Yeşil Alg ve Siyanobakteri Türlerinden Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Karakterizasyonu

Mevlüt Alper Ayanoğlu

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

Ocak 2026

Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate (PHB) from Green Algae and Cyanobacteria Species

Mevlüt Alper Ayanoğlu

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biotechnology and Biosafety

January 2026

Yeşil Alg ve Siyanobakteri Türlerinden Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Karakterizasyonu

Mevlüt Alper Ayanoğlu

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uyarınca

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. İlknur DAĞ

İkinci Danışman: Doç. Dr. Betül Yılmaz ÖZTÜRK

“ESOGÜ-BAP tarafından FYL-2025-3355 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.”

Ocak 2026

ONAY

Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi **Mevlüt Alper AYANOĞLU**'nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Yeşil Alg ve Siyanobakteri Türlerinden Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Karakterizasyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İlknur DAĞ

İkinci Danışman : Doç. Dr. Betül Yılmaz ÖZTÜRK

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. İlknur DAĞ

Üye: Prof. Dr. Gökalp İŞCAN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ferhan KORKMAZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ……..…….. tarih ve ……..……. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. ....

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. İlknur DAĞ ve Doç. Dr. Betül Yılmaz ÖZTÜRK danışmanlığında hazırlamış olduğum "Yeşil Alg ve Siyanobakteri Türlerinden Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Karakterizasyonu" başlıklı Yüksek Lisans tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallarına uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 14/01/2026

Mevlüt Alper Ayanoğlu

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ KULLANIMI BEYAN FORMU

Bu tezi/projeyi hazırlarken aşağıdaki Üretken Yapay Zekâ (ÜYZ) araçlarından destek aldığımı beyan ederim:

Aşağıdaki ÜYZ araçlarını kullandım. (Birden fazla seçenek işaretlenebilir)

☐ Claude
X ChatGPT
☐ DeepSeek
☐ Gemini
☐ Copilot
☐ Diğer (Belirtiniz): .....

ÜYZ araçlarını tezimin/projemin aşağıdaki aşamalarında ilgili amaçlar için kullandım. (Birden fazla seçenek işaretlenebilir):

☐ Metin oluşturma
X Literatür tarama
☐ Çeviri
☐ Düzenleme/dil kontrolü
☐ Veri işleme ve analizi
☐ Veri görselleştirme
☐ Görüntü üretme
☐ Kaynakça düzenleme
☐ Diğer (Belirtiniz): .....

Bu çalışmada ÜYZ kullanımı ***Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber***'e ve akademik dürüstlük ilkelerine uygun şekilde gerçekleştirilmiş olup ÜYZ araçlarından alınan destek etik kurallar ve kaynak gösterme esaslarına uygun biçimde belirtilmiştir.

ÜYZ araçlarının sağladığı bilgilerin doğruluğunu kontrol ettiğimi, yanlış veya eksik bilgi bulunması halinde tüm sorumluluğun tarafıma ait olduğunu; ayrıca çalışmamla ilgili bu beyana aykırı bir durumun herhangi bir zamanda tespit edilmesi durumunda ortaya çıkabilecek akademik ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi beyan ederim.

505320230002

Mevlüt Alper AYANOĞLU

10/02/2026

ÖZET

Petrol kökenli plastiklerin yaygın kullanımı çevre kirliliği, fosil kaynakların tükenmesi ve mikroplastik birikimi gibi önemli küresel sorunlara yol açmaktadır. Biyolojik olarak parçalanabilen ve yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilen biyoplastikler, sürdürülebilir malzeme üretimi açısından önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Poli-3-hidroksibütirat (PHB), mikroorganizmalar tarafından doğal olarak sentezlenen, biyouyumlu ve tamamen biyolojik olarak parçalanabilen bir polihidroksialkanoat türüdür. Mikroalgler hızlı büyüme hızları, yüksek fotosentetik verimlilikleri ve atmosferik CO_2'yi doğrudan karbon kaynağı olarak kullanabilme yetenekleri nedeniyle biyoplastik üretimi için önemli bir potansiyel taşımaktadır. Bu çalışmada bir yeşil alg türü olan *Kirchneriella lunaris* ile siyanobakteriyal *Chroococcus* sp. türleri tarafından üretilen PHB'nin verimi ve biyokütle üretim etkinliği araştırılmıştır. Türlere ait büyüme profilleri optik yoğunluk ve gravimetrik ölçümlerle belirlenmiş, hücreler erken logaritmik fazda hasat edilerek PHB üretimleri izlenmiştir. *K. lunaris* için 1 g mikroalgden elde edilen PHB miktarı 0.1358 g/g iken(% 13.58 w/w), *Chroococcus* sp. için bu oran 0.0344 g/g biyokütle oranındadır (% 3.44 w/w). FTIR verileri özellikle PHB'lerin karakteristik işlevselliğinde rol oynayan C-O-C bağları ve C-H bağlarındaki gerilme ve titreşim bükülmeleri ile uyumluluk göstermiştir. Floresan, elektron mikroskobik ve termal analiz verileri PHB'nin yapısı hakkında aydınlatıcı veriler sağlamıştır. Elde edilen bulgular, *K. lunaris*'in optimal büyüme koşulları altında *Chroococcus* sp.'ye kıyasla daha yüksek PHB birikim kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, PHB sentezinin yalnızca stres koşullarına özgü bir metabolik yanıt olmadığını, bazı mikroalg türlerinde büyüme ile eş zamanlı olarak da gerçekleşebildiğini ortaya koymaktadır. Gelecek çalışmalarda yeşil alglerin PHB üretim potansiyelinin farklı kültür parametreleri altında detaylı olarak incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca, stres içermeyen ve stresli koşulların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi, türlere özgü PHB birikim mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, Siyanobakteri, Yeşil Algler, Biyoplastik, Polihidroksibütirat

SUMMARY

The widespread use of petroleum-based plastics leads to significant global problems such as environmental pollution, depletion of fossil resources, and microplastic accumulation. Therefore, biodegradable and renewable bioplastics represent a significant alternative for sustainable material production. Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) is a type of polyhydroxyalkanoate that is naturally synthesized by microorganisms, is biocompatible, and completely biodegradable. Microalgae hold significant potential for bioplastic production due to their rapid growth rates, high photosynthetic efficiencies, and ability to directly utilize atmospheric CO_2 as a carbon source. This study investigated the yield and biomass production efficiency of PHB produced by the green algae species *Kirchneriella lunaris* and the cyanobacterial species *Chroococcus* sp. Growth profiles of the species were determined by optical density and gravimetric measurements, and PHB production was monitored by harvesting cells in the early logarithmic phase. The amount of PHB obtained from 1 g of microalgae was 0.1358 g/g (13.58 % w/w) for *K. lunaris*, while for *Chroococcus* sp. this rate was 0.0344 g/g biomass (3.44 % w/w). FTIR data showed agreement with stretching and vibrational bending in C-O-C and C-H bonds, which play a role in the characteristic functionality of PHB. Fluorescence and electron microscopic data provided illuminating information about the morphological structure of PHB. Thermal analysis data supported the finding that PHB obtained from *K. lunaris* was more advantageous than cyanobacterial PHB in terms of purity and homogeneity. The findings showed that *K. lunaris* has a higher PHB accumulation capacity compared to *Chroococcus* sp. under optimal growth conditions. This result reveals that PHB synthesis is not only a metabolic response specific to stress conditions but can also occur simultaneously with growth in some microalgal species. It is recommended that future studies investigate the PHB production potential of green algae in detail under different culture parameters. In addition, a comparative evaluation of stress-free and stressful conditions will contribute to a better understanding of species-specific PHB accumulation mechanisms.

Keywords: Microalgae, Cyanobacteria, Green Algae, Bioplastic, Polyhydroxybutyrate

TEŞEKKÜR

Uzun bir lisansüstü eğitimi süresi boyunca, ciddi bir emek ve özveri ile hazırladığım yüksek lisans tezimi tamamlamamın heyecanını ve gururunu yaşıyorum.

Öncelikle danışmanlığımı üstlenen, konu seçiminden araştırmanın yürütülmesine kadar benimle bilgi ve birikimlerini paylaşan, bana akademik bir bakış açısını kazandıran, her zaman yapıcı, teşvik edici ve yüreklendirici olan, tecrübeleri ile bilgi ve birikimlerini paylaşan, sadece bir öğretmen olarak değil aynı zamanda ailem gibi gördüğüm, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım Prof. Dr. İlknur DAĞ hocama,

Çalışmalarımda her zaman yanımda olup bana yardımcı olan, yol gösteren, farklı fikir ve bakış açısı kazanmamı sağlayan, bilgi ve tecrübelerini her zaman paylaşan, lisansüstü eğitim boyunca içinde bulunduğum yoğun tempolu süreçte desteklerini her zaman hissettiğim, Doç. Dr. Betül YILMAZ ÖZTÜRK ve Doç. Dr. Bükay YENİCE hocalarıma,

Akademik çalışmalarımda bana sağlamış oldukları her türlü imkan ve destekten ötürü değerli arkadaşlarım Fatma Hayrunisa ŞANLI, Nurşah ALTAŞER ve ESOGÜ-ARUM ekibine teşekkür ederim. Ayrıca çalışmamızı 2025-3355 numaralı ‘Yeşil Alg ve Siyanobakteri Türlerinden Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi ve Karakterizasyonu’ başlıklı proje kapsamında destekleyen Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonuna,

Tüm eğitim ve öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi olarak beni destekleyen çok değerli aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **vii**

SUMMARY ..... **viii**

TEŞEKKÜR ..... **ix**

İÇİNDEKİLER ..... **x**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiv**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xvii**

1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI **2**

2.1. Biyoplastik Nedir? 2

2.2. Biyoplastiklere Neden Gereksinim Var? 2

2.3. Biyoplastik Türleri 3

2.4. Biyoplastik Üretiminde Mikroalglerin Kullanımı ve Üretim Mekanizmaları 4

2.5. Mikroalglerden Biyoplastik Üretimi Avantajları 8

2.6. PHB Üretiminde Siyanobakterilerin Kullanımı 9

2.7. PHB Birikimi Yapan Mikroorganizmalarda Hızlı Tanı 10

2.8. PHB'lerin Kullanım Alanları 10

2.9. Biyoplastik Kaynakları 12

2.9.1. Tarım ürünleri 12

2.9.2. Atık sular 12

İÇİNDEKİLER

Sayfa

2.9.3. Organik atıklar 12

2.9.4. Mikroalgler 12

2.10. PHB Üretiminde Karşılaşılan Zorluklar ve Üretimi Zenginleştirme Yolları .. 13

3.MATERYAL VE YÖNTEM 14

3.1. Materyal 14

3.1.1. Kullanılan mikroorganizmalar 14

3.1.2. Kullanılan besiyeri ve kimyasallar 15

3.1.3. Kullanılan cihazlar 17

3.2. Yöntem 17

3.2.1. Suşların temini ve kültüre edilmesi 17

3.2.1.1. *K. lunaris* hücrelerinin eldesi ve kültür koşulları 18

3.2.1.2 *Chroococcus* sp. hücrelerinin eldesi ve kültür koşulları..... 19

3.2.2. Alg türlerinin büyüme profili ve kuru hücre ağırlıkları tayini..... 20

3.2.3. PHB ekstraksiyonu 22

3.2.4. PHB varlığının Sudan Black B-Safranin boyama tekniği ile incelenmesi.25

3.2.5. PHB karakterizasyon yöntemleri 26

3.2.5.1. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi 26

3.2.5.2. Geçirimli elektron mikroskop (TEM) analizi 26

3.2.5.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi 26

İÇİNDEKİLER

Sayfa

3.2.5.4. PHB örneklerinin termal analizi 27

3.2.6. İstatiksel analizler 27

4.BULGULAR VE TARTIŞMA 28

4.1. Seçilen Türlerin İsimlendirilmesi ve Büyüme Profili Verileri 28

4.1.1. *K. lunaris* suşunun kuru hücre ağırlığı 31

4.1.2. *Chroococcus* sp. suşunun kuru hücre ağırlığı 33

4.2. PHB Ekstraksiyonu Verileri 37

4.2.1. *K. lunaris* suşundan elde edilen PHB miktarı 37

4.2.2. *Chroococcus* sp. suşundan elde edilen PHB miktarı 37

4.2.3. Elde edilen PHB'lerin FTIR verileri 39

4.2.3.1. *K. lunaris* suşundan elde edilen PHBlerin FTIR sonuçları 39

4.2.3.2. *Chroococcus* sp. suşundan elde edilen PHBlerin FTIR sonuçları 41

4.2.4. SEM analiz sonuçları 45

4.2.5. TEM analiz sonuçları 45

4.2.5.1. *K. lunaris* TEM analiz sonuçları 45

4.2.5.2. *Chroococcus* sp. TEM analiz sonuçları 47

4.2.6. Termal Analiz 49

4.2.6.1. *K. lunaris* termal analiz sonuçları 50

4.2.6.2. *Chroococcus* sp. termal analiz sonuçları 52

İÇİNDEKİLER

Sayfa

4.3. Elde Edilen PHB'lerin Miktar Tayini 57

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 61

KAYNAKLAR DİZİNİ 63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Biyoplastik türleri 3

2.2. Mikroalglerden üretilen ürünler 5

2.3. Mikroalglerden biyoplastik üretim süreci 8

3.1. BG-11 sıvı besiyerinde üretilmiş saf *K. lunaris* hücreleri 19

3.2. Kurutulmuş *K. lunaris* hücreleri (A) Liyofilizasyon sonrası elde edilen ilk hasat görüntüsü. (B) Tartım sonrası cam tüpe alınmış hali 21

3.3. Kurutulmuş *Chroococcus* sp. Hücreleri (A) Liyofilizasyon sonrası elde edilen ilk hasat görüntüsü, (B) Tartım sonrası cam tüpe alınmış hali 22

3.4. NaOCl eklenen *K. lunaris* hücrelerinin ilk hali ve 2 saat sonraki çöküntüsü 23

3.5. NaOCl eklenen *Chroococcus* sp. hücrelerinin ilk hali ve 2 saat sonraki çöküntüsü. 23

3.6. Santrifüj sonrası elde edilen *K. lunaris* ve *Chroococcus* sp. hücrelerine ait pellet görüntüsü 24

3.7. A, *Chroococcus*'a ait ve B ise *K. lunaris*'e ait PHB eldesini göstermektedir 25

4.1. *K. lunaris* izolatına ait ışık mikroskop görüntüsü. Magnifikasyon: x40 29

4.2. *Chroococcus* sp. izolatına ait ışık mikroskop görüntüsü. Magnifikasyon: x40 30

4.3. *K. lunaris*'in 15 günlük gelişim sürecinde gravimetrik yöntemle elde edilen kuru biyokütle (mg) tayini 31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

4.4. *K. lunaris*'in 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 680 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi 32

4.5. *K. lunaris*'in 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 720 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi 32

4.6. *K. lunaris*'in 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 750 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi 33

4.7. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük gelişim sürecinde gravimetrik yöntemle elde edilen kuru biyokütle (mg) tayini 34

4.8. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 680 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi..... 34

4.9. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 720 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi..... 35

4.10. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 750 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi..... 35

4.11. *K. lunaris*'ten ekstrakte edilen PHB'nin FTIR analizi sonuçları 39

4.12. *Chroococcus* sp.'den ekstrakte edilen PHB'nin FTIR analizi sonuçları..... 41

4.13. Farklı azot konsantrasyonlarında geliştirilen *K. lunaris* hücrelerinin Sudan siyah B–safranin boyası ile PHB varlığının analizi..... 43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

4.14. *Chroococcus* sp. hücrelerinin Sudan siyah B – safranin boyası ile PHB varlığının analizi 44
4.15. *K. lunaris ve Chroococcus* sp.'nin SEM analiz sonuçları 45
4.16. *K. lunaris* hücreleri içerisindeki PHB granüllerinin TEM görüntüsü 46
4.17. *K. lunaris* hücrelerinden üretilen PHB'lerin TEM görüntüsü 47
4.18. *Chroococcus* sp.'dan alınan tam ince kesitte gözlenen veziküler yapılara ait TEM görüntüsü 48
4.19. *Chroococcus* sp.'den üretilen PHB granüllerinin TEM görüntüsü 49
4.20. *K. lunaris*'e ait TGA sonuçlarını içeren grafik 50
4.21. *K. lunaris*'e ait DTG sonuçlarını içeren grafik 51
4.22. *K. lunaris*'e ait DTA sonuçlarını içeren grafik 51
4.23. *Chroococcus* sp.'ye ait TGA sonuçlarını içeren grafik 53
4.24. *Chroococcus* sp.'ye ait DTG sonuçlarını içeren grafik 53
4.25. *Chroococcus* sp.'ye ait DTA sonuçlarını içeren grafik 54
4.26. Krotonik asit 0-200 mg/L arası konsantrasyon grafiği 58

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
%	Yüzde işareti
NaCl	Sodyum Klorür
° C	Santigrat Derece
NaOCl	Sodyum Hipoklorit

Kısaltmalar	**Açıklama**
PHB	Polihidroksibütirat
MPa	Megapaskal
Nm	Nanometre
µmol m^{-2} s^{-1}	Mikromol / Metrekare x Saniye
g/L	Gram / Litre
M/L	Mol / Litre
Rpm	Dakika Başına Devir

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Petrol bazlı plastik ve sentetik polimerlerin dünya çapındaki üretimi artan taleple orantılı olarak her geçen gün artmaktadır. Üretilen plastiğin % 10'u geri dönüştürülmekte, % 14'ü yakılmakta ve geri kalan kısmı da çöpe atılmakta ya da suya karışmaktadır. Plastik kalıntıların çeşitli sebeplerle parçalanması mikro ve nanoplastikleri açığa çıkarmaktadır ve bu durum çevre ve insan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmektedir. Bu duruma alternatif bir çözüm önerisi çevrede kalıntı bırakmayan, zararlı yan ürünler olmadan karbondioksit ve suya ayrışan plastiklerin kullanımıdır. Biyobozunur plastikler içinde en umut verici malzemelerden biri de polihidroksialkanoat (PHA) ailesine ait olan PHB'dir. Canlı hücrelerden elde edilen PHB, polipropilene olağanüstü benzerlik gösterir ve biyolojik olarak % 100 parçalanabilen bir termoplastiktir. Mikrobiyal kökenli biyoplastiklere olan ihtiyaç arttığı için, yüksek PHB içeriğine sahip uygun alg suşlarının biyolojik olarak araştırılması büyük önem taşımaktadır. Literatürde PHB üretimi için çok sınırlı mikroalg suşu rapor edilmiştir. Yüksek verime sahip mikroalg ve siyanobakteri suşları araştırılmaya devam etmektedir. Bu çalışma siyanobakteri ve yeşil alg türlerinden PHB ekstraksiyonu ve karakterizasyonunu amaçlamaktadır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Biyoplastik Nedir?

Fosil yakıt kaynaklı mevcut plastikler küresel çapta yoğun olarak kullanılmakta olup, petrokimya türevlerinin işlenmesi ile elde edilirler. Bu yolla elde edilen plastikler doğada biyolojik olarak parçalanamamakta ve giderek artan kullanıma bağlı olarak çevresel ve sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Günümüzde yenilenebilir hammaddelerden üretilen ve doğada kolay parçalanabilen biyo bazlı plastikler çevre dostu bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyolojik atıklar veya mikroorganizmalar gibi biyolojik kaynaklardan elde edilen polimerler biyoplastik olarak tanımlanmaktadır. Biyoplastiklerin kullanımı fosil yakıtlara bağımlılığı azaltmakta ve sera gazı emisyonlarını da indirgemektedir. Bu bağlamda atıkların değerlendirilmesi ve yenilenebilir malzemelerin kullanımına katkı sağlamaları ile çevre dostu bir yaklaşım olarak kabul edilirler. Biyoplastiklerin antimikrobiyal etkinlikleri ve biyouyumlulukları tarım, sağlık yada endüstri alanlarındaki potansiyel uygulamalar için oldukça değerlidir (Ghosal ve Ghosh, 2023; Oliver-Cuenca vd., 2024; Ayanoğlu vd., 2025).

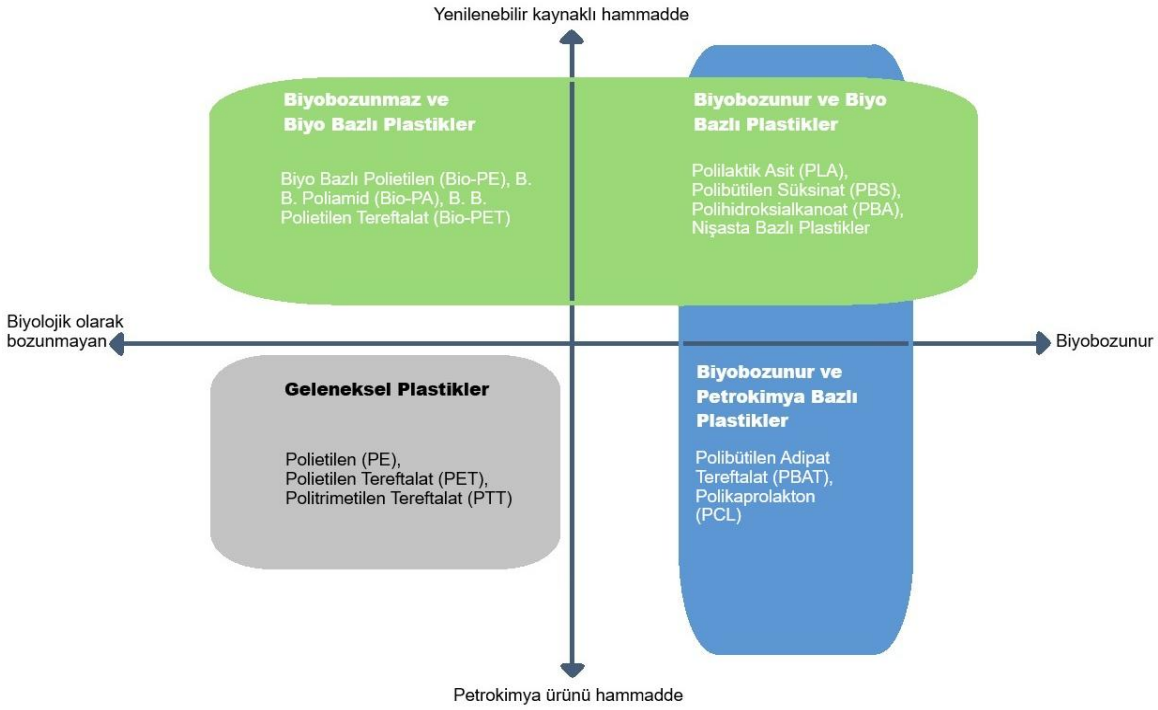
2.2. Biyoplastiklere Neden Gereksinim Var?

Plastik ürünler günlük hayatımızın önemli bir parçası olup, elastikiyet, ucuzluk, taşıma kolaylığı ve kolay şekil alma gibi özelliklerinden dolayı çok fazla tercih edilmektedirler (Yılmaz ve Beyatlı, 2003). Geleneksel petrol türevi sentetik polimerlerden üretilen plastikler kullanılıp atılma özelliklerinden dolayı küresel çaptaki en önemli çevre problemlerinden biridir. Bu plastikler yüksek enerji tüketimi, çürümeye karşı direnç göstererek doğada birikme, bakteriler tarafından ayrıştırılamama, azalan bir doğal kaynak olan ham petrolden üretilme ve yakılmaları sonucunda zararlı kimyasallar salgılama gibi pek çok dezavantaja sahiptirler. Yapılan araştırmalar, her yıl 8 milyon tondan fazla plastik atığın okyanuslara sızdığını ortaya koymaktadır (MacArthur, 2017). Doğal hammaddeler kullanılarak elde edilen biyoplastikler ise biyolojik olarak parçalanabildiklerinden iyi bir alternatif oluştururlar (Abdo ve Ali, 2019).

Biyolojik bazlı plastikler modifiye edilmiş doğal polimerlerden, sentezlenmiş biyolojik bazlı monomerlerden sentezlenmiş polimerlerden ya da atıklardan elde edilen biyoplastikler şeklinde olabilir (Thielen, 2014). Şimdilerde dünyadaki plastik üretiminin sadece % 1'i biyoplastiktir. Biyoplastik üretiminde bitki bazlı hammaddeler ve doğal polimerler kullanılır. Mısır ve patates gibi bitkilerden elde edilen biyoplastikler uzun vadede sürdürülebilir olmayacak gibi görünmektedir çünkü bu yöntemde üretim, geniş araziler, su ve besinler açısından bir tüketim söz konusudur. Mikrolagler ise diğer gıda kaynaklarıyla rekabet etmez, atıklarda gelişebilir ve yüksek lipid birikimine sahiptir. Yani mikroalgler iyi bir biyokütle kaynağı olmasının yanısıra, sürdürülebilir olma ve çok farklı alanlarda kullanılabilme potansiyeli taşır.

2.3. Biyoplastik Türleri

Plastikler fosil bazlı ya da biyo bazlı, biyobozunamaz ya da biyobozunabilir olarak sınıflandırılır (Onen Cinar vd., 2020), (Şekil 2.1.).

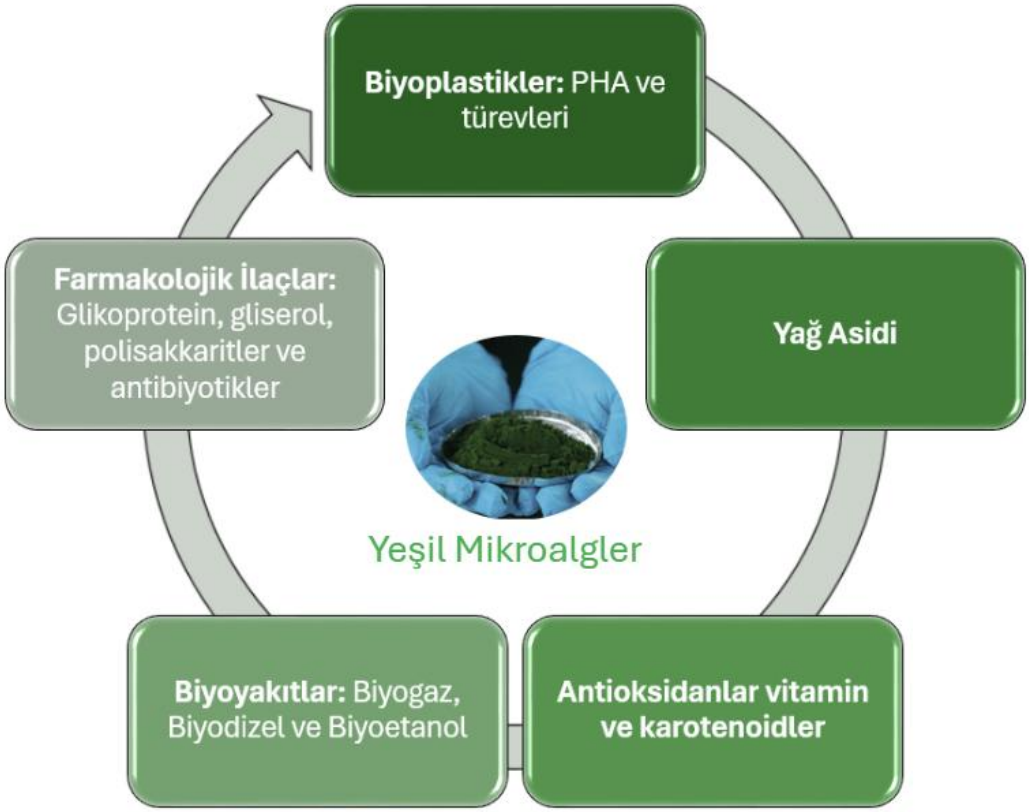


Şekil 2.1. Biyoplastik türleri (Onen Cinar vd., 2020; Rahman ve Miller, 2017; Ayanoğlu vd., 2025; Chauhan vd., 2024 çalışmasından modifiye edilmiştir)

2.4. Biyoplastik Üretiminde Mikroalglerin Kullanımı ve Üretim Mekanizmaları

Algler ve siyanobakteriler fotoototrofik organizmalar olup sınırlı besin gereksinimleri, mevsimsel hasat gerektirmemeleri ve atık sular elverişsiz çevrelerde bile gelişebilme yetenekleri sebebiyle biyoplastik üretiminde popülerdirler. Karbondioksidi asimile ederek çeşitli organik bileşiklere çevirirler. Böylece karbondioksit emisyonu azalır ve üretilen faydalı biyopolimerler sayesinde daha güvenli bir çevre sunarlar. Algal biyokütle plastiğin ayrışma sürecini de hızlandırabilir çünkü biyokütledeki yüksek nitrojen konsantrasyonu mikrobiyal adezyonu geliştirir ve biyofilm oluşumunu uyarır. Böylece algler gelecekte biyoplastik üretimi için potansiyel bir hammadde olma özelliği taşımaktadır (Sreenikethanam ve Bajhaiya, 2021).

Biyoplastik üretiminde mikroalg biyokütlesi direkt olarak ya da algin sekonder metaboliti olarak kullanılabilmektedir (Rahman ve Miller, 2017). PHB, biyolojik olarak üretilebilen ve doğal yolla parçalanabilen plastik yapısında bir polimerdir. PHB, asetil koenzim A'dan 3 enzimin etkisiyle sentezlenir: B-ketotiyolaz (phaA), asetil-CoA'yı asetoasetil-CoA molekülüne dönüştüren ilk anahtar enzimdir; ikinci enzim asetoasetil-CoA redüktaz (phaB), asetoasetil-CoA'yı 3-hidroksibütirilCoA'ya indirger ve son enzim PHB polimeraz (phaC), 3-hidroksibütiril CoA'nın PHB molekülüne polimerizasyonunu katalize eder (Roja vd., 2019). Üretilen PHB hem plastiğin geri dönüştürülebilir özelliğini artırır hem de kullanılan petrolü azaltır. Böylece PHB endüstri, tıp, tarım ve ekoloji gibi pek çok alanda kullanılabilir (Aburas, 2016). PHB'nin petrol bazlı plastiklere göre farkı biyobozunur olmasıdır. Aerobik koşullarda PHB'nin biyodegradasyonu ile karbondioksit ve su açığa çıkarken, anaerobik koşullarda oluşan degradasyon ürünleri karbondioksit ve metandır. Yapılan çalışmalar PHA'nın % 85'inin yedi haftada bozunduğunu ortaya koymaktadır. PHA sulu çevrelerde ise 60 °C'yi geçmeyen sıcaklıklarda 254 günde bozunduğunu destekler.



Şekil 2.2. Mikroalglerden üretilen ürünler (Onen Cinar vd., 2020; Pal vd., 2019; Musa vd., 2019).

Mikroalgler tatlı su ve denizlerde yaşayan, güneş enerjisini kullanarak ATP üreten mikroskobik organizmalar olup, biyoteknolojik pek çok araştırmada giderek popülerleşmektedirler. Şekil 2.2.'de önemli mikroalg ürünleri gösterilmektedir:

Yeşil, kahverengi ve kırmızı algler biyobozunur plastik üretme yeteneğine sahip olup, mikroalglerdeki nişasta, selloz, lignin gini bileşenler yenilenebilir biyokütle kaynağı olarak kaliteli biyoplastik üretiminde kullanılabilirler (Maniglia vd., 2019). Biyobazlı olmasının yanısıra biyobozunur da olabilen plastikler, biyodegradasyon özellikleri gösteren ve yenilenebilir doğal kaynaklardan elde edilmektedir. Termoplastikli modifiye nişasta, PHA, polilaktik asit (PLA), ve polibütilen süksinat (PBS) bu kategoride yer alır. Bakteriler PHA'ları temel olarak şeker ve lipitlerden elde ederler, 250 farklı mikroorganizma PHA üretimi yapabilmektedir. Günümüzde marketlerde yer alan çoğu biyoplastik, biyobozunamaz özellikte olduğu için atık yönetimi konusunda ciddi problem oluşturmaktadır. Bu gruptaki plastiklere örnek olarak biyo bazlı propilen (Biyo-PP), biyo

bazlı polietilen (Biyo-PE), polietilen tereftalat (PET) ve politrimetilen tereftalat (PTT) verilebilir ve biyokütle gibi yenilenebilir doğal kaynaklardan elde edilmelerine rağmen biyobozunur değillerdir.

Mikroalglerin temel bileşenleri yağlar, karbonhidratlar, proteinler olup, kalsiyum, magnezyum, fosfor, potasyum, sodyum, sülfür, bakır, demir, manganez, selenyum ve çinko gibi elementler de içermektedirler (Zhang vd., 2000). Nitrojen açlığı ile meydana gelen stres durumu da biyopolimer oluşumunu tetiklemektedir. Ancak mikrobiyal suş ve kültür durumlarına göre elde edilen biyopolimerler değişiklik göstermektedir.

Mikroalg-polimer karışımı oluşturmada biyokütle, polimer ve katkı maddeleri birleştirilerek belirli sıcaklık, basınç ve zaman derecelerinde sıkıştırılarak kalıplanır. Mikroalg hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen biyopolimer üretiminde ise mikroalglerden intrasellülar olarak ya da mikroalg biyokütlesi kullanılarak fermentasyon yoluyla üretim söz konusudur. En bilinen intraselülar üretim metodu da çeşitli mikroorganizmalar tarafından sentezlenen PHB üretimidir.

Mikroalg biyokütlesinden biyoplastik eldesinde ilk adım ekim ve mikroalg biyokütlesinin toplandığı hasat aşamasıdır. Hasat işleminde filtreleme, yüzdürme, santrifüjleme ve sedimantasyon teknikleri kullanılabilir. Geliştirme aşamasında açık havuzlar ya da fotobiyoreaktörler kullanılır. Mikroalgler için evrensel bir geliştirme ve hasat yöntemi bulunmadığından, çalışılan mikroalg ve elde edilecek ürüne göre optimizasyon işlemi yapılması önem taşır (Khanra vd., 2018; Amaro vd., 2014). Sonrasında ise PHB üretmek için farklı metotlar kullanılabilir.

Alg biyokütlesinden biyopolimer eldesi üç farklı yolla olabilmektedir. Birinci yolda doğal biyopolimerler mikroalg biyokütlesi içinde hücre tarafından üretilmektedir. Bu yolda polimerler, mikroalg tarafından minimum miktarda ışık enerjisi kullanılarak fotosentezle üretilir. Işık yoğunluğu ve süresine bağlı olarak organik moleküller organizma içinde biriktirilir. Literatürde UV radyasyonunun da sentez sırasında etkili olabileceğini ve çapraz

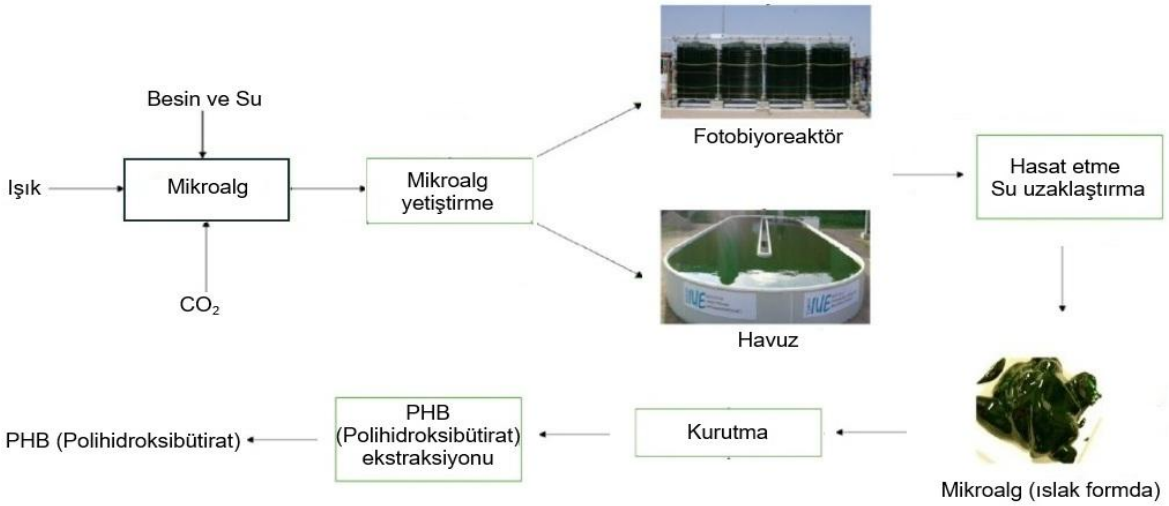
bağlı zincirler oluşturmak için nişasta ile tepkimeye giren serbest radikaller ürettiğini göstermektedir.

İkinci yolda biyopolimerik ürünler mikroorganizmalarla mikroalgal biyokütlenin fermente edilmesiyle elde edilirler. Fermentasyon prosesi sürecinde algal biyokütle enzimatik olarak biyopolimerleri içeren ürünlere dönüştürülür. Son araştırmalarda, alg biyokütlesinin parçalanması ve fermantasyon işleminden önce gerekli karbonhidratların, proteinlerin ve lipitlerin çıkarılması konusuna odaklanılmaktadır. Bu konudaki bir çalışmada, alg biyokütlesini parçalamak için su kullanılmış ve PHA'lar üretmek üzere fermente edilen kritik altı hidrotermal yöntemi kullanılmıştır (Steinbruch vd., 2020). Üçüncü yolda ise kompozit mikroalgal biyopolimerler mikroalgal biyokütle ve bazı katkı maddelerinin kombine edilmesiyle oluşmaktadır (Kartik vd., 2021; Ciapponi vd., 2019). Bu yöntemde mikroalg ve katkı maddeleri bir kalıpta sıkıştırılır. Bu konuda alternatif olarak mikroalg ve katkı maddeleri bir çözücü içinde çözüldükten sonra film üretmek için yüzeylerde kurutulabilir. PVA-alg karışımı eldesinde ise bileşenler bir cam plaka üzerinde birleştirilir ve biyopolimerik film oluşumu için 24 saat havada kurutulabilir.

Alg biyokütlesinden biyopolimer üretimi için fermentasyon metoduna göre daha basit olan çözücü ekstraksiyon metodu kullanılabilir. Alg biyokütlesini geliştirmek ve polimer çökeltileri üretmek için kimyasallarla birleştirme işlemi yapılır ve verimi artırmak için kimyasal ve fiziksel özellikler değiştirilebilir. Bu işlemde eleme, filtreleme ve santrifüjleme aşamaları önemli rol oynar. Geleneksel yaklaşıma oranla daha verimli sonuç veren diğer bir yöntem de ultrason destekli ekstraksiyon ile biyopolimerlerin alg biyokütlesinden çıkarılmasıdır. Yöntemde ultrason uygulanması kavitasyona ve dolayısıyla mikropartiküllerin çarpışmasına neden olur. Oluşan titreşimle alg hücre duvarları bozulur biyopolimerin alg biyokütlesinden çıkması kolaylaşır (Flórez-Fernández vd., 2017).

Mikroalglerden biyoplastik üretiminde iki ana yol mevcuttur: İlk yaklaşımda mikroalg biyokütlesi biyolojik ya da petrol bazlı primerler ve katkı maddelerinin harmanlanmasıyla hazırlanırken, ikinci yaklaşımda PHB ya da nişasta gibi biyopolimerler mikroalg içerisinde üretilir. Buradan ekstrakte edilen ürün daha sonra ilave adımlar

yardımıyla biyoplastik üretiminde kullanılır ve mikroalg hücreleri direkt kullanılmaz (Şekil 2.3.), (Onen Cinar vd., 2020).



Şekil 2.3. Mikroalglerden biyoplastik üretim süreci (Onen Cinar vd., 2020; Rahman ve Miller, 2017; Ayanoglu vd., 2025).

Biyokütleden değerli bileşiklerin çıkarılması ile ilgili çevre dostu yaklaşımlardan biri de mikrodalga destekli ekstraksiyondur. Bu yöntemde süreç hızlıdır ve enerjiye ihtiyaç duyulmaz.

Diğer bir yenilikçi ekstraksiyon metodu ise kritik olmayan su ekstraksiyonu metodudur. Bu metodda su 22.12 MPa'dan daha düşük kritik basıncın çok altına zorlanır ve biyoaktif kimyasalları biyokütleden çıkarmak için kaynama noktasının üzerindeki sıcaklık maksimum 374 °C'ye yükseltilir. Yöntemde çözücü olarak su kullanıldığı için zararlı kimyasallara olan ihtiyaç ortadan kaldırılmış olur.

2.5. Mikroalglerden Biyoplastik Üretimi Avantajları

Mikroalglerin biyoplastik üretiminde kaynak olarak kullanımı pek çok avantaja sahiptir. Gıda rekabetine yol açmazlar, yüksek sıcaklık ya da nem gibi ekstrem koşullarda

hayatta kalabilir. Gıda bitkilerine kıyasla biyokütle üretim hızları yüksektir. Algler fotosentetik olduğundan karbondioksiti tutar ve karbon kaynağı olarak kullanarak sera gazlarının azaltılmasına yardım eder. Diğer yandan ek bir besin kaynağına ihtiyaç duymaz. Yüksek protein ve lipit içeriğine sahiptir. Biyolojik parçalanma oranları yüksektir (Arora vd., 2023).

2.6. PHB Üretiminde Siyanobakterilerin Kullanımı

Siyanobakteriler, fotoototrofik yapıları ve besin gereksinimlerinin minimum düzeyde olması nedeniyle alternatif bir konakçı sistem olarak kabul edilebilir. Şimdiye kadar *Spirulina* spp gibi birkaç siyanobakteride PHB oluşumu gösterilmiştir. Siyanobakterilerin sahip olduğu bir kimyasal mekanizma, fosfatın ağırlıklı olarak polifosfat formunda depolanmasını sağlar. Ayrıca bir sera gazı olan karbondioksiti güneş enerjisi yardımıyla çevre dostu plastiklere dönüştürürler. Siyanobakterilerin siyanofisin, polifosfat, polisakkarit ve PHB gibi rezerv materyali biriktirebildiği bilinmektedir. Polisakkarit ve PHB genellikle karbon ve enerji rezervi olarak kabul edilir. Siyanobakteriyal PHB diğer prokaryotlara kıyasla üstün bir kalitededir. Gram negatif mikroorganizmalar olan siyanobakteriler güneş enerjisinin % 3-9'unu biyokütleye dönüştürebilirler. Birçok siyanobakteri organik karbon kaynakları kullanmadan, karbondioksit ve güneş ışığını kullanarak PHA üretebilir, PHB'yi de hücre içinde granüler formda depolar. Glikojen ve PHB, siyanobakteri hücreleri için enerji ve karbon kaynağı olarak görev yapmaktadır. Çoğu siyanobakterinin doğal bir PHB yolu olmasına rağmen, bazıları da genetik olarak tasarlanmış sentetik bir yolla elde edilir. Siyanobakteriler, asetat, sitrat, glikoz, fruktoz, propiyonat vb. varlığında daha fazla biyokütle sağlayacak şekilde miksotrofik koşullar altında büyütülebilir (Das ve Maiti, 2021).

Tez çalışmamızda kullanılan *Chroococcus* sp., toksik olmayan ve azot bağlamayan bir siyanobakteridir (Wang vd., 2024). Tek hücreli ve koloniyal özellikte olup, mikroskobik incelemede küresel formda izlenmektedir. Bakteriler alemi, *Cyanobacteriophyta* filumu, *Cyanophyceae* sınıfı, *Chroococcales* takımı ve *Chroococcaceae* familyasına aittir (Guiry, 2010).

2.7. PHB Birikimi Yapan Mikroorganizmalarda Hızlı Tanı

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda PHB biriktiren bakterilerin hızlı tanısında canlı koloni boyama tekniği kullanılmış ve Sudan siyahı B boyası siyanobakteriyal yağı tespit edebilmiştir. Sonrasında mikrokopik preparatlar hazırlanmış, örnekler alkollü Sudan siyahı B çözeltisi ile boyanmış ve safranin ile zıt boyama yapılmıştır. Başka bir çalışmada PHB granülleri, nil mavisi ile boyandığında güçlü bir turuncu floresan sergiledi. Isı ile sabitlenmiş hücreler 10 dakika boyunca % 1 nil mavisi A ile muamele edilmiş ve 460 nm'lik boyunda ekzitasyon gözlenmiş, parlak turuncu olarak gözlenmiştir. PHB üreticileri UV lamba altında güçlü floresan göstermektedir (Balaji vd., 2013).

2.8. PHB'lerin Kullanım Alanları

PHB'ler, nanotüp ya da nano-kompleks filmlerle ilgili materyal özelliklerinin geliştirilmesinde, üre gübresi ya da insektisit paketlemesinde, cerrahi dikiş ve çeşitli doku mühendisliği gibi alanlarda kullanım potansiyeline sahiptir (Chen, 2009). Pek çok bakteri ve alg türü gıda depo maddesi olarak PHB üretebilmektedir (Falcone, 2004).

Biyoplastikler tarımsal uygulamalarda yetiştirme torbaları, ağlar ve malç filmleri yapımında kullanılır. PHA bazlı yetiştirme torbaları çevre dostu, biyobozunur olmaları ve çevredeki su kaynakları için güvenli olmaları gibi avantajlara sahiptir (Abd El-malek vd., 2020).

Biyoplastiklerin en önemli kullanım alanlarından biri de gıda ambalajı olarak kullanım potansiyelleri olmasıdır. Gıda endüstrisinde kalite standartları ve uzun vadede sürdürülebilirlik açısından yeni biyoplastik bazlı ambalajların geliştirilmesi önemlidir. Burada depolama kalitesi, talep, ucuz maliyet, çevre dostu olma ve hafif olma gibi özellikler ön plana çıkar. Su ve oksijen koruması, gıda ambalajları için en yaygın gereksinimlerdir (Jabeen vd., 2015).

Biyopolimerlerin gıda sektöründe kullanım alanlarından biri de antioksidan kapasiteleridir ve zararsız olduklarından üretilen diğer antioksidanlara göre avantajları vardır. Diğer yandan biyopolimerlerin medikal ve biyolojik uygulamaları da dikkat çekmektedir. PHA'lar biyouyumlu oldukları için kanser tespiti, ameliyat sonrası ülser tedavisi, yara iyileştirici pansuman, kemik dokusu mühendisliği, yapay kan arterleri, kalp kapakçıkları gibi tıbbi uygulamalar için de uygundur. Diğer yandan ilaç salınım sistemleri ya da tıbbi implantları geliştirilmesi gibi alanlarda da kullanımları mevcuttur. Esneklikleri sebebiyle biyoplastiklerin üç boyutlu baskı teknolojileri açısından da yoğun olarak araştırıldığı söylenebilir. Biyoplastiklerin doğal tekstil, doğal lif, dolgu maddeleri gibi ürünlerin eldesinde kullanım potansiyelleri de diğer araştırma konuları arasındadır (Candamano vd., 2017).

PHB'ler biyouyumludur ve onun bir monomeri olan 3-hidroksibutirat (3-HB), kan ve ökaryotik hücre zarının bir bileşenidir. Bu özelliği sebebiyle tıbbi uygulamalar için elverişlidir.

Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat ile polihidroksibutirat-polihidroksivalerat kopolimeri, osteokondüktif özelliği nedeniyle sert doku replasmanı ve güçlendirilmesi için kullanılabilir. Diğer yandan PHB, başlangıçta hücre büyümesine destek sağlayan, sonra yaraları iyileştiren doku yenilenmesini destekleyen ve ardından parçalanan üç boyutlu bir iskele olarak kullanılabilir.

Bu polimerlerin kullanımı, vücutta herhangi bir yabancı varlık bırakmadan monomerlerine ayrıştığı için doku iskeleleri, greft veya implantların cerrahi olarak çıkarılmasını gerektirmez. PHB'nin yavaş bozunması, yönlendirilmiş ilaç dağıtım sistemi çalışmalarında ek bir avantaj sağlar. PHB monomerleri antibiyotikler gibi ince kimyasalların sentezi için kiral ara maddeler olarak kullanılabilir. Kiral bir molekül olan 3-HB, nörodejeneratif hastalıklarda terapötik etkilere sahip olduğundan, Alzheimer hastalığının tedavisi için potansiyel bir ilaç adayıdır. PHB bazlı adsorban ve hidrojeller organik kirleticileri atık sudan uzaklaştırma özelliğine de sahiptirler (Alammar vd., 2020).

2.9. Biyoplastik Kaynakları

2.9.1. Tarım ürünleri

Biyoplastik yapımında polisakkaritler, proteinler ve diğer karbon kaynakları kullanılabilir. Bu grupta en yaygın olarak kullanılan biyoplastik termoplastik nişastadır ve hidrofilik plastikleştiricilerle nişastanın değiştirilmesi ya da mikrobiyal fermentasyonla elde edilir. Diğer yandan beyaz glüten, şeker kamışı ve yağ da biyoplastik sentezinde kullanılabilmektedir.

2.9.2. Atık sular

Atık sularda buluna yüksek tuz ve organik madde içeriği farklı alanlarda kullanılabilecek değerli bir kaynak niteliğindedir. Örneğin PHB'ler atık su arıtım sürecinde oluşan aktif çamurun termal parçalanmasıyla, patates işleme sektöründen gelen atık suda, nişasta bazlı biyoplastiklerin oluşturulmasında kullanılabilir (Van der Hoek vd., 2016).

2.9.3. Organik atıklar

Gıda işleme atıkları biyoplastik üretimi için iyi birer kaynak olabilir; havuç, maydonoz, turp, karnabahar, şeker kamışı küspesi, pirinç kepeği gibi organik atıklar bu gruba örnek olarak verilebilir (Jogi ve Bhat, 2020).

2.9.4. Mikroalgler

Mikroalgler hızlı üremeleri ve yenilenebilir gıdalarla rekabet etmedikleri için biyoplastik üretiminde önemli bir alternatif kaynak durumundadırlar. Biyoplastik üretiminde doğrudan biyokütle olarak ya da mikroalg hücrelerinden nişasta ve PHB ekstraskiyonu ile üretilebilirler. Literatürde biyoplastik üretimi için en çok kullanılan mikroalgler *Chlorella*

ve *Spirulina* cinslerine aittir. *Chlorogloea fritschii*, *Calothrix scytonemicola, Scenedesmus almeriensis, Neochloris oleoabundans, Nannocloropsis gaditana* ya da *Phaeodactylum tricornutum* gibi mikrolagler ya da siyanobakteriler de biyoplastik üretebilmektedir (Rajpoot vd., 2022).

Tez çalışmasında kullanılan *K. lunaris* türü hızlı büyüyen ve toksik olmayan bir yeşil alg türü olup tatlı sularda yaşar (Yılmaz Öztürk vd., 2025). Ökaryotik yapıda olup, *Chlorophyta* filumu, *Chlorophyceae* sınıfı, *Sphaeropleales* takımı, *Selenastraceae* familyası ve *Kirchneriella* cinsine aittir (Guiry, 2010).

2.10. PHB Üretiminde Karşılaşılan Zorluklar ve Üretimi Zenginleştirme Yolları

Biyoplastiklerin çevreye ve sağlığa olumlu etkilerinin yanı sıra aşılması ve geliştirilmesi gereken bazı zorlukları da mevcuttur. Örneğin, geleneksel sentetik plastiklere kıyasla üretim maliyetleri daha yüksektir. Elde edilen PHB verimi düşüktür ve fotosentetik büyüme koşulları PHB üretiminde bazı sınırlamalara yol açabilir. Örneğin büyük fotobiyoreaktörlerde ışık sınırlı penetrasyon gösterdiğinden üretim heterojen olabilmektedir. Mikroalg ve siyanobakterilerin hücre duvarları sert ve kalın olduğu için ekstraksiyon ve saflaştırma işleminde kloroform gibi organik çözücüler kullanılır. Üretimi artırmak için yapılan besin kısıtlaması sürecinde algin büyümesi de azalacağından elde edilen PHB miktarı da düşük olmaktadır. Kontaminasyon riskine karşı çok dikkatli olunmalıdır. Ekonomik sürdürülebilirlik açısından da katedilmesi gereken epey yol vardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan *K. lunaris* (Kirchner) Möbius ve *Chroococcus* sp. izolatları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoteknoloji Laboratuvar'ında bulunan stok kültürlerden elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan mikroorganizma stokları, biri siyanobakteri diğeri yeşil alg olmak üzere iki farklı fotosentetik gruba ait kültürlerden oluşmaktadır. Kültürlerin uzun süreli canlılığının ve genetik/fizyolojik stabilitesinin korunabilmesi amacıyla, her iki grup için literatürde önerilen düşük metabolik aktiviteyi destekleyen stoklama koşulları uygulanmıştır.

Yeşil alg kültürleri (*K. lunaris*), steril sıvı besiyeri (BG-11) içerisinde, düşük ışık şiddeti (5–10 µmol m^{-2} s^{-1}) altında ve 4 ± 1 °C sıcaklıkta stoklanmıştır. Bu koşullar, fotosentetik aktivitenin minimum düzeyde tutulmasını sağlayarak hücresel metabolizmayı yavaşlatmakta ve kültürlerin uzun süreli canlılığını korumaktadır. Stok kültürler, kontaminasyon ve morfolojik değişimlerin önlenmesi amacıyla periyodik ve mikroskobik olarak kontrol edilmiş sonrasında belirli aralıklarla taze besiyerine aktarılmıştır. Bu yaklaşım, *K. lunaris* alginin laboratuvar koşullarında güvenli ve sürdürülebilir şekilde muhafazası için yaygın olarak önerilmektedir.

Siyanobakteri kültürleri (*Chroococcus* sp.) ise, fizyolojik stresin en aza indirilmesi amacıyla düşük ışık koşullarında ve 4 ± 1 °C'de saklanmıştır. Siyanobakterilerin bazı türlerinde uzun süreli karanlık koşulların fizyolojik hasara yol açabileceği göz önünde bulundurularak, stoklama sırasında tamamen karanlık yerine çok düşük ışık şiddeti tercih edilmiştir. Kültürler, hücre bütünlüğü ve pigment stabilitesinin korunması açısından düzenli

aralıklarla gözlemlenmiş ve deneysel çalışmalarda kullanılmadan önce ön adaptasyon sürecine tabi tutulmuştur.

Genel koruma ve kalite kontrol amacıyla, her iki gruba ait stok kültürlerde kontaminasyon kontrolü düzenli olarak yapılmış, deneylerde kullanılan kültürler stok kültürlerden doğrudan değil, aktif büyüme fazına geçirilmiş alt kültürlerden elde edilmiştir. Bu yaklaşım, deneysel sonuçların tekrarlanabilirliğini ve fizyolojik tutarlılığını sağlamak amacıyla uygulanmıştır (Ali vd., 2021; Pozzobon vd., 2024).

3.1.2. Kullanılan besiyeri ve kimyasallar

BG-11 Besiyeri: Mikroalglerin geliştirilmesinde kullanılan bu besiyerinin hazırlığında öncelikle aşağıda verilen sekiz stok solüsyon 100'er ml distile su içerisinde hazırlanır.

$NaNO_3$….....15 g/L

K_2HPO_4.....0.4 g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$.....0.75 g/L

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$.....0.36 g/L

Sitrik asit.....0.06 g/L

Demir (III) amonyum sitrat...0.06 g/L

Na_2-EDTA.....0.01 g/L

Na_2CO_3.....0.2 g/L

Her bir çözeltiden 10'ar ml alınarak 1 L'lik cam bir şişe içerisine aktarılmıştır (Toplam 80 ml).

İz element çözeltisi: Aşağıda verilen iz elementler belirtilen oranlarda tartıldıktan sonra ayrı bir şişede 100 ml distile su içerisinde karıştırılmıştır. Bu karışımdan 1 ml alınarak yukarıda anlatılan 80 ml'lik ana şişeye eklenmiştir.

H_3BO_3.....61 mg (1×10^{-3} M/L)

$MnSO_4 \cdot H_2O$.....169 mg x (1×10^{-3} M/L)

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.....287 mg x (1×10^{-3} M/L)

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$.....2.5 mg x (1×10^{-5} M/L)

$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$.....12.5 mg ($1 \times 10^{-5}$ M/L)

Bu şekilde hazırlanan besiyeri son hacim 1 L (919 ml distile su) olacak şekilde distile su ile tamamlanmış ve final pH değeri 6.8 olacak şekilde otoklav yoluyla steril edilmiştir (Rippka, 1988).

Sudan Siyah B Boyası (% 0.3): PHB granüllerinin hücre içindeki varlığını tespit etmede yaygın olarak kullanılan lipofilik bir boyadır. 0.3 g Sudan siyah B tartılmış ve % 70 etanol ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 1–2 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 0.45 µm PTFE filtre yardımı ile süzülmüştür. Boya amber şişe içerisinde +4 °C'de saklanmıştır (Burdon, 1946).

Safranin O Boyası (% 0.5): Sudan siyah B uygulaması sonrası zıt boya olarak kullanılır. 0.5 g safranin 100 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Boya amber şişede ve +4 °C'de saklanmıştır (Burdon, 1946).

Krotonik Asit Standart Çözeltilerinin Hazırlanması: Stok çözelti için 10 mg saf krotonik asit tartılır ve ultra saf su içinde hacim 10 mL'ye tamamlanır (1 mg/mL). Stok çözelti ve ultra saf su kullanılarak uygun konsantrasyonlarda dilüsyonlar hazırlanır (Blank olarak yalnızca ultra saf su kullanılır).

Krotonik Asit Konsantrasyona Asit Eklenmesi: PHB türevli numunelerin matris koşullarına uyması için, krotonik asit standartları aynı H_2SO_4 (sülfürik asit) işlemine tabi tutulmuştur. Krotonik asit konsantrasyonlarının her biri 200 µL olacak şekilde Asit dirençli bir cam tüpe eklendi ve üzerine yavaşca 800 µL konsantre H_2SO_4 (98 %) eklendi. Karıştırmak için kısa süre vortekslendi ve 100 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Tüplerin oda sıcaklığına soğumasını beklendi (Blank için 800 µL H_2SO_4 ve 200 µL ultra saf su kullanarak bir boş örnek hazırladı). Bu işlemler sonrası çözeltiler spektrofotometre cihazı ile 235 nm'de ölçüldü ve grafik oluşturuldu.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Tip I Biyogüvenlik kabini (Hed LAB, Türkiye); Çekerocak (Hed LAB, Türkiye); Soğutmalı santrifüj (Beckmann-Coulter Allegra X30-R ve Hermle Z326k, Almanya); Manyetik karıştırıcı (Schott, Amerika); Buzdolabı (Arçelik, Türkiye); Distile su cihazı (Elga, Almanya); Etüv (Binder, Almanya); Hassas terazi (Ohaus, İsviçre); UV-Görünür spektrofotometre (AE-S90-2D UV-VIS Spectrophotometer, Çin); Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), (Hitachi HT7800, Japonya); Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM), (Hitachi Regulus 8230, Japonya); Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), (Perkin Elmer Spectrum 100 FTIR - ATR unit, Almanya); Liyofilizatör (Christ Alpha Plus, Almanya); Ters (Inverted) Mikroskop (Zeiss Primovert, Almanya); Su banyosu (NB 301, Kore); Vorteks (Biocote, İngiltere); Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC), (Perkin Elmer DSC8000, Almanya); Fotobiyoreaktör (Photon Systems Instruments MultiCultivator OD-1000, Çekya).

3.2. Yöntem

3.2.1. Suşların temini ve kültüre edilmesi

Çalışmada mikroalg test organizması olarak *K. lunaris* (Kirchner) Möbius ve siyanobakteri test organizması olarak *Chroococcus* sp. kullanılmıştır.

3.2.1.1. K. lunaris hücrelerinin eldesi ve kültür koşulları

Çalışmada kullanılan *K. lunaris* (Kirchner) Möbius, Porsuk Nehri'nden (39° 42′ 0″ N, 31° 59′ 0″ E) izole edilmiş (Eskişehir, Türkiye) ve daha önce önerilen şekilde saf kültür haline getirilmiştir (Rippka vd., 1988). İzolasyon prosesinde daha önceki bir çalışmada önerilen metot uygulanmıştır (Öztürk vd., 2019). Örnekler steril saf su yardımıyla seri dilüsyona alınmış ve BG-11 katı besiyerine çizgi ekimleri yapılmıştır. Daha sonra her bir koloni, ters mikroskop altında çalışan Pasteur pipeti yardımıyla ayrı ayrı izole edildi. Pasteur pipetleri, çalışmaya başlamadan önce ateş altında penset yardımıyla mümkün olduğunca inceltildi. 7-10 gün inkübasyondan sonra oluşan kolonilerden BG-11 sıvı besiyeri içeren steril erlenlere inokülasyon yapılmış ve çalkalayıcı kullanılarak beyaz fluoresan ışık yoğunluğu altında (16 saat gündüz 8 saat gece, 27 °C'de 3000 lux koşullarında) 2-4 hafta süreyle log fazına ulaşana kadar geliştirilmiştir. Daha sonra yeniden seri dilüsyon işlemine alınarak hücreler saf kültür halinde elde edilmiştir. Ters mikroskop altında her hücre ayrı ayrı izole edilmiş ve BG-11 besiyerine alınmıştır. Tür tayini için mikroskopta morfolojik özellikler incelenmiştir. Çalışma öncesi + 4 °C' de izole edilen saf kültür buzdolabında saklanmıştır (Rippka, 1988; Prescott, 1973; Wilmotte ve Herdman, 2001).

Sıvı besiyerinde algleri geliştirmek için Photon Systems Instruments'den alınan MultiCultivator OD-1000 sistemi kullanılmıştır (Zuliani vd., 2016). Cihaz bünyesinde termostatik bir banyoya daldırılmış sekiz adet tüp bulunmaktadır. Bu tüpler 80 ml besiyerini içine alabilecek kapasitededir. Her tüp, 400 µmol m^{-2} s^{-1} olarak ayarlanmış bir LED sistemi ile aydınlatılmaktadır. Çalışmamızda her tüpe 2 × 10^5 hücre/mL olacak şekilde inokülasyonlara yapıldı. Vakumlu hava sağlanarak hücre agregasyonu önlenmeye çalışıldı. Cihaz 24 saatte bir klorofil içeriği ile orantılı olarak 680 nm'de ve optik yoğunluk ile bağlantılı olarak 720 nm'de ve 750 nm'de absorbans ölçecek şekilde ayarlandı. Besiyeri olarak BG-11 kullanıldı. Cihaz 27 ºC'de 16:8 aydınlık:karanlık döngüsünde tutuldu (Öztürk vd., 2025).

Fotobiyoreyaktörde geliştirilen *K. lunaris* hücrelerinin kitlesel üretimi amacı ile çalışmaya erlenlerden oluşan bir düzenek ile devam edilmiştir. Bu amaçla 1-5 L'lik erlenlerde bulunan BG-11 besiyeri ortamına eksponansiyel büyüme fazındaki algal

inokülümden eklenmiştir. Hücreler sıcaklık kontrollü bir ortamda 25 ± 2 °C'de geliştirilmiş ve kültürler 1500 lux aydınlatma seviyesinde, 16:8 saatlik aydınlık/karanlık döngüsüne sahip soğuk floresan lambalar ile aydınlatılmıştır (Costa vd., 2018; Roja vd., 2019). Havalandırma oranı ise % 2 CO_2 ile zenginleştirilmiş atmosferik hava ortamı ile sağlandı (Şekil 3.1.), (Nascimento vd., 2013).



Şekil 3.1. BG-11 sıvı besiyerinde üretilmiş saf *K. lunaris* hücreleri

3.2.1.2. Chroococcus sp. hücrelerinin eldesi ve kültür koşulları

Çalışmamızda kullanılan Siyanobakteriyel test izolatı *Chroococcus* sp., Eskişehir iline ait Mamuca/Sarısungur Göleti'nden (39° 42' 17" K - 30° 34' 31" D) toplanmış olup daha önce önerilen şekilde saf kültür olarak elde edilmiştir (Rippka vd., 1988). Örnekler steril saf su yardımıyla seri dilüsyona alınmış ve BG-11 katı besiyerine çizgi ekimleri yapılmıştır. 7-10 gün inkübasyondan sonra oluşan kolonilerden BG-11 sıvı besiyeri içeren steril erlenlere inokülasyon yapılmış ve çalkalayıcı kullanılarak beyaz fluoresan ışık yoğunluğu altında (12 saat gece - 12 saat gündüz, 25 °C'de 3000 lux koşullarında) 2-4 hafta süreyle log fazına ulaşana kadar geliştirilmiştir. Daha sonra yeniden seri dilüsyon işlemine alınarak hücreler saf kültür halinde elde edilmiştir. Ters mikroskop altında her hücre ayrı ayrı izole edilmiş ve BG-11 besiyerine alınmıştır. Tür tayini için mikroskopta morfolojik özellikler incelenmiştir.

Çalışma öncesi + 4 °C' de izole edilen saf kültür buzdolabında saklanmıştır (Rippka, 1988; Çiğdem, 2024).

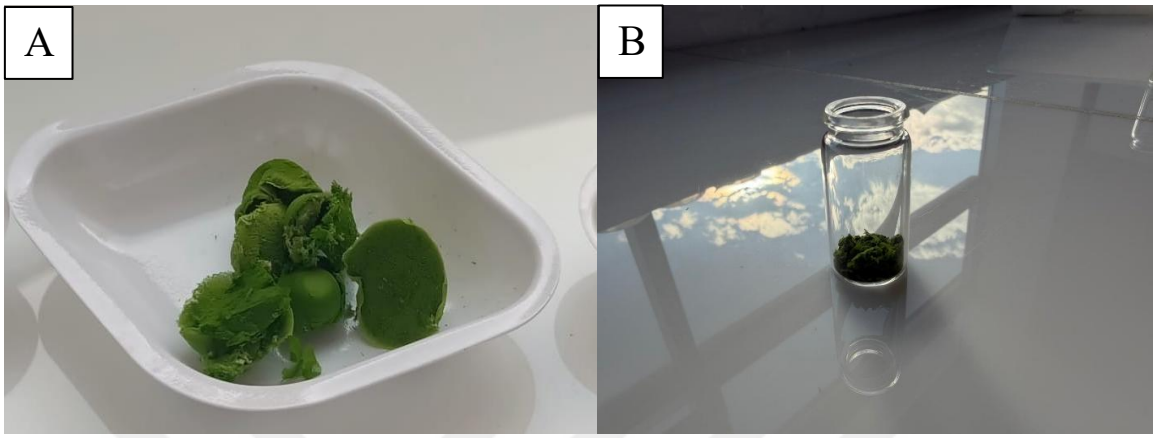
Siyanobakterileri fotobiyoreaktörde geliştirmek için 3.2.1.1. kısımında mikroalgler için yapılan işlemler aynen uygulanmıştır (Zuliani vd., 2016; Öztürk vd., 2025; Costa vd., 2018; Roja vd., 2019; Nascimento vd., 2013).

3.2.2. Alg türlerinin büyüme profilinin belirlenmesi ve kuru hücre ağırlıklarının tayini

Optimal ışık koşullarında *K. lunaris* ve *Chroococcus* sp. 'nin büyüme eğrisini oluşturmak için deney düzeneği kurulmuştur. Kültürler, 15 gün boyunca beyaz ışığa (430–750 nm) maruz bırakılmıştır. Büyüme hem klorofil bolluğunu hem de hücre yoğunluğunu yansıtan 680 nm, 720 ve 750 nm'de absorbans değerleri (OD_{680}, OD_{720}, OD_{750}) ölçülerek her 72 saatte bir izlenmiştir. Bu ölçümler, bu deney setinde kuru biyokütleye dönüştürülmeden büyüme eğrileri oluşturmak için kullanılmıştır. OD değerlerini desteklemek açısından kuru ağırlıklar da 72 saatte bir belirlenmiştir (Costa vd., 2018; Roja vd., 2019).

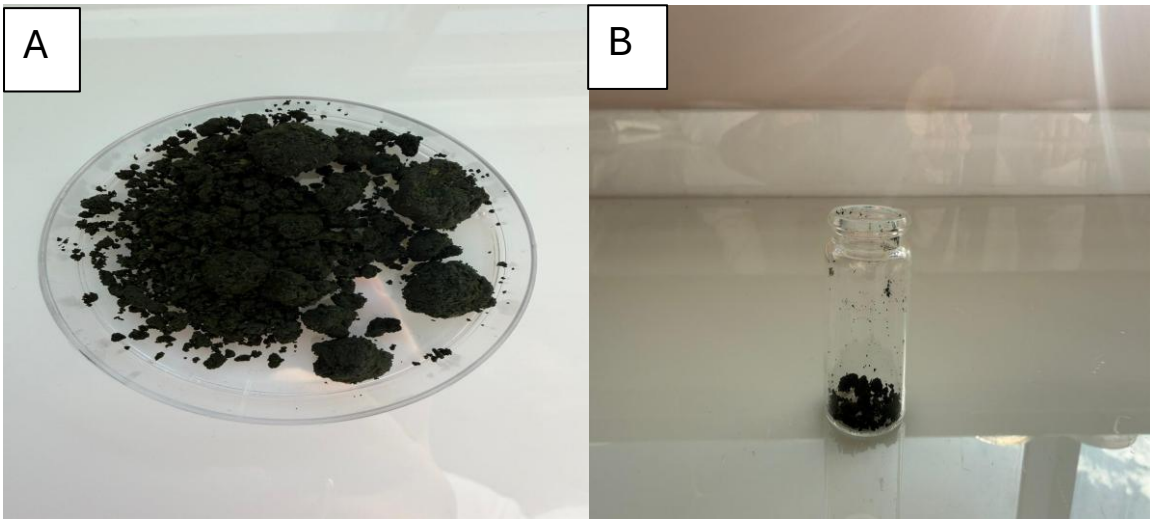
Saf kültür olarak elde edilen *K. lunaris* hücreleri, bir litrelik şişelerde bulunan BG-11 besiyerinde çoğaltılmıştır. Her bir litre besiyeri için 10 ml alg eklenmiştir (Rana vd., 2024). Mikroalgler fotosentetik olduğu için gelişim sürecinde ortama CO_2 akışı sağlanmıştır. Bu süreçte buharlaşma fazla olur ve BG-11 seviyesi azalır ise, BG-11 takviyesi yapılmıştır. Yeterli miktarda alg üretildikten sonra hasat işlemine geçilmiştir. *K. lunaris'*in besiyerinden ayrılması için basit ve enerji açısından düşük maliyetli bir yöntem olan sedimentasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kültür bir litrelik şişeler için ortalama iki gün süre ile bekletilmiş ve hücrelerin kendi ağırlığı ile dibe çökmesi sağlanmıştır (Placzek vd., 2025). Çökelmiş hücrelerin bulunduğu alt tabakayı bozmadan, üstte kalan BG-11 süpernatantını uzaklaştırmak için sifonlama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla ince steril bir silikon hortum kullanılmıştır. Şişeyi hareket ettirmeden hortumun bir ucu üst sıvıya daldırılarak diğer ucundan bir pompa yardımı ile çekilmiştir. Kültür hacmi belirli bir yoğunluğa ulaştığında (yaklaşık 100 mL'de 2 x 10^5) karıştırılmış ve 50 ml'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. 4500 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı atılmıştır. Pellet hücreleri saf su ile

yıkanarak santrifüj edilmiş ve işlem üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen *K. lunaris* hücreleri liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur ve kurutulmuş hale getirilmiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Kurutulmuş *K. lunaris* hücreleri (A) Liyofilizasyon sonrası elde edilen ilk hasat görüntüsü. (B) Tartım sonrası cam tüpe alınmış hali.

İzole edilmiş *Chroococcus* sp. hücrelerinin çoğaltılması ve liyofilize hale getirilmesi için yapılan işlemler, *K. lunaris* için anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. Ancak santrifüj işleminde küçük bir modifikasyona gidilmiştir. Siyanobakteri hücreleri çok küçük olduğu için kendi kendine çökmemektedir. Bu sebeple hasat işleminde çeşitli demir tuzlarının flokülant olarak kullanımı faydalı olabilmektedir. Çalışmamızda *Chroococcus* sp. hücreleri Fe_2SO_4 ile muamele edilerek eppendorf tüplerde 12 000 rpm ve 5 dk süre ile çöktürme işlemine gidilmiştir (Goswami vd., 2019). Geriye kalan işlemler *K. lunaris* için uygulanan şekilde gerçekleştirilmiş ve liyofilize hale getilmiştir (Şekil 3.3.).

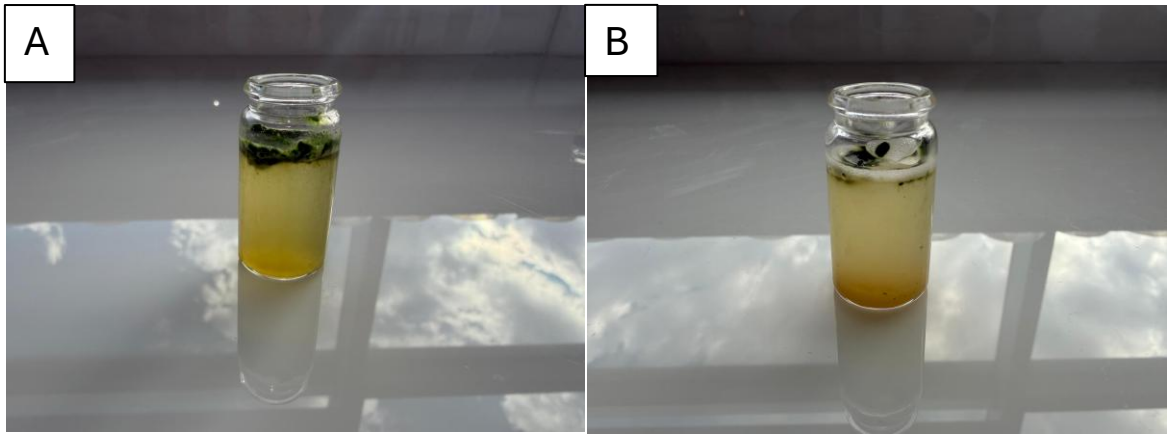


Şekil 3.3. Kurutulmuş *Chroococcus* sp. Hücreleri (A) Liyofilizasyon sonrası elde edilen ilk hasat görüntüsü, (B) Tartım sonrası cam tüpe alınmış hali.

3.2.3. PHB ekstraksiyonu

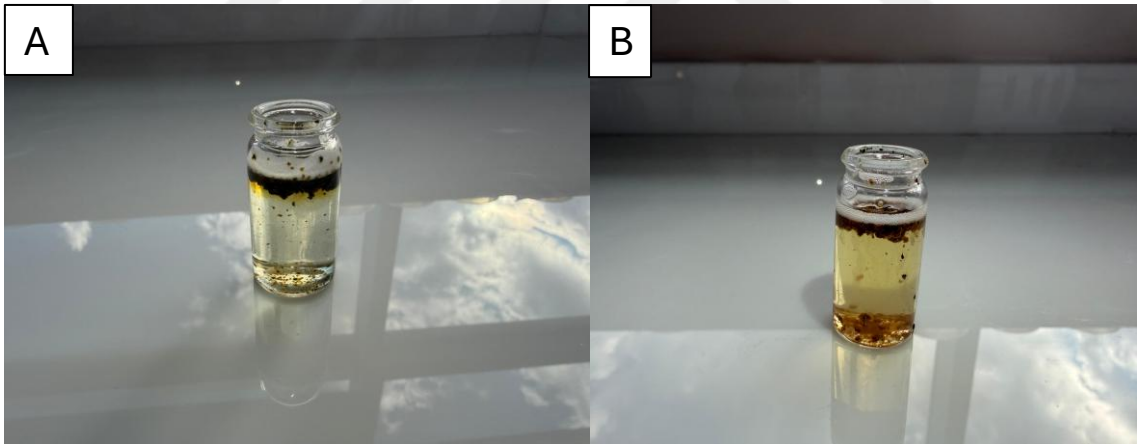
Çalışmada hem *K. lunaris* hem de *Chroococcus* sp. izotlatlarından PHB ekstraksiyonu yapmak için izlenen adımlar benzer şekilde uygulanmıştır.

Bu amaçla, 60 mg kurutulmuş biyokütle cam deney tüplerinde 5 ml sodyum hipoklorit (NaOCl, % 4) çözeltisi ile karıştırılmış ve 30 °C'de 2 saat su banyosunda inkübe edilmiştir. Şekil 3.4.A, *K. lunaris* hücrelerine sodyum hipoklorit eklendiği anı ve Şekil 3.4. B ise 2 saat sonra elde edilen çökmeyi göstermektedir (Mourão, M. M. vd., 2020).



Şekil 3.4. NaOCl eklenen *K. lunaris* hücrelerinin ilk hali (A) ve 2 saat sonra elde edilen çökelti görüntüsü (B)

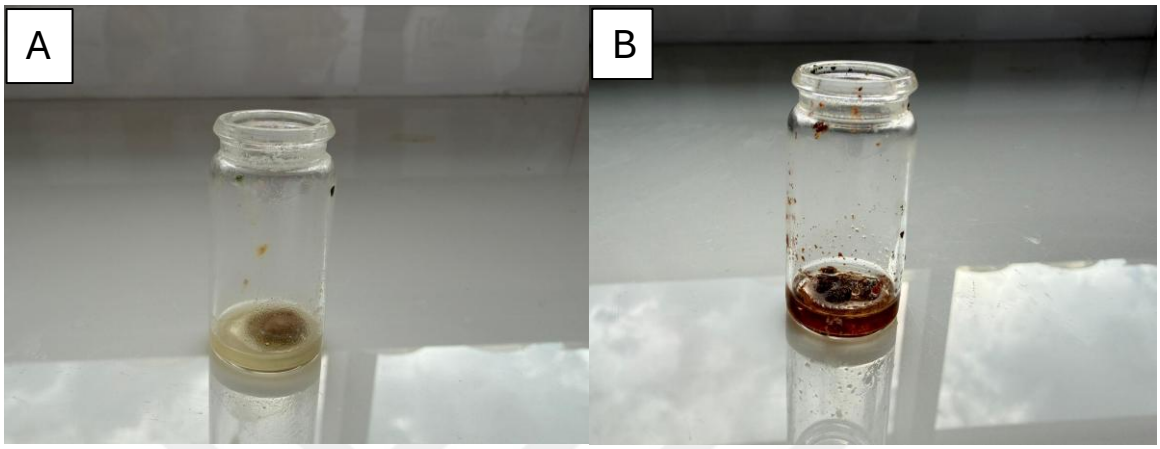
Benzer şekilde uygulama yapılan *Chroococcus* sp. hücrelerine ait görsel ise Şekil 3.5.'te sunulmuştur.



Şekil 3.5. NaOCl eklenen *Chroococcus* sp. hücrelerinin ilk hali (A) ve 2 saat sonra elde edilen çökelti görüntüsü (B)

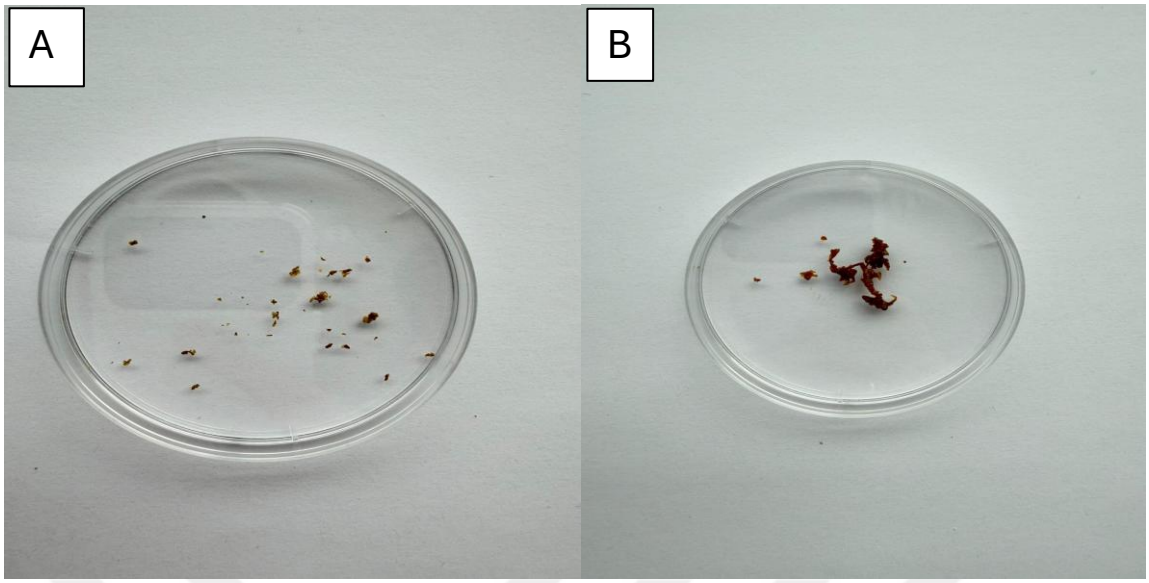
NaOCl hücre duvarı ve zarı parçalayarak hücre içindeki PHB'yi serbest bırakmak için uygulamıştır. Daha sonra tüpler 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Daha sonra pellet 5 ml bidistile su ve 5 ml % 100 etanol ile karıştırılmış ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edilmiştir. Burada bidistile su, NaOCl kalıntılarını ve çözünmüş safsızlıkları uzaklaştırmak, etanol ise PHB yapısına zarar vermeden ortamdaki organik

kalıntıları çözmek için kullanılmıştır. İşlemler 2 kere tekrarlanmıştır (García, G. vd., 2020). Santrifüj sonrası elde edilen *K. lunaris* ve *Chroococcus* sp. hücrelerine ait pellet görüntüsü Şekil 3.6.'da sunulmaktadır.



Şekil 3.6. Santrifüj sonrası elde edilen *K. lunaris* ve *Chroococcus* sp. hücrelerine ait pellet görüntüsü (A) *K. lunaris*, (B) *Chroococcus* sp.

Santrifüj sonrası elde edilen pelletler bir önceki hipoklorit-su-etanol işlemlerinden sonra PHB'yi çözündürmek amacıyla kloroform muamelesine tabi tutulmuştur. Bu amaçla elde edilen pellet kaynama noktasına getirilen 10 ml kloroform içerisinde çözdürülmüştür. Elde edilen kloroform çözeltisi 0.45 µm PTFE gözenekli filtreden geçirilmiştir. Elde edilen sıvı bir kaba aktarılmış ve sıvı kısmı buharlaşacak bir sıcaklıkta, etüv içerisinde kontamine olmamasına dikkat edilecek şekilde kuruması sağlandı. Buharlaşma sonrası kalan kuru ağırlık, toplam PHB üretimini tespit etmek için tartılmıştır (García, G. vd., 2020; Costa vd., 2018; Roja vd., 2019). Şekil 3.7. A, *Chroococcus*'a ait ve Şekil 3.7. B ise *K. lunaris*'e ait PHB eldesini göstermektedir.



Şekil 3.7. Ekstraksiyon sonrası elde edilen PHB'lere ait görüntüler **(**A) *Chroococcus* sp., (B) *K. lunaris*

3.2.4. PHB varlığının Sudan siyah B-Safranin O boyama tekniği ile incelenmesi

Mikroalg kültürü, 4500 rpm'de 5 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve elde edilen hücre pelleti iki kez distile su ile yıkandıktan sonra bir miktar distile su ile süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonundan bir damla mikroskop lamına alınır ve havada kurutma yolu ile tespit edilmiştir. Lam üzerine % 0.3 Sudan siyah B çözeltisi damlatılmış ve 15-20 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lam distile su ile yıkanmıştır. Zıt boyama için lam üzerine % 0.5 safranin boyası damlatılmış ve 10-15 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda lam tekrar distile su ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Boyanmış preparatlar ışık mikroskobu altında x1000 büyütmede incelenmiştir. Bu teknikte PHB granülleri koyu siyah veya mavi-siyah olarak görülürken, hücrenin geri kalan kısımları kırmızı renkte görünür (Wei vd., 2011).

3.2.5. PHB karakterizasyon yöntemler

3.2.5.1. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

PHB örneklerinin topolojik yüzey incelemeleri amacıyla SEM kullanılmıştır. Bu amaçla elde edilen PHB'ler çift taraflı karbon bant ile yapıştırılmış aliminyum tutucular üzerine yerleştirilmiş ve Hitachi Regulus 8230 marka/model FE-SEM cihazında analiz edilmiştir.

3.2.5.2. Geçirimli elektron mikroskop (TEM) analizi

Örneklerin ultrayapısal düzeyde incelenebilmesi amacıyla öncelikle PHB içeriği 4000xg'de 10 dk süre santrifüj edilmiş ve elde edilen pelet PBS içerisinde hazırlanan % 2.5'luk glutaraldehit fiksatifi içerisinde +4 °C'de 24 saat tutulmuştur. Hücreler ertesi gün 3 kez PBS ile yıkanmış ve birincil fiksatiften uzaklaştırılmış ve sonra bir rotator yardımıyla karanlıkta 1 saat osmiyum tetraoksit ile ikincil fiksasyona tabi tutulmuştur. PBS ile tekrar üç kez yıkandıktan sonra, hücreler % 5 agar içine gömülmüş ve ardından % 1 uranil asetat ile blok boyanmıştır. Örnekler +4 °C'de % 40, 60, 75 ve 95 etil alkol serilerinde dehidre edilmiş sonra % 100'lük etanol içindeki son dehidrasyon da oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Propilen oksitle şeffaflaştırma sonrası epoksis resine gömülen örnekler 60 °C'de 48 saat polimerize olmaya bırakılmıştır. Bir ultramikrotom (Leica UltraCutR) ile 60 nm kalınlıkta alınmış olan tam ince kesitler bakır gridlere yerleştirilmiştir. Gridler 15 dakika uranil asetat ile ve sonra da 1 dakika kurşun sitrat ile boyandıktan sonra Hitachi HT7800 TEM ile incelenmiştir (Yapıcı vd., 2021; Danis vd., 2015)

3.2.5.3. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Çalışmada elde edilen PHB örneklerinin kalitatif analizi FTIR cihazı ile yapılmıştır. Analiz Perkin Elmer Spektrum Two spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bantlar 4000-400 cm^{-1} arasındaki bölgede incelenmiştir, böylece PHB örneklerindeki kimyasal grupların tespit edilmeye çalışılmıştır (Costa vd., 2018; Roja vd., 2019).

3.2.5.4. PHB örneklerinin termal analizi

Sentezlenen PHB'ler, termal özelliklerinin incelenmesi için Termogravimetrik Analiz (TGA) cihazı kullanılmıştır. TGA cihazı ile plastikte sıcaklık sonucu meydana gelen değişiklikler, cam geçiş sıcaklığı (Tg) ve erime sıcaklığı (Tm) kullanılarak doğrulanmıştır. TGA, Perkin Elmer Pyris 13'te, 25 °C'den 1000 °C'ye kadar nitrojen atmosferinde ve 10 °C/dk bir ısıtma oranıyla yapılmıştır.

3.2.6. İstatiksel analizler

Büyüme eğri verileri, bağımsız olarak yürütülen üç deneyin ortalama ± standart sapması (SD) olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak belirlenmiştir. Farklılıklar, gün gün karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, anlamlılık düzeyleri $P < 0,05$ (*) olarak belirlenmiştir.

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Seçilen Türlerin İsimlendirilmesi ve Büyüme Profili Verileri

Morfolojik karakterlerinin incelenmesi sonucunda *K. lunaris* olduğu tespit edildi. Bu türün sistematik olarak canlılar aleminde yer alan sistematiği şu şekildedir:

Şube (Phylum): *Chlorophyta,*

Sınıf: *Chlorophyceae,*

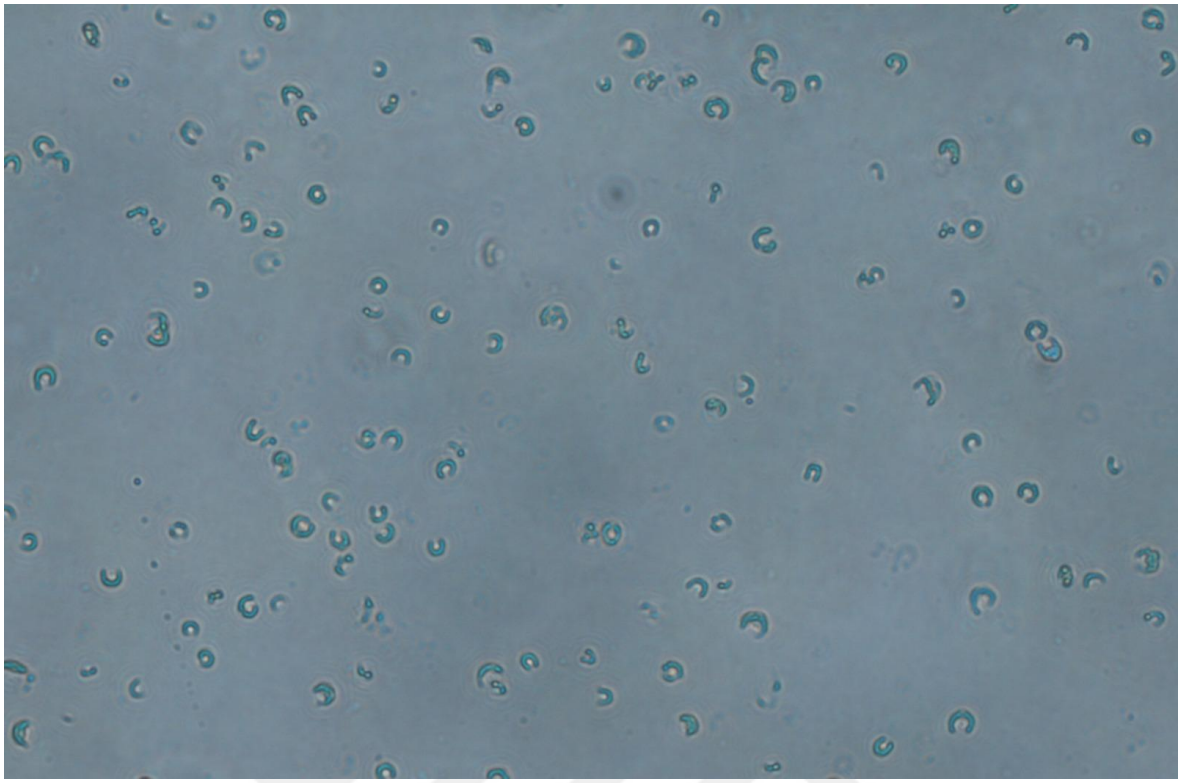
Takım: *Sphaeropleales,*

Aile: *Selenastraceae,*

Cins: *Kirchneriella,*

Tür: *Kirchneriella lunaris.*

Çalışmada kullanılan *K. lunaris* izolatına ait ışık mikroskop görüntüsü Şekil 4.1.'de sunulmuştur (Guiry, 2010).



Şekil 4.1. *K. lunaris* izolatına ait ışık mikroskop görüntüsü. Magnifikasyon: x40

Morfolojik karakterlerinin incelenmesi sonucunda *Chroococcus* sp. olduğu tespit edildi. Bu türün sistematik olarak canlılar aleminde yer alan sistematiği şu şekildedir:

Şube (Phylum): *Cyanobacteriophyta,*

Sınıf: *Cyanophyceae,*

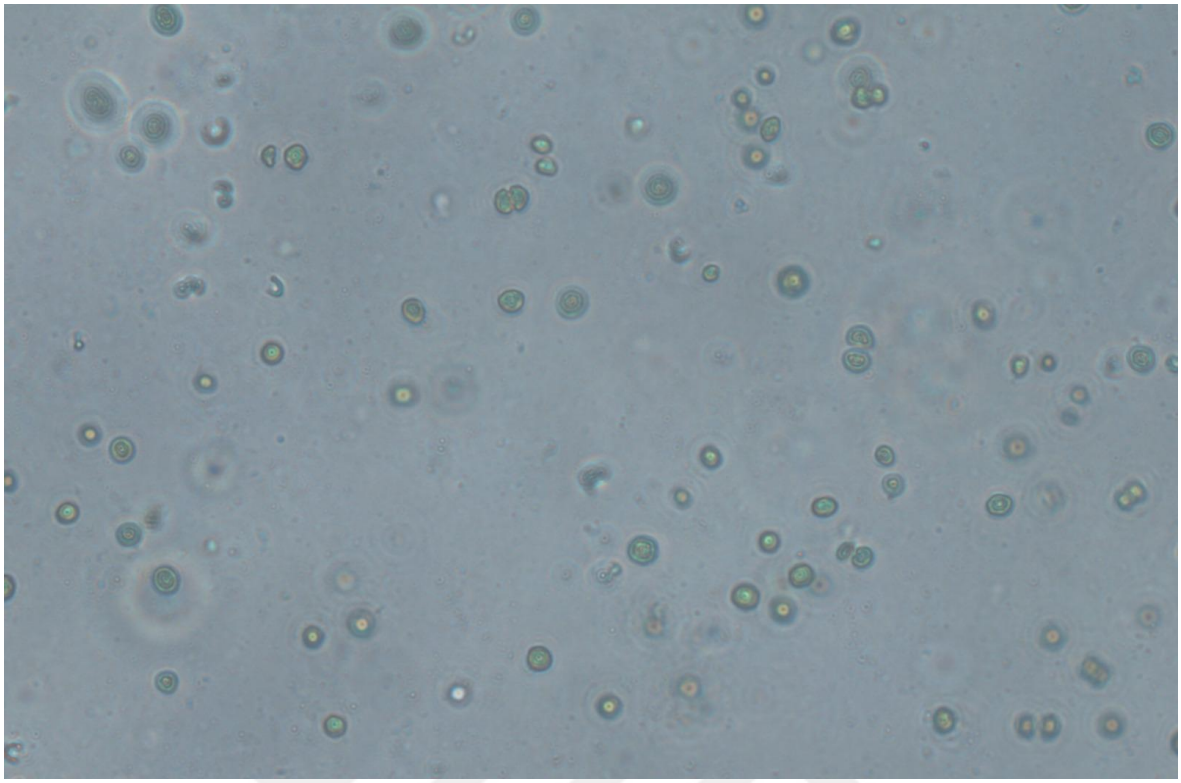
Takım: *Chroococcales,*

Aile: *Chroococcaceae,*

Cins: *Chroococcus*,

Tür: *Chroococcus* sp.

Çalışmada kullanılan *Chroococcus* sp. izolatına ait ışık mikroskop görüntüsü Şekil 4.2.'de sunulmuştur (Guiry, 2010).



Şekil 4.2. *Chroococcus* sp. izolatına ait ışık mikroskop görüntüsü. Magnifikasyon: x40

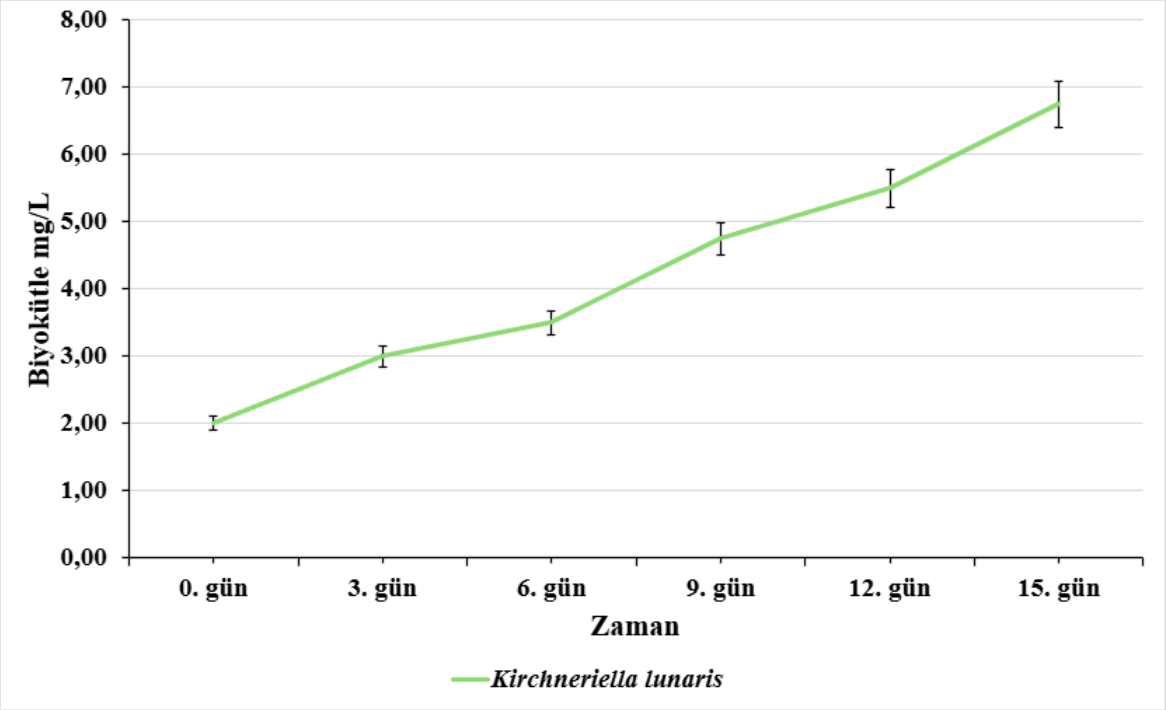
Pigment absorbsiyonundan etkilenen 680 nm ile ışık saçılımını yansıtan 720 ve 750 nm dalga boylarının birlikte kullanılması, büyüme dinamiklerinin güvenilir şekilde değerlendirilmesini sağlamıştır. Elde edilen büyüme profilleri doğrultusunda, hücreler erken logaritmik fazda hasat edilmiş ve bu fazda PHB varlığı izlenmiştir.

Bu çalışmada mikroalg/siyanobakteri kültürlerinin büyüme dinamiği 15 gün boyunca 3 günlük aralıklarla OD_{680}, OD_{720} ve OD_{750} dalga boylarında izlenmiş; aynı günlerde eş zamanlı olarak belirli hacimde kültür örneği alınarak gravimetrik kuru biyokütle (mg) tayini yapılmıştır. Optik yoğunluk (OD) temelli izleme, mikroalg kültürlerinde hızlı ve tekrarlanabilir bir yaklaşım olmakla birlikte, tür/ortam/cihaz farklılıkları nedeniyle OD'nin mutlak biyokütleye çevrilmesinde mutlaka gravimetrik kalibrasyon önerilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda OD ölçümleri, aynı zaman noktalarında elde edilen gravimetrik kuru ağırlık verileri ile birlikte değerlendirilmiş ve böylece büyümenin hem optik hem de kütlesel karşılığı aynı deney düzeneği içinde doğrulanmıştır. OD-kuru ağırlık kalibrasyonunun güvenilirliği; ölçüm dalga boyu seçimi, kültür bileşimindeki değişimler ve ölçüm

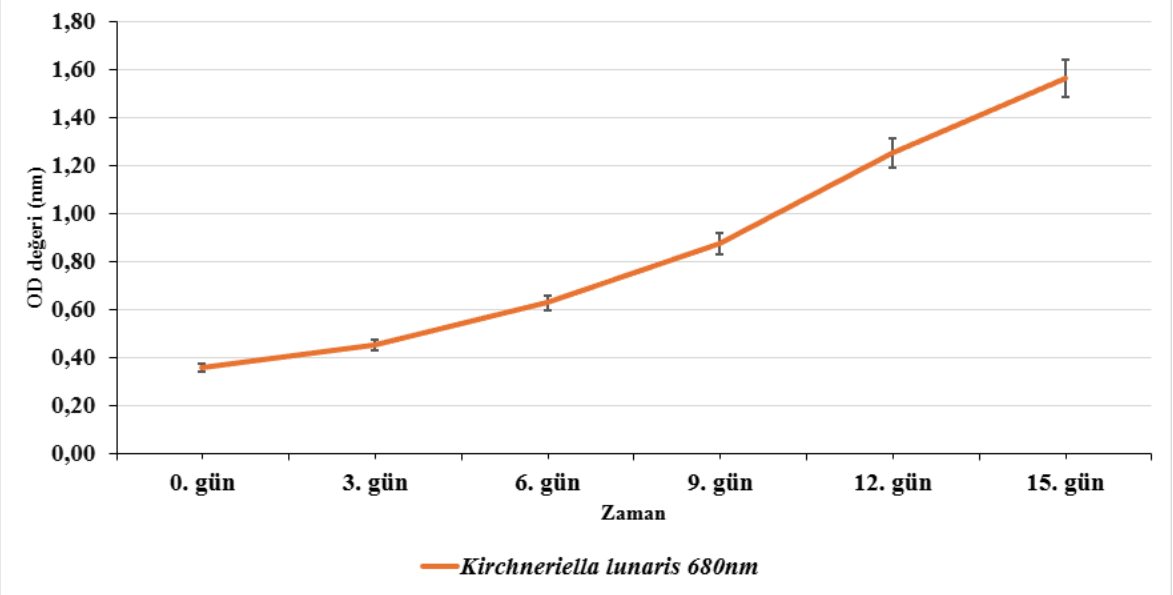
aralığındaki doğrusal saçılma varsayımlarına bağlı olduğundan, kalibrasyonun deney koşullarında kurulması gerektiği özellikle vurgulanmaktadır (Havlik vd., 2022).

4.1.1. *K. lunaris* suşunun kuru hücre ağırlığı

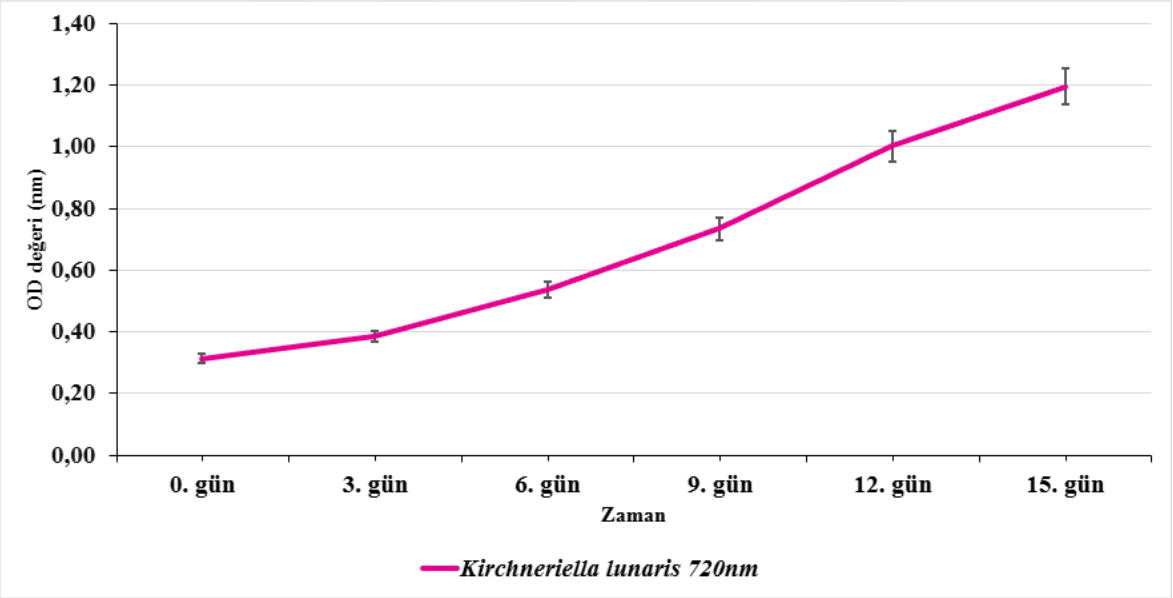
K. lunaris suşunun kuru hücre ağırlığına ilişkin optik yoğunluk (OD) ölçümleri, 680, 720 ve 750 nm dalga boylarında gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.). Üç dalga boyundaki OD değerleri, 0. günden 15. güne kadar düzenli ve anlamlı bir artış göstermiştir. Özellikle 680 nm'de ölçülen OD değerleri diğerlerine kıyasla daha yüksek ve biyokütle değişimini daha hassas yansıtmaktadır. Bu bulgular, *K. lunaris* suşunun sağlıklı bir büyüme kinetiği sergilediğini ve 680 nm OD ölçümünün kültür büyümesini izlemek için uygun bir parametre olduğunu göstermektedir.



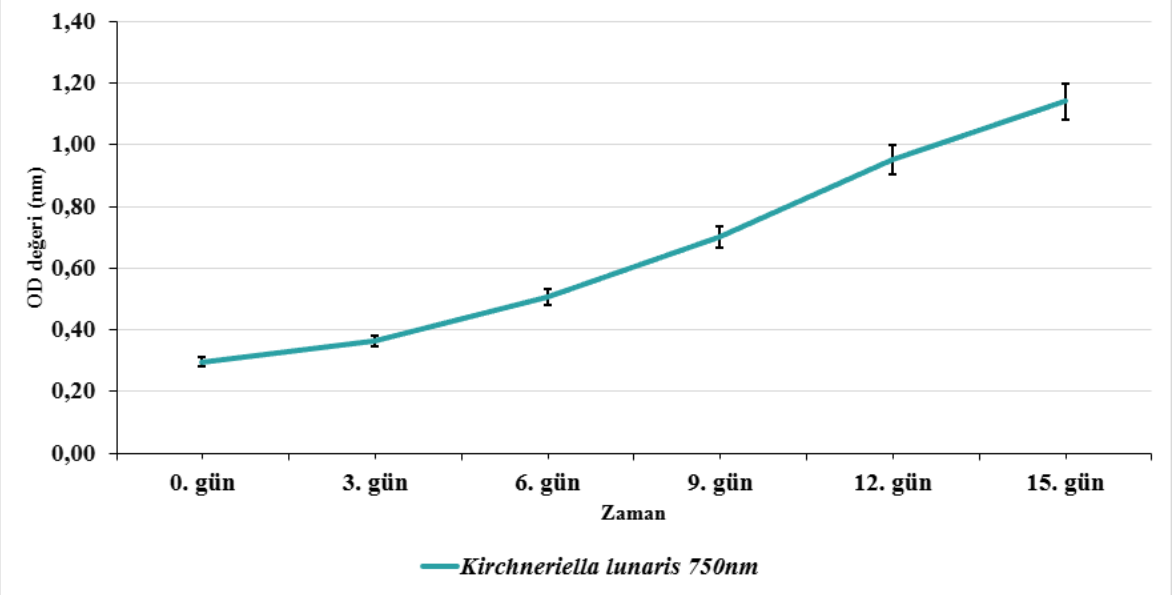
Şekil 4.3. *K. lunaris*'in 15 günlük gelişim sürecinde gravimetrik yöntemle elde edilen kuru biyokütle (mg) tayini. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.



Şekil 4.4. *K. lunaris*'in 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 680 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.



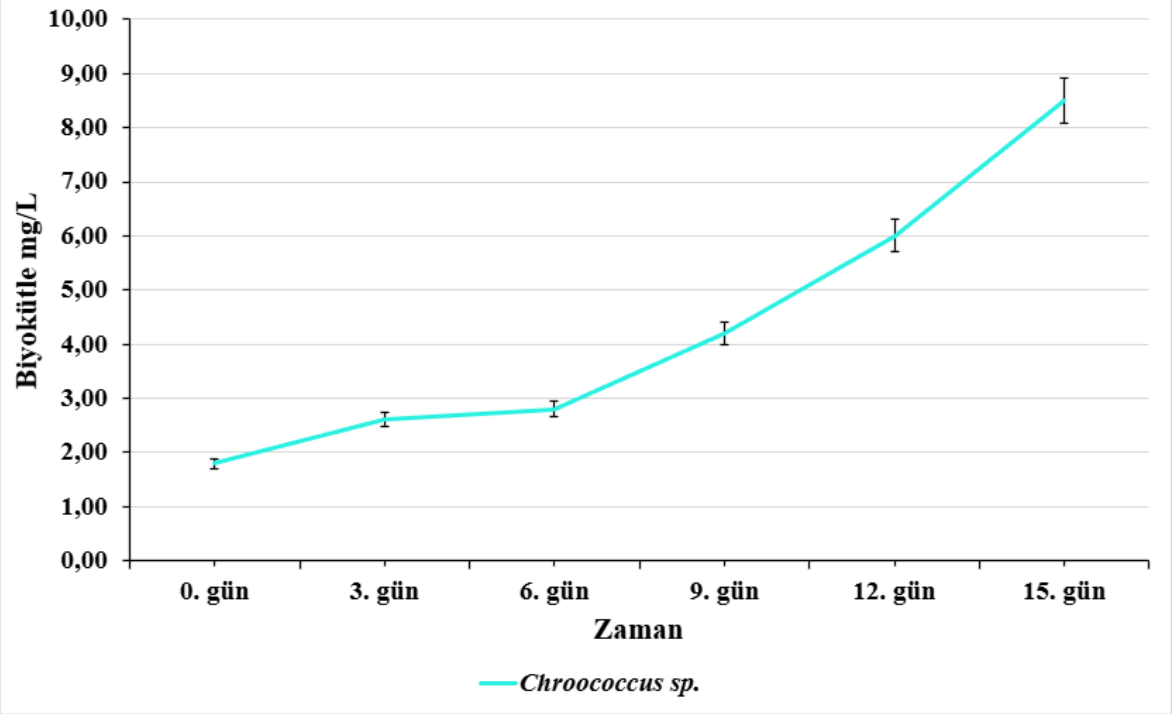
Şekil 4.5. *K. lunaris*'in 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 720 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.



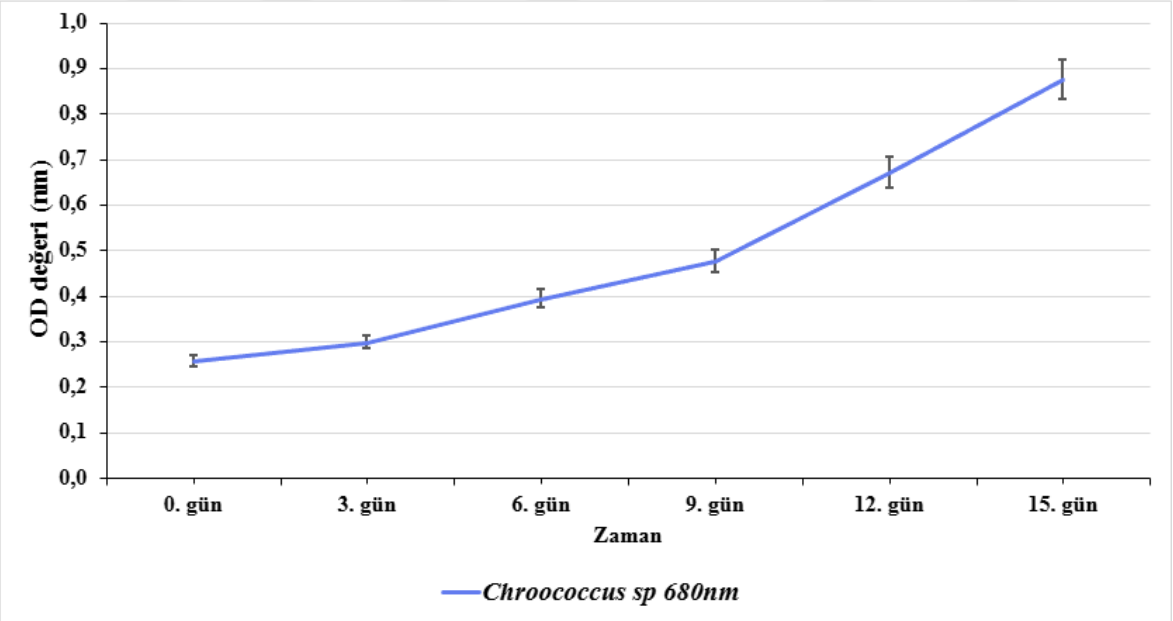
Şekil 4.6. *K. lunaris*'in 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 750 nm dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.

4.1.2. *Chroococcus* sp. suşunun kuru hücre ağırlığı

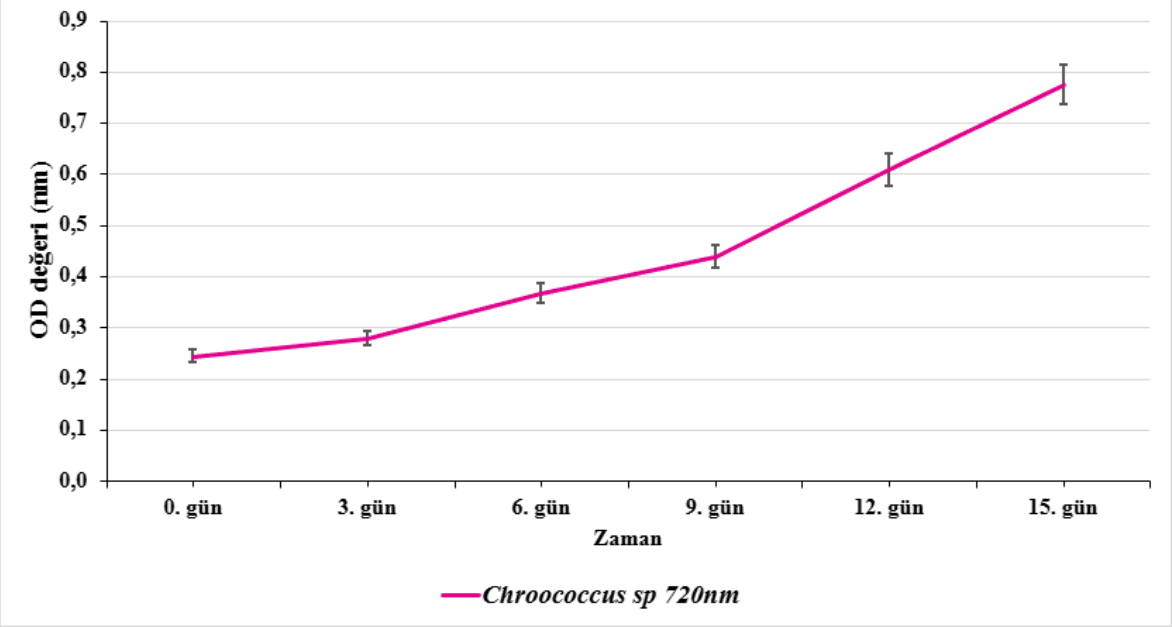
Chroococcus sp. suşunun optik yoğunluk (OD) değerleri, 680, 720 ve 750 nm dalga boylarında ölçülmüş ve 0'dan 15. güne kadar düzenli bir artış göstermiştir (Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.) 680 nm dalga boyunda ölçülen OD değerleri diğerlerine göre daha yüksek olup, biyokütle değişimini daha hassas yansıtmaktadır. Bu sonuçlar, *Chroococcus* sp.'nin kültür süresince sağlıklı büyüdüğünü ve 680 nm OD ölçümünün büyüme takibinde güvenilir bir parametre olduğunu göstermektedir.



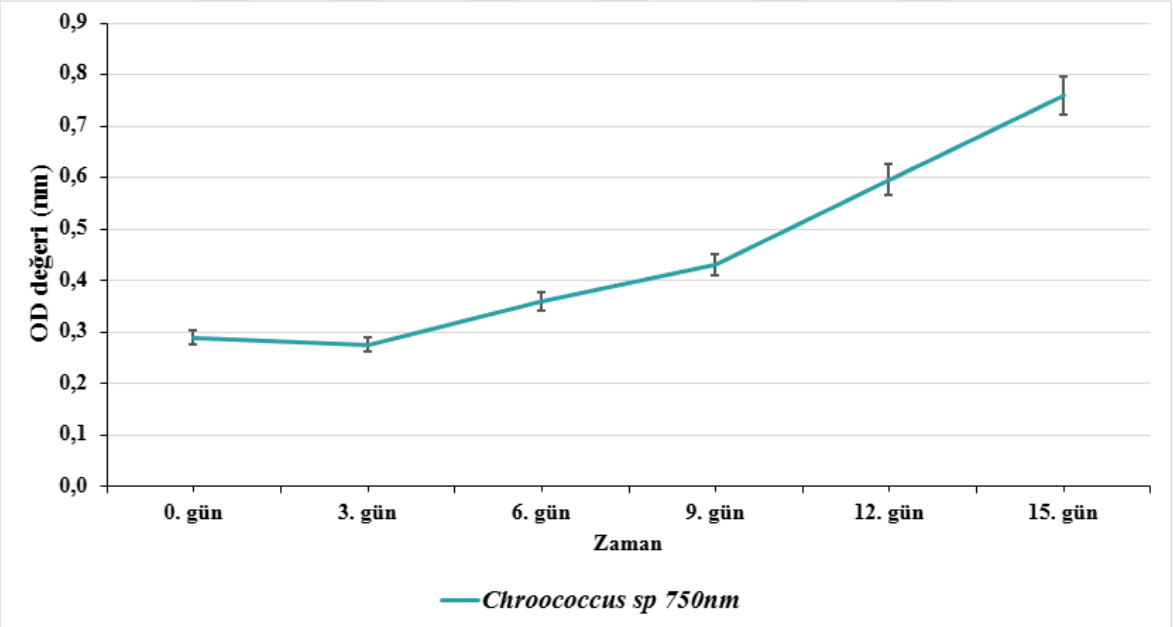
Şekil 4.7. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük gelişim sürecinde gravimetrik yöntemle elde edilen kuru biyokütle (mg) tayini. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.



Şekil 4.8. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 680 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.



Şekil 4.9. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 720 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.



Şekil 4.10. *Chroococcus* sp.'nin 15 günlük yetiştirme süresi boyunca 750 nm, dalga boyunda ölçülen optik yoğunluk (OD) değerine dayalı büyüme eğrisi. Veriler ortalama ± standart hata (n = 3) olarak sunulmuştur. ANOVA'ya göre, zaman arasında anlamlı farklılıkları ($p < 0,05$) göstermektedir. Deney her grup için üçer kez tekrarlandı.

Çalışmamızda *K. lunaris* ve *Chroococcus* sp. kültürlerinde zamanla ölçülen optik yoğunluk (OD) ve kuru hücre ağırlığı artışları, literatürde mikroalg büyümesini izlemek için yaygın kullanılan OD göstergesiyle uyumludur. Literatürde OD ile biyokütle arasında güçlü korelasyonlar bildirilmiş olup (Schagerl vd., 2022), optik ölçümlerin büyüme profillerini takip etmek için geçerli bir parametre olduğu kanıtlanmıştır. Daha önceki bir çalışmada *Kirchneriella*'nın kütle halinde yetiştirilebilme ve ticari açıdan ilgi çekici biyolojik ürünler üretebilme yeteneği açısından çok umut verici olduğu belirtilmiş (Frampton vd., 2013), bu bulgu bizim biyokütle artış verilerimizle uyumluluk göstermiştir. Ayrıca *Chroococcus* türlerinin uygun ışık ve sıcaklık koşullarında anlamlı biyokütle üretimi gösterebildiği literatürde yer almaktadır (Sahoo vd., 2020). Bu bulgular, deneysel büyüme profillerimizin literatürdeki mikroalg büyüme kinetiği ve biyokütle verimlilik desenleri ile tutarlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda OD_{750} (ve/veya 730'a yakın dalga boyları) özellikle tercih edilmiştir; çünkü 750 nm civarı ölçümler pigmentlerin (klorofil/karotenoid) güçlü absorpsiyon bölgesinin dışında kaldığından, sinyal daha çok ışık saçılımına dayanır ve pigment kaynaklı girişimi azaltarak hücre yoğunluğunun daha "biyokütle odaklı" izlenmesine katkı sağlar. Bu yaklaşımın rutin alg kültürlerinde yaygın ve pratik olduğu; OD_{750}'nin pigment absorpsiyonundan nispeten bağımsız kabul edilerek büyüme takibinde kullanıldığı literatürde açıkça belirtilmektedir (Chioccioli vd., 2014). Buna karşılık OD_{680} ölçümleri klorofil absorpsiyonuna daha duyarlı olduğundan, özellikle fototrofik kültürlerde "hücre yoğunluğu + pigment içeriği" bileşik sinyalini yansıtabilir; bu nedenle OD_{680}'in tek başına biyokütle yerine geçmesi yerine, gravimetrik ölçümle birlikte yorumlanması daha doğru kabul edilir (Havlik vd., 2022). Çalışmamızda $OD_{680/720/750}$ birlikte ele alınarak (i) pigmentteki olası değişimlerin (OD_{680}'i etkileyebilecek) ve (ii) saçılım temelli yoğunluk artışının (OD_{750} / OD_{720}) aynı anda izlenmesi sağlanmıştır. Bu çoklu-dalga yaklaşımı, özellikle stres koşullarında pigment kompozisyonu değişebildiği için, büyüme değerlendirmesinin tek bir optik pencereden yapılmasına kıyasla daha "savunulabilir" bir kanıt seti sunmaktadır. Siyanobakterilerde büyüme takibi için OD_{730} / OD_{750} kullanımının yaygınlığı da ayrıca raporlanmaktadır; örneğin bazı çalışmalarda siyanobakteri büyümesi OD_{730} ile izlenmiş ve kalibrasyon eğrileri ile biyokütle/hücre yoğunluğuna çevrim yapılmıştır (Billi vd., 2022). Ayrıca deneysel protokollerde, siyanobakteri kültürlerinde

OD_{750} ölçümünün 400–700 nm aralığındaki pigment absorpsiyonu nedeniyle tercih edildiği; OD'nin mutlak hücre yoğunluğuna çevrimi için kalibrasyon yaklaşımlarının uygulandığı vurgulanmaktadır (Hasenklever vd., 2024). Sonuç olarak, bu tez kapsamında elde edilen büyüme eğrileri; (1) OD_{680} / OD_{720} / OD_{750} ile çoklu optik izleme ve (2) aynı zaman noktalarında yapılan gravimetrik kuru biyokütle tayini ile çapraz doğrulanmıştır. Literatürde önerildiği üzere, OD'nin tek başına "biyokütle" olarak raporlanması yerine, deney koşullarına özgü OD kuru ağırlık ilişkisi kurulmuş ve bu ilişki üzerinden büyüme kinetiği hem nicel hem de metodolojik olarak tutarlı biçimde savunulabilir hale getirilmiştir. Optik yoğunluk (OD_{680}, OD_{720} ve OD_{750}) ve gravimetrik ölçümlerle büyüme profilleri oluşturulduktan sonra, hücreler erken logaritmik fazda hasat edilmiş ve bu fazda PHB varlığı izlenmiştir. Erken log fazının seçilme nedeni, hücrelerin metabolik olarak aktif olması ve karbon metabolizmasının biyopolimer sentezine yönlenmeye başladığı bir geçiş evresini temsil etmesidir.

4.2. PHB Ekstraksiyonu Verileri

4.2.1. *K. lunaris* suşundan elde edilen PHB miktarı

Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda 2 L BG-11 besiyeri içerisinde 10 ml *K. lunaris* hücreleri iki ay süre ile optimum koşullarda geliştirilmiş; hasat ve liyofilizsayon işlemleri sonrası elde edilen kuru alg biyokütlesi 1.495 g olarak tartılmıştır. Elde edilen biyokütlenin 1.2 gramından elde edilen PHB miktarı ise 0.163 g'dır. Yani 1 gram mikroalgden elde edilen PHB miktarı 0.1358 g/g biyokütle oranındadır (% 13.58 w/w).

4.2.2. *Chroococcus* sp. suşundan elde edilen PHB miktarı

Çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda 5 L BG-11 besiyeri içerisinde 50 mL *Chroococcus* sp. hücreleri üç ay süre ile optimum koşullarda geliştirilmiş; hasat ve liyofilizsayon işlemleri sonrası elde edilen kuru alg biyokütlesi 4.069 g olarak tartılmıştır. Elde edilen biyokütlenin 0.6 gramından elde edilen PHB miktarı ise 0.2064 g'dır. Yani 1

gram siyanobakteriden elde edilen PHB miktarı 0.0344 g/g biyokütle oranındadır (%3.44 w/w).

K. lunaris ve *Chroococcus* sp. suşlarından elde edilen PHB üretim verileri, literatürde mikroalg ve siyanobakterlerin biyoplastik üretme potansiyelini değerlendiren çalışmalardaki verilerle tutarlılık göstermektedir. PHB, birçok fotoototrofik mikroorganizma tarafından karbon ve enerji depolama ürünü olarak sentezlenen bir biopolimerdir. Mikroalglerdeki PHB birikimi stres koşulları, besin bileşenlerinin sınırlanması ya da metabolik yönlendirme ile artırılabilmektedir ve bu durum literatürde pek çok çalışmada raporlanmıştır. Örneğin, farklı mikroalg türlerinde PHB içerikleri kuru hücre ağırlığının % 7–42.8 aralığında bildirilmektedir; bu da fotoototrofik mikroalg sistemlerinin biyoplastik üretme potansiyelini göstermektedir (Mirza vd., 2024).

Çalışmamızda *K. lunaris* suşuna ait 1.495 g kuru biyokütlenin 1.2 gramından PHB eldesi yapılmıştır. Burada kullanılan santrifüj cihazı 20 adet tüp bölmesine sahip olup, tüp başına 60 mg biyokütle alma kapasitesindedir. Bu sebeple 1.2 gram biyokütleden 0.163 g PHB izolasyonu gerçekleştirilmiştir (% 13.58). Bu sonuç, bazı yeşil mikroalg türlerinde literatürde bildirilen orta–yüksek PHB yüzdeleri ile uyumludur; örneğin *Chlorella vulgaris* gibi türlerin de farklı koşullarda 0.3–0.4 g PHB/g kuru ağırlık gibi yüksek PHB birikim yüzdelerine eriştiği bildirilmiştir (Nirmala vd., 2025).

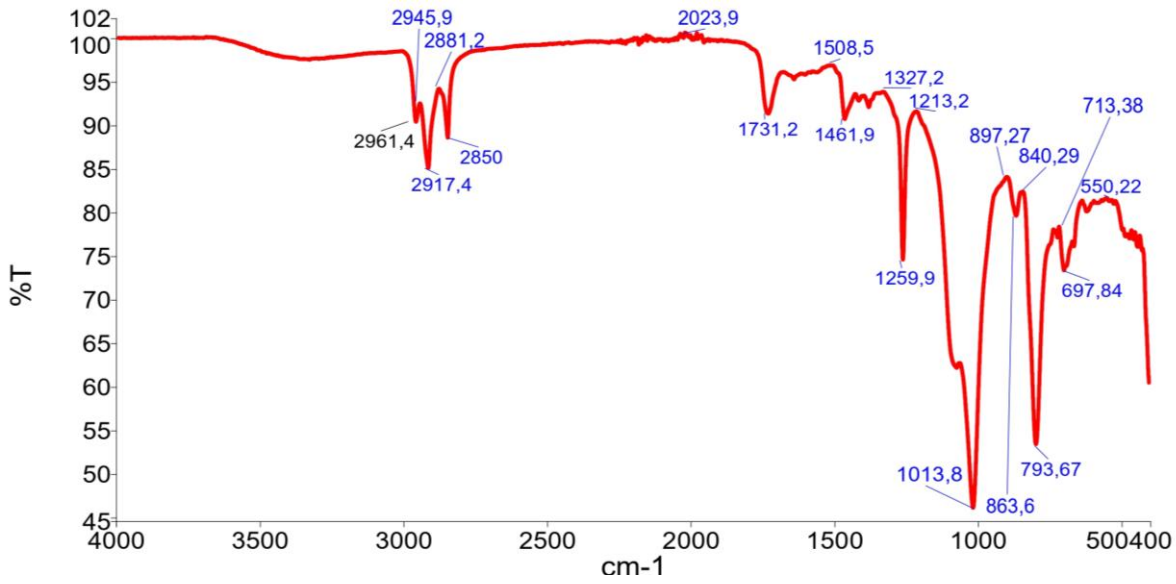
Diğer yandan, *Chroococcus* sp. suşundan elde edilen 4.069 g kuru biyokütlenin 0.6 gramından PHB eldesi yapılmıştır. Burada elde edilen PHB'nin sonraki yeni ekstraksiyon çalışmalarında da kullanılabileceği gözönüne alınarak toplam 1.2 gram kullanmak yerine 0.6 gram şeklinde kullanılması öngörülmüştür. Sonuç olarak 0.6 gram biyokütleden 0.0206 g PHB izolasyonu yapılmış ve bu da biyokütle başına % 3.44 oranında bir verim ile sınırlı bir PHB üretimi olduğunu göstermiştir. Siyanobakterilerde PHB üretimi, besin eksikliği ve ışık rejimi gibi çevresel faktörlerle arttırılabilse de literatürde genellikle daha düşük PHB oranları rapor edilmektedir ve bu konudaki çalışmalar da nispeten daha sınırlıdır (Zhila vd., 2025).

Elde edilen sonuçlar iki suş arasında PHB üretim kapasitesinin farklı olduğunu ortaya koymaktadır. *K. lunaris* daha yüksek PHB içerikleri ile güçlü bir biyoplastik üretim potansiyeline sahipken, *Chroococcus* sp. daha yüksek toplam biyokütle üretmesine rağmen daha düşük PHB verimi sergilemiştir. Bu durum, suşların metabolik özellikleri ve kültür koşullarına duyarlılıkları arasındaki farklardan kaynaklanmaktadır ve literatürde mikroalgler ile siyanobakteriler arasında sıkça rapor edilen farklı eğilimlerle uyumludur.

4.2.3. Elde edilen PHB'lerin FTIR verileri

4.2.3.1. *K. lunaris* suşundan elde edilen PHBlerin FTIR sonuçları

Çalışmamızda her iki mikroorganizma grubuna ait PHB eldesi sonucu gerçekleştirilen FTIR analizleri ile yapısal karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *K. lunaris* için elde edilen spektrumlar Şekil 4.11.'de sunulmuştur.



Şekil 4.11. *K. lunaris*'ten ekstrakte edilen PHB'nin FTIR analizi sonuçları

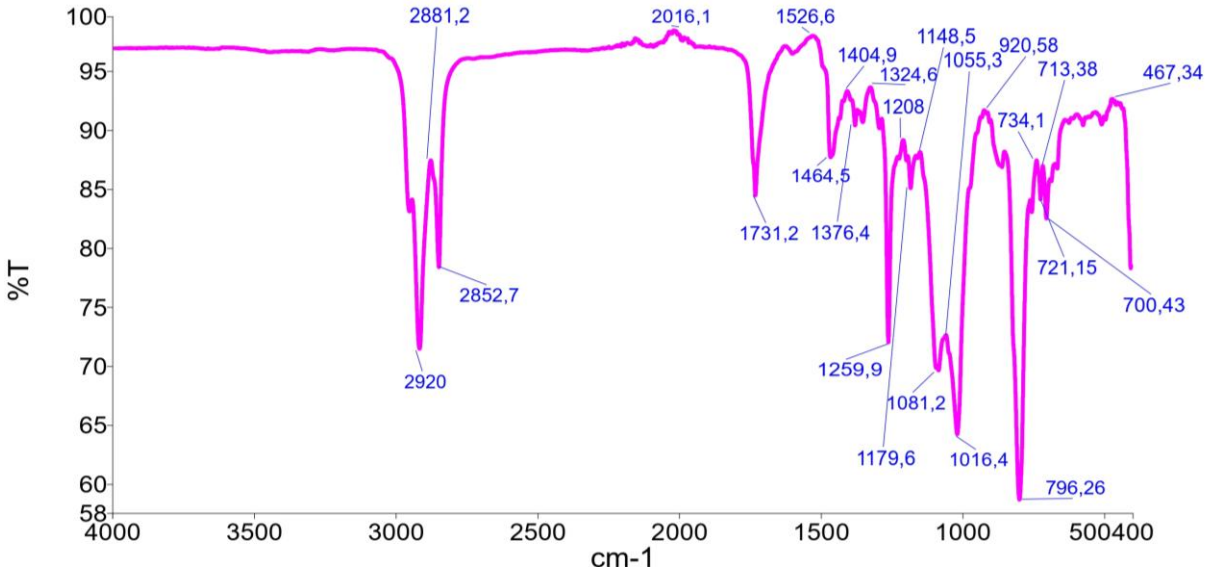
FTIR cihazı polimer yapısı hakkında hızlı ve güçlü bilgi sağlayan bir araçtır. Örnekteki her kimyasal bileşenin kendine has belirgin bir absorbans/transmitans spektrumu

bulunmaktadır. PHB çalışmalarında da sıklıkla kullanılır. Çalışmamızda *K. lunaris*'den ekstrakte edilen biyopolimerin FTIR spektrumu 4000 ile 400 cm^{-1} arasında ölçülmüştür. Ester grupları ile monomer birimlerinin yoğunlaşmasından meydana gelen C–O–C bağlarına ek olarak, C–H bağlarının gerilme ve bükülme titreşimleri de PHB'lerin karakteristik işlevselliğinde önemli rol oynamaktadır (Kumari vd., 2022). 1015 cm^{-1}'deki pikin ester grubundaki C-O çift bağının gerilmesine işaret ettiği aynı çalışma ile FTIR verilerimizde 1013 cm^{-1}'deki sinyal uyuşmaktadır (Roja vd., 2019). Diğer yandan 1043- 1255 cm^{-1} bölgesinde gözlenen yoğun bantlar amin gruplarının C-N vibrasyonlarına işaret edebilmektedir. 1213 cm^{-1} spektrumunda gözlenen bant C-O-C gruplarına işaret edebilir (Shamala vd., 2009). Çalışmamızda da 1259 cm^{-1}'de gözlenen bandın bu bölgeye ait olabileceği düşünülmektedir (Selveraj vd., 2021). 1327 cm^{-1}'de elde edilen pik için literatürde çok belirgin bir atama yapılmamış olmasına rağmen, literatürde 1370 cm^{-1} bölgesi genellikle CH_2 grubunun bükülme modlarına bağlanmaktadır (Chae ve Lee, 2025). 1374 cm-1'de elde edilen sinyalin -CH3 grubunu ifade edebileceği düşünülmektedir (Kumari vd., 2022). 1415 cm^{-1}'deki sinyalin CH_3 grubundaki asimetrik gerilme titreşimini temsil ettiği belirtilen çalışma, verilerimizde gözlenen 1414 cm^{-1} sinyali ile uyumludur. 1460 cm^{-1}'deki tepe noktası, CH_3 grubundaki asimetrik gerilmeye karşılık gelmiş olup, verilerimize göre 1461 cm^{-1}'deki sinyalle benzerlik göstermektedir (Roja vd., 2019). FTIR verilerimize göre 1508 cm^{-1}'deki sinyal için karakteristik bir PHB fonksiyonel grubu işaret edilmemekle beraber, ilgili pek çok çalışmada 1452 cm^{-1}'deki pik CH_3 ya da CH_2 nin asimetrik bükülmesi olarak ifade edilmektedir (Ramezani vd., 2015). Literatürde yeşil alg ve siyanobakterilerden PHA eldesi ve karalterizasyonu gerçekleştirilen bir çalışmada 1639 cm^{-1} sinyalinin C-O çift bağının gerilmesine işaret edebileceği belirtilmiş olup, çalışmamızda 1637 cm^{-1}'de gözlenen sinyalle örtüşmektedir. *K. lunaris* için 1731 cm^{-1}'da gözlenen transmitans bandı genellikle biyopolimerdeki C=O grubunun (ester karbonil) gerilme titreşimine atfedilmektedir ve literatürde buna çok yakın olan 1725 cm^{-1} bandı standart PHB'nin güçlü bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Shamala vd., 2009; Gopi vd., 2014). Yapılan literatür çalışmalarında 2023 cm^{-1} elde edilen sinyal tipik bir PHB fonksiyonel grubu olarak ilişkilendirilememiştir. Ancak bir ölçüm artefaktı ya da ortamdan kaynaklanan bir pik olabileceği düşünülmektedir. 2881 cm^{-1} bandı ise metil ve metilenin C-H bağlarının gerilme vibrasyonuna ait olduğu düşünülmektedir (Shamala vd., 2009). Benzer şekilde diğer çalışmalarda da C-H bölgesi için bu bölgeye işaret edilmektedir. Örneğin, mikroalglerle yapılan benzer bir çalışmada 2955-2582 cm^{-1} arasındaki absorpsiyon bölgesi C-H varlığına atfedilen büyük bir spektrum

aralığını kapsamıştır ve sonuçlarımızda gözlenen 2961, 2945, 2917, 2881, 2850 cm^{-1} piklerinin de bu aralıkta yer aldığı görülmektedir (Selvaraj vd., 2021).

4.2.3.2. *Chroococcus* sp. suşundan elde edilen PHBlerin FTIR sonuçları

Chroococcus sp. için elde edilen FTIR grafiği Şekil 4.12.'de sunulmuştur.



Şekil 4.12. *Chroococcus* sp.'den ekstrakte edilen PHB'nin FTIR analizi sonuçları

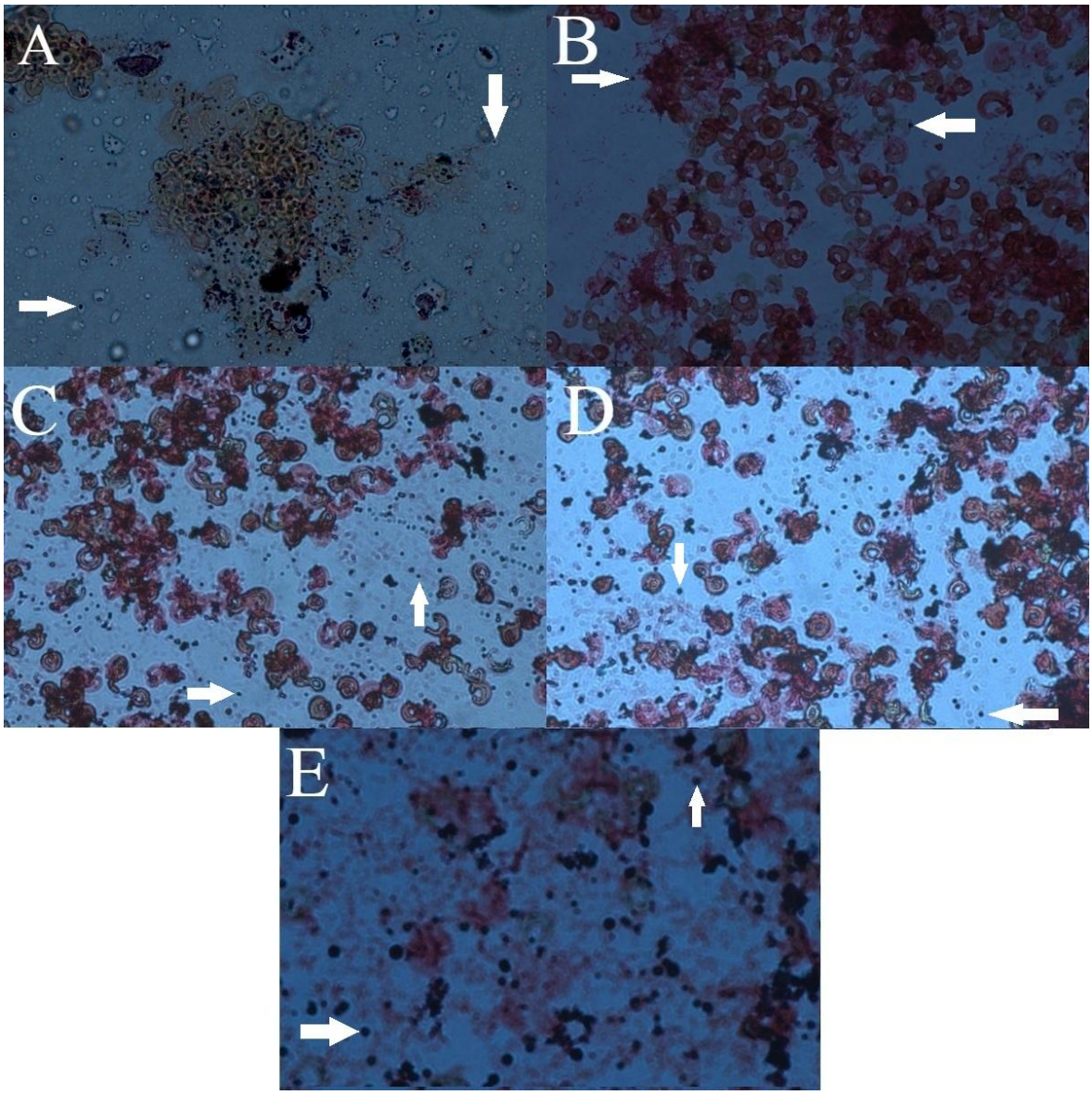
Çalışmamızda *Chroococcus* sp.'den ekstrakte edilen biyopolimerin FTIR spektrumu 4000 ile 400 cm^{-1} arasında ölçülmüştür. Daha önceki bir çalışmada 2955-2582 cm^{-1} arasındaki absorpsiyon bölgesi C-H varlığına atfedilen büyük bir spektrum aralığını kapsamıştır ve sonuçlarımızda gözlenen 2920, 2881, 2852 cm^{-1} piklerinin de bu aralıkta yer aldığı görülmektedir (Selvaraj vd., 2021). Yapılan literatür çalışmalarında 2016 cm^{-1} elde edilen sinyal tipik bir PHB fonksiyonel grubu olarak ilişkilendirilememiştir. Benzer bir bulgu da *K. lunaris*'le yapılan FTIR analizimiz sonucu gözlenmiştir (2020 cm^{-1}). Bu durumun bir ölçüm artefaktı ya da ortamdan kaynaklanan bir pik olabileceği düşünülmektedir. *Chroococcus* sp. için 1731 cm^{-1}'da gözlenen transmitans bandı genellikle biyopolimerdeki C=O grubunun (ester karbonil) gerilme titreşimine atfedilmektedir ve literatürde buna çok yakın olan 1725 cm^{-1} bandı standart PHB'nin güçlü bir göstergesi olarak

kabul edilmektedir (Shamala vd., 2009; Gopi vd., 2014). 1526 cm^{-1}'deki sinyal ile ilgili literatürde direk bir atama görülmemekle beraber, 1540 cm^{-1} bölgesinde gözlenen sinyalin amide II varlığına işaret ettiği düşünülmektedir (Doppler vd., 2021). 1460 cm^{-1}'deki tepe noktası, CH_3 grubundaki asimetrik gerilmeye karşılık gelmiş olup, verilerimize göre 1464 cm^{-1}'deki sinyalle benzerlik göstermektedir (Roja vd., 2019). 1405 cm^{-1}'deki sinyalin CH3 grubundaki asimetrik gerilme titreşimini temsil ettiği belirtilen çalışma, verilerimizde gözlenen 1404 cm^{-1} sinyali ile uyumludur (Omar vd., 2016; Roja vd, 2019). 1376 cm^{-1}'de elde edilen sinyalin -CH_3 grubunu ifade edebileceği düşünülmektedir (Kumari vd., 2022). 1324 cm^{-1}'de elde edilen pik için literatürde çok belirgin bir atama yapılmamış olmasına rağmen, literatürde 1371 cm^{-1} bölgesi genellikle CH_2 grubunun bükülme modlarına bağlanmaktadır (Chae ve Lee, 2025). Çalışmamızda da 1259 cm^{-1}'de gözlenen bandın bu bölgeye ait olabileceği düşünülmektedir (Selveraj vd., 2021). Diğer yandan 1043-1255 cm^{-1} bölgesinde gözlenen yoğun bantlar amin gruplarının C-N vibrasyonlarına işaret edebilmektedir. 1208 cm^{-1} spektrumunda gözlenen bant C-O-C gruplarına işaret edebilir (Shamala vd., 2009). 1148, 1081 ve 1055 cm^{-1}'de gözlenen piklerin çok benzer olmamakla beraber literatürde 1138-829 cm-1 aralığında absorpsiyon bantı veren C-O ve C-C gerilme titreşimi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Ansari ve Fatma, 2016). Verilerimizde gözlenen 1179 cm^{-1} piki de bu bölgenin dışında olmakla beraber, direk PHB karakteristiği gösteren bir pikle eşleşmemekte olup 1138 cm^{-1} sinyaline yakın bir bölge olarak düşünülebilir. 1016 cm^{-1}'deki pikin ester grubundaki C-O çift bağının gerilmesine işaret ettiği aynı çalışma ile FTIR verilerimizle birebir uyuşmaktadır (Roja vd., 2019).

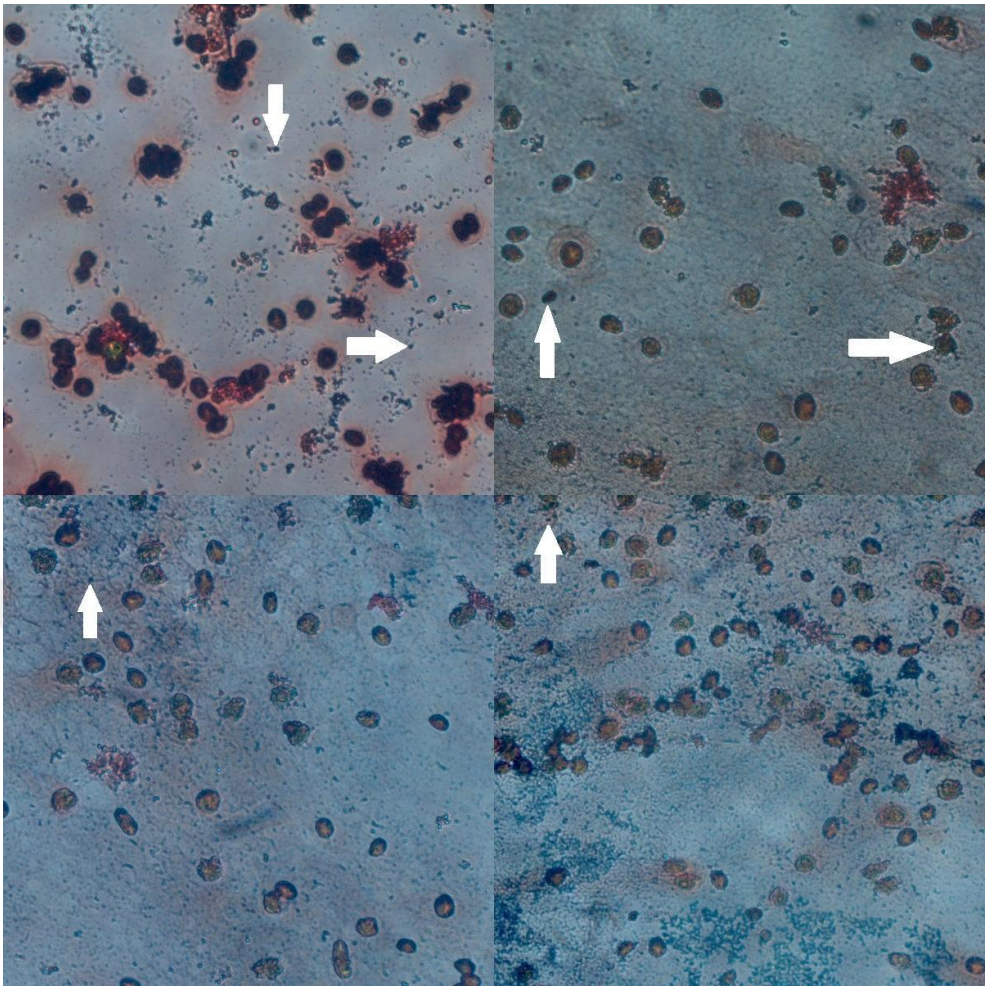
Sudan siyah B-Safranin O boyama

K. lunaris'de PHB üretimini gözlemleyebilmek için Sudan siyah B ve Safranin boyama tekniği kullanılmıştır. Bu boya, hücre içerisindeki granüllerin boyutu ve şekli gözemlenebildiği için biyopolimer araştırmalarında spesifik bir boya olarak kullanılmaktadır. *K. lunaris* için BG-11 besiyeri ortamında % 0, % 25, % 50, %75 ve % 100 azot stresi ortamı sağlanmış ve her durum için floresan mikroskop incelemeleri yapılmıştır ve Şekil 4.13'de sunulmuştur.

Siyah yuvarlak granüller PHB varlığını, pembe-kırmızı yapılar ise alg hücrelerini göstermektedir. Azot derişimi farklılığı uygulanan gruplarda PHB üretimi açısından önemli bir fark olup olmadığı açıkça söylenememekle beraber özellikle % 0 azot uygulanan grupta diğer gruplara kıyasla bol miktarda PHB granülü izlenmiştir.



Şekil 4.13. Farklı azot konsantrasyonlarında geliştirilen *K. lunaris* hücrelerinin Sudan siyah B – safranin boyası ile PHB varlığının analizi (A) % 0, (B) % 25, (C) % 50, (D) % 75, (E) % 100. Magnifikasyon: A = x20; B, C, D = x40; E = x100.



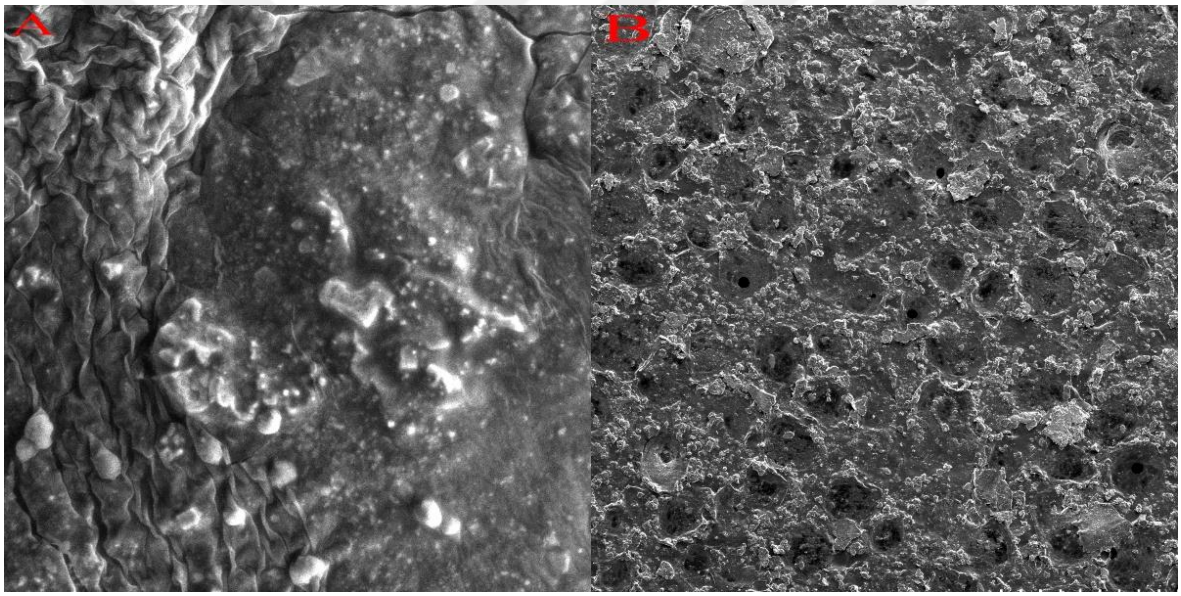
Şekil 4.14. *Chroococcus* sp. hücrelerinin Sudan siyah B – safranin boyası ile PHB varlığının analizi. Magnifikasyon: x40.

Chroococcus sp. için PHB varlığını araştırmada bu boya uygulanmıştır ancak siyanobakterilerde PHB üretimi oldukça az olmakta ve *K. lunaris* ile karşılaştırıldığında ışık mikroskobunda daha seyrek olarak görüntülemiştir (Şekil 4.14.).

Literatürde de bu boyama yöntemi çeşitli mikroorganizmaların PHB üretme yeteneğinin doğrulanmasında kullanılan mikroskobik bir yöntem olarak önerilmektedir (Narayanan vd., 2020; Legat vd., 2010).

4.2.4. SEM analiz sonuçları

Şekil 4.15., *K. lunaris* ve *Chroococcus* sp tarafından üretilen PHB yapısına ait karakteristik yüzey morfolojilerinin SEM görüntülerini göstermektedir. Literatürde de belirtildiği gibi PHB yüzeyi kristal yapısı nedeniyle doğal olarak kırılgan, sert, pürüzlü ve oldukça gözenekli bir formdadır (Mourão vd., 2021). *K. lunaris* PHB'sine ait SEM mikrografı sert, homojen olmayan ve pürüzlü bir şekilde izlenirken, *Chroococcus* sp.'ye ait resimler gözenekli ve iç içe geçmiş bir yapı şeklidedir. Şekillerde gözlenen yuvarlak yapıların PHB granülleri olduğu düşünülmektedir (Kamravamanesh vd., 2017).



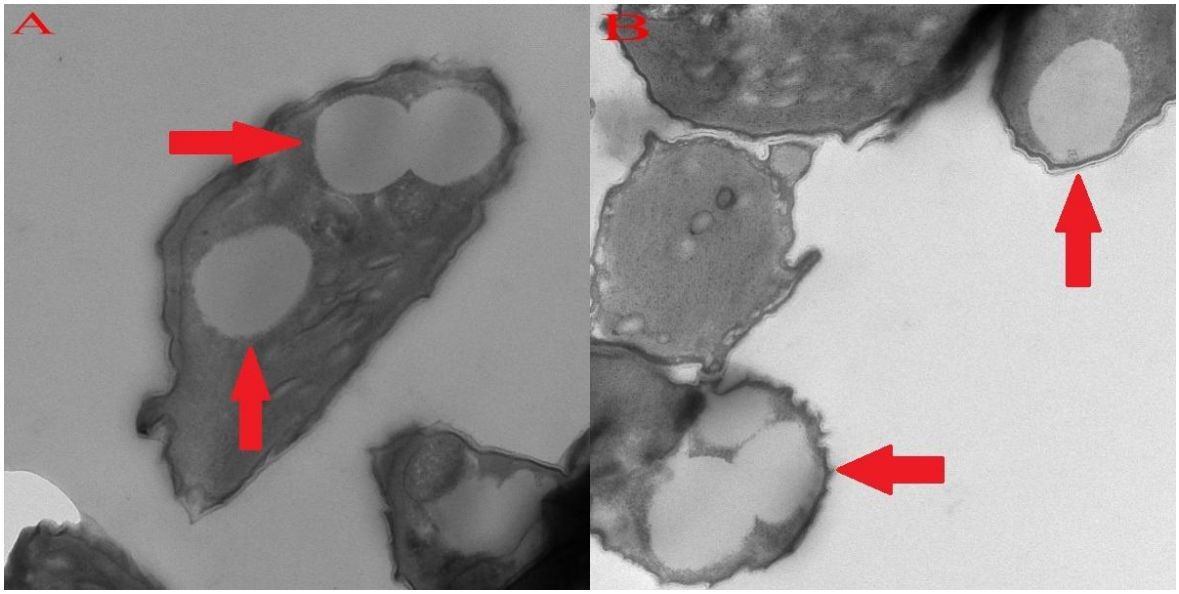
Şekil 4.15. *K. lunaris ve Chroococcus* sp.'nin SEM analiz sonuçları (A) *K. lunaris,* (B) *Chroococcus* sp.

4.2.5. TEM analiz sonuçları

4.2.5.1. *K. lunaris* TEM analiz sonuçları

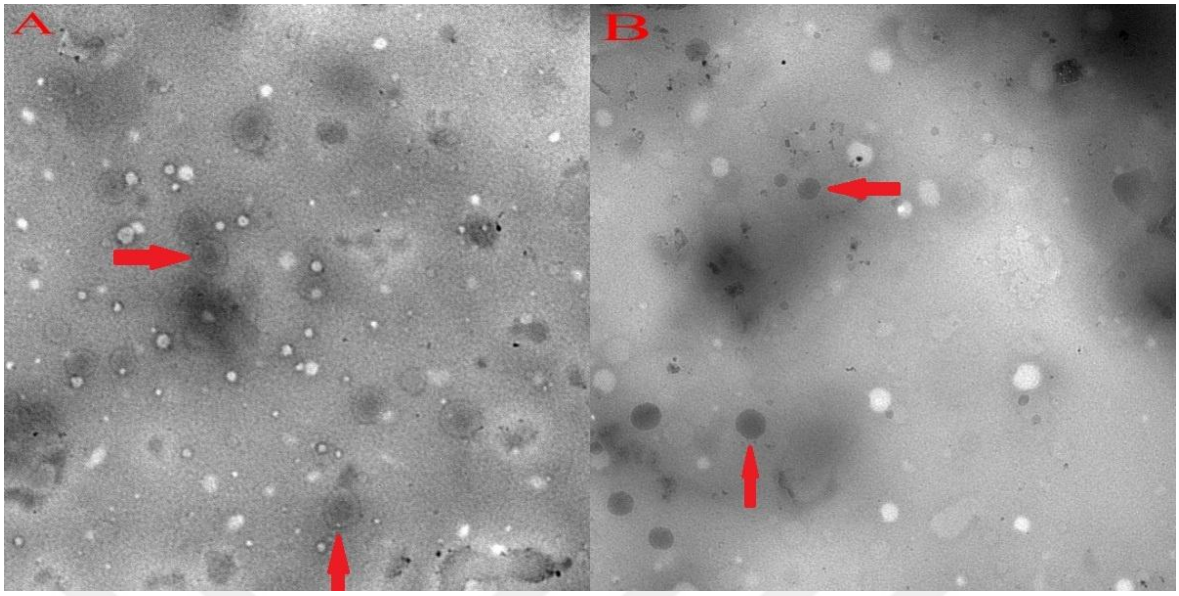
Hücre içerisindeki PHB'yi görüntülemek için uyguladığımız TEM prosedüründe kimyasal takip işlemi sonrası epoksi reçine içine gömülen hücreler bloklar haline getirilmiş

ve ultramikrotomda kesitleri alındıktan sonra boyanarak incelenmiştir. Şekil 4.16., *K. lunaris* mikroalgi için elde edilen TEM mikrografını göstermektedir. Hücre stoplazmasında beyaz inklüzyon cisimcikleri şeklinde olabilen bir ya da daha fazla PHB granülleri gözlenmiştir. Literatürde de benzer şekilde hücre stoplazmasında grimsi beyaz renkli büyük PHA granülleri rapor edilmekte ve özellikle nitrojen sınırlaması durumunda PHA içeriğinin arttığı bildirilmektedir (Higuchi-Takeuchi vd., 2016; Hempel vd., 2011). Çalışmamızda mikroalglere herhangi bir stres uygulaması yapılmamasına rağmen *K. lunaris* için gözlenen PHB granüllerinin oldukça büyük olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.16. *K. lunaris* hücreleri içerisindeki PHB granüllerinin TEM görüntüsü

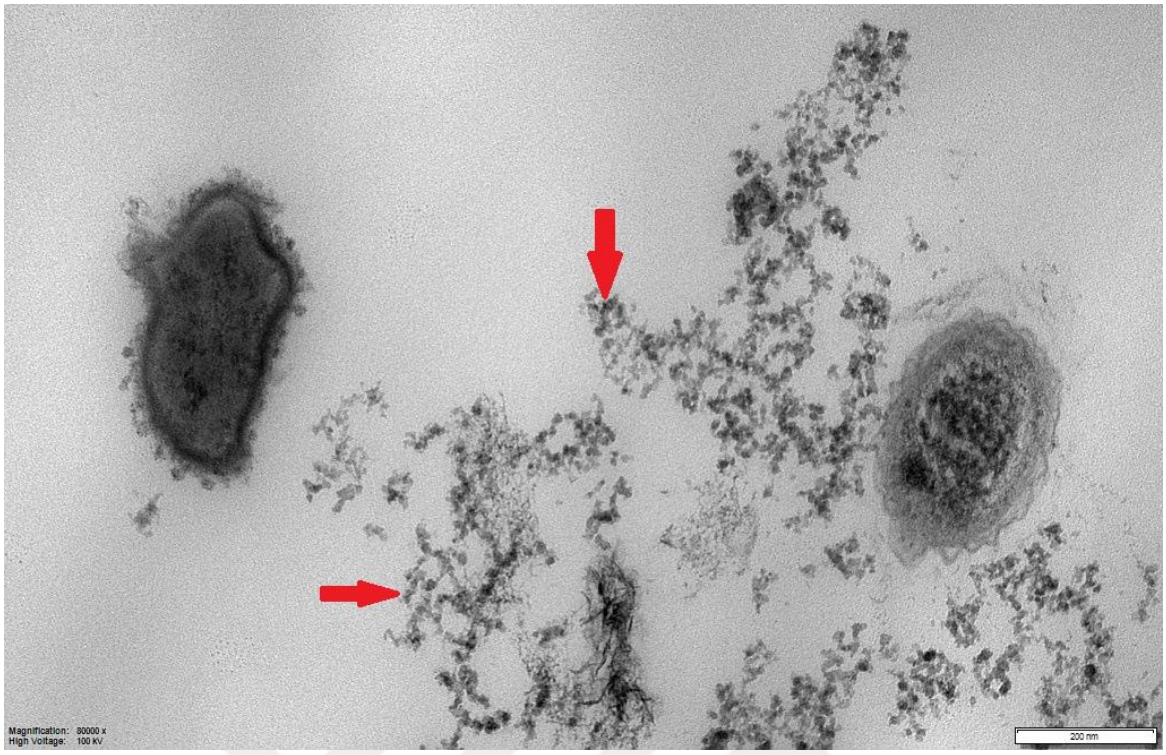
TEM ile yapılan diğer uygulamada, ekstrakte edilen PHB çözdürüldükten sonra bakır grid üzerine alınmış ve incelenmiştir. Veziküler yapılı granüller literatürle uyumlu olarak PHB varlığını desteklemektedir (Rosselgong vd., 2025), (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. *K. lunaris* hücrelerinden üretilen PHB'lerin TEM görüntüsü

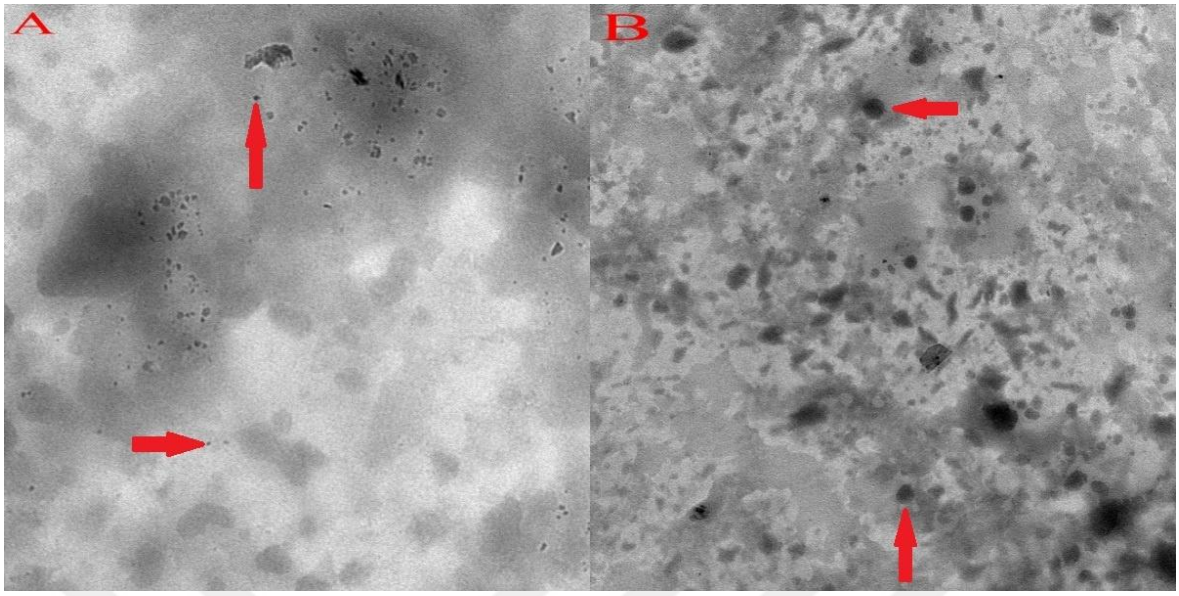
4.2.5.2. *Chroococcus* sp. TEM analiz sonuçları

Chroococcus sp. hücreleri içerisindeki PHB varlığını incelemek için aldığımız kesitlere ait temsilci görüntü Şekil 4.18.'de sunulmuştur. Burada PHB granülleri *K. lunaris*'te gözlendiği şekilde beyaz büyük granüller şeklinde izlenmemiştir ancak hücre içinde, yüzeyinde ya da hücre dışında beyaz, gri ya da siyah renklerde olabilen çok sayıda küçük veziküler yapılar izlenmiştir. Normal gelişim koşullarında bu türe ait PHB miktarının oldukça düşük olması sebebiyle sonuçların dikkatle yorumlanması gerekmektedir.



Şekil 4.18. *Chroococcus* sp.'dan alınan tam ince kesitte gözlenen veziküler yapılara ait TEM görüntüsü

TEM ile direkt olarak PHB incelemesinde ise örnek çözdürüldükten sonra bakır grid üzerine alınmış ve incelenmiştir. Veziküler yapılı küreler PHB varlığını desteklemektedir (Şekil 4.19.).



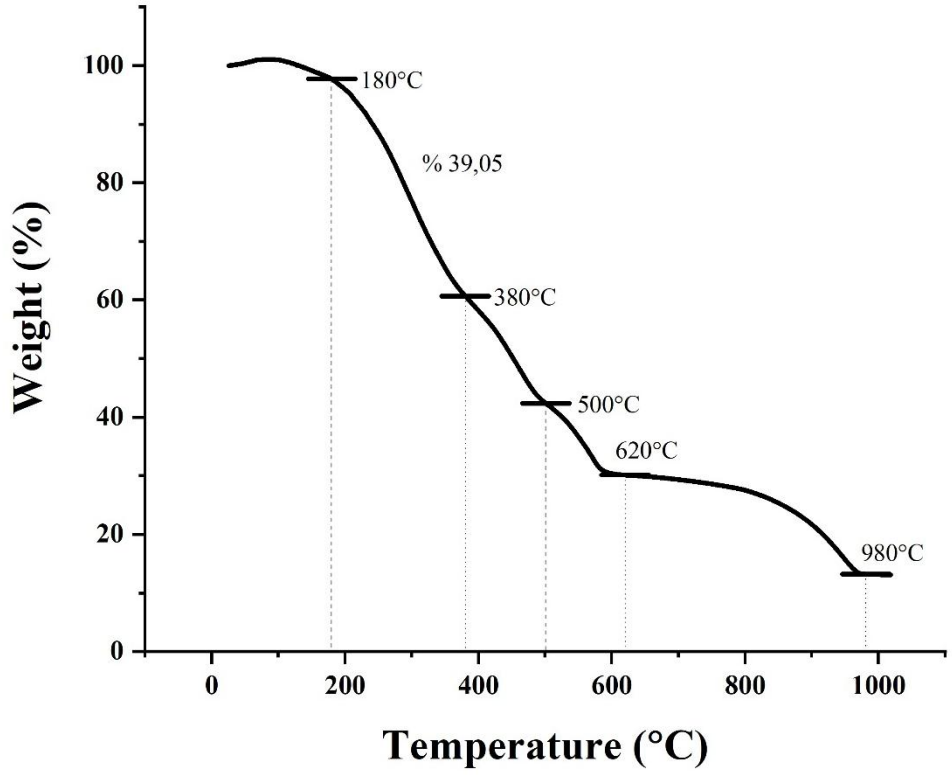
Şekil 4.19. *Chroococcus* sp.'den üretilen PHB granüllerinin TEM görüntüsü

4.2.6. Termal Analiz

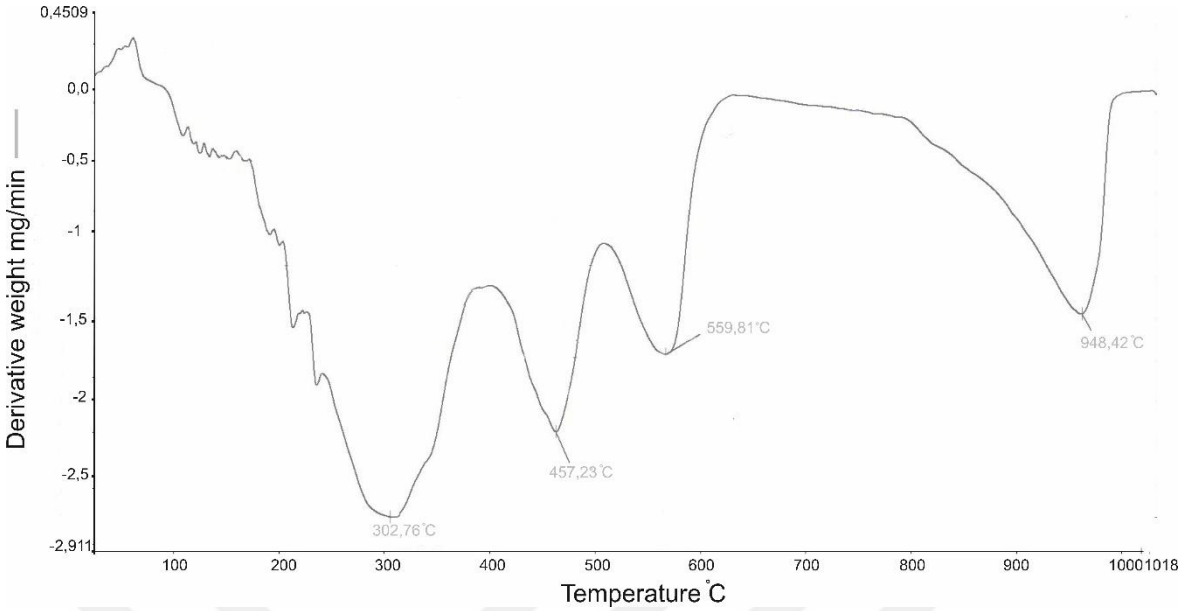
Her iki numunenin termal analizi için termogravimetrik analiz (TGA), differansiyel taramalı analiz (DTA) ve türev termogravimetri (DTG) eğrileri oluşturulmuş ve sonuçlar yorumlanmıştır. Bu analizler malzemenin ısıl kararlılığı, bileşimi ve bozunma mekanizması hakkında bilgi sağlamaktadır.

4.2.6.1. *K. lunaris* termal analiz sonuçları

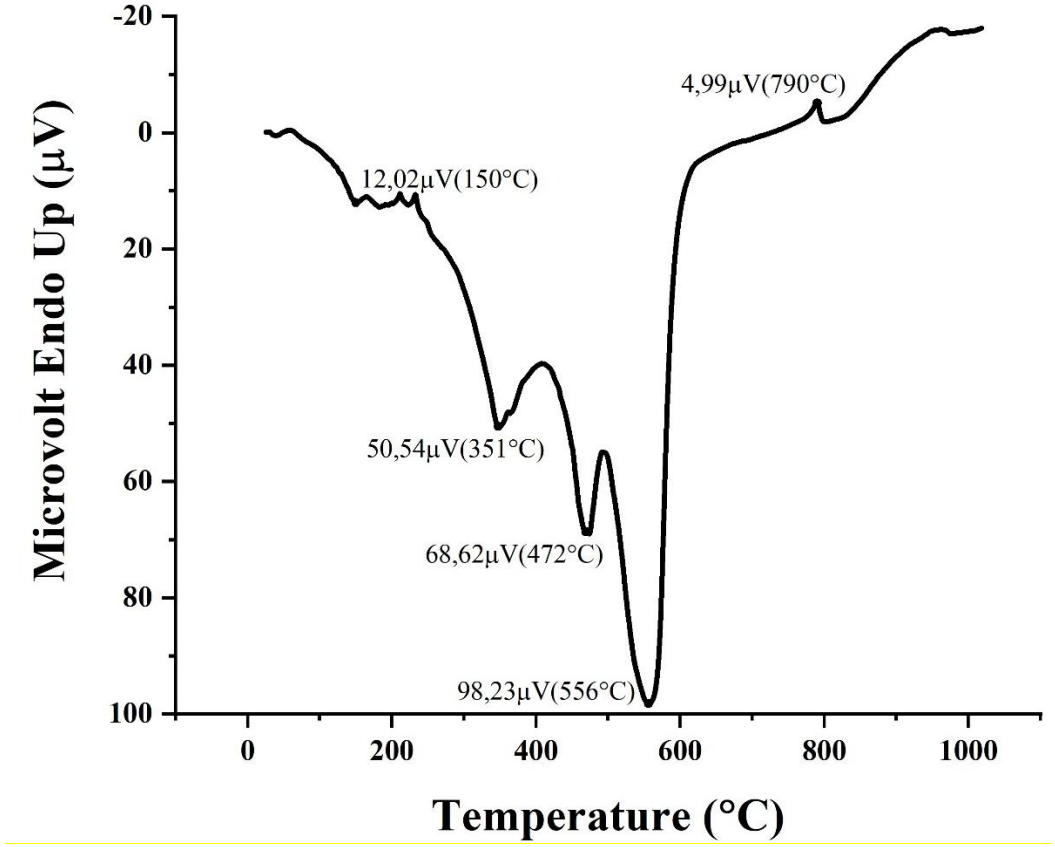
Şekil 4.20., Şekil 4.21., ve Şekil 4.22., *K. lunaris*'e ait termal analiz verilerini göstermektedir.



Şekil 4.20. *K. lunaris*'e ait TGA sonuçlarını içeren grafik



Şekil 4.21. *K. lunaris*'e ait DTG sonuçlarını içeren grafik



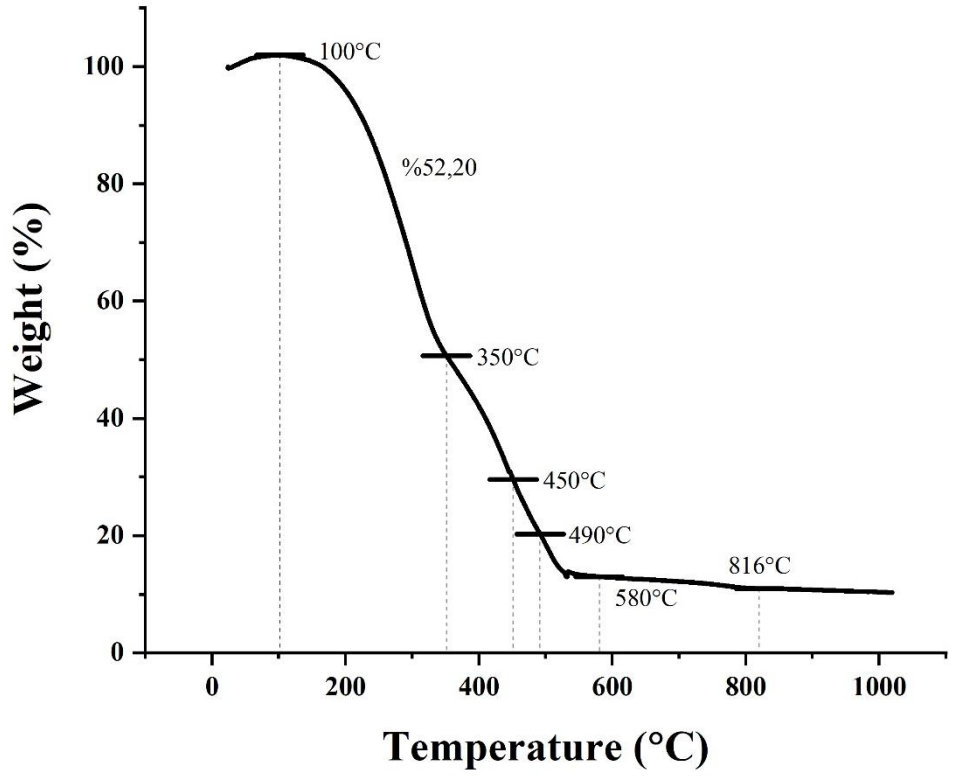
Şekil 4.22. *K. lunaris*'e ait DTA sonuçlarını içeren grafik

TGA eğrileri, biyokütle kökenli PHB'ler için tipik olan çok basamaklı termal bozunma davranışını sergilemiştir. Düşük sıcaklık aralığında (25–120 °C) gözlenen sınırlı kütle kaybı (% 2–3), fiziksel olarak absorbe olmuş su ve uçucu bileşenlerin uzaklaşmasını desteklemektedir. Bu değerlerin düşük olması, her iki numunenin de nispeten hidrofobik bir polimer matrisi içerdiğini ortaya koyabilir (Şekil 4.20).

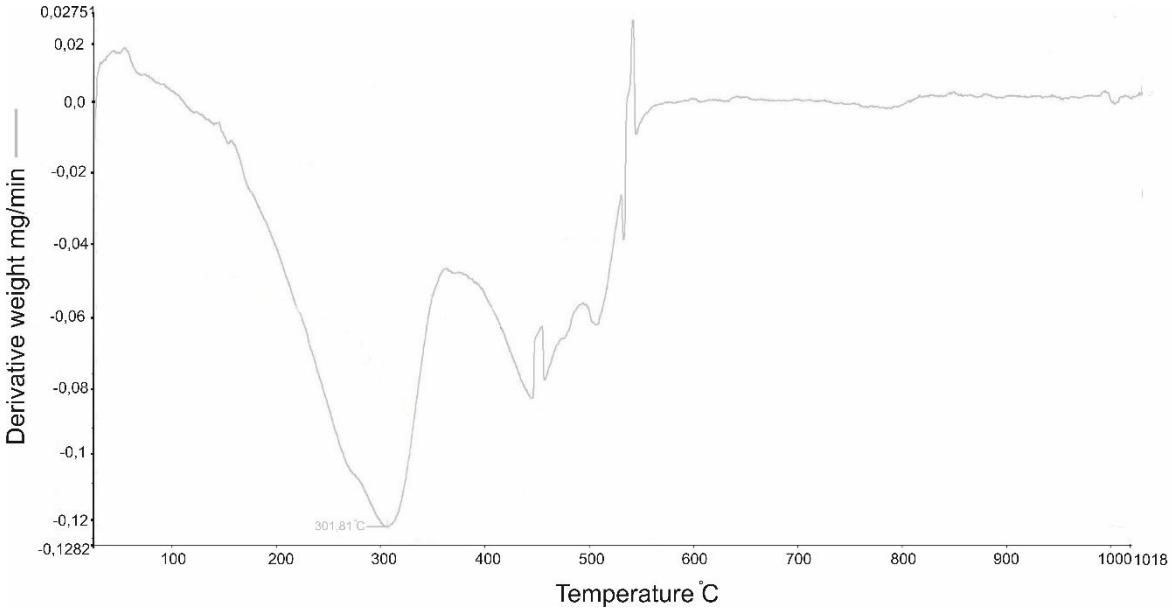
K. lunaris'e ait PHB'de ana bozunma basamağı yaklaşık 180–380 °C aralığında gerçekleşmiş ve bu basamakta toplam kütlenin yaklaşık % 39'u kaybedilmiştir (Şekil 4.20.). DTG eğrisinde maksimum bozunma hızının ~303 °C'de görülmesi, ester bağlarının termal olarak parçalanmasıyla ilişkili olabilir ve bu değer literatürde rapor edilen PHB bozunma sıcaklıklarıyla uyumludur (Şekil 4.21.). Bununla birlikte, ana bozunmayı takiben 380–500 °C (1), 500-620 °C (2) ve 620-980 °C (3) aralıklarında ek kütle kayıpları gözlenmiştir. Bu durum ortamda protein, pigment ve hücre duvarı kalıntıları gibi biyomatriks bileşenlerinin varlığına atfedilebilir. Yüksek sıcaklıklarda (980 °C üzeri) kalan yaklaşık % 13'lük kül fraksiyonu, *Kirchneriella* kökenli numunenin belirgin bir inorganik içerik taşıdığını ortaya koyar (Şekil 4.20.).

4.2.6.2. *Chroococcus* sp. termal analiz sonuçları

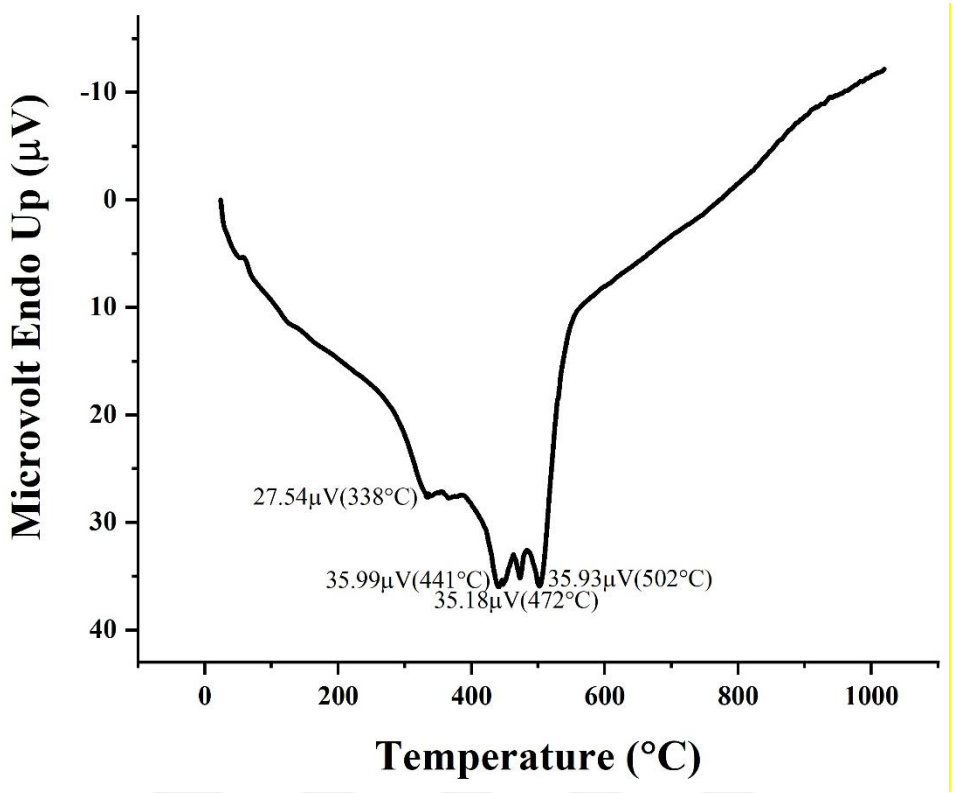
Şekil 4.23., Şekil 4.24. ve Şekil 4.25. *Chroococcus* sp.'ye ait termal analiz verilerini göstermektedir.



Şekil 4.23. *Chroococcus* sp.'ye ait TGA sonuçlarını içeren grafik



Şekil 4.24. *Chroococcus* sp.'ye ait DTG sonuçlarını içeren grafik



Şekil 4.25. *Chroococcus* sp.'ye ait DTA sonuçlarını içeren grafik

Chroococcus sp. kaynaklı PHB numunesi ise daha farklı bir termal profil sergilemiştir. Ana bozunma basamağında gerçekleşen kütle kaybı yaklaşık % 52 olup, yaklaşık aralıklar 100-350 °C (1) aralıklarındadır ve bu kaybın büyük ölçüde tek baskın basamakta yoğunlaştığı görülmüştür. Diğer kütle kayıplarının görüldüğü aralıklar 350-450 °C (2), 450-490 °C (3), 490-580 °C (4) ve 580-816 °C (5) olarak sıralanabilir (Şekil 4. 23.). DTG için maksimum değerin ~302 °C civarında olması, polimerin PHB karakterini doğrulamakta; ancak bozunmanın daha keskin ve yoğun gerçekleşmesi, numunede PHB oranının daha yüksek olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.24.). Yüksek sıcaklıklarda kalan kül miktarının yaklaşık % 11 olması ise *Chroococcus* kökenli PHB'nin *Kirchneriella* numunesine kıyasla daha saf olduğunu göstermektedir (Şekil 4. 23.).

Her iki mikroorganizma kaynaklı PHB numunesi karşılaştırıldığında, *K. lunaris*'e ait PHB'nin daha yüksek ana bozunma kütle kaybı, daha düşük kül oranı ve daha düzenli DSC erime davranışı sergilediği söylenebilir (Şekil 4.22.). Bu sonuçlar, *K. lunaris*'den elde edilen PHB'nin saflık ve homojenlik açısından siyanobakteriyel PHB'ye kıyasla daha avantajlı

olduğunu göstermektedir. Buna karşın, *Chroococcus* sp. numunesinde gözlenen daha belirgin çok basamaklı bozunma davranışı, biyokütle kalıntılarının polimer matrisi üzerinde daha güçlü bir etki yaptığını ortaya koymaktadır (Şekil 4.25.).

Daha önceki bir çalışmada *Chlorophyceae* familyasına ait iki mikroalg türü PHB üretimi için tanımlanmış, olumsuz koşullar altında yeşil alglerin kuru hücre ağırlıklarının % 20-50'sini lipid şeklinde biriktirdiği görülmüş ve bu türler PHB üreticisi olarak tanımlanmıştır (Selvaraj vd., 2021). Çalışmada güneş ışığı altında 30 ± 1 °C sıcaklıkta maksimum 2,01 g L^{-1} biyokütle verimi ve % 20 PHB içeriği rapor edilmiştir. FTIR verileri OH, C=O gerilmesi ve C-H bölgesinde büyük absorbsiyon pikleri göstermiş ve bu verilerin ortamda nitro bileşikler ve amin gruplarının varlığına işaret ettiği belirtilmiştir. TGA verileri, PHB'nin erime tepe noktasının 342,1 °C olduğunu ve bu sıcaklık aralığındaki toplam ağırlık kaybının % 98,5 olduğunu desteklemiştir (Selvaraj vd., 2021). Bu sonuçlar bulgularımızla tutarlılık gösterir.

Sonuç olarak, termal analiz sonuçları her iki numunenin de PHB karakteristiklerini taşıdığını doğrulamış; ancak termal davranışlardaki farklılıklar, mikroorganizma türüne bağlı olarak elde edilen polimerin saflık, kristallik ve biyomatriks etkileşimi açısından önemli ölçüde değişebildiğini göstermiştir. Bu bulgular, mikroalg ve siyanobakteri seçiminin biyolojik PHB üretiminde nihai polimer özelliklerini belirleyen kritik bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır.

Belirli mikroorganizmalar tarafından depolama bileşiği olarak üretilen ve biyolojik olarak % 100 parçalanabilen PHB, geleneksel plastiklere kıyasla cazip bir alternatiftir. Termoplastik özelliklere sahip olması, hidrofobikliği ve biyouyumluluğu dikkat çekici özelliklerindendir. Bakterilerin ürettiği PHB endüstriyel uygulamalarda yüksek maliyet gerektirdiği için sınırlı potansiyeldedir. Algler ise fotoototrofik özellikleri ve minimum besin tüketimiyle alternatif bir PHB kaynağı olabilir. Literatürde Spirulina gibi alglerin % 73 oranında PHB ürettiği rapor edilmektedir (Balaji vd., 2013).

Bu konuda yapılan bir çalışmada *Chlorophyceae* familyasına ait iki mikroalg türü PHB üretimi için tanımlanmış, olumsuz koşullar altında yeşil alglerin kuru hücre ağırlıklarının % 20-50'sini lipid şeklinde biriktirdiği görülmüş ve bu türler PHB üreticisi olarak tanımlanmıştır (Selvaraj vd., 2021). Çalışmada güneş ışığı altında 30±1 °C sıcaklıkta maksimum 2,01 g/L−1 biyokütle verimi ve % 20 PHB içeriği rapor edilmiştir. FTIR verileri OH, C=O gerilmesi ve C-H bölgesinde büyük absorbsiyon pikleri göstermiş ve bu verilerin ortamda nitro bileşikler ve amin gruplarının varlığına işaret ettiği belirtilmiştir. TGA verileri, PHB'nin erime tepe noktasının 342,1 °C olduğunu ve bu sıcaklık aralığındaki toplam ağırlık kaybının % 98,5 olduğunu desteklemiştir (Selvaraj vd., 2021). Diğer bir çalışmada ise *Chlorella fusca* LEB 111'de azot kısıtlaması ve ekzojen karbon kaynağı olarak D-ksiloz ilavesi ile PHB birikiminin indüklendiği rapor edilmiştir. Azot kaynağının azaltılması, hücresel büyüme ile karbon akışının PHB gibi depo polimerlerine yönlendirilmesini teşvik etmiş, D-ksiloz ilavesi ise özellikle düşük azot koşullarında, hücre içi PHB birikimini artıran tamamlayıcı bir faktör olarak ifade edilmiştir. Yazarlar maksimum PHB içeriğini büyümeden ziyade metabolik stres koşullarıyla ilişkilendirmiştir. Çalışma besin girdilerinin azaltılması ve düşük konsantrasyonlu ekzojen karbon kaynaklarının kullanımıyla, mikroalglerde PHB gibi biyoteknolojik değeri yüksek moleküllerin üretilebileceğini ortaya koymaktadır (Cassuriaga vd., 2023). Biyohidrojen üretiminden kaynaklanan hidrojenik atık kullanılarak, mixotrofik ve besin kısıtlı koşullar altında PHB üretiminin açıklandığı bir çalışmada azot ve fosfor kısıtlaması altında PHB üretimi iki aşamalı olarak gerçekleştirilmiş olup, mikroalglerin PHB'yi etkili bir karbon depolama ürünü olarak biriktirdiği ve bu yaklaşımın sürdürülebilir biyopolimer üretimi için umut verici olduğu belirtilmiştir (Thepsuthammarat vd., 2024). Bulgularımız literatürde mikroalglerden PHB üretiminin gerçekleştiği birçok çalışmayla paralellik göstermektedir (Shan, ve Salleh, 2025). Ancak çalışmamızda PHB üretimi için stres koşulları oluşturulmamış ve iki türün normal büyüme koşullarındaki üretim düzeyi araştırılmıştır.

Chlorella, Scenedesmus ya da *Coelastrella* gibi birçok mikroalg türü optimal büyüme koşullarında hücre içi metabolizmanın doğal bir parçası olarak düşük düzeyde PHB sentezleyebilir. Bu durum bazal PHB üretimi olarak değerlendirilir. Çünkü optimal koşullarda karbon öncelikle büyüme, protein sentezi ve hücresel bölünmeye yönlendirilir. PHB ise bir karbon ve enerji depolama polimeridir. Hücre stok yapma ihtiyacı hissetmediği için PHB sentez yolları aktifleşmez ya da çok sınırlı çalışır. Yani mikroalgler, stres

uygulanmaksızın bazal düzeyde PHB sentezleyebilse de, endüstriyel olarak anlamlı PHB birikimi genellikle besin kısıtlaması veya çevresel stres koşulları altında gerçekleşmektedir.

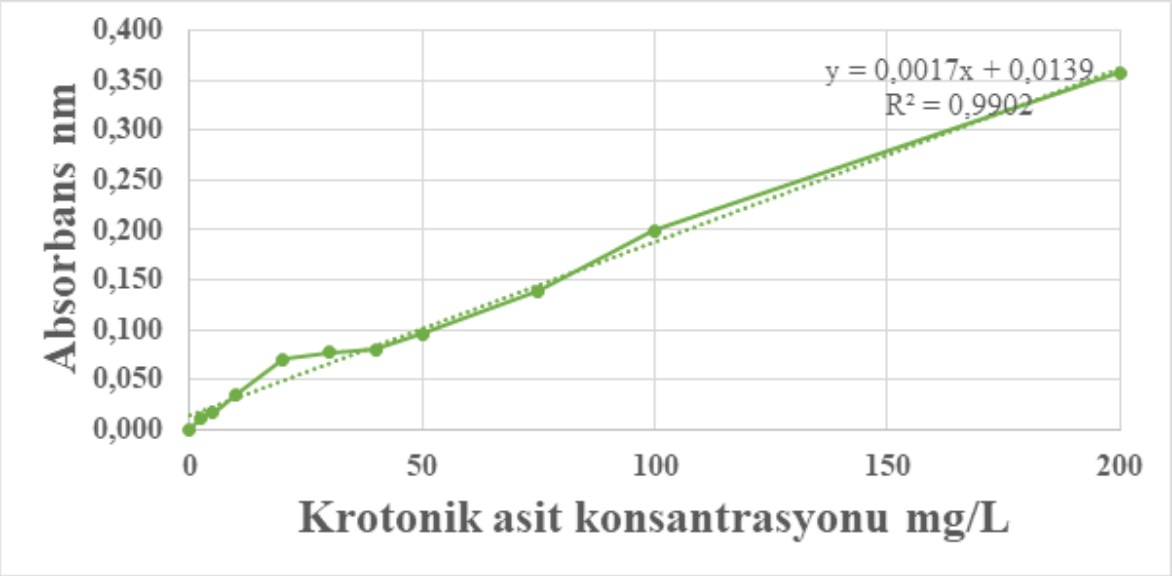
Bununla beraber 2025 tarihli bir çalışmada, filamentöz siyanobakteri *Nostoc* türü üzerinde genetik mühendislik uygulayarak azot açlığı gibi stres koşullarına bağımlı olmadan sürekli PHB üretimi sağlayan bir sistem geliştirmiştir. Bu sistemde, bakteri *Cupriavidus necator* H16'dan alınan PHB sentez operonunu ifade edecek şekilde modifiye edilmiştir ve mikroorganizma hem canlılığını koruyup hem de PHB sentezlemektedir; böylece klasik stres-bağımlı üretim zorunluluğu ortadan kaldırılmıştır (Fink vd., 2025).

Diğer bir yaklaşımda ise üretimin artırılması için ortama organik karbon veya alternatif bileşenler eklenir ve metabolik bir indükleme amaçlanır. Bu konuda yapılan bir çalışmada *Coelastrella* sp., *Ettlia texensis* ve *Pecatinodesmus* sp. mikroalglerinde azot ve fosfor stresi ve miksotrofik koşullar altında PHB birikiminin incelenmiştir. En yüksek PHB birikimi, *Coelastrella* sp.'de, azot ve fosforun sınırlandığı ve glikozun eklendiği koşullarda 72 saat sonunda 151.8 ± 12.1 μg/mg DCW olarak elde edilmiştir. İki aşamalı kültür stratejisi sayesinde, mikroalg büyümesi baskılanmadan yüksek bir PHB birikimi sağlanmıştır. Çalışma, bu üç mikroalg türünün sürdürülebilir PHB üretimi için potansiyel adaylar olduğunu desteklemektedir (Samadhiya vd., 2022).

4.3. Elde Edilen PHB'lerin Miktar Tayini

Krotonik asit standart eğrisi, PHB miktar tayini amacıyla 235 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometrik yöntem kullanılarak oluşturulmuştur. Bu kapsamda, krotonik asit çözeltileri 0-200 mg/L konsantrasyon aralığında hazırlanmış ve her konsantrasyon için absorbans değerleri blank düzeltilmesi yapılarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, krotonik asit konsantrasyonu ile absorbans arasında pozitif ve monoton bir ilişki olduğunu göstermiştir. Düşük konsantrasyon aralığında (≤10 mg/L) ölçülen absorbans değerlerinde, cihaz duyarlılığı ve sinyal/gürültü oranına bağlı olarak sınırlı sapmalar gözlenmiş olmakla birlikte, 20-200 mg/L aralığında belirgin bir doğrusal ilişki elde edilmiştir. Bu doğrusal aralık, kantitatif analizler için uygun kabul edilmiştir. Elde edilen standart eğri, Beer-

Lambert yasası ile uyumlu olup literatürde bildirilen krotonik asit bazlı PHB tayin yöntemleriyle karşılaştırıldığında benzer doğrusal aralık ve absorbans değerleri göstermektedir. Bu nedenle, oluşturulan standart eğrinin PHB miktar tayininde güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği değerlendirilmiştir (Şekil 4.26.).



Şekil 4.26. Krotonik asit 0-200 mg/L arası konsantrasyon grafiği

Krotonik asit standard eğrisi, 235 nm'de UV–Vis absorbans ölçümleri kullanılarak hazırlanmıştır. Standart çözeltiler 0–200 mg/L aralığında (0, 2,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 ve 200 mg/L) hazırlanmış ve her bir noktanın A235 değeri blank düzeltmesi sonrası kaydedilmiştir. Konsantrasyon ile absorbans arasında artan (monotonik) bir ilişki gözlenmiş ve 0–200 mg/L aralığında doğrusal regresyon analizi uygulanmıştır. Blank düzeltmesi nedeniyle regresyon orijinden geçecek şekilde modellenmiş ve

$$y = 0{,}0017x + 0{,}0139$$

$R^2 = 0{,}9902$ denklemi elde edilmiştir **(**$R^2 \approx 0{,}99$**).** Bu sonuç, ölçüm aralığında eğrinin yeterli doğrusallığa sahip olduğunu göstermektedir. Standart üst sınırını aşan örnekler için hesaplamalar doğrusal ekstrapolasyona dayandığından, bu örnekler 'aralık dışı tahmini değer' olarak raporlanmıştır.

*Chroococcus***,** *Kirchinella*'ya göre daha yüksek PHB (krotonik asit eşdeğeri) sinyali vermiştir. Oran olarak: 415,9 / 260,5 bu da 1,60 kat. *Chroococcus*'un PHB miktarı yaklaşık %60 daha fazla olarak hesaplandı.

Bu bulgular, eşit kütlede kullanılan PHB örneklerinin farklı alg türlerinden elde edilmesine bağlı olarak yapısal özellikler, polimer saflığı veya krotonik aside dönüşüm verimi açısından farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Elde edilen verilere göre *Chroococcus* sp.'den elde edilen PHB'nin krotonik asit eşdeğeri, *K. lunaris*'e kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, *Chroococcus* sp.'nin daha yüksek PHB içeriğine sahip olabileceğini veya uygulanan asidik dönüşüm koşulları altında daha etkin bir krotonik asit oluşumu sağladığını düşündürmektedir. Ancak bu farklılığın kesin kaynağının belirlenebilmesi için PHB'nin moleküler ağırlık dağılımı, saflık düzeyi ve monomerik kompozisyonunun ileri analitik yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir (Hiremanth vd., 2015; Salah Elsayed vd., 2013).

Aynı kütlede PHB örnekleri kullanılmış olmasına rağmen Chroococcus sp. ve Kirchinella sp. arasında farklı krotonik asit eşdeğer absorbanslarının elde edilmesi, PHB'nin türler arası yapısal ve fizikokimyasal özelliklerindeki farklılıklara işaret etmektedir. Literatürde, PHB'nin moleküler ağırlığı, polimerizasyon derecesi ve kristallik oranının mikroalg ve siyanobakteri türlerine bağlı olarak değişebildiği; bu yapısal farklılıkların asit hidrolizi sırasında krotonik aside dönüşüm verimini doğrudan etkilediği bildirilmektedir (Law ve Slepecky, 1961; Braunegg vd., 1978; Yu, 2007). Çalışmamızda, *Chroococcus* sp.'de gözlenen daha yüksek krotonik asit eşdeğeri, mutlak PHB miktarındaki bir artıştan ziyade, daha kısa zincir uzunluğu, daha düşük kristallik veya hidrolize daha duyarlı bir PHB fraksiyonunun varlığı ile ilişkili olabilir.

Ayrıca siyanobakterilere özgü hücre duvarı bileşenleri, pigmentler ve hücre içi biyopolimer matrisi, UV absorbans ölçümlerinde matriks etkisi oluşturarak 235 nm'de ölçülen sinyali artırabilmektedir. Bu durum, özellikle *Chroococcus* gibi pigment açısından zengin türlerde, krotonik asit eşdeğerinin göreceli olarak yüksek ölçülmesine katkı

sağlayabilmektedir (Li vd., 2003). Dolayısıyla elde edilen bulgular, *Chroococcus* sp.'nin *K. lunaris*'e kıyasla daha yüksek krotonik asit eşdeğeri sergilediğini, ancak bu farkın PHB'nin tür-spesifik yapısal özellikleri ve dönüşüm verimiyle ilişkili olduğunu göstermekte; sonuçların mutlak PHB miktarından ziyade dönüşüm davranışı ve polimer karakteri bağlamında değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

PHB, biyolojik olarak parçalanabilen bir polyester olup, geleneksel petrol bazlı plastiklere sürdürülebilir ve güvenli bir alternatif oluşturmaktadır. Mikrobiyal PHB, depolama molekülü olarak genellikle stres koşullarında birikir ve çoğu mikroorganizmada PHB üretimini indüklemek için azot, fosfor gibi besin sınırlamaları ya da diğer stres koşullarını kullanılır. Mikroalglerin fotosentez yaparak CO_2'yi doğrudan kullanma, hızlı büyüme ve yüksek biyokütle potansiyeli, tarım alanı ya da şeker gibi gıda hammaddesi kullanmama gibi kendine özgü avantajları, PHB üretiminde oldukça cazip bir alternatif oluşturur. Literatürdeki çalışmaların büyük çoğunluğu PHB üretimini besin stresine bağlı olarak araştırmaktadır. Bununla beraber stres koşulları uygulamak genellikle besin ortamının değiştirilmesini, kültür sürelerinin uzamasını ve fotobiyoreaktör sistemlerin düzenli kontrolünü gerektirir. Ayrıca azot veya fosfor yetersizliği gibi koşullar PHB üretimini artırırken, mikroalg büyümesini olumsuz etkilemektedir.

Bu tez çalışmasında, bir yeşil alg ve bir de siyanobakteri türünün PHB üretim potansiyeli stres faktörleri uygulanmadan araştırılmış ve bazal PHB sentez kapasiteleri incelenmiştir. Böylece mikroalglerin optimal büyüme koşullarındaki PHB üretim potanisyelinin incelenmesi, PHB üretiminin büyüme ile birlikte mi, yoksa yalnızca stresle mi tetiklendiğinin araştırılması ve stres faktörü olmadan PHB birikiminin türler arasında nasıl değiştiğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Her iki türe ait kültürlerin büyüme dinamikleri optik yoğunluk (OD_{680}, OD_{720} ve OD_{750}) ve gravimetrik ölçümlerle belirlendikten sonra, hücreler erken logaritmik fazda hasat edilmiş ve bu fazdaki PHB üretimleri izlenmiştir. *K. lunaris* için 1 g mikroalgden elde edilen PHB miktarı 0.1358 g/g iken (% 13.58 w/w), *Chroococcus* sp. için bu oran 0.0344 g/g biyokütle oranındadır (% 3.44 w/w). FTIR, TEM, SEM, floresan mikroskop, termal analiz verileri ile PHB yapısı detaylı olarak aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Elde edilen bulgular, *K. lunaris*'in optimal büyüme koşulları altında *Chroococcus* sp.'ye kıyasla daha yüksek PHB birikim kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bu sonuç,

PHB sentezinin yalnızca stres koşullarına özgü bir metabolik yanıt olmadığını, bazı mikroalg türlerinde büyüme ile eş zamanlı olarak da gerçekleşebildiğini ortaya koymaktadır. Özellikle yeşil alglerin stres gerektirmeden PHB üretebilmesi, bu grubu biyoplastik üretimi açısından daha sürdürülebilir ve endüstriyel olarak uygulanabilir bir biyolojik kaynak haline getirmektedir. Siyanobakteride gözlenen daha düşük bazal PHB düzeyi ise, bu organizmaların PHB sentezinin büyük ölçüde stres koşullarına bağımlı olabileceğini düşündürmektedir. Gelecek çalışmalarda yeşil alglerin PHB üretim potansiyelinin farklı kültür parametreleri altında detaylı olarak incelenmesi önerilmektedir. Ayrıca, stres içermeyen ve stresli koşulların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi, türlere özgü PHB birikim mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Metabolik yolakların ve ilgili enzimlerin moleküler düzeyde incelenmesi, yeşil alglerin neden daha yüksek bazal PHB ürettiğinin açıklanmasına olanak tanıyabilir. Stres gerektirmeden PHB üretimi gerçekleştirebilen mikroalg türlerinin ölçek büyütme ve sürekli kültür sistemlerinde değerlendirilmesi, biyoplastik üretiminin ekonomik ve çevresel sürdürülebilirliği açısından önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Ghosal, K., & Ghosh, S. (2023). Biodegradable polymers from lignocellulosic biomass and synthetic plastic waste: an emerging alternative for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 156, 100761. https://doi.org/10.1016/j.mser.2023.100761

Oliver-Cuenca, V., Salaris, V., Muñoz-Gimena, P. F., Agüero, Á., Peltzer, M. A., Montero, V., Arrieta, M. P., Sempere-Torregrosa, J., Pavon, C., Samper, M. D., Crespo, G. R., Kenny, J. M., López, D., & Peponi, L. (2024). Bio-Based and Biodegradable Polymeric Materials for a Circular Economy. *Polymers*, 16(21), 3015. https://doi.org/10.3390/polym16213015

Ayanoğlu M.A., Öztürk B.Y., & Dağ İ. (2025). *Biyoloji Alanında Uluslararası Araştırmalar-IV* 1. Cilt. *Siyanobakterilerden Polihidroksibütirat (PHB) Üretimi Nasıl Zenginleştirilir? Güçlükler, Yeni Gelişmeler ve Gelecek Perspektifler* (s. 155-171). Biyoloji Alanında Uluslararası Araştırmalar-IV, ISBN: 978-625-385-430-0, Eğitim Yayınevi

Yılmaz, M., & Beyatlı, Y. (2003). Biyoplastik: Poli-β-hidroksibütirat (PHB). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(9), 1-33.

MacArthur, E. (2017). Beyond plastic waste. *Science*, 358(6365), 843-843. DOI: 10.1126/science.aao6749

Abdo, S. M., & Ali, G. H. (2019). Analysis of polyhydroxybutrate and bioplastic production from microalgae. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-4. https://doi.org/10.1186/s42269-019-0135-5

Thielen, M. (2014). *Bioplastics: Plants and Crops Raw Materials Products*. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe eV (FNR) Agency for Renewable Resources.

Onen Cinar, S., Chong, Z. K., Kucuker, M. A., Wieczorek, N., Cengiz, U., & Kuchta, K (2020). Bioplastic production from microalgae: a review. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3842. https://doi.org/10.3390/ijerph17113842

Rahman, A., & Miller, C. D. (2017). Microalgae as a source of bioplastics. In *Algal green chemistry* (pp. 121-138). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00006-0

Aburas, M. M. A. (2016). Degradation of poly (3-hydroxybuthyrate) using Aspergillus oryzae obtained from uncultivated soil. *Life Sci J*, 13(3), 51-56.

Sreenikethanam, A., & Bajhaiya, A. (2021). Algae based bio-plastics: Future of green economy. *Biorefineries-Sel. Process*, 9, 77-89.

Pal, P., Chew, K. W., Yen, H. W., Lim, J. W., Lam, M. K., & Show, P. L. (2019). Cultivation of oily microalgae for the production of third-generation biofuels. *Sustainability*, 11(19), 5424. https://doi.org/10.3390/su11195424

KAYNAKLAR DİZİNİ

Musa, M., Ayoko, G. A., Ward, A., Rösch, C., Brown, R. J., & Rainey, T. J. (2019). Factors affecting microalgae production for biofuels and the potentials of chemometric methods in assessing and optimizing productivity. *Cells*, 8(8), 851. https://doi.org/10.3390/cells8080851

Maniglia, B. C., Tessaro, L., Ramos, A. P., & Tapia-Blácido, D. R. (2019). Which plasticizer is suitable for films based on babassu starch isolated by different methods?. *Food Hydrocolloids*, 89, 143-152. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.038

Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., & Bhowmick, T. K. (2018). Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food and bioproducts processing*, 110, 60-84. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002

Zhang, F., Endo, T., Kitagawa, R., Kabeya, H., & Hirotsu, T. (2000). Synthesis and characterization of a novel blend of polypropylene with Chlorella. *Journal of Materials Chemistry*, 10(12), 2666-2672. https://doi.org/10.1039/B004489J

Amaro, H. M., Malcata, F. X., & Sousa-Pinto, I. (2014). Production and Supply Logistics of Microalgae as an Energy Feedstock. *Sustainable Bioenergy Production*, 148-167.

Kartik, A., Akhil, D., Lakshmi, D., Gopinath, K. P., Arun, J., Sivaramakrishnan, R., & Pugazhendhi, A. (2021). A critical review on production of biopolymers from algae biomass and their applications. *Bioresource Technology*, 329, 124868. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124868

Ciapponi, R., Turri, S., & Levi, M. (2019). Mechanical reinforcement by microalgal biofiller in novel thermoplastic biocompounds from plasticized gluten. *Materials*, 12(9), 1476. https://doi.org/10.3390/ma12091476

Steinbruch, E., Drabik, D., Epstein, M., Ghosh, S., Prabhu, M. S., Gozin, M., Kribus, A., & Golberg, A. (2020). Hydrothermal processing of a green seaweed Ulva sp. for the production of monosaccharides, polyhydroxyalkanoates, and hydrochar. *Bioresource Technology*, 318, 124263. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124263

Flórez-Fernández, N., López-García, M., González-Muñoz, M. J., Vilariño, J. M. L., & Domínguez, H. (2017). Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from Sargassum muticum. *Journal of Applied Phycology*, 29, 1553-1561. https://doi.org/10.1007/s10811-016-1043-9

Das, M., & Maiti, S. K. (2021). Recent progress and challenges in cyanobacterial autotrophic production of polyhydroxybutyrate (PHB), a bioplastic. Journal of *Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105379. https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105379

KAYNAKLAR DİZİNİ

Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). A review on production of poly β hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. *Algal Research*, 2(3), 278-285. https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.03.002

Chen, G. Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry. *Chemical society reviews*, 38(8), 2434-2446. https://doi.org/10.1039/B812677C

Falcone, D. B. (2004). Biodegradable plastic in the environment M. Sc (Doctoral dissertation, Thesis, UFSCar, Sao Paulo, Brazil).

Abd El-malek, F., Khairy, H., Farag, A., & Omar, S. (2020). The sustainability of microbial bioplastics, production and applications. *International journal of biological macromolecules*, 157, 319-328. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.076

Jabeen, N., Majid, I., & Nayik, G. A. (2015). Bioplastics and food packaging: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1117749. https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1117749

Candamano, S., Frontera, P., Macario, A., & Crea, F. (2017). Effect of commercial LTA type zeolite inclusion in properties of structural epoxy adhesive. *Advanced Science Letters*, 23(6), 5927-5930.

Alammar, A., Park, S. H., Ibrahim, I., Arun, D., Holtzl, T., Dumée, L. F., Lim, H. N., & Szekely, G. (2020). Architecting neonicotinoid-scavenging nanocomposite hydrogels for environmental remediation. *Applied Materials Today*, 21, 100878. https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100878

Van der Hoek, J. P., de Fooij, H., & Struker, A. (2016). Wastewater as a resource: Strategies to recover resources from Amsterdam's wastewater. *Resources, Conservation and Recycling*, 113, 53-64. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2016.05.012

Jogi, K., & Bhat, R. (2020). Valorization of food processing wastes and by-products for bioplastic production. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 18, 100326. https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100326

Rajpoot, A. S., Choudhary, T., Chelladurai, H., Verma, T. N., & Shende, V. (2022). A comprehensive review on bioplastic production from microalgae. Materials Today: *Proceedings*, 56, 171-178. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.01.060

Chauhan, K., Kaur, R., & Chauhan, I. (2024). Sustainable bioplastic: a comprehensive review on sources, methods, advantages, and applications of bioplastics. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 63(8), 913-938. https://doi.org/10.1080/25740881.2024.2307369

KAYNAKLAR DİZİNİ

Mourão, M. M., Gradíssimo, D. G., Santos, A. V., Schneider, M. P. C., Faustino, S. M. M., Vasconcelos, V., & Xavier, L. P. (2020). Optimization of polyhydroxybutyrate production by amazonian microalga Stigeoclonium sp. B23. Biomolecules, 10(12), 1628. https://doi.org/10.3390/biom10121628

García, G., Sosa-Hernández, J. E., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacarías, C., Iqbal, H., & Parra-Saldívar, R. (2020). Accumulation of PHA in the microalgae *Scenedesmus* sp. under nutrient-deficient conditions. Polymers, 13(1), 131. https://doi.org/10.3390/polym13010131

Roja, K., Sudhakar, D. R., Anto, S., & Mathimani, T. (2019). Extraction and characterization of polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. *Biocatal Agric Biotechnol* 22: 101358. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101358

Costa, S. S., Miranda, A. L., de Jesus Assis, D., Souza, C. O., de Morais, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2018). Efficacy of Spirulina sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. *Algal research*, 33, 231-238. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.05.016

Rippka, R. (1988). [1] Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods in enzymology*, 167, 3-27. https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67004-2

Çiğdem, U., (2024), *Siyanobakteri aracılı gümüş nanopartiküllerin tekli ve ikili Candida albicans ve Staphylococcus aureus biyofilmleri üzerine in vitro etkilerinin araştırılması* [Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü].

Yılmaz Öztürk, B., Dağlıoğlu, Y., Tezcan Ün, Ü., & Dağ, İ. D. İ. R. İ. S. (2025). Phycoremediation potential with ultrastructural and biochemical response of Kirchneriella lunaris to metribuzin. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 22(9), 8195-8210. https://doi.org/10.1007/s13762-024-06217-z

Ozturk, B. Y., Asikkutlu, B., Akkoz, C., & Atici, T. (2019). Molecular and morphological characterization of several cyanobacteria and Chlorophyta species isolated from lakes in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19(8), 635-643. DOI: 10.4194/1303-2712-v19_8_01

Zuliani, L., Frison, N., Jelic, A., Fatone, F., Bolzonella, D., & Ballottari, M. (2016). Microalgae cultivation on anaerobic digestate of municipal wastewater, sewage sludge and agro-waste. *International journal of molecular sciences*, 17(10), 1692. https://doi.org/10.3390/ijms17101692

Nascimento, I. A., Marques, S. S. I., Cabanelas, I. T. D., Pereira, S. A., Druzian, J. I., de Souza, C. O., Vich, D. V., de Carvalho, G. C., Nascimento, M. A. (2013). Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. *Bioenergy research*, 6(1), 1-13. https://doi.org/10.1007/s12155-012-9222-2

KAYNAKLAR DİZİNİ

Rana, Q. U. A., Latif, S., Perveen, S., Haq, A., Ali, S., Irfan, M., Gauttam, R., Shah, T. A., Dawoud, T. M., Wondmie, G. F., Bourhia, M., Badshah, M. (2024). Utilization of microalgae for agricultural runoff remediation and sustainable biofuel production through an integrated biorefinery approach. *Bioresources and Bioprocessing*, 11(1), 8. https://doi.org/10.1186/s40643-023-00720-w

Płaczek, M., Błasiak, A., & Witczak, S. (2025). Harvesting Baltic Microalgae Chlorella vulgaris BA-167 Using Coagulant Flokor 1.2 A via Static Sedimentation Under Auto-and Targeted Flocculation. *Applied Sciences*, 15(2), 949. https://doi.org/10.3390/app15020949

Burdon, K. L. (1946). Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. *Journal of bacteriology*, 52(6), 665-678.

Wei, Y. H., Chen, W. C., Huang, C. K., Wu, H. S., Sun, Y. M., Lo, C. W., & Janarthanan, O. M. (2011). Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *International journal of molecular sciences*, *12*(1), 252-265. https://doi.org/10.3390/ijms12010252

Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A., Maiti, S. K., Dutta, B. C., Singh, H., & Das, D. (2019). A low-cost and scalable process for harvesting microalgae using commercial-grade flocculant. *RSC advances*, 9(67), 39011-39024. DOI: 10.1039/C9RA08072D

Danis, O., Ogan, A., Tatlican, P., Attar, A., Cakmakci, E., Mertoglu, B., & Birbir, M. (2015). Preparation of poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery. Extremophiles, 19(2), 515-524. https://doi.org/10.1007/s00792-015-0735-4

Yapıcı, M., Gürsu, B. Y., & Dağ, İ. (2021). In vitro antibiofilm efficacy of farnesol against Candida species. *International Microbiology*, 24(2), 251-262. https://doi.org/10.1007/s10123-021-00162-4

Arora, Y., Sharma, S., & Sharma, V. (2023). Microalgae in bioplastic production: a comprehensive review. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 48(6), 7225-7241. https://doi.org/10.1007/s13369-023-07871-0

Gopi, K., Balaji, S., & Muthuvelan, B. (2014). Isolation purification and screening of biodegradable polymer PHB producing cyanobacteria from marine and fresh water resources. *Iranica Journal of Energy & Environment*, 5(1). DOI: 10.5829/idosi.ijee.2014.05.01.14

Shamala, T. R., Divyashree, M. S., Davis, R., Kumari, K. L., Vijayendra, S. V. N., & Raj, B. (2009). Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. *Indian journal of microbiology*, 49(3), 251-258. https://doi.org/10.1007/s12088-009-0031-z

KAYNAKLAR DİZİNİ

Selvaraj, K., Vishvanathan, N., & Dhandapani, R. (2021). Screening, optimization and characterization of poly hydroxy butyrate from fresh water microalgal isolates. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 139-162. https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1926621

Omar, H. H., Aly, M. M., Al-Malki, W. J., & Balkhair, K. S. (2016). Production and enhancement of poly-β-hydroxybutyrate in cyanobacteria. *Main Group Chemistry*, 15(2), 153-161. https://doi.org/10.3233/MGC-150194

Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PloS one*, 11(6), e0158168. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158168

Doppler, P., Gasser, C., Kriechbaum, R., Ferizi, A., & Spadiut, O. (2021). In Situ Quantification of polyhydroxybutyrate in photobioreactor cultivations of Synechocystis sp. using an ultrasound-enhanced ATR-FTIR spectroscopy probe. *Bioengineering*, 8(9), 129. https://doi.org/10.3390/bioengineering8090129

Chae, Y. J., & Lee, T. G. (2025). Controlled biodegradability of polyhydroxybutyrate via surface coating with cellulose triacetate. *Scientific reports*, 15(1), 25776. https://doi.org/10.1038/s41598-025-10782-9

Ramezani, M., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2015). Screening and comparative assay of poly-hydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly-β-hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium *Oceanimonas* sp. GK1. *Annals of microbiology,* 65(1), 517-526. https://doi.org/10.1007/s13213-014-0887-y

Roja, K., Sudhakar, D. R., Anto, S., & Mathimani, T. (2019). Extraction and characterization of polyhydroxyalkanoates from marine green alga and cyanobacteria. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 22, 101358. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101358

Kumari, P., Kiran, B. R., & Mohan, S. V. (2022). Polyhydroxybutyrate production by *Chlorella sorokiniana* SVMIICT8 under nutrient-deprived mixotrophy. *Bioresource Technology*, 354, 127135. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127135

Prescott, G. W. (2008). Algae of the western Great Lakes area. *Otto Koeltz Science Publishers*, 977 p. In: Germany

Wilmotte, A., & Herdman, M. (2001). Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume One: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria, 487-493.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Ali, P., Fucich, D., Shah, A. A., Hasan, F., & Chen, F. (2021). Cryopreservation of cyanobacteria and eukaryotic microalgae using exopolysaccharide extracted from a glacier bacterium. *Microorganisms*, 9(2), 395. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020395

Pozzobon, V., Levasseur, W., & Camarena-Bernard, C. (2024). Chlorella vulgaris cold preservation (4∘ C) as a means to stabilize biomass for bioreactor inoculation: A six-month study. *Aquacultural Engineering*, *107*, 102449. https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2024.102449

Mirza, S. S., Yaseen, K., Aslam, S., Fatima, A., Morowvat, M. H., Ishaque, A., & Fatima, K. (2026). Exploration of Polyhydroxybutyrate (PHB) Production Potential of Photosynthetic Microbes: A Sustainable Source of Bioplastic. *Recent Patents on Biotechnology*, 20(1), 122-138. doi: 10.2174/0118722083295143241220054012

Nirmala, N., Arun, J., Palanisamy, S., Ravindran, R. E., Abbas, M., Kalathil, S., & Rahman, M. Z. (2025). Integrated biodiesel and biopolymer production from *Nannochloropsis* biomass: a closed-loop biorefinery approach. RSC advances, 15(50), 42513-42521. DOI: 10.1039/D5RA02952J

Zhila, N. O., Kiselev, E. G., Shishatskaya, E. I., Ghorabe, F. D., Kazachenko, A. S., & Volova, T. G. (2025). Comparative study of the synthesis of polyhydroxyalkanoates by cyanobacteria *Spirulina platensis* and green microalga *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 85, 103826. https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103826

Higuchi-Takeuchi, M., Morisaki, K., Toyooka, K., & Numata, K. (2016). Synthesis of high-molecular-weight polyhydroxyalkanoates by marine photosynthetic purple bacteria. *Plos one*, 11(8), e0160981. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160981

Hempel, F., Bozarth, A. S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A., & Maier, U. G. (2011). Microalgae as bioreactors for bioplastic production. *Microbial cell factories*, 10(1), 81. https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-81

Rosselgong, J., Dhaini, A., Rochedy, M., Bravo-Anaya, L. M., Carpentier, J. F., & Guillaume, S. M. (2025). Poly (β-hydroxyalkanoate)/polymethacrylate self-assembled architectures by ring-opening polymerization (ROP)/reversible addition–fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization and polymerization-induced self-assembly (PISA). *Polymer Chemistry*, 16(10), 1162-1175. DOI: 10.1039/D4PY01447B

Mourão, M. M., Xavier, L. P., Urbatzka, R., Figueiroa, L. B., Costa, C. E. F. D., Dias, C. G. B. T., Schneider, M. P. C., Vasconcelos, V., & Santos, A. V. (2021). Characterization and biotechnological potential of intracellular polyhydroxybutyrate by Stigeoclonium sp. B23 using cassava peel as carbon source. *Polymers*, 13(5), 687. https://doi.org/10.3390/polym13050687

KAYNAKLAR DİZİNİ

Kamravamanesh, D., Pflügl, S., Nischkauer, W., Limbeck, A., Lackner, M., & Herwig, C. (2017). Photosynthetic poly-β-hydroxybutyrate accumulation in unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6714. *AMB express*, 7(1), 143. https://doi.org/10.1186/s13568-017-0443-9

Narayanan, M., Kandasamy, S., Kumarasamy, S., Gnanavel, K., Ranganathan, M., & Kandasamy, G. (2020). Screening of polyhydroxybutyrate producing indigenous bacteria from polluted lake soil. *Heliyon*, 6(10). DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05381

Legat, A., Gruber, C., Zangger, K., Wanner, G., & Stan-Lotter, H. (2010). Identification of polyhydroxyalkanoates in Halococcus and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 1119-1127. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2611-6

Schagerl, M., Siedler, R., Konopáčová, E., & Ali, S. S. (2022). Estimating biomass and vitality of microalgae for monitoring cultures: A roadmap for reliable measurements. *Cells*, 11(15), 2455. https://doi.org/10.3390/cells11152455

Frampton, D. M., Gurney, R. H., Dunstan, G. A., Clementson, L. A., Toifl, M. C., Pollard, C. B., Burn, S., Jameson, I. D., & Blackburn, S. I. (2013). Evaluation of growth, nutrient utilization and production of bioproducts by a wastewater-isolated microalga. *Bioresource technology*, 130, 261-268. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.001

Sahoo, C. R., Maharana, S., Mandhata, C. P., Bishoyi, A. K., Paidesetty, S. K., & Padhy, R. N. (2020). Biogenic silver nanoparticle synthesis with cyanobacterium Chroococcus minutus isolated from Baliharachandi sea-mouth, Odisha, and in vitro antibacterial activity. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(6), 1580-1586. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.03.020

Hasenklever, D., Pohlentz, J. C., Berwanger, T., Kokarakis, E. J., Hassan, T., Schipper, K., Matuszyńska, A., Axmann, I. M., & Ducat, D. C. (2024). Assembly and Quantification of Co-Cultures Combining Heterotrophic Yeast with Phototrophic Sugar-Secreting Cyanobacteria. *Journal of Visualized Experiments* (JoVE), (214), e67311. DOI:10.3791/67311

Billi, D., Fernandez, B. G., Fagliarone, C., Chiavarini, S., & Rothschild, L. J. (2021). Exploiting a perchlorate-tolerant desert cyanobacterium to support bacterial growth for in situ resource utilization on Mars. *International Journal of Astrobiology*, 20(1), 29-35. https://doi.org/10.1017/S1473550420000300

Chioccioli, M., Hankamer, B., & Ross, I. L. (2014). Flow cytometry pulse width data enables rapid and sensitive estimation of biomass dry weight in the microalgae Chlamydomonas reinhardtii and Chlorella vulgaris. *PloS one*, 9(5), e97269. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097269

KAYNAKLAR DİZİNİ

Havlik, I., Beutel, S., Scheper, T., & Reardon, K. F. (2022). On-line monitoring of biological parameters in microalgal bioprocesses using optical methods. *Energies*, 15(3), 875. https://doi.org/10.3390/en15030875

Hiremanth, L., Narendra Kumar, S., Ravishankar, H. N., Angadi, S., & Sukanya, P. (2015). Design, Screening and Microbial Synthesis of Bio-polymers of Polyhydroxybutyrate from low cost carbon sources. International Journal of Advanced Research, 3(2), 420-425.

Salah Elsayed, N., Mabrouk Aboulwafa, M., Aboshanab, K. M., & Hassouna, N. (2013). PHB production in Azomonas, Acinteobacter and Bacillus species: isolation, screening and identification. Archives of clinical microbiology.

Samadhiya, K., Ghosh, A., Nogueira, R., & Bala, K. (2022). Newly isolated native microalgal strains producing polyhydroxybutyrate and energy storage precursors simultaneously: targeting microalgal biorefinery. *Algal Research*, 62, 102625. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102625

Fink, P., Menzel, C., Kwon, J. H., & Forchhammer, K. (2025). A novel recombinant PHB production platform in filamentous cyanobacteria avoiding nitrogen starvation while preserving cell viability. *Microbial Cell Factories*, 24(1), 43. https://doi.org/10.1186/s12934-025-02650-y

Shan, L. M., & Salleh, K. M. (2025). An overview on microalgal polyhydroxybutyrate (PHB) production and improvement of mechanical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146056. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.146056

Thepsuthammarat, K., Imai, T., Plangklang, P., Sittijunda, S., & Reungsang, A. (2024). Two-step polyhydroxybutyrate production from hydrogenic effluent by freshwater microalgae *Coelastrella* sp. KKU-P1 and Acutodesmus sp. KKU-P2 under mixotrophic cultivation. *Heliyon*, 10(17). DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e37261

Cassuriaga, A. P. A., Moraes, L., Morais, M. G., & Costa, J. A. V. (2023). Use of exogenous substrate in Chlorella cultivation: Strategy for biomass and polyhydroxybutyrate production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 231, 123193. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123193

Selvaraj, K., Vishvanathan, N., & Dhandapani, R. (2021). Screening, optimization and characterization of poly hydroxy butyrate from fresh water microalgal isolates. *International Journal of Biobased Plastics*, 3(1), 139-162. https://doi.org/10.1080/24759651.2021.1926621

Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1961). Assay of poly-β-hydroxybutyric acid. *Journal of bacteriology*, 82(1), 33-36. https://doi.org/10.1128/jb.82.1.33-36.1961

KAYNAKLAR DİZİNİ

Braunegg, G., Sonnleitner, B. Y., & Lafferty, R. M. (1978). A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 6(1), 29-37. https://doi.org/10.1007/BF00500854

Yu, J. (2007). Microbial production of bioplastics from renewable resources. *In Bioprocessing for value-added products from renewable resources* (pp. 585-610). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-044452114-9/50024-4

Li, S. D., He, J. D., Yu, P. H., & Cheung, M. K. (2003). Thermal degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) as studied by TG, TG–FTIR, and Py–GC/MS. *Journal of applied polymer science*, 89(6), 1530-1536. https://doi.org/10.1002/app.12249

GUIRY, M. D. (2010). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National university of Ireland, Galway. *http://www. algaebase. org/.*

Wang, M., Liu, Y., Cai, Y., Song, Y., Yin, Y., & Gong, L. (2024). Inhibition of nitrate accumulation in vegetable by Chroococcus sp. and related mechanisms. *Rhizosphere, 31*, 100934. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100934