale metabolic network for *Bacillus licheniformis* WX-02, *Research in Microbiology*, 167, 282-289, **2016**.
- [216] J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, **2001**.
- [217] S.J. Moore, A.D. Lawrence, R. Biedendieck, E. Deery, S. Frank, M.J. Howard, S.E.J. Rigby, M.J. Warren, Elucidation of the anaerobic pathway for the corrin component of cobalamin (vitamin B12), *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 14906, **2013**.
- [218] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254, **1976**.
- [219] B. Bandyopadhyay, A.E. Humphrey, H. Taguchi, Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems, *Biotechnology and Bioengineering*, 104, 842-853, **2009**.
- [220] Z. Yıldırım, E. Çelik, Periplasmic and extracellular production of cellulase from recombinant *Escherichia coli* cells, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, 319-324, **2017**.
- [221] L. Heirendt, S. Arreckx, T. Pfau, S.N. Mendoza, A. Richelle, A. Heinken, H.S. Haraldsdóttir, J. Wachowiak, S.M. Keating, V. Vlasov, S. Magnusdóttir, C.Y. Ng, G. Preciat, A. Žagare, S.H.J. Chan, M.K. Aurich, C.M. Clancy, J. Modamio, J.T. Sauls, A. Noronha, A. Bordbar, B. Cousins, D.C. El Assal, L.V. Valcarcel, I. Apaolaza, S. Ghaderi, M. Ahookhosh, M. Ben Guebila, A. Kostromins, N. Sompairac, H.M. Le, D. Ma, Y. Sun, L. Wang, J.T. Yurkovich, M.A.P. Oliveira, P.T. Vuong, L.P. El Assal, I. Kuperstein, A. Zinovyev, H.S. Hinton, W.A. Bryant, F.J. Aragón Artacho, F.J. Planes, E. Stalidzans, A. Maass, S. Vempala, M. Hucka, M.A. Saunders, C.D. Maranas, N.E. Lewis, T. Sauter, B.Ø. Palsson, I. Thiele, R.M.T. Fleming, Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v.3.0, *Nature Protocols*, 14, 639-702, **2019**.
- [222] M.E. Ali, A. Lamprecht, Spray freeze drying as an alternative technique for lyophilization of polymeric and lipid-based nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 516, 170-177, **2017**.

- [223] S. Hu, A.G. McDonald, E.R. Coats, Characterization of polyhydroxybutyrate biosynthesized from crude glycerol waste using mixed microbial consortia, *Journal of Applied Polymer Science*, 129, 1314-1321, **2013**.
- [224] H. Mirhosseini, B.T. Amid, Effect of different drying techniques on flowability characteristics and chemical properties of natural carbohydrate-protein Gum from durian fruit seed, *Chemistry Central Journal*, 7, 1, **2013**.
- [225] D.J.L. Faccin, R. Rech, A.R. Secchi, N.S.M. Cardozo, M.A.Z. Ayub, Influence of oxygen transfer rate on the accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium*, *Process Biochemistry*, 48, 420-425, **2013**.
- [226] D. Moorkoth, K.M. Nampoothiri, Production and characterization of poly(3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate, *Bioresource Technology*, 201, 253-260, **2016**.
- [227] D. Alsafadi, O. Al-Mashaqbeh, A one-stage cultivation process for the production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from olive mill wastewater by *Haloferax mediterranei*, *New Biotechnology*, 34, 47-53, **2017**.
- [228] S. Ansari, T. Fatma, Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization, *Plos One*, 11, **2016**.
- [229] F. Masood, F. Hasan, S. Ahmed, P. Chen, A. Hameed, Biosynthesis and Characterization of Poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Bacillus cereus* S10, *Journal of Polymers and the Environment*, 20, 865-871, **2012**.
- [230] G.D. Saratale, M.K. Oh, Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock, *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 627-635, **2015**.
- [231] S.S. Sawant, B.K. Salunke, L.E. Taylor, B.S. Kim, Enhanced Agarose and Xylan Degradation for Production of Polyhydroxyalkanoates by Co-Culture of Marine Bacterium, *Saccharophagus degradans* and Its Contaminant, *Bacillus cereus*, *Applied Sciences-Basel*, 7, **2017**.
- [232] C. Phithakrotchanakoon, V. Champreda, S. Aiba, K. Pootanakit, S. Tanapongpipat, Engineered *Escherichia coli* for Short-Chain-Length Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer Biosynthesis from Glycerol and Dodecanoate, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 77, 1262-1268, **2013**.
- [233] M.A. Porras, C. Vitale, M.A. Villar, M.A. Cubitto, Bioconversion of glycerol to poly(HB-co-HV) copolymer in an inexpensive medium by a *Bacillus*

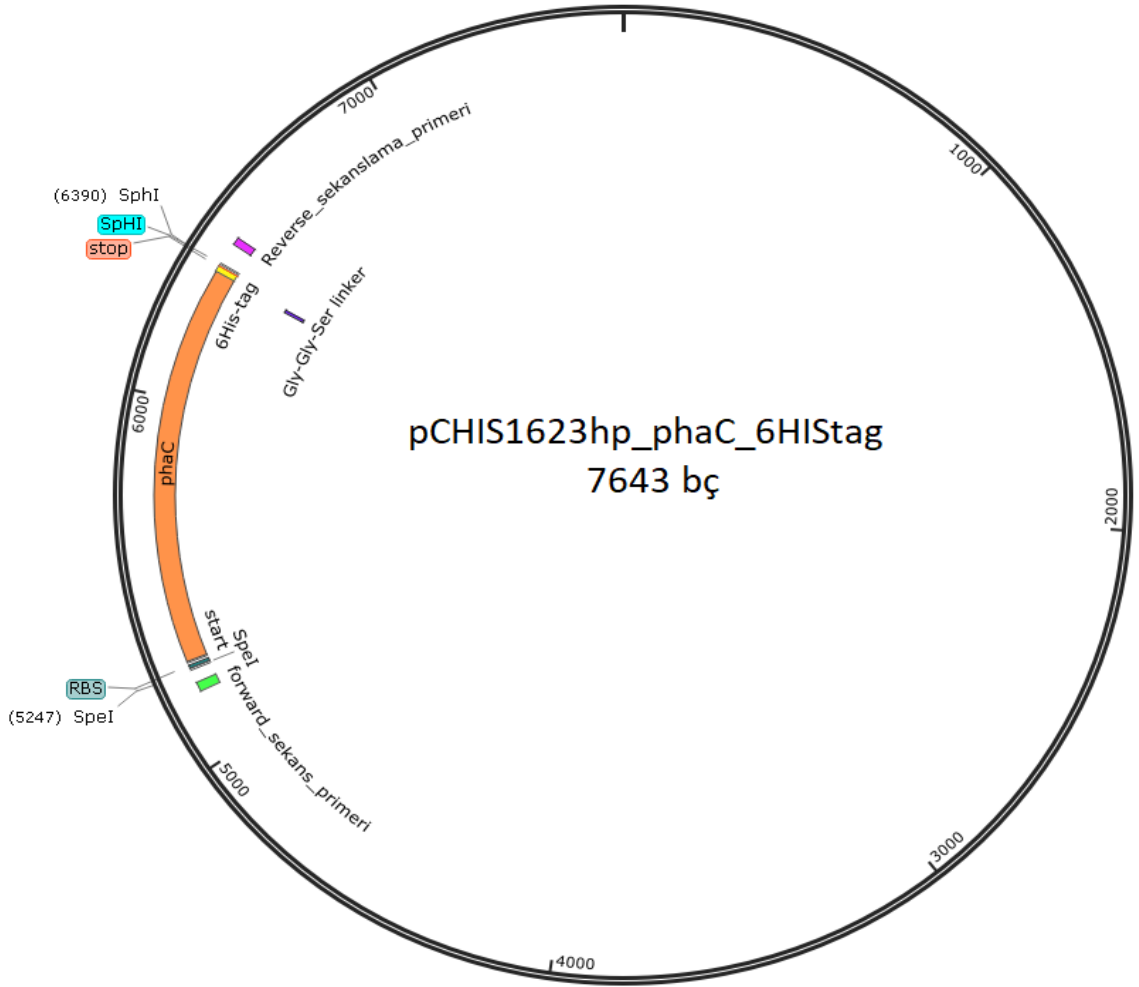
- megaterium strain isolated from marine sediments, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 1-9, **2017**.
- [234] A.M. Gumel, M.S.M. Anuar, T. Heidelberg, Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by *Pseudomonas putida* Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent, *Plos One*, 7, **2012**.
- [235] H. Ariffin, H. Nishida, Y. Shirai, M.A. Hassan, Determination of multiple thermal degradation mechanisms of poly(3-hydroxybutyrate), *Polymer Degradation and Stability*, 93, 1433-1437, **2008**.
- [236] R. Bhati, N. Mallick, Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N₂-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agardh, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87, 505-512, **2012**.
- [237] S.V. Reddy, M. Thirumala, S.K. Mahmood, A novel *Bacillus* sp accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36, 837-843, **2009**.
- [238] P. Furrer, R. Hany, D. Rentsch, A. Grubelnik, K. Ruth, S. Panke, M. Zinn, Quantitative analysis of bacterial medium-chain-length poly(R -3-hydroxyalkanoates) by gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1143, 199-206, **2007**.
- [239] B.B. Salgaonkar, J.M. Bragança, Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Halogeometricum borinquense* strain E3, *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 339-346, **2015**.
- [240] D.E. Harrison, *The Regulation of Respiration Rate in Growing Bacteria*, *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, pp. 243-313, **1976**.
- [241] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview, *Biotechnology Advances*, 27, 153-176, **2009**.
- [242] M. Michelin, A.M. de Oliveira Mota, M. Polizeli, D.P. da Silva, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, Influence of volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) on xylanases batch production by *Aspergillus niger* van Tieghem in stirred tank and internal-loop airlift bioreactors, *Biochemical Engineering Journal*, 80, 19-26, **2013**.
- [243] Y. Zhou, L.R. Han, H.W. He, B. Sang, D.L. Yu, J.T. Feng, X. Zhang, Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein

- GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient, *Molecules*, 23, 125, **2018**.
- [244] W. Blunt, D.B. Levin, N. Cicek, Bioreactor Operating Strategies for Improved Polyhydroxyalkanoate (PHA) Productivity, *Polymers*, 10, 1197, **2018**.
- [245] D. Riesenberg, V. Schulz, W.A. Knorre, H.D. Pohl, D. Korz, E.A. Sanders, A. Ross, W.D. Deckwer, High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate, *Journal of Biotechnology*, 20, 17-28, **1991**.
- [246] B. Alkotaini, H. Koo, B.S. Kim, Production of polyhydroxyalkanoates by batch and fed-batch cultivations of *Bacillus megaterium* from acid-treated red algae, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 33, 1669-1673, **2016**.
- [247] M.H.A. Ibrahim, A. Steinbuchel, High-Cell-Density Cyclic Fed-Batch Fermentation of a Poly(3-Hydroxybutyrate)-Accumulating Thermophile, *Chelatococcus* sp Strain MW10, *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 7890-7895, **2010**.
- [248] S. Kulpreecha, A. Boonruangthavorn, B. Meksiriporn, N. Thongchul, Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 240-245, **2009**.
- [249] P. Singhaboot, P. Kaewkannetra, A higher in value biopolymer product of polyhydroxyalkanoates (PHAs) synthesized by *Alcaligenes latus* in batch/repeated batch fermentation processes of sugar cane juice, *Annals of Microbiology*, 65, 2081-2089, **2015**.
- [250] F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, V.E. Santos, J.C. Merchuk, Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview, *Biochemical Engineering Journal*, 49, 289-307, **2010**.
- [251] V. Urtuvia, N. Maturana, C. Peña, A. Díaz-Barrera, Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* with different 3HV fraction in shake flasks and bioreactor, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 1469-1478, **2020**.
- [252] F.C. de Paula, C.B.C. de Paula, J.G.C. Gomez, A. Steinbüchel, J. Contiero, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production from biodiesel by-product and propionic acid by mutant strains of *Pandora* sp, *Biotechnology Progress*, 33, 1077-1084, **2017**.
- [253] T. Fukui, T. Kichise, T. Iwata, Y. Doi, Characterization of 13 kDa Granule-Associated Protein in *Aeromonas caviae* and Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates with Altered Molar Composition by Recombinant Bacteria, *Biomacromolecules*, 2, 148-153, **2001**.

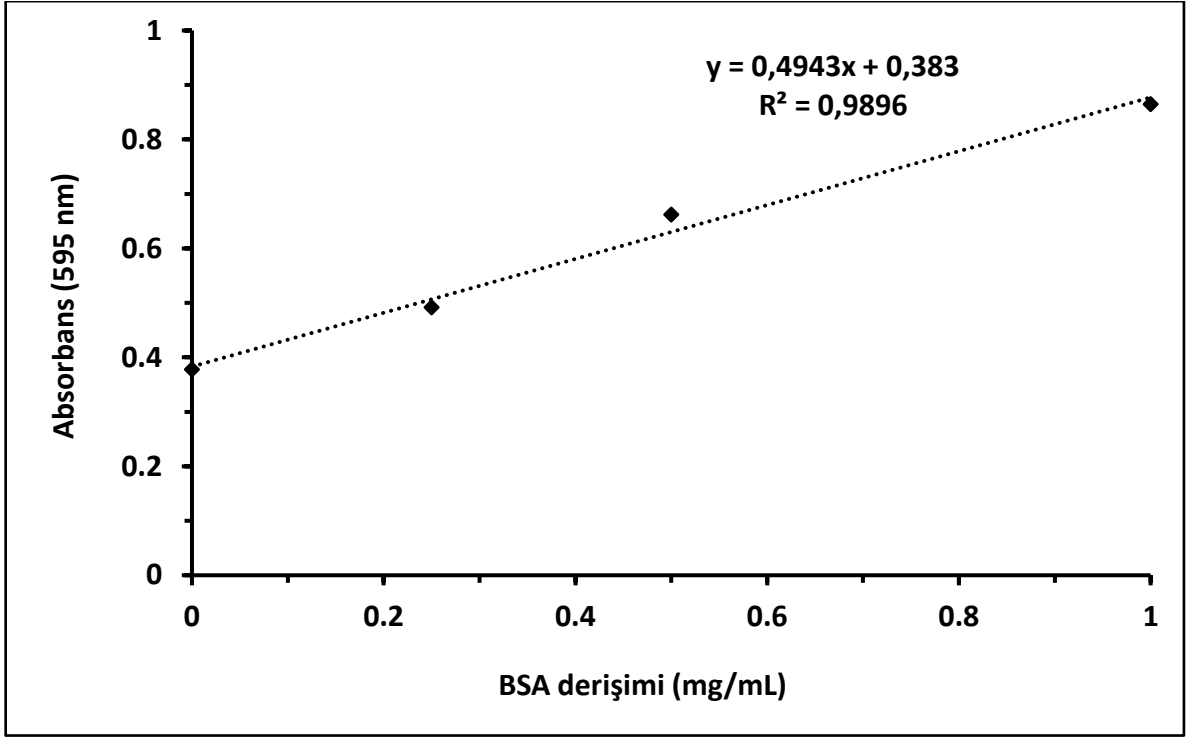
- [254] J. Han, Y.Z. Qiu, D.C. Liu, G.Q. Chen, Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition, *FEMS Microbiology Letters*, 239, 195-201, **2004**.
- [255] S. Kuciel, K. Mazur, P. Jakubowska, Novel Biorenewable Composites Based on Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with Natural Fillers, *Journal of Polymers and the Environment*, 27, 803-815, **2019**.
- [256] S. Singh, A.K. Mohanty, T. Sugie, Y. Takai, H. Hamada, Renewable resource based biocomposites from natural fiber and polyhydroxybutyrate-co-valerate (PHBV) bioplastic, *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 39, 875-886, **2008**.
- [257] S.K. Hasan, S. Zainuddin, J. Tanthongsack, M. Hosur, L. Allen, A study of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biofilms' thermal and biodegradable properties reinforced with halloysite nanotubes, *Journal of Composite Materials*, 52, 3199-3207, **2018**.
- [258] T.M. Don, C.W. Chen, T.H. Chan, Preparation and characterization of poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17, 1425-1438, **2006**.

EKLER

EK 1: *phaC* gen overekspresyonu gerçekleştirilmiş pC-HIS1623hp plazmid haritası



EK 2: BSA standart kalibrasyon eğrisi



EK 3: *phaC*-GGS geninin ileri sekans primeri ile sekans analizi (L1)

Mon Mar 13, 2017 3:29 EET

L1_[17021095]54-F_A79937_D12_1702005641Z.seq from 1 to 1249

Alignment to

pCHis1623-hp-*phaC*-6His (1).ape from 1 to 7643

```
1 -----TAGGTATGATGTACAAATGGTCCAAACTAGTAAGGAGTGAATATACAATGGCAATTCCCTTACGTCCAAAGAGTGGGAAA 79
5201 aaacttgctcactcaaaccaaggagggtgaaigtacaatggtccaatactegtaaggagggtgaatatacaaatggcaattcccttacgtccaagagtgggaaa 5300
*
*
*
80 AATTAATCAAAATCAATGCCAAGTGAATATAAAAGTTCGCAAGACGTTTAAAGCGTGCATATGAAATTATGACAGCAGAGCGGAAACCGGAAGTGGGATT 179
5301 aattaatcaaatcaatgccaaagtgaatataaaagtctcgcaagacggtttaaagcgtgcataatgaattatgacagcagaagcggaaacgggaagtgggatt 5400
*
*
*
180 AACACCAAAGAGAGGTATTGGAAGAAAGAACAAAGCAAAATATACCGCTATACCGCCAGTAAAGATTAACCTGCATAAAACACCAATCTACTCGTATAT 279
5401 aaacocaaagagaggtatttggaaaaagacaagaacaaattataccgctataccgocagtaaaagataaacctgcataaaaacccaatctactcgtatata 5500
*
*
*
280 GCATTGATCAATAAACCGTATAATTTGATTTAACCCTNGAAGACAGCCCTGTTGAATACITATTAAACCGTGGTTTTGACGTGTATTGCTGACTGGG 379
5501 gcattgatcaataaacccgtataatTTGATTTAACCCTNGAAGACAGCCCTGTTGAATACITATTAAACCGTGGTTTTGACGTGTATTGCTGACTGGG 5600
*
*
*
380 GAATCCAGGGCTTGAAGACAGCAATATGAAGCTAGATGATTATATGATGATTAATTCCAAAGCGGCGAAAAGGGTGCCTGCCACTCTCTAAATCTCC 479
5601 gaatccagggttgaagacagcaatatagaagctagatgattatATATGATGATTAATTCCAAAGCGGCGAAAAGGGTGCCTGCCACTCTCTAAATCTCC 5700
*
*
*
480 TGATTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 579
5701 tgatttgcctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgct 5800
*
*
*
580 AGTCCATTTGATTTTTCGGATACAGGTTTATACGGAGCATTCCTAGACGATGCTACTTTAATTTAGATAAAGCAGTAGATACATTGGGAACATCCCTC 679
5801 agtccatttgatTTTTCGGATACAGGTTTATACGGAGCATTCCTAGACGATGCTACTTTAATTTAGATAAAGCAGTAGATACATTGGGAACATCCCTC 5900
*
*
*
680 CAGAGATGATGACTTTGGAACAAGATGTTAAAGCCAAATCACGAATTCATATGCCCATATGTAACGTTGGTGGACCGTTCCGGAAMATCAGCGGTTTGT 779
5901 cagagatgatgactTTGGAACAAGATGTTAAAGCCAAATCACGAATTCATATGCCCATATGTAACGTTGGTGGACCGTTCCGGAAMATCAGCGGTTTGT 6000
*
*
*
780 TGAAGCTCGGAAGCAATGCAAAAGTGGGTTGCTGACGGAAATCCCATTTGCTGGTGAAGCTTATTCGTCAGTGGATTCGGGACTTCTATCAACAAAAGAAA 879
6001 tgaagctcggaaagcaatgcaaaagtgggttGCTGACGGAAATCCCATTTGCTGGTGAAGCTTATTCGTCAGTGGATTCGGGACTTCTATCAACAAAAGAAA 6100
*
*
*
880 TTAATCAATGGTGAACCTTGAAGTTCGGGACGCAAGTAGATTGAAAAATATTAAAGCTAATATTTTAAACATTGCTGCTAGCCGTTGATCATATTGGGA 979
6101 ttaatcaatggTGAACCTTGAAGTTCGGGACGCAAGTAGATTGAAAAATATTAAAGCTAATATTTTAAACATTGCTGCTAGCCGTTGATCATATTGGGA 6200
*
*
*
980 TGCCCATCAAGTGGCAGCTTTAATGGAAGCTGTTTCAATGGA-GAT-AGAGTACAAATTTGTCAAAACA-GTCACGATATCTGTTGATTTGGTCCAAA 1076
6201 tgcccatcaagTGGCAGCTTTAATGGAAGCTGTTTCAATGGA-GAT-AGAGTACAAATTTGTCAAAACA-GTCACGATATCTGTTGATTTGGTCCAAA 6300
```


EK 5: *phaC* geninin ileri sekans primeri ile sekans analizi (L2)

```
1 .....CCCCAGCTGATGTACATCGCTCCAACTACTAAGGAGGCTCAATATACAATGCCAATTCCTTACGTCCAGAGCTCCGAAA 78
5201 .....
179 AATTAATCAAAATCAATCCCAAGTCAATATAAAAGTTCTCCACAGCCTTTTAAGCCTGCATATCAAATTATGACAGCAGAACCCGAAACCCGAACTGCATT 178
5301 .....
179 AACACCAAAAGAGCTTATTTCCAAAAGAAACAAGCAAATTTATACCGCTATACCCAGTAAAGATAACTGCATAAAACACCAATCTTACTCGTATAT 278
5401 .....
279 GCATTGATCAATAAACCCGTATATTTTGGATTAAACACCTCGAAACAGCCTTCTTGAATACTTATTAACCCGTGCTTTTGACGTGTATTGCTTGACTCGG 378
5501 .....
379 GAACTCCAGGCTTCAAGACACCAATATCAAGCTAGATGATTATTTGTAGATTATATCCAAAAGCCGCGAAAAGCTGCTGCCACTTCTAAATCTCC 478
5601 .....
479 TGATTTCCTCTTCTTCTGCTTACTGCATGGCCGCACTATGACATCTATTTTCTGCTCATTAAATGAAGACTTCCCGATTAAAACTTAATTTTTATGACA 578
5701 .....
579 AGTCCATTGATTTTTCGGATACAGCTTATACGGAGCATTCTAGACGATCCGCTACTTTAATTTAGATAAAGCAGTAGATACATTCCGAAACATCCCTC 678
5801 .....
679 CAGAGATGATGACTTTCCAAAACAAGATCTTAAGCCCAATCAACCAATTTCTATGCCCCATATGTAACGTTGCTGGACCCGTTCCGAAAATCAGCCGTTGT 778
5901 .....
779 TCAAAAGCTCCAAAGCTAATCCAAAAGTGGCTTCTGACCCCAATCCCAATTTGCTGCTGCAAGCTTATCGTCAGTGCATTCCGACTTCTATCAACAAAATAAA 878
6001 .....
879 TTAATCAATGCTCAACTTGAAGTTCCCGACCCAAAGTAGATTTGAAAAATATTAAGCTAATATTTTAAACATTGCTGCTAGCCCTGATCATATTCCGA 978
6101 .....
979 TGCCGCATCAAGTCCGAGCTTTAATGGACGCTGTTCAAGTGAAGATAAAGACTACAAATTTGTCAAAACAGGTCACGCTATCTGTTGATTTGGTCCAAA 1078
6201 .....
1079 -GCAGTGAA-CAACATAT-CTTCAATCCGCGATTCCGCTAGAAAAACGCTCTAAACATCAC-ATCA-CATCACT-AGCATGCC-G-CTGA-A-GATCCGA 1168
6301 .....
1169 TCACCATCA-CATCCCT-A-CGGTCCAAGAA-TGCAGCCAATCAATCTTCCCG-G----- 1219
6401 .....
1219 toaooatoaaotaaotaaobgggtoaaagaattggagooaaotaaottogggggaaoatgtgaaogaaooaaooottggogaaooatatoaatog 6500
```

EK 6: *phaC* geninin geri sekans primeri ile sekans analizi (L2)

Mon Mar 13, 2017 4:32 EET

L2_[17021096]57-R_A79937_G12_1702005642Z.seq from 1214 to 1

Alignment to

pCHIS1623hp_phaC_nolinker (1).ape from 1 to 7634

```

1213 -----ATACTGTTCCCTAATCAAGACGCTGAATGTACATGTCCAAACCTAGACTGATATCATGCATCCTTACCTGCAAGACTGGAAA 1128
5201 ||||||| 5300
1127 AAT--ATCAAAATCAATGCCAAGTGAATATAAAACT-CTGCCAAGACGTTTTAAGCGTGCATATGAAATTATGACAGCAGAAACCGAAACCGAAGTTGGATT 1031
5301 ||||||| 5400
1030 AACCCAAAAGAGGTTATTTGGAAAAAGAACAAAGCAAAATTATACCGCTATACGCCAGTAAAGATAACTGCATAAAACACCAATCTTACTCGTATAT 931
5401 ||||||| 5500
930 GCATTGATCAATAAACCCTATATTTGGATTAAACACCTGCAAACAGCCCTGTTGAATACTTATTAAACCGTCTGTTGACGTGATTGCTTGACTGGC 831
5501 ||||||| 5600
830 GAACTCCAGGCGCTTAAGACAGCAATATGAAGCTAGATGATTATATTGTAGATTATATTCAAAAGCGGCGAAAAAGGCTGCGCACCTTCTAAATCTCC 731
5601 ||||||| 5700
730 TGATTGTCTGCTTCTGGTACTGCATGGGCGAACTATGCATCTATTTTTGCTGCCATTAATGAAGACTTCCGATTAATAAACTTAATTTTTATGACA 631
5701 ||||||| 5800
630 ACTCCATTGATTTTTCCGATACAGCTTATAACGACCATTCCTAGACGATCGCTACTTAAATTTAGATAAAGCAGCTAGATACATTCCGAAACATCCCTC 531
5801 ||||||| 5900
530 CAGAGATGATTCACCTTTCCAAACAGATCTTAAGCCCAATCACGAATTTCTATGCCCCATATGTAAACCTGCTGGACCGTTCCGAAATCAGCCGTTTCT 431
5901 ||||||| 6000
430 TCAAGCGTCCAGCTAATGCCAAAGTGGCTTGCAGCGAATCCCATTTGCTGCTGAAGCTTATCGTCACTCGATTCCTACTCTATCAACAAAATAAA 331
6001 ||||||| 6100
330 TTAATCAATCGTGAACCTTGAAGTTCGCCAGCCCAAGCTAGATTTGAAAATAATTAAGCTAATATTTTAAACATTCCTGCTAGCCCTCATATTCGA 231
6101 ||||||| 6200
230 TCCCGCATCAAGTCCGAGCTTAAATGCCAGCTGTTTCAAGTGAAGATAAAGACTACAAATTCGTCAAAACAGCTCACCTATCTCTGTATTGCTCCAAA 131
6201 ||||||| 6300
130 ACCAGTGAAGCAAAACATATCCTTCAATCGGCGATTGCCAGAAAACGCTCTAAACATCACCATCACCTAAGCATGCCCGCTCAGAGGATCGCA 31
6301 ||||||| 6400
30 TCACCATCACCATCACTAACCC-T
6401 ||||||| 6500

```

EK 7: İBM1128 modeli için eklenen yeni reaksiyonlar ve metabolitler

No	Reaksiyon Adı	Reaksiyon
1	(R)-3-hydroxybutyryl-CoA dehidratase	RHYBC[c] <=> CRONYLCOA[c] +H2O[c]
2	3-oxoadipate CoA-transferase	SUCCOA[c] + 3OA[c] <=> SUCC[c] + 3OACOA[c]
3	GDP-L-fucose synthase	C00325[c] + NADP[c] <=> C01222[c] + NADPH[c] + H[e]
4	GDP-mannose 4,6-dehidratase	GDPMAN[c] <=> C01222[c] + H2O[e]
5	Succinyl-CoA:acetate CoA-transferase	SUCCOA[c] + AC[e] <=> ACCOA[c] + SUCC[e]
6	(S)-malate:acceptor oxidoreductase	MAL[c] + C15602[c] <=> OA[e] + C15603[c]
7	D-galactonate hydro-lyase	DGALAC[e] <=> C01216[c] + H2O[c]

Metabolit Adı	Kısaltması	Kimyasal Formülü	KEGG Numarası
3-Oxoadipate	3OA[c]	C6H6O5	C00846
GDP-L-fucose	C00325[c]	C16H25N5O15P2	C00325
GDP-4-dehydro-6-deoxy-D-mannose	C01222[c]	C16H23N5O15P2	C01222
quinone	C15602[c]	C6H4O2	C15602
Hydroquinone	C15603[c]	C6H6O2	C15603
2-Dehydro-3-deoxy-D-galactonate	C01216[c]	C6H10O6	C01216
3-Oxoadipate	3OA[c]	C6H6O5	C00846

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı: Murat AKDOĞAN

Doğum Yeri: Mersin

Medeni Hali: Evli

E-posta: muratakdogan@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü,
Beytepe/ANKARA

Eğitim:

Lise: Mehmet Adnan Özçelik Anadolu Lisesi, Mersin

Lisans: Anadolu Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Eskişehir

Yüksek Lisans: Anadolu Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Eskişehir

Bütünleşik Doktora: Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara

Yabancı Dil ve Düzeyi:

İngilizce: İleri Düzey (ÜDS: 81.25)

İş Deneyimi:

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Araştırma Görevlisi (2013-Halen)

Deneyim Alanları:

Biyoteknoloji, Biyoteknolojik Prosesler ve Fermentasyon Teknolojisi, Polimer Teknolojisi

Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi:

Akdoğan M. (Araştırmacı), Çelik E. (Yürütücü). "Rekombinant *Bacillus megaterium* ile Biyopolimer Üretimi ve Karakterizasyonu", Proje No: FBB-2016-11851. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje Dönemi: 2016-2019, Bütçe: 146 000 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar:

1. Akdoğan M., Çelik E. (2021). Enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biopolymer by recombinant *Bacillus megaterium* in fed-batch bioreactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44, 403-416.
2. Akdoğan M., Çelik E. (2018). Purification and characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) from a *Bacillus megaterium* strain using various dehydration techniques. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(8), 2292-2298.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/ veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:

Akdoğan M., Çelik E., Production and characterization of poly 3 hydroxybutyrate PHB under different dehydration techniques by *Bacillus megaterium* strain, 15th International Symposium on Biopolymers, 26 - 29 Eylül 2016, Madrid, İspanya (poster sunumu).