

**BİYOBOZUNUR PLASTİK
POLİHİDROKSİALKANOATLARIN *Bacillus
megaterium*'DA GENETİK MÜHENDİSLİĞİ YOLUYLA
ÜRETİMİNİN ARTIRILMASI**

**OVERPRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC
POLYHYDROXYALKANOATES BY *Bacillus megaterium*
VIA GENETIC ENGINEERING**

BATUHAN DOĞAN

Doç. Dr. EDA ÇELİK AKDUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

ÖZET

BİYOBOZUNUR PLASTİK POLİHİDROKSİALKANOATLARIN *Bacillus megaterium*'DA GENETİK MÜHENDİSLİĞİ YOLUYLA ÜRETİMİNİN ARTIRILMASI

BATUHAN DOĞAN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. EDA ÇELİK AKDUR

Haziran 2021, 75 sayfa

Günümüzde yaygın bir şekilde kullanılmakta olan fosil yakıt türevli plastik malzemeler, hafiflik, kolay şekillendirilebilme, hammadde ve imalat açısından ekonomik olmaları gibi avantajlarıyla hemen her alanda artan bir üretim ve tüketim değerine sahiptir. Ancak bu plastikler doğada uzun zamanda parçalanmaları ve içerdiği kanserojen bileşenler nedeniyle insan ve çevre sağlığına ciddi tehdit oluşturmaktadır. Sınırlı fosil yakıt kaynaklarının hızla tükenmesiyle birlikte petrol bazlı plastiklerin yerini alabilecek alternatif malzemelerden birisi de biyoparçalanabilirlik ve biyoyumluluk özellikleri bulunan polihidroksialkanoatlardır (PHA). PHA, oksijen, azot ve fosfor gibi bileşenler yönünden zayıf, karbonca zengin bir besi yerinde, hücrel stres altında kullanılmak üzere sentezlenen polimerlerdir. Ancak, bu biyopolimerlerin ticari olarak tercih edilebilmesi için bakterilerde üretim verimlerinin artırılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, PHA'yı rekombinant (r)-*Bacillus megaterium* bakterisinden çeşitli genetik modifikasyonlarla yüksek verimlilikte üretmek için genetik

mühendisliği yöntemleri uygulanmıştır. *B. megaterium* genomunda bulunan PHA sentez genleri *phaC* ve *phaR* ekspresyon vektörüne klonlanarak (r)-*B. megaterium* suşu ilk kez geliştirilmiştir. Doğal fenotip *B. megaterium* NRRL B-14308 suşu ile *phaC-phaR* genleri overekspres edilmiş (r)-*B. megaterium* suşu ve daha önce araştırma grubumuzda geliştirilmiş olan ve *phaC* geni overekspres edilmiş (r)-*B. megaterium* suşunda üretilen PHA'nın üretim verimleri ve üretilen PHA'ların yapıları karşılaştırılmıştır. Orbital çalkalamalı biyoreaktörde 72 saat inkübasyon sonucunda pC-HIS1623hp-*phaC-phaR*, pC-HIS1623hp-*phaC* ve kontrol grubu olan pC-HIS1623hp plazmidlerini içeren (r)-*B. megaterium* suşlarından sırasıyla 2,3 g L⁻¹, 2,2 g L⁻¹ ve 2,1 g L⁻¹ verimlerinde PHA elde edilmiştir. PHA sentezi için gerekli olan PhaC ve PhaR proteinleri SDS-PAGE yöntemi ile teyit edildikten sonra, çözücü ekstraksiyonu yöntemiyle saflaştırılan biyopolimerlerin yapısal ve termal özellikleri Gaz Kromatografisi (GC-FID), Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR), Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (¹H-NMR), Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizleri ile karakterize edilmiştir. Rekombinant suşlardan elde edilen PHA'ların karakterizasyonları sonucunda polimerlerin kopolimer (PHB-ko-PHV) yapısında olduğu ve 3-hidroksibütirat (3HB) ile 3-hidroksivalerat (3HV) monomer birimlerinden oluştuğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus megaterium*, rekombinant, *phaC-phaR*, polihidroksialkanoat, karakterizasyon

ABSTRACT

OVERPRODUCTION OF BIODEGRADABLE PLASTIC POLYHYDROXYALKANOATES BY *Bacillus megaterium* VIA GENETIC ENGINEERING

Batuhan DOĞAN

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. EDA ÇELİK AKDUR

June 2021, 75 pages

Fossil fuel-derived plastic materials, have currently production and consumption values at increasing quantities, due to their lightness, easy malleability and economical reasons. Owing to their poor degradation rates and their carcinogenic components, fossil-resource based plastics pose serious health problems on humans and the environment. With the rapid depletion of limited fossil fuel resources, one of the alternative materials that can replace petroleum based plastics is polyhydroxyalkanoates (PHA) with their biodegradability and biocompatibility properties. PHAs are polyesters synthesized to be used during cellular stress, in a carbon-rich nutrient medium that is poor in terms of components such as oxygen, nitrogen and phosphorus. However, in order for these biopolymers to be preferred commercially, the production efficiency in bacteria should be increased.

In this thesis study, genetic engineering methods have been applied to produce PHA at high efficiency, from recombinant (r)-*Bacillus megaterium* bacterium with various genetic modifications. PHA synthesis genes *phaC* and *phaR* found in the *B. megaterium* genome were cloned into an expression vector and a new (r)-*B.*

megaterium strain was developed. The production efficiency and structure of PHA produced by the wild type *Bacillus megaterium* NRRL B-14308 strain, the (r)-*Bacillus megaterium* strain overexpressing *phaC* and *phaR*, and our previously developed (r)-*Bacillus megaterium* strain overexpressing *phaC*, were compared. After 72 hours of incubation in an orbitally shaken bioreactor, PHA was obtained from (r)-*B. megaterium* NRRL B-14308 strains containing pC-HIS1623hp-*phaC*-*phaR*, pC-HIS1623hp-*phaC* and as a control group pC-HIS1623hp plasmids with yields of 2.3 g L⁻¹, 2.2 g L⁻¹ and 2.1 g L⁻¹, respectively. Following the confirmation of PhaC and PhaR proteins required for PHA synthesis via SDS-PAGE method, the structural and thermal properties of biopolymers obtained by chloroform purification method were characterized by Gas Chromatography (GC-FID), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-NMR), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) analyses. As a result of the characterization of PHAs obtained from the recombinant strains, it has been determined that the polymers are in copolymer (PHB-co-PHV) structure, and consist of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) monomer units.

Keywords: *Bacillus megaterium*, recombinant, *phaC*-*phaR*, polyhydroxyalkanoate, characterization

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Biyopolimerler.....	4
2.1.1. Biyopolimer Grupları ve Sınıflandırılmaları	4
2.1.2. Biyopolimerlerin Kullanım Alanları.....	6
2.2. Polihidroksialkanoatlar (PHA).....	6
2.2.1. Polihidroksialkanoat Türleri ve Kaynakları.....	7
2.2.2. PHA Üretim Genleri ve Metabolik Yolları.....	11
2.2.3. PHA Üretiminde Verim Artırmaya Yönelik Yapılan Çalışmalar	13
2.2.4. PHA Kullanım Alanları, Ekonomisi ve Geleceği	16
2.3. Endüstriyel Bir Üretici Olarak <i>Bacillus megaterium</i>	17
2.4. <i>Bacillus</i> Ekspresyon Sistemleri.....	18
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	19
3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Mikroorganizmalar, Çoğalma Ortamları ve Plazmidler	19
3.2. Moleküler Biyoloji ve Genetik Mühendisliği Yöntemleri	20
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	20
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonrası DNA'nın Safılaştırılması.....	21
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	21
3.2.4. DNA'nın Agaroz Jelden Elde Edilmesi	22
3.2.5. Primerlerin Tasarımı.....	24

3.2.6.	Hedef DNA Molekülünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	25
3.2.7.	Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Sonrasında DNA'nın Saflaştırılması 25	
3.2.8.	Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon).....	25
3.2.9.	<i>E. coli</i> DH5α'nın CaCl ₂ Metodu ile Transformasyonu	26
3.2.10.	Rekombinant DNA'nın Dizi Analizi	26
3.4.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> Kullanılarak PHA Üretimi.....	28
3.5.	Rekombinant Protein Analizleri	29
3.5.1.	Bradford Yöntemi	29
3.5.2.	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) Yöntemi	29
3.6.	PHA Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar, Besi Ortamı ve Çoğalma Koşulları	29
3.7.	PHA Üretim Miktarının Nile red Floresan Spektroskopisi ile Tayin Edilmesi.....	30
3.8.	DNS Yöntemi Kullanılarak Artık Glikoz Miktar Tayin Edilmesi.....	31
3.9.	PHA Ekstraksiyonu.....	31
3.10.	PHA Karakterizasyonu	32
3.10.1.	Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	32
3.10.2.	Termogravimetrik Analiz (TGA).....	32
3.10.3.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	32
3.10.4.	¹ H-NMR	32
3.10.5.	Gaz Kromatografisi Analizi (GC-FID)	33
4.	Sonuçlar ve Tartışma.....	34
4.1.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile <i>phaR</i> Geninin Çoğaltılması ...	34
4.2.	Elde Edilen Gen ve Vektör DNA'larının Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi	35
4.3.	Rekombinant Plazmidlerin <i>E. coli</i> DH5α'ya Aktarılması	36
4.4.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> Suşları ile PHA Üretimi.....	36
4.5.	<i>B. megaterium</i> Suşlarında Rekombinant PhaC ve PhaR Ekspresyonu 40	
4.6.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları ile Üretilen PHA Polimerlerinin Hücre İçinden Saflaştırılması.....	43

4.7. Rekombinant <i>B. megaterium</i> Suşları ile Üretilen PHA Polimerlerinin Karakterizasyonu.....	43
5. YORUM	53
KAYNAKLAR.....	55
EKLER	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. PHA'ları oluşturan monomerler ve polimer yapılarındaki PHA'lar [24].	7
Çizelge 2.2. Farklı doğal fenotip mikroorganizmalardan elde edilen PHA üretim verimleri.	9
Çizelge 2.3. Farklı rekombinant mikroorganizmalardan elde edilen PHA üretim verimleri.	11
Çizelge 2.4. PHA üretiminde var olan sorunlar, sebepleri ve çözüm yolları [71].	13
Çizelge 3.1. Klonlama aşamalarında kullanılan suşlar ve plazmidler.	19
Çizelge 3.2. İçerik ve miktarı PZR için optimize edilmiş reaksiyon karışımı	20
Çizelge 3.3. Çoğaltılması istenilen gen bölgesi için optimize edilmiş PZR reaksiyon parametreleri.	21
Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan primerler.	24
Çizelge 3.5. Ligasyon karışımı.	25
Çizelge 3.6. Hyp besi ortamı bileşenleri [149].	28
Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan primerlerin erime sıcaklıkları ve uzunlukları.	34
Çizelge 4.2. Kesme reaksiyonu	35
Çizelge 4.3. Ligasyon ürünleri.	36
Çizelge 4.4. PHA üretiminde kullanılan DNA dizini doğrulanmış rekombinant klonlar	38
Çizelge 4.5. Dehidre edilmiş maksimum biyokütle miktarı, maksimum PHA birikimi, kurutulmuş biyokütlenin PHA içeriği (%CDW) ve hacimsel verimlilik değerleri	38
Çizelge 4.6. Farklı saflaştırma yöntemleri ile edilen PHA ekstrasyon verimleri.	43
Çizelge 4.7. Orbital Çalkalamalı Biyoreaktörde üretilen PHA Polimerlerinin içeriği.	48
Çizelge 4.8. Rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları ile üretilen PHA polimerleri ve Ticari PHB'nin termal özellikleri.	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Biyopolimerlerin temel olarak iki sınıfa ayrılması [5].....	5
Şekil 2.2.	Biyobozunur polimer gruplarının bozunma şekillerine ve kaynaklarına göre sınıflandırılması [3].	5
Şekil 2.3.	Kısa ve orta zincir uzunluğuna sahip PHA'lar. 3HB = 3-hidroksibütirat, 3HV = 3-hidroksivalerat, 3HHx = 3-hidroksihekzanoat, 3HO = 3-hidroksioktanoat, 3HD = 3-hidroksidekanoat, 3HDD = 3-hidroksidodekanoat [15].	7
Şekil 2.4.	Farklı ko-polimer gruplarının kimyasal yapıları. Kısaltmalar: Polihidroksibütirat (PHB), Polihidroksibütirat-ko-valerat (PHBV), Poli-3-hidroksibütirat-ko-4-hidroksibütirat (P3HB-4HB), Polihidroksioktanoat (PHO), Poli-3-hidroksihekzanoat P(3HHx) [25].	8
Şekil 2.5.	Polihidroksialkanoatların (PHA) üretildiği metabolik yollar [66].....	12
Şekil 2.6.	Küresel PHA pazarının gelecek yıllardaki tahmini piyasa değeri [124].	17
Şekil 3.1.	Moleküler klonlama prosedürünün şematik gösterimi [148].....	23
Şekil 4.1.	phaR geninin (insert DNA) PZR sonrası agaroz jel görüntüsü. Marker (M):1 kb. phaR:656 bç.....	34
Şekil 4.2.	1-pC-HIS1623hp-phaC-phaR ve 2- pC-HIS1623hp-phaC vektörlerinin NdeI ve EcoRI kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü	37
Şekil 4.3.	Elde edilen üç farklı <i>B. megaterium</i> suşu ile orbital çalkalamalı biyoreaktörde gerçekleştirilen PHA üretiminde zamana bağlı hücre derişimi (Cx, düz çizgi) ve glikoz tüketimi (Cs, kesikli çizgi).	39
Şekil 4.4.	Farklı <i>B. megaterium</i> suşları ile gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen hücrelerin Nile red ile boyama sonrası floresan spektroskopisi sinyal yoğunlukları. Nile Red boyası hücre içi lipitleri boyamakta olup, sinyal yoğunluğu hücre içi PHA birikimi ile doğru orantılıdır.....	39
Şekil 4.5.	<i>B. megaterium</i> hücrelerinde %0,5 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan iki saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi	40

Şekil 4.6.	<i>B. megaterium</i> hücrelerinde %0,5 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan dört saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi.....	41
Şekil 4.7.	<i>B. megaterium</i> hücrelerinde %0,5, 0,75 ve %1,5 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan altı saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi	41
Şekil 4.8.	<i>B. megaterium</i> hücrelerinde %0,5 ve %1 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan altı saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi	42
Şekil 4.9.	<i>B. megaterium</i> hücrelerinde %0,75 ve %1 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan altı saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi	42
Şekil 4.10.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> ile elde edilmiş ve saflaştırılmış PHA'ların FTIR analizi. a) (r)- <i>B. megaterium</i> pC-HIS1623-hp-phaC ile elde edilen PHA b) <i>B. megaterium</i> pC-HIS1623-hp ile elde edilen PHA c) (r)- <i>B. megaterium</i> pC-HIS1623-hp-phaC-phaR ile elde edilen PHA.....	44
Şekil 4.11.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları tarafından sentezlenen ve saflaştırılan PHA örneklerinin 1H-NMR spektrumu. a) Ticari PHB örneği b) (r)- <i>B. megaterium</i> pC-HIS-phaC ile elde edilen PHA c) <i>B. megaterium</i> pC-HIS ile elde edilen PHA d) (r)- <i>B. megaterium</i> pC-HIS-phaC-phaR ile elde edilen PHA.....	47
Şekil 4.12.	Rekombinant <i>B. megaterium</i> suşları tarafından sentezlenen ve saflaştırılan PHA örneklerinin TGA analizi. a) (r)- <i>B. megaterium</i> pC-HIS-phaC-phaR ile elde edilen PHA, b) (r)- <i>B. megaterium</i> pC-HIS-phaC ile elde edilen PHA, c) <i>B. megaterium</i> pC-HIS ile elde edilen PHA.....	49
Şekil 4.13.	pC-HIS-phaC-phaR plazmidi içeren <i>B. megaterium</i> ile üretilen PHA	50
Şekil 4.14.	pC-HIS-phaC plazmidi içeren <i>B. megaterium</i> ile üretilen PHA.....	51
Şekil 4.15.	pC-HIS plazmidi içeren <i>B. megaterium</i> ile üretilen PHA.....	51
Şekil 4.16.	GC-FID Deneyinde Kullanılan PHA Kalibrasyon Eğrisi	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

s	Saniye
dk	Dakika
sa	Saat
kDa	Kilodalton
ng	Nanogram
μ L	Mikrolitre
g	Gram
μ m	Mikrometre
nm	Nanometre
μ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
mM	Milimolar
M	Molar

Kısaltmalar

3HB	3-Hidroksibütirat
3HV	3-Hidroksivalerat
3HO	3-Hidroksioktanoat
3HD	3-Hidroksidekanoik asit
3HDD	3-Hidroksidodekanoat
3HHX	3-Hidroksihekzanoat
4HB	4-Hidroksibütirat
Amp	Ampisilin
DNS	3,5-dinitrosalisilik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EtBr	Etidyum Bromür
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
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolisakkarit
mcl-PHA	Orta zincir uzunluklu polihidroksialkanoat
ScI-PHA	Kısa zincir uzunluklu polihidroksialkanoat
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
¹ H-NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
OD	Optik Yoğunluk
P(3HB-3HV)	Poli-3hidroksibütirat-ko-3hidroksivalerat
P(3HB-4HB)	3-Hidroksibütirat-ko-4-Hidroksivalerat
P(3HB-4HB-3HV)	Poli-3hidroksibütirat-ko-4hidroksibütirat-ko-3hidroksivalerat
P(3HB-3HV-3HHX)	Poli-3hidroksibütirat-ko-3hidroksivalerat-ko-3hidroksihekzanoat
P(3HB-3HO)	Poli-3hidroksibütirat-ko-3hidroksioktanoat
P(3HB-3HV-DHB)	Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat-ko-2,3-dihidroksibütirat)
PBA	Polibütilen adipat
PBS	Polibütilen süksinat
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PGA	Poliglikolit
PHA	Polihidroksialkanoat
PhaA	β-ketotiaz enzimi
PhaB	asetoasetil-KoA redüktaz enzimi
PhaC	PHA sentaz enzimi
PHB	Polihidroksibütirat
PHBV	Polihidroksibütirat-ko-hidroksivalerat
PHO	Poli (3-hidroksioktanoat)

PHV	3-Polihidroksivalerat
PVA	Polivinil Alkol
PVP	Polivinilpirolidon
PxyIA	PxyIA promotoru
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
r	Rekombinant
RE	Restriksiyon Enzimi
SacC	β -fruktofuranosidaz
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trikarboksilik Asit
Tet	Tetrasiklin
xyIA	xyIA geni

1. GİRİŞ

Plastik ürünlerin hızla artan üretimi ve tüketimi dünya için önemli bir çevre ve sağlık problemi haline gelmiştir. Plastik atıkların uzun süreler boyunca doğada kalabilmesi ve kanserojen bileşenler içermesi canlı sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedir. Binlerce yeni plastik ürünün üretimi ve geliştirilmesi II. Dünya Savaşı'ndan sonra hızlanmıştır ve böylece plastik ürün üretimi, tüketimi ve doğal ortamlarda birikmesi, modern çağın küresel bir problemi haline gelmiştir.

Plastik birikiminin denizsel ve karasal ekosistemlerde kolayca gözlemlenebilir olması plastik ürünlerin insanoğluna katkısından kaynaklanmaktadır. Plastikler, biyomedikal, havacılık, uzay, ulaşım ve yakıt sektörleri gibi günlük hayatta karşımıza çıkan her alanda sıklıkla kullanılmaktadır.

Günümüzde, tek kullanımlık plastikler her yıl üretilen plastiğin yüzde 40'ını oluşturmaktadır. Plastik poşetler ve yiyecek ambalajları gibi ürünlerin birçoğunun tüketim ömrü dakikalar ile saatler arasında olmasına rağmen çeşitli ekosistemlerde yüzlerce yıl kalmaktadır. Her yıl 4,8 ila 12,7 milyon ton arasında plastik atık okyanusları kirletmektedir [1]. Okyanusları kirleten plastiklerin büyük bir kısmını milimetre ölçeğinde olan mikroplastikler oluşturmaktadır. Deniz canlılarının vücudunda biriken mikroplastikler ise deniz ürünlerinin tüketimi ile insan vücudunda da birikime sebep olmaktadır [2].

Tek kullanımlık plastik atıklarının okyanus akıntıları ile taşınması ve denizel ekosistemi zehirlenmesi, karasal ekosistemlerde vahşi yaşama makro ve mikro boyutta zarar vermesi ve insan vücudu için kanserojen maddeler içeriyor olması, insanlığın plastik sorununun çözümüne odaklanmasını hızlandırmıştır.

Fosil yakıt kaynaklı geleneksel plastiklerin yerini alabilecek malzemeler uzun yıllardır tartışılmaktadır. Biyoplastikler, geleneksel plastiklerin yerini alabilecek alternatif malzemelerdir. Biyoplastiklere yönelik araştırmalar, atık halinde doğaya bırakıldığında dahi kendiliğinden bozunabilen ve canlı yaşamına zararlı olmayan biyoplastiklerin üretiminin artırılmasına yöneliktir. Biyoplastikler farklı kaynaklardan, farklı şekillerde üretilmekte ve şekillendirilebilmektedir.

Biyoplastiklerin yüksek şekillendirilebilme yetenekleri, onların tek kullanımlık geleneksel plastiklerin yerini alabilme ihtimallerini artırmaktadır. Günümüzde biyoplastiklerin karşılaştığı en büyük problem, üretim maliyetlerinin fosil yakıt kaynaklı geleneksel plastiklerin üretimi ile başa çıkamayacak kadar yüksek olmasıdır.

Doğada bozunabilen biyoplastiklerin üretim verimlerinin artırılması, üretim maliyetlerinin düşürülmesi ve kullanım alanlarının genişletilebilmesi adına yapılan araştırmalar tüm dünyada devam etmektedir. Biyoplastiklerin pek çok çeşidi bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi de polihidroksialkaonat (PHA)'lardır. PHA'lar çok çeşitli mikroorganizma grupları tarafından sınırlı besin koşullarında hücre içi polyester granülleri olarak üretilmektedirler. İkincil metabolit olarak hücre içinde biriken PHA'lar, mikroorganizma besin stresine girdiği zaman metabolize edilmektedir.

PHA, hücre içinde phaABC operonu tarafından üç aşamalı bir enzimatik yolla üretilmektedir. PHA üretim verimini artırmaya yönelik genetik çalışmalar ile birlikte üretim ortamının optimizasyonuna yönelik çalışmalar da gerçekleştirilmektedir. PHA'lar pek çok bitki, hayvan ve bakteri hücresi tarafından sentezlenmektedir. Sahip olduğu avantajlardan dolayı *Bacillus megaterium*, PHA üretiminde ön plana çıkmaktadır. Gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus megaterium*, PHA üretiminde gram-negatif bakterilere kıyasla ucuz karbon kaynaklarını kullanabilme ve dış membranlarında lipopolisakkarit (LPS) endotoksini içermemesi gibi avantajlara sahiptir.

Bu tez kapsamında; araştırma grubumuzda daha önce geliştirilmiş olan rekombinant pC-HIS1623-hp-phaC plazmidine, *phaC* geninin aktivitesini artıran *phaR* geni klonlanmış ve yeni, rekombinant bir plazmid elde edilmiştir. Rekombinant plazmidler sonrasında, *B. megaterium* NRRL B-14308 suşuna aktarılmış ve orbital çalkalayıcı biyoreaktörde PHA üretimi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak boş vektör pC-HIS1623-hp plazmidini de *B. megaterium* NRRL B-14308 suşuna aktarılmış ve elde edilen üç farklı suşun PHA üretim verimleri kıyaslanmıştır. SDS-PAGE analizi ile PhaC ve PhaR proteinlerinin rekombinant *B. megaterium* hücrelerinde ekspres edildiği belirlenmiştir. Üretilen PHA polimerleri çözücü ekstraksiyonu ile saflaştırılmış ve elde edilen polimerlerin yapısal ve termal özellikleri Gaz

Kromatografisi (GC-FID), Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FT-IR), Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi ($^1\text{H-NMR}$), Termogravimetrik Analiz (TGA) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) analizleri ile karakterize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyopolimerler

Biyopolimerler, geleneksel polimer kaynağı olan petrolden ziyade, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi canlı organizmalar tarafından üretilen veya bunlardan türetilen polimerlerdir. Biyopolimerlerin kaynakları yenilenebilir olup, çoğu biyopolimer biyolojik olarak parçalanabilmektedir (Şekil 2.1). Polietilen, polivinilklorür, polipropilen, polistiren ve polietilen tereftalat gibi geleneksel plastiklerin çoğu mikrobiyal metabolizmaya karşı dirençlidir, çünkü bu plastiklerin doğadaki görece kısa varlıkları sırasında mikroorganizmalar bu tür sentetik maddeleri parçalayabilen enzimler geliştirememişlerdir. Biyolojik olarak parçalanabilir olduğu bilinen birçok polimer aslında biyolojik olarak aşınabilir, hidrobiyolojik olarak parçalanabilir veya ışıkla biyolojik olarak parçalanabilir (Şekil 2.2). Bu farklı polimer sınıflarının tümü, çevresel olarak bozunabilir polimerler kategorisine girmektedir. Biyoplastiklerin çevresel olarak parçalanabilir olmaları kimyasal yapılarına bağlıdır [3].

2.1.1. Biyopolimer Grupları ve Sınıflandırılmaları

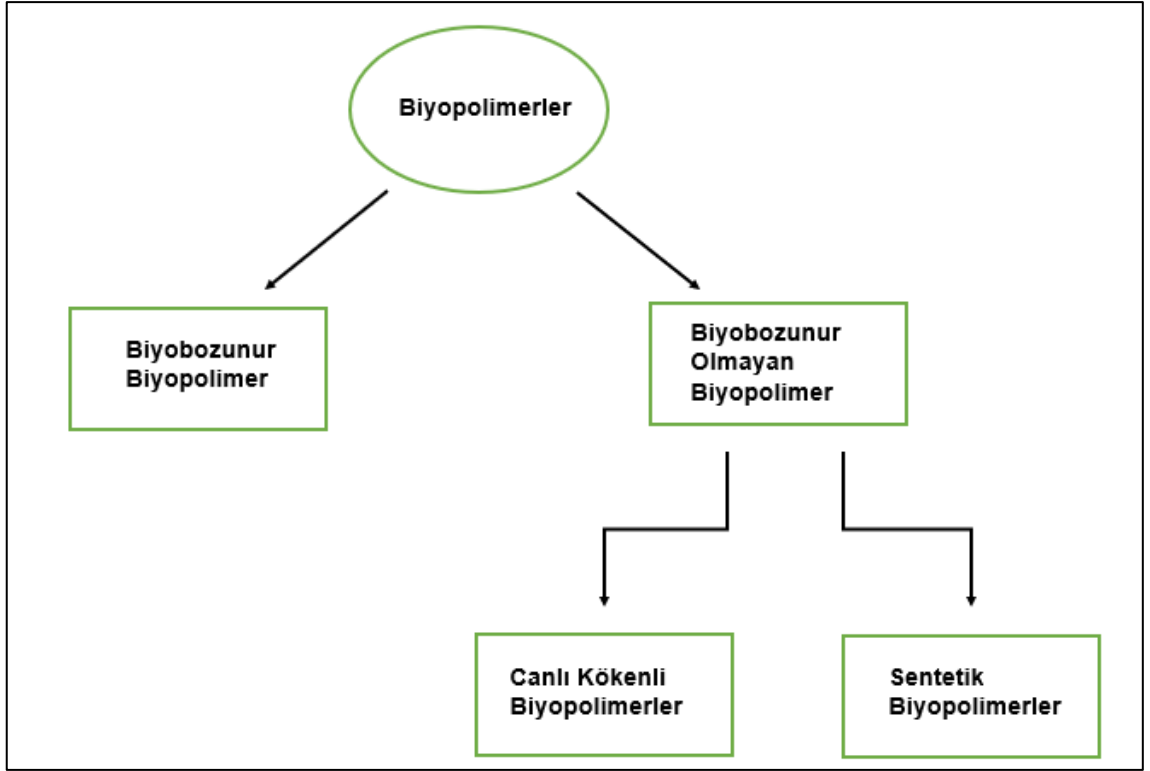
Biyopolimerler kökenlerine bağlı olarak üç tipte sınıflandırılmaktadır [3, 4]:

(i) Doğal biyopolimerler: Selüloz, Ksantan, Pullulan

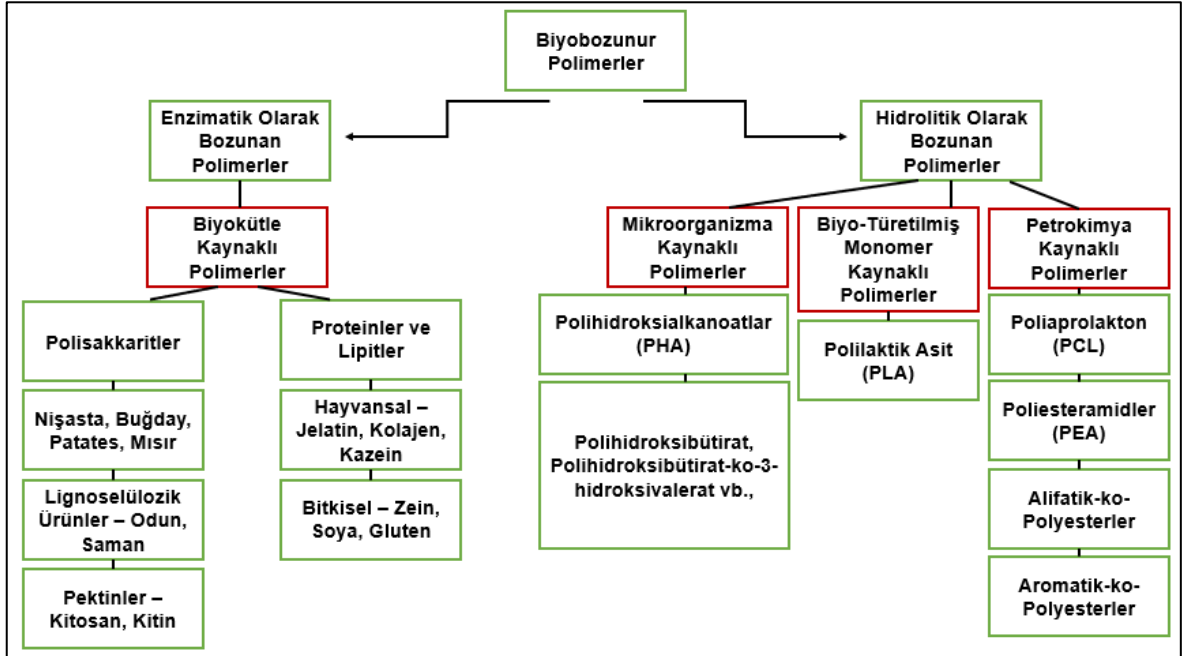
(ii) Sentetik biyopolimerler: Alifatik polimerler ve kopolimerleri: polilaktik asit (PLA), polikaprolakton (PCL), polibütülen süksinat (PBS), polibütülen adipat (PBA), poliglikolit (PGA)

(iii) Mikrobiyal biyopolimerler: Polisakkaritler ve proteinler

Bununla birlikte, biyopolimerlerin bozunabilirliği ve bozunma yolları da, biyoplastiklerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır.



Şekil 2.1. Biyopolimerlerin temel olarak iki sınıfa ayrılması [5].



Şekil 2.2. Biyobozunur polimer gruplarının bozunma şekillerine ve kaynaklarına göre sınıflandırılması [3].

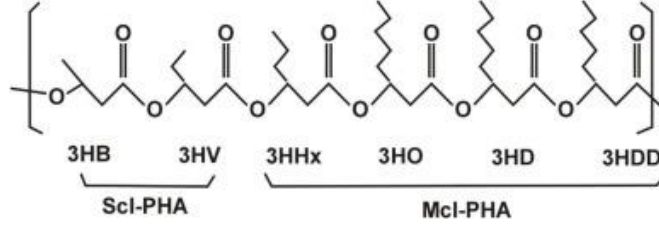
2.1.2. Biyopolimerlerin Kullanım Alanları

Biyopolimerler sahip oldukları çeşitli özellikler sebebiyle pek çok alanda kullanılmaktadır. Biyomedikal çalışmalarda klinik olarak cerrahi dikişler ve implantlar olarak kullanılan bozunabilir polimerler [6], gıda ve ambalaj endüstrilerinde biyobozunur doğal polimerik malzemeler, yenilebilir filmler ve kaplamalar, ambalaj malzemeleri, antimikrobiyal ve antioksidatif malzemelerin taşıyıcıları olarak kullanılmaktadır [7]. Su arıtımı ve nanoteknoloji çalışmalarında ise çeşitli nanokompozitlerin arsenik, kurşun ve diğer kirletici maddeler gibi toksik türleri temizleme kapasitesinin antimikrobiyal özelliklerle birleştirilmesi, elektriksiz çalışabilen uygun fiyatlı su arıtıcılarının üretilmesini sağlamaktadır [8-12].

2.2. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), hücre içi karbon ve enerji depolama bileşikleri olarak Gram-negatif bakteriler, Gram-pozitif bakteriler, siyanobakteriler ve arkeler dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalarda stres, besin-kısıtlı (sınırlı azot, fosfor, oksijen ve magnezyum) ve zengin karbonlu koşullar altında sentezlenen ve hücrelerin sitoplazmasında granüller halinde biriken hidroksialkanoatların (HA'lar) polyesterleridir. PHA'ların bileşenleri olarak 150'den fazla HA tespit edilmiştir; bu, termoplastik malzemelerin, monomer birimlerine bağlı olarak sert kristalin polimer veya elastik kauçuğa benzeyen çeşitli mekanik özelliklere sahip olmasını sağlamaktadır [13, 14]. PHA'lar, "yeşil plastik"ler olup, üretim ve geri dönüşüm açısından geleneksel plastiklerle karşılaştırıldığında olumlu sosyal ve çevresel etkiye sahiptirler. Bu biyoplastikler, kalıcılık veya kirliliğe neden olmadan düzenli depolama gereksinimlerini azaltmak için yenilenebilir ve sürdürülebilir kaynaklardır [15]. Bununla birlikte, PHA'lar *in vivo* kullanıldığında akut ve kronik sağlık sorunlarına sebebiyet vermemektedir.

PHA'lar genellikle kısa zincir uzunluğunda PHA (scl) (monomer alt birimlerinde 3-5 karbon atomu) ve orta zincir uzunluğunda PHA (mcl) (monomer alt biriminde 6-14 karbon atomu) (Şekil 2.3) olarak sınıflandırılmaktadır [16].



Şekil 2.3. Kısa ve orta zincir uzunluğuna sahip PHA'lar. 3HB = 3-hidroksibütirat, 3HV = 3-hidroksivalerat, 3HHx = 3-hidroksihekzanoat, 3HO = 3-hidroksioktanoat, 3HD = 3-hidroksidekanoat, 3HDD = 3-hidroksidodekanoat [15].

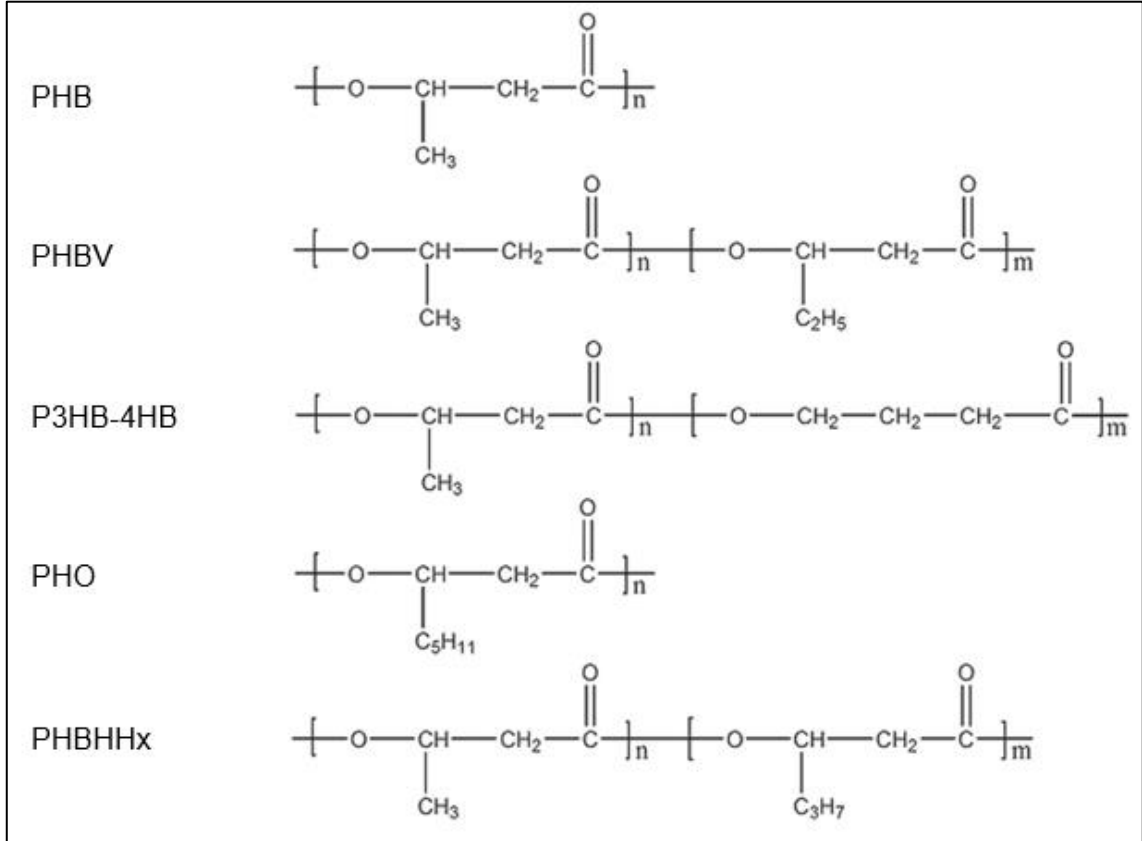
2.2.1. Polihidroksialkanoat Türleri ve Kaynakları

PHA'lar yapılarına göre çok farklı türde ve özellikte bulunmaktadır. Bununla birlikte farklı monomerik yapılardaki hidroksialkanoatlar farklı yapılarda PHA'ları meydana getirmektedir. (Çizelge 2.1). Sahip oldukları farklı kimyasal yapılar onlara çok çeşitli fiziksel özellikler sağlamaktadır. Tam biyoyumluluk eksikliği, kırılabilirlik, düşük termal kararlılık nedeniyle PHA'ların tek başlarına kullanımları yaygın değildir ve PHA'ların bir kopolimer yapıya sahip olmaları gerekmektedir (Çizelge 2.1, Şekil 2.4). Mikrobiyal üretim [17], birleştirme [18], makro başlatma [19], trans-esterifikasyon [20], radyasyon aşılama [21], klik reaksiyonları [22], halka açma [23] gibi yöntemler polimerizasyonu gerçekleştirmek için kullanılmaktadır .

Çizelge 2.1. PHA'ları oluşturan monomerler ve polimer yapılarındaki PHA'lar [24].

Monomer (M) veya Polimer (P) Yapısı	Yapı Adının Kısaltması
3-Hidroksibütirik asit (M)	3HB
3-Hidroksivalerik asit (M)	3HV
3-Hidroksioktanoat (M)	3HO
3-Hidroksidekanoik asit (M)	3HD
4-Hidroksibütirik asit (M)	4HB
Poli-3hidroksibütirat-ko-3hidroksivalerat (P)	P(3HB-3HV)

Poli-3hidroksibütirat-ko-4hidroksibütirat-ko-3hidroksivalerat (P)	P(3HB-4HB-3HV)
Poli-3hidroksibütirat-ko-3hidroksivalerat-ko-3hidroksiheksanoat (P)	P(3HB-3HV-3HHX)
Poli-3hidroksibütirat-ko-3hidroksioktanoat (P)	P(3HB-3HO)
Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat-ko-2,3-dihidroksibütirat) (P)	P(3HB-3HV-DHB)



Şekil 2.4. Farklı ko-polimer gruplarının kimyasal yapıları. Kısaltmalar: Polihidroksibütirat (PHB), Polihidroksibütirat-ko-valerat (PHBV), Poli-3-hidroksibütirat-ko-4-hidroksibütirat (P3HB-4HB), Polihidroksioktanoat (PHO), Poli-3-hidroksiheksanoat P(3HHx) [25].

Farklı kopolimer yapılarına sahip PHA'lar çok çeşitli karbon kaynaklarını kullanan doğal fenotip ve/veya rekombinant mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir [26]. PHA üretimi yapan türler geniş bir verim yelpazesine sahiptir (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3). Çok farklı PHA üretici mikroorganizma türünde hücre içinde PHA birikimi gerçekleşmektedir [14]. *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Cupriavidus necator*, *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas putida*, *Haloferax mediterraneai*, rekombinant *Escherischia coli*, *Synechococcus* MA19 ve *Nostoc muscorum* literatürde PHA üretim kapasitesine sahip olduğu belirtilen mikroorganizmalardır [17, 27-35]. Çizelge 2.2' görüldüğü gibi çok farklı PHA üretim verimlerine sahip mikroorganizma cinsleri bulunmaktadır. Her ne kadar *B. megaterium* NRRL B-14308'den daha yüksek üretim verimine sahip mikroorganizmalar bulunsa da, *B. megaterium* ile üretilen PHA'ların yüksek hidroksivalerat birimleri içeren PHA'lar olması, endotoksin barındırmaması sebebiyle daha güvenli üretim süreçlerine ve yüksek biyoyoumluluk özelliklerine sahip olması sebebiyle yüksek bir ticari değeri bulunmaktadır. Üretilen PHA'ların ticari değerini belirleyen önemli bir unsur da polimerlerin içerisinde var olan kopolimer yapılarıdır [36].

Çizelge 2.2. Farklı doğal fenotip mikroorganizmalardan elde edilen PHA üretim verimleri.

Mikroorganizma	PHA	Substrat	PHA Derişimi (g L ⁻¹ Hücre Çoğalma Ortamı)	% Kütlece PHA	Ref.
<i>B. megaterium</i> CCM2307	3HB	Peynir Altı Suyu	1,5	51	[37]
<i>Methylobacterium</i> sp. ZP24	3HB	Peynir Altı Suyu	2,1	67	[38]
<i>B. megaterium</i> uyuni S29	3HB	Glikoz	2,1	41	[39]
<i>Halomonas halophila</i> CCM 3662	3HB	Glikoz	3,7	72	[40]

<i>Haloferax mediterranei</i> ATCC 33500	3HB-ko-3HV	Glikoz ve Galaktoz	4,0	53	[41]
<i>C. necator</i> DSM 545	3HB	Atık Gliserol	51,2	62	[42]
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 126	3HB	Atık Gliserol	11,0	50	[42]
<i>B. megaterium</i> BA-019	3HB	Şeker Kamışı Pekmezi	1,7	46	[43]
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	3HB	Buğday Samanı	3,7	49	[44]
<i>Pseudomonas pseudoflava</i> ATCC 33668	3HB	Buğday Samanı	0,9	22	[44]
<i>C. necator</i> H16	3HB	Atık Kolza Yağı	4,9	62	[45]
<i>Halomonas hydrothermalis</i>	3HB-ko-3 HV	Ham Levulinik Asit	1,1	73	[46]
<i>Burkholderia sacchari</i> DSM 17165	3HB	Gliserol	10,2	23	[47]
<i>B. cepacia</i> IPT 048	3HB	Küspe Hidrolizatı	2,3	53	[48]
<i>B. cepacia</i> IPT 048	3HB	Ksiloz ve Glikoz	34,8	57	[48]
<i>C. necator</i> DSM4058	3HB	Ham Gliserol	24,0	48	[49]
<i>C. taiwanensis</i>	3HB-ko-3HV	Mısır Nişastası	2,1	65	[50]
<i>Massilia sp.</i> UMI-21	3HB	Niştasta (<i>Ulva</i> sp. – Deniz Marulu)	3,8	45	[51]
<i>Z. denitrificans</i> MW1	3HB	Atık Gliserol	54,5	67	[52]

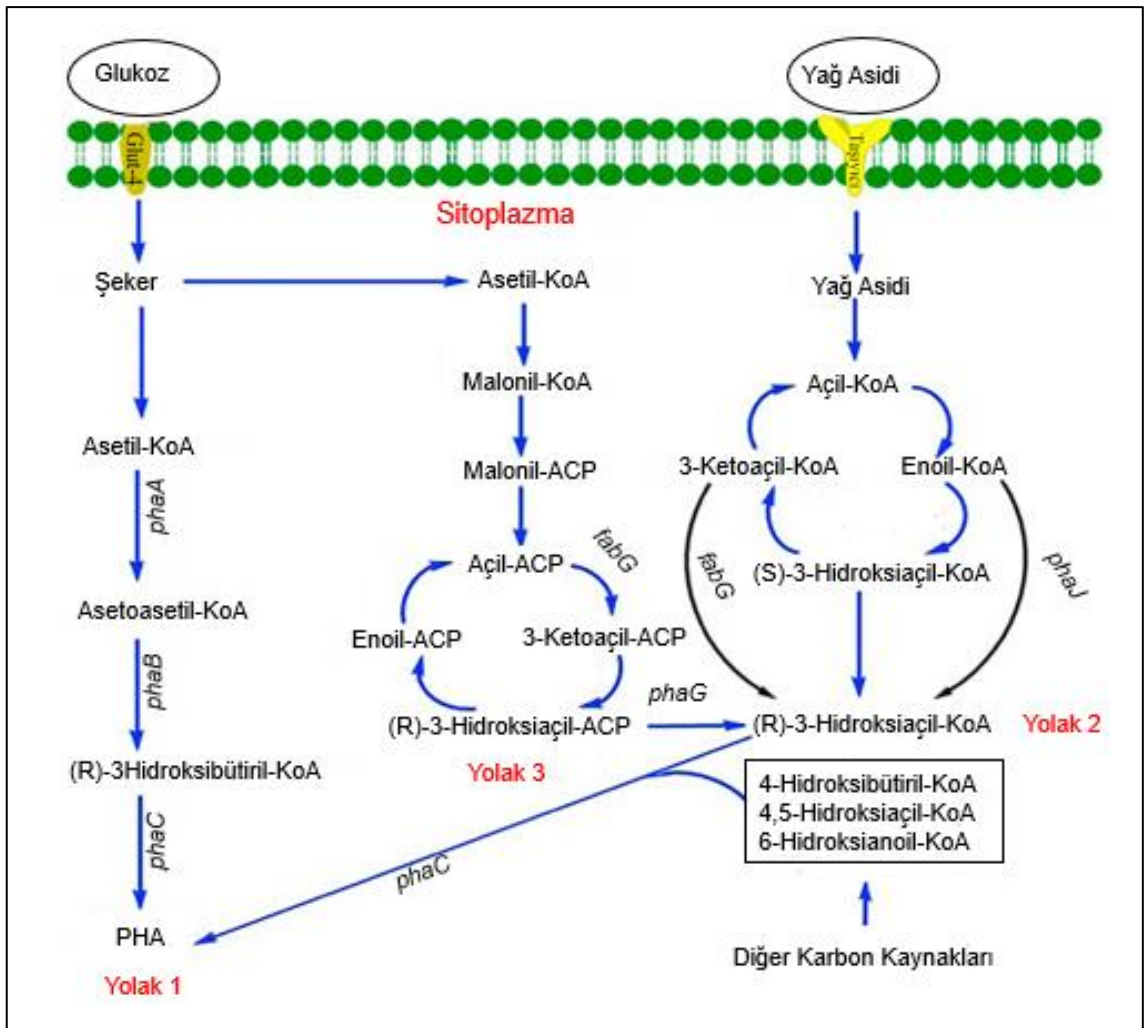
Çizelge 2.3. Farklı rekombinant mikroorganizmalardan elde edilen PHA üretim verimleri.

Mikroorganizma	PHA	Substrat	PHA Derişimi (g L ⁻¹ Hücre Çoğalma Ortamı)	% Kütlece PHA	Ref.
<i>E. coli</i> Δ arcA	3HB	Peynir Altı Suyu	51,1	73	[53]
<i>E. coli</i> (<i>phaC1</i>)	3HB	Şeker Kamışı Pekmezi	3,0	75	[54]
<i>Halomonas</i> spp. TD04	3HB-ko-3HV	Propiyonik Asit	8,3	83	[55]
<i>E. coli</i> CGSC 4401 (<i>pJC4</i>)	3HB	İşlenmiş Sığır Peynir Altı Suyu Çözeltisi	96	80	[56]
<i>C. necator</i> NCIMB11599	3HB	Sükroz	2,0	73	[57]
<i>E. coli</i> SKB99	3HB	Nişasta	1,2	57	[58]
<i>E. coli</i> TG1	3HB	Ham Gliserol	10,1	46	[59]
<i>Halomonas bluephagenesis</i> TD01 Δ gabD2	PHB	Glikoz	13,3	62	[60]
<i>H. bluephagenesis</i> TD01	3HB-ko-4HB	Glikoz	11	85	[61]
<i>E. coli</i> DH5 α	3HB	Şeker Kamışı	0,56	23	[62]
<i>E. coli</i> W Δ cscR	3HB	Sükroz	47,7	46	[63]

2.2.2. PHA Üretim Genleri ve Metabolik Yolları

PHA'lar arasında, polihidroksibütirat (PHB) ve poli (hidroksibütirat-ko-hidroksivalerat) (PHBV) biyopolimerleri, scl-PHA ailesinin en iyi bilinen üyeleridir. Scl-PHA sentezi, phaABC operonu tarafından üç aşamalı bir enzimatik yolla meydana gelmektedir (Şekil 2.5). β -ketotiaz (PhaA), trikarboksilik asit

döngüsünde (TCA) asetoasetil-KoA elde etmek üzere PHB sentetik yolunun öncüsü olan iki asetil molekülünün yoğunlaşmasını katalize etmektedir. Asetoasetil-KoA molekülü, NADH'ye bağlı asetoasetil-KoA redüktaz (PhaB) ile 3-hidroksibütiril-KoA'ya indirgenmektedir. Son olarak, 3-hidroksibütiril-KoA, PHA sentez enzimi (PhaC) ile polimerize edilmektedir. PhaC enzimleri, KoA'yı serbest bırakarak KoA substratının açıl parçasını polimerize etmekte, böylece PhaC enzimleri, hücrelerde lipid granülleri olarak biriken uzun poliester zincirleri üretmektedir [64, 65].



Şekil 2.5. Polihidroksialkanoatların (PHA) üretildiği metabolik yollar [66].

PHA sentazlar büyüklüklerine, alt birim kompozisyonlarına ve substrat özelliklerine göre dört sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I ve Sınıf II PHA sentazlar bir alt birimden (PhaC) oluşmaktadır. Sınıf I PHA sentazlar (*Ralstonia eutropha*) esas olarak scl-PHA'ları polimerize ederken, Sınıf II PHA sentazlar (*Pseudomonas*) mcl-PHA'ları polimerize etmektedir. Sınıf III ve Sınıf IV PHA sentazlar (sırasıyla *Allochromatium vinosum* ve *Bacillus megaterium*) iki hetero alt üiteden oluşmaktadır. Sınıf III ve Sınıf IV (40 kDa) katalitik alt ünite PhaC enzimlerinin, PhaC enzim aktivitesini yürütmek için ikincil alt birimlere, sırasıyla PhaE ve PhaR'ye ihtiyacı vardır [64, 67].

2.2.3. PHA Üretiminde Verim Artırmaya Yönelik Yapılan Çalışmalar

PHA'nın büyüyen pazarına rağmen petrol kullanımının gelecek yıllarda azalacağı düşünülmemektedir. Bu durum PHA'yı düşük maliyetli petrol bazlı plastiklere kıyasla daha az rekabetçi hale getirmektedir. Bununla birlikte, PHA üretiminde var olan ve fiyat-performans dengesini etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır (Çizelge 2.4). Bu nedenle, bu zorluğun üstesinden gelmek için çeşitli stratejiler benimsenmiştir: PHA üreticisi olmayan türlere PHA sentez özelliklerinin kazandırıldığı genetik çalışmalar [68-71] ve PHA sentez yoluna rakip metabolik yolların ortadan kaldırıldığı metabolik müdahale çalışmaları [63, 72-75] gerçekleştirilmektedir. Ayrıca, yüksek üretim verimi olan türlerin [76-79] ve alternatif karbon kaynaklarının araştırılması da yapılmaktadır [80-83].

Çizelge 2.4. PHA üretiminde var olan sorunlar, sebepleri ve çözüm yolları [71].

Problem	Sebep	Çözüm
Yüksek enerji talebi	Sterilizasyon ve yoğun havalandırma	Steril olmayan ve mikro-aerobik süreçler
Substrat-PHA dönüşüm oranının az olması	Substratların farklı materyallerin üretiminde kullanılması	PHA ile ilgisiz yolları silme veya zayıflatma

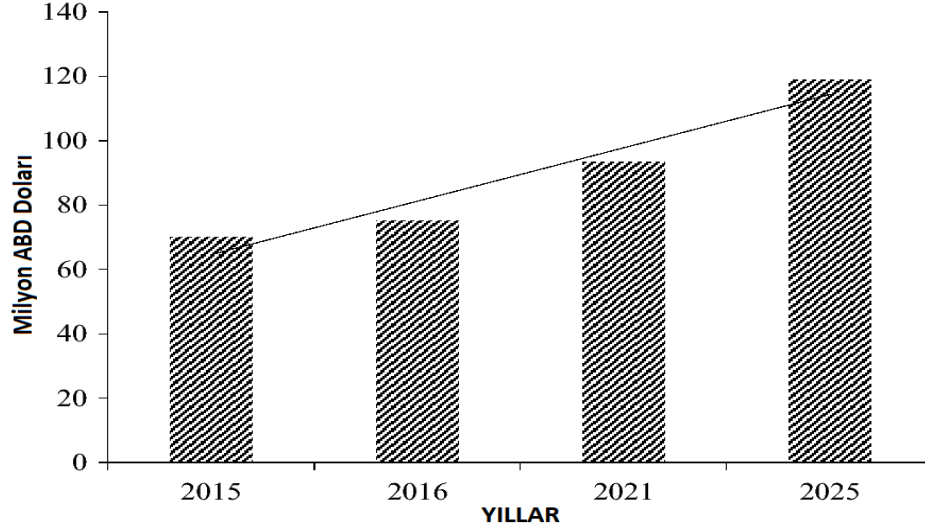
Kararsız PHA yapıları	PHA öncüllerini tüketen birden çok yolun bulunması	PHA ile ilgisiz yolları silme veya zayıflatma
Devamlı olmayan üretim süreçleri	Olası kontaminasyondan kaçınmak	Kontaminasyon dirençli suşların kullanılması
Pahalı downstream süreçleri	Ürünlerin saflaştırılması ve eldesinde var olan karmaşıklık	Morfoloji mühendisliği
Düşük üretim verimi	Doğal olarak PHA üreten mikroorganizmaların az miktarda PHA üretmesi	Genetik mühendisliği
Üretim ortamında bulunan karbon kaynağının yüksek maliyeti	Üretimi gerçekleştiren mikroorganizmanın karbon kaynağına yönelik talebi	Mikroorganizmaların kullanabileceği ucuz karbon kaynaklarının araştırılması

PHA üretim verimlerinin artırılmasına yönelik çalışmalar Çizelge 2.4'te bahsedildiği gibi çok yönlü olarak sürdürülmektedir. Bu çalışmaları kısaca özetlemek gerekirse; yağ asidi substratları çoğunlukla 3-hidroksiasil-KoA'ya dönüştürüldüğünden, *Pseudomonas putida* veya *P. entomophila*'nın beta-oksidadasyon yolundaki FadA ve FadB enzimlerinin silinmesiyle PHA'ya substrat dönüşüm verimliliği önemli ölçüde iyileştirilmiştir [84-86]. Beta-oksidadasyon yolu silinmiş *Pseudomonas spp.* suşlarının homopolimer, blok veya rastgele kopolimerler şeklinde 3-hidroksiheksanoat (3HHx), 3-hidroksioktanoat (3HO), 3-hidroksidekanoat (3HD) ve 3-hidroksidodekanoat (3HDD) ürettiği bildirilmiştir [87]. *Pseudomonas putida* KT2442, *Ralstonia eutropha*, *Burkholderia thailandensis*, *C. necator* H16, *Salinivibrio sp.* M318 gibi PHA üretici mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen ve atık kolza tohumu, atık patates nişastası, soya fasulyesi yağı, atık balık yağı, gliserol ve palmye yağı gibi hayvansal ve bitkisel kökenli atıkların karbon kaynağı olarak kullanıldığı

çalışmalarda 1,6 g/L ila 94 g/L PHA verimleri elde edilmiştir [50, 88-92]. Yapılan bu çalışmalar ile bitkisel ve hayvansal atıkların karbon kaynağı olarak kullanılmasının büyük bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Arabinoz, sükroz, ksiloz ve gliserol gibi karbon kaynaklarını kullanma yeteneği olmayan suşlara bu karbon kaynaklarını kullanmaları için genetik modifikasyon uygulama çalışmaları literatürde yer almaktadır. *Mannheimia succiniciproducens*'ten elde edilen β -fruktofuranosidaz (SacC) ile sükroz kullanma yeteneği kazandırılmış *E.coli* DH5 α suşuna, *Ralstonia eutropha*'dan elde edilen PHA sentez operonu olan phaCAB aktarılmış ve 0,67 g/L PHA verimi elde edilmiştir [93]. Bununla birlikte, ucuz karbon kaynaklarını kullanma yeteneği bulunan türlere PHA sentez genlerinin aktarıldığı çalışmalar da mevcuttur. *Alcaligenes eutrophus*for PHA sentez genleri, PHA negatif bir mikroorganizma olan *Escherichia coli* GCSC 6576 suşuna aktarılmış ve peynir altı suyunun karbon kaynağı olarak kullanıldığı üretimlerde 5,2 g/L PHA üretim verimi elde edilmiştir [94, 95]. Devamlı olmayan üretim süreçleri gerçekleştirebilmek için ekstromofil mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır. Yüksek miktarda tuz bulunan ortamda çoğalma yeteneğine sahip kontaminasyon dirençli *Halomonas* TD01 suşu ile PHBV polimerleri üretilmiş ve kuru hücre ağırlığının %70'i kadar PHBV üretilmiştir [96]. Üretim sonrası gerçekleştirilen saflaştırma süreçlerinin yüksek maliyetli olması, araştırmaları morfoloji mühendisliğine yönlendirmektedir. *Escherichia coli* JM109SG suşunda aktin benzeri proteinleri ifade eden *mreB* geninin silinmesi ile hücre iskeleti zayıflatılmış ve hücre içi hacim arttırılmıştır. Bu sayede hücre içi PHB birikimi %100'e ulaşmış ve saflaştırma süreçlerinde maliyet düşürülmüştür [97]. Üretim ortamları için gerçekleştirilen sterilizasyon ve havalandırma işlemleri maliyetleri yükseltmektedir. Mikro-aerobik üretim ortamlarında çoğalabilen ve ek sterilizasyon işlemlerine gerek duymayan suşların kullanılması ile üretim maliyetleri düşürülmektedir. Düşük miktarda havalandırmanın bulunduğu ve yüksek miktarda tuz içeren ortamlarda çoğalma yeteneğine sahip *Halomonas venusta* KT832796 suşu kullanılarak mikro-aerobik ve steril olmayan bir ortamda PHA üretimi gerçekleştirilmiş ve herhangi bir kontaminasyon gerçekleşmeden 3,86 g/L verimde PHB üretilmiştir [98].

2.2.4. PHA Kullanım Alanları, Ekonomisi ve Geleceği

Biyoplastiklerin pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Kullanım alanlarının genişliği, üretilen polimerlerin fiziksel ve kimyasal yapılarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Kopolimer yapıları değiştikçe PHA'ların kullanım alanları da değişmektedir. Çeşitli türler tarafından üretilen farklı kopolimer yapılarına sahip PHA'ların biyomedikal kullanımları şu şekilde özetlenebilir; mide duvar yaması [99], ilaç taşınımında ajan [100], protein saflaştırma prosesi reaktifi [100], klinik tanı antikör reaktifi, sığır tüberkülozu teşhisi reaktifi [101], aşı taşıma ajanı [102], mikro plastik parçacıkları [103, 104], tıbbi yaklaşımlarda biyo-görüntüleme için nano/mikro cihaz [105], spesifik antijene bağlanmış ve floresan ile aktive edilmiş hücre sıralama tabanlı tanılama malzemesi [106], endotoksin giderimi reaktifi [107], miyokardiyal yama [108, 109], kemik iyileşmesinde biyomalzeme [110-113], stent [114], kıkırdak doku mühendisliğinde biyomalzeme [115, 116], doku mühendisliği için iskele [117, 118], implant ve biyolojik doku arasında bağlayıcı [119], elastik membran [120], metisilin dirençli mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ajan [121, 122] ve sıçanlarda deri altı yama [123]. Bölüm 2.1.2'de bahsedildiği gibi biyopolimerler pek çok farklı alanda kullanıma sahiptir. Bu kullanımların önemli bir kısmını bu bölümde anlatıldığı üzere PHA'lar oluşturmaktadır. Gelişen teknolojiler ve sayısı her geçen gün artan akademik çalışmalar ile birlikte PHA'lar pek çok alanda geleneksel plastiklerin yerini almaktadır. PHA üretim veriminin artırılması ile birlikte üretim maliyetleri de önemli miktarda düşmektedir. Bu düşüş, PHA'lara yönelik ilgiyi her geçen gün artırmaktadır. 2015 yılında 60 milyon ABD doları olan küresel PHA pazarı, 2016 yılında 80 milyon ABD dolarına yaklaşmıştır [124]. Küresel PHA pazarının, gerçekleştirilen araştırmalar ve düşen üretim verimleri sayesinde gelecek yıllarda daha da büyüyeceği tahmin edilmektedir. (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Küresel PHA pazarının gelecek yıllardaki tahmini piyasa değeri [124].

2.3. Endüstriyel Bir Üretici Olarak *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium suşlarının çok geniş bir ekolojik habitat yelpazesi bulunmaktadır. Genel olarak bir toprak mikroorganizması olarak kabul edilse de deniz, pirinç tarlaları, balıkların ve bal arılarının sistemlerinde de bulunabilmektedir. Bununla birlikte kullanışlı enzimlerin ve ürünlerin üretimi için de geniş çapta kullanılan bir mikroorganizmadır. Aynı zamanda sporlaşma yeteneğine de sahiptir. Basit bir hücre farklılaşma döngüsü bulunduğu için gen düzenlemeleri ve morfolojik araştırmalar için bir model görevi görmektedir. *B. megaterium*, penisilin amidaz, steroid hidrolazlar ve B₁₂ vitamini gibi ticari açıdan önemli ürünler ürettiği için büyük bir ekonomik öneme sahip olmaktadır [125]. Bu ürünlerle birlikte PHB, bakteriyosin, şikimik asit, çeşitli lipopeptitler, megasin A-216, oksetanosin A, α -amilaz, β -amilaz, megacin BII gibi ticari önemi bulunan maddelerin üretimi de *B. megaterium* tarafından gerçekleştirilmektedir [126-136]. Ayrıca, *B. megaterium* suşları kullanılarak altın ve bakır gibi elementlerin geri kazanımı ve tarım zararlılarının kontrolü de gerçekleştirilmektedir [137, 138].

B. megaterium'un PHA üretiminde gram-negatif bakterilere kıyasla ucuz karbon kaynaklarını kullanabilmesi, dış membranlarında lipopolisakarit (LPS) endotoksini içermemesi [139], kolay genetik modifikasyonları [132, 140, 141] ve

biyolojik üretim süreçleri için uygun bir mikroorganizma olması [142], onu PHA üretimi için iyi bir aday yapmaktadır.

2.4. *Bacillus* Ekspresyon Sistemleri

Bacillus megaterium, çeşitli proteinlerin üretiminde yüksek kararlılıkta ve verimde olması, *E. coli* gibi model organizmalar ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir çoğalma oranına sahip olması, endotoksin bulundurmaması, indüklemeye 5 saat sonra bile proteaz aktivitesinin gerçekleşmemesi ve patojen olmaması gibi özellikleriyle rekombinant protein üretimlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Rekombinant protein üretimlerinin *Bacillus megaterium*'da gerçekleştirilmesinin sağlanması amacıyla çeşitli vektör plazmidler geliştirilmiştir [143-146]. *B. megaterium*'un karbon metabolizması için genetik düzenleyici unsurlarından biri, Rygus ve Hillen tarafından araştırılmış ve iyi karakterize edilmiş ksiloz operonudur [147]. *Bacillus* türlerinde en çok kullanılan vektörler ksiloz ile uyarılabilir vektörlerdir ve bu türler için geliştirilen vektörler, ksiloz uyarımından sonra transkripsiyonu aktive etmektedir. *Bacillus* türleri için geliştirilen klasik vektörlerin yanı sıra, son yıllarda yüksek performanslı ekspresyon vektörleri geliştirilmiştir. Bu yüksek performans ekspresyon vektörleri, klasik vektörlerde bulunan promotor P_{xylA}'nın modifikasyonu ile elde edilmektedir. Rekombinant *Bacillus* suşları için geliştirilen vektörlerden bazıları hedef genlerin ekspresyonunu artıracak, bazıları ise azaltacak şekilde geliştirilmektedir. Hedef genin ksiloz uyarımını sağlayan *xylA* geninin içerisine aktarılacak şekilde tasarlanması durumunda yeni durdurma kodonları oluşabilmektedir. Rekombinant *Bacillus* türleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda hedef genin verimini artırma ve rakip metabolik yolları ortadan kaldırma gibi amaçlara yönelik vektör seçimi ve tasarımı gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, transforme edilmiş hücrelerin içindeki vektör kopya sayıları da rekombinant protein üretimlerinde önemli bir unsurdur. Hedef proteinin özelliklerine ve yapısına göre düşük kopya sayılı vektörler veya yüksek kopya sayılı vektörler *Bacillus* türleri için kullanılmaktadır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Mikroorganizmalar, Çoğalma Ortamları ve Plazmidler

Moleküler biyoloji ve klonlama çalışmalarında *E. coli* DH5 α suşu, biyopolimer üretim çalışmalarında ise *B. megaterium* NRRL-B 14308 ve rekombinant *B. megaterium* suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.1). *B. megaterium* genomundan PZR ile elde edilen *phaR* geni araştırma grubumuzda geliştirilen pC-HIS1623hp-*phaC* plazmidine aktarılmıştır (EK-1). Elde edilen pC-HIS1623hp-*phaC*-*phaR*-GGs-6His rekombinant plazmidi *B. megaterium*'a aktarılmıştır.

E. coli suşları Lysogeny Broth (LB: 10 g/L NaCl, 10 g/L tripton, 5 g/L maya ekstraktı) besi ortamında çoğaltılmıştır. 15 g/L agar LB ortamına eklenmiş ve katı çoğalma ortamı elde edilmiştir. Hazırlanan katı çoğalma ortamları, otoklavda steril edildikten sonra oda koşullarında muhafaza edilmiştir. Plazmid stabilitesinin sağlanabilmesi için *E. coli*'nin bulunduğu çoğalma ortamında 100 μ g/mL ampisilin (Amp^R), *B. megaterium*'un bulunduğu çoğalma ortamına 10 μ g/mL tetrasiklin (Tet^R) eklenmiştir. Mikroorganizmaların -80°C'de uzun süre depolanabilmesi için kültür ortamından alınan örnekler %15 gliserol (v/v) çözeltisine aktarılmıştır.

Çizelge 3.1. Klonlama aşamalarında kullanılan suşlar ve plazmidler

İsim	Açıklama	Kaynak
Suşlar		
<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 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44, thi-1, gyrA96, relA1	Ticari Firma, ABD
Plazmidler		
pC-HIS1623hp	Ekspresyon vektörü, Amp ^R (<i>E. coli</i>) ve Tet ^R (<i>Bacillus</i>)	Ticari Firma, Almanya

pC-HIS1623hp-phaC-GGS-6His	Gly-Gly-Ser bağlayıcı ve 6xHis-etiketli bir ksilozla uyarılabilir promotorun <i>phaC</i> gen aktarımına sahip pC-HIS1623hp türevi	H.Ü. Bilimsel Araştırma Projesi (FBB-2016-11851)
pC-HIS1623hp-phaC-phaR-GGS-6His	Gly-Gly-Ser bağlayıcı ve 6xHis-etiketli bir ksilozla uyarılabilir promotorun <i>phaC-phaR</i> gen aktarımına sahip pC-HIS1623hp türevi	Bu çalışma

3.2. Moleküler Biyoloji ve Genetik Mühendisliği Yöntemleri

Tez çalışmasında gerçekleştirilen moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği yöntemleri standart protokollere göre gerçekleştirilmiştir [148]. Klonlama akış şeması (Şekil 3.1) aşağıda gösterilmiştir.

3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çoğaltılması istenilen DNA dizisi PZR ile termal döngü cihazı kullanılarak çoğaltılmıştır. 50 µL hacmindeki reaksiyon karışımı buz içerisinde hazırlanmış olup, içeriği Çizelge 3.3'teki gibidir:

Çizelge 3.2. İçerik ve miktarı PZR için optimize edilmiş reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktarı
5X PZR reaksiyon tamponu	10 µL
dNTP (10 mM stok)	1 µL
İleri primer (10µM stok)	1 µL
Geri primer (10µM stok)	1 µL
Şablon DNA	1 µL (~100 ng)
OneTaq DNA polimeraz	0,2 µL
MgCl ₂	0,5 µL
Steril dH ₂ O	35,3 µL

Polimeraz zincir reaksiyonu işleminde gerçekleştirilmiş döngü sayısı ve sıcaklık değerleri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Sonrasında, PZR ürününden 10 µL alınmış, %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve jelin görüntüsü alınmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonrası DNA'nın Saflaştırılması

PZR işlemi sonrasında, PZR saflaştırma kiti ve üretici firmanın protokolü kullanılarak PZR reaksiyonundan arda kalan nükleotidlerin, primerlerin, tuzların ve DNA polimerazın uzaklaştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 µL'lik EB tampon ile saflaştırılan DNA örneklerinin elüsyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Çoğaltılması istenilen gen bölgesi için optimize edilmiş PZR reaksiyon parametreleri

1 döngü	$T_1 = 94^{\circ}\text{C}$	30 saniye
35 döngü	$T_1 = 94^{\circ}\text{C}$	30 saniye
	$T_2 = 56^{\circ}\text{C}-59.5^{\circ}\text{C}$ (Her döngüde $0,1^{\circ}\text{C}$ artarak)	30 saniye
	$T_3 = 68^{\circ}\text{C}$	70 saniye
1 döngü	$T_3 = 68^{\circ}\text{C}$	5 dakika
1 döngü	$T_4 = 8^{\circ}\text{C}$	∞

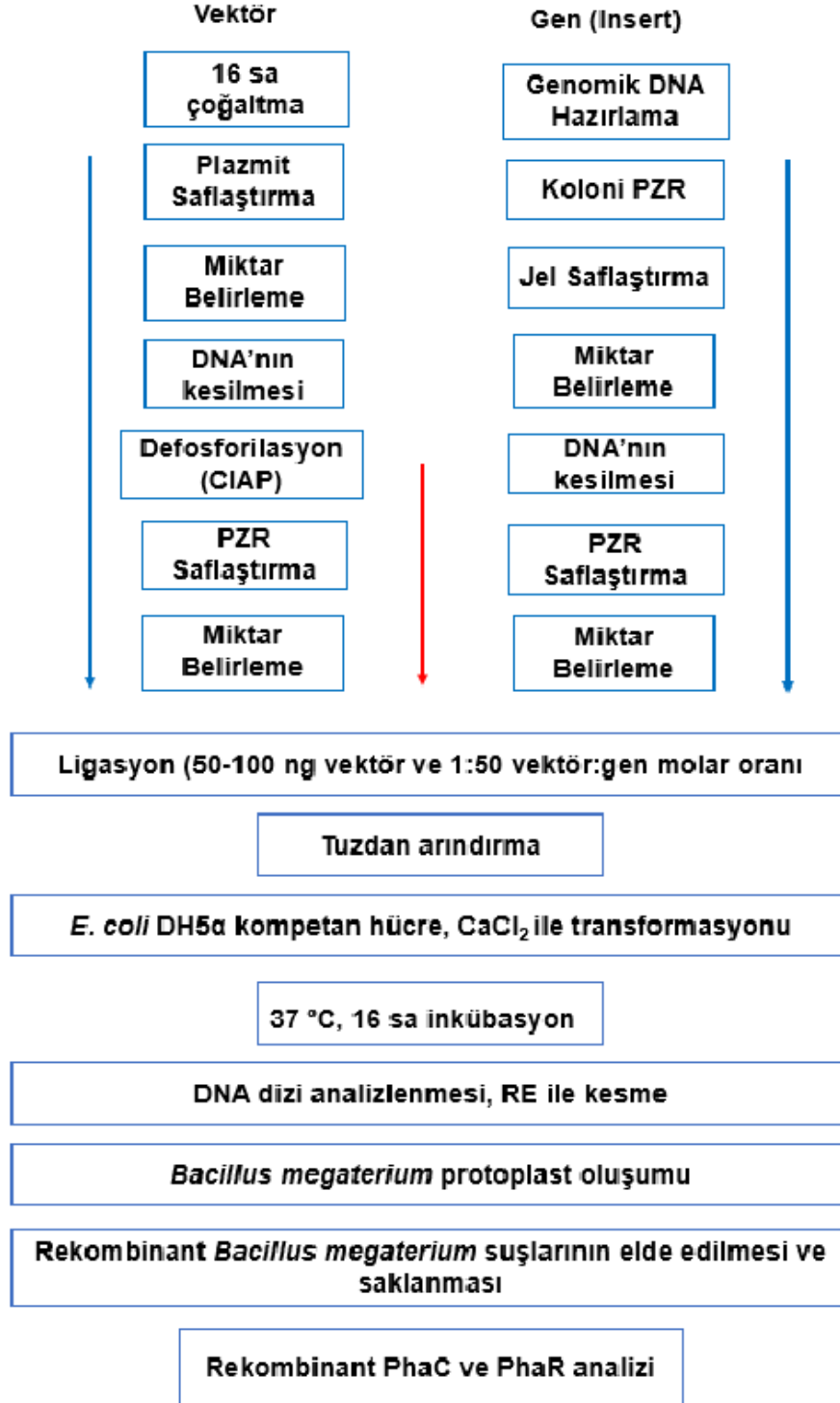
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen DNA moleküllerini boyutlarına göre ayırmak ve tanımlamak için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, %1'lik agaroz jel, 100 mL Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponunda (89 mM Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8.3) hazırlanmış, agaroz karışımı mikrodalga fırın yardımıyla homojen bir hale gelene kadar ısıtılmıştır. Agaroz çözeltisi yeterli sıcaklığa kadar soğutulduktan sonra, son derişimi 0,5 µg/mL olacak şekilde Etidyum Bromür (EtBr) eklenmiş ve çözelti

içerisinde herhangi bir kabarcık oluşmamasına dikkat edilerek jel tepsisine dökülmüştür. Uygun taraklar jel içerisine yerleştirilmiş ve yükleme kuyuları oluşturulmuştur. Jelin katılaşması beklenmiş ve jelin yerleştirildiği tank içerisine TBE tamponu dökülmüştür. Katılaştıran agaroz jel, tarak çıkarıldıktan sonra elektroforez haznesine yerleştirilmiş ve sonrasında DNA örnekleri ve DNA standardı belirlenen sıra ile jeldeki kuyulara yüklenmiştir. 100 V'da 45-60 dk koşturulan örnekler, bir transillüminator cihazının üstünde incelenmiş ve jel görüntüleme kabininde görüntüsü alınmıştır.

3.2.4. DNA'nın Agaroz Jelden Elde Edilmesi

Plazmid içerisine klonlanacak olan geni içeren bantlar UV ışığı altında görüntülenmiş ve sonrasında jelden kesilmiştir. Ticari jel ekstraksiyon kiti ile DNA'nın agaroz jelden elde edilme süreci, kiti üreten firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu protokole, klonlanacak DNA molekülünü içeren jel parçasına QG tamponu (20 mM Tris-HCl, 5.5 M guanidinyum tiyosiyanat, pH 6.6) eklenerek jelin 65°C'de çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti 17000xg'de santrifüj edilmiştir. Sonrasında ise kolona PE tamponu (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 80% etanol) eklenmiş, yıkanmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ile tamponlar uzaklaştırılmış ve DNA, 30 µL elüsyon tamponu (EB) kullanılarak (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) kolondan saflaştırılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Moleküler klonlama prosedürünün şematik gösterimi [148].

3.2.5. Primerlerin Tasarımı

Polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) ile belirlenen gen bölgelerinin çoğaltılabilmesi için gerekli olan primerlerin tasarımında dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıdaki gibidir:

1. Tasarlanacak olan ideal bir primer, 20-60 baz nükleotit uzunluğunda olmalıdır.
2. Primerin toplam C ve G baz içeriği %30-60 arasında olmalıdır.
3. Primerin 3' ucu, 1-2 C veya G bazlarını içermelidir ve tasarlanacak olan primerin özgün olabilmesi için 3' ucunda üçten daha fazla C veya G bazları bulunmamalıdır.
4. "Saç tokası" (hairpin) ile karşılaşılması için, primer kendi içinde eşleşecek baz dizileri içermemelidir.
5. Tasarlanan ileri ve geri primerler, dimer oluşumunu engelleyecek şekilde 8'den fazla birbirleriyle eşleşecek baz içermemelidir.
6. Tasarlanan ileri ve geri primerlerin (T_m) değerleri birbirine denk veya aralarında 5-8°C'lik bir fark olmalıdır.

Bu tez çalışmasında kullanılan primerlerin dizileri Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Primerlerin kendini tamamlayıcı dizileri içermeme ihtimali, primer dimerlerinin oluşması ve erime sıcaklığı gibi parametreler, ücretsiz web tabanlı yazılımlar ile kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.4. Tez çalışmasında kullanılan primerler

Primer	Dizi (5' -> 3')
phaR-seq-F	atcggcgattggctagaaaaacg
SphI-start-phaR-F	tgatagcatgcatgttgaacagcaaaaagtattgatcc
SphI-stop-Flagtag-phaR-R	ctagctgcatgcttactgtcgtcatcgtctttgtagcttacttgcgagctggctgc

3.2.6. Hedef DNA Molekülünün Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Restriksiyon enzimi (*SphI-HF*) ile hem ileri ve hem de geri kesme reaksiyonu için, mikrosantrifüj tüpünde hazırlanan örnekler 1 sa boyunca 37°C'de ısıtıcı blokta tepkimeye bırakılmış ve ardından %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür.

3.2.7. Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Sonrasında DNA'nın Saflaştırılması

Restriksiyon enzimi (*SphI-HF*) ile kesimden sonra, PZR Saflaştırma Kiti ve üretici firmanın protokolü kullanılarak enzimlerin, primerlerin, nükleotidlerin ve tuzların ayrıştırılması işlemi gerçekleştirilmiştir. Protokolün sonunda saflaştırılmış DNA, 30 µL EB tamponu ile santrifüj kolonundan saflaştırılmıştır.

3.2.8. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)

Insert ve vektör DNA moleküllerinin ekleme reaksiyonunda kullanılan bileşenler Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Ligasyon karışımı

	L1	L2	L3 (Kontrol)
10x Ligasyon tamponu	2 µL	2 µL	2 µL
Gen (insert) DNA (622 bç)	1,4 µL	13,6 µL	-
İki kez kesilmiş vektör DNA (6547bç)	5,9 µL	3,4 µL	5,9 µL
T4 DNA ligaz	1 µL	1 µL	1 µL
Steril dH ₂ O	9,7 µL	-	11,1 µL

$$gen\ miktarı(ng) = 100\ ng\ vektör \times \frac{genin\ büyüklüğü\ (bç)}{vektörün\ büyüklüğü\ (bç)} \times \frac{50}{1} \quad (3.1)$$

Ligasyon karışımına eklenen gen miktarı yukarıdaki eşitliğe göre belirlenmiştir (Eşitlik 3.1). Kontrol grubu ise gen (insert) DNA dışında yukarıda adı geçen diğer tüm maddeleri içerecek şekilde oluşturulmuştur. Ekleme reaksiyonu 16°C'de, 16 sa gerçekleştirilmiş, sonrasında 20 dk boyunca 65°C'de tutularak reaksiyon durdurulmuştur. Ekleme reaksiyonu ürünleri 0,45 µm'lik membran üzerinde damla-diyaliz yöntemiyle tuzdan arındırıldıktan sonra, *E. coli* transformasyon reaksiyonunda 5 µL'si kullanılmış ve sonrasında -20°C'de saklanmıştır.

3.2.9. *E. coli* DH5α'nın CaCl₂ Metodu ile Transformasyonu

E. coli DH5α suşu, plazmidin çoğalabilmesini sağlamak adına kimyasal-kompetan hücre olarak kullanılmıştır. Öncelikle -80°C'de saklanan *E. coli* DH5α suşu LB agar plakalara ekilmiş ve 37°C'de 16 sa boyunca inkübe edilmiştir. 5 mL sıvı LB ortamı içerisine LB agar plakalardan seçilen bakteri kolonisi aktarılmış ve çalkalayıcı karıştırıcıda 37°C, 200 devir/dk karıştırma hızında 16 sa boyunca inkübe edilmiştir. 16 saatlik inkübasyon sonunda çoğalan örnekten 1:100 aşılama oranına göre 5 mL LB ortamı içerisine 50 µL aktarılmış ve optik yoğunluk (OD₆₀₀) değeri 0,3-0,4 olana kadar orbital çalkalayıcı karıştırıcıda inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında hücreler 5 dakika boyunca 3000xg, 4°C'de santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 0,1 M CaCl₂ ile süspansiyon edilmiştir. 100 ng plazmid DNA hücrelerin üstüne eklenmiş ve 30 dk buzda bekletilmiştir. Plazmidin hücre içine alımı 42°C'de 90 sn ısı şoklama ile sağlanmıştır. Buz üzerinde 5 dk boyunca bekletilen kompetan hücrelerin üzerine 750 µL SOB ortamı ilave edilmiş ve 45 dk boyunca, 200 devir/dk hızında, 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası, 100-200 µL transformasyon karışımı, seçici antibiyotik (Amp^R) içeren LB agar ortamına yayılmış ve 37°C'de 16 sa inkübe edilmiştir.

3.2.10. Rekombinant DNA'nın Dizi Analizi

Sentezi gerçekleştirilen rekombinant plazmid dizisi, DNA dizi analizinin gerçekleştirilebilmesi için tasarlanmış primer kullanılarak dizinletilmiştir (hizmet alımı, Ankara). Dizi analizi sonrası, analiz verileri ücretsiz yazılımlar (ApE-

plasmid-editor, SnapGene ve BLAST yazılımları, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kullanılarak analiz edilmiştir (Ek-3).

3.3. *B. megaterium* Protoplast Transformasyonu

Hücreler 5 mL LB ortamında 37°C, 200 devir/dk'da bir gece çoğaltılmıştır. LB ortamında gece boyunca çoğaltılan mikroorganizmalardan 1 mL alınarak 50 mL Hyp besi ortamı (Çizelge 3.5) içeren yeni ortama aşılama gerçekleştirilmiştir (1:50 aşılama oranı) ve OD₆₀₀=0,8-1 değerine ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 2600xg, 4°C'de 15 dk santrifüj edilmiş, elde edilen pelet 100 µL, 5 mg/mL lizozim içeren ve filtre sterilizasyonuna tabi tutulmuş 5 mL Hyp besi ortamı içerisinde süspanse hale getirilerek protoplast oluşumu için 37°C, 100 devir/dk karıştırma hızında 20 dk inkübe edilmiştir. Protoplast hücreleri 30 dk boyunca buz içerisinde bekletilmiştir. Sonrasında 1400xg, 4°C'de 10 dk santrifüj edilmiş ve toplanan protoplast hücreleri 2,5 mL Hyp besi ortamı ile yavaşça yıkanmıştır. Yıkama işlemi, fazla lizozimin uzaklaştırılabilmesi için üç defa tekrar edilmiştir. Yıkama işlemi sonrasında 500 µL protoplast çözeltisi yeni bir deney tüpüne aktarılmış ve içerisine 50 µL rekombinant plazmid DNA (3-5 µg) eklenmiştir. Daha sonra bu çözeltinin içerisine 1,5 mL %35 PEG-P (MA=8000) çözeltisi eklenmiş ve protoplast hücreler 37°C'de 2-4 dk inkübe edilmiştir. Yine bu karışımın içerisine 5 mL Hyp besi ortamı eklenmiş ve karıştırılmıştır. Sonrasında bu karışım 1400xg, 4°C'de 4 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen hücreler 1 mL Hyp-besi ortamı ile tekrar resüspanse edilmiş ve 37°C, 100 devir/dk karıştırma hızında 3 sa inkübe edilmiştir. 100 µL ve 900 µL olarak ayrılan hücre süspansiyonları %0,9 agar içeren 7 mL Hyp besi ortamı-Agar çözeltisi ile karıştırılarak antibiyotikli (Tet^R) %1,7 agar içeren Hyp besi ortamı petri kabına dökülmüş ve 37°C'de 24 sa inkübe edilmiştir. 24 saat sonra çoğalan koloniler tetrasiklin antibiyotiği içeren sıvı LB ortamına aktarılmış ve 37°C, 200 devir/dk karıştırma hızında gece boyunca inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.6. Hyp besi ortamı bileşenleri [149].

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

3.4. Rekombinant *B. megaterium* Kullanılarak PHA Üretimi

DNA dizi analizi ile doğrulanmış rekombinant plazmidler, *B. megaterium*'a protoplast transformasyonu yöntemi ile aktarılmış ve elde edilen rekombinant suşlar -80°C'de saklanmıştır. Çizelge 3.1'de belirtilen klonlar tetrasiklin içeren sıvı LB ortamına inoküle edilerek, 30°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki orbital çalkalamalı karıştırıcıda 16 sa çoğaltılmıştır. Gece boyunca çoğalan bakteri kültüründen 1:100 aşılama oranına göre 200 µL hücre alınmış ve tetrasiklin içeren 20 mL sıvı LB ortamına aktarılmıştır. OD₆₀₀=0,8-1,0 aralığına ulaşan bakteri kültüründen 1:100 aşılama oranına göre hücre alınmış ve 250 mL'lik erlen içerisinde bulunan 40 mL hacmindeki minimal besi ortamına aktarılmıştır. Hücreler 72 sa süreyle 30°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Plazmid içerisine aktarılan *phaC* ve *phaR*'nin rekombinant gen ekspresyonunu gerçekleştirmek için, üretimi yapılan kültür ortamına OD₆₀₀=0,3-0,4'e geldiğinde %0,5 ksiloz çözeltisi eklenerek plazmidin indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ksiloz ile indükleme sonrasında hücre derişimini belirlemek için belirli zaman aralıklarında örnekler alınmış ve optik yoğunluk (OD₆₀₀) değerleri ölçülmüştür.

3.5. Rekombinant Protein Analizleri

3.5.1. Bradford Yöntemi

Rekombinant *B. megaterium* suşları ile gerçekleştirilen PHA üretim deneylerinde belirli saatlerde alınan hücre örneklerinin içerdiği toplam protein ve rekombinant protein miktarlarını belirlemek için Bradford yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, rekombinant protein ve standart olarak saf sığır serum albümin proteini (BSA) derişimleri Bradford reaktifi kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışma esnasında konsantrasyon belirleme işlemi iki tekrarlı şekilde 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuyucu ile yapılmıştır. Çalışmada temel alınan BSA protein standart eğrisi EK-2'te verilmiştir.

3.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Yöntemi

Protein derişimi Bradford yöntemi ile belirlenmiş protein örneklerini moleküler büyüklüklerine göre ayırmak amacıyla sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılmıştır. Ayrımı gerçekleştirilecek olan proteinlerin moleküler büyüklüğüne göre hazırlanması gereken jelinin yüzdesi değişkenlik göstermektedir. PhaC ve PhaR proteinlerinin büyüklüğü sırasıyla 42,5 kDa ve 24 kDa olması sebebiyle %12'lik SDS-PAGE jeli hazırlanmıştır. SDS-PAGE analizinde jel üzerinde koşturulan proteinlerin ve bunların alt birimlerinin moleküler büyüklüklerine göre ayrımı gerçekleştirilmiştir. Ayrılan proteinler, Coomassie Brilliant Blue ile boyanmış ve jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

3.6. PHA Üretiminde Kullanılan Mikroorganizmalar, Besi Ortamı ve Çoğalma Koşulları

Rekombinant *B. megaterium* suşları, sıvı LB ortamına inoküle edilmiş ve 200 devir/dk karıştırma hızındaki orbital çalkalamalı karıştırıcıda 37°C'de 16 sa boyunca çoğaltılmıştır. Gece boyunca gerçekleştirilen üretimden sonra hücre kültüründen alınan 200 µL hücre, taze 20 mL LB ortamına eklenmiştir. PHA

üretimi için kullanılacak olan besi ortamına aktarılacak olan suşlar, logaritmik çoğalma fazına gelinceye kadar alt kültürde inkübe edilmiştir. $OD_{600}=0,8-1,0$ 'a ulaşan bakteri kültüründen, 1:100 aşılama oranı ile 40 μ L hücre 250 mL'lik erlenlerde bulunan 40 mL hacmindeki minimal besi ortamına inoküle edilmiş ve 37°C, 200 devir/dk karıştırma hızındaki çalkalayıcıda 72 sa süreyle inkübe edilmiştir. Minimal besi ortamı (pH 7.0); 10 g/L glikoz, 7,2 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 3,6 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ve 1 mL/L iz element çözeltisinden oluşmaktadır. İz element çözeltisi; 0,015 g/L $CaCl_2$, 0,025 g/L $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,03 g/L $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,03 g/L $NiSO_4 \cdot 6H_2O$, 0,03 g/L $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,1 g/L $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,12 g/L H_3BO_3 , 0,2 g/L $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ve 5 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ içermektedir.[150]. Hücre derişimi, belirli saatlerde alınan örneklerin UV-görünür spektrofotometrede 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğunun (OD_{600}) ölçülmesiyle hesaplanmıştır.

3.7. PHA Üretim Miktarının Nile red Floresan Spektroskopisi ile Tayin Edilmesi

Rekombinant *B. megaterium* suşları ile gerçekleştirilen PHA üretim deneylerinde inkübasyon süresince, kültür ortamından belirli zaman aralıklarında alınmış hücrelerin PHA birikimleri; Nile red ile boyama sonrasında floresan spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Kültür ortamından alınan örnekler santrifüj edilmiş ve hücreler çöktürülmüştür. Sonrasında bu hücreler 1xPBS çözeltisi ile süspanse edilmiş, santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler 1 μ g/mL derişimindeki Nile red-PBS çözeltisi ile yeniden süspanse edilmiş, çözeltinin hücrelere nüfuz edebilmesi için karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 2 sa inkübe edilmiştir. Hücreler 12000xg'de 10 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücreler fazla boyanın uzaklaştırılması için 1xPBS çözeltisi ile 3 defa yıkanmıştır. Distile su kullanılarak hacmi 3 mL'ye tamamlanan hücreler, 535 nm eksitasyon ve 605 nm emisyon dalga boyunda floresan spektrofotometrede analiz edilmiştir [136].

3.8. DNS Yöntemi Kullanılarak Artık Glikoz Miktar Tayin Edilmesi

Çalkalamalı biyoreaktörde fermantasyon boyunca glikoz tüketimi 3,5-dinitrosalisilik asit (DNS) kullanılarak DNS yöntemi [151] ile belirlenmiştir. 3,5 dinitrosalisilik asit (DNS)'in indirgen şekerler ile reaksiyona girerek, aromatik bir bileşik olan 3-amino-5-nitrosalisilik asite indirgenme özelliği bulunmaktadır. Bu reaksiyon, alkali koşullarda ve yüksek sıcaklıkta meydana gelmektedir. Reaksiyon sonrası ortaya çıkan bu bileşik 540 nm dalga boyundaki ışığı absorbe etmektedir. İndirgeme reaksiyonu öncesi sarı olan renk, reaksiyon sonrasında kırmızı-turuncuya dönüşmektedir ve oluşan renk yoğunluğu ortamda bulunan indirgenmiş şeker konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 3,5 dinitrosalisilik asit yöntemi, PHA üretim ortamından belirli aralıklar ile alınan örneklerin santrifüj sonrası süpernatantlarını ve glikoz standardını içeren 96 kuyulu mikrotiter plakalarda gerçekleştirilmiştir. İndirgenme reaksiyonu, 40 µL süpernatant örneği üzerine 80 µL DNSA eklendikten sonra 95°C'de 5 dk kaynatılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu karışımdan 100 µL alınmış ve üzerine 200 µL distile su eklenmiştir. Son olarak spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.9. PHA Ekstraksiyonu

Liyofilize edilerek kurutulan ve toz haline getirilen hücrelerin bir paraleli %100 etanol çözeltisi ile yıkanmıştır. Hücreler yıkamadan sonra 10000xg'de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Toz haline getirilen hücrelerin ikinci paraleli ise etanol çözeltisi ile yalnızca iki kere yıkanmış ve santrifüj edilmemiştir. Elde edilen peletlerin üzerine 7 mL kloroform eklenmiş ve 30°C'de, 200 devir/dk hızında, 24 sa süreyle orbital çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra 0,22 µm şırınga ile filtre edilen hücre-kloroform karışımının üzerine soğuk metanol 10 kat olacak şekilde eklenmiştir (metanol: kloroform= 9:1). 10000xg'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek çöktürülen PHA polimerleri 55°C'de etüv içerisinde kurutulmuştur.

3.10. PHA Karakterizasyonu

3.10.1. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi analizi saflaştırılmış PHA örneklerinin yapısal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda 4000-400 cm^{-1} spektral aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.10.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Saflaştırılan PHA polimerlerinden alınan 5-10 mg örnek ile TGA analizi Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. TGA analizi inert azot gazı akışı altında $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ısıtma hızında ve 500°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir [152]. TGA analizi sonucunda elde edilen termal bozunma eğrileri (termogramlar) ile PHA örneklerinin kütle kayıpları ve termal bozunma sıcaklıkları belirlenmiştir.

3.10.3. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Saflaştırılan PHA polimerlerinden alınan 5-10 mg örnek ile DSC analizi Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İntert azot gazı akışı altında $10^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ısıtma ve soğutma hızlarında -30°C 'den 200°C sıcaklığa kadar ısıtma, sonrasında 200°C 'den -30°C sıcaklığa kadar soğutma ve tekrar 200°C sıcaklığa kadar ısıtma ile gerçekleştirilmiştir. DSC analizi sonucunda elde edilen eğriler ile PHA polimerlerinin erime sıcaklığı (T_m), camsı geçiş sıcaklığı (T_g) ve kristallenme sıcaklığı (T_c) değerleri belirlenmiştir [153].

3.10.4. $^1\text{H-NMR}$

Saflaştırılan PHA polimerlerinin yapısal özelliklerinin tayin edilmesi için 20 mg örneğin $^1\text{H-NMR}$ analizi Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü NMR Laboratuvarı'nda 25°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir [154].

3.10.5. Gaz Kromatografisi Analizi (GC-FID)

Liyofilize edilmiş hücrelerin polimer içeriğinin ve polyester yapısının belirlenmesi amacıyla 50 mg kurutulmuş hücre örnekleri, vida kapaklı deney tüpünde hacimce %3 H₂SO₄ içeren 2 mL asitleştirilmiş metanol ve 2 mL kloroform çözeltisinde 4 saat boyunca 100°C'de metanoliz tepkimesine tutulmuştur. Metanoliz reaksiyonundan sonra PHA polimerlerinin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve üzerlerine 1 mL distile su eklenerek reaksiyon karışımında faz ayrımı oluşması sağlanmıştır. Elde edilen organik faz 2 µL olacak şekilde Agilent Technologies 6890 N GC gaz kromatografisinde analiz edilmiştir. Gaz kromatografisi çalışmasında metil benzoat çözeltisi, doğruluk ve tekrarlanabilirliği artırmak için iç standart olarak kullanılmıştır. Gaz kromatografisi analizi alev iyonizasyon dedektörü (FID) ile donatılmış Agilent Technologies 6890 N GC gaz kromatografisinde 25 m x 0.32 mm x 0.25 µm ölçülerindeki HP-FFAP kapiler kolonda gerçekleştirilmiştir. 1 mL/dk akış hızında Argon gazı taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Gaz kromatografisi dedektör ve enjektör sıcaklıkları 230°C olup, fırın sıcaklığı ilk olarak 5°C/dk ısıtma hızı ile 50°C'den 100°C'ye, sonra ise 20°C/dk ısıtma hızı ile 230°C ye çıkarılmış ve 230°C'de 5 dk boyunca bekletilmiştir.

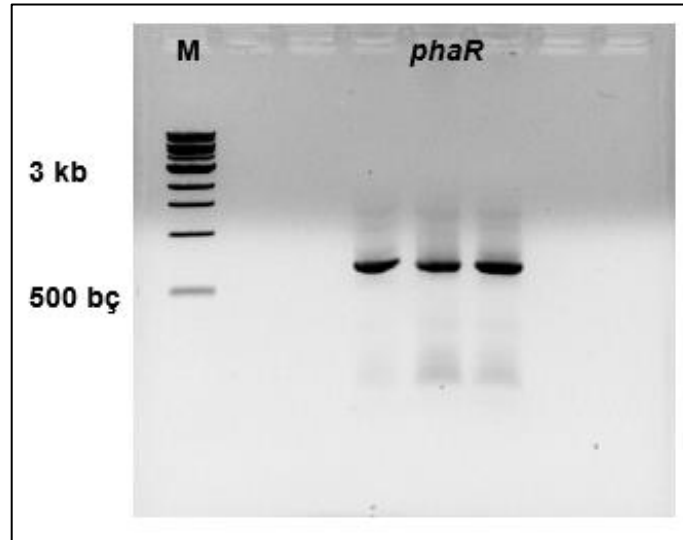
4. Sonuçlar ve Tartışma

4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile *phaR* Geninin oğaltılması

B. megaterium'dan *phaR* geninin çoğaltılması ve plazmidlere (pC-HIS1623hp-*phaC*) klonlanması için tasarlanan primerler izelge 3.2'de gösterilmiştir. Primer tasarımı kuralları göz önünde bulundurularak tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları ve uzunlukları izelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tez çalışmasında kullanılan primerlerin erime sıcaklıkları ve uzunlukları

Primer Adı	T _m (°C)	Uzunluğu (b)
phaR-seq-F	58	23
SphI-RBS-start-phaR-F	68,2	58
SphI-stop-Flagtag-phaR-R	70,8	59



Şekil 4.1. *phaR* geninin (insert DNA) PZR sonrası agaroz jel görüntüsü. Marker (M):1 kb. *phaR*:656 b.

4.2. Elde Edilen Gen ve Vektör DNA'larının Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

PZR ile çoğaltılan *phaR* geni ve miniprep ile elde edilen vektör, tasarımda belirlenen kesme enzimi ile (*SphI-HF*) kesilmiştir (Çizelge 4.2). Vektör için gerçekleştirilen kesme reaksiyonunda, ligasyon reaksiyonu esnasında plazmid DNA'nın kendi kendine kapanmasını engellemek için kesim sonrası DNA'nın 5' ucunda ortaya çıkan fosfat gruplarını uzaklaştıran alkalın fosfataz enzimi (CIAP) eklenmiştir.

Klonlamada kullanılan ve *SphI-HF* enzimi ile kesilmiş ve yapışkan uçları oluşturulmuş *phaR* geni PZR saflaştırma yöntemiyle saflaştırılmıştır. Mikro hacimli spektrofotometre ölçümü ile derişimleri belirlenmiş hem vektör hem de gen yeterli miktarlarda elde edilmiştir.

Yapışkan uçlara sahip *phaR* geni aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş olan pC-HIS1623hp-*phaC* plazmid vektörüne T4 DNA ligaz enzim katalizörü varlığında klonlanmıştır. Ligasyon ürününe tuzdan arındırma işlemi uygulanmış ve sonrasında -20°C'de saklanmıştır. Ligasyon ürününden alınan 4 µL rekombinant plazmid, *E. coli* DH5α suşuna CaCl₂ metodu ile aktarılmıştır. Ligasyon ürünleri Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Kesme reaksiyonu

Reaksiyon No.	Insert - Vektör	Kesme Enzimi (İleri)	Kesme Enzimi (Geri)	Boyut
D1	<i>SphI</i> -RBS-start- <i>phaR</i> -Flagtag-stop- <i>SphI</i>	<i>SphI</i>	<i>SphI</i>	656 bç
D2	pC-HIS1623hp- <i>phaC</i>	<i>SphI</i>	<i>SphI</i>	7643 bç

Çizelge 4.3. Ligasyon ürünleri

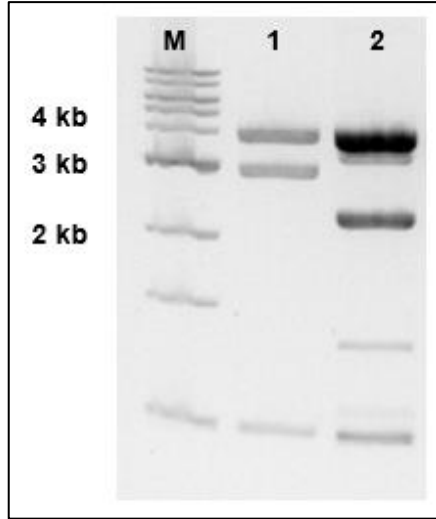
Ligasyon #	L1	L2
Ligasyonda kullanılan kesme ürünleri	D1-D2	D2
Ürün	pC-HIS1623hp-phaC - <i>SphI</i> -RBS-start-phaR-Flagtag-stop- <i>SphI</i>	pC-HIS1623hp- <i>SpeI</i> -RBS-start-phaC-6xHistag-stop- <i>SphI</i>
Ürün boyutu	8299 bç	7643 bç

4.3. Rekombinant Plazmidlerin *E. coli* DH5 α 'ya Aktarılması

Tuzdan arındırma işlemi gerçekleştirilmiş olan ligasyon ürünleri, *E. coli* DH5 α suşuna CaCl₂ yöntemi kullanılarak aktarılmış ve rekombinant plazmid taşıyan bu suşlar ampisilin antibiyotiği içeren LB agar ortamında çoğaltılmıştır. Çoğalma gerçekleşen LB agar plakalardan koloniler seçilmiş ve yine ampisilin içeren sıvı LB ortamında gece boyunca çoğaltılmış ve sonrasında miniprep işlemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan plazmid örnekleri restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve klonlamanın başarılı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Şekil 4.2, pC-HIS1623hp-phaC ve pC-HIS1623hp-phaC-phaR vektörlerinin uygun restriksiyon enzimleri ile (*NdeI* ve *EcoRI*) kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsünü göstermektedir. İki vektörden de beklenen boyutlarda bantlar elde edilmiştir. DNA dizi analizi ile (Ek-3) klonlama işleminin başarıyla gerçekleştiği kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, kontrol grubu olarak yalnızca vektör plazmid içeren ligasyon reaksiyonu, CaCl₂ transformasyonu sonucu koloni oluşturmamıştır.

4.4. Rekombinant *B. megaterium* Suşları ile PHA Üretimi

PhaC ve PhaC-PhaR proteinlerini üretmek üzere tasarlanmış ve sentezlenmiş rekombinant plazmidler DNA dizini doğrulandıktan sonra (Çizelge 4.4) protoplast transformasyonu yöntemiyle *B. megaterium*'a aktarılmış ve uzun süreli depolama amacı ile -86°C'de saklanmıştır. Kontrol grubu olarak rekombinant olmayan boş plazmid aynı şekilde *B. megaterium*'a aktarılmış ve -86°C'de saklanmıştır.



Şekil 4.2. 1-pC-HIS1623hp-phaC-phaR ve 2- pC-HIS1623hp-phaC vektörlerinin NdeI ve EcoRI kesimi sonrası agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Elde edilen üç farklı suş ile orbital çalkalamalı biyoreaktörde 30°C, 200 devir/dk hızında ve 72 saat boyunca, tanımlanmış minimal besi ortamında üretim deneyleri gerçekleştirilmiş ve suşların çoğalma hızları (Şekil 4.3) incelenmiştir. Bununla birlikte, Nile red boyama sonrası floresan spektroskopisi kullanılarak üç farklı suşun PHA üretim kapasiteleri kıyaslanmıştır (Şekil 4.4). Nile red boyaması sonrası gerçekleştirilen floresan spektroskopisi ölçümünde en yüksek sinyal yoğunluğu beklenildiği gibi pC-HIS-phaC-phaR plazmidini içeren *B. megaterium* hücrelerinden, en düşük sinyal yoğunluğu ise boş plazmid barındıran hücrelerden elde edilmiştir. Bunun nedeni *phaR* geninin, *phaC* geninin aktivitesini artırmasıdır [155]. Ayrıca, orbital çalkalamalı biyoreaktörde 72 saatlik inkübasyon sonrası elde edilen kuru hücre ağırlığı ve PHA üretim verimleri Çizelge 4.5'de sunulmuştur. Plazmid tasarımında yer alan 6xHisTag dizisinin varlığında beklenen düzeylerde PHA verimleri elde edilmiş ve bu dizinin PHA üretiminde bir aksaklığa sebep olmadığı tespit edilmiştir [141].

Çizelge 4.4. PHA üretiminde kullanılan DNA dizini doğrulanmış rekombinant klonlar

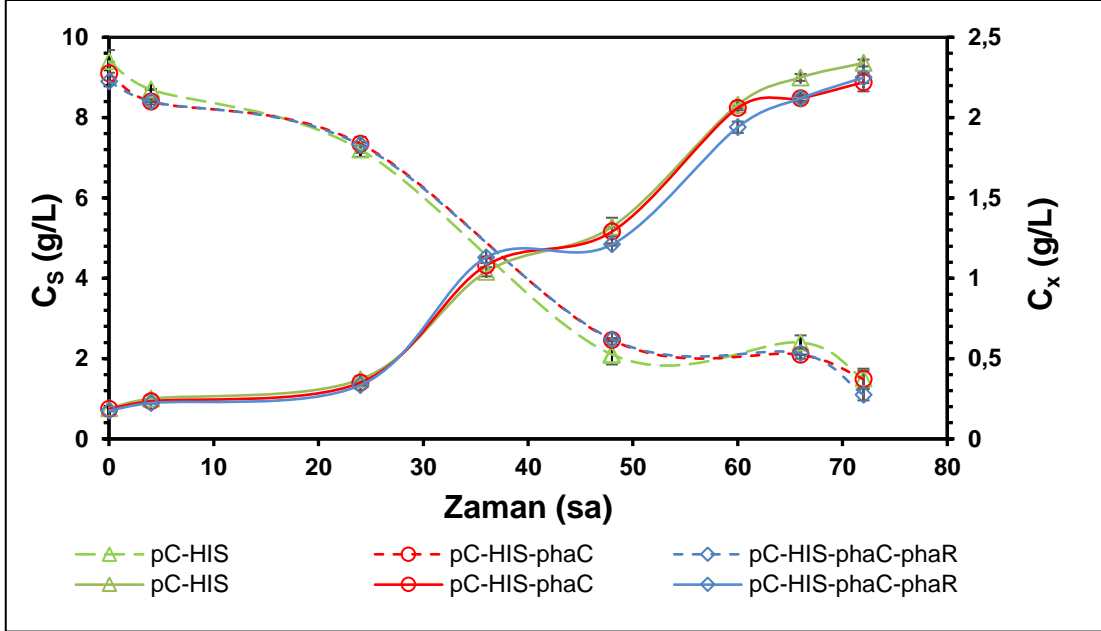
DNA dizini doğrulanmış rekombinant klonlar	
1.	<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308-pCHIS-phaC-phaR-GGS-6His
2.	<i>B. megaterium</i> NRRL B-14308-pCHIS-phaC-GGS-6His
3.	<i>B. megaterium</i> NRRL B-pCHIS

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

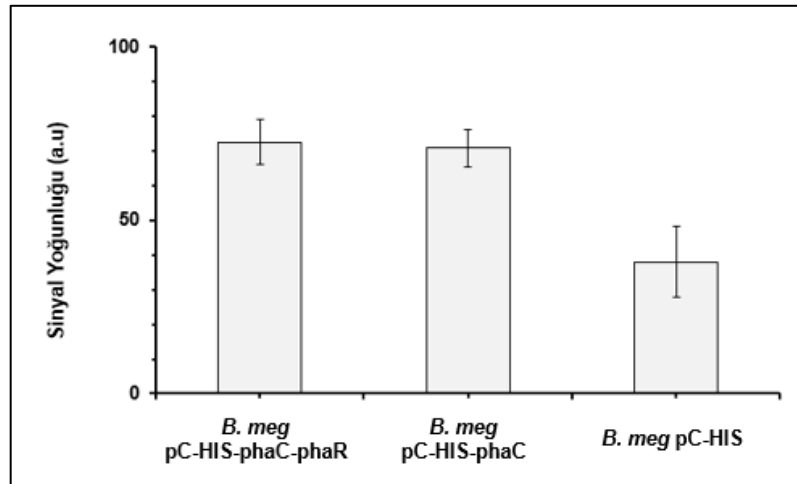
Suş	Dehidre Biyokütle_{max} (g L⁻¹)	PHA_{max} (g L⁻¹)	PHA (%CDW)	qPHA (g_{PHA} L⁻¹ h⁻¹)
pC-HIS	2,34	0,96	41	0,013
pC-HIS-phaC	2,22	1,12	50	0,016
pC-HIS-phaC-phaR	2,25	1,56	69	0,022

Üç farklı *B. megaterium* suşu ile gerçekleştirilen üretim deneylerinde pC-HIS1623hp plazmidinin indüklenmesi için %0,5 ksiloz ile indüklemenin en uygun koşul olduğu daha önce laboratuvar grubumuzda *B. megaterium* NRRL B-14308-pCHIS-phaC-GGS-6His ile gerçekleştirilen üretim deneylerinde tespit edilmiştir [141]. Gerçekleştirilen üretim deneyleri sonucunda rekombinant plazmid içeren *B. megaterium* suşları ile boş plazmid içeren *B. megaterium* suşunun çoğalma ve glikoz tüketim hızlarının benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Üretilen rekombinant proteinlerin, ana metabolik yolları etkileyen proteinler olmaması nedeniyle, hücre çoğalması ve glikoz tüketim hızı üzerinde bir etkisinin olmaması, beklenen bir sonuç olmuştur. Hücre çoğalması ve glikoz tüketim hızlarının birbirine benzer olması sonucu dehidre edilmiş biyokütle ağırlıkları benzerdir. Bununla birlikte rekombinant plazmid barındıran *B. megaterium* suşlarında daha yüksek hücre içi PHA birikimi gözlenirken, en düşük hücre içi PHA birikimi

beklenildiği gibi boş plazmid içeren *B. megaterium* suşunda tespit edilmiştir. Şekil 4.3'te gösterilen hücre çoğalma grafiğindeki C_x (g/L) değerlerinin elde edilmesinde kalibrasyon denklemi ($C_x = (OD_{600}) * 0,71 - 0,86$) kullanılmıştır.



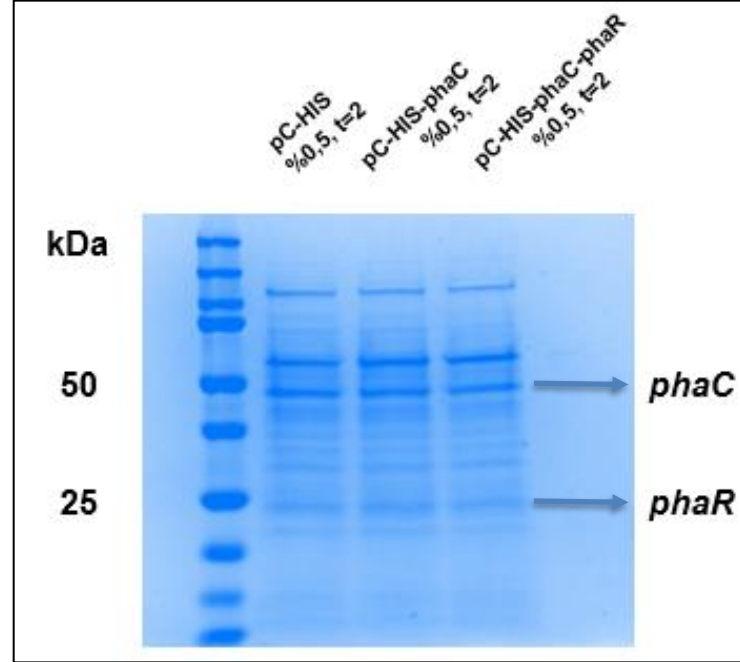
Şekil 4.3. Elde edilen üç farklı *B. megaterium* suşu ile orbital çalkalamalı biyoreaktörde gerçekleştirilen PHA üretiminde zamana bağlı hücre derişimi (C_x , düz çizgi) ve glikoz tüketimi (C_s , kesikli çizgi).



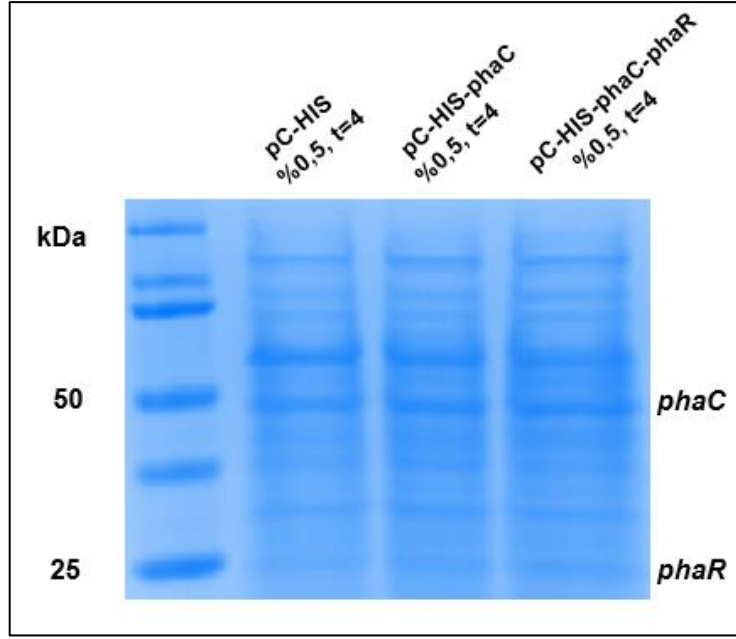
Şekil 4.4. Farklı *B. megaterium* suşları ile gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen hücrelerin Nile red ile boyama sonrası floresan spektroskopisi sinyal yoğunlukları. Nile Red boyası hücre içi lipitleri boyamakta olup, sinyal yoğunluğu hücre içi PHA birikimi ile doğru orantılıdır.

4.5. *B. megaterium* Suşlarında Rekombinant PhaC ve PhaR Ekspresyonu

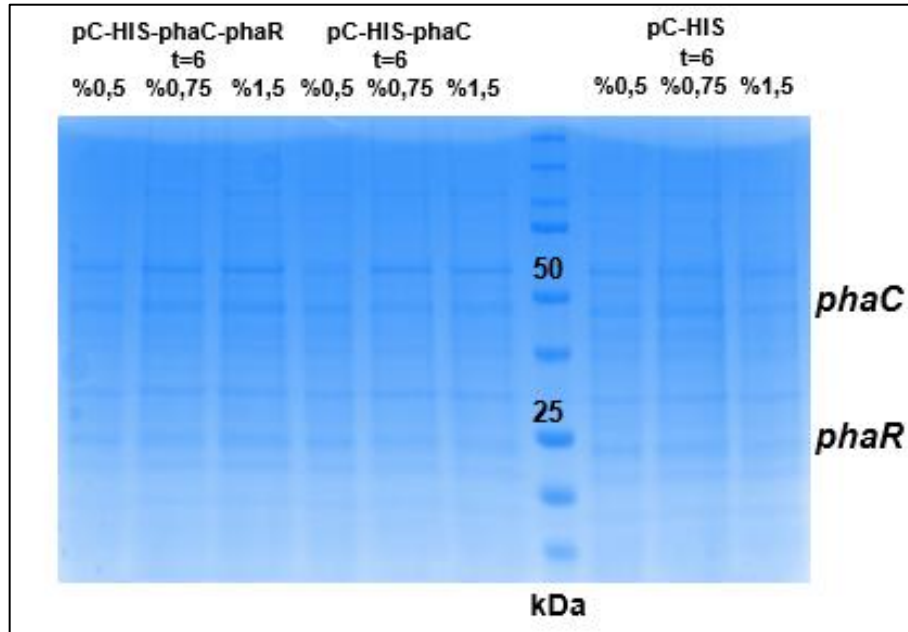
Rekombinant *B. megaterium* suşlarında plazmid indüksiyonu için farklı ksiloz derişimi denenmiş ve farklı zamanlarda örnekler alınarak ekspresyon seviyeleri kıyaslanmıştır (Şekil 4.5-4.9). Üretim ortamından eşit hacimde alınan örnekler santrifüj edilmiş, elde edilen hücre peleti sonikasyon işlemine tabi tutulmuş ve eşit hacimde kuyulara yüklenerek SDS-PAGE analizleri gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 42 kDa değerinde görülen protein bandı *phaC*, 24 kDa değerinde görülen protein bandı ise *phaR* geninin ekspresyonunu göstermektedir. 42 ve 24 kDa boyutlarında görülen PhaC ve PhaR bantlarında overekspresyon seviyeleri beklenen düzeyde elde edilememiştir. Bunun sebebi düşük sıcaklıkta uzun süreli depolama ve devamlı dondurma/çözdürme sonucunda plazmid ve genomik DNA stabilitesinin azalması olarak açıklanabilir [156, 157]. %0,5 ksiloz (ağırlık/hacim) ile indüklenen ve 4. saatte alınan örneklerde (Şekil 4.6) ekspresyon seviyelerinde düşük bir fark görülmektedir. Bu sonuç ise literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir [141].



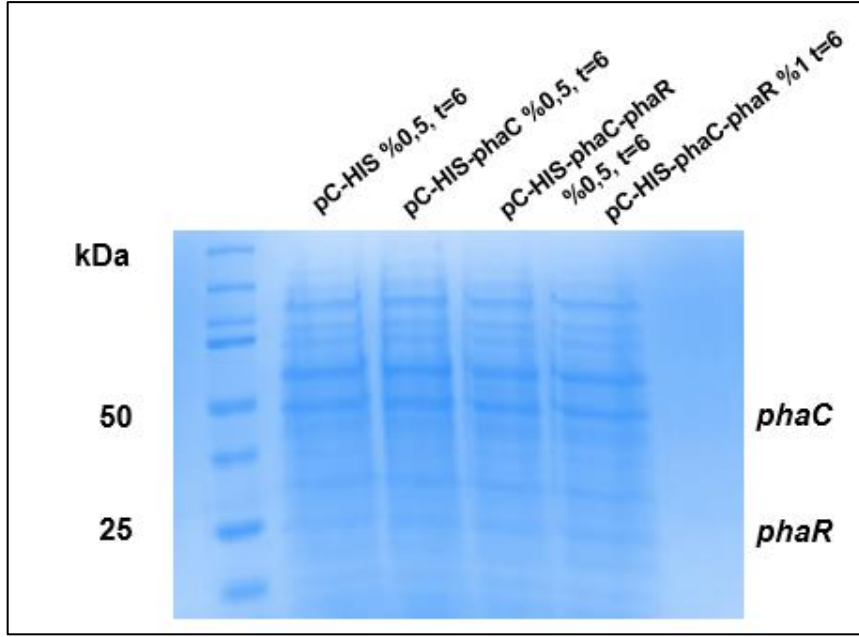
Şekil 4.5. *B. megaterium* hücrelerinde %0,5 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan iki saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi



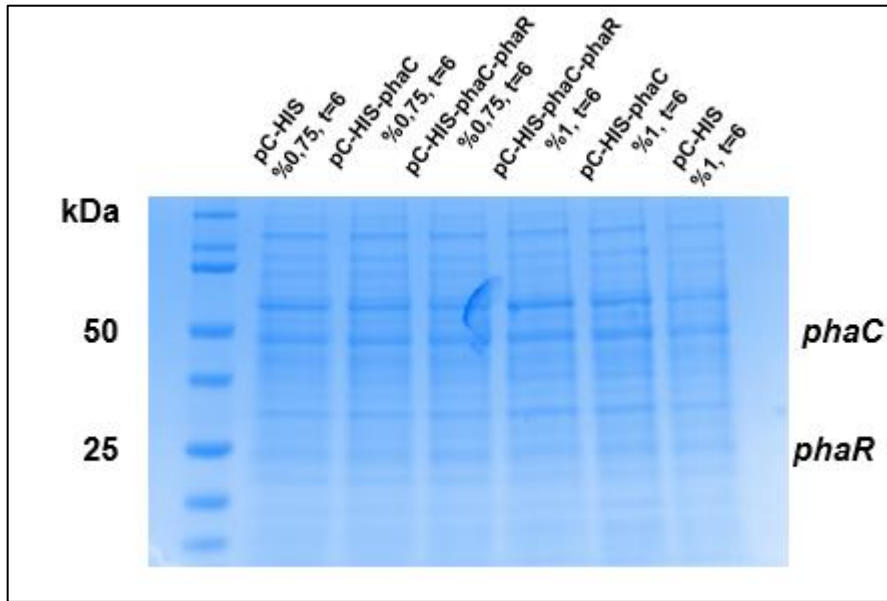
Şekil 4.6. *B. megaterium* hücrelerinde %0,5 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan dört saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi



Şekil 4.7. *B. megaterium* hücrelerinde %0,5, 0,75 ve %1,5 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan altı saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi



Şekil 4.8. *B. megaterium* hücrelerinde %0,5 ve %1 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan altı saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi



Şekil 4.9. *B. megaterium* hücrelerinde %0,75 ve %1 ksiloz ile plazmid indüksiyonundan altı saat sonra alınan örneklerde PhaC ve PhaR proteinlerinin analizi

4.6. Rekombinant *B. megaterium* suşları ile Üretilen PHA Polimerlerinin Hücre İçinden Saflaştırılması

Saflaştırma protokolüne göre Çizelge 4.6'da verilen verimler elde edilmiştir. %100 etanol çözeltisi ile yıkandıktan sonra 10000xg'de 10 dk süreyle santrifüj edilen hücrelerden daha düşük verimde PHA elde edilmesinin sebebi, uzun süreli etanole maruz kalan hücrelerin duvarında bulunan proteinlerin denatürasyonu ve lipidlerin çözünmesi sonucu hücre içi PHA'nın santrifüj sonrası elde edilen süpernatanta sızmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.6. Farklı saflaştırma yöntemleri ile edilen PHA ekstrasyon verimleri

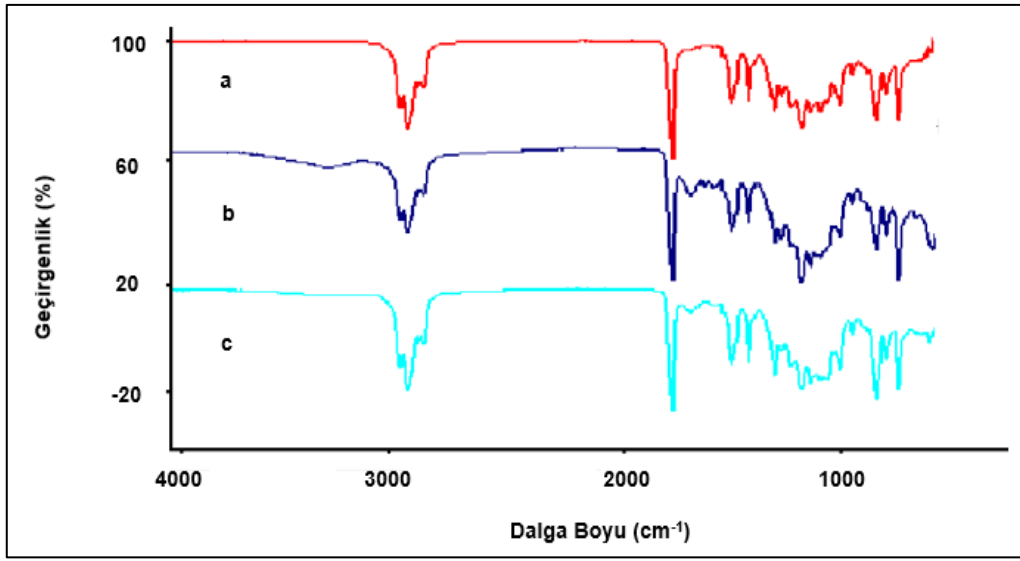
Suş	Etanol ile yıkama sonrası santrifüj	Yalnızca etanol ile yıkama
pC-HIS-phaC-phaR	0,54 g L ⁻¹	1,56 g L ⁻¹
pC-HIS-phaC	0,38 g L ⁻¹	1,12 g L ⁻¹
pC-HIS	0,32 g L ⁻¹	0,96 g L ⁻¹

4.7. Rekombinant *B. megaterium* Suşları ile Üretilen PHA Polimerlerinin Karakterizasyonu

Rekombinant *B. megaterium* suşları ile üretilen ve saflaştırılan PHA polimerlerinin yapısal ve termal özellikleri, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Proton Nükleer Manyetik Rezonans (¹H-NMR), Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) analizleri ile karakterize edilmiştir.

Rekombinant ve boş plazmid taşıyan suşlar tarafından üretilen PHA'ların kimyasal yapısı FTIR analizi ile incelenmiştir (Şekil 4.10). Spektrumda görülen 2846-2976 cm⁻¹'deki tepe değerleri, PHB polimerleri için metilen (CH₂) ve C-H metil (CH₃) gruplarının gerilme titreşimini göstermektedir. 1722 cm⁻¹ değerindeki emme tepe noktası karbonil (C = O), 1261 cm⁻¹ değerindeki tepe noktası ise

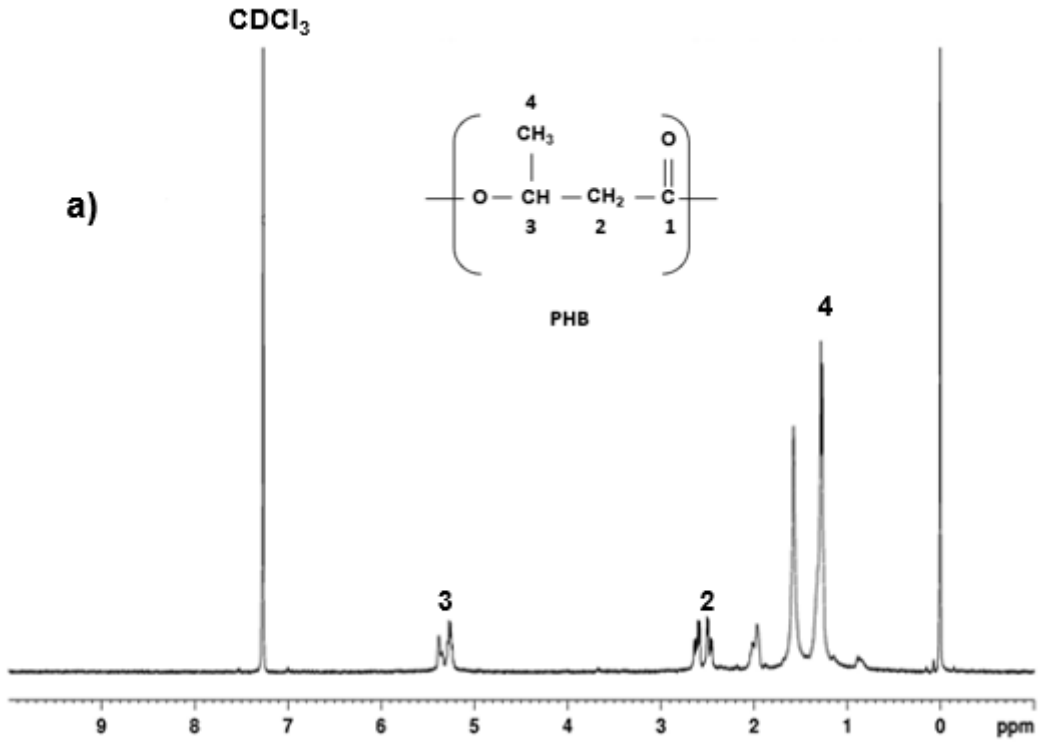
asimetrik germe C-O-C gruplarını göstermektedir. Metil (CH₃) grubunun gerilme ve asimetrik deformasyonu ise sırasıyla 1456 cm⁻¹ ve 1379 cm⁻¹'deki emme zirvelerinde görülmektedir. CH₂ salgılaması, CH₃ bükme, CC, CO ve COC bantlarına karşılık gelen değerler ise 1450-1000 cm⁻¹ aralığındaki absorpsiyon tepe değerleridir [158-161]. Bu değerler aynı zamanda, rekombinant suşlar tarafından üretilen PHA polimerindeki hidroksivalerat birimlerinin varlığını da göstermektedir [158].

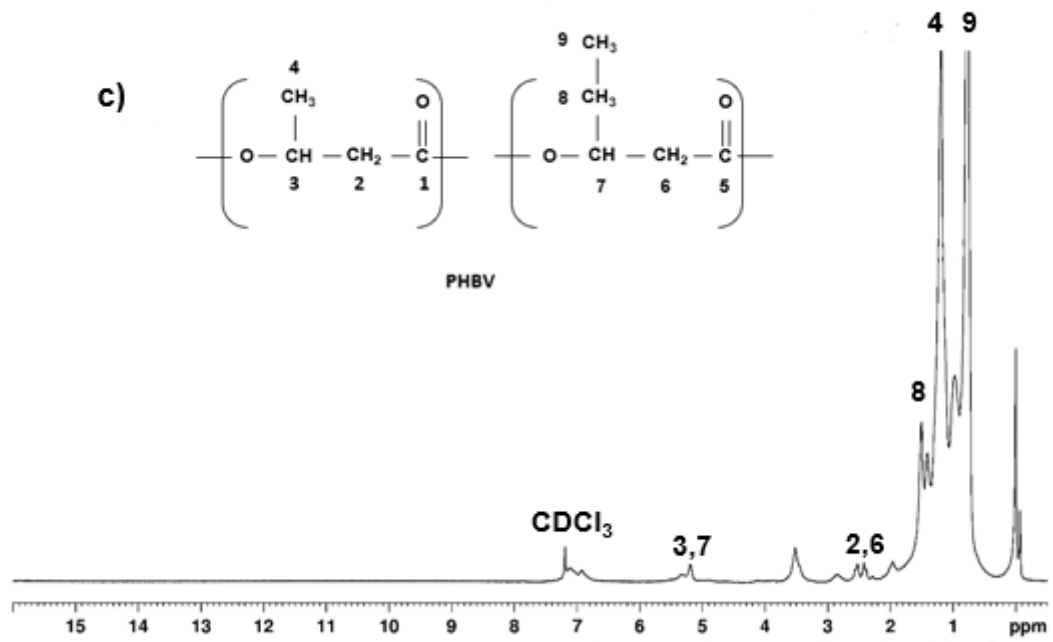
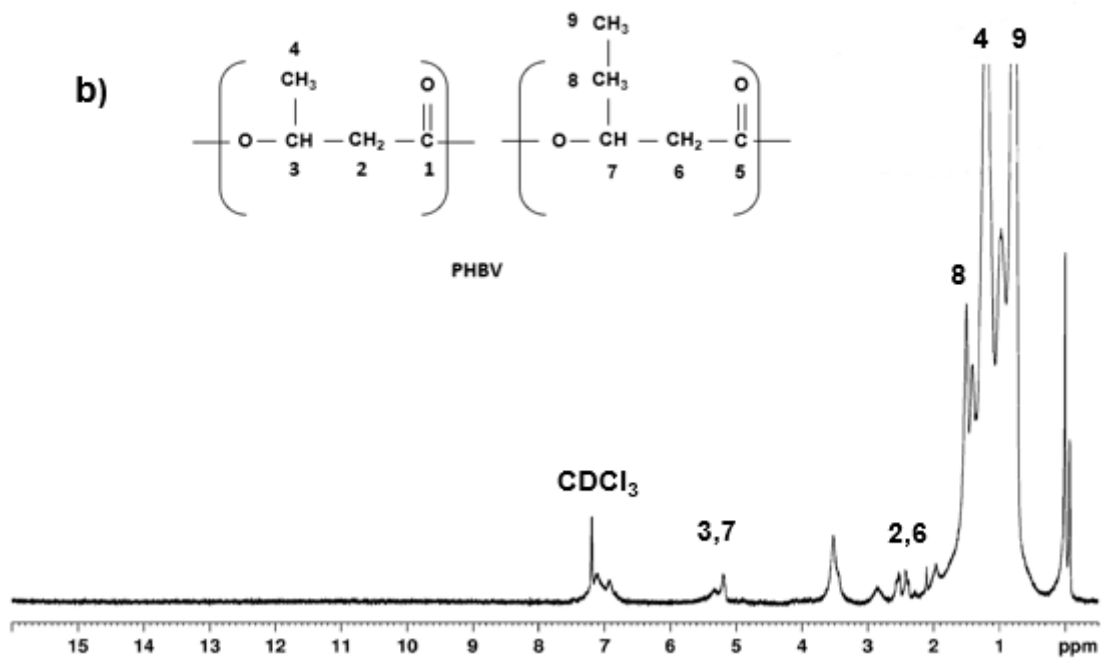


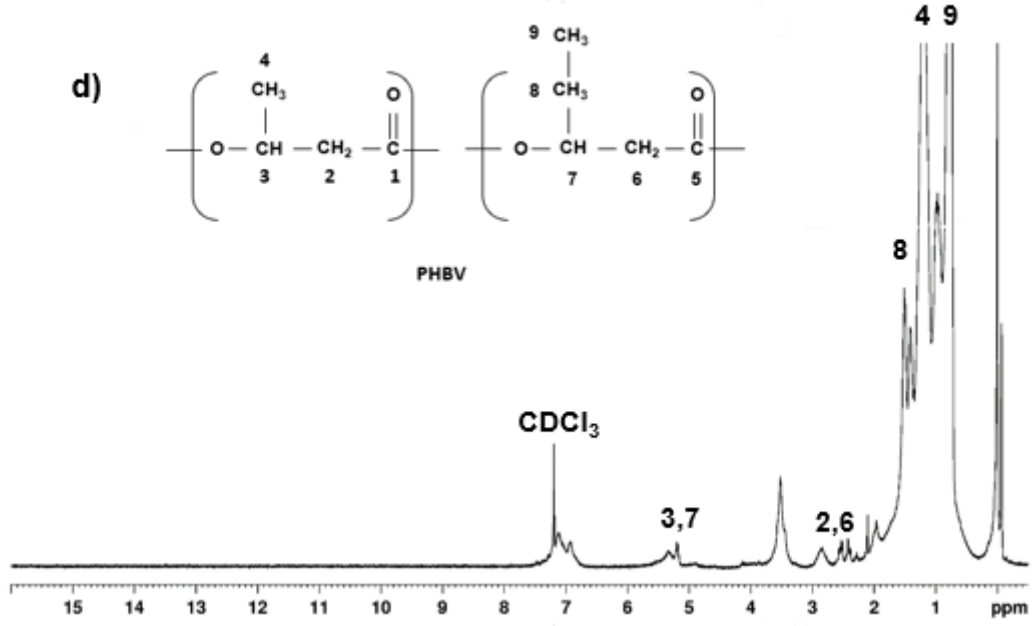
Şekil 4.10. Rekombinant *B. megaterium* ile elde edilmiş ve saflaştırılmış PHA'ların FTIR analizi. a) (*r*)-*B. megaterium* pC-HIS1623-hp-phaC ile elde edilen PHA b) *B. megaterium* pC-HIS1623-hp ile elde edilen PHA c) (*r*)-*B. megaterium* pC-HIS1623-hp-phaC-phaR ile elde edilen PHA

Rekombinant *B. megaterium* suşları ile sentezlenen PHA polimerlerinin yapısal içeriğini belirlemek için ¹H-NMR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.11). PHB polimerinin üç sinyal grubundan oluştuğu ticari PHB polimeri ile gerçekleştirilen ¹H-NMR analizi ile gösterilmiştir. Bu üç grup; bir protona bağlı halde metil grubu 1.25 ppm değerinde bir pik, 2.58 ppm değerinde asimetrik karbon atomu ve bir proton ile komşu olan metilen grubu dörtlü çift şeklinde ve 5.27 ppm değerinde metilen grubu olacak şekilde çoklu piklerdir. Kloroforma (CDCl₃) bağlanan pik

noktası ise 7.29 ppm değerinde görülmüştür [162]. Rekombinant ve boş plazmid içeren *B. megaterium* suşlarından elde edilen PHA polimerlerinin ¹H-NMR spektrumu ticari PHB'nin ¹H-NMR spektrumu ile karşılaştırıldığında 0.9 ppm, 1.55 ppm ve 3.5 ppm değerlerinde fazladan pikler gözlenmiştir. Terminal metil gruplarının ve iç metilen gruplarının diğer pozisyonlarına karşılık gelen, sırasıyla 0.9 ppm ve 1.55 ppm'de pikler görülmektedir. Bununla birlikte, 3.5 ppm'de ise metanole bağlı olarak bir pik oluştuğu görülmektedir [163]. Rekombinant ve boş plazmid içeren *B. megaterium* suşlarından elde edilen PHA polimerlerinin 3HV ve 3HB monomer birimlerinden oluştuğu ¹H-NMR analizi ile belirlenmiştir.







Şekil 4.11. Rekombinant *B. megaterium* suşları tarafından sentezlenen ve saflaştırılan PHA örneklerinin 1H-NMR spektrumu. a) Ticari PHB örneği b) (*r*)-*B. megaterium* pC-HIS-phaC ile elde edilen PHA c) *B. megaterium* pC-HIS ile elde edilen PHA d) (*r*)-*B. megaterium* pC-HIS-phaC-phaR ile elde edilen PHA

Rekombinant suşlardan elde edilen PHA'lar kısa zincir uzunluklu PHA'lar olup PHBV yapısındadırlar. Üretilen polimerlerin sahip oldukları % HV ve % HB içeriği eşitlik 4.1 ve 4.2 kullanılarak bulunmuştur (Çizelge 4.7) [164]. Rekombinant *B. megaterium* suşları ile 3HV bakımından zengin PHBV polimerleri üretilmiştir. PHBV içeriğindeki 3HV miktarı arttıkça, biyopolimerin erime sıcaklığı düşmekte ve elastikiyet özelliği artmaktadır.

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

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

Çizelge 4.7. Orbital Çalkalamalı Biyoreaktörde üretilen PHA Polimerlerinin içeriği

Suş-PHA	Biyopolimer	3HV %	3HB %
pC-HIS-phaC-phaR	PHBV	61±2,9	39±4
pC-HIS-phaC	PHBV	60±2,5	40±3,8
pC-HIS	PHBV	59±2,2	41±3,5
Ticari PHB	PHB	2	98

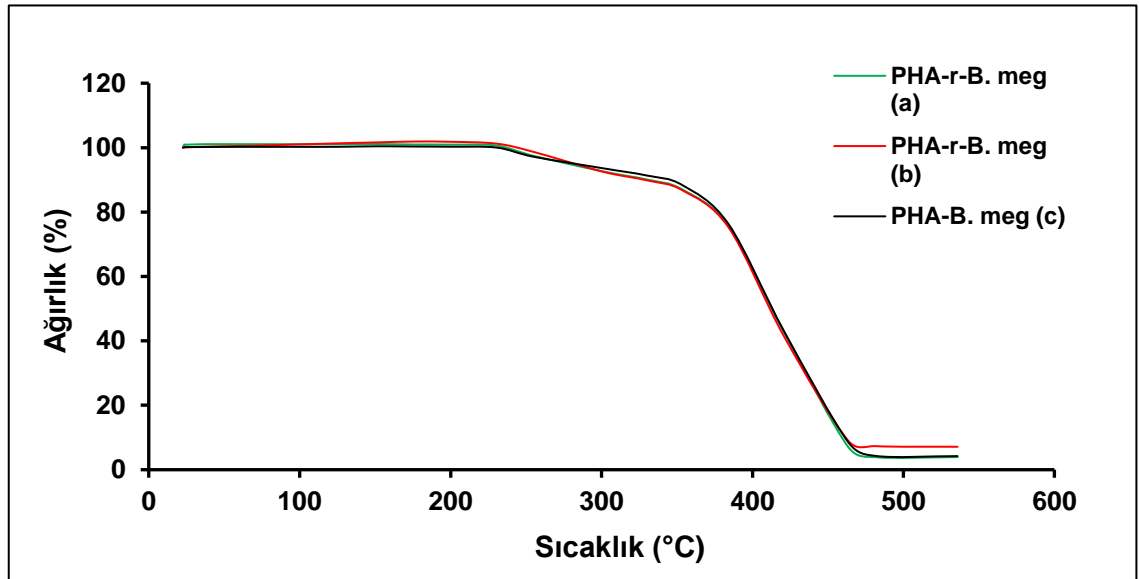
Rekombinant *B. megaterium* suşlarından sentezlenen PHA polimerlerinin termal özelliklerinin belirlenmesi için PHA örnekleri diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve termogravimetrik analiz (TGA) ile analiz edilmiştir. Polimerlerin termal bozulmaları gerçekleşmeden önce dayanabilecekleri maksimum sıcaklık değerleri, polimerlerin işlenmesi için önemli bir faktördür. TGA analizi PHA polimerlerinin bozunma sıcaklıklarının (Td) belirlenmesi için gerçekleştirilmiştir. Rekombinant suşlar ile üretilen ve saflaştırılan PHA polimerlerinin ısıl bozulması esas olarak 255-265°C ila 390-400°C arasındaki sıcaklıklarda iki aşamalı bir şekilde meydana gelmektedir (Şekil 4.12). PHA polimer örneklerinin iki farklı ayrışma sıcaklığına sahip olmasının nedeni 3HV gibi farklı monomer yapılarını içerisinde barındırmasıdır. Farklı monomer yapılarının polimer içerisindeki varlığı polimerlerin termal stabilitesine katkı sağlamaktadır. Ticari PHB'nin termal degradasyonu, 287°C'de tek adımlı bir degradasyon yoluyla olup sadece ana degradasyon olarak β -eliminasyonu ile rastgele bir zincir kesimi yoluyla gerçekleşmektedir.

Çizelge 4.8'de rekombinant *B. megaterium* suşları ile sentezlenen PHA polimerlerinin termal özellikleri verilmiştir. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizi elde edilen PHA polimerlerinin erime sıcaklıklarının (Tm) karakterizasyonu için yapılmıştır. Ticari PHB'nin erime sıcaklığı 175°C olarak belirlenirken, rekombinant suşlardan elde edilen PHA'ların erime sıcaklıkları ise 150 ila 166°C arasındadır. Rekombinant suşlar ile elde edilen PHA polimerlerinin ticari PHB'ye

kıyasla daha düşük erime sıcaklıklarına sahip olmasının nedeni sentezlenen PHA'ların içerdği 3HV monomer birimleridir. Biyobozunur polimerlerde 3HV monomer birimlerinin oranı arttıkça, polimerlerin T_m sıcaklığı azalmakta ve polimerin esnekliği ve darbe dayanımı gibi özellikleri artmaktadır [158].

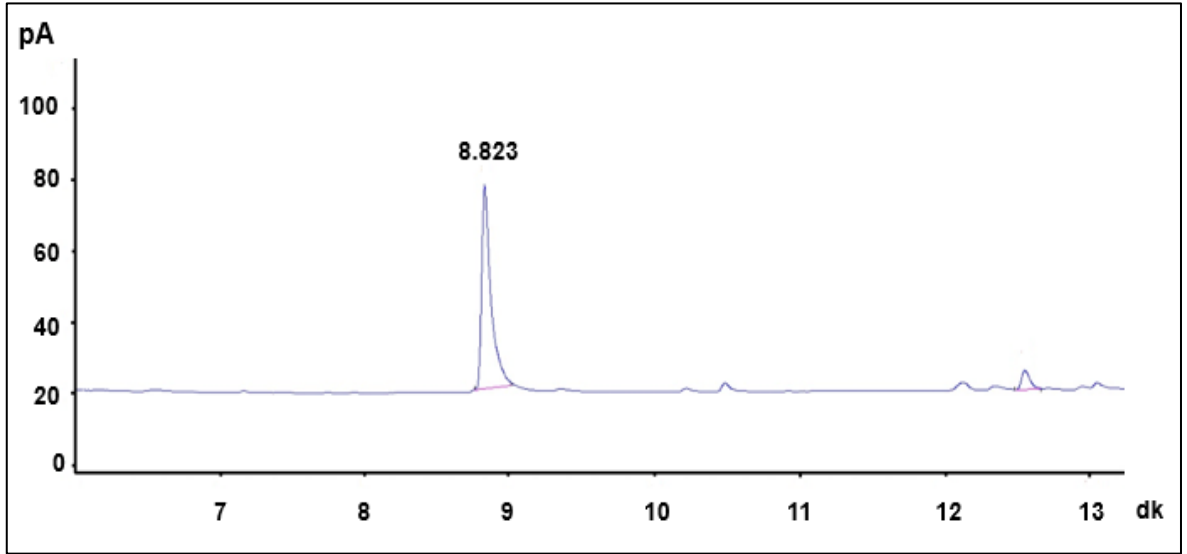
Çizelge 4.8. Rekombinant *B. megaterium* suşları ile üretilen PHA polimerleri ve Ticari PHB'nin termal özellikleri

Suş-PHA	T _{d1} (°C)	T _{d2} (°C)	T _m (°C)
pC-HIS-phaC-phaR	249	407	161
pC-HIS-phaC	261	404	150
pC-HIS	240	402	166
Ticari PHB	287	-	175

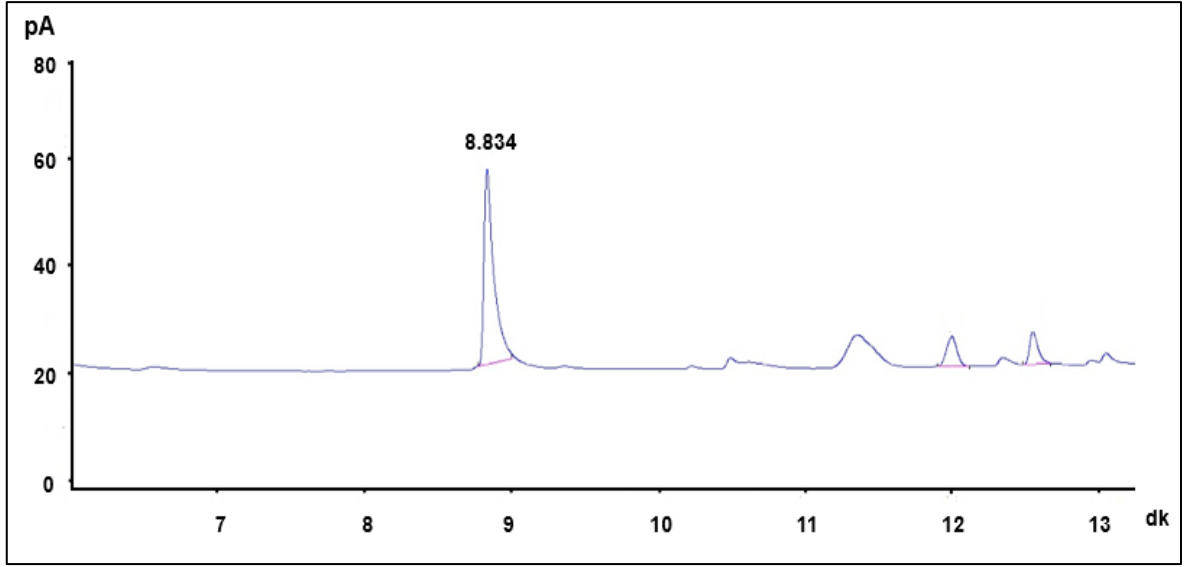


Şekil 4.12. Rekombinant *B. megaterium* suşları tarafından sentezlenen ve saflaştırılan PHA örneklerinin TGA analizi. a) (*r*)-*B. megaterium* pC-HIS-phaC-phaR ile elde edilen PHA, b) (*r*)-*B. megaterium* pC-HIS-phaC ile elde edilen PHA, c) *B. megaterium* pC-HIS ile elde edilen PHA

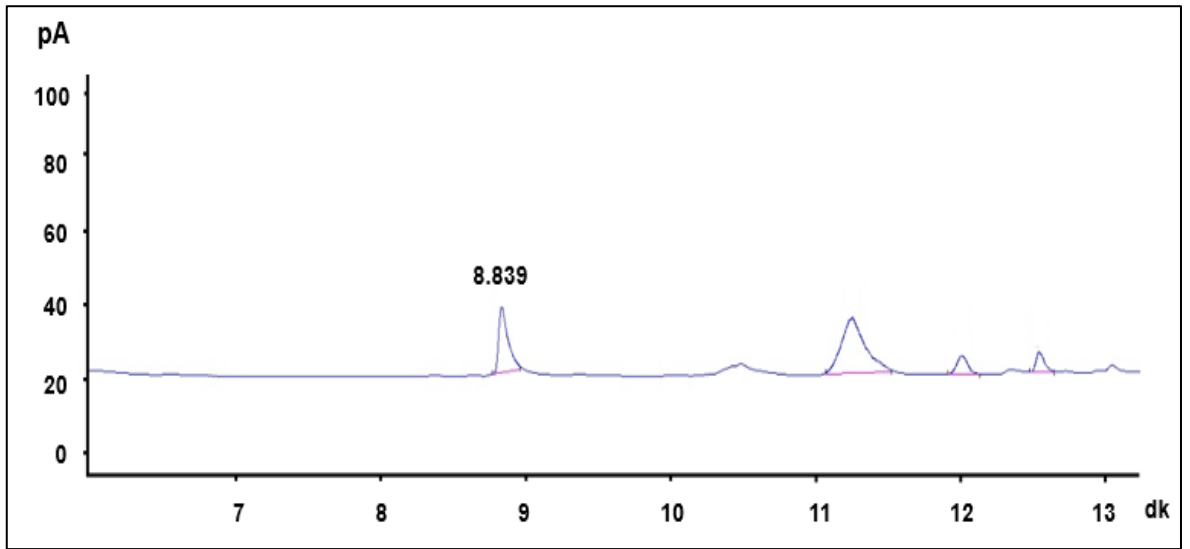
Rekombinant plazmid içeren *B. megaterium* suşları ve boş plazmid içeren *B. megaterium* suşu ile orbital çalkalamalı biyoreaktörde gerçekleştirilen üretimlerden elde edilen PHA polimerlerinin içeriğini belirlemek için GC-FID kromatogramları elde edilmiştir. Alıkonma süreleri yaklaşık 8.8 dk'da elde edilen pikler PHB varlığını göstermektedir. Rekombinant plazmidleri taşıyan suşlardan elde edilen PHA'ların piki boş plazmid barındıran suştan elde edilen PHA'ların pikinden daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.13-Şekil 4.15). GC-FID standart PHA kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.16) kullanılarak *B. megaterium* suşlarından elde edilen PHA polimerlerinin miktarı belirlenmiştir. GC-FID analizi sonucu en yüksek PHA miktarı beklenildiği gibi pC-HIS-phaC-phaR plazmidini barındıran *B. megaterium* hücrelerinde ($2,3 \text{ g L}^{-1}$), sonrasında pC-HIS-phaC plazmidini barındıran hücrelerde ($2,2 \text{ g L}^{-1}$) ve en düşük PHA miktarı ise boş plazmid barındıran hücrelerde ($2,1 \text{ g L}^{-1}$) tespit edilmiştir.



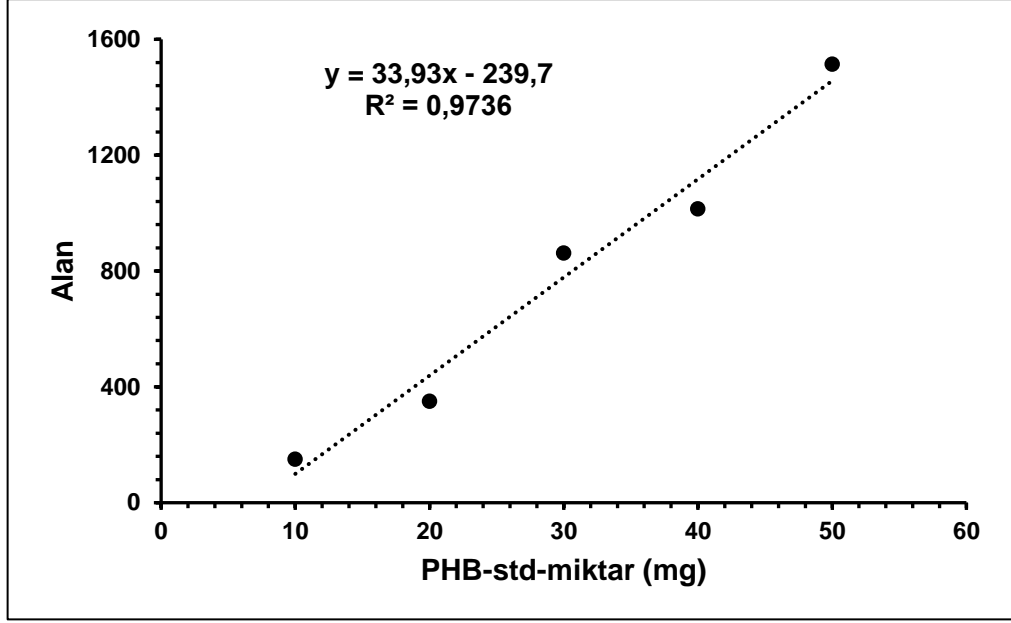
Şekil 4.13. pC-HIS-phaC-phaR plazmidi içeren *B. megaterium* ile üretilen PHA



Şekil 4.14. pC-HIS-phaC plazmidi içeren *B. megaterium* ile üretilen PHA



Şekil 4.15. pC-HIS plazmidi içeren *B. megaterium* ile üretilen PHA



Şekil 4.16. GC-FID Deneyinde Kullanılan PHA Kalibrasyon Eğrisi

5. YORUM

Moleküler klonlama prosedürleri takip edilerek vektör ve insert DNA'lar elde edilmiş ve ligasyon reaksiyonu ile birleştirilerek rekombinant plazmidler elde edilmiştir. Restriksiyon kesme ve DNA dizi analizi ile doğrulanan plazmidler *B. megaterium* NRRL B-14308 suşuna protoplast transformasyonu ile aktarılmış ve bu tez çalışmasında PHB üretiminde kullanılmak üzere rekombinant suşlar elde edilmiştir.

Rekombinant proteinlerin hücre çoğalmasını etkileyen proteinler olmaması sebebiyle elde edilen üç farklı suşun çoğalma eğrileri beklenildiği gibi birbirine benzemektedir. Bununla birlikte, Nile red Floresan Spektroskopisi'nde pC-HIS-phaC-phaR plazmidini içeren *B. megaterium* hücrelerinden en yüksek sinyal yoğunluğu elde edilmiş, pC-HIS-phaC plazmidini barındıran *B. megaterium* hücrelerinden en yüksek ikinci sinyal yoğunluğu elde edilmiştir. Boş plazmid içeren *B. megaterium* suşundan ise en az sinyal yoğunluğu elde edilmiştir. Nile red Floresan Spektroskopisi sonuçlarında suşlar arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır. Ayrıca, SDS-PAGE analizleri ile *phaC* ve *phaR* genlerinin *B. megaterium* suşlarında ekspres edildiği gösterilmiştir.

Farklı suşlardan elde edilen PHA polimerlerinin hepsinin PHBV yapısında olduğu, birbirlerine yakın bozunma (240-261°C, 402-407°C) ve erime sıcaklıklarına (161-166°C) sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen polimerlerin bozunma ve erime sıcaklıklarının ticari PHB'nin bozunma (287°C) ve erime sıcaklıklarından (175°C) düşük olması ve ikinci bozunma sıcaklıklarına sahip olmaları üretilen polimerlerin yapısında hidroksivalerat birimlerinin varlığından kaynaklanmaktadır.

Endüstriyel ve ticari olarak kullanılan PHA'larda mol bazında minimum %20 HV birimlerinin bulunması gerekmektedir [36]. Tez kapsamında üretilen ve saflaştırılan PHA örneklerinde ise %60 oranda 3HV birimlerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Üretilen PHA içerisinde hidroksivalerat birimlerinin artması ile birlikte üretilen PHA'nın kullanılabilirliği ve ticarileştirilebilirliği artmaktadır.

Hücre pelletlerinden PHA saflaştırması için iki farklı saflaştırma yöntemi denenmiş ve en yüksek saflaştırma verimleri; pC-HIS-phaC-phaR plazmidini içeren *B. megaterium* hücreleri için 1,56 g L⁻¹, pC-HIS-phaC plazmidini içeren *B. megaterium* hücreleri için 1,12 g L⁻¹ ve boş plazmid içeren *B. megaterium* hücreleri için 0,96 g L⁻¹ olarak bulunmuştur.

GC-FID analizlerinin sonuçlarına göre PHA üretim verimleri incelenmiş ve sonuçlar sırasıyla; pC-HIS-phaC-phaR plazmidini içeren *B. megaterium* hücreleri için 2,3 g L⁻¹, pC-HIS-phaC plazmidini içeren *B. megaterium* hücreleri için 2,2 g L⁻¹ ve boş plazmid içeren *B. megaterium* hücreleri için 2,1 g L⁻¹ olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında, genetik mühendisliği yöntemleri kullanılarak, daha önce araştırma grubumuz tarafından geliştirilen rekombinant bir plazmide *phaC* geninin aktivitesini artıran *phaR* geni klonlanmış, plazmidin *B. megaterium* NRRL B-14308 suşuna aktarılmasıyla yeni bir rekombinant *B. megaterium* suşu elde edilmiştir. Rekombinant suşlar ile üretilen biyopolimer miktarı literatürdeki rekombinant *B. megaterium* suşları ile kıyaslandığında, benzer düzeylerde dir [135, 165]. Elde edilen PHA miktarlarının rekombinant olmayan *B. megaterium* suşları ile kıyaslandığında ise daha yüksek düzeyde olduğu görülmektedir [136, 166, 167].

Bundan sonraki çalışmalarda mcl-PHA üreten *Pseudomonas* cinslerinden elde edilecek PHA sentez genlerinin *B. megaterium* suşlarına aktarılmasıyla, endüstriyel açıdan büyük önem taşıyan scl-mcl-PHA yapısında bulunan biyopolimerler üretilebilir. Ayrıca, *B. megaterium* genomundaki PHA sentez operonu üzerinde bulunan genlerin tekli ve çoklu kombinasyonlarının farklı ekspresyon vektörlerine aktarılması ile PHA üretim verimleri artırılabilir. Bununla birlikte daha yüksek verime sahip plazmidlerin ve daha az maliyetli indükleyicilerin kullanılması ile PHA üretim maliyetleri düşürülebilir. Son olarak, rekombinant suşlar ile üretilen PHA polimerlerinin mekanik karakterizasyonları gerçekleştirilebilir ve ticarileştirme süreçlerine yönelik sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] R. Geyer, J.R. Jambeck, K.L. Law, Production, use, and fate of all plastics ever made, *Science Advances*, 3 (2017).
- [2] C. Campanale, C. Massarelli, I. Savino, V. Locaputo, V.F. Uricchio, A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health, *Int J Environ Res Public Health*, 17 (2020).
- [3] N.R. Nair, V.C. Sekhar, K.M. Nampoothiri, A. Pandey, 32 - Biodegradation of Biopolymers, in: A. Pandey, S. Negi, C.R. Soccol (Eds.) *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier (2017) 739.
- [4] A.A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed, Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnology Advances*, 26 (2008).
- [5] S. Ibrahim, O. Riahi, S.M. Said, M.F.M. Sabri, S. Rozali, *Biopolymers From Crop Plants*, Reference Module in Materials Science and Materials Engineering, Elsevier (2019).
- [6] B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biomedical Applications of Biodegradable Polymers, *J Polym Sci B Polym Phys*, 49 (2011).
- [7] G. Radoslav, M. Vukic, V. Gojkovic Cvjetkovic, Application of Biopolymers in the Food Industry, (2017)
- [8] M.U. Sankar, S. Aigal, S.M. Maliyekkal, A. Chaudhary, Anshup, A.A. Kumar, K. Chaudhari, T. Pradeep, Biopolymer-reinforced synthetic granular nanocomposites for affordable point-of-use water purification, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (2013) 8459.
- [9] C. Cheng, J. Deng, B. Lei, A. He, X. Zhang, L. Ma, S. Li, C. Zhao, Toward 3D graphene oxide gels based adsorbents for high-efficient water treatment via the promotion of biopolymers, *Journal of Hazardous Materials*, 263 (2013) 467-478.
- [10] T.C.-Y. Leung, C.K. Wong, Y. Xie, Green synthesis of silver nanoparticles using biopolymers, carboxymethylated-curdlan and fucoidan, *Materials Chemistry and Physics*, 121 (2010) 402-405.
- [11] S. Mohan, O.S. Oluwafemi, S.C. George, V.P. Jayachandran, F.B. Lewu, S.P. Songca, N. Kalarikkal, S. Thomas, Completely green synthesis of dextrose reduced silver nanoparticles, its antimicrobial and sensing properties, *Carbohydrate Polymers*, 106 (2014) 469-474.
- [12] A. Panáček, L. Kvítek, R. Prucek, M. Kolář, R. Večeřová, N. Pizúrová, V.K. Sharma, T.j. Nevěčná, R. Zbořil, *Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis*,

Characterization, and Their Antibacterial Activity, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110 (2006) 16248-16253.

- [13] S.Y. Lee, Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnology and Bioengineering*, 49 (1996) 1-14.
- [14] L. Huang, C. Liu, Y. Liu, X. Jia, The composition analysis and preliminary cultivation optimization of a PHA-producing microbial consortium with xylose as a sole carbon source, *Waste Manag*, 52 (2016) 77-85.
- [15] Z.A. Raza, S. Abid, I.M. Banat, Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126 (2018) 45-56.
- [16] S. Obruca, P. Sedlacek, M. Koller, D. Kucera, I. Pernicova, Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications, *Biotechnology Advances*, 36 (2018) 856-870.
- [17] U. Rao, R. Sridhar, P.K. Sehgal, Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil, *Biochemical Engineering Journal*, 49 (2010) 13-20.
- [18] A.P. Andrade, B. Witholt, D. Chang, Z. Li, Synthesis and Characterization of Novel Thermoplastic Polyester Containing Blocks of Poly[(R)-3-hydroxyoctanoate] and Poly[(R)-3-hydroxybutyrate], *Macromolecules*, 36 (2003) 9830-9835.
- [19] H. Arslan, A. Menteş, B. Hazer, Synthesis and characterization of diblock, triblock, and multiblock copolymers containing poly(3-hydroxy butyrate) units, *Journal of Applied Polymer Science*, 94 (2004) 1789-1796.
- [20] F. Ravenelle, R.H. Marchessault, One-Step Synthesis of Amphiphilic Diblock Copolymers from Bacterial Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid], *Biomacromolecules*, 3 (2002) 1057-1064.
- [21] K. Bahari, H. Mitomo, T. Enjoji, F. Yoshii, K. Makuuchi, Degradability of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer grafted with styrene by radiation, *Polymer Degradation and Stability*, 61 (1998) 245-252.
- [22] J. Babinot, E. Renard, V. Langlois, Controlled Synthesis of Well Defined Poly(3-hydroxyalkanoate)s-based Amphiphilic Diblock Copolymers Using Click Chemistry, *Macromolecular Chemistry and Physics*, 212 (2011) 278-285.
- [23] L.-P. Wu, L. Wang, X. Wang, K. Xu, Synthesis, characterizations and biocompatibility of novel biodegradable star block copolymers based on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and poly(ϵ -caprolactone), *Acta biomaterialia*, 6 (2009) 1079-1089.

- [24] S. Ray, V.C. Kalia, Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates, *Indian J Microbiol*, 57 (2017) 261-269.
- [25] Y. Ke, C. Liu, X. Zhang, M. Xiao, G. Wu, Surface Modification of Polyhydroxyalkanoates toward Enhancing Cell Compatibility and Antibacterial Activity, *Macromolecular Materials and Engineering*, 302 (2017) 1700258.
- [26] L. Favaro, M. Basaglia, S. Casella, Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13 (2019) 208-227.
- [27] A. Torrejon-Cabello, J. Espi, B. Ruiz, Influence of the C/N ratio on synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Ralstonia eutropha* using juice manufacturing wastewater as carbon source, *New Biotechnology*, 33 (2016) S153.
- [28] 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 & Biotechnology*, 92 (2017) 1809-1816.
- [29] J.H. Dhangdhariya, S. Dubey, H.B. Trivedi, I. Pancha, J.K. Bhatt, B.P. Dave, S. Mishra, Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium, *Int J Biol Macromol*, 76 (2015) 254-261.
- [30] X. Gao, X.-X. Yuan, Z.-Y. Shi, Y.-Y. Guo, X.-W. Shen, J.-C. Chen, Q. Wu, G.-Q. Chen, Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *E. coli* containing an optimized PHA synthase gene, *Microbial Cell Factories*, 11 (2012) 130.
- [31] S. Ghosh, R. Gnaim, S. Greiserman, L. Fadeev, M. Gozin, A. Golberg, Macroalgal biomass subcritical hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by *Haloferax mediterranei*, *Bioresource Technology*, 271 (2019) 166-173.
- [32] S.M. Haase, B. Huchzermeyer, T. Rath, PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations, *Journal of Applied Phycology*, 24 (2012) 157-162.
- [33] T. Hai, S. Hein, A. Steinbüchel, Multiple evidence for widespread and general occurrence of type-III PHA synthases in cyanobacteria and molecular characterization of the PHA synthases from two thermophilic cyanobacteria: *Chlorogloeopsis fritschii* PCC 6912 and *Synechococcus* sp. strain MA19, *Microbiology (Reading)*, 147 (2001) 3047-3060.

- [34] I. Poblete-Castro, D. Binger, R. Oehlert, M. Rohde, Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different *Pseudomonas putida* strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions, *BMC Biotechnol*, 14 (2014) 962.
- [35] P. Sharma, B.K. Bajaj, Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PS 10, *International Journal of Biological Macromolecules*, 81 (2015) 241-248.
- [36] 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 (2017) 47-53.
- [37] S. Obruca, I. Marova, S. Melusova, L. Mravcova, Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037, *Annals of Microbiology*, 61 (2011) 947-953.
- [38] A. Nath, M. Dixit, A. Bandiya, S. Chavda, A.J. Desai, Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24, *Bioresour Technol*, 99 (2008) 5749-5755.
- [39] A. Rodríguez-Contreras, M. Koller, G. Brauneegg, M.S. Marqués-Calvo, Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain, *New Biotechnology*, 33 (2016) 73-77.
- [40] D. Kucera, I. Pernicová, A. Kovalcik, M. Koller, L. Mullerova, P. Sedlacek, F. Mravec, J. Nebesarova, M. Kalina, I. Marova, V. Krzyzanek, S. Obruca, Characterization of the promising poly(3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*, *Bioresource Technology*, 256 (2018) 552-556.
- [41] J. Pais, L.S. Serafim, F. Freitas, M.A.M. Reis, Conversion of cheese whey into poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*, *New Biotechnology*, 33 (2016) 224-230.
- [42] J.M.B.T. Cavalheiro, M.C.M.D. de Almeida, C. Grandfils, M.M.R. da Fonseca, Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol, *Process Biochemistry*, 44 (2009) 509-515.
- [43] P. Kanjanachumpol, S. Kulpreecha, V. Tolieng, N. Thongchul, Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019, *Bioprocess Biosyst Eng*, 36 (2013) 1463-1474.
- [44] M.T. Cesário, R.S. Raposo, M.C.M.D. de Almeida, F. van Keulen, B.S. Ferreira, M.M.R. da Fonseca, Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates, *New Biotechnology*, 31 (2014) 104-113.

- [45] S. Obruca, O. Snajdar, Z. Svoboda, I. Marova, Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil, *World J Microbiol Biotechnol*, 29 (2013) 2417-2428.
- [46] 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 (2015) 487-494.
- [47] A. Rodríguez-Contreras, M. Koller, M. Miranda-de Sousa Dias, M. Calafell-Monfort, G. Braunegg, M.S. Marqués-Calvo, Influence of glycerol on poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* and *Burkholderia sacchari*, *Biochemical Engineering Journal*, 94 (2015) 50-57.
- [48] L.F. Silva, M.K. Taciro, M.E. Michelin Ramos, J.M. Carter, J.G. Pradella, J.G. Gomez, Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 31 (2004) 245-254.
- [49] G. Mothes, C. Schnorpfeil, J.U. Ackermann, Production of PHB from Crude Glycerol, *Engineering in Life Sciences*, 7 (2007) 475-479.
- [50] D.-S. Sheu, W.-M. Chen, J.-Y. Yang, R.-C. Chang, Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources, *Enzyme and Microbial Technology*, 44 (2009) 289-294.
- [51] X. Han, Y. Satoh, Y. Kuriki, T. Seino, S. Fujita, T. Suda, T. Kobayashi, K. Tajima, Polyhydroxyalkanoate production by a novel bacterium *Massilia* sp. UMI-21 isolated from seaweed, and molecular cloning of its polyhydroxyalkanoate synthase gene, *J Biosci Bioeng*, 118 (2014) 514-519.
- [52] M.H. Ibrahim, A. Steinbüchel, *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol, *J Appl Microbiol*, 108 (2010) 214-225.
- [53] P.I. Nickel, M.J. Pettinari, M.A. Galvagno, B.S. Méndez, Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutants in microaerobiosis, *Appl Environ Microbiol*, 72 (2006) 2614-2620.
- [54] V. Saranya, R. Shenbagarathai, Production and characterization of PHA from recombinant *E. coli* harbouring *phaC1* gene of indigenous *Pseudomonas* sp. LDC-5 using molasses, *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 42 (2011) 1109-1118.

- [55] X. Fu, D. Tan, G. Aibaidula, Q. Wu, J.-C. Chen, G.-Q. Chen, Development of Halomonas TD01 as A Host for Open Production of Chemicals, *Metabolic Engineering*, 23 (2014).
- [56] W.S. Ahn, S.J. Park, S.Y. Lee, Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant Escherichia coli with a highly concentrated whey solution, *Applied and environmental microbiology*, 66 (2000) 3624-3627.
- [57] S.J. Park, Y.A. Jang, W. Noh, Y.H. Oh, H. Lee, Y. David, M.G. Baylon, J. Shin, J.E. Yang, S.Y. Choi, S.H. Lee, S.Y. Lee, Metabolic engineering of Ralstonia eutropha for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose, *Biotechnol Bioeng*, 112 (2015) 638-643.
- [58] S.K. Bhatia, Y.-H. Shim, J.-M. Jeon, C.J. Brigham, Y.-H. Kim, H.-J. Kim, H.-M. Seo, J.-H. Lee, J.-H. Kim, D.-H. Yi, Y.K. Lee, Y.-H. Yang, Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered Escherichia coli, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38 (2015) 1479-1484.
- [59] S. Yup Lee, Poly(3-hydroxybutyrate) production from xylose by recombinant Escherichia coli, *Bioprocess Engineering*, 18 (1998) 397-399.
- [60] C. Ling, G.-Q. Qiao, B.-W. Shuai, K. Olavarria, J. Yin, R.-J. Xiang, K.-N. Song, Y.-H. Shen, Y. Guo, G.-Q. Chen, Engineering NADH/NAD⁺ ratio in Halomonas bluephagenesis for enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHA), *Metabolic Engineering*, 49 (2018) 275-286.
- [61] J. Ye, D. Hu, X. Che, X. Jiang, T. Li, J. Chen, H.M. Zhang, G.-Q. Chen, Engineering of Halomonas bluephagenesis for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose, *Metabolic Engineering*, 47 (2018) 143-152.
- [62] H.-D. Tran, V.-H. Huynh, C.-H. Pham, D. Chung Anh, D. Tran Quoc, Cloning phbCAB operon of Alcaligenes eutrophus H16 into Escherichia coli DH5 α to manufacture Poly 3-Hydroxybutyrate using molasses as carbon source, *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 6 (2016) 1017-1026.
- [63] Y. Arifin, S. Sabri, H. Sugiarto, J.O. Krömer, C.E. Vickers, L.K. Nielsen, Deletion of cscR in Escherichia coli W improves growth and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from sucrose in fed batch culture, *J Biotechnol*, 156 (2011) 275-278.
- [64] T. Tsuge, Fundamental factors determining the molecular weight of polyhydroxyalkanoate during biosynthesis, *Polymer Journal*, 48 (2016) 1051-1057.
- [65] Y.-X. Zhao, Z.-M. Rao, Y.-F. Xue, P. Gong, Y.-Z. Ji, Y.-H. Ma, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by Haloarchaeon

- Halogramum amylolyticum*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (2015) 7639-7649.
- [66] S. Mohapatra, S. Maity, H. Dash, S. Das, S. Pattnaik, C.c. Rath, D.D. Samantaray, *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12 (2017) 206-213.
- [67] A. Maehara, S. Taguchi, T. Nishiyama, T. Yamane, Y. Doi, A Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA, *Journal of Bacteriology*, 184 (2002) 3992.
- [68] V. Saranya, R. Shenbagarathai, Production and characterization of PHA from recombinant *E. coli* harbouring phaC1 gene of indigenous *Pseudomonas* sp. LDC-5 using molasses, *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42 (2011) 1109-1118.
- [69] Y. Lian-ngit, T. Mumtaz, M. Mohammadi, L.-Y. Phang, Y. Ando, A. Raha, K. Sudesh, H. Ariffin, M. Hassan, M.R. Zakaria, Polyhydroxyalkanoate Synthesis by Recombinant *Escherichia coli* JM109 Expressing PHA Biosynthesis Genes from *Comamonas* sp. EB172, *Microbial & Biochemical Technology*, 4 (2012) 103-110.
- [70] J. Draper, B. Rehm, Engineering bacteria to manufacture functionalized polyester beads, *Bioengineered*, 3 (2012) 203-208.
- [71] G.-Q. Chen, X.-R. Jiang, Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis, *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2 (2017) 192-197.
- [72] A. Steinbüchel, T. Lütke-Eversloh, Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms, *Biochemical Engineering Journal*, 16 (2003) 81-96.
- [73] H. Wu, S. Li, M. Ji, Q. Chen, J. Shi, J.M. Blamey, J. Sun, Improvement of polyhydroxybutyrate production by deletion of *csrA* in *Escherichia coli*, *Electronic Journal of Biotechnology*, 46 (2020) 8-13.
- [74] Z.-J. Li, Z.-Y. Shi, J. Jian, Y.-Y. Guo, Q. Wu, G.-Q. Chen, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered *Escherichia coli*, *Metabolic Engineering*, 12 (2010) 352-359.
- [75] L. Tripathi, L.P. Wu, M. Dechuan, J. Chen, Q. Wu, G.Q. Chen, *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions, *Bioresour Technol*, 142 (2013) 225-231.

- [76] M. Singh, S. Patel, V. Kalia, *Bacillus subtilis* as potential producer for Polyhydroxyalkanoates, *Microbial cell factories*, 8 (2009) 38.
- [77] A. Singh, N. Mallick, Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production, *FEMS Microbiology Letters*, 364 (2017).
- [78] J. Mozejko-Ciesielska, K. Szacherska, P. Marciniak, *Pseudomonas* Species as Producers of Eco-friendly Polyhydroxyalkanoates, *Journal of Polymers and the Environment*, 27 (2019).
- [79] J. Mozejko-Ciesielska, P. Marciniak, K. Szacherska, Polyhydroxyalkanoates Synthesized by *Aeromonas* Species: Trends and Challenges, *Polymers (Basel)*, 11 (2019) 1328.
- [80] L.R. Castilho, D.A. Mitchell, D.M.G. Freire, Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation, *Bioresource Technology*, 100 (2009) 5996-6009.
- [81] K. Sudesh, K. Bhubalan, J.-A. Chuah, Y.-K. Kek, H. Kamilah, N. Sridewi, Y.-F. Lee, Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (2011) 1373-1386.
- [82] K. Khosravi-Darani, Z.-B. Mokhtari, T. Amai, K. Tanaka, Microbial production of poly(hydroxybutyrate) from C 1 carbon sources, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (2013) 1407-1424.
- [83] T.M.M.M. Amaro, D. Rosa, G. Comi, L. Iacumin, Prospects for the Use of Whey for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production, *Front Microbiol*, 10 (2019) 992-992.
- [84] A.L. Chung, H.L. Jin, L.J. Huang, H.M. Ye, J.C. Chen, Q. Wu, G.Q. Chen, Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxydodecanoate) by β -oxidation inhibited mutant of *Pseudomonas entomophila* L48, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 3559-3566.
- [85] H.-h. Wang, X.-t. Li, G.-Q. Chen, Production and characterization of homopolymer polyhydroxyheptanoate (P3HHp) by a *fadBA* knockout mutant *Pseudomonas putida* KTOY06 derived from *P. putida* KT2442, *Process Biochemistry*, 44 (2009) 106-111.
- [86] Q. Liu, G. Luo, X.R. Zhou, G.Q. Chen, Biosynthesis of poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by β -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*, *Metab Eng*, 13 (2011) 11-17.
- [87] G.-Q. Chen, I. Hajnal, H. Wu, L. Lv, J. Ye, Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates, *Trends in Biotechnology*, 33 (2015) 565-574.

- [88] L. Tripathi, L.-P. Wu, M. Dechuan, J. Chen, Q. Wu, G.-Q. Chen, *Pseudomonas putida* KT2442 as a platform for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with adjustable monomer contents and compositions, *Bioresource Technology*, 142 (2013) 225-231.
- [89] A. Surendran, M. Lakshmanan, J.Y. Chee, A.M. Sulaiman, D.V. Thuoc, K. Sudesh, Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils?, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8 (2020).
- [90] P. Kahar, T. Tsuge, K. Taguchi, Y. Doi, High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain, *Polymer Degradation and Stability*, 83 (2004) 79-86.
- [91] R. Haas, B. Jin, F.T. Zepf, Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from Waste Potato Starch, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (2008) 253-256.
- [92] N. Annamalai, N. Sivakumar, Production of polyhydroxybutyrate from wheat bran hydrolysate using *Ralstonia eutropha* through microbial fermentation, *J Biotechnol*, 237 (2016) 13-17.
- [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 (2020) 593-599.
- [94] S.Y. Lee, A.P.J. Middelberg, Y.K. Lee, Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters*, 19 (1997) 1033-1035.
- [95] H.H. Wong, S.Y. Lee, Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50 (1998) 30-33.
- [96] X.-Z. Fu, D. Tan, G. Aibaidula, Q. Wu, J.-C. Chen, G.-Q. Chen, Development of *Halomonas* TD01 as a host for open production of chemicals, *Metabolic Engineering*, 23 (2014) 78-91.
- [97] X.-R. Jiang, H. Wang, R. Shen, G.-Q. Chen, Engineering the bacterial shapes for enhanced inclusion bodies accumulation, *Metabolic Engineering*, 29 (2015) 227-237.
- [98] 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 (2020) 86.

- [99] M. Löbler, M. Sass, C. Kunze, K.P. Schmitz, U.T. Hopt, Biomaterial implants induce the inflammation marker CRP at the site of implantation, *J Biomed Mater Res*, 61 (2002) 165-167.
- [100] J. Ihssen, D. Magnani, L. Thöny-Meyer, Q. Ren, Use of extracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase for targeted binding of proteins to artificial poly[(3-hydroxyoctanoate)-co-(3-hydroxyhexanoate)] granules, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 1854-1864.
- [101] S. Chen, N.A. Parlane, J. Lee, D.N. Wedlock, B.M. Buddle, B.H.A. Rehm, New skin test for detection of bovine tuberculosis on the basis of antigen-displaying polyester inclusions produced by recombinant *Escherichia coli*, *Applied and environmental microbiology*, 80 (2014) 2526-2535.
- [102] N.A. Parlane, D.N. Wedlock, B.M. Buddle, B.H.A. Rehm, Bacterial Polyester Inclusions Engineered To Display Vaccine Candidate Antigens for Use as a Novel Class of Safe and Efficient Vaccine Delivery Agents, *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (2009) 7739.
- [103] S.J. Lee, J.P. Park, T.J. Park, S.Y. Lee, S. Lee, J.K. Park, Selective Immobilization of Fusion Proteins on Poly(hydroxyalkanoate) Microbeads, *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 5755-5759.
- [104] N.A. Parlane, S.K. Gupta, P. Rubio-Reyes, S. Chen, M. Gonzalez-Miro, D.N. Wedlock, B.H.A. Rehm, Self-Assembled Protein-Coated Polyhydroxyalkanoate Beads: Properties and Biomedical Applications, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3 (2017) 3043-3057.
- [105] A.C. Jahns, R.G. Haverkamp, B.H.A. Rehm, Multifunctional Inorganic-Binding Beads Self-Assembled Inside Engineered Bacteria, *Bioconjugate Chemistry*, 19 (2008) 2072-2080.
- [106] B.T. Bäckström, J.A. Brockelbank, B.H. Rehm, Recombinant *Escherichia coli* produces tailor-made biopolyester granules for applications in fluorescence activated cell sorting: functional display of the mouse interleukin-2 and myelin oligodendrocyte glycoprotein, *BMC Biotechnol*, 7 (2007) 3.
- [107] J. Li, G. Shang, M. You, S. Peng, Z. Wang, H. Wu, G.Q. Chen, Endotoxin removing method based on lipopolysaccharide binding protein and polyhydroxyalkanoate binding protein PhaP, *Biomacromolecules*, 12 (2011) 602-608.
- [108] H. Kenar, G.T. Kose, M. Toner, D.L. Kaplan, V. Hasirci, A 3D aligned microfibrillar myocardial tissue construct cultured under transient perfusion, *Biomaterials*, 32 (2011) 5320-5329.
- [109] H. Kenar, G.T. Kose, V. Hasirci, Design of a 3D aligned myocardial tissue construct from biodegradable polyesters, *J Mater Sci Mater Med*, 21 (2010) 989-997.

- [110] S.M. Cool, B. Kenny, A. Wu, V. Nurcombe, M. Trau, A.I. Cassady, L. Grøndahl, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composite biomaterials for bone tissue regeneration: in vitro performance assessed by osteoblast proliferation, osteoclast adhesion and resorption, and macrophage proinflammatory response, *J Biomed Mater Res A*, 82 (2007) 599-610.
- [111] A. Kumarasuriyar, R.A. Jackson, L. Grøndahl, M. Trau, V. Nurcombe, S.M. Cool, Poly(beta-hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate) supports in vitro osteogenesis, *Tissue Eng*, 11 (2005) 1281-1295.
- [112] S. Zhang, M.P. Prabhakaran, X. Qin, S. Ramakrishna, Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate containing scaffolds and their integration with osteoblasts as a model for bone tissue engineering, *J Biomater Appl*, 29 (2015) 1394-1406.
- [113] S. Zhang, M.P. Prabhakaran, X. Qin, S. Ramakrishna, Biocomposite scaffolds for bone regeneration: Role of chitosan and hydroxyapatite within poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate on mechanical properties and in vitro evaluation, *J Mech Behav Biomed Mater*, 51 (2015) 88-98.
- [114] X.-H. Qu, Q. Wu, G.-Q. Chen, In vitro study on hemocompatibility and cytocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), *Polymer Edn*, 17 (2006) 1107-1121.
- [115] Z. Zheng, F.F. Bei, H.L. Tian, G.Q. Chen, Effects of crystallization of polyhydroxyalkanoate blend on surface physicochemical properties and interactions with rabbit articular cartilage chondrocytes, *Biomaterials*, 26 (2005) 3537-3548.
- [116] Y. Wang, Y.Z. Bian, Q. Wu, G.Q. Chen, Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits, *Biomaterials*, 29 (2008) 2858-2868.
- [117] H.M. Chang, Z.H. Wang, H.N. Luo, M. Xu, X.Y. Ren, G.X. Zheng, B.J. Wu, X.H. Zhang, X.Y. Lu, F. Chen, X.H. Jing, L. Wang, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering, *Braz J Med Biol Res*, 47 (2014) 533-539.
- [118] C. Ye, P. Hu, M.X. Ma, Y. Xiang, R.G. Liu, X.W. Shang, PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 30 (2009) 4401-4406.
- [119] Z.B. Luklinska, H. Schluckwerder, In vivo response to HA-polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate composite, *J Microsc*, 211 (2003) 121-129.

- [120] E.I. Shishatskaya, I.A. Khlusov, T.G. Volova, A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation, *J Biomater Sci Polym Ed*, 17 (2006) 481-498.
- [121] N. Dinjaski, M. Fernández-Gutiérrez, S. Selvam, F.J. Parra-Ruiz, S.M. Lehman, J. San Román, E. García, J.L. García, A.J. García, M.A. Prieto, PHACOS, a functionalized bacterial polyester with bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Biomaterials*, 35 (2014) 14-24.
- [122] V. Rivero-Buceta, M.R. Aguilar, A.M. Hernández-Arriaga, F.G. Blanco, A. Rojas, M. Tortajada, R.A. Ramírez-Jiménez, B. Vázquez-Lasa, A. Prieto, Anti-staphylococcal hydrogels based on bacterial cellulose and the antimicrobial biopolyester poly(3-hydroxy-acetylthioalkanoate-co-3-hydroxyalkanoate), *International Journal of Biological Macromolecules*, 162 (2020) 1869-1879.
- [123] D.B. Hazer, B. Hazer, F. Kaymaz, Synthesis of microbial elastomers based on soybean oily acids. Biocompatibility studies, *Biomed Mater*, 4 (2009) 035011.
- [124] H.S. Al-Battashi, N. Annamalai, N. Sivakumar, S. Al-Bahry, B.N. Tripathi, Q.D. Nguyen, V.K. Gupta, Lignocellulosic biomass (LCB): a potential alternative biorefinery feedstock for polyhydroxyalkanoates production, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 18 (2019) 183-205.
- [125] P.S. Vary, Prime time for *Bacillus megaterium*, *Microbiology (Reading)*, 140 (Pt 5) (1994) 1001-1013.
- [126] M. Higashihara, S. Okada, Studies on β -Amylase of *Bacillus megaterium* Strain No. 32, *Agricultural and Biological Chemistry*, 38 (1974) 1023-1029.
- [127] S. Abootalebi, A. Saeed, A. Gholami, M. Mohkam, A. Kazemi, N. Nezafat, S.M. Mousavi, S.A. Hashemi, E. Shorafa, Screening, Characterization and Production of Thermostable Alpha-Amylase Produced by a Novel Thermophilic *Bacillus megaterium* Isolated from Pediatric Intensive Care Unit, *Journal of Environmental Treatment Techniques*, 8 (2020) 952-960.
- [128] S. Niziołek, beta-Amylase production by some *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus polymyxa* [correction of polymaxa] strains, *Acta Microbiol Pol*, 46 (1997) 357-362.
- [129] S. Ståhl, A new bacteriocinogenic activity: Megacin BII encoded by plasmid pSE 203 in strains of *Bacillus megaterium*, *Archives of Microbiology*, 151 (1989) 159-165.
- [130] A. Kiss, G. Balikó, A. Csorba, T. Chuluunbaatar, K.F. Medzihradzsky, L. Alföldi, Cloning and Characterization of the DNA Region Responsible for

Megacin A-216 Production in *Bacillus megaterium*, 216, *Journal of Bacteriology*, 190 (2008) 6448.

- [131] M. Morita, K. Tomita, M. Ishizawa, K. Takagi, F. Kawamura, H. Takahashi, T. Morino, Cloning of oxetanocin A biosynthetic and resistance genes that reside on a plasmid of *Bacillus megaterium* strain NK84-0128, *Biosci Biotechnol Biochem*, 63 (1999) 563-566.
- [132] K. Grage, P. McDermott, B.H.A. Rehm, Engineering *Bacillus megaterium* for production of functional intracellular materials, *Microbial Cell Factories*, 16 (2017) 211.
- [133] M.A. Von Tersch, B.C. Carlton, Bacteriocin from *Bacillus megaterium* ATCC 19213: comparative studies with megacin A-216, *Journal of Bacteriology*, 155 (1983) 866.
- [134] R.H. Findlay, D.C. White, Polymeric Beta-Hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, *Applied and Environmental Microbiology*, 45 (1983) 71.
- [135] S. Rami Reddy Tadi, S. Dutt Ravindran, R. Balakrishnan, S. Sivaprakasam, Recombinant production of poly-(3-hydroxybutyrate) by *Bacillus megaterium* utilizing millet bran and rapeseed meal hydrolysates, *Bioresource Technology*, 326 (2021) 124800.
- [136] M. Akdoğan, E. Çelik, Purification and characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) from a *Bacillus megaterium* strain using various dehydration techniques, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93 (2018) 2292-2298.
- [137] M. Arshadi, S.M. Mousavi, P. Rasoulnia, Enhancement of simultaneous gold and copper recovery from discarded mobile phone PCBs using *Bacillus megaterium*: RSM based optimization of effective factors and evaluation of their interactions, *Waste Management*, 57 (2016) 158-167.
- [138] Q. Kong, S. Shan, Q. Liu, X. Wang, F. Yu, Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*, *International Journal of Food Microbiology*, 139 (2010) 31-35.
- [139] 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 (2020) 1242-1250.
- [140] J. Ricardo, J. Gómez Cardozo, R. Velasco Bucheli, C. Sánchez, I. La, M. Riesco, A. Lucía, M. Martínez, Engineering of *Bacillus megaterium* for improving PHA production from glycerol, *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 27 (2019) 64-72.

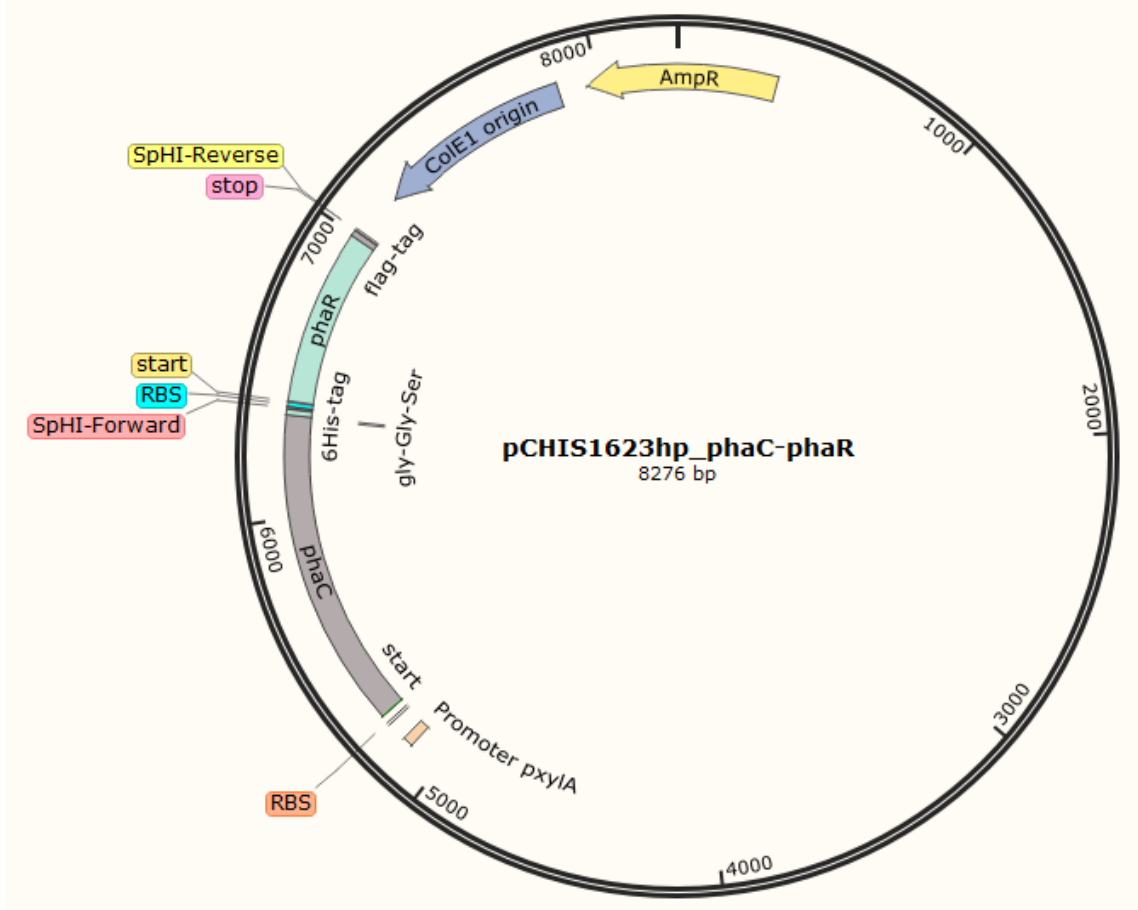
- [141] M. Akdoğan, E. Çelik, Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biopolymer by recombinant *Bacillus megaterium* in fed-batch bioreactors, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44 (2021) 403-416.
- [142] S. Mohapatra, S. Maity, H.R. Dash, S. Das, S. Pattnaik, C.C. Rath, D. Samantaray, *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12 (2017) 206-213.
- [143] M. Malten, R. Biedendieck, M. Gamer, A.C. Drews, S. Stammen, K. Buchholz, L. Dijkhuizen, D. Jahn, A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium, *Appl Environ Microbiol*, 72 (2006) 1677-1679.
- [144] M. Malten, R. Biedendieck, M. Gamer, A.-C. Drews, S. Stammen, K. Buchholz, L. Dijkhuizen, D. Jahn, A *Bacillus megaterium* Plasmid System for the Production, Export, and One-Step Purification of Affinity-Tagged Heterologous Levansucrase from Growth Medium, *Applied and environmental microbiology*, 72 (2006) 1677-1679.
- [145] R. Biedendieck, Y. Yang, W.D. Deckwer, M. Malten, D. Jahn, Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*, *Biotechnol Bioeng*, 96 (2007) 525-537.
- [146] S. Stammen, B.K. Müller, C. Korneli, R. Biedendieck, M. Gamer, E. Franco-Lara, D. Jahn, High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*, *Applied and environmental microbiology*, 76 (2010) 4037-4046.
- [147] T. Rygus, W. Hillen, Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35 (1991) 594-599.
- [148] S. J.F, D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*, 2001.
- [149] S. Moore, A. Lawrence, R. Biedendieck, E. Deery, S. Frank, M. Howard, S. Rigby, M. Warren, Elucidation of the anaerobic pathway for the corrin component of cobalamin (vitamin B-12), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (2013).
- [150] M. Akdoğan, E. Çelik, Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biopolymer by recombinant *Bacillus megaterium* in fed-batch bioreactors, *Bioprocess Biosyst Eng*, 44 (2021) 403-416.
- [151] Z. Yıldırım, E. Çelik, Periplasmic and extracellular production of cellulase from recombinant *Escherichia coli* cells, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92 (2017) 319-324.

- [152] R.C. Tappel, W. Pan, N.S. Bergey, Q. Wang, I.L. Patterson, O.A. Ozumba, K.i. Matsumoto, S. Taguchi, C.T. Nomura, Engineering *Escherichia coli* for Improved Production of Short-Chain-Length-co-Medium-Chain-Length Poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] (SCL-co-MCL PHA) Copolymers from Renewable Nonfatty Acid Feedstocks, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2 (2014) 1879-1887.
- [153] S.-G. Hong, H.-W. Hsu, M.-T. Ye, Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111 (2013) 1243-1250.
- [154] A. Rodríguez-Contreras, M. Koller, M. Miranda-de Sousa Dias, M. Calafell-Monfort, G. Braunegg, M.S. Marqués-Calvo, High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain, *J Appl Microbiol*, 114 (2013) 1378-1387.
- [155] A. Maehara, S. Taguchi, T. Nishiyama, T. Yamane, Y. Doi, A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA, *Journal of bacteriology*, 184 (2002) 3992-4002.
- [156] B. Röder, K. Frühwirth, C. Vogl, M. Wagner, P. Rossmannith, Impact of long-term storage on stability of standard DNA for nucleic acid-based methods, *J Clin Microbiol*, 48 (2010) 4260-4262.
- [157] W. Shao, S. Khin, W.C. Kopp, Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis, *Biopreserv Biobank*, 10 (2012) 4-11.
- [158] 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*, *N Biotechnol*, 34 (2017) 47-53.
- [159] S. Ansari, T. Fatma, Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization, *PLoS One*, 11 (2016) e0158168.
- [160] 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 (2012) 865-871.
- [161] G.D. Saratale, M.K. Oh, Characterization of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) produced from *Ralstonia eutropha* using an alkali-pretreated biomass feedstock, *Int J Biol Macromol*, 80 (2015) 627-635.
- [162] 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*, 7 (2017) 225.

- [163] S. Jan, C. Pau Roblot, J. Courtois, B. Courtois, J. Barbotin, J. Séguin, ¹H NMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, *Enzyme and Microbial Technology - ENZYME MICROB TECHNOL*, 18 (1996) 195-201.
- [164] 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 (2015) 339-346.
- [165] J.H. Dhangdhariya, S. Dubey, H.B. Trivedi, I. Pancha, J.K. Bhatt, B.P. Dave, S. Mishra, Polyhydroxyalkanoate from marine *Bacillus megaterium* using CSMCRI's Dry Sea Mix as a novel growth medium, *International Journal of Biological Macromolecules*, 76 (2015) 254-261.
- [166] A. Thammasittirong, S. Saechow, S.N. Thammasittirong, Efficient polyhydroxybutyrate production from *Bacillus* juice substrate *thuringiensis* using sugarcane, *Turk J Biol*, 41 (2017) 992-1002.
- [167] J. Gómez Cardozo, R. Velasco Bucheli, N. Pareja, O. Ruiz, G. Londoño, A. Mora, Fed-batch production and characterization of polyhydroxybutyrate by *Bacillus megaterium* LVN01 from residual glycerol, *DYNA*, 87 (2020) 111-120.

EKLER

EK 1: *phaC-phaR* genlerini içeren pC-HIS1623hp plazmidi



EK 2: BSA standart kalibrasyon eğrisi

