

**BACILLUS SUŞU KULLANILARAK KISA ZİNCİR UZUNLUĞUNDA (SCL)
POLİHİDROKSİALKANOAT (PHA) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
KOLLAJEN İLE FORMÜLASYONU**

Müşerref YILMAZ

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2020

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No. 1807S262).

ÖZET

BACILLUS SUŞU KULLANILARAK KISA ZİNCİR UZUNLUĞUNDA (SCL) POLİHİDROKSİALKANOAT (PHA) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE KOLLAJEN İLE FORMÜLASYONU

Müşerref YILMAZ

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Plastik yapımında kullanılan birçok farklı kimyasal grubun son derece toksik olduğu ve çevre için ciddi bir tehdit oluşturduğu bilinmektedir. Bu amaçla biyosentetik ve biyobozunur biyopolimerler, bu özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir.

Polihidroksialkanoatlar (PHA), besin sınırlayıcı koşullarda hücre içi karbon ve enerji depo maddesi olarak birçok mikroorganizma tarafından sentezlenebilir. PHA'ları kimyasal olarak sentezlemek oldukça zor olduğundan, mikroorganizmalar, bu polimerin yüksek saflıkta üretilmesi için önemli bir kaynak olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde ilaç taşınmasında ortaya çıkan sorunları azaltmak için yeni teknolojilerden faydalanılmaktadır. Fizyolojik koşullarda biyoyumlu ve biyobozunabilir polimerler ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde biyobozunur olmayan polimerlere göre daha fazla tercih edilmektedir.

Bu çalışmada, kısa zincir uzunluğundaki polihidroksialkanoat (scl-PHA)'ın gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus cereus* suşu kullanılarak sentezlenmesi, saflaştırılması ve bu ürünün denizanası kollajeni (jellyfish collagen) ile formüle edilerek yara iyi edici sistemlerin hazırlanmasında kullanılması amaçlanmıştır. Hazırlanan sistemlerin ise, fizikokimyasal karakterizasyonu değerlendirilmiş ve HaCaT keratinosit hücre hattı üzerinde etkileri araştırılmış.

Anahtar Sözcükler: *Polihidroksialkanoat (PHA), scl-PHA, Bacillus cereus, İlaç taşıyıcı sistem, Kollajen*

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF SHORT CHAIN LENGTH (SCL) POLYHYDROXYALKANOATE (PHA) FROM BACILLUS AND FORMULATION OF IT WITH COLLAGEN

Müşerref YILMAZ

Department of Advance Technologies

Programme in Biotechnology

Anadolu University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, August 2020

Supervisor: Assoc. Prof. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

It is known that many different chemical groups used in the construction of plastics are extremely toxic and be a serious threat to the environment. Nowadays, with increasing concern, biosynthetic and biodegradable biopolymers are of great interest due to their properties.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) can be synthesized by many microorganisms as intracellular carbon and energy storage material in nutrient limiting conditions. Since chemically synthesizing of PHAs is quite difficult, microorganisms are used as an important source for the production of this polymer in high purity.

Today, new technologies are being exploited to reduce the problems of drug delivery. In physiological conditions, biocompatible and biodegradable polymers are more preferred over non-biodegradable polymers in the development of drug delivery systems.

In this study, it is aimed to synthesize, purify the short chain length polyhydroxyalkanoate (Scl-PHA) using *Bacillus cereus* strain, a gram-positive bacterium, and use this product in the preparation of wound healing systems by formulating it with jellyfish collagen. The physicochemical characterization of the prepared systems has been evaluated and the effects on the HaCaT keratinocyte cell line have been investigated.

Keywords: *Polyhydroxybutyrate (PHB), scl-PHA, Bacillus cereus, Drug delivery systems, Collagen*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca çalışmalarımın her aşamasında destek olan ve yardımlarını esirgemeyen, değerli bilgi ve tecrübelerini paylaştan tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her konuda deneyimlerinden yararlandığım, hücre kültürü çalışmalarımda hem teorikte hem de uygulamada elinden gelen yardımı esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Behiye ŞENEL'e

Yüksek lisans eğitimim sırasında bizlere her türlü laboratuvar imkânlarını sunan Farmasötik Teknoloji Bölümü Hocalarım, Prof. Dr. Yasemin YAZANA, Prof. Dr. Müzeyyen Demirel'e, Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIM-LIOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Alper ÖZTÜRK'e,

Yüksek lisans döneminin bana kattığı ve bana her konuda destek veren, ihtiyacım olan her anda yardımlarını esirgemeyen dostlarım Uzm.Ecz. Rasim MASİMOV, Uzm.Ecz. Serdar ALAGÖZ ve Zülfiye JAFAROVA'ya,

Tez çalışmamızda kullanılan *R.pulmo* denizanası kollajenini izolasyonu ve saflaştırmasını gerçekleştiren Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyomühendislik bölümünden sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'a,

Lisans dönemimden beri hayatımdaki tüm süreçlerde yanımda olan, iyi ve kötü her koşulda beni destekleyen ve yol gösteren hem yüksek lisans hem de ev arkadaşım olan değerli dostum Burcu Latife ARSLAN'a,

Hayatımdaki her anda bana güvenen, destek olan ve beni her konuda cesaretlendirip motive eden çok değerli arkadaşım Semih ÇAĞLI'ya

Her koşulda yanımda olan, maddi ve manevi her konuda beni destekleyen sevgili AİLEME,

Yüksek lisans tezimin TÜBİTAK 2210-c yurt içi öncelikli alanlar kapsamına dahil edilmesiyle birlikte, almış olduğum proje burs desteği için TÜBİTAK kurumuna,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

Müşerref YILMAZ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Müşerref YILMAZ

İÇİNDEKİLER

SAYFA

BAŞLIK SAYFASI	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Polihidroksialkanoatlar (PHA).....	4
2.2. Polihidroksialkanoatların Yapısı ve Özellikleri.....	6
2.2.1. PHA granüllerinin yapısı	6
2.2.2. Kimyasal özellikleri	8
2.2.3. Fiziksel ve mekanik özellikleri.....	9
2.2.3.1. Kısa zincir uzunluğundaki polihidroksialkanoatların (scl- PHA) fiziksel özellikleri.....	10
2.2.4. Polihidroksialkanoatların biyouyumluluğu	11
2.2.5. Polihidroksialkanoatların biyobozunurluğu	12
2.3. Polihidroksialkanoatların Sentez Yolu	13
2.4. Bakterilerde PHA Üretimi	16
2.4.1. PHA üretiminde kullanılan karbon kaynakları.....	17
2.4.2. PHA üretiminde kullanılan mikroorganizmalar	17
2.4.2.1. Bacillus cinsi bakterilerde PHA üretimi	18
2.5. Polihidroksialkanoatların Mikrobiyal Hücrelerden Ekstraksiyonu.....	19
2.5.1. Solvent ekstraksiyon yöntemi	20

2.5.2.	Sindirim yöntemi.....	21
2.5.2.1.	Kimyasal sindirim	21
2.5.2.2.	Enzimatik sindirim.....	22
2.5.3.	Mekanik bozulma	22
2.5.4.	Süperkritik sıvı ile ekstraksiyon	23
2.5.5.	Hücre kırılabilirliği.....	23
2.6.	Polihidroksialkanoatların Uygulama Alanları.....	26
2.6.1.	Polihidroksialkanoatların medikal uygulamaları.....	27
2.7.	Yara İyileşme Süreci ve Kollajen	32
2.7.1.	Yara iyileşme süreci.....	33
2.7.2.	Kollajen.....	37
2.8.	İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	40
2.8.1.	Kollicoat.....	43
2.8.2.	Polietilen glikol (PEG)	43
2.8.3.	Eudragit	44
3.	GEREÇLER.....	45
3.1.	Kullanılan Maddeler.....	45
3.2.	Kullanılan Cihazlar	47
4.	YÖNTEM.....	48
4.1.	<i>Bacillus cereus</i> İçin Büyüme Ortamı ve PHA Üretimi İçin Kültür Koşulları.....	48
4.1.1.	<i>Bacillus cereus</i> 'un canlandırılması.....	48
4.1.2.	Gram boyama.....	50
4.1.3.	<i>Bacillus cereus</i> 'un üretimi.....	51
4.1.4.	PHB üretimi için sınırlayıcı besiyerleri	51
4.2.	Kloroform (CHCl ₃) ve Sodyum Hipoklorit (NaClO) Dispersiyonunu Kullanılarak PHB Ekstraksiyonu.....	54
4.2.1.	PHB veriminin hesaplanması	55
4.3.	Kollajenin Miktar Tayini	55
4.4.	Kollajen Yüklü PHB Formülasyonlarının Hazırlanması.....	58
4.4.1.	PHB emdirilmiş liyofilize kollajen disklerinin oluşturulması.....	58

4.4.2. Emülsiyon yöntemiyle kollajen yüklü PHB filmlerinin oluşturulması	60
4.5. Kollajenin Sistemlerden <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları	61
4.6. Kollajenin SDS-PAGE Jel Elektroforezi	62
4.6.1. SDS-PAGE jelinin hazırlanması.....	64
4.6.2. SDS-PAGE için protein örneklerinin hazırlanması	65
4.6.3. Proteinin jelde belirlenmesi	66
4.7. Hücre Kültürü.....	67
4.7.1. Sitotoksikite çalışmaları.....	67
4.8. Karakterizasyon Çalışmaları.....	69
4.8.1. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi	69
4.8.2. Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi.....	69
4.8.3. X-ışını kırınımı (XRD) analizi	69
4.8.4. Fourier dönüşümü infrared spektrometresi (FTIR) analizi	69
4.8.5. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi analizi	70
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	71
5.1. <i>Bacillus cereus</i> 'un Canlandırılması ve Saflığının Doğrulanması	71
5.2. <i>Bacillus cereus</i> 'un Ön Kültür Koşulları ve Besin Sınırlayıcı Koşullarda PHA Üretimi.....	72
5.3. Kloroform (CHCl ₃) ve Sodyum Hipoklorit (NaClO) Dispersiyonunu Kullanılarak PHA Ekstraksiyonu ve PHA Eldesi.....	72
5.4. Bradford Yöntemi Kullanılarak Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması	76
5.5. Kollajen Yüklü PHB Formülasyonlarının Hazırlanma Çalışmaları	78
5.5.1. KD ve KD-PHB formülasyonları.....	79
5.5.2. F-PHB ve KF-PHB formülasyonları.....	80
5.6. Kollajen Yüklü PHB Formülasyonlarının <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	81
5.6.1. KD ve KD-PHB formülasyonların salım profili.....	81
5.6.2. KF-PHB formülasyonlarının salım profili	84
5.7. SDS-PAGE Çalışması	85
5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	88

5.8.1.	KD ve KD-PHB formülasyonlarının sitotoksisite değerleri.....	88
5.8.2.	F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarının sitotoksisite değerleri	89
5.9.	Karakterizasyon Çalışmaları.....	91
5.9.1.	Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi.....	91
5.9.2.	Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi.....	100
5.9.3.	X-ışını kırınımı (XRD) analizi	104
5.9.4.	Fourier dönüşümü infrared spektrometresi (FTIR) analizi	105
5.9.5.	Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi analizi	112
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	117
	KAYNAKÇA	119
	ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. R gruplarına göre PHA'ların adlandırılması.....	9
Tablo 2.2. PHA kopolimerlerinin mekanik özelliklerinin ortak plastiklerle karşılaştırılması	11
Tablo 2.3. PHA sentezinde görev alan enzimler.....	16
Tablo 2.4. Çeşitli mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını kullanarak ürettikleri homopolimer ve kopolimer türleri	18
Tablo 2.5. Çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin sonuçları.....	24
Tablo 2.6. Ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	25
Tablo 2.7. Çeşitli ilaçların farklı ilaç taşıyıcı sistem formları için kullanılan PHA'lar	28
Tablo 2.8. Yara iyileşme süreci.....	37
Tablo 4.1. Besiyeri içerikleri.....	48
Tablo 4.2. 1. Sınırlayıcı besiyeri içeriği.....	52
Tablo 4.3. 2. Sınırlayıcı besiyeri içeriği	53
Tablo 4.4. PBS tamponu için gerekli bileşenler.....	56
Tablo 4.5. 1-10 µg aralığı için 100 µg/mL konsantrasyonundaki BSA stok çözeltisinin PBS ile seyreltme oranları	57
Tablo 4.6. 10-100 µg aralığı için 1 mg/mL konsantrasyonundaki BSA stok çözeltisinin PBS ile seyreltme oranları	58
Tablo 4.7. Oluşturulan disklerin kollajen ve PHB içerikleri.....	59
Tablo 4.8. PHB ve Kollajen kullanılarak hazırlanan formüllasyonların isimlendirilmesi.....	61
Tablo 4.9. Salım profilinde kullanılan KD-PHB, KD ve KF-PHB sistemlerinin miktarı ve içerikleri.....	62
Tablo 4.10. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler	64
Tablo 5.1. Liyofilize hücre kütleleri	72
Tablo 5.2. Liyofilize hücrelerin kuru hücre ağırlıkları ve verim değerleri	74
Tablo 5.3. Oluşan PHA miktarları	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. PHA'ların tarihsel gelişimi.....	6
Şekil 2.2. PHA granüllerinin transmisyon elektron mikroskobu ile görüntülenmesi.....	7
Şekil 2.3. PHA granülü üzerindeki granül-ilişkili proteinlerin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4. Polihidroksialkanoatların genel yapısı	8
Şekil 2.5. PHA'ların yaşam döngüsü.....	13
Şekil 2.6. PHA biyosentez yolları.....	15
Şekil 2.7. PHA'nın geri kazanım yöntemleri	20
Şekil 2.8. PHA'ların potansiyel uygulamaları	26
Şekil 2.9. Fazin içeren PHA nanopartiküller ile hedef proteinlerin ayrılması	29
Şekil 2.10. Ligand-PhaP-PHA bazlı spesifik ilaç dağıtım sistemi	30
Şekil 2.11. Deri katmanlarının şematik görüntüsü	34
Şekil 2.12. Yara onarımının klasik aşamaları.....	36
Şekil 2.13. Kollajen proteininin organizasyonu	38
Şekil 2.14. Fibrilleri oluşturmak üzere düzenlenmiş, bireysel üçlü sarmallar veya tropokollajen molekülleri.....	39
Şekil 2.15. Geleneksel salım sisteminden ve kontrollü salım sisteminden salınan plazmadaki ilaç seviyeleri	42
Şekil 4.1. Çözücü buharlaştırmalı emülsiyon hazırlama yöntemi ile kollajen yüklü PHB filmlerinin hazırlanmasının şematik gösterimi.....	61
Şekil 5.1. Gram boyama sonucu gözlemlenen <i>Bacillus cereus</i> suşu.....	71
Şekil 5.2. Farklı sınırlayıcı besiyerlerinde üretilmiş ve % 30'luk hipoklorit çözeltisi ve kloroform eklenmiş bakteri lizatları.....	73
Şekil 5.3. Kloroform-sodyum hipoklorit yönteminde santrifüj sonrası gözlemlenen faz ayrımları.....	74
Şekil 5.4. Soğuk etanol yardımıyla çöktürülen polimerler.	75
Şekil 5.5. 1-10 µg konsantrasyon aralığındaki Bradford reaktifi eklenmiş protein çözeltilerindeki renk değişimleri.....	77
Şekil 5.6. 10-100 µg konsantrasyon aralığındaki Bradford reaktifi eklenmiş protein çözeltilerindeki renk değişimleri	77
Şekil 5.7. 1-10 µg konsantrasyon aralığı için kalibrasyon grafiği.....	78
Şekil 5.8. 10-100 µg konsantrasyon aralığı için kalibrasyon grafiği.....	78

Şekil 5.9. Liyofilize kollajen diskleri	80
Şekil 5.10. Emülsiyon yöntemiyle hazırlanan film formülasyonları.....	81
Şekil 5.11. KD ve KD-PHB formülasyonlarının 12 haftalık zaman dilimi içindeki genel salım profili	82
Şekil 5.12. KD ve KD-PHB formülasyonlarından salınan kollajenin zamana göre dağılımı	83
Şekil 5.13. KF-PHB formülasyonlarının salım profili	84
Şekil 5.14. Proteinlerin molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan marker	85
Şekil 5.15. Kollajen, KD ve KD-PHB salım örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü	87
Şekil 5.16. Kollajen ve KF-PHB salım örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü.	87
Şekil 5.17. KD ve KD-PHB formülasyonlarının HaCat hücre hattında 72. saatteki sitotoksite değerleri.....	88
Şekil 5.18. F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarının HaCat hücre hattında 72. saatteki sitotoksite değerleri.....	90
Şekil 5.19. Referans PHB (PHB-İ)'nin SEM görüntüleri	92
Şekil 5.20. PHB-M'ye ait çeşitli kesitlerin SEM görüntüleri.....	94
Şekil 5.21. Denizanası kollajenin farklı kesitlerdeki SEM görüntüleri	95
Şekil 5.22. KD diskinin SEM görüntüleri	96
Şekil 5.23. KD-PHB diskinin SEM görüntüleri	97
Şekil 5.24. F-PHB filminin SEM görüntüleri.....	98
Şekil 5.25. KF-PHB filminin SEM görüntüleri.....	99
Şekil 5.26. DSC grafikleri	101
Şekil 5.27. Kollajen, PHB-M, KD ve KD-PHB formülasyonlarına ait DSC termogramları.....	103
Şekil 5.28. Kollajen, PHB-M, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarına ait DSC termogramları.....	104
Şekil 5.29. PHB-M'nin XRD kırınım diyagramı	105
Şekil 5.30. PHB-İ: Referans polimer, PHB-M: Ekstre edilen polimer için FTIR spektrumları	107
Şekil 5.31. Kollajen, PHB-M, KD ve KD-PHB formülasyonlarına ait FTIR spektrumları	109
Şekil 5.32. Kollajen, PHB-M, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarına ait FTIR spektrumları	111

Şekil 5.33. PHB-İ: Referans polimer, PHB-M: Ekstre edilen polimeriğin ^1H NMR spektrumları	113
Şekil 5.34. PHB'nin kimyasal formülü	113
Şekil 5.35. Kollajen, PHB-M, KD ve KD-PHB formülasyonlarına ait ^1H NMR spektrumları	115
Şekil 5.36. Kollajen, PHB-M, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarına ait ^1H NMR spektrumları	116



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3HA	: 3-hidroksialkanoat
3HAME	: 3-hidroksialkanoat metil ester
3HB	: 3-hidroksibütirik asit
3HBME	: R-3-hidroksibütirat metil ester
3HV	: 3-hidroksivalerik asit
4hbD	: 4-hidroksibutirat dehidrojenaz
ATPS	: Aqueous two phase system (Sulu iki fazlı sistem)
CM	: Curcumin (Kurkumin)
COL	: Collagen (Kollajen)
CPE	: <i>Coccinia grandis</i> ekstratı
D407	: Retinal pigment epiteli hücre hattı
DSC	: Differential Scanning Calorimeter Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ECM	: Extracellular Matrix (Hücre dışı matris)
EGF	: Epidermal growth factor (Epidermal büyüme faktörü)
EPT	: Eliptikinin
FGF	: Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spectrometry Fourier Dönüşümü İnfrared Spektrometresi
G	: Gelatin (Jelatin)
GAG	: Glycosaminoglycans (Glikozaminoglikanlar)
Gly	: Glisin
HA	: Hidroksialkanoat, R-hidroksialkanoik asit
HCC	: Hepatocellular carcinoma

	(Heptasellüler karsinom)
hESC	: Human Embryonic Stem Cells (İnsan embriyonik kök hücresi)
HET	: 7-hidroksiteofilin
ICI	: Imperial Chemical Industries
Kons.	: Konsantrasyon
LPS	: Lipopolisakkaritler
mcl-PHA	: Medium Chain Length-Polyhydroxyalkanoate (Orta zincir uzunluğunda polihidroksialkanoatlar)
MPa	: Tensile Strength (Gerilme kuvveti)
Mw	: Moleküler Ağırlık
NA	: Nutrient agar
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NB	: Nutrient broth
NBA	: Nil Blue A Nil Mavisi A
NG108-15	: Nöron hücre hattı
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
NP	: Nanopartikül
NPCM	: non-PHA Cell Mass (PHA olmayan hücre kalıntıları)
OD	: Optik densite
OrfZ	: 4-hidroksibütirat-CoA: CoA transferaz
P (3HB)	: Poli 3-hidroksibütirik asit
P (3HB4HB)	: Poli (3-hidroksibütirat-ko-4-hidroksibütirat)
P (3HB-ko-3HHx),	: Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat)
PHBHHx	
P (3HB-ko-3HV)	: Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)
P (3HHx)	: Poli (3-hidroksiheksanoat)
P (3HHx-ko-3HO)	: Poli (3-hidroksiheksanoat-ko-3-hidroksioktanoat)
P (3HO)	: Poli (3-hidroksioktanoat)

P (3HV)	: Poli (3-hidroksivalerat)
P (4HB)	: Poli (4-hidroksibütirat)
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat sodyum klorür tamponu)
PDGF	: Platelet-derived growth factor (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)
PEG	: Polietilen glikol
PF127	: Pluronik F127
PHA	: Polihidroksialkanoat
phaA	: 3-Ketotiolaz
phaB	: Asetoasetil- CoA Redüktaz
phaC	: PHA sentaz
PhaP	: PHA granül bağlayıcı protein, Fazin proteini
PHB	: Polihidroksibütirat
PHB-PDMAEMA	: Poli[(R)-3-hidroksibutirat] –b-poli (2-(dimetilamino) etil metakrilat)
PHBV	: Polihidroksibütirat-ko-valerat
PLGA	: Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PNP	: Polimerik nanopartikül
PTX	: Paclitaxel (Paklitaksel)
PVA	: Polivinil alkol
rhAGP	: İnsan α 1-asit glikoprotein ligantı
rhEGF	: İnsan epidermal büyüme faktörü ligantı
RPE	: Retinal pigment epithelium (Retinal pigment epiteli)
SC-CO₂	: Süperkritik-karbondioksit
SCF	: Supercritical fluid (Süperkritik sıvı)
scl-PHA	: Short Chain Length-Polyhydroxyalkanoates (Kısa zincir uzunluğunda polihidroksialkanoatlar)
SDhESC	: Spontaneously differentiated human embryonic stem cells (Kendiliğinden farklılaşmış insan embriyonik kök hücresi)

SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEM	: Scanning electron microscope (Taramalı elektron mikroskobu)
SF	: Serum fizyolojik
SSB	: Sudan Black B Sudan Siyah B
SucD	: Süksinik semialdehit dehidrojenaz
TAG	: Triasilgliseritler
TEM	: Transmission Electron Microscope (Transmisyon Elektron Mikroskobu)
Tg	: Glass Transition Temperature (Cam geçiş sıcaklığı)
TGF-β	: Transforming growth factor beta (Dönüştürücü büyüme faktörü)
Tm	: Melting Temperature (Erime sıcaklığı)
UV	: Ultraviyole
XRD	: X-Ray Diffraction Analysis X-ışını Kırınımı Analizi

1. GİRİŞ

Plastikler, modern yaşamda yaşam kalitesini ve konforunu artırmak için, yıllar içerisinde tıbbi ve endüstriyel alanlarda, tek kullanımlık donanımlar, ambalajlar, ev eşyaları, makine çerçeveleri ve aksesuarları gibi geniş uygulama alanları nedeniyle değerli malzemeler haline gelmişlerdir. Petrol türevi plastikler üzerine büyük oranda bağımlı olunması, ham petrolün hızla azalmasına ve ciddi kirlilik problemlerine neden olmuştur (Anjum vd., 2016). Bu nedenle, plastik atıkların çevre üzerindeki zararlı etkilerine çözüm olarak biyolojik olarak bozunabilen plastiklerin geliştirilmesine odaklanılmıştır. Polihidroksialkanoatlar (PHA'lar), biyolojik olarak parçalanabilme ve biyouyumluluk gibi özelliklerinden dolayı petrokimyasal plastiklere alternatif sağlamaktadırlar (Salehizadeh ve Van Loosdrecht, 2004). Biyopolimerlerin elde edilmesinin en önemli avantajı, geri dönüştürülmesi zor olan ve plastik atılmasından kaynaklanan çöp ve deniz kirliliği sorunlarını çözebilmektir (Law vd., 2003).

PHA'lar, bakteriler tarafından, aşırı karbon varlığında ve azot, magnezyum, oksijen veya kükürt gibi önemli sınırlayıcı besin koşulları altında enerji ve karbon için depo bileşikleri olarak sentezlenen biyopolimerlerdir (Salehizadeh ve Van Loosdrecht, 2004). PHA'ların bakteriler tarafından üretildiği, 1926 yılında *Bacillus megaterium* bakterisi içerisinde, PHA ailesinin bir üyesi olan polihidroksibütiratın (PHB) oluştuğunu bildiren Maurice Lemoigne tarafından keşfedilmiştir (Anjum vd., 2016).

PHB'nin PHA ailesi içerisinde en yaygın üyesi olmasına rağmen, çeşitli mikroorganizmalar, farklı uzunluklarda PHA ko- ve termopolimerleri üretebilirler (Obruca vd., 2017). Karbon sayılarına ve farklı malzeme özelliklerine bağlı olarak iki ana gruba ayrılırlar. Kısa zincir uzunluğuna sahip PHA'lar (scl-PHA), 3 ila 5 karbon sayısına sahip monomerlerden oluşarak polipropilene benzer termoplastik malzeme özelliklerini gösterirken, orta zincir uzunluğundaki PHA'lar (mcl-PHA), 6 ila 14 karbon atomuna sahip monomerlerden oluşarak kauçuğa ve elastomere benzer elastik malzeme özellikleri gösterirler (Park vd., 2012).

PHA'lar şekerler ve bitkisel yağlar gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilir. PHA'nın ticari olarak üretimi, geleneksel plastiklere kıyasla daha yüksek maliyet gerektirir (Pillai vd., 2017). Bu biyoplastiklerin üretimindeki ana maliyet substratın maliyetidir (Salehizadeh ve Van Loosdrecht, 2004). Biyopolimerler, ambalaj materyalleri, biyomedikal implant malzemeleri, ilaç taşıyıcı sistemleri, karton ve kağıtlar

üzerindeki suya dayanıklı kaplamalar, gıda işleme sanayi gibi çeşitli alanlardaki uygulamalar için uygun özellikleri göstermektedir (Pillai vd., 2017). Özellikle, biyolojik olarak parçalanabilmeleri, biyouyumlu ve toksik olmamaları nedeniyle tıp ve sağlık alanındaki uygulamalarda giderek daha fazla kullanılmaktadırlar (Law vd., 2003; Obruca vd., 2017).

İlaç taşıyıcı sistem teknolojisi insan sağlığını iyileştirebilme açısından büyük öneme sahiptir (Masood vd., 2015). Hedefe yönelik ilaç dağıtımı, belirlenen bölgede diğer doku ve organları etkilemeden uygun ilaç miktarını sağlamaktadır. Bu teknolojiyi geliştirmek için, biyolojik olarak çözünebilir ve biyolojik olarak uyumlu biyomateriyaller büyük ilgi görmüştür (Bhatia vd., 2019). Biyomedikal uygulamalarda kullanmak üzere geniş ölçüde araştırılan PHA polimerleri, hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistem olarak araştırılmasının yanında doku mühendisliğinde de ilgi çekmektedir. PHA bazlı yapı iskelelerinin uygulamaları ile çeşitli doku mühendisliği alanlarında önemli araştırmalar yapılmıştır. Bunların içinde, cilt dokusu üzerine uygulanacak farklı doku iskeleleri de yer almaktadır ve geliştirilmiş bu sistemler ile dikkat çekici yara iyileşme süreçlerin gözlemlendiği bildirilmiştir (Larsson vd., 2014; Masood vd., 2015; Bhatia vd., 2019).

İdeal bir doku iskelesinin, hücresel aktiviteleri düzenleyen ve mekanik destek sağlayan hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinin yapısını ve fonksiyonunu taklit etmesi gerekmektedir. Bu nedenle kollajen çeşitli yara iyi edici doku iskelelerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır (Rho vd., 2006).

Kollajen, insan ve hayvan organizmalarının ekstrasellüler matriksinde (ECM) en bol miktarda bulunan proteindir. İnsan vücudunun kuru kütlelerinin dörtte birinden fazlasını oluşturur. Bağ dokularına kuvvet, elastikiyet ve işlevsellik sağlar (Collier vd., 2018). Doğal biyolojik makromoleküller arasında kollajen, hemostatik ajan ve yara pansumanı için mükemmel emilebilir bir bileşenidir. Yapılan çok sayıda araştırma kollajenin, ilaç taşınımı ve doku mühendisliğinde de kullanılabileceğini göstermiştir (Sun vd., 2017). Kollajen, farmasötik uygulamalarda yaprak/film, sünger, sprey ve hidrojel gibi çeşitli şekillerde yara sargı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kollajen içeren iskeleler üzerinde yapılan pek çok çalışma, bu iskelelerin iyileşme sürecinin hızlanmasına yardımcı olduğunu, daha hızlı bir epitelizasyon sağladığını, filmlerin canlıda herhangi bir toksisite göstermeden fibroblast hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu etkili bir şekilde kolaylaştırdığını göstermiştir (Ramanathan vd., 2017). Kollajen süngerleri,

hemostazda ve yara iyileşmesinde, iyi gaz geçirgenliği, epitel hücrelerinin büyümesinin teşvik edilmesi ve granülasyon dokusu oluşumu gibi mükemmel özelliklerinden dolayı iyi bir şekilde uygulanabilmektedir (Sun vd., 2017).

Bu tez çalışmasında; biyobozunur ve biyouyumluluk özellikteki scl-PHA’lardan biri olan polihidroksibutirat (PHB)’ın *Bacillus cereus* suşu kullanılarak üretilmesinin ardından, yara iyileşme sürecinde önemli etkilere sahip kollajen ile lokal olarak uygulanabilecek özellikte yara örtülerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Çalışmada kullanılan *R.pulmo* denizanası kollajenidir ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyomühendislik bölümünden sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre Arslan’dan temin edilmiştir.

Bu amaçla;

- *Bacillus cereus* suşunu, önce normal daha sonra ise sınırlayıcı besin koşullarında üreterek PHB sentezinin gerçekleştirilmesi,
- Sentezlenen PHB’nin uygun ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak hücre içerisinden yüksek saflıkta çıkartılması,
- Elde edilen PHB’nin fizikokimyasal karakterizasyonu,
- Denizanası kollajeninin PHB’ye yüklenmesi ile yara örtülerinin eldesi ve
- Yara örtülerinin *in vitro* karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Sentetik plastikler ilk kez 1950’lerde ortaya çıktığından beri insan yaşamında büyük yer kaplayan ve vazgeçilmez endüstriyel bir madde haline gelmiştir (Loo ve Sudesh, 2007; Chee vd., 2010). Plastikler o zamanlardan bu yana birçok evsel, çevresel ve endüstriyel malzemelerde yerini almışlardır. Bu yaygın uygulamaları, stabilite, dayanıklılık, elverişli mekanik ve ısı özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Ojumu vd., 2004). Petrol bazlı plastikler, aynı zamanda kimyasal bozulma ve mikrobiyal ayrıştırılma gibi sert koşullara karşı dayanıklı, çevresel koşullarda uzun ömürlü ve yüksek dirençlidir (Loo ve Sudesh, 2007). Bu özellik, atılan plastiklerin atık akışına girdiklerinde çevre sorunları oluşturmalarına neden olmaktadır (Chee vd., 2010). Plastik atıkların yönetimine ait çözümler arasında geri dönüşüm, biyobozunma, kullanılan kaynakların azaltılması ve yakma gibi uygulamalar bulunmaktadır. Bu yöntemlerin birçoğunun kendi içinde problemleri olsa da özellikle plastiklerin yakılması sırasında ortaya çıkabilecek hidrojen siyanür potansiyel sağlık sorunlarına neden olabilir (Khanna ve Srivastava, 2005). Doğal çevre, bu zararlı plastikler tarafından sürekli kirlendiği için araştırmacılar, polihidroksialkanoatlar (PHA) gibi tamamen biyobozunur plastikler geliştirmişlerdir (Chee vd., 2010; Verlinden vd, 2007).

Biyobozunur plastikler, çoğunlukla biyobozunur polyesterler yani polihidroksialkanoatlar, polilaktitler, alifatik polyesterler, polisakkaritler ve bunların kopolimeri veya karışımlarıdır ve sentetik plastiklerin yerini almak üzere geliştirilmektedir (Ojumu vd., 2004). PHA’lar, gram pozitif ve gram negatif olmak üzere en az 75 farklı cinsten bakteri tarafından sentezlenebilen çeşitli hidroksialkanoatların (HA) polyesterleridir (Redd vd., 2003). Bakteriyel hücrelerden elde edilen bu PHA’lar polipropilene benzer materyal özellik gösterir. Bu polimerlerin doğal, yenilenebilir kaynaklardan üretilabilir ve biyoyumlu oluşu, diğer petrol türevi plastiklere göre son derece önemli avantajlar sağlamaktadır (Verlinden vd, 2007).

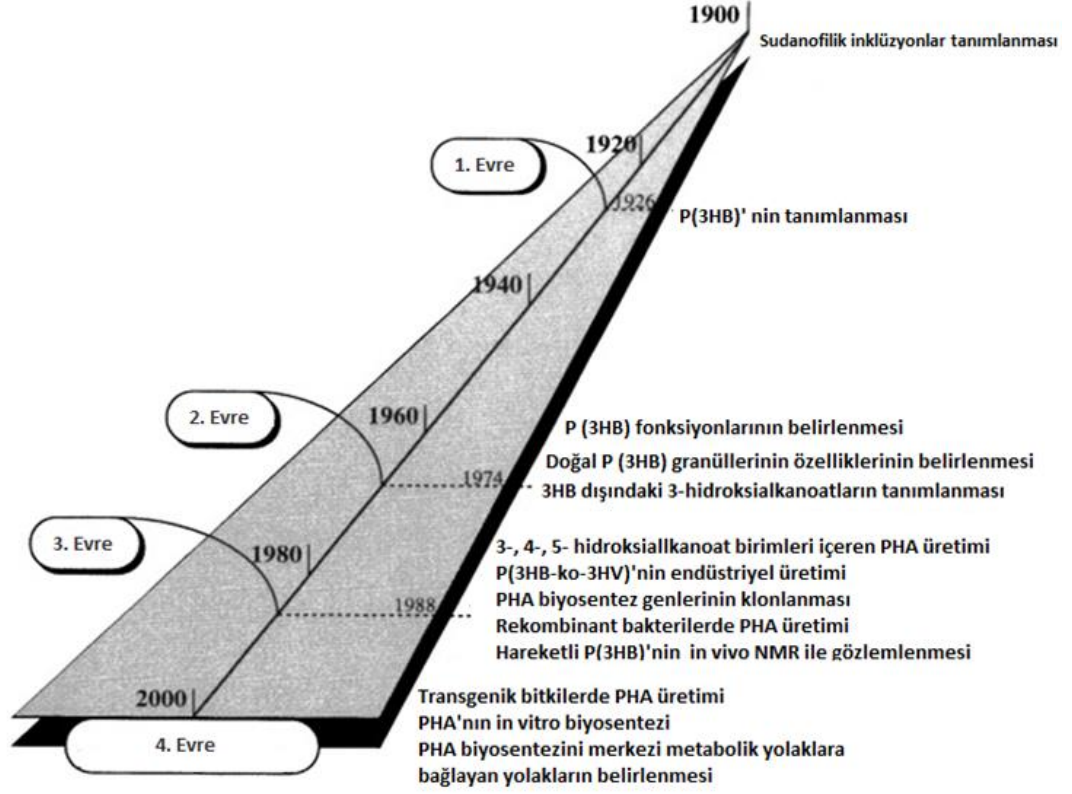
Bakteriyel hücrelerdeki polihidroksialkanoat oluşumları ilk olarak 1888’de Beijerinck tarafından tarif edilmiştir. PHA’lar temel olarak 1925 yılında Maurice Lemoigne tarafından keşfedilmiştir. Bu tarihten öncesine kadar ise bakteriler içerisinde bulunan bu maddeler ‘lipit’ olarak adlandırılıyordu (Chodak, 2008). Lemoigne, *Bacillus megaterium*’un anaerobik koşullar altında 3-hidroksibütirikasit (3HB) biriktirdiğini

göstermiştir. PHA'ların anlaşılmasındaki diğer bir gelişme ise 1958 yılında Macrae ve Wilkinson'ın PHA üretimindeki besin kısıtlamalarının rolünü bulmasıydı (Macrae ve Wilkinson, 1958; Rai ve Roy, 2011).

Wallen ve Rohwender 1974'te 3HB dışındaki hidroksialkanoatların (HA) varlığını tanımlamışlardır (Sudesh vd., 2000). 1983'te yapılan bir çalışmada, poli-beta-hidroksialkanoat (PHA) olarak adlandırılan bu karma polimerin kapiller gaz-sıvı kromatografisi ile yapılan analizinde en az 11 farklı kısa zincirli beta-hidroksiasit bulunduğu gösterilmiştir (Findlay ve White, 1983). Mikrobiyal PHA'da 3HB dışındaki farklı HA birimlerinin tanımlanmasının, bu bakteriel polimerlerin ticari çalışmaları üzerinde büyük etkisi olmuştur. Poli 3-hidroksibütiratın [PHB, P(3HB)] homopolimeri tek başına kırılğan bir malzeme olsa da bu yapının içerisine ikinci bir monomer biriminin ilave edilmesi bu yapının özelliklerini önemli ölçüde arttırabilir (Sudesh ve ark., 2000). *Alcaligenes eutrophus* kullanılarak yapılan bir çalışmada 3-hidroksibütirat (3HB) ve 3-hidroksivalerat (3HV)'tan oluşan bir kopolimerin ilk endüstriyel üretimi gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan bu ticari polyester ürünü 'BIOPOL®'olarak adlandırılmıştır (Braunegg vd., 1998; Sudesh vd., 2000; Chodak, 2008).

1976 yılında İngiltere'nin İmparatorluk Kimya Endüstrileri (Imperial Chemical Industries (ICI)) tarafından P (3HB)'nin, bakteriyel fermantasyon yoluyla fotosentez kaynaklı karbonhidrat hammaddelerinden kazançlı bir şekilde üretilip üretilmeyeceği araştırılmaya başlamıştır (Braunegg vd., 1998).

1970'li yılların sonunda başlayan moleküler biyolojideki gelişmeler, PHA biyosentezinde yer alan bazı genlerin klonlanmasının araştırılmasına neden olmuş ve 1980'lerin sonunda PHA biyosentezinde rol alan genler *Ralstonia eutropha*'da klonlanmış ve *Escherichia coli* 'de fonksiyonel olarak aktif olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.1.) (Chodak, 2008).



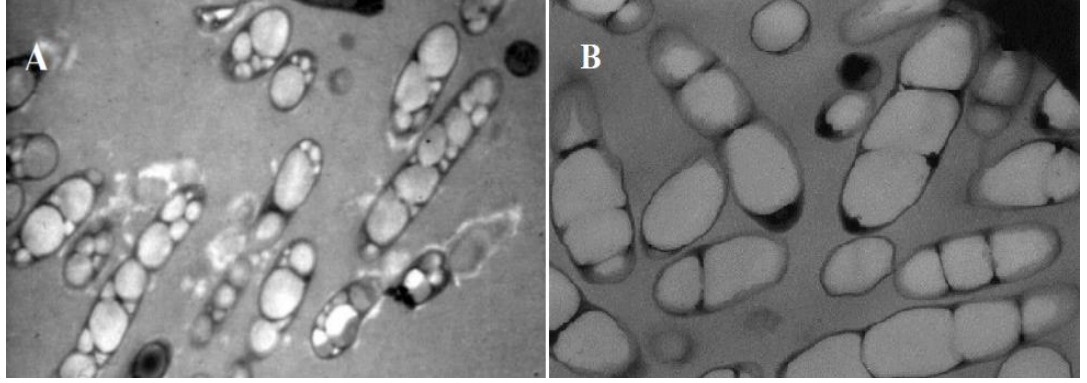
Şekil 2.1. PHA'ların tarihsel gelişimi (Sudesh ve ark., 2000)

2.2. Polihidroksialkanoatların Yapısı ve Özellikleri

2.2.1. PHA granüllerinin yapısı

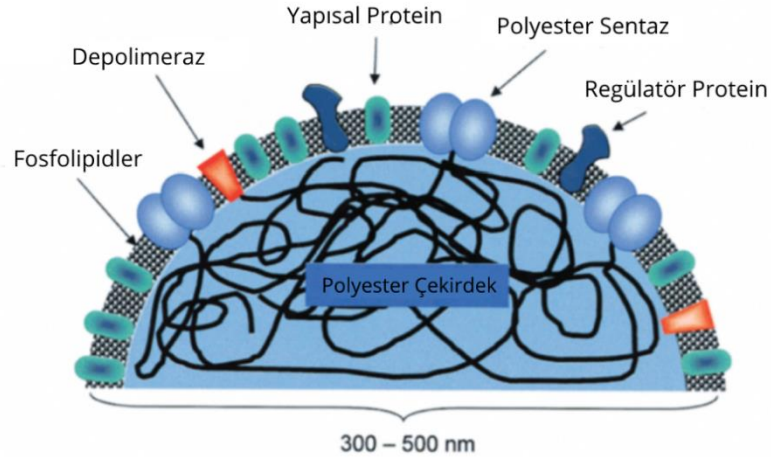
Prokaryotik mikroorganizmalar, doğada uzun süre aç kaldıklarında hayatta kalmak için önemli besin maddeleri depolarlar. PHA'lar, mikroorganizmaların bu şekilde stres koşullarında ve karbon kaynağı fazlalığında biriktirdiği depolama bileşiğidir. Bunun için, önce karbon kaynakları özümленir, hidroksialkanoat (HA) bileşiklerine dönüştürülür ve yüksek moleküler ağırlıklı PHA'lara polimerize edilirler. Sonuç olarak hücre sitoplazmasında suda çözünmeyen granüller olarak depolanırlar (Holmes, 1988; Loo ve Sudesh, 2007). PHA granülleri tipik olarak 0.2-0.5 µm çapındadır. PHA içeren bakterilerin ince kesitleri transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelendiğinde granüller Şekil 2.2.'deki gibi gözlemlenmiştir (Sudesh vd., 2000).

Nil Kırmızı, Nil Mavisi A (NBA) ve Sudan Siyah B (SBB) PHA granüllerinin seçici olarak boyanmasında en çok kullanılan boyalar arasındadır (Mesquita vd., 2015).



Şekil 2.2. PHA granüllerinin transmisyon elektron mikroskobu ile görüntülenmesi (A. Loo ve Sudesh, 2007 B. Sudesh vd., 2000)

Mikroorganizmalar kuru hücre ağırlıklarına göre hücre ağırlığının %80 (a/a) veya daha fazlasına kadar PHA biriktirebilirler. Depolanan polimer granülleri bir fosfolipid ve protein tabakası ile kaplanmıştır. Granüle bağlı proteinler, PHA'ların sentezinde, granüllerin oluşmasında ve sonrasında PHA'ların parçalanmasında önemli rol oynar (Şekil 2.3.) (Pötter ve Steinbüchel, 2005).



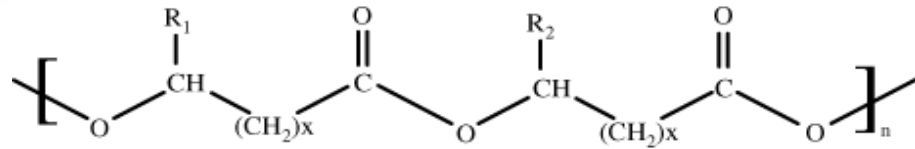
Şekil 2.3. PHA granülü üzerindeki granül-ilişkili proteinlerin şematik gösterimi (Grage vd., 2009)

PHA'lar *in vivo* ortamda, amorf ve suda çözünmeyen granüller halinde mevcutken *in vitro* ortamda, petrokimyasal termoplastiklere benzer şekilde sert ve kırılkan kristalimsi özellik gösterirler (Muhammadi vd., 2015). PHA granüllerinin araştırılmasında saflaştırma tekniği çok önemlidir. PHA'da meydana gelen denatürasyon

ve kristalizasyon, genellikle fazla sonikasyon, donma ve çözme döngüleri veya solventlere, deterjanlara maruz kalması gibi fiziksel streslere bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu nedenle saflaştırma işleminde doğru tekniğin seçilmesi önemlidir (Grage vd., 2009).

2.2.2. Kimyasal özellikleri

PHA'lar, R-hidroksialkanoik asit (HA) monomerlerinin termoplastik veya elastomerik polyesterleridir (Prieto vd., 2007; Keshavarz ve Roy, 2010). Bu polimerlerde, bir monomerin karboksil grubu ile komşu monomerin hidroksil grubu arasında bir ester bağı oluşur (Muhammadi vd., 2015). Günümüzde, homopolimer veya kopolimer olarak tanımlanan yaklaşık 150 farklı PHA bileşeni bulunmuştur. PHA tipleri içerisindeki bu farklılığın nedeni, mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını besin olarak kullanmasından ve PHA sentazların geniş substrat özgüllüğünden kaynaklanmaktadır (Loo ve Sudesh, 2007). Bakteriler, metabolik yollar yoluyla PHA'ların optik olarak aktif homopolimerleri ve 4 ile 14 karbon atomu arasında değişen kopolimerlerini sentezlerler (Şekil 2.4) (Taguchi ve Doi, 2004).



Şekil 2.4. Polihidroksialkanoatların genel yapısı. R_1/R_2 = alkil grupları, C_1-C_{13} , $x=1-4$, $n=100-30000$ (Philip vd., 2007)

Yapısal olarak PHA ailesi kısa zincir uzunluğunda ve orta zincir uzunluğunda polihidroksialkanoatlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Anjum vd., 2016). 3 ila 5 karbon atomu taşıyan PHA'lar kısa zincirli PHA'lar (scl-PHA) olarak adlandırılır (Keshavarz ve Roy, 2010). Bu grubun en yaygın örnekleri, poli (3-hidroksibutirat) P(3HB), poli (4-hidroksibutirat) P(4HB) ve poli (3-hidroksivalerat) P (3HV) ya da P (3HB-ko-3HV) kopolimeridir (Keshavarz ve Roy, 2010; Anjum vd., 2016). Poli (3-hidroksibutirat) P(3HB), en yaygın PHA'dır (Zinn vd., 2001). *Ralstonia eutropha* ve diğer birçok bakteri türü scl-PHA'ları sentezleyebilir (Visakh, 2014).

Orta zincirli PHA'lar ise 6 ila 14 karbon atomu içerir. Bu grubun örnekleri arasında, poli (3-hidroksiheksanoat) P (3HHx), poli (3-hidroksioktanoat) P (3HO) ve P (3HHx-ko-3HO) gibi heteropolimerler bulunur (Keshavarz ve Roy, 2010). Mcl-PHA sentezini, *Pseudomonas oleovorans* ve diğer birçok bakteri türü gerçekleştirebilmektedir (Visakh, 2014). İki sınıf arasındaki temel fark, belirli bir karbon atomu uzunluğundaki 3HA (3-hidroksialkanoat)'yı kabul edebilen PHA sentazların substrat spesifikliğıinden kaynaklanmaktadır. Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (P(3HB-ko-3HHx)) gibi hem kısa zincirli hem de orta zincirli birimler içeren hibrit polimerler de bulunmaktadır (Anjum vd., 2016).

Polihidroksialkanoatların, içerdikleri alkil gruplarına göre (R- Grubu) adlandırılması Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. R gruplarına göre PHA'ların adlandırılması (Bagheriasl, 2012)

Polimer Adı	R- Grubu	Kısaltma
Poli (3-hidroksiopropiyonat)	Hidrojen- H	PHP
Poli (3-hidroksibütirat)	Metil- CH ₃	PHB
Poli (3-hidroksivalerat)	Etil- CH ₂ CH ₃	PHV
Poli (3-hidroksiheksanoat)	Propil- (CH ₂) ₂ CH ₃	PHH _x
Poli (3-hidroksiheptanoat)	Bütıl- (CH ₂) ₃ CH ₃	PHH
Poli (3-hidroksioktanoat)	Pentil- (CH ₂) ₄ CH ₃	PHO
Poli (3-hidroksinonanoat)	Heksil- (CH ₂) ₅ CH ₃	PHN
Poli (3-hidroksidekanoat)	Heptil- (CH ₂) ₆ CH ₃	PHD
Poli (3-hidroksiandekanoat)	Oktil- (CH ₂) ₇ CH ₃	PHUD
Poli (3-hidroksidodekanoat)	Oktil- (CH ₂) ₇ CH ₃	PHDD

Şu ana kadar, düz, dallanmış, doymuş, doymamış ve aromatik gibi çok çeşitli monomerlere sahip PHA'lar bulunmuştur. Bu özelliklere sahip PHA'ların yan zincir uzunlukları ve fonksiyonel grupları, oluşacak biyoplastiğın, erime noktası, camsı geçiş sıcaklığı ve kristallik (sertlik/esneklik) gibi özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir (Zinn vd., 2001).

2.2.3. Fiziksel ve mekanik özellikleri

PHA'ların biyoyumlu, biyobozunur ve nontoksik olması gibi özellikleri onlara sentetik polimerlerden özellikle poliproline göre avantaj sağlamaktadır (Yousuf, 2017).

Polimerler genellikle hem amorf hem de kristal bölgelerden oluşmaktadır. Doğrusal bir molekülün rastgele düzenlenmesinden oluşuyorsa, amorf polimer, doğrusal zincirlerden oluşuyorsa kristalimsi bir polimer oluşur. Polimerlerin optik özellikleri, kristallik derecesinden önemli ölçüde etkilenir. Kristal polimerler, onları opak hale getiren daha büyük bir kırılma indeksinden oluşurken amorf polimerler saydam olabilir (Bagheriasl, 2012).

PHA'nın mekanik özellikleri, HA'ların dallı uzunluğuna veya polimer omurgalarındaki ester bağlantıları arasındaki mesafeye bağlı olarak kırılğan ile esnek/elastik arasında değişir. PHA biyosentezindeki değişkenlik, sert ve kırılğan plastiklerden kauçuklu polimerlere kadar değişen fiziksel özelliklere sahip biyopolimerlerin üretilmesini mümkün kılar (Muhammadi vd., 2015). Kısa zincir uzunluğundaki polimerler (scl-PHA), %60-80 arasında yüksek bir kristallik derecesine sahiptir ve sert-kırılğan özellik gösterirken, orta zincir uzunluğundaki polimerler (mcl-PHA), düşük gerilme kuvveti, yüksek kopma uzaması, düşük erime sıcaklığı ve düşük kristallik derecesine sahiptir ve esnek, elastik malzemelerdir (Anjum vd., 2016).

2.2.3.1. Kısa zincir uzunluğundaki polihidroksialkanoatların (scl-PHA) fiziksel özellikleri

PHB'ler, biyolojik olarak üretilen makromoleküllerin stereo düzenliliği sebebiyle, sert ve kırılğan olan yüksek kristal özelliğe sahip polimerlerdir ve termal olarak kararsızlardır (Padermshoke vd., 2005). PHB molekülünün erime sıcaklığı (T_m) 180 °C, termal bozunma sıcaklığı 200 °C'ye yakındır ve moleküler ağırlığı, T_m 'nin hemen üzerindeki sıcaklıklarda önemli ölçüde düşmektedir (Kim ve Lenz, 2001; Padermshoke vd., 2005). PHB, kopma sırasında düşük bir uzamaya sahiptir. Sahip olduğu bu zayıf mekanik özellikler onların endüstriyel alanlardaki uygulamalarını kısıtlar. Sonuç olarak mekanik özelliklerini iyileştirmek için kopolimer oluşumuyla PHB'nin özellikleri artırılabilir (Yousuf, 2017). PHB'nin erime sıcaklığını düşürmek ve morfolojisini değiştirmek için yapısına, 3-hidroksivalerat (3HV) birimlerinin eklenmesiyle elde edilen kopolimer poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) [poli (3HB-ko-3HV)], poli (3HB)'den daha düşük erime sıcaklığına ve daha yüksek esnekliğe sahiptir. Ticari olarak üretilen bu ürün BIOPOL® adı altında satılmaktadır (Kim ve Lenz, 2001).

Oluşturulan diğer bir kopolimer olan poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) [P (HB-ko-HHx)]'ın farklı % mol oranları, poli (3HB-ko-3HV) ile

karşılaştırıldığında Tm değerlerinde daha büyük düşüşler gözlemlendiği rapor edilmiştir (Tablo 2.2) (Padermshoke vd., 2005).

Tablo 2.2. PHA kopolimerlerinin mekanik özelliklerinin ortak plastiklerle karşılaştırılması (Loo ve Sudesh, 2007)

<i>Polimer</i>	<i>Cam Geçiş Sıcaklığı (Tg)</i>	<i>Erime Sıcaklığı (Tm)</i>	<i>Gerilme Kuvveti (Mpa)</i>	<i>Kopma Uzunluğu (%)</i>
P(3HB)	4	180	43	5
P(3HB-ko-20 mol %3HV)	-1	145	20	50
P(3HB-ko-16 mol %4HB)	-7	150	26	444
P(3HB-ko-10 mol %3HHx)	-1	127	21	400
P(3HB-ko-15 mol %3HHx)	-	115	23	760
P(3HB-ko-17 mol %3HHx)	-	120	20	850
Polipropilen	-10	176	38	400
Düşük yoğunluklu polietilen	-30	130	10	620

PHB'ler 200.000- 3.000.000 Da arasında değişebilen yüksek bir moleküler ağırlığa sahiptir. Polimerler üretilirken, moleküler ağırlıkları dikkate alınmalıdır. Çünkü bir polimerin moleküler ağırlığı, bozunma hızı ve mekanik dayanıklılık gibi birçok özelliğe etki edebilir. Molekül ağırlıklarındaki bu değişimler, fermantasyon sırasında kullanılan karbon kaynağından ve bakterilerin büyüme koşullarından etkilenebilir (Bagheriasl, 2012).

2.2.4. Polihidroksialkanoatların biyoyuymumluluğu

PHA'ların biyoyuymumluluğu, polimer zincirine dahil olan 3-hidroksiasitler gibi bazı monomerlerin, insan vücudunda doğal olarak oluşmasından kaynaklanmaktadır. 3-hidroksibütirik asit monomeri, insan kanında doğal olarak bulunan bir metabolittir ve sağlıklı erişkinlerde 100 mL kan başına 3-10 mg konsantrasyonlarında bulunur. (Rai ve Roy, 2011). Ayrıca PHB'nin ökaryotik ve prokaryotik hücre zarlarında transmembran iyon kanalı komplekslerinin oluşumunda rol oynadığı, yapılan çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. PHB'nin bu yüksek biyoyuymumluluğu, PHA polimerinin bozunması ile oluşan monomerlerin çeşitli organizmalarda ve yüksek memelilerde doğal olarak bulunmasından kaynaklanmaktadır (Muhammadi vd., 2015).

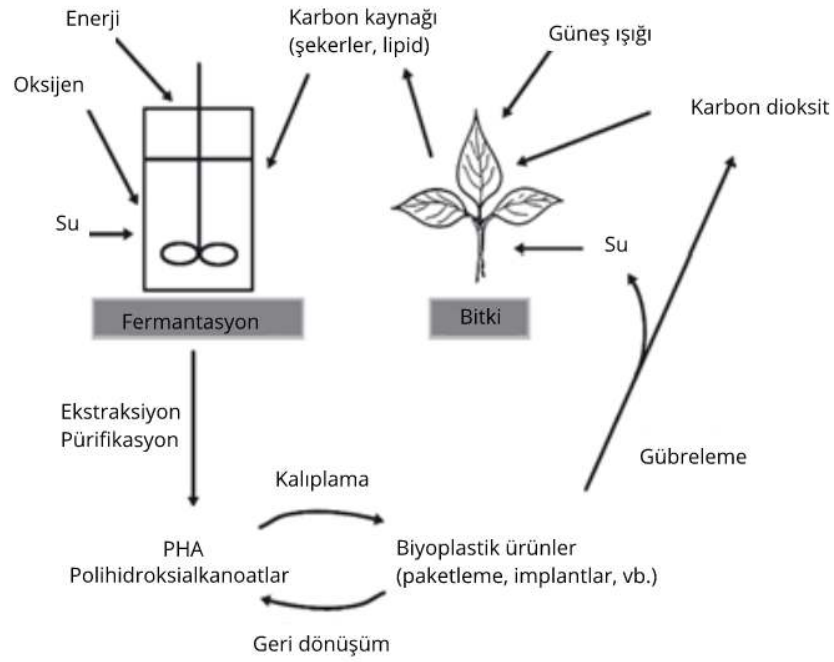
2.2.5. Polihidroksialkanoatların biyobozunurluğu

PHA'lar mikroorganizmalar tarafından yenilenebilir kaynaklardan doğrudan üretilir (Gross ve Kalra, 2002). PHB ve kopolimerleri, alg, mantar ve bakteri gibi çeşitli organizmalar tarafından karbondioksit ve enerjiye tamamen dönüştürülebilmelerinden dolayı biyolojik olarak parçalanabilirler (Holmes, 1985). PHA'ların diğer biyobozunur polimerlere kıyasla sahip oldukları en büyük avantajlardan biri hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında bozulabilme yetenekleridir (Philip vd., 2007).

PHA'ların bozunabilirliği hücre içi yıkım ve hücre dışı yıkım olarak ayrılabilir. Hücre içi bozulma, bakterinin kendisi tarafından biriktirdiği bir endojen depolama rezervuarının aktif olarak bozulmasını içerir. Hücre içi PHA bozunumunu katalize eden enzimler, hücre içi PHA depolimerazlardır (e-PHA depolimerazlar). Hücre dışı bozulma ise, ekzojen bir polimerin, hücre dışı PHA depolimerazlar (e-PHA depolimerazlar) salgılayan bir organizma tarafından kullanılmasıdır (Jendrossek ve Handrick, 2002). Bu enzimlerin aktiviteleri, polimerin bileşimine, fiziksel yapısına (amorf veya kristal) ve sıcaklık, nem, PH gibi çevresel koşullara bağlı olarak değişebilir. Bir P(3HB) parçasının bozunma hızı birkaç ay (anaerobik kanalizasyonda) ile yıl (deniz suyu) arasındadır (Madison ve Huisman, 1999).

Polimerlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, biyobozunurluk üzerine önemli ölçüde etki eder. Örneğin, düşük moleküler ağırlıklı PHA'lar biyobozunmaya karşı daha duyarlıyken, erime noktası arttıkça, biyobozunurluk azalır. Çünkü erime sıcaklığının yüksek olması enzimatik bozunabilirliği azaltır (Philip vd., 2007). Ayrıca, UV ışınlarının da PHA bozunması üzerinde etkili olduğu ve bozunmayı arttırdığı bildirilmiştir (Shangguan vd., 2006). PHA'ların mükemmel biyoyumluluğu ve biyobozunurluğu nedeniyle, bu polimerler farklı tıbbi uygulamalarda kullanım için potansiyel adaylardır (Anjum vd., 2016).

PHA'lar için önemli olan diğer bir konu ise, üretimlerinin biyolojik olması ve yenilenebilir kaynaklara dayanmasıdır. Yani PHA'ların sentezi ve biyobozunması, karbon döngüsüyle tamamen uyumludur (Şekil 2.5) (Verlinden vd., 2007).



Şekil 2.5. PHA'ların yaşam döngüsü (Verlinden vd., 2007)

2.3. Polihidroksialkanoatların Sentez Yolu

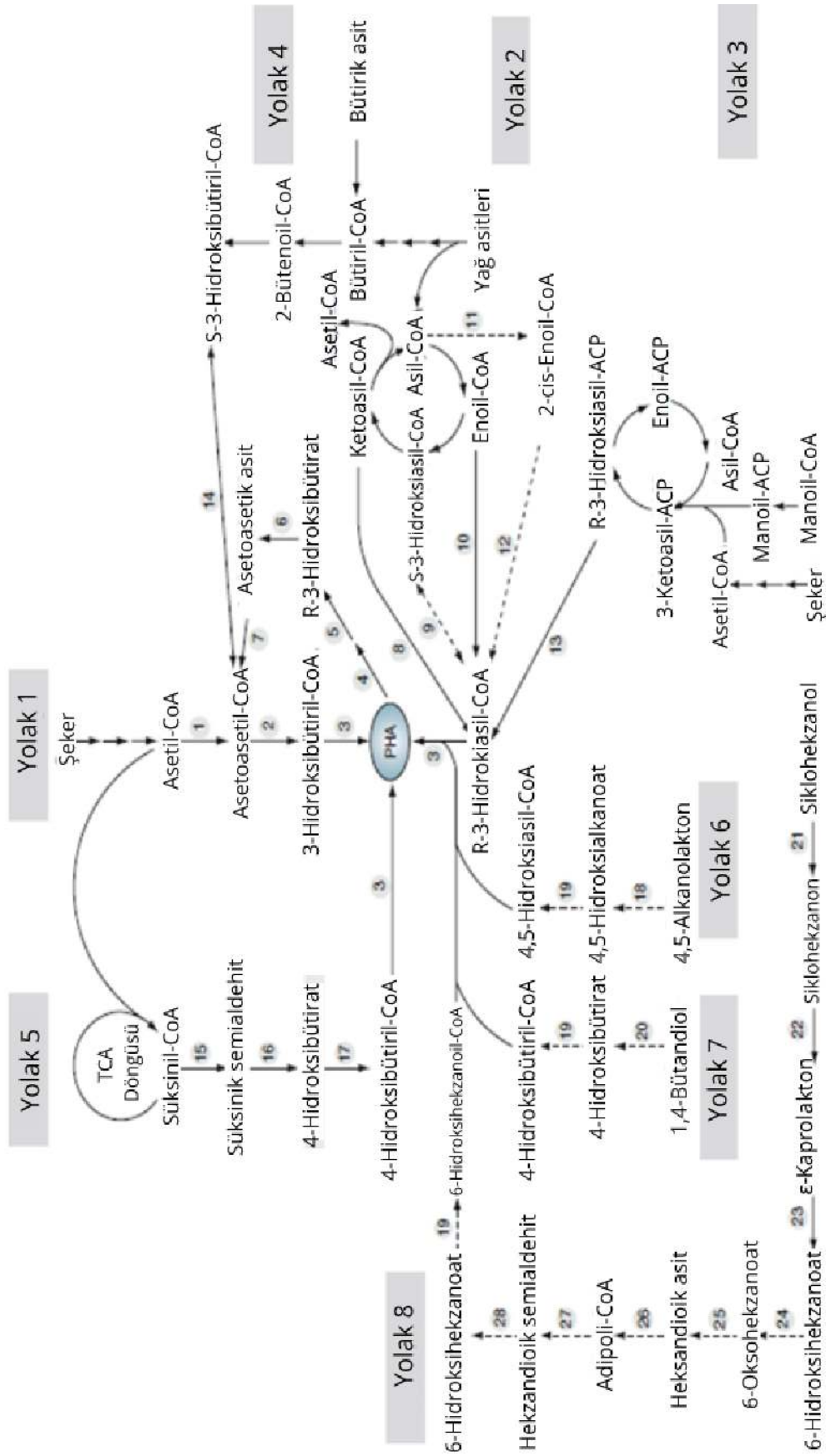
Birçok bakterinin çeşitli polihidroksialkanoat (PHA) yapılarını ürettiği bulunmuştur. PHA sentezinin yolu ve düzenlenmesi *Alcaligenes eufrophus*'ta ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır (Doi, 1995). Bakteriyel hücrelerde PHA'ların biyosentezi Şekil 2.6.'da gösterilen çeşitli yollarla gerçekleşir. PHA'lar bakterilerin çoğunda, üç biyosentetik enzim tarafından asetil-koenzim-A (asetil-CoA)'dan üretilir (Verlinden vd., 2007). Asetil-CoA, farklı uzunluklardaki 3-hidroksialkanoil-CoA'nın, çeşitli özelliklerdeki PHA sentezi için substrat olarak kullanılmasını sağlayan ana bileşendir. PHA sentezinde çeşitli enzimleri kodlayan birçok gen, doğrudan veya dolaylı olarak yer almaktadır (Chen, 2010). Birinci yolda, önce asetil-CoA üretmek için karbon kaynağı olarak şeker kullanılır (Meng ve Chen, 2017). Daha sonra, 3-Ketotiaz (phaA), asetil-CoA'nın asetoasetil-CoA'ya geri dönüşümlü oluşumunu katalize eder. Asetoasetil-CoA, bir NADPH bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz (phaB) ile (R)-3-hidroksibutiril-CoA'ya indirgenir (Doi, 1995). Daha sonra, PHA sentaz (phaC), (R)-3-hidroksibutiril-CoA'yı PHB (scl-PHA)'ye polimerize eder (Verlinden vd., 2007). Oluşan PHB'nin bozulması ise, PHA depolimerazlar ile başlatılarak öncelikle (R)- 3- hidroksibutirik asit oluşturulur. Oluşan bu asit, 3-hidroksibutirat dehidrojenaz ile asetoasetata okside edilir ve bu yapı

daha sonra asetoasetil- CoA'ya dönüştürülür. Böylece, asetoasetil- CoA'nın PHA biyosentez ve yıkım sürecinde ortak bir ara madde olduğu gözlemlenmiştir (Doi, 1995; Chen, 2010).

İkinci yolak, substrat olarak yağ asitleri kullanılır. Bu yağ asitleri β -oksidasyon döngüsüne girer ve çoğunlukla mcl-PHA sentezlemek için R-3- hidroksiasil-CoA monomerlerinin oluşumuna yol açar. Üçüncü yolak, PHA monomeri 3-hidroksiasil-CoA'yı oluşturmak için asetil-CoA'yı, malonil-CoA ile 3-ketoasil-ACP'ye yönlendirir (Meng ve Chen, 2017). Dördüncü yolakta, (S)-(+)-3-hidroksibutiril-CoA'yı oksitlemek için NADH'ye bağlı asetoasetil-CoA redüktaz kullanır. Beşinci yolakta, 4-hidroksibutirat içeren PHA oluşturmak için 4-hidroksibutiril-CoA sentezlenir. Bunun için de süksinik semialdehit dehidrojenaz (SucD), 4-hidroksibutirat dehidrojenaz (4hbD) ve 4-hidroksibütirat-CoA: CoA transferaz (OrfZ) kullanılır. Altıncı yolakta, 4,5-alkanolakton 4,5-hidroksiasil-CoA'ya dönüştürülür. Yedinci yolakta, 4-hidroksibutirat içeren PHA sentezlenebilmesi için, 1,4-bütandiol, 4-hidroksibutiril-CoA'ya oksitlenir. Sekizinci yolakta ise sekiz enzimin yardımıyla 6-hidroksiheksanoat içeren PHA oluşturulur (Chen, 2010).

Birçok farklı yolak ile oluşabilen PHA tipleri, sadece kullanılan monomer çeşitlerine değil aynı zamanda PHA sentazların özgüllüğüne de bağlıdır. Genellikle PhaC enziminin düşük özgüllüğü, çeşitli PHA yapılarının oluşumuna neden olur (Meng ve Chen, 2017).

PHA biyosentezinde görev alan bazı enzimler Tablo 2.3'de belirtilmiştir.



Şekil 2.6. PHA biyosentez yolları (Chen, 2010)

Tablo 2.3. PHA sentezinde görev alan enzimler (Chen, 2010)

No	Yolak	Kısaltma	Enzim	Türler
1	1.Yolak	PhaA	β - Ketotiolaz	<i>Ralstonia eutropha</i>
2		PhaB	NADPH bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz	
3		PhaC	PHA sentaz	
4	İlişkili Yolak	PhaZ	PHA depolimeraz	<i>Aeromonas hydrophila</i> 4AK4
5			Dimer hidrolaz	<i>Pseudomonas stutzeri</i> 1317
6			(R)-3-Hidroksibütirat dehidrojenaz	<i>R. eutropha</i>
7			Asetoasetil-CoA Sentaz	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
8	2. Yolak	FabG	3-Ketoasil-CoA redüktaz	<i>Pseudomonas putida</i> KT2442
9			Epimeraz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10		PhaJ	(R)-Enoil-CoA hidratat/enoil-CoA hidratat I	
11			Asil-CoA oksidaz, varsayılan	
12			Enoil-CoA hidratat I, varsayılan	
13	3. Yolak	PhaG FabD	3-Hidroksiasil-ACP-CoA transferaz Malonil-CoA-ACP transasilaz	<i>Pseudomonas mendocina</i>
14	4. Yolak		NADH-bağımlı asetoasil-CoA redüktaz	<i>Rhizobium (Cicer) sp.</i> CC 1192
15		SucD	Süksinik semialdehit dehidrojenaz	<i>Clostridium kluyveri</i>
16	5. Yolak	4hbD	4- Hidroksibütirat dehidrojenaz	
17		OrfZ	4-Hidroksibütirat-CoA: CoA transferaz	
18	6. Yolak		Laktonaz, varsayılan	
19			Hidroksiasil-CoA sentaz, varsayılan	
20	7. Yolak		Alkol dehidrojenaz, varsayılan	
21	8. Yolak	ChnA	Sikloheksanol dehidrojenaz	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19
22		ChnB	Sikloheksanon monooksijenazlar	<i>Acinetobacter sp.</i> SE19
23		ChnC	Kaprolakton hidrolaz	
24		ChnD	6-Hidroksiheksanoat dehidrojenaz	
25		ChnE	6-Oksoheksanoat dehidrojenaz	
26			Semialdehit dehidrojenaz, varsayılan	
27			6-Hidroksiheksanoat dehidrojenaz, varsayılan	
28			Hidroksiasil-CoA sentaz, varsayılan	

2.4. Bakterilerde PHA Üretimi

Günümüzde PHA üreten çok sayıda gram negatif ve gram pozitif bakteri tespit edilmiştir (Mercan ve Beyatlı, 2004). PHA'lar, aşırı karbon kaynağı varlığında azot, oksijen, magnezyum ve fosfor gibi sınırlayıcı büyüme koşullarında birçok bakteri tarafından sentezlenebilir. Polimerlerin endüstriyel üretimi için, seçilen mikroorganizmaların ucuz bir karbon kaynağı kullanma yeteneği, organizmanın büyüme ve polimer sentezleme hızı, substrat bazında belirli bir organizmanın maksimum polimer birikim derecesi gibi faktörlere dikkat edilmelidir (Ojumu vd., 2004).

2.4.1. PHA üretiminde kullanılan karbon kaynakları

PHA'ların ve bunların kopolimerlerinin ve terpolimerlerinin endüstriyel üretiminde; soya melası ve hidrolize soya, şeker pancarı melası, gliserol, kazein hidrolizatı, nişasta, üre, selüloz ve selüloz hidrolizatları, ksiloz, sükroz, glikoz, früktoz, galaktoz, mannoz, arabinoz, mısır nişastası, triasilgliseritler (TAG), pirinç kepeği, hindistan cevizi yağı, propiyonik asit, butirik asitlaktik asit, asetik asit, oleik asit, zeytin yağı, mısır yağı, hurma yağı, susam yağı, fındık yağı, soya fasülyesi yağı, pamuk tohumu yağı, atık bitkisel yağlar, belediye atık suları, biyodizel atık su, atık susam yağı, atık kızartma yağı, atık patates nişastası, nişastalı atık su, malt atığı, metanol gibi çok çeşitli karbon kaynakları kullanılabilir (Anjum vd., 2016).

2.4.2. PHA üretiminde kullanılan mikroorganizmalar

PHA'lar ve kopolimerinin üretiminde; *A. Eutrophus*, *Wautersia eutropha* or *Cupriavidus necator*, *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Halomonas* sp., *Haloferax* sp., *Aeromonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas* sp., *A. Latus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zobellella denitrificans*, *Cyanobacteria*, *Chromobacterium* sp., *Erwinia* sp., rekombinant *Escherichia coli* gibi çeşitli mikroorganizmalar kullanılmaktadır (Anjum vd., 2016). Literatürdeki bazı mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını kullanarak ürettikleri homopolimer ve kopolimer türleri Tablo 2.4'de, gösterilmiştir.

Tablo 2.4. Çeşitli mikroorganizmaların farklı karbon kaynaklarını kullanarak ürettikleri homopolimer ve kopolimer türleri

Suş	PHA Tipi	Karbon Kaynağı	Kaynak
<i>Alcaligenes latus</i> DSM 1124	P(3HB)	Malt ve soya atıkları	Yu vd, 1999
<i>Bacillus megaterium</i>	P(3HB)	Pancar melası, hurma şurubu	Omar vd, 2001
<i>Bacillus sp. SV13</i>	P(3HB)	Ananas ve şeker kamışı	Suwannasing vd, 2015
<i>Bacillus sp. 88D</i>	P (3HB-co3HV)	Glukoz veya Gliserol	Reddy vd, 2009
	PHB	Sodyum asetat	
<i>Bacillus cereus</i> SPV	P(3HB)	Şeker kamışı melası	Akaraonye vd., 2012
		Glikoz	Valappil vd., 2007
<i>Bacillus subtilis</i> (KP172548)	PHB	Balık katı atıkları (FSW)	Mohapatra vd., 2017a
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 17759	P(3HB-co-3HV)	Ksiloz ve levulinik asit	Keenan vd., 2004
<i>Cupriavidus necator</i> H16	P(3HB-co-3HV)	Ham hurma yağı, hurma çekirdeği yağı, zeytin yağı, ayçiçek yağı, hindistancevizi yağı + sodyum propiyonat	Lee vd., 2008
<i>Pseudomonas sp. G101</i>	mcl-PHA	Sabunlaştırılmış atık palm yağı	Mozejko ve Ciesielski, 2013
<i>Pseudomonas mendocina</i> PSU	P(3HB)	Biyodizel sıvı atık	
	P(3HB-co-3HV)	Biyodizel sıvı atık + sodyum propiyonat	Martla vd., 2018
<i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 29347	mcl-PHAs	Oktanoik asit	Durner vd., 2000
<i>Wautersia eutropha</i> (mutant suşu)	P(3HB-ko-3HHx)	Hurma çekirdeği yağı, hurma oleini, ham hurma yağı	Loo vd., 2005

2.4.2.1. *Bacillus* cinsi bakterilerde PHA üretimi

Bacillus cinsi bakteriler Bacillaceae familyasına dahil olan, çubuk şekilli gram pozitif, zorunlu veya fakültatif aerob, spor oluşturan hareketli bakterilerdir (Ayhan, 2000; Katı vd., 2016). *Bacillus* cinsine ait bir bakteri olan *Bacillus cereus* için optimum gelişim sıcaklığı, suşlara göre 28-35 °C arasında değişmekle birlikte genellikle 30 °C'dir. En yüksek üreme sıcaklığı 37-48 °C arasında değişirken, en düşük üreme sıcaklığı 10-18 °C arasında değişebilmektedir (Kalkan, 2006).

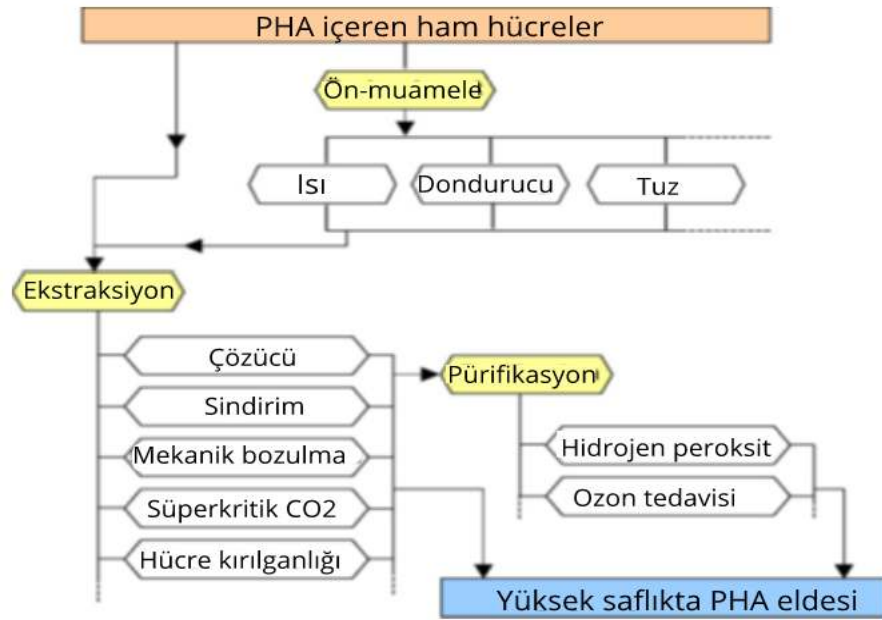
Gram negatif organizmalar, dış membranlarında lipopolisakkarit (LPS) denilen endotoksinleri içerir. Bu nedenle, gram negatif organizmaların oluşturduğu PHB'ler, PHA'larla birlikte olduğu bilinen bu pirojenleri içerir. Gram pozitif bakterilerde LPS

bulunmaz. LPS varlığı, güçlü bir immünojenik reaksiyona neden olduğu için gram pozitif bakterilerin oluşturduğu PHA'lar biyomedikal uygulamalarda kullanmak üzere daha iyi PHA kaynaklarıdır (Valappil vd., 2007).

2.5. Polihidroksialkanoatların Mikrobiyal Hücrelerden Ekstraksiyonu

PHA'ların mikroorganizmalardan geri kazanılmasındaki zorlu koşullar, onların ticari alanda kullanılmasında ki en büyük engel olmuştur (Hahn vd., 1994). Yapılan çok sayıda çalışma, endüstriyel ölçekte PHA üretiminin, normal petrokimyasal plastiklerin üretiminden daha pahalı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, PHA'ların üretimini daha düşük maliyetli hale getirmek için ekstraksiyon işlemleri geliştirilmeye çalışılmıştır (Jacquel vd., 2008).

Sitoplazma içinde granüller halinde biriken PHA'nın ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler önerilmiştir (Hahn vd., 1994). Hücre içi granüller şeklinde depolanan PHA'ların, PHA olmayan hücre kalıntılarından (non-PHA cell mass (NPCM)) ayrılması gerekmektedir (Koller vd., 2013). Ayırma işleminin ana basamağı, PHA granüllerinin çıkarılmasıdır. PHA'ların geri kazanılması, ön işlem, ekstraksiyon ve saflaştırmayı içeren üç adımdan oluşabilir (Jacquel vd., 2008). PHA'ları mikrobiyal hücre kalıntılarından ayırmak için geliştirilen yöntemlerin çoğu, kloroform ve diklorometan gibi halojenlenmiş hidrokarbonları içeren organik çözücüler ile ekstraksiyona dayanır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, büyük miktarlarda çözücü gerektirmesi ve kullanılan bu çözücülerin toksik olmasıdır (Koller vd., 2007; Yang vd., 2011). Ancak bu yöntemde, sonucunda yüksek saflıkta PHA elde edilebildiğinden tıbbi uygulamalar için iyi bir yöntemdir (Verlinden vd., 2007). Çözücü ekstraksiyon yöntemine alternatif olarak, hücresel sindirim yöntemleri, mekanik bozulma, süperkritik sıvı (SCF) ile ekstraksiyon gibi yöntemler uygulanabilir (Şekil 2.7) (Jacquel vd., 2008).



Şekil 2.7. PHA'nın geri kazanım yöntemleri (Jacquel vd., 2008)

2.5.1. Solvent ekstraksiyon yöntemi

Solvent ekstraksiyonu basit ve hızlılığı nedeniyle laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan ve PHA'nın geri kazanılmasında en yaygın olan yöntemdir (Kunasundari ve Sudesh, 2011). İki aşamadan oluşur, ilk aşamada hücre duvarı geçirgenliği değiştirilerek PHA'nın sitoplazmadan salınması ve sonrasında muamele edilen çözücüde çözünmesi sağlanır. İkinci aşamada ise polimerin, çözücü olmayan başka bir madde kullanarak çöktürülmesi sağlanır (Visakh, 2014). Dikloroetan, 1,1,2-trikloroetan, kloroform, asetik anhidrit, propilen karbonat ve etilen karbonat gibi ekstraksiyon çözücüleri bildirilmiştir (Tamer ve Moo-Young, 1998). Kloroform gibi halojenli çözücüler kısa zincir uzunluğu ve orta zincir uzunluğundaki PHA'ların izolasyonunda mükemmel performans gösterirken aseton gibi düşük zincirli ketonlar, özellikle uzun zincirli PHA'nın çıkarılması için en önde gelen çözücüdür (Koller vd., 2007; Kunasundari ve Sudesh, 2011). Bu yöntemde PHA'yı çöktürmek için çözücü olmayan madde olarak genellikle soğuk halde metanol ve etanol kullanılır (Raza vd., 2018). Solvent ekstraksiyonunda, PHA'nın elde edilebilmesi için büyük miktarlarda çözücü gereklidir. Çözücünün çok az kullanılması, eğer çözelti konsantrasyonu %5 (a/h) PHA'dan fazla ise çok viskoz bir polimer çözeltisine neden olabilir (Yang vd., 2011).

1,2-propilen karbonat, diğer çözücülere kıyasla daha düşük toksik yapısı nedeniyle tercih edilen bir çözücüdür (Raza vd., 2018). Yüksek kaynama noktasına (240 °C) sahiptir. Bu özelliği, çözücünün düşük sıcaklıklarda buharlaşmasını önler ve tekrar kullanılabilirliği sağlar. Böylece daha az çözücü tüketimine neden olur (Kunasundari ve Sudesh, 2011).

Solvent ekstraksiyonunda bakteri endotoksinleri uzaklaştırılabilir ve bu yöntem diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha yüksek verimlilik sağlar. Yüksek moleküler ağırlığa sahip saf PHA elde edilebilir (Kunasundari ve Sudesh, 2011). Ancak bu yöntem pahalıdır ve bu nedenle farklı yöntemler geliştirilmiştir (Tamer ve Moo- Young, 1998).

2.5.2. Sindirim yöntemi

Bu yöntem, PHA'ları hücre dışına çıkarabilmek için bir sindirim mekanizması içerir. Sindirim mekanizması, kimyasal veya enzimatik yollarla olabilir. Bu iki teknik de, PHA olmayan hücre kütlelerini sindirir (Raza vd., 2018). Çözücü ekstraksiyon tekniklerinde PHA granüllerinin çözünürlüğünü dikkate alınırken, sindirim yöntemleri, PHA granüllerini çevreleyen hücre malzemelerinin çözünmesini içerir (Kunasundari ve Sudesh, 2011).

2.5.2.1. Kimyasal sindirim

Kimyasal yöntemde, PHA'ların hücreden çıkarılmasını kolaylaştırmak için genellikle sodyum hipoklorit veya yüzey aktif maddeler uygulanır. Yüzey aktif maddelerden Triton X-100, sodyum dodesil sülfat (SDS), betain ve palmitoil karnitin etkili bir kimyasal sindirim için sodyum hipoklorit ile birlikte kullanılmıştır (Tamer ve Moo- Young, 1998). Anyonik sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi yüzey aktif cisimler, lipid iki tabakalı hücre zarına girerek hücre yapısını bozar ve hücreyi eritir ancak polimer granüllerine zarar vermezler (Jacquel vd., 2008). Hücrelerin sodyum hipoklorit ile muamelesinin, hücresel yapıyı etkili bir şekilde sindirdiği ancak polimerin yapısını da ciddi anlamda bozduğu bilinmektedir (Tamer ve Moo- Young, 1998). Hem yüzey aktif maddeler hem de sodyum hipoklorit, ayrı ayrı kullanıldığında düşük performans göstermektedir. Sadece sodyum hipoklorit kullanıldığında %50'ye kadar polimer bozunmasına neden olabilirken, tek başına yüzey aktif madde kullanıldığında da yüksek saflıkta PHA oluşmaz. Bu nedenle her ikisinin kombinasyonlarına ihtiyaç duyulur (Jacquel vd., 2008; Raza vd., 2018).

Araştırmacılar hem diferansiyel sindirimi hem de çözücü ekstraksiyonunu içeren yeni bir ayırma işlemi geliştirmişlerdir (Kunasundari ve Sudesh, 2011). Bu yöntemde bir sodyum hipoklorit çözeltisi ve kloroform dispersiyonu kullanılmaktadır. Burada üç ayrı faz gözlemlenir. Üst fazda sodyum hipoklorit çözeltisi, orta fazda PHA dışı hücre metaryalleri ve bozulmamış hücreler, en altta ise PHA'yı içeren kloroform fazı bulunur. Buradan kloroform fazı çekilerek çözücü olmayan bir madde ile çökeltilir (Jacquel vd., 2008). Hücreler hipoklorit tarafından sindirilip PHA granülleri serbest kaldıkça, kloroform, salınan polimeri hemen çözmekte ve böylece polimer sodyum hipoklorite daha az maruz kalmaktadır. Bu nedenle, bu yöntemde polimerin bozulmadan korunduğu düşünülmektedir. Ancak sadece hipoklorit ile ekstraksiyona kıyasla bozunma azalmıştır, bozunma tamamen ortadan kaldırılamamıştır (Tamer ve Moo- Young, 1998).

2.5.2.2. Enzimatik sindirim

Enzimatik sindirim kullanılarak PHA'nın ekstraksiyonu oldukça kompleks bir işlemdir. PHA dışındaki hücre bileşenlerinin çözünürlüğü, ısı işlem, enzimatik hidroliz ve yüzey aktif madde yıkamasından oluşan birçok aşama sonucu gerçekleştirilir. Enzimlerin hedefe spesifik olduğu bilinmektedir ve bu nedenle PHA'ların iyi bir şekilde geri kazanılmasını sağlayabilir (Raza vd., 2018). Bu amaçla çeşitli enzimler, özellikle proteazlar hücre lizisine neden olma etkinlikleri açısından değerlendirilmiştir. Enzimatik sindirim, katalize ettikleri reaksiyonlara göre spesifik olduğundan, iyi kalitede polimer geri kazanımını sağlayabilir. Ancak bu yöntemin en önemli dezavantajı, yüksek enzim maliyeti ve geri kazanım sürecinin karmaşıklığıdır (Kunasundari ve Sudesh, 2011).

2.5.3. Mekanik bozulma

Mekanik bozulma yöntemi, hücre içi proteinleri serbest bırakmak için yaygın olarak kullanılırken, bu yöntem, polimerleri bakteriyel hücrelerden serbest bırakabilmek için denenmiştir. Boncuk öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon teknikleri mekanik bozulma yöntemleri içerisinde önemli bir yere sahiptir (Tamer ve Moo- Young, 1998). Temel olarak, diğer ekstraksiyon yöntemlerinin aksine, polimerlere kimyasal içermeden daha hafif zarar vermesi ve böylece çevre kirliliğini en aza indirmesi ve ekonomik olarak avantajlı olması sebebiyle tercih edilebilir bir yöntemdir. Yöntemin dezavantajı ise, yüksek sermaye gereksinimi, işlem süresi ve ölçeklendirme zorluğudur (Kunasundari ve Sudesh, 2011).

2.5.4. Süperkritik sıvı ile ekstraksiyon

Süperkritik sıvılar, sahip oldukları yüksek yoğunluk ve düşük viskoziteleri gibi benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle PHA ekstraksiyonu alanında potansiyel ekstraksiyon çözücüleri olarak ortaya çıkmıştır. Bu amaçla kullanılan süperkritik-karbondioksit (SC-CO₂), düşük toksisite ve reaktivite, orta derecede kritik sıcaklık ve basınç (31 °C ve 73 atm), bulunabilirlik, düşük maliyet ve yanıcı olmaması gibi özellikleri nedeniyle yaygın şekilde kullanılır (Jacquel vd, 2008).

2.5.5. Hücre kırılabilirliği

Azotobacter vinelandii UWD ve rekombinant E. coli gibi bazı mikroorganizmalar, fazla miktarda PHA birikimi sonucu kırılabilir hale gelebilir. Hücre kırılabilirlik mekanizması sadece Gram negatif mikroorganizmalarla sınırlı değildir, aynı zamanda Gram pozitif mikroorganizmalar için de kullanılabilir. Hücrelerin bu özelliği kullanılırken, PHA içeriği yüksek olan mikrobiyal büyümeyi teşvik etmek için hücre duvarı yumuşaması ve hücre duvarı bütünlüğünü dengelemek gerekmektedir (Kunasundari ve Sudesh, 2011).

Polihidroksialkanoatların geri kazanılmasında yukarıda bahsedilen yöntemlerin dışında, flotasyon yöntemi, sulu iki fazlı sistem (ATPS), gama ışıması, çözünmüş hava flotasyonu gibi farklı yöntemler de geliştirilmiştir (Jacquel vd., 2008; Kunasundari ve Sudesh, 2011). Bu yöntemlerin bazılarının saflık, verim yüzdeleri, avantaj ve dezavantajları Tablo 2.4 ve Tablo 2.5'te gösterilmiştir.

Tablo 2.5. Çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin sonuçları

Ekstraksiyon Yöntemi	Açıklama	Suç	Sonuçlar	Referans
Solvent Ekstraksiyonu	Kloroform	<i>Bacillus cereus</i> SPV	Saflık: 92% Verim: 31%	Valappil vd., 2007
	Kloroform	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Saflık: 95% Verim: 96%	Fiorese vd., 2009
	1,2-Propilen Karbonat	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Saflık: 84% Verim: 95%	
Sürfaktan	SDS	<i>Ralstonia eutropha</i>	Saflık: 95% Verim: 90%	Kim vd., 2003
Sodyum Hipoklorit	Sodyum Hipoklorit	<i>C. necator</i> DSM 545	Saflık: 98%	Berger vd., 1989
Sürfaktan-Sodyum Hipoklorit	SDS-Sodyum Hipoklorit	<i>Azotobacter chroococcum</i> G-3	Saflık: 98% Verim: 87%	Dong ve Sun, 2000
Sürfaktan-Şelat	Triton X-100-EDTA	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Saflık: 68%	Lakshman ve Shamala, 2006
Sodyum Hipoklorit ve Kloroform Dispersiyonu	Sodyum hipoklorit ve kloroform	<i>Ralstonia eutropha</i>	Saflık: 97% Verim: 91%	Hahn vd., 1994
Enzimatik Sindirim	Bromelain; pankreatin	<i>Ralstonia eutropha</i>	Saflık: 89% Verim: 90%	Kapritchkoff vd., 2006
	SDS-EDTA ile kombine edilmiş enzim	<i>Pseudomonas putida</i>	Saflık: 92% Verim: 90%	Yasotha vd., 2006
Mekanik Bozulma	SDS-Yüksek basınçlı homojenleştirme	<i>Metylobacterium sp</i> V49	Saflık: 95% Verim: 98%	Ghatnekar vd., 2002
	Sonikasyon	<i>Bacillus flexus</i>	Saflık: 92% Verim: 20%	Divyashree vd., 2009
Hücre kırılabilirliği	Alkali hidrolizi	<i>Bacillus flexus</i>	Verim: 20%	Divyashree ve Shamala, 2010
Gama Işıması	Radyasyon-Kloroform	<i>Bacillus flexus</i>	Verim: 45-54%	Divyashree ve Shamala, 2009

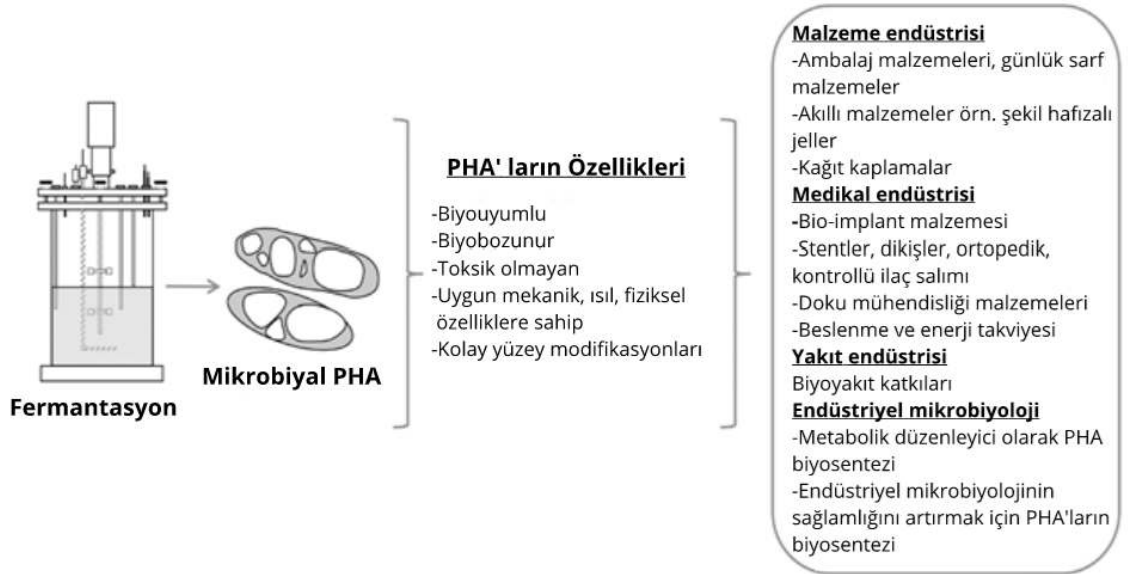
Tablo 2.6. Ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Kunasundari ve Sudesh, 2011)

<i>Ekstraksiyon Yöntemi</i>		<i>Avantajlar</i>	<i>Dezavantajlar</i>
Solvent Ekstraksiyonu		Yüksek moleküler ağırlık ve saflık Endotoksinlerin giderilmesi Polimerde sınırlı bozunma	Fazla miktarda toksik ve uçucu çözücülerin kullanılması Yüksek sermaye ve işletme maliyeti gereksinimi
Kimyasal Sindirim	Sürfaktan	Doğal polimer zincirleri korunur Elde edilen PHA orijinal moleküler ağırlığını korur	Düşük saflıkta PHA eldesi Yüzey aktif maddeleri atık sudan çıkartmak için su arıtma gerekliliği
	Sodyum Hipoklorit	Yüksek saflıkta PHA üretimi	Polimerin bozulması ve moleküler ağırlığında yüksek miktarda azalma
	Sürfaktan-Sodyum Hipoklorit	Hızlı ve basit proses PHA'da sınırlı bozulma ve solvent ekstraksiyonuna göre düşük maliyet	Sürfatan ve sodyum hipokloriti atık sudan arıtma gerekliliği
	Sürfaktan-Şelat	Yüksek saflıkta polimer eldesi	Büyük hacimde atık su üretimi
	Sodyum Hipoklorit ve Kloroform Dispersiyonu	Yüksek saflıkta polimer üretimi Düşük polimer bozunması	Yüksek miktarda toksik ve uçucu solventlerin tüketimi Yüksek maliyet
Enzimatik Sindirim		Polimerin kaliteli bir şekilde geri kazanımı	Yüksek enzim maliyeti Karmaşık süreç
Mekanik Bozulma	Boncuk Öğütme	Kimyasal kullanımı yok	Uzun işlem süresi içerir Çeşitli proses parametrelerinin hassas bir şekilde kontrol edilmesini gerektirir
	Yüksek Basınçlı Homojenizasyon	Kimyasal kullanımı yok	Hem sürece hem de mikrobiyal fizyolojik parametrelere bağlıdır
	Süperkritik Sıvı (SCF)	Basit, Ucuz, Hızlı, Çevre dostu, Düşük toksisite Ekipman ve işgücü ihtiyaçlarını, kirlenmeyi ve verim kaybını en aza indirir	Düşük geri kazanım Proses parametrelerine bağlı Sık sık temizlik ihtiyacı
	Hücre kırılabilirliği	Basit Hafif ekstraksiyon koşulları	Hücre duvarı bütünlüğünü ve hücre duvarı yumuşamasını dengelemek gerekir
	Gama Işıması	Kullanılan kimyasal yok / daha az kirlenme	Işınlama süresi uzunluğu

2.6. Polihidroksialkanoatların Uygulama Alanları

Mikrobiyal olarak tasarlanmış PHA'lar, doğal biyouyumluluk, değiştirilebilir mekanik özellikler, kanserojen etkiye sahip olmamaları, tehlikeli olmayan parçalanma ürünleri ve kontrol edilebilir biyobozunurluk gibi özellikleri nedeniyle çeşitli tıbbi uygulamalar için dünya çapında büyük ilgi görmüştür (Singh vd., 2019). PHA'lar, kardiyovasküler yamalar, ortopedik iğneler, eklem kıkırdak tamir cihazları, kemik iliği iskeleleri, rejenerasyon cihazları ve yara örtüleri de dahil olan cihazları geliştirmek için kullanılmıştır (Chen ve Wu, 2005). Ayrıca, biyouyumluluk ve biyobozunurluklarından dolayı, ilaçların belirli bir bölgeye dağıtılması ve salınması için yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik çekici adaylar olarak ortaya çıkmışlardır (Singh vd., 2019).

PHA'ların monomer bileşimi ve kimyasal yapıları, polimerin fiziksel ve malzeme özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bazı scl-PHA'lar çok sert ve kırılğan olduklarından dolayı biyomedikal ve ambalaj filmi uygulamaları için gereken mekanik özelliklerden yoksun olabilir. Bu nedenle polimerlerin, çeşitli uygulamalarda kullanılabilir hale gelebilmesi için polyesterlerin fiziksel ve mekanik özelliklerinin çeşitlendirilmesi ve iyileştirilmesi yani modifiye edilmesi gerekebilir (Hazer vd., 2012).



Şekil 2.8. PHA'ların potansiyel uygulamaları (Możejko-Ciesielska ve Kiewisz, 2016)

2.6.1. Polihidroksialkanoatların medikal uygulamaları

PHA'lar, dikişler, dikiş elemanları, zimba teli, vidalar, kemik plakaları ve kemik kaplama sistemleri, cerrahi ağ, kardiyovasküler yamalar, stentler, eklem kırıkdam tamir cihazları, sinir kılavuzları, tendon tamir cihazları, perikardiyal yamalar, kılavuzlu doku onarımı/ rejenerasyon cihazları, şişirme ve doldurma maddeleri, damar valfleri, kemik dübelleri, kemik iliği iskeleleri, cilt ikameleri, oküler hücre implantları, bağ ve tendon greftleri, yara örtüleri ve hemostat dahil tıbbi implant cihazlarını geliştirmek için kullanılmıştır (Wu vd., 2009).

PHA'lar, biyobozunurluk, biyoyumluluk, yüksek immünotolerans ve düşük sitotoksositeye sahip olmaları nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak oldukça önemli biyomalzemelerdir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin (hESC'ler), kendiliğinden farklılaşmış hESC'lerin (SDhESC'ler) ve mezenkimal kök hücrelerin (hMSC'lerin), poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx) ve kollajen ile birlikte hasarlı dokular için biyoyumlu bir değiştirme stratejisi olarak uygulanabilirliği araştırmış ve sonuç olarak gözenekli PHBHHx / kolajen jel hibrid iskelesi geliştirmiştir (Lomas vd., 2013).

Tezcaner ve ark. retinal pigment epiteli (RPE) dejenerasyonun neden olduğu retinal bozuklukları tedavi etmeye yönelik olarak hastalıklı veya kaybedilen RPE'nin yerine biyobozunur polimerik kalıpların kullanımını araştırmışlardır. Bu amaçla poli (hidroksibutirat-ko-hidroksivaleerat) (PHBV8) filmi kullanılmış ve polimer filmin yüzeyi, D407 (RPE hücre hattı) hücrelerin bağlanmasını arttırmak için yüzey modifikasyonu ile hidrofilik hale getirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu PHBV8 ince filmlerinin RPE hücrelerinin subretinal transplantasyonu için geçici bir şablon olarak kullanımda iyi bir substrat olduğu tespit edilmiştir (Tezcaner vd., 2003).

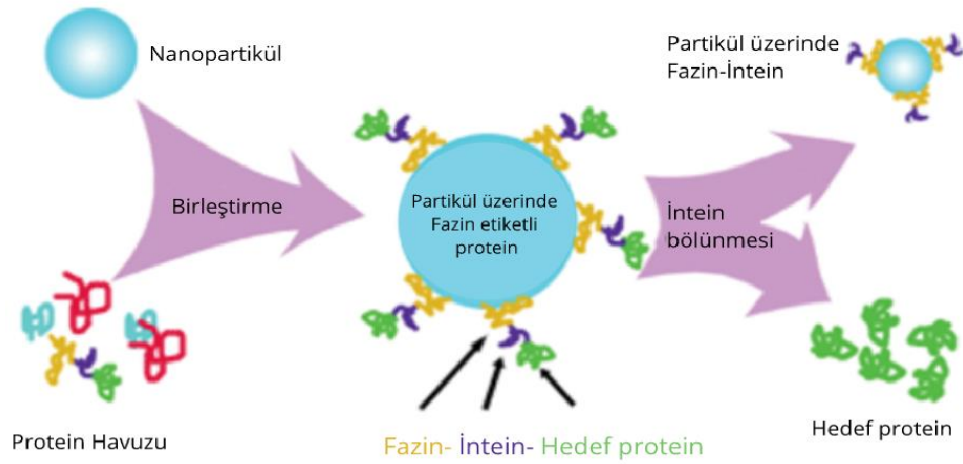
Lizarraga-Valderrama vd. farklı oranlarda poli(3-hidroksikotanoat) /poli(3-hidroksibutirat) (P(3HO) /P(3HB)) karışımları kullanarak sinir klavuz kanalları oluşturmaya çalışmışlardır. NG108-15 nöron hücreleri 25:75, 50:50 ve 75:25 oranlarında birleştirilmiş P (3HO) / P (3HB) filmlerine ekilmiş ve sonuçlar incelenmiştir. Test edilen üç karışımda biyoyumlu olmasına rağmen, 25:75 P (3HO) / P (3HB) karışımı, hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını daha fazla oranda desteklemiştir (Lizarraga-Valderrama vd., 2015).

Kontrollü ilaç dağıtım sistemleri, ilaçların doğru zamanda, doğru yerde ve istenilen süre boyunca belirlenen oranlarda salınması, hedeflenmesi ve aktif halde uzun süre kalabilmesi amacıyla geliştirilmiştir. PHA'ların uygun şekillerde yapılandırılarak ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabileceği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Hazer vd., 2012). Bu polimerler, antibiyotikler, antioksidanlar, hormonlar gibi çeşitli aktif maddeleri ve gen terapisi için genetik materyalleri taşıyan sistemler olarak çalışılmıştır. PHA'lar hidrofobik yapıda olduklarından, suda çözünürlüğü az olan etkin maddelerin kapsüllemesi için nanopartiküller, nanolifler, mikroküreler ve iskeleler gibi çeşitli formlarda kullanılmıştır (Bhatia vd., 2019).

Tablo 2.7. Çeşitli ilaçların farklı ilaç taşıyıcı sistem formları için kullanılan PHA'lar

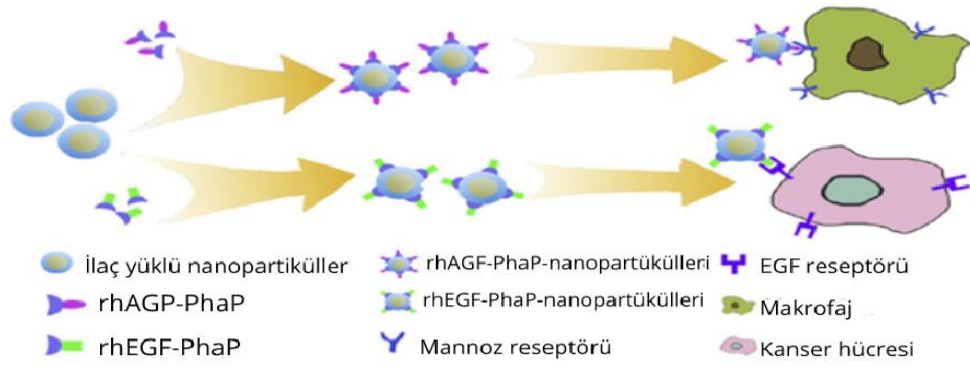
PHA	Yapı	İlaç	Uygulama	Referans
P(3HB)	Mikroküre	Aklarubisin	Kontrollü ilaç salımı için taşıyıcı sistem	Juni vd., 1986
PHBV	Mikroküre	Progesteron	Hormon taşıyıcı sistem	Gangrade ve Price, 1991
P(3HB3HV)	Disk	Gentamisin	Antibiyotiğin kontrollü salınımı	Rossi vd., 2004
P(3HB4HB)	Nanofiber	Paklitaksel	Biyouyumlu ilaç salınımlı stentlerin geliştirilmesi	Lee vd., 2015
P(3HB3HHx)	Nanopartikül ve Mikropartikül	5-Fluorourasil	İlaç taşıyıcı sistem	Lu vd., 2010

Hidrofobik yapıdaki PHA'lar, granül bağlayıcı protein olan PhaP (fazin) içerirler ve protein hidrofobik materyallere karşı yüksek afiniteye sahiptir. Bu sayede PhaP'ye dayalı ilaca özgü taşıyıcı sistemler geliştirilebilir (Şekil 2.9) (Chen, 2010).



Şekil 2.9. Fazin içeren PHA nanopartiküller ile hedef proteinlerin ayrılması (Wang vd., 2008)

Fazin proteini PHA üreten bakterilerde yüksek seviyelerde toplanır. Bu proteinler, hidrofobik polimer ve hidrofilik ortam arasındaki sınırı oluşturan amfifilik moleküllerdir. Yao ve arkadaşları PHA nanopartiküllerinin ilaç taşıyıcıları olarak kullanıldığı hedeflendirilmiş bir PHA-bazlı ilaç hedefleme sistemi geliştirmiştir. Burada makrofajları veya hepatosellüler karsinoma hücrelerini spesifik olarak hedefleyebilecek PHA nanopartikülleri oluşturulmuştur. Ligand rhAGP (insan α 1-asit glikoprotein) makrofajların mannoz reseptörüne bağlanırken, ligand rhEGF (insan epidermal büyüme faktörü) karsinoma hücrelerinde EGF reseptörlerini hedef almaktadır. Rekombinant üretilen rhAGP-PhaP ve rhEGF-PhaP füzyon proteinlerini içeren PHA nanopartikülleri, özellikle *in vitro* koşullarda makrofajlar veya hepatosellüler karsinoma hücreleri tarafından alınmıştır. Böylece bu çalışmada, ligand-PhaP-PHA nanopartiküllerini içeren hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sisteminin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak etkili olduğu kanıtlanmıştır (Yao vd., 2008).



Şekil 2.10. Ligand-PhaP-PHA bazlı spesifik ilaç dağıtım sistemi (Yao vd., 2008)

Althuri ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kanserli hücreleri hedeflemek için ilaç taşıyıcısı olarak folat fonksiyonlu arsenik trioksit yüklü poli-3-hidroksibutirik asit- polivinil alkol (PHB-PVA) nanopartikülleri hazırlanmış ve ilaç salınım çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda, hazırlanan bu PHB nanopartiküllerin, kanser gibi hastalıkların tedavisinde hedeflenen bölgelere ilaç taşınımı ve salımı için ideal ve biyouyumlu polimer matrisler olduğu gösterilmiştir (Althuri vd., 2013).

Korsatko ve arkadaşları ise ilaç ve PHB'nin sıkıştırılmış tabletlerinden 7-hidroksietilteofilin'in (HET) *in vitro* ve *in vivo* salınımını araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre, *in vitro* salım süresinin ilaç yükleme miktarına bağlı olduğunu, *in vivo* salımın ise *in vitro* salıma göre daha yavaş gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Pouton ve Akhtar, 1996).

2009 yılında yapılan bir çalışmada poli-3-hidroksibutirattan (PHB) mikroküreler hazırlanmış ve bunlar *in vitro* ve *in vivo* olarak test edilmiştir. Burada mikroküreler farklı antibiyotiklerle (rubomisin ve tienam) yüklenmiştir. Çalışmanın sonucunda, PHB'nin mikropartikül formunda uzatılmış etkili ilaçları üretmek için iyi bir aday olabileceği belirtilmiştir (Goreva vd., 2009).

2013 yılında Masood ve arkadaşları, PHA'ları kanser tedavisi için nanoterapötik araç olarak kullanmışlardır. Bu çalışmada, kanser hücre hattı A549'un inhibisyonu amacıyla, farklı formülasyonlarda poli-(3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) hazırlanmış ve Elliptikinin (EPT) kapsüllemesi için nanotaşıyıcı olarak kullanılmıştır. EPT, model bir antikanser ilacıdır. Burada, boş ve EPT yüklü nanopartiküllerin parçacık

boyutu, morfolojisi ve zeta potansiyeli gibi fiziko kimyasal özellikleri de araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmaya göre, EPT-PHBV nanopartiküllerinin A549 hücre hattı üzerindeki % inhibisyonu, *in vitro* deneyler altında ilacın biyoyararlanımını artırma kabiliyeti nedeniyle tek başına EPT'ye kıyasla yaklaşık iki kat daha yüksekti. Bu durum PHBV kopolimerlerinin kanser tedavilerinde kullanılabilecek bir araç olduğunu göstermiştir (Masood vd., 2013).

Bini ve arkadaşları, biyoaktif moleküllerin eşzamanlı, ikili salınımı için enjekte edilebilir bir jel olarak kullanılmak üzere jelatin ve poli-3-hidroksibutirat polimerik nanopartiküllerinden (PNP) oluşan nanokompozit bir jel geliştirmişlerdir. İkili ilaç enkapsülasyonu, PNP'de kurkumin (CM) ve jelatin matrisinde naproksen sodyum ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, PNP'nin eklenmesinin hem fiziksel hem de kimyasal jeller için saf jelatine göre depolama oranında bir artış sağladığını göstermiştir (Bini vd., 2017)

2017'de Senthilkumar ve arkadaşları, *Pseudomonas aeruginosa* SU-1 suşunu kullanarak polihidroksialkanoat üretimini optimize etmeyi ve ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistem olarak kullanmayı amaçlamışlardır. *P. aeruginosa* SU-1'den ekstrakte edilen PHA'nın polihidroksibutirat (PHB) olduğu belirlenmiş ve nanopresipitasyon yöntemiyle kurkumin kapsüllü nanopartiküller üretmek için kullanılmıştır (Senthilkumar vd., 2017).

2017 yılında yapılan başka bir çalışmada hepatoselüler karsinom (HCC) yani karaciğer kanserinde ilaç direncinin üstesinden gelmek için, ilaç ve genin birlikte dağıtım nanosistemleri olarak amfifilik katyonik polyesterin kullanımı araştırılmıştır. Bu raporda, PHB'nin biyoyuymurluğu, yüksek kristalizeliği, biyobozunurluğu ve hidrofobiklik gibi avantajları nedeniyle amfifilik poli [(R)-3-hidroksibutirat] –b-poli (2-(dimetilamino) etil metakrilat) (PHB-PDMAEMA) kopolimeri bazlı katyonik bir polyester tasarlanmıştır. P-glikoprotein ve değiştirilmiş prosurvival Bcl-2 ekspresyonu, HCC'de kemoterapinin başarısız olmasına yol açan ilaç direncinin kilit mekanizmasıdır. Bu çalışmada, katyonik nanopartikül taşıyıcılara kemoterapötik paklitaksel (PTX) ve Bcl-2 dönüşüm Nur77 genini yükleyerek ilaç direncinin üstesinden gelmek amaçlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, amfifilik katyonik polyesterlerin, ilaca dirençli kanser hücrelerindeki ilaç direncini inhibe etmek amacıyla ilaç ve gen birlikte dağıtım nanosistemleri olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Cheng vd., 2018).

Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) nanopartiküllerinin etkin ve uzun süren ilaç salınımı için umut verici bir ilaç taşıyıcı sistem olabileceğini göstermek için 2017’de Vardhan ve arkadaşları, dosetaksel yüklü PHBV nanopartiküllerinin geliştirilmesi üzerine çalışmışlardır. Bir antimitotik ajan olan desotaksel, güçlü bir anti-tümör aktivitesine sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucunda, PHBV nanopartiküllerin göğüs kanserinin daha iyi tedavi edilmesi için hidrofobik ilaç uygulamasında umut vaat eden bir araç olduğunu öne sürmüşlerdir (Vardhan vd., 2017)

2018’de Javan ve arkadaşları tarafından, poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) nanopartikülleri (NP) temel alan pramipeksol için uzun etkili bir formülasyon hazırlanmıştır. Bu çalışmada, parkinson hastalığının semptomlarının ilerlemesini azaltmaya yönelik dopamin seviyesini arttırmak amaçlanmış ve bu amaçla bir dopamin agonisti olan pramipeksol kullanılmıştır. Mevcut çalışma, nanopartiküllerin ilacın plazma dalgalanmalarını azaltmak amacıyla parkinson hastalığında alternatif bir tedavi olarak, pramipeksolün uzun süreli verilmesi için umut verici bir aday olduğunu kanıtlamıştır (Javan vd., 2018).

2.7. Yara İyileşme Süreci ve Kollajen

İnsan vücudundaki en büyük organ cilttir ve vücudu çevreden koruyan bir bariyer görevi görür. Cilt yüzeyinde meydana gelen hasarlar, yaralanma, yanma veya hastalıklardan kaynaklanabilir (Sugappriya vd., 2019). Yara iyileşmesi, biyokimyasal, moleküler ve hücrel tepkileri içeren karmaşık bir süreçtir. Hücrelerin yapışması ve çoğalması, fibroblastlar ve hücre dışı matris (ECM) oluşumunu gerektiren yara iyileşmesi sırasında meydana gelir. Ancak bu süreç bazı durumlarda çok yavaş gerçekleşir. Bu nedenle biyolojik olarak parçalanabilen bir iskele kullanılarak rejenerasyon süreci hızlandırılabilir. PHA’lar bu amaçla kullanılarak yapay hücre dışı bir matris görevi görürler (Veronica vd., 2019).

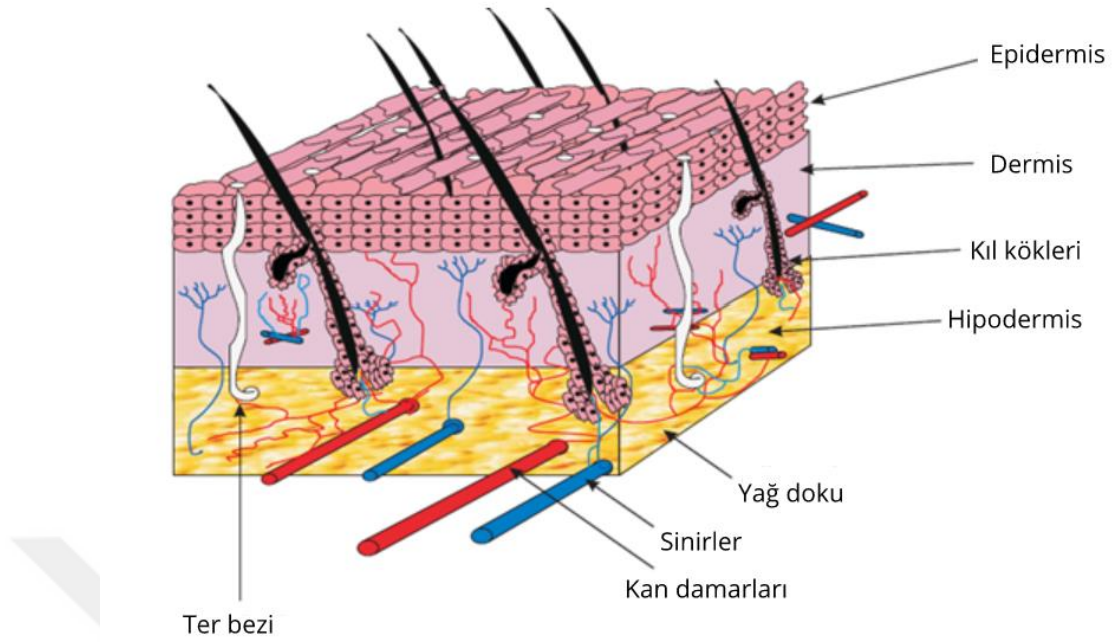
Doku mühendisliği ve yara iyileştirilmesinin birleştirilmesi, hasar görmüş cilt dokularının onarımı için iyileştirici biyomalzemeler/ iskeleler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Cilt yarası genellikle kazalar ve yanıklar sonucu oluşur ve kolay ve hızlı iyileşebilmesi için biyomimetik iskelelere ihtiyaç vardır. Küçük cilt yaraları normal bir şekilde iyileşebilirken, büyük hasarlarda cildin yerine geçecek ek desteklere ihtiyaç duyulur. Bu iskeleler, ekstrasellüler matriksin işlevini taklit eder ve kolay iyileşmeye

yardımcı olur. Ayrıca yaranın mikrobik enfeksiyon prevalansını önler (Ramanathana vd., 2017).

2.7.1. Yara iyileşme süreci

Omurgalıların en büyük organı olan deri, epidermis, dermis ve hipodermis olarak adlandırılan üç katmandan oluşur ve sinir, kan damarlarıyla bir dizi bağlantıya sahiptir. Bu üç katman, vücudu herhangi bir mekanik hasardan korumada önemli bir rol oynar. En üst katmanda epidermis bulunur ve bu katman mikroplara ve antijenlere karşı bir bariyer sağlar. Epidermisin hemen altında dermis bulunur. Bu yapı cildin kütlesini oluşturur ve kollajen, elastin ve glikozaminoglikanlardan (GAG'lar) oluşur. Dermiste bulunan ana hücre tipi, yara iyileşmesi sürecinde önemli bir rol oynayan proteazlar ve kollajenazlar gibi yeniden biçimlendirici (remodelling) enzimler üretebilen fibroblasttır. Son katman hipodermistir ve iyi vaskülarize edilmiş yağ dokusuna sahiptir. Bu katman, cilde termoregülasyon ve mekanik kuvvet kazandırılmasına katkıda bulunur (Şekil 2.11) (Metcalf ve Ferguson, 2006).

Yaralanma ve yara iyileşmesi vücudun her dokusunda ve organında gerçekleşir. İyileşme süreci, çeşitli immünolojik ve biyolojik sistemler arasındaki koordineli etkileşimleri içeren karmaşık bir süreçtir ve çok sayıda hücre, moleküler ve biyokimyasal aktivite içerir. Yara iyileşmesi biyolojik olarak 4 faza ayrılabilir. Bunlar; 1) Yaralanmadan hemen sonra başlayan, pıhtılaşma ve hemostaz, 2) Sonrasında gerçekleşen enflamasyon, 3) Yaralanmanın günleri içinde başlayan ve başlıca iyileşme süreçlerini kapsayan proliferasyon ve 4) Uzun süreç içerisinde gerçekleşen skar dokusu oluşumunun gerçekleştiği, yaranın yeniden biçimlenmesidir (remodelling) (Tablo 2.7) (Velnar vd., 2009).

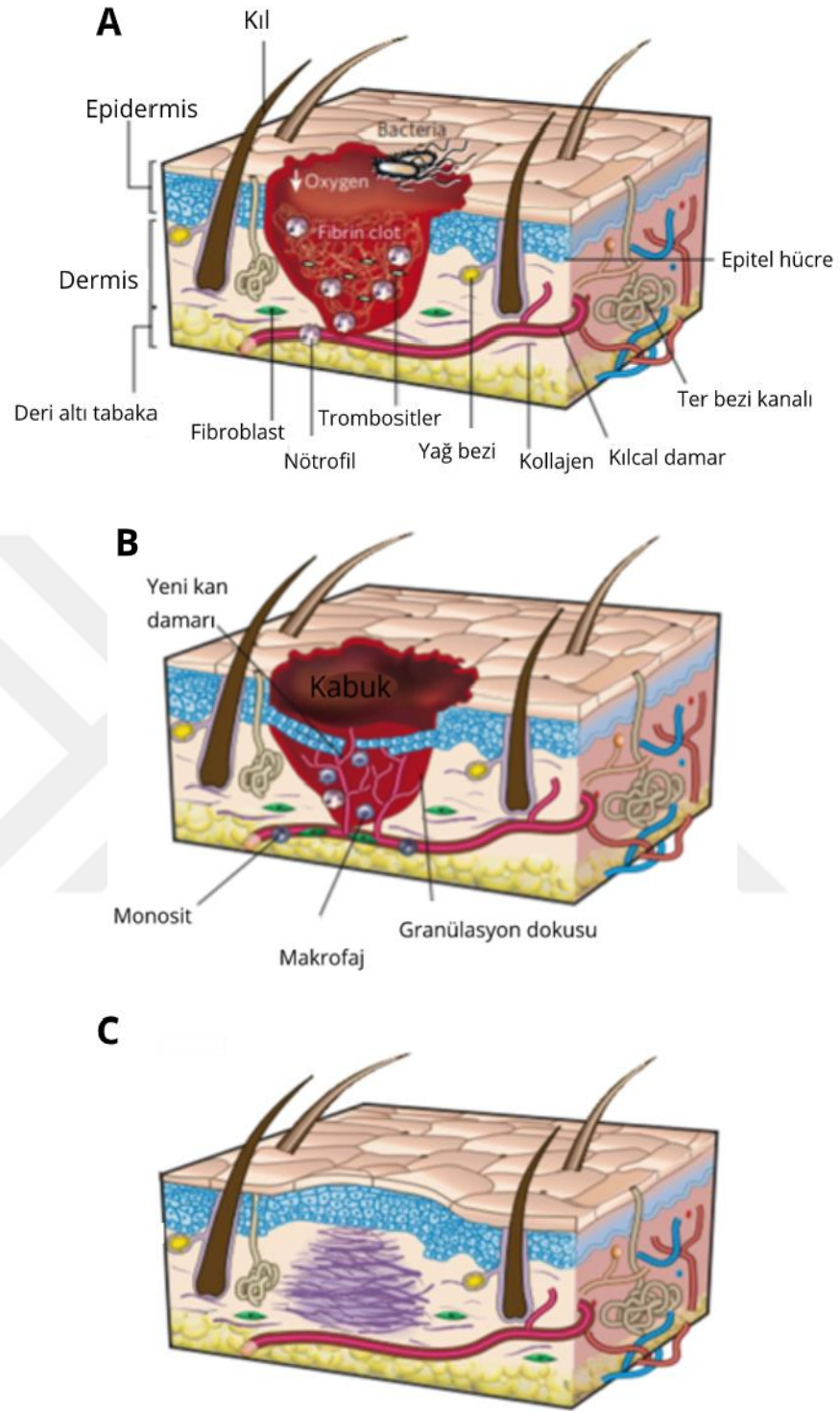


Şekil 2.11. Deri katmanlarının şematik görüntüsü (Metcalf ve Ferguson, 2006)

Yaralanma meydana gelir gelmez ilk olarak, yara iyileşmesinin ilk adımı olan hemostaz başlar. Hemostazın ilk evresi, yaralanmadan hemen sonra gerçekleşen vasküler daralma ve fibrin pıhtı oluşumu ile başlar (Guo ve DiPietro, 2009). Bu durum, sitokinlerin salınımını, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) - β vb. gibi büyüme faktörlerinin serbest bırakılmasına neden olmaktadır. Yara bölgesindeki kanamanın kontrolü sağlandıktan sonra, enflamatuar hücreler yara bölgesine kemotaksis yoluyla göç ederek ikinci aşama olan enflamasyonu başlatır (Şekil 2.12.A). Bu aşamada lenfositlerin, nötrofillerin ve makrofajların salınımı gerçekleşir. Nötrofiller, yara bölgesine ilk gelen ve akut inflamasyonu başlatan lökositlerdir. Bu hücreler, bakteriyel kontaminasyonu ve enfeksiyon oluşumunu engeller. (De Souza ve Shivakumar, 2019). Makrofajların yara iyileşme sürecinde birçok işlevi vardır. Makrofajlar ilk olarak, lökositleri aktive ederek enflamatuar yanıtın oluşmasını kolaylaştıran sitokinleri serbest bırakırlar. Ayrıca makrofajlar, apoptotik hücrelerin (nötrofiller dahil) indüklenmesi ve yok edilmesinden de sorumludur. Böylece enflamasyonun azalması sağlanır. Makrofajlar bu apoptotik hücreleri yok ederken, hücrelerin doku rejenerasyonu için uyarılmasını sağlar. Bu amaçla, keratinositleri, fibroblastları ve anjiyogenezi uyaran onarıcı bir

duruma geçiş sağlanır ve böylece proliferasyon fazı başlar. Bu fazda, epitel hücrelerinin proliferasyonu gerçekleşir (re-epithelialization) (şekil 2.12.B). Fibroblastlar ve endotel hücreler, kollajen oluşumu, kılcal damar büyümesi ve doku oluşumunu destekler (Guo ve DiPietro, 2009).

Fibroblastlar ilk olarak yaraya girdiklerinde, bolca çoğalırlar ve matris proteinlerini (hiyalronan, fibronectin, proteoglikanlar ve tip 1 ve tip 3 prokollajen) retirler. Yara iyileşmesinin ilerleyen süreçlerinde fibroblastlar, hücre göçünü daha da destekleyen ve onarım süreci için gerekli olan bol miktarda hücre dışı matris (ECM) retir. Kollajenler, yara iyileşmesinin tüm aşamalarında önemli bir bileşendir. Fibroblastlar tarafından sentezlenen bu proteinler, tüm dokulara bütünlük ve kuvvet kazandırır ve özellikle onarımın proliferatif ve remodeling aşamalarında önemli bir rol oynar. Yara iyileşmesinin son aşaması remodeling fazıdır ve bu süreç yıllarca sürebilir (şekil 2.12.C) (Velnar vd., 2009). Bu aşamada yeni oluşan kılcal damarların çoğunun regresyonu meydana gelir, böylece yaranın damar yoğunluğu normale döner. Yara iyileştikçe, fibroblastların ve makrofajların yoğunluğu apoptozla daha da azalır.



Şekil 2.12. Yara onarımının klasik aşamaları: A) Enflamasyon B) Yeni doku oluşumu C) Remodeling (Gurtner vd., 2008)

Remodeling fazının önemli özelliklerinden bir diğeri ise, ECM'nin fenotipik olarak normal dokuya yakın bir biçimde yeniden şekillenebilmesidir (Guo ve DiPietro, 2009).

Akut bir yaranın başarılı bir şekilde yeniden şekillenmesi, bozulma ve sentezi içeren tüm fazların işlevlerini doğru sırayla ve uygun bir süre boyunca hassas bir denge içerisinde, normal iyileşmeye yol açan düzenleyici mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmesine bağlıdır. Hücre içi matriks olgunlaşmasıyla kollajen demetlerinin çapı artar ve hyaluronik asit ve fibronektin bozulur. Yaranın gerilme kuvveti, kollajen toplanmasına paralel olarak aşamalı olarak artar. Sonuç olarak, azalmış sayıda hücre ve kan damarı ve yüksek gerilme kuvveti ile tamamen olgunlaşmış bir yara meydana gelir. (Velnar vd., 2009).

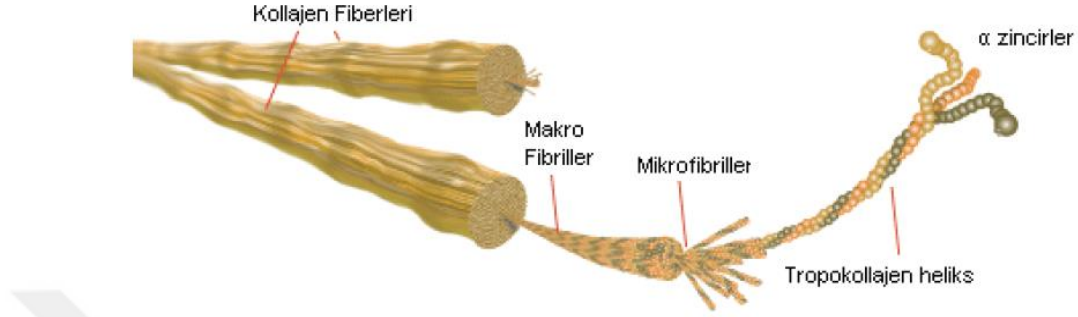
Tablo 2.8. Yara iyileşme süreci (Guo ve DiPietro, 2009)

Faz	Hücresel ve Biyofizyolojik Olaylar
Hemostaz	Vasküler daralma Pıhtı toplanması, degranülasyon ve fibrin oluşum (trombüs)
Enflamasyon	Nötrofil infiltrasyonu Monosit infiltrasyonu ve makrofaj farklılaşması Lenfosit infiltrasyonu
Proliferasyon	Re-epitelizasyon Anjiyogenez Kollajen sentezi
Remodeling	Hücre dışı matris (ECM) Kollajen remodeling Vasküler olgunlaşma ve regresyon

2.7.2. Kollajen

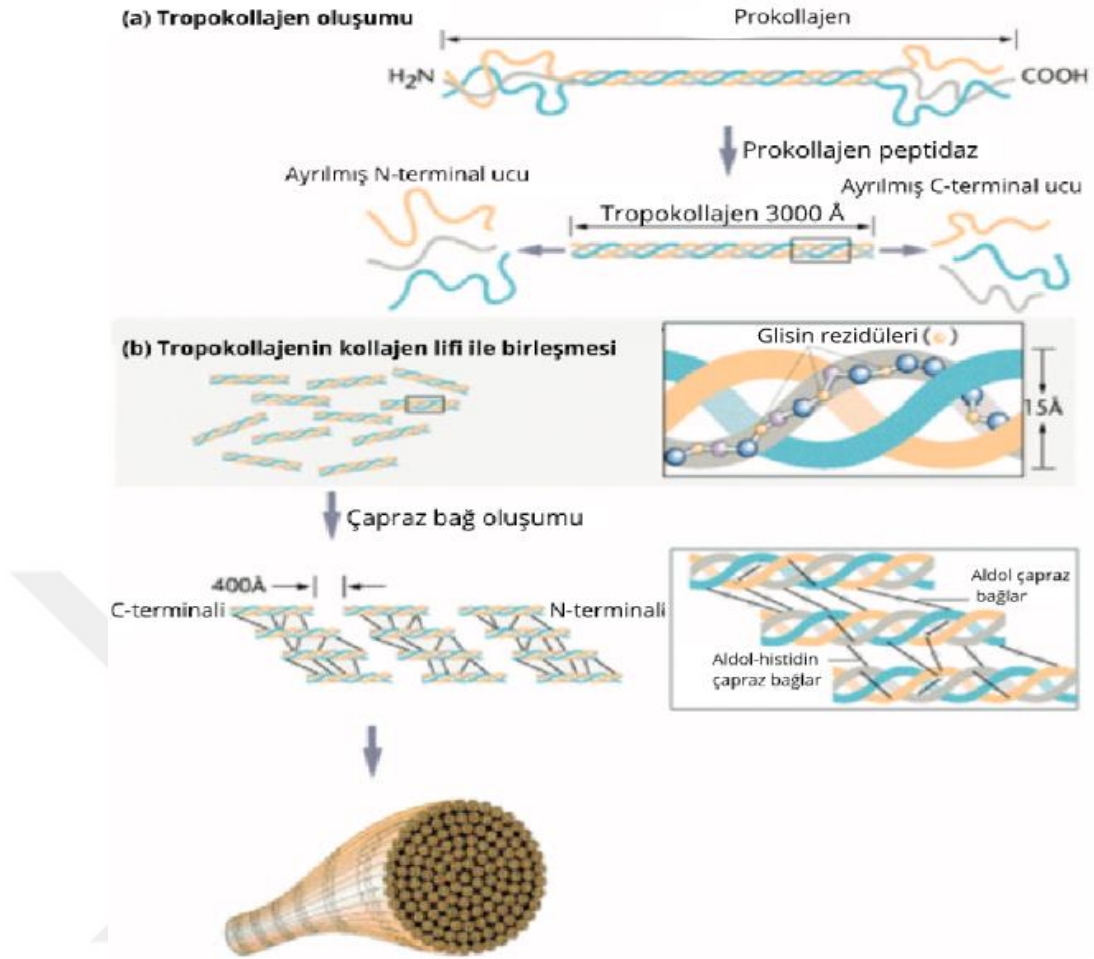
Kollajenler, insan vücudundaki en bol miktarda bulunan proteindir ve hücre dışı matrisin (ECM) en bol miktarda bulunan proteindir. Vücudun proteinlerinin üçte birini oluşturan kollajenler, ekstraselüler matrikste ve tendon, kıkırdak, kemiğin organik matriksi ve kornea gibi bağ dokularında bulunan başlıca fibröz glikoproteinlerdir. Bu proteinler bağ dokularına kuvvet, elastikiyet ve işlevsellik sağlar (Yalovaç ve Ulusu, 2007). Globüler proteinlerin aksine, doğrusal fiber benzeri bir yapıya sahip olan kollajen moleküllerinin en belirgin özelliği, üç polipeptit zincirinden oluşması ve üçlü helezon yapısına dönüşmesidir (Şekil 2.13) (Yetim, 2011; Sun vd., 2017). Kollajen proteinin yapı taşlarını oluşturan ve polipeptid alt birimlerden oluşan α -zincirleri, bir ortak eksen etrafında dönerek 3000 Å uzunluğunda ve 15 Å çapında çubuk benzeri molekülleri

oluştururlar. Bu zincirler, mikro fibrilleri, mikro fibriller makro fibrilleri ve daha sonra da makro fibriller bir araya gelerek kollajen fiberlerini meydana getirirler (Yetim, 2011).



Şekil 2.13. Kollajen proteininin organizasyonu (Yetim, 2011)

Kollajenin bugüne kadar çeşitli dokulardan yaklaşık 28 farklı üyesi tanımlanmıştır. Bunlardan en yaygın olarak bulunan Tip I kollajendir ve en fazla tendon, kemik, bağ ve deri gibi gerilme kuvveti gerektiren doku ve organlarda bulunur (Yetim H., 2011; Collier vd., 2018). Tip II kollajen özellikle kıkırdak dokularda bulunurken, Tip III kollajen ise yaşa bağlı olarak büyük değişiklikler göstermektedir (Yetim, 2011). Günümüzde tip I kollajen, biyoyumluluk, biyobozunabilirlik ve düşük antijenite gibi olumlu özellikleri sayesinde biyomedikal hammaddelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğal biyolojik makromoleküller arasında kollajen, hemostatik ajan ve yara pansumanının mükemmel emilebilir bir bileşenidir. Yapılan çok sayıda araştırma kollajenin, ilaç verme ve doku mühendisliğinde de kullanılabileceğini göstermiştir. Kollajen sünger, hemostazda ve yara iyileşmesinde, iyi gaz geçirgenliği, epitel hücrelerinin büyümesinin teşvik edilmesi ve granülasyon dokusu oluşumu gibi mükemmel özelliklerinden dolayı iyi bir şekilde uygulanabilir (Sun vd., 2017).



Şekil 2.14. Fibrilleri oluşturmak üzere düzenlenmiş, bireysel üçlü sarmallar veya tropokollajen molekülleri (Bhattacharjee ve Bansal, 2005)

Diğer birçok protein gibi, kollajen de primer, sekonder ve tersiyer yapılara sahiptir. Kollajen proteinini, üç farklı primer polipeptit zincirinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Örneğin, Tip I kollajen, 1014 adet aminoasitin yan yana gelmesiyle oluşmuş 3 polipeptiden meydana gelmektedir. Polipeptit zincirlerindeki glisin (Gly), tek başına aminoasit kompozisyonunun %33'ünü, prolin ve hidroksiprolin ise %22'sini oluşturmaktadır. Bu nedenle alfa (α) zincir olarak da adlandırılan bu yapı, Gly-X-Y diziliminin 334 kere tekrarlanması ile meydana gelmiştir ve burada X ve Y olan kısımlara çoğu kez prolin ve hidroksiprolin olmakla birlikte başka herhangi bir amino asit de olabilir (Yetim, 2011). Kollajenin yapısında on sekiz farklı amino asit bulunmaktadır ve dokuz zorunlu amino asitin sekiz tanesi (histidin, izölösin, lösin, lizin, metiyonin (sistein), fenilalanin, treonin, tirozin ve valin) kollajenin yapısında yüksek oranda mevcuttur (Bilek ve Bayram, 2015).

Kollajen, genellikle hücre dışı matriste fibril formunda bulunur. Fibril oluşturan kolajenlerin uzunluğu 300 nm, çapı 67 nm'dir. Fibril oluşturan kolajenler tip I, II, III, V ve XI olup, bu tür kolajenler vücutta en yaygındır (Yalovaç ve Ulusu, 2007). Diğer kolajen tipleri bir ağ yapı ya da tabakalardan oluşmalarından dolayı genel olarak lifli olmayan kolajenler olarak adlandırılırlar (Bilek ve Bayram, 2015). Kollajenin sağlam ve kararlı yapısı, fibriller arasında bulunan çapraz bağlardan kaynaklanmaktadır. Bu çapraz bağ yapıları da kovalent bağlardan oluşmuştur. Birçok kollajen fibrili bu çapraz bağlar sayesinde bir araya gelerek, deri, kemik, tendon gibi dokuların temel yapısını oluştururlar (Şekil 2.14) (Yetim, 2011).

Kollajen farmasötik uygulamalarda yaprak/ film, sünger, sprey ve hidrojel gibi çeşitli şekillerde yara sargı maddesi olarak kullanılmaktadır. Kollajen, daha hızlı iyileşme için iyi bir hücre adezyonu ve proliferasyonu için fibroblast çeken bir özelliğe sahiptir (Ramanathana vd., 2017). Kollajenin biyomedikal malzeme ve ilaç taşıyıcı olarak kullanımı için büyük çaba harcanmıştır. Kollajenin sayısız faydalı özelliğe sahip olmasından dolayı biyomalzeme olarak kullanışlı ve güvenli oluşu çokça gösterilmiştir. Filmler, peletler ve iskeleler gibi kollajen bazlı formlasyonlar, yara iyileştirici ilaçlar ve mikrobik öldürücüler de dahil olmak üzere lokal olarak aktif maddelerin sağlanması rollerini üstlenmiştir (Lee ve Lee, 2016).

2.8. İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç dağıtımı, insanlarda veya hayvanlarda terapötik bir etki elde etmek için farmasötik bir maddenin uygulanmasına yönelik geliştirilen bir yöntemdir (Tiwari vd., 2012). Farmasötik ve biyoteknolojik alanlarda ilacın etki göstereceği bölgeye taşınması önemli bir problemdir. Günümüzde ilaç kullanımında ortaya çıkan problemleri en aza indirmek için gelişmekte olan teknolojilerden yararlanılır ve bu amaç için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Yapılan çalışmalar spesifik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde etkili olmuştur. Bu sayede hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemleri elde edilmiştir. Bu sistemler, ilaçları daha etkili ve günümüzdeki ilaçlara kıyasla daha pratik bir şekilde hedefe iletilmesini sağlamaktadır (Tüylek, 2017).

Geliştirilen bu yeni ilaç dağıtım sistemleri; terapötik dozun istenilen oranda kontrollü bir şekilde verilmesi, verilen etkin maddenin etkinlik dozunun maksimuma çıkarılması, spesifik organ ve/veya dokuları hedef alması, uzun süreli tedavi süresince ilaç konsantrasyonunun optimal terapötik bir aralıkta tutulması, sık doz alımını en aza

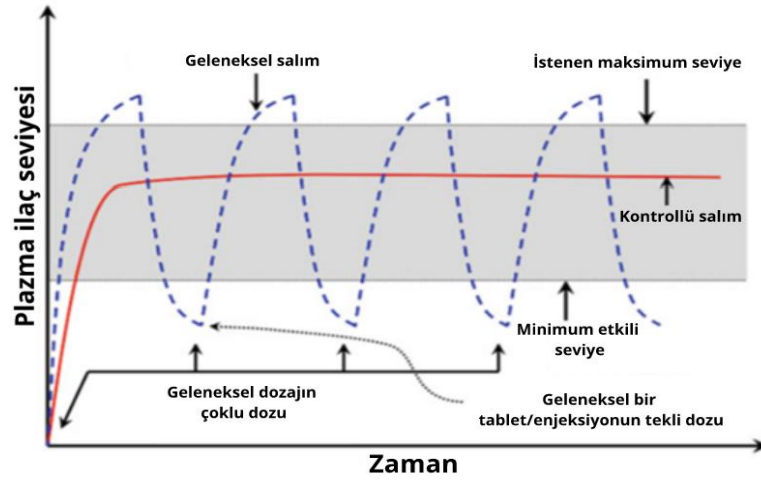
indirmesi, yan etkilerin azaltılması ve hasta uyumunun artırılması gibi avantajlardan bir veya birkaçını sağlamalıdır (Lin ve Chien, 2013). Uygun ilaç taşıyıcı sistemin, etkilerini belirlenen süre içerisinde göstermesi ve hedef doku dışında vücudun diğer kısımlarında etki göstermemesi beklenmektedir (Tülek, 2017). Yüklenen etkin maddeyi istenilen doku veya organa taşıyan sistemlere hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, yüklenen etkin maddenin salım hızını kontrol eden sistemlere ise kontrollü salım sistemleri adı verilmektedir (Özakar, 2014).

Modifiye edilmiş salım sistemleri, etkin maddenin salındığı hızı ve gönderildiği bölgeyi tanımlayan bir terimdir (Jha, 2012). Modifiye edilmiş ilaç salım sistemi türleri şunlardır;

Uzatılmış Salım Sistemleri (Extended-release systems): İlaç uygulamasından sonra etkin maddenin uzun süre boyunca kullanılabilir halde salınmasını sağlamak amacıyla hazırlanırlar. Uzatılmış salım, sürekli veya kontrollü salım sistemleri kullanılarak sağlanabilir (Jha, 2012).

Sürekli Salım Sistemleri (Sustained-Release Systems): Bu şekilde hazırlanan salım formlarında, ilaç uzun bir süre boyunca, salım sisteminin yönettiği oranda yavaş yavaş salınır. Böylece tedavi süresince, kandaki ilacın minimum etkili konsantrasyonu (MEC) sabit bir seviyede tutulur ve uzun süreli terapötik etki sağlanır (Jha, 2012).

Kontrollü Salım Sistemleri (Controlled-Release Systems): Kontrollü salım sistemlerinde ilaç sabit bir oranda salınır ve uygulamadan sonra plazmadaki konsantrasyonu zamanla değişmez. Kontrollü salım sistemlerinin özel yapıları nedeniyle, etkin maddenin terapötik seviyesini uzun süre boyunca korumak ve ilacı belirli bir hücre tipine vermek için, ilaç hareketini lokalize ederek uzun süre kontrollü hızda salım sağlanır (Şekil 2.15) (Jha, 2012).



Şekil 2.15. Geleneksel salım sisteminden ve kontrollü salım sisteminden salınan plazmadaki ilaç seviyeleri (Huynh ve Lee, 2015)

Hedeflendirilmiş kontrollü etkin madde salımı sağlayan sistemler, geleneksel salım sistemleri ile karşılaştırıldığında, düzeltilmiş etkinlik ve azaltılmış toksisite gibi çok sayıda üstünlüklere sahiptirler (Özakar, 2014).

Geciktirilmiş Salım Sistemleri (Delayed-Release Systems): Bu formda hazırlanan sistemlerde ilaçların, uygulamadan hemen sonra başka bir zamanda serbest bırakılması sağlanır. Genellikle enterik kaplama şeklinde hazırlanır (Jha, 2012).

Hedeflendirilmiş Salım Sistemleri (Targeted-Release Systems): Hedeflendirilmiş salımda ilacın, vücudun amaçlanan etki bölgesinde diğer bölgelerine göre daha yüksek konsantrasyonda olacak şekilde hastaya verilmesi sağlanır (Jha, 2012).

Tekrarlanan Etkili Sistemler (Repeat-Action Systems): Tekrarlanan etkili sistemler birden fazla etkin madde dozu içerir. Belirli zaman aralıkları ile bu dozların salımı gerçekleşir (Özakar, 2014).

İlaç taşıyıcı sistemlerde istenilen bir diğer özellik de etken maddenin vücuttaki bariyerleri aşarak hedef alana ulaşmasıdır. Bu amaçla geliştirilen nano taşıyıcılar, kan-beyin bariyeri, solunum sistemindeki bronşiyoller ve derideki sıkı bağlantılar gibi çeşitli anatomik ve biyolojik yapıları aşarak ilaçların hedef dokuya ulaştırılması sağlamaktadır (Tüylek, 2017). İlaç taşıyıcı sistemler arasında, nanopartiküller, nanoküreler, nanokapsüller, nanoemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar, niozomlar, lipozomlar,

dendrimerler, miseller, mikroküreler, katı lipid nanopartiküller, karbon nanotüpler ve polimerik sistemler sayılabilir (Vural ve Özer, 2015; Saygıner ve Çomoğlu, 2016).

Lipozomlar; fosfotipid yapıda, küresel şekilli, bir veya birden çok lipid çift tabakadan oluşan hem iç kısmında hem de tabakalar arasında sulu faz bulunan kapalı veziküllerdir (Saygıner ve Çomoğlu, 2016). Lipozomlar, biyouyumlu, nonimmünolojik yapıda olmaları, çok yönlü ve terapötik etkiyi güçlendirmeleri nedeniyle ilaç formülasyonlarının hazırlanmasında büyük ilgi çekmektedirler (Tüylek, 2017). Miseller; lipid ya da polimer yapıda, küresel ya da tabakalı ve nano boyutlarda büyüklüğe sahip olan yapılardır (Vural ve Özer, 2015). İlaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılan miseller, etken maddenin taşınmasını sağlamak için vücutta uzun süre kalabilir ve spesifik ligandlarla birleştiğinde vücutta istenilen bölgelere hedeflenebilirler (Tüylek, 2017). Nanoemülsiyonlar; birbirleriyle karışmayan su ve yağ fazının yüzey etkin madde varlığında oluşturulduğu sistemlerdir. Bu sistem hazırlanırken, dağılan faz nanometre boyutundaki damlacıklar halinde oluşur (Saygıner ve Çomoğlu, 2016). Katı lipid nanopartiküller (SLN); nanometre büyüklüğünde olan, oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipidler ile hazırlanan ve emülgatörler ile stabil hale getirilen partiküllerdir. Düşük toksisiteye sahip olmaları, etkin maddenin hedeflendirilmesi ve kontrollü salımı, etkin maddenin kimyasal bozunmaya karşı korunması gibi özelliklere sahiptirler (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006).

2.8.1. Kollicoat

Bir polivinil alkol-polietilen glikol greft kopolimeri olan Kollicoat, farmasötik yardımcı madde olarak, hızlı salımlı formülasyonların hazırlanmasında kaplama polimeri olarak geliştirilmiştir. Burada, polivinil alkol kısmı film oluşturma özelliği sağlarken polietilen glikol kısmı bir plastikleştirici görevi görür. Kollicoat molekülü hidrofiliktir ve bu nedenle suda iyi çözünür. İlaç taşınmasında ideal bir film oluşturunucudur. Kollicoat ile hazırlanan filmlerin, aktif bileşenleri hızlı bir şekilde serbest bırakması, sağlam ve esnek oluşu, kullanımı kolay ve güvenli oluşu önemli özellikleri arasındadır (Pathare vd., 2013).

2.8.2. Polietilen glikol (PEG)

Polietilen glikoller (PEG), tekrarlayan (n =tekrar sayısı) etilen oksit alt birimlerinden oluşan amfifilik polimerlerdir. PEG, çeşitli moleküler ağırlıklarda bulunur. Her bir etilen oksit rezidüsü, 44 Da'lık moleküler ağırlığa (MW) sahiptir. $n \times 44$ Da, PEG molekülünün ortalama moleküler ağırlığını göstermektedir (Bailon ve Berthold, 1998).

PEG, düşük toksisite, aşırı düşük immünojeniklik ve antijeniklik, sulu çözeltilerde yüksek çözünürlük ve kimyasal olarak aktive edilebilen iki terminal hidroksil grubu içermesi gibi mükemmel birçok özelliğe sahiptir (Zalipsky, 1995; Bailon ve Berthold, 1998).

Polimerin çoklu zincirleri, amaçlanan biyolojik olarak aktif bileşiklere kovalent bağlanır. Bu nedenle, genellikle biyomalzemelerin, partiküllerin ve proteinlerin kovalent modifikasyonu için tercih edilen başlangıç materyalidir (Zalipsky, 1995).

2.8.3. Eudragit

Sentetik polimerlerden eudragitler, akrilik asit (prop-2-enoik asit; $\text{CH}_2 = \text{CHCOOH}$) ve metakrilik asitlerin veya bunların butil ester veya dimetilaminoetil ester gibi polimerlerinin polimerleştirilmesiyle elde edilirler. Piyasada çeşitli eudragitler mevcuttur ve bunlar kuru toz, granüller, sulu dispersiyon veya organik çözelti gibi çeşitli formlarda bulunmaktadır. Eudragitler, metakrilik asit ve metakrilik veya akrilik esterlere dayanan anyonik, katyonik ve nötr kopolimerleri veya bunların değişen oranlarda türevlerini içeren kopolimerlerdir (Thakral vd., 2013). Eudragit RS 100, topikal uygulama için pek çok yara iyi edici formülasyonlarda kullanılmıştır. Genel olarak dayanıklı yapısı nedeniyle mekanik özelliği değiştirme amacıyla (Kouchak vd., 2014) ve kontrollü ilaç salım sağlayan özelliği nedeniyle, ilaç yüklü nanopartikül (Fan vd., 2019), mikrosünger (Panday vd., 2015), nanofiber (Fayab vd., 2014) ve film formlarında (Nawaz vd., 2018) yara üzerine topikal uygulanacak sistemlere dahil edilmiştir.

Nawaz ve arkadaşları, suda çözünürlüğü az olan kurkuminin topikal emilimini arttırmak amacıyla, karboksi polimetilen ve eudragit RS 100 matris polimerleri kullanılarak çözücü buharlaştırma tekniği ile kurkumin transdermal filmler geliştirmişlerdir. Perkütan absorpsiyonu arttırmak için DMSO, tween 80 ve oleik asitin kullanıldığı bu sistemin, kurkuminin topikal uygulanmasında etkin olduğunu belirlemişlerdir (Nawaz vd., 2018).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Madde Adı	Firma Adı
%85 Fosforik asit	: Merck, Almanya
2-Merkaptoetanol	: Amresco, Amerika
Akrilamit/Bisakrilamit (%30, 29:1)	: Applichem, Almanya
Amonyum persülfat (%99)	: Applichem, Almanya
<i>Bacillus cereus</i> 14579	: ATCC, Amerika
Bovine Serum Albümin	: Sigma-Aldrich Almanya
Brillant blue G	: Santa Cruz Biotechnology, Amerika
Bromfenol blue	: Amresco, Amerika
Diklorometan	: VWR, Fransa
Dipotasyum hidrojen fosfat	: Merck, Almanya
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	: Biological Ind. İsrail
Ethanol (%99,9)	: Merck, Almanya
Eudragit RS 100	: Röhm, Almanya
Glasiyel asetik asit	: Sigma-Aldrich Almanya
Glikoz	: Sigma-Aldrich, Almanya
Gliserol	: Sigma-Aldrich Almanya
Glisin	: Merck Almanya
Hidroklorik asit	: Merck, Almanya
Kalsiyum klorür	: Sigma-Aldrich, Almanya
Kloroform	: Sigma-Aldrich, Almanya
Kollajen	: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Türkiye
Kollicoat MAE100P	: Basf, Almanya
Magnezyum sülfat heptahidrat	: Merck, Almanya
Maya ekstresi	: Merck, Almanya
Metanol	: Merck Almanya
MTT boyası	: Applichem Almanya
n-Butanol	: Sigma-Aldrich Almanya
Nutrient agar	: Merck, Almanya

Nutrient broth	: Merck, Almanya
Polietilen glikol 400 (PEG 400)	: Tekkim, Türkiye
Potasyum dihidrojen fosfat	: Horasan Kimya, Türkiye
Potasyum klorür	: Merck, Almanya
Potasyum nitrat	: Merck, Almanya
SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)	: Merck Almanya
SDS için protein işaretleyici (4 renkli 10-260kDa)	: Thermo Scientific Amerika
Sodyum fosfat dibazik	: BioShop, Kanada
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
Sodyum hipoklorit	: Merck, Almanya
Sodyum klorür	: Merck, Almanya
Span 80	: Merck, Almanya
TEMED (Tetrametiletildiamin)	: Applichem Almanya
Tripsin/EDTA	: Biological Ind. İsrail
Trizma baz	: Sigma-Aldrich Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Firma Adı
Bruker UltraShield 300 spektrometresi	: Bruker, ABD
Büyük kapasiteli santrifüj	: Eppendorf 5810, Almanya
Çalkalayıcı etüv	: New Brunswick™ Innova® 42R, Amerika
Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC)	: Shimadzu DSC-60, Japonya
Dikey jel elektroforezi	: UVP, Amerika
Distile su cihaz	: Millipore, Amerika
Dondurucu (-20 °C)	: Arçelik, Türkiye
Dondurucu (-80 °C)	: New Brunswick Sci., Amerika
Floresan mikroskop	: Leica 400DMI, Almanya
FTIR spektrofotometresi	: Shimadzu, Japonya
Güç kaynağı	: Consort E861, Belçika
Hassas terazi	: Ohaus, Amerika
İnvert mikroskop	: Leica DMIL, Almanya
Jel dokümantasyon cihazı	: Uvitec Cambride, İngiltere
Laminar akış kabini	: Heal, Force Çin
Liyofilizatör	: Coolsafe 110-4 Pro, ScanVac, İskandinav
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph, Almanya
Orbital karıştırıcı	: Stuart SSL1, İngiltere
Otoklav	: Hirayama, Japonya
Otomatik mikropipetler	: Eppendorf, Almanya
pH-metre	: Mettler Toledo, Amerika
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	: Hitachi TM3030 plus Tabletop Microscope, Japonya
UV Spektrofotometre	: Shimadzu, Japonya
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech Co., Çin
X-ışını difraktometresi (XRD)	: Miniflex 600, Rigaku, Japonya

4. YÖNTEM

4.1. *Bacillus cereus* İçin Büyüme Ortamı ve PHA Üretimi İçin Kültür Koşulları

Deneyin ilk aşamasında *Bacillus cereus* suşu için yüksek hücre yoğunluğunda bir kültür üretmek amacıyla besin kısıtlaması olmaksızın büyüme gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. *Bacillus cereus*'un canlandırılması

Öncelikle ATCC'den temin edilen *Bacillus cereus* 14579 nolu suş için canlandırma prosedürü gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak, Tablo 4.1'deki ATCC tarafından belirlenen içeriklere sahip Nutrient agar (NA) ve Nutrient broth (NB) besiyerleri hazırlanmıştır (http-1).

Tablo 4.1. Besiyeri içerikleri (http-1)

Nutrient Agar (NA)		Nutrient Broth (NB)	
Beef Extract	3 gr/ L	Beef Extract	3 gr/ L
Pepton	5 gr/ L	Pepton	5 gr/ L
Agar	15 gr/ L	-	-

Nutrient Broth ve Nutrient Agar besiyerleri için Tablo 4.1'de belirtilen içerikler ayrı ayrı olarak 1 L distile suda çözündürüldükten sonra pH değerleri pH-metre (Mettler Toledo, Amerika) yardımıyla, 1 N hidroklorik asit (HCl) ve 1 N sodyum hidroksit (NaOH) kullanılarak 6.8 +/- 0.2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan Nutrient Broth'lar 8 mL olacak şekilde cam durham tüplerine porsiyonlara ayrılarak ağızları pamukla kapatılmıştır. Otoklav cihazında (Hirayama, Japonya) 121 °C'de 20 dk steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyerlerinden Nutrient Agar'lar ise 45 °C'ye geldikten sonra laminar akış kabini (Heal, Force Çin) içerisinde aseptik koşullarda plastik petrilere yaklaşık 15-20 mL dökülerek donması beklenmiştir. Hazırlanan besiyerleri kullanılacakları süreye kadar +4 °C'de saklamaya alınmıştır.

Seri seyreltme aşamasında kullanılmak üzere serum fizyolojik (SF) hazırlamak için, 1 L distile su içine 9 gr Sodyum klorür (NaCl) eklenmiş ve çözündürülmüştür. Çözeltinin pH'sı 1 N NaOH ile 7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve çözelti 9 mL 'lik porsiyonlar halinde

cam durham tüplerine aktararak ve ağızları pamukla tıkanarak, 121°C’de 20 dakika otoklav ile sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılmıştır.

Besiyerleri ve SF hazırlandıktan sonra, organizmaların canlandırılması ve saflığının doğrulanması için yapılan aşağıdaki tüm adımlar bek alevi yanında aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

- 1 mL steril pH 6,8 Nutrient Broth besiyeri alınıp liyofilize mikroorganizma üzerine eklenerek hücreler dispers oluncaya kadar pipetaj ile dağıtılmıştır edilmiştir.
- Organizmaları içeren besiyerinin tamamı pipetle çekilerek, başka bir cam tüpte bulunan steril 8 mL pH 6,8 Nutrient Broth besiyeri üzerine eklenmiştir.
- Ekim yapılan tüp, 30 °C’lik bir etüvde (New Brunswick™ Innova® 42R, Amerika) 24 saat inkübe edilmiştir.
- 24 saat inkübasyondan sonra tüp vortekslenerek tamamen dispers olması sağlanmıştır. Dispers olan bu bakteri süspansiyonundan 1 mL alınarak serum fizyolojik ile 10 mL’ye tamamlanmış daha sonra 10^{-1} - 10^{-7} konsantrasyon aralığında seri dilüsyon ile seyreltilmiştir.
- Seri seyreltme yapılan son üç tüpten (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) 100 µl alınarak agarlı besiyeri üzerine drigalski spatülü ile yayılmış ve 30 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra, üreyen bakteriyi tek koloniye düşürmek için üç ayrı petriden alınan örnekten öze ile aseptik koşullarda başka petrilere ayrı ayrı çizgi ekim yapılmıştır ve bunlar 30 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Çizgi ekim sonucunda tek düşen kolonilerin gram pozitif ve saf olduğunu belirlemek amacıyla gram boyama yapılmıştır. Bu yöntemle saf ve gram pozitif olduğu belirlenen organizmalar, uzun süreli saklamak amacıyla, cryotüplerde bulunan %20 Gliserol içeren 1 mL steril pH 6,8 Nutrient Broth besiyeri içerisine öze yardımı ile aseptik koşullar altında tek koloni halinde alınmıştır. Organizma bulunan cryotüpler vortekslenerek tamamen dispers olması sağlanmış ve tüplerin kapakları parafilmlenerek -20 °C ve -80 °C’de saklamaya alınmıştır.
- Bundan sonraki aşamada çalışmaya devam etmek için, tek düşen kolonilerden steril pH 6,8 Nutrient Agar yatık besiyerine ekim yapılarak 30 °C’de 24 saat

inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında tüpler +4 °C'ye kaldırılmıştır. İleriki çalışmalara bu kültürden devam edilmiştir.

4.1.2. Gram boyama

Gram boyama, bakterileri gram-pozitif ve gram-negatif olmak üzere iki temel hücre çeşidine ayırır. Gram boyama meknizmasında, mikroorganizmaların hücre duvarı yapılarından yararlanır. Böylece gram boyama sonucu gram-pozitif bakteriler mor renkte gözlemlenirken gram-negatif bakteriler pembe-kırmızı renkte gözlemlenirler (Beveridge, 2001).

Bu çalışmada ATCC'den satın alınan *Bacillus cereus* 14579 suşunun saflığını doğrulamak amacıyla gram boyama yapılmıştır. Bunun için, Coico'nun uygulamış olduğu yöntem temel alınarak kullanılacak solüsyonlar hazırlanmış ve aşağıdaki adımlar gerçekleştirilmiştir (Coico, 2006).

Kristal viyole çözeltisi

Çözelti A: 20 gr kristal viyole 100 mL %95 etanolde çözündürülmüştür.

Çözelti B: 1 gr amonyum oksalat 100 mL distile suda çözündürülmüştür.

Çözelti A 1: 10 oranında distile suyla (d.su) seyreltilmiş ve 4 hacim Çözelti B ile karıştırılmıştır. Gram boyama çalışmasında bu çözelti kullanılmıştır.

İyot çözeltisi

1 g iyot kristali ve 2 g potasyum iyodür 5 mL suda eritilmiştir. Daha sonra 240 mL su ve 60 mL %5 (a/h) sodyum bikarbonat çözeltisi eklenmiştir.

Renk giderici solüsyon

Eşit hacimlerde %95 etanol ve aseton karıştırılmıştır.

Safranin çözeltisi

2,5 gr safranin O 100 mL %95 etanolde çözündürülmüştür.

1. Öncelikle gram boyama yapılacak koloniler belirlenmiştir. Sonrasında temiz bir lam üzerine bir damla su damlatılarak belirlenen koloniden bek alevi yanında öze ile bir miktar alınmış ve lam üzerindeki su yardımıyla örnek yayılmıştır.
2. Örneğin kuruması için beklenmiş ve kuruduktan sonra lam iki veya üç defa alevden geçirilerek örnekler ısıyla fikse edilmiştir.

3. Fikse edilmiş örnek üzerine, tamamı kaplanacak şekilde kristal viyole çözeltisi damlatılmış ve 1 dk bekletilmiştir. Beklenen süre sonunda kristal viyole çözeltisi distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.
4. Yıkanan örnek üzerine, tamamı kaplanacak şekilde iyot çözeltisi damlatılmış ve 1 dk bekletilmiştir. Beklenen süre sonunda iyot çözeltisi distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.
5. Yıkanan örnek üzerine, tamamı kaplanacak şekilde renk giderici solüsyon eklenerek 30 sn bekletilmiştir. Beklenen süre sonunda renk giderici solüsyon distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.
6. Yıkanan örnek üzerine, tamamı kaplanacak şekilde safranin çözeltisi damlatılmış ve 1 dk bekletilmiştir. Beklenen süre sonunda safranin çözeltisi distile su ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.
7. Boyanan örnekler kuruması için bekletilmiştir.
8. Kuruyan örnekler, 100x büyütme kullanılacağı için immersiyon yağı damlatılarak ışık mikroskobu (Leica DMIL, Almanya) altında incelenmiştir.

4.1.3. *Bacillus cereus*'un üretimi

Bacillus cereus 14579 suşunun üretimi, literatürde yer alan Singh ve diğerlerinin uyguladığı yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Singh vd., 2013).

İlk olarak, yatık agara ekilmiş olan, canlandırılan ve saflığı doğrulanan *Bacillus cereus* 14579 suşundan bek alevi yanında öze ile bir miktar alınarak, 8 mL'lik steril pH 6,8 Nutrient Broth (3 gr/ L Beef Extract ve 5 gr/ L Pepton) besiyerine ekim yapılarak aşılannmıştır. Bu aşı kültür 30 °C'lik bir etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 600 nm'deki Optik Density (OD) değeri UV spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) kullanılarak okutulmuştur. OD₆₀₀ değerinin yaklaşık 0,7- 0,8 aralığında olduğu belirlenen ve bu değer aralığında sabitlenen aşı kültürlerinin inkübasyon süresi sona erdirilmiş ve buradan %1 (h/h) oranında alınarak 250 mL'lik cam erlen içerisinde bulunan 30 mL steril pH 6,8 Nutrient Broth içerisine ekilmiştir. 30 °C'de 200 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve sonrasında UV spektrofotometrede 600 nm dalga boyunda Optik Densite (OD)'si ölçülmüştür.

4.1.4. PHB üretimi için sınırlayıcı besiyerleri

Literatürde, farklı *Bacillus* suşları tarafından karbon kaynağı olarak glikoz kullanılarak PHB üretimi gerçekleştiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Valappil vd.,

2007; Kumar vd., 2009; Philip vd., 2009). Valappil ve arkadaşlarının 2007’de ve Philip ve arkadaşlarının 2009’da *Bacillus cereus* SPV suşu üzerinde yaptıkları çalışmalarda, karbon kaynağı olarak glikoz kullanarak farklı sınırlayıcı ortamlarda üretilen polimerin PHB olduğunu doğrulamışlardır.

Bu çalışmada, Nutrient Broth besiyerinde üretilen *Bacillus cereus* 14579 suşunun, PHB üretimini sağlamak için sınırlayıcı besiyerine ekimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için literatürde bulunan farklı sınırlayıcı besiyeri örnekleri incelenerek aşağıda belirtilmiş olan 2 farklı sınırlayıcı besiyeri denenmiştir.

1. Sınırlayıcı

30 mL’lik steril pH 6,8 Nutrient Broth besiyerinde üretilen organizmalar, PHA üretimi için hazırlanan sınırlayıcı besiyeri üzerine aseptik koşullarda ekilmiştir. Bunun için Valappil ve arkadaşlarının 2007 yılında çalıştığı fosfat sınırlayıcı besiyeri ve PHB üretim koşulları kullanılmıştır (Valappil vd., 2007).

1 L’lik cam erlen içerisinde 300 ml’lik sınırlayıcı besiyeri hazırlanmıştır. Bunun için Tablo 4.2’de belirtilen oranlara göre tartılan maddeler 300 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. pH değeri pH metre kullanılarak 1 N HCl ve 1 N NaOH ile $7 \pm 0,2$ ’ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 20 dk otoklavlanmıştır.

Tablo 4.2. 1. Sınırlayıcı besiyeri içeriği (Valappil vd., 2007)

Glikoz	20 g/ L
Potasyum Nitrat (KNO ₃)	0,5 g/ L
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,2 g/ L
Kalsiyum Klorür (CaCl ₂)	0,2 g/ L
Sodyum Klorür (NaCl)	0,1 g/ L
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	8 mg/ mL
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	2,8 mg/ mL

30 mL pH 6,8 Nutrient Broth besiyeri içerisinde 24 saat büyütülen organizmalar, 1 L’lik erlen içerisinde hazırlanmış olan 300 mL’lik sınırlayıcı besiyerine bek alevi yanında

aseptik koşullarda eklenmiştir. Sınırlayıcı besiyerine aktarılan organizmalar 30 °C’de 200 rpm’de çalkalayıcı etüvde 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 72 saatin sonunda elde edilen bu yeni bakteri süspansiyonu, eşit miktarlarda olacak şekilde 50 mL’lik konik tabanlı falkon tüplerine porsiyonlar halinde bölünerek 11.000 rpm’de, 25 °C’de, 30 dakika santrifüj (Eppendorf 5810, Almanya) edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatantlar atılmış, pelletler üzerine 5 mL distile su konulmuş ve pelletin disperse edilmesi için vortekslenmiştir. Elde edilen dispersiyonlar tek falkon tüpünde toplanmış, 11.000 rpm’de, 25 °C’de, 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kuru kütle tayini yapmak için pelletler 1 mbar vakum altında, -110 C°’de liyofilize (ScanVac, İskandinav) edilmiştir.

2. Sınırlayıcı

30 mL’lik pH 6,8 Nutrient Broth besiyerinde üretilen organizmalardan PHB üretimi için, Kumar ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınladığı sınırlayıcı besiyeri ve PHB üretim koşulları kullanılmıştır (Kumar vd., 2009).

1 L’lik cam erlen içerisinde 400 mL’lik sınırlayıcı besiyeri hazırlanmıştır. Bunun için Tablo 4.3’te belirtilen oranlara göre tartılan maddeler 400 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. pH değeri pH metre kullanılarak 1 N HCl ve 1 N NaOH ile 7, 2’ye ayarlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 121 °C’de 20 dk otoklavlanmıştır.

Tablo 4.3. 2. Sınırlayıcı besiyeri içeriği (Kumar vd., 2009)

Maya Ekstresi	1 g/ L
Dipotasyum hidrojen fosfat (K ₂ HPO ₄)	1 g/ L
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,5 g/ L
Glikoz	10 g/ L

30 mL pH 6,8 Nutrient Broth besiyeri içerisinde 24 saat büyütülen organizmalar, 1 L’lik erlen içerisinde hazırlanmış olan 400 mL’lik sınırlayıcı besiyerine bek alevi yanında aseptik koşullarda eklenmiştir. Sınırlayıcı besiyerine aktarılan organizmalar 30 °C’de 200 rpm’de çalkalayıcı etüvde 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda elde edilen bu yeni bakteri süspansiyonu, eşit miktarlarda olacak şekilde 50 mL’lik konik

tabanlı falkon tüplerine porsiyonlar halinde bölünerek 11.000 rpm’de, 25 °C’de, 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, süpernatantlar atılmış, pelletler üzerine 5 mL distile su konulmuş ve pelletin disperse edilmesi için vortekslenmiştir. Elde edilen dispersiyonlar tek falkon tüpünde toplanmış, 11.000 rpm’de, 25 °C’de, 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kuru kütle tayini yapmak için pelletler 1 mbar vakum altında, -110 C°’de liyofilize edilmiştir.

4.2. Kloroform (CHCl₃) ve Sodyum Hipoklorit (NaClO) Dispersiyonu Kullanılarak PHB Ekstraksiyonu

Farklı sınırlayıcı besiyerlerinde üretilerek elde edilmiş hücre lizatlarından PHB’nin ekstraksiyonu için bir sodyum hipoklorit çözeltisi ve kloroform dispersiyon yöntemi kullanılmıştır (Hahn vd., 1993). Bu yöntemde üç ayrı faz gözlemlenir. Üst fazda sodyum hipoklorit çözeltisi, orta fazda PHA dışı hücre metaryalleri ve bozulmamış hücreler, en altta ise PHA’yı içeren kloroform fazı bulunur. Buradan kloroform fazı çekilerek çözücü olmayan bir madde ile çökeltilir (Jacquel vd., 2008).

Kuru hücre ağırlıklarını belirleyerek verim hesabı yapılması için liyofilize edilen örneklerden sonra, ileriki ekstraksiyon çalışmalarında Kourmentza’nın yönteminde belirtildiği gibi ıslak hücrelerden ekstraksiyon yapılarak devam edilmiştir (Kourmentza vd., 2017). Bundan sonraki aşamada uygulanacak olan ekstraksiyon prosedürü, literatürde yer alan Hahn ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem baz alınarak gerçekleştirilmiştir (Hahn vd., 1993).

İlk olarak Bölüm 4.1’de anlatıldığı gibi; farklı sınırlayıcı besiyerleri üzerinde üretilmiş ve çöktürülmüş bakteri pelletleri üzerine 50 mL % 30 hipoklorit çözeltisi eklenmiş, homojen bir dağılım elde edilinceye kadar tüp vortekslenmiş ve dağıtılmış bakteri lizatı 250 mL’lik cam erlene aktarılmıştır. Üzerine bakteri içindeki polimeri çözmesi için 50 mL kloroform eklenerek 30 °C’lik bir etüvde 200 rpm’de 150 dk karıştırılmaya bırakılmıştır.

Bu aşamada kullanılan sodyum hipoklorit hücre zarına zarar vererek PHB’nin hücre dışına salınmasına yardımcı olur. Serbest kalan PHA, kloroform fazına geçerek çözünür. Böylece sodyum hipoklorit sayesinde hücre kalıntıları ve nükleik asitler ekstre olurken, kloroform sayesinde PHA molekülleri, sodyum hipokloritin yıkıcı etkisine fazla maruz kalmadan çözünmüş olur (Hahn vd., 1994).

150 dk sonunda etüvden çıkarılan örnekler 50 mL'lik falkon tüplere alınarak 30 °C 11.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda tüplerde 3 ayrı faz gözlemlenmiştir. Oluşan üç fazdan alttaki kloroform fazı pipetle çekilerek başka bir 50 mL'lik falkon tüpe aktarılmıştır. Son hacim 5 mL olacak şekilde, bu kloroform fazının oda ısısında uçarak konsantre olması beklenmiştir. Konsantre olan kloroform üzerine, -20 °C'den çıkarılan 10 hacim soğuk etanol dökülerek PHA moleküllerinin çökmesi sağlanmıştır (Valappil vd., 2007). Polimerin alkol varlığı ile çökmesi için, tüpler bir gece oda ısısında ağzı kapalı bir şekilde bekletilmiş daha sonra 5.000 rpm'de 25 °C'de 15 dakika santrifüjlenerek polimerin tüplerin dibine çökmesi sağlanmıştır. Tüplerden süpernatant kısım yavaşça çekilerek atılmıştır. Çöken polimerin kuruması için oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra tartımları yapılmıştır.

4.2.1. PHB veriminin hesaplanması

PHB veriminin hesaplanması için, kloroform fazından her bir örnek için 1 mL alınarak klorform fazı tamamen uçuruldu. Kloroformun uçması ile tüpte oluşan yapı üzerine 5 ml H₂SO₄ ilave edilerek 100 °C'de 10 dk bekletildi. Örnekler soğuduktan sonra absorbans değerleri, krotonik asite karşı bir spektrofotometrede 235 nm dalga boyunda ölçüldü (Güngörmedi vd., 2014). Bu yöntem PHB' yi ölçmek için kullanılabilen basit ve spesifik bir yöntemdir. Bu yöntemin iki ilkesi vardır; birincisi, poli-hidroksibütiratı konsantre sülfürik asit içinde ısıtılarak kantitatif olarak krotonik aside dönüştürmek, ikincisi ise konsantre sülfürik asit çözücü olduğunda, krotonik asidin ultraviyole absorbansını maksimumunun 235 nm'ye kaydırılarak ölçüm sağlamaktır. Böylece β-hidroksi asitler ve poli-β-hidroksibutirik asit için uygun bir analiz gerçekleştirilmektedir (Law ve Slepecky, 1961).

Çıkan değerler denklem (4.1)'de yerine konularak PHB verimi hesaplandı (Odeniyi ve Adeola, 2017).

$$\%PHB = \frac{PHB \text{ Konsantrasyonu}}{Kuru Hücre Ağırlığı} \times 100 \quad (4.1)$$

4.3. Kollajenin Miktar Tayini

Kollajenin kalibrasyon grafiğini oluşturmak için Bradford Yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, Commassie Brilliant Blue G-250 çözeltisinin protein varlığında verdiği renk değişimlerine ait gözlemlenen absorbans değişimine dayanmaktadır. Boya serbest haldeyken kırmızı renktedir. Protein çözeltisi eklendiğinde, boyanın sülfonik gruplarının

elektrostatik çekim ile proteine bağlanmaktadır. Böylece boyanın rengi kırmızıdan maviye dönmektedir. Protein- boya kompleksi oluştuktan sonra $A_{max}=595 \text{ nm}$ 'de alınan ölçüm bir numunenin protein içeriğinin doğru bir şekilde ölçülmesini sağlamaktadır. Bu yöntem de iki dakika içinde renk oluşmaktadır ve bir saat kadar stabil kalmaktadır (Bonjoch ve Tamayo, 2001).

Çalışma boyunca kollajenin miktar tayini Bradford yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Grafik oluşturulurken standart protein örneği olarak Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılmıştır. BSA stok çözeltisi aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmış ve pH 7,4 fosfat PBS (Phosphate buffered saline) tampon çözeltisi kullanılarak 1-10 μg ve 10-100 μg olmak üzere 2 farklı konsantrasyon aralığında seyreltmeler yapılarak 1 mL'lik tek kullanımlık plastik küvetlere aktarılmış, UV spektrofotometrede (Shimadzu, Japonya) absorbans değerleri belirlenmiştir. Kruger'in uyguladığı yöntem esas alınarak aşağıdaki işlemler uygulanmıştır (Kruger, 2009).

Bradford Reaktifinin Hazırlanması

100 mg Commassie Brilant Blue G-250, 50 mL%95'lik etanolde çözünmüştür. Üzerine 100 mL%85'lik fosforik asit ilave edilerek 0,22 μm filtre ile süzölmüştür. Süzöldükten sonra distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır (Kruger, 2009).

Standart Protein Çözeltilerinin Hazırlanması

Öncelikle stok olarak kullanılacak BSA çözeltilerinin hazırlanmasında ve bu çözeltilerin seyreltilmesinde kullanılacak olan PBS tamponu Tablo 4.4'te belirtilen oranlarda hazırlanmıştır.

Tablo 4.4. PBS tamponu için gerekli bileşenler ([http-2](#))

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KH_2PO_4	0.24 g

Belirtilen miktarlarda tartılan tuzlar 800 mL'lik distile suda sırasıyla çözünmüştür. Hazırlanan tamponun pH değeri pH metre kullanılarak 1 N HCl ve 1 N NaOH ile 7,4'e ayarlanarak hacim 1 L'ye tamamlanmıştır ve 2 farklı seyreltme oranları (Tablo 4.5 ve Tablo 4.6) kullanılarak elde edilen değerlerle 2 kalibrasyon eğrisi çıkarılmıştır.

1-10 µg aralığında seyreltme için;

Çözücü olarak pH 7,4 PBS kullanılarak 100 µg/mL konsantrasyonunda stok BSA çözeltisi hazırlanmıştır ve Tablo 4.5'te belirtilen oranlarda seyreltmeler yapılmıştır.

Tablo 4.5. 1-10 µg aralığı için 100 µg/mL konsantrasyonunda ki BSA stok çözeltisinin PBS ile seyreltme oranları

	Stok BSA çözeltisi (100 µg/mL)	PBS
	µL	µL
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10
10	100	0

Tabloda verildiği gibi hazırlanan her 100 µL'lik örnek üzerine 1 mL Bradford reaktifi eklenerek ölçüm yapılmıştır. Kör olarak 100 µL PBS ve 1 mL Bradford reaktifi karışımı kullanılmıştır (Kruger, 2009).

10-100 µg aralığında;

1 mg BSA, 1 mL pH 7,4 PBS tamponunda çözündürülerek 1 mg/mL konsantrasyonunda BSA stok çözeltisi hazırlanmış ve Tablo 4.6'da verildiği gibi seyreltmeler yapılmıştır.

Tablo 4.6. 10-100 µg aralığı için 1 mg/mL konsantrasyonunda ki BSA stok çözeltisinin PBS ile seyreltme oranları

	Stok BSA çözeltisi (1 mg/mL) µL	PBS µL
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10
10	100	0

Tabloda verildiği gibi hazırlanan her 100 µL'lik örnek üzerine 5 mL Bradford reaktifi eklenerek ölçüm yapılmıştır. Kör olarak 100 µL PBS ve 5 mL Bradford reaktifi karışımı kullanılmıştır (Kruger, 2009).

Her iki konsantrasyon aralığı için de protein ve boya kompleksi bir araya geldikten sonra 5 dk beklenmiş ve UV spektrofotometrede kör'e karşı 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Her bir değer 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış ve okuma sonunda ortalamaları alınmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ile kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

4.4. Kollajen Yüklü PHB Formülasyonlarının Hazırlanması

Kollajen yüklü PHB sistemlerinin geliştirilmesinde iki farklı yöntem denenmiştir. Burada PHB, farklı polimerlerle birleştirilerek disk ve film yapıları oluşturulmuştur. Sadece PHB kullanılarak elde edilen filmler tipik olarak kırılğandır ve birçok araştırmacı PHB'yi diğer polimerlerle harmanlayarak bu kırılğanlığı azaltmaya çalışmıştır (Rodrigues vd., 2005).

4.4.1. PHB emdirilmiş liyofilize kollajen disklerinin oluşturulması

Kollajen suda çözünür özelliktedir. Organik çözücüler kullanımı protein yapının zarar görmesine ve dolayısıyla beklenen etkiyi göstermesine neden olmaktadır. Bu nedenle, lifli yapıdaki kollajenin dağılmadan bir arada tutulabilmesi, yara bölgesine uygulama sırasında esneklik kazanabilmesi için ayrıca PHB ile polimer etkileşimini sağlayarak PHB'nin kırılğanlığı azaltabilmesi amacıyla Kollicoat MAE100P ve PEG400 polimerleri kullanılmıştır (Rodrigues vd., 2005; Pathare vd., 2013). Kollajen,

Kollicoat MAE100P ve PEG400 çözeltilerini içeren karışım hazırlanmış ve bu karışım liyofilize edilerek gözenekli kollajen disklerinin hazırlanması sağlanmıştır. Daha sonrasında, organik çözücüde çözündürülmüş PHB, bu disklerin üzerine damlatılarak emdirilmiş ve organik çözücünün sıcaklığında uçması oda beklenmiştir.

Bu amaçla, 900 mg Kollicoat MAE100P tartılmış ve cam beher içerisinde 8 mL etanolde çözündürülmüştür. Bu çözelti üzerine, ayrı bir beherde 30 mL d.su içinde çözündürülmüş 787 mg PEG 400 içeren çözelti eklenmiş ve bu karışım oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde (etanolün tamamen uçması amacıyla) son hacim 20 mL oluncaya kadar 100 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım üzerine, 10 mL d. suda 90 mg Kollajen olacak şekilde hazırlanmış kollajen çözeltisi ilave edilmiştir ve 5 dakika karıştırılmıştır.

Hazırlanan karışım, ~5 mm yükseklikte olacak cam petri yüzeyine dökülerek - 20°C'lik buzdolabında bir gün boyunca donmaya bırakılmıştır. Dondurulan örnekler, liyofilizatöre konulup içerisindeki sıvının tamamen uzaklaşması ve süngerimsi yapıdaki kollajen yüklü disklerinin oluşumu sağlanmıştır.

Oluşan liyofilize kollajen diskler Tablo 4.7.'de belirtilen miktarlarda küçük parçalarda kesilmiştir. Her bir disk içeriğindeki kollajen ve PHB miktarları sabit tutulmak için 500 µl kloroform içerisinde Tablo 4.7.'de belirtilen miktarlarda PHB çözünmüş ve kesilen kollajen disklerine damlatılmıştır. Diskler, oda ısında kloroform uçana kadar bekletilmiştir ve kollajen salım çalışmaları ile hücre kültürü çalışmalarında kullanılıncaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır. Bu sistem KD-PHB olarak adlandırılmıştır.

Kollajen salımında ve hücre kültüründe PHB'nin etkilerinin gözlenmesi amacıyla, kollajen içeren ancak PHB emdirilmemiş diskler (KD) de bu çalışmalar yapılincaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

Tablo 4.7. Oluşturulan disklerin kollajen ve PHB içerikleri

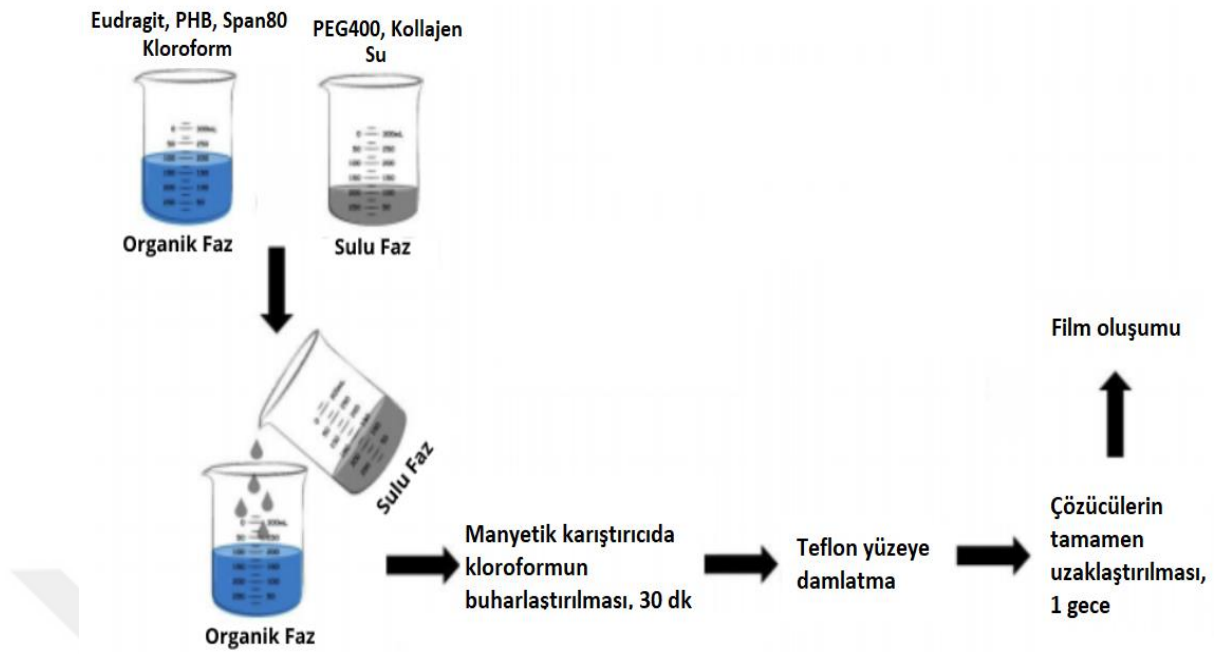
	Disk Ağırlığı	Kollajen Miktarı	PHB Miktarı
KD-PHB1	21,00 mg	0,90 mg	3,16 mg
KD-PHB2	20,91 mg	0,89 mg	3,15 mg
KD-PHB3	16,81 mg	0,72 mg	2,53 mg
KD-PHB4	16,70 mg	0,71 mg	2,52 mg

4.4.2. Emülsiyon yöntemiyle kollajen yüklü PHB filmlerinin oluşturulması

Birbiri içerisine karışmayan iki sıvının birbiri içerisinde yüzey etkin maddeler yardımı ile dağılması sonucu oluşan emülsiyonlar, heterojen sistemlerdir. Birbiriyle karışmayan bu iki sıvıdan biri, bir diğerrinin içinde karıştırma yardımı ile damlacıklar halinde dağıtılır. Dağılmış damlalar iç fazı oluştururken diğerr sıvı kısım dış fazı (sürekli fazı) oluşturur (Güngör vd., 2013). Emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi birçok farklı ilacı içeren polimer mikrokürelerini oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu yöntemle hidrofobik polimerler ve suda çözünürlüğü yüksek olan protein ve peptit gibi bileşenler kapsüllenebilmektedir (O'Donnell ve McGinity, 1997).

Bu çalışmada emülsiyon yöntemiyle kollajen yüklü PHB filmleri oluşturulmuştur. Film oluşumunda PHB'ye yardımcı polimerler olarak Eudragit RS100 ve PEG400 kullanılmıştır. Burada kullanılan PEG400, PHB'nin kırılğan yapısını azaltmak, Eudragit RS100 ise çok az elde edebildiğimiz PHB polimerinin miktarını ve biyodegradasyonunu arttırmak amacıyla kullanılmıştır (Rodrigues vd., 2005; Thakral vd., 2013). Yağ içinde su emülsiyonu hazırlanması amacıyla da yüzey etkin madde olarak Span80 seçilmiştir.

Yağ fazı (organik faz) için sırasıyla 80 mg Eudragit RS100 ve 40 mg PHB 2 mL kloroformda cam bir beher içerisinde çözündürülmüştür ve 40 mg Span80 üzerine ilave edilmiştir. Sulu faz ise 60 mg PEG 400 ve 5 mg Kollajenin 120 µL d. suda çözündürülmesi ile elde edilmiştir. Sulu faz, yağ fazına Şekil 4.1.'deki gibi eklenmiş ve manyetik karıştırıcı üzerinde 750 rpm'de kloroformun bir kısmının uçması için ve emülsiyonun yoğunlaşması sağlanıncaya kadar 30 dakika süresince karıştırılmaya bırakılmıştır. Hala akışkan özellikteki emülsiyon sistem, teflon yüzeye damlalar halinde dökülmüş ve kloroformun tamamen uçması için oda sıcaklığında bir gece bekletilmiştir. Kollajen içeren film sistem KF-PHB olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.1. Çözücü buharlaştırmalı emülsiyon hazırlama yöntemi ile kollajen yüklü PHB filmlerinin hazırlanmasının şematik gösterimi

Hücre kültürü çalışmalarında, PHB'nin toksikolojik özelliğinin belirlenmesi amacıyla kollajen içermeyen PHB filmleri de hazırlanmıştır. Bu işlem, kollajen ekleme basamağı olmadan yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır ve F-PHB olarak adlandırılmıştır.

Hazırlanan sistemlerin adlandırılması Tablo 4.8'de belirtilmiştir.

Tablo 4.8. PHB ve Kollajen kullanılarak hazırlanan formüllasyonların isimlendirilmesi

Örnekler	İsimlendirme
Referans polimer	PHB-İ
Ekstrakte edilen polimer	PHB-M
Liyofilize kollajen disk	KD
PHB emdirilmiş liyofilize kollajen disk	KD-PHB
PHB emülsiyon film	F-PHB
Kollajen yüklü PHB emülsiyon film	KF-PHB

4.5. Kollajenin Sistemlerden *In Vitro* Salım Çalışmaları

Hazırlanan KD ve KD-PHB diskleri ve KF-PHB filmi için de *in vitro* salım çalışması yapılmıştır. Disk sisteminlerinden kollajenin salımında, PHB varlığının nasıl

etki ettiğinin anlaşılabilmesi için, KD ve KD-PHB sistemleri için ayrı ayrı salım düzeneği kurtulmuştur. F-PHB formülasyonu kollajen içermediği için salım çalışmasına dahil edilmemiştir. Her bir sistem için 4 tekrarlı düzenek kurulmuştur. Kurulan bu düzenek, Eudragit ve Kollicoat ile oluşturduğu filmlerden *in vitro* ilaç salınımını inceleyen Cuppok'un kullandığı yöntem ile benzerlik göstermektedir (Cuppok vd., 2011).

Tüm disk ve filmlerden Tablo 4.9'da belirtilen miktarlarda bütün parçalar kesilmiş ve ayrı ayrı 37 °C'ye ayarlanmış 3 mL pH 7,4 PBS içeren, 50 ml'lik plastik falkon tüplerine konulmuştur. Isıtmalı düzenek kurulan 130 rpm'deki orbital çalkalayıcı üzerine sabitlenerek, belirli aralıklarla 300 µL örnek alınmış ve yerine 300 µL taze pH 7,4 PBS konulmuştur. Alınan örneklerin 100 µL'si 15 mL'lik plastik falkon tüplerine aktarılmış, üzerine 5 mL Bradford reaktifi eklenmiş ve 5 dk beklenmiştir. Süre sonunda bu örnekten 1 mL alınarak plastik bir küvette UV spektrofotometrede köre karşı 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Çıkan sonuçlar, oluşturulan denklem ile hesaplanarak kollajenin salım profilleri çıkarılmıştır. Salım çalışması 3 ay süresince devam ettirilmiştir.

Tablo 4.9. Salım profilinde kullanılan KD-PHB, KD ve KF-PHB sistemlerinin miktarı ve içerikleri

Örnek Adı	Disk/Film Ağırlığı	Kollajen Miktarı	PHB Miktarı
KD-PHB1	21,00 mg	0,90 mg	3,16 mg
KD-PHB2	20,91 mg	0,89 mg	3,15 mg
KD-PHB3	16,81 mg	0,72 mg	2,53 mg
KD-PHB4	16,70 mg	0,71 mg	2,52 mg
KD1	16,8 mg	0,85 mg	-
KD2	19.11 mg	0,96 mg	-
KD3	14,20 mg	0,72 mg	-
KD4	14,42 mg	0,73 mg	-
KF-PHB	22,51 mg	0,50 mg	4,00 mg
KF-PHB	22,50 mg	0,50 mg	4,01 mg
KF-PHB	22,51 mg	0,50 mg	4,02 mg
KF-PHB	21,00 mg	0,46 mg	3,73 mg

4.6. Kollajenin SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi, proteinlerin yükten bağımsız olarak boyutlarına göre ayrılması için sıklıkla kullanılmaktadır. Burada kullanılan anyonik (negatif yüklü) deterjan olan SDS, proteinlerin ikincil ve üçüncül yapılarını denatüre ederek negatif yük

ile kaplar. SDS ile yük kazandırılmış bu proteinler, bir jele yüklendiğinde ve elektriksel bir akım uygulandığında, proteinlerin sadece moleküler ağırlıklarına göre ayrımı sağlanmaktadır. En popüler SDS-PAGE prosedürü 1970 yılında Laemmli tarafından tanımlanmıştır. Laemmli SDS-PAGE sisteminde, farklı pH değerlerini ve poliakrilamid konsantrasyonlarını içeren üst üste binmiş, yükleme jeli ve ayırma jeli olarak bilinen iki farklı poliakrilamid konsantrasyonlu jel kullanılmıştır. Üst jel yani yükleme jeli, proteinlerin hızlı bir şekilde yürüyüp tek bir hizaya gelebilmesi için düşük konsantrasyonda poliakrilamid içerirken, alt jel yani ayırma jeli, proteinlerin ayrımının sağlanması için daha yüksek konsantrasyonda poliakrilamid içermektedir. Buradaki poliakrilamid konsantrasyonu, ayrımı yapılacak proteinlerin boyutlarına bağlı olarak değiştirilebilmektedir (Brunelle ve Green, 2014; Pavlova vd., 2018).

Bu sistem, hazırlanan formülasyonlarda kullanılan kollajenin, formülasyon hazırlanırılama koşullarında yapısının bozulup bozulmadığını ve salım sonucunda salınan kollajenin stabilitesini kontrol etmek amacıyla kullanılmıştır.

Kollajen proteinini SDS-PAGE sisteminde ayırabilmek için %7,5 ayırma jeli ve %4 yükleme jeli kullanılmıştır (Zhang vd., 2014). SDS-PAGE için kullanılacak çözeltiler Tablo 4.10' da listelenmiştir.

Tablo 4.10. SDS-PAGE için kullanılan çözeltiler (Simpson, 2006)

%7,5 Ayırma Jeli (5 mL)	Distile su	2.35 mL
	%30 Akrilamit/bisakrilamit	1.25 mL
	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	1.3 mL
	%10 SDS	0.05 mL
	%10 APS	0.05 mL
	TEMED	0.003 mL
%4 Yükleme Jeli (2 mL)	Distile su	1.44 mL
	%30 Akrilamit/bisakrilamit	0.27 mL
	1 M Tris-HCl (pH 6.8)	0.25 mL
	%10 SDS	0.02 mL
	%10 APS	0.02 mL
	TEMED	0.002 mL
Yürütme Tamponu (10X)	Trizma baz	30 g
	Glisin	144 g
	SDS	10 g
	Distile su	1 L
Örnek Yükleme Tamponu (2X)	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	2 mL
	Gliserol	1.6 mL
	%10 SDS	3.2 mL
	2-Merkaptoetanol	0.8 mL
	%1 Bromofenol blue	0.4 mL
Fiksasyon çözeltisi (100 mL)	Glasiyel asetik asit	10 mL
	Metanol	50 mL
	Distile Su	40 mL
Boyama çözeltisi (100 mL)	Comassie Brilliant blue	0.25 g
	Glasiyel asetik asit	10 mL
	Metanol	45 mL
	Distile su	45 mL
Yıkama çözeltisi (100 mL)	Glasiyel asetik asit	10 mL
	Metanol	40 mL
	Distile su	50 mL

4.6.1. SDS-PAGE jelinin hazırlanması

Hazırlanan örneklerin yükleneceği ve yürütüleceği iki ayrı jel hazırlanmıştır.

1. Jel hazırlanmadan önce cam plakalar distile su ile yıkanarak, kurulanmıştır. İki camın arasına konulan plastik şeritlere sızıntıyı önlemek amacıyla az miktarda vazelin sürülmüştür. Cam plakalar jel kasetine yerleştirilerek, sıkıca tutturulmuştur.
2. Ayırma jelini hazırlamak için gereken çözeltiler, sırasıyla, distile su, akrilamit, Tris-HCl, SDS bir behere konularak iyice karıştırılmıştır. Son olarak APS ve TEMED eklenmiş ve karışım, jelin donmaması için hızlıca plakalar arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülmüştür.
3. Taraklar takıldıktan sonra yaklaşık 1 cm altına kadar ayırma jeli döküldükten sonra üzerine Bütanol eklenerek jelin üst kısmı düzleştirilmiş ve polimerleşme için 30-45 dakika beklenmiştir.
4. Jelleşme tamamlandıktan sonra bütanol kurutma kâğıdı yardımı ile ortamdan çekilmiştir.
5. Yükleme jelini hazırlamak için gereken çözeltiler sırasıyla, distile su, akrilamit, Tris-HCl, SDS bir behere konularak iyice karıştırılmıştır. Son olarak APS ve TEMED eklenmiş ve karışım hızlıca pipet yardımı ile plakalar arasına hava kabarcığı kalmayacak bir şekilde dökülmüş ve taraklar yerleştirilmiştir. Polimerleşme için 30-45 dakika beklenmiştir.

Jelleşme tamamlandıktan sonra camların alt ve yan kısımlarındaki plastik şeritler çıkarılarak, kaset tank içerisine yerleştirilmiştir. Taraklar dikkatlice çıkarılmış ve kuyular pipet yardımıyla yürütme tamponuyla yıkanmıştır.

4.6.2. SDS-PAGE için protein örneklerinin hazırlanması

Film formülasyonu sırasında kullanılan kloroformun, karıştırma hızının ve kloroformun uçurulması işlemleri etkilerini belirlemek için, film formülasyonu koşulları diğer maddeler eklenmeden Bölüm 4.4.2’de anlatıldığı gibi uygulanmıştır. Bunun için 5 mg Kollajen 120 μ L d. suda çözülümüş üzerine 2 ml kloroform eklenerek 30 dakika manyetik karıştırıcıda kloroformun uçurulması için ağzı açık bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra örnekler teflon yüzeye dökülmüş, su ve kloroformun tamamen uzaklaşması beklenmiştir. Kalıntı halindeki kollajen toplanmış, 120 μ L d. suda tekrar çözünmüştür.

Kontrol olarak aynı konsantrasyonlarda hazırlanmış ve kloroform ile muamele edilmemiş saf kollajenden kullanılmıştır.

Salım esnasında kollajenin stabilitesini tespit edebilmek için, aşağıda belirtilen salım sürelerinde alınmış KD, KD-PHB ve KF-PHB formülasyonlarına ait salım örnekleri kullanılmıştır.

KD; 20 dk, 2 sa, 12 sa, 24 sa, 1 hafta

KD-PHB; 20 dk, 1 sa, 12 sa, 24 sa, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta

KF-PHB; 20 dk, 1 sa, 12 sa, 24 sa, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta, 4 hafta

- Mikrotüpler içerisine 7,5 µL analiz edilecek örneklerden ayrı ayrı konulmuş ve üzerine 7,5 µL yükleme tamponu eklenmiştir.
- Denatürasyon için, tüpler su banyosunda yaklaşık 90 °C’de 3 dakika bekletilmiştir.
- Tüpler su banyosundan alındıktan sonra hemen buz üzerine aktarılmış ve orada 1 dakika bekletildikten sonra jele yüklenmiştir.
- 10 µl protein işaretleyici de kollajenin göüleceği seviyeyi belirlemek amacıyla ilk kuyucuğa mikropipet yardımı ile yüklenmiştir.

80 V ve 25 mA’de 30 dakika ve 120 V 45 mA’de 80 dakika yürütülmüştür ve proteinin jelde belirlenmesi ilemine geçilmiştir.

4.6.3. Proteinin jelde belirlenmesi

Jelin Fiksasyonu

Yürütme tamamlandıktan sonra jel, elektroforez cihazından ve cam plakalar arasından çıkarılarak plastik bir kap içerisine alınmış ve d.su ile yıkanmıştır,

Kabın içerisine fiksasyon çözeltisi konulup çalkalayıcı üzerine alınarak 1 saat çalkalanmaya bırakılmıştır.

Jelin Boyanması

Fiksasyon işleminden sonra, kaptaki fiksasyon çözeltisi dikkatlice dökülmüş ve kabın içerisine boyama çözeltisi konulup kap çalkalayıcı üzerine konulmuştur. Çalkalayıcı üzerinde yaklaşık 20-30 dakika 300 rpm’de çalkalanmıştır.

Jelin Boyasının Yıkanması

Jelin boyama işlemi tamamlandıktan sonra, kaptaki boyama çözeltisi dikkatlice dökülmüştür. Fazla kalan boyayı uzaklaştırmak için bir iki kez d.su geçirilerek kap ve jel birlikte yıkanmıştır.

Üzerine yıkama solüsyonu konularak, protein olmayan bölgelerdeki boyanın tamamen uzaklaşması için çalkalayıcıda bırakılmıştır.

Jel tamamen boyadan arındıktan sonra görüntülenmesi yapılmıştır.

4.7. Hücre Kültürü

Hazırlanan formülasyonların etkinliğinin belirlenmesi için, HaCaT keratinosit hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü için hücrelerin üretilmesi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

- Hücreler %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin içeren DMEM ortamında kültüre edilmiştir.
- Hücre kültürü 37 °C’ de %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında yapılmıştır.

Hücreler hızlı büyüme fazına ulaştığı zaman, 2XTripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilerek flask duvarından kopması sağlanmış ve bundan sonra alt kültürlerle ayrılmıştır.

4.7.1. Sitotoksitesite çalışmaları

Hücre sitotoksitesitesi temel olarak hücrelerin bir ilaca veya herhangi bir kimyasal maddeye karşı tepkisinin analiz edilmesi için kullanılır. *In vitro* sitotoksitesite çalışmaları genellikle test edilecek bir maddenin canlı hücrelerle belirli bir süre inkübasyonundan sonra, kalan canlı hücre sayısını belirleyerek bu maddenin toksik olup olmadığını ölçer. Ortamdaki canlı hücre sayısını ölçme yöntemleri genellikle metabolik aktivitenin ölçülmesine dayanır. Bu yöntemlerden biri olan MTT tetrazolium deneyi, çok sayıda numunedeki canlı hücre sayısını belirlemek için kullanılır (Riss vd., 2011).

MTT analizi, 3- [4,5-dimetiltiyazol-2-il] -2,5 difenil tetrazolium bromür (MTT tetrazolium) bileşiğinin, canlı hücrelerden salınan mitokondriyal NAD (p) H'ye bağlı oksidoredüktaz enzimleri tarafından çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürülmesi temeline dayanır. Bu yöntem, formazan kristallerinin miktarı ile ilişkili olan mitokondriyal aktiviteyi ölçerek canlı hücre sayısının belirlenmesini sağlar. Ölü veya yavaş büyüyen hücreler mitokondriyal aktivite gösteremedikleri için düşük seviyede formazan kristali oluştururlar. MTT uygulamasından sonra oluşan formazan kristalleri, dimetil sülfoksit (DMEM) veya sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi çözültülerde çözündürülerek 540-720 nm arasında bir spektrofotometrede ölçülebilir (Adan vd., 2016).

Bu çalışmada geliştirilmiş film ve disk formülasyonların hücreler üzerindeki etkileri MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Testin uygulanması aşağıdaki ifade edildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

- Hücreler kültüre edildikten sonra %10 FBS içeren DMEM ortamında dağıtılarak süspansiyon haline getirilmiş ve hücre süspansiyonundan belli bir miktar *Thoma* lamı üzerine alınarak hücre sayısı belirlenmiştir.
- Her bir kuyuya 17.500 hücre olacak şekilde ayarlanmış hücre süspansiyonundan alınarak 24 kuyucuklu hücre kültür plakalarının her kuyucuğuna 500 µL süspansiyon aktarılmıştır.
- Sitotoksik etkiyi incelemek için 1 günlük üremeye bırakılan hücrelerin besiyerleri 2. gün sonunda çekilmiş ve hazırlanan film ve disk formülasyonlarından, kollajen miktarları kontrol grubundaki kollajen miktarı ile aynı olacak şekilde belirli kesitler alınarak, tarafımızdan hazırlanan tel ızgaralar üzerine yerleştirilmiş ve hücrelere temas etmeyecek şekilde kuyulara asılı pozisyonda yerleştirilmiştir. Hazırlanan bu kuyucukların üzerine 2 ml DMEM besiyeri ilave edilmiştir. Bu işlemler tamamlandıktan sonra plaklar, Cytation 5 plaka okuyucuya yerleştirilerek 37 °C' de %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 72 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki formülasyon ve besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklar pH 7,4 olan steril PBS ile yıkanmıştır.
- Yıkama sonunda PBS çekilerek her bir kuyucuğa 150 µL (5 mg/mL) MTT boyası konulmuştur. MTT boyasının canlı hücrelerde formazan kristallerine dönüştürülebilmesi için 37 °C de 4 saat bekletilmiştir,
- MTT boyası kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 1mL DMSO konularak 30 dakika 37 °C'de etüvde bekletilmiştir,
- 30 dakikalık inkübasyon süresi tamamlandıktan sonra hücre canlılığını belirlemek üzere Cytation 5 plaka okuyucuda (BioTek, ABD) 570 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.
- Deney, disk ve film formülasyonlarının her biri için bu deney 4 tekrarlı olarak yapılmıştır.

4.8. Karakterizasyon Çalışmaları

4.8.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Bu çalışmada, üretilen PHB ve hazırlanan formülasyonların yüzey morfolojisini belirlemek için taramalı elektron mikroskobu (Hitachi TM3030 plus Tabletop Microscope, Japonya) kullanılmıştır. Analiz öncesi, küçük parçalar halinde alınmış PHB ve hazırlanan formülasyonlar, karbon bant yapıştırılmış stab üzerine sabitlenecek daha sonra, örnekler ince altın tabakası (100 Å) ile kaplanmış ve yüksek vakum altında değişik çözünürlükte uygun voltaj altında SEM ile görüntülenmiştir.

4.8.2. Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi

Polimerin ve hazırlanan formülasyonların termal özellikleri, yani cam geçiş sıcaklığı (T_g) ve erime sıcaklığı (T_m), bir Shimadzu DSC-60 ekipmanı kullanılarak diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) çalışması yapılarak belirlenmiştir. Çalışma için kullanılan örnek miktarları 1 ila 3 mg arasında tartılmış ve standart alüminyum hücrelere yerleştirilerek 30 °C ve 300 °C arasındaki 10 °C min⁻¹ lik bir ısıtma işlemine tabi tutulmuştur.

4.8.3. X-ışını kırınımı (XRD) analizi

Bacillus cereus tarafından üretilen polimerin yapısal özellikleri hakkında bilgi edinmek için, bir Cu K-alpha (40 kV, 15 mA) radyasyon kullanılarak bir X-ışını difraktometre (Rigaku, Japonya) üzerinde toplanan sinyaller kaydedilmiştir. Veriler, 2 ° / dak tarama hızı kullanılarak sürekli tarama modunda 5°-70° lik 2θ aralığında kaydedilmiştir.

4.8.4. Fourier dönüşümü infrared spektrometresi (FTIR) analizi

Ekstrakte edilmiş PHB numuneleri ve oluşturulan film ve disk formülasyonlarındaki fonksiyonel grupların varlığı FTIR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Yaklaşık 1 mg numune örneği, Azaltılmış Toplam Yansıma (ATR) aparatıyla FTIR spektrofotometresine (Shimadzu, Japonya) sabitlenmiştir. İletilen ışık enerjisinin nispi yoğunluğu, ortam sıcaklığında 400-4000 cm⁻¹ bölgesindeki emilim dalga boyuna karşı ölçülmüştür.

4.8.5. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi analizi

Ekstrakte edilen polimer, 10 mg/ml konsantrasyonda deuterodimetil sülfoksit (DMSO-*d*₆)içerisinde süspanse edilmiştir. ¹H NMR spektrumları, 25  C'de 10  s darbe genişliği (90  darbe açısı), 6103,516 Hz spektral genişlik, 16384 veri noktası ile bir Bruker UltraShield 300 spektrometresi (Bruker, ABD)  zerinde elde edilmiştir.



5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. *Bacillus cereus*'un Canlandırılması ve Saflığının Doğrulanması

Bacillus cereus, gram-pozitif aerobik veya fakültatif olarak anaerobik spor oluşturan çubuk benzeri yapılardır (Drobniewski, 1993). ATCC'den temin edilen *Bacillus cereus* 14579 nolu suş için bölüm 4.1'de belirtilen şekilde canlandırma prosedürü gerçekleştirilmiştir. Canlandırılan organizmaların saflığını doğrulamak amacıyla serum fizyolojik içerisinde seri seyreltmeler yapılmış ve tek koloni düşürülmüştür. Bu tek kolonilerden gram boyama yapılarak (Bölüm 4.1.2) elimizdeki suşun Şekil 5.1.'de gösterildiği gibi saf ve gram pozitif olduğu doğrulanmıştır. Gram boyama meknizmasında, mikroorganizmaların hücre duvarı yapılarından yararlanır. Böylece gram boyama sonucu gram (+) bakteriler mor renkte gözlemlenirken gram (-) bakteriler pembe-kırmızı renkte gözlemlenirler (Beveridge, 2001). Şekil 5.1'e bakıldığında çubuk şeklinde ve mor renkli yapılar *Bacillus cereus*'un özelliklerini doğrulamaktadır.



Şekil 5.1. Gram boyama sonucu gözlemlenen *Bacillus cereus* suşu

5.2. *Bacillus cereus*'un Ön Kültür Koşulları ve Besin Sınırlayıcı Koşullarda PHA Üretimi

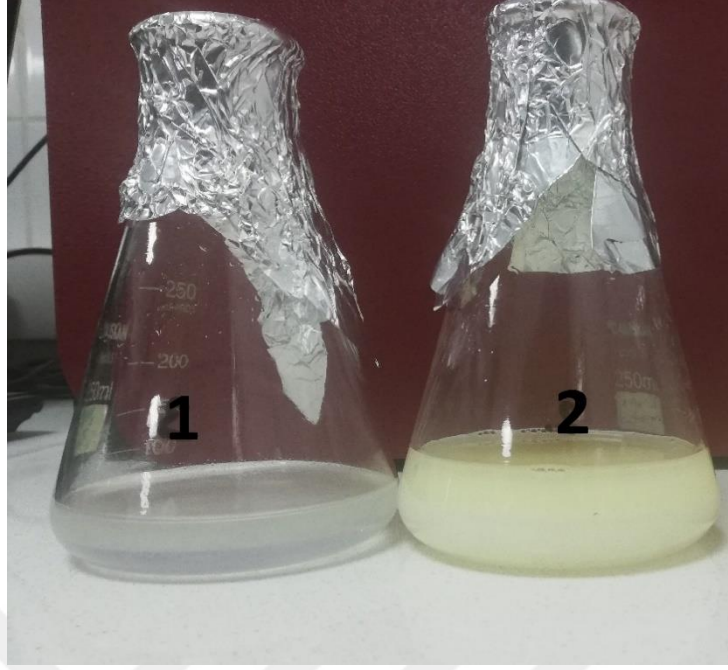
Canlandırılan *Bacillus cereus* suşu PHA üretimine hazırlanmak için öncelikle bölüm 4.1’de belirtildiği gibi ön kültür koşulları sağlanmış ve bakteri kültürlerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Kültürlerin optik yoğunlukları (OD) 600 nm’de ölçülmüştür (Bizani ve Brandelli, 2002). Üretilen kültürlerin OD₆₀₀ değeri 0,8’de sabitlenmiştir. Bundan sonraki aşamada üretilen organizmalar farklı besin sınırlayıcı besiyerine alınmış ve PHA üretimleri gerçekleştirilmiştir. Organizmaların kuru hücre ağırlıklarını öğrenmek için hücreler liyofilize edilmiştir (Bölüm 4.1.3) ve Tablo 5.1’de listelenmiştir.

Tablo 5.1. *Liyofilize hücre kütleleri*

Sınırlayıcı	Örnek	Kuru hücre ağırlığı
1. Sınırlayıcı	1	0,1332 g
	2	0,1405 g
	3	0,1362 g
2. Sınırlayıcı	1	0,1789 g
	2	0,1420 g
	3	0,1683 g

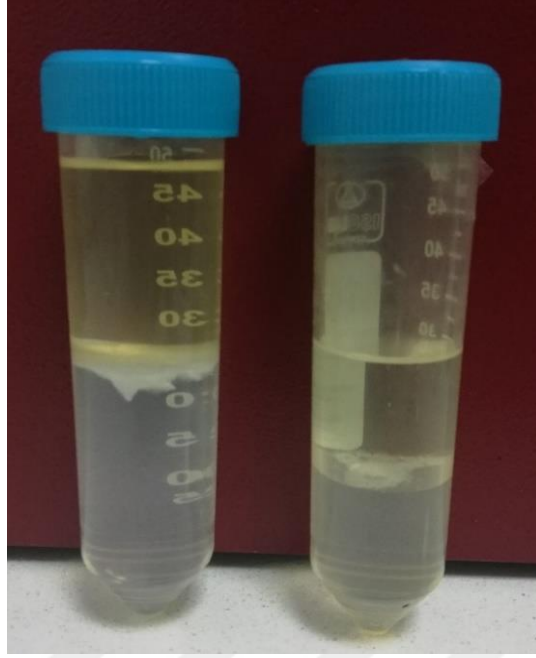
5.3. Kloroform (CHCl₃) ve Sodyum Hipoklorit (NaClO) Dispersiyonunu Kullanılarak PHA Ekstraksiyonu ve PHA Eldesi

Farklı sınırlayıcı besiyerinde PHA üretimi gerçekleştirilen organizmalardan bölüm 4.2’de belirtilen protokole uygun olarak PHA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan daha önceki çalışmalarda, optimum koşullarda 1:1 oranında %30 sodyum hipoklorit ve kloroformun (Şekil 5.2) 30 °C’de 60-150 dk arasında hücrelere uygulanmasının yüksek saflık ve verimde PHA eldesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Hahn vd., 1993; Hahn vd., 1994; Jacquel vd., 2008).



Şekil 5.2. Farklı sınırlayıcı besiyerlerinde üretilmiş ve %30'luk hipoklorit çözeltisi ve kloroform eklenmiş bakteri lizatları. 1; 1. sınırlayıcı ürünü, 2; 2. sınırlayıcı ürünü

Hanh ve arkadaşlarının yöntemine göre Bölüm 4.2'de ki ekstaksiyon işleminde belirtildiği şekilde, üzerine % 30'luk hipoklorit çözeltisi ve kloroform eklenmiş liyofilize bakteri lizatı (Şekil 5.2) 30 °C'lik etüvde 150 dk çalkılanarak inkübe edilmiş ve sonrasında porsiyonlara ayrılarak santrifüjlenmiştir (Hanh vd., 1993). Santrifüj sonrası Şekil 5.3.'de gösterildiği gibi üç ayrı faz gözlemlenmektedir. En üstteki faz sodyum hipoklorit çözeltisini, orta faz PHA dışı hücre metaryalleri ve bozulmamış hücreleri, en alt faz ise PHA'yı içeren kloroformu içerir (Jacquel vd., 2008). Bu aşamada gerçekleşen, sodyum hipokloritin etkisiyle hücre zarı zarar görerek PHA'nın hücre dışına çıkması, kloroform ile hücre dışına salınan bu PHA'nın çözündürülmesi işlemidir. Bu yöntemin polimer bozunmasını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Hahn vd., 1994; Jacquel vd., 2008).



Şekil 5.3. Kloroform-sodyum hipoklorit yönteminde santrifüj sonrası gözlemlenen faz ayrımları

Ekstraksiyon aşamasından sonra elde edilen PHB' nin %'de verimleri Bölüm 4.2.1'de belirtilen şekilde hesaplanmıştır. Hesaplanan PHB verim değerleri Tablo 5.2'de gösterilmiştir.

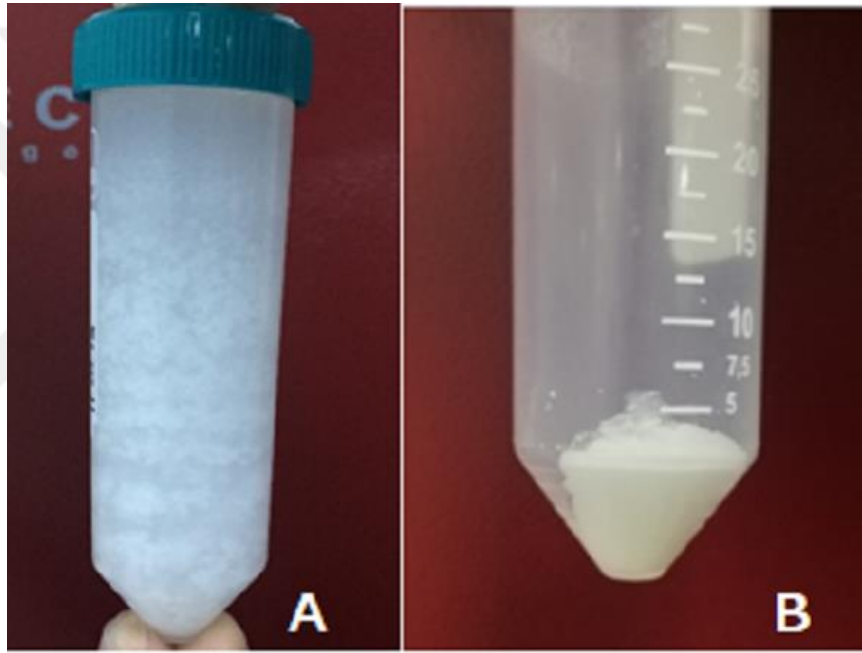
Tablo 5.2. Liyofilize hücrelerin kuru hücre ağırlıkları ve verim değerleri

Sınırlayıcı	Örnek	Kuru hücre ağırlığı	Verim
1. Sınırlayıcı	1	0,1332 g	%8,2
	2	0,1405 g	%35,7
	3	0,1362 g	%24,2
2. Sınırlayıcı	1	0,1789 g	%38,2
	2	0,1420 g	%42,2
	3	0,1683 g	%34,5

Elde edilen verim yüzdeleri, literatürdeki kloroform-sodyum hipoklorit ile ekstre edilen PHB verimlerine göre daha düşük çıkmıştır. Hanh ve diğerleri *Alcaligenes eutrophus* kullanarak üretilen PHB'yi kloroform-sodyum hipoklorit ile ekstre ederek yaklaşık %91 verimde PHB elde ederlerken, Akaraonye ve diğerleri *Bacillus cereus* kullanarak yaklaşık %51,37 verimde PHB elde etmişlerdir (Hanh vd., 1994; Akaraonye vd., 2012). Literatürlerdeki bu farklı PHB verim değerleri, kullanılan organizmanın

farklılığından kaynaklandığını göstermektedir. Bizim yaptığımız çalışmada, PHB verimi, 1. sınırlayıcı için en düşük %8,2 ve en yüksek %35,7 olarak, 2. sınırlayıcı için ise en düşük %34,5 ve en yüksek %42,2 olarak bulunmuştur.

Verim hesabı için alınan 1 mL örnekten sonra, kalan kloroform fazındaki polimerlerin çöktürülmesi için üzerine soğuk etanol eklenmiştir (Şekil 5.4) (Jacquel vd., 2008). Alkol eklemesi ile oluşan polimer lifleri, santrifüj ile çöktürülerek süpernatant atılmış ve pellet kurumaya bırakılmıştır. Pellet tamamen kuruyup, beyaz ve kristalimsi yapı oluştuktan sonra tartılmış ve sonuçlar Tablo 5.3'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4. Soğuk etanol yardımıyla çöktürülen polimerler. A; Kloroformu uçurulmamış form, B; Kloroform uçurulmuş ve kurutulmuş form

Tablo 5.3. Oluşan PHA miktarları

Sınırlayıcı	Örnek	PHB miktarı
1. Sınırlayıcı	1	11 mg
	2	50 mg
	3	33 mg
2. Sınırlayıcı	1	68 mg
	2	60 mg
	3	58 mg

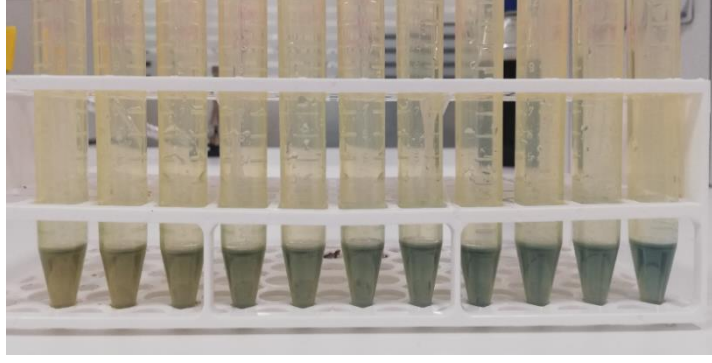
Tablo 5.2'deki verim değerleri incelendiğinde, 2. Sınırlayıcıda büyütölen bakterilerin daha yüksek oranda PHB ürettiği gözlenmiştir. Kumar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada belirtildiği gibi, sınırlayıcının PHB verimine etkili olduğu sonucu bizim çalışmamızda da gözlenmiştir (Kumar vd., 2009). Bu nedenle, bundan sonraki çalışmalarımıza, daha yüksek verim elde edildiği için 2. Sınırlayıcıyla devam edilmiştir. Kuru hücre ağırlıkları belirlenerek verim hesabı yapılan örneklerden sonra, liyofilizasyon cihazımızın kullanım dışı olması nedeniyle, ileriki ekstraksiyon çalışmalarında Kourmentza'nın yönteminde belirtildiği gibi, liyofilizasyon basamağı olmadan, ıslak hücrelerden ekstraksiyon yapılarak devam edilmiştir (Kourmentza vd., 2017).

5.4. Bradford Yöntemi Kullanılarak Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması

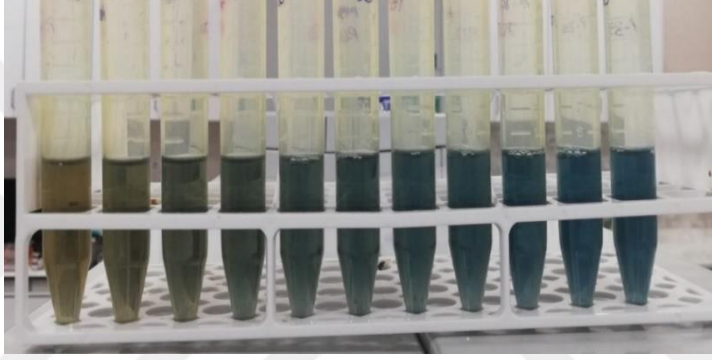
Literatürde kollajen miktar tayini için kullanılan, Hidroksiprolin tayini, Lowry, Biuret ve Bradford gibi çeşitli protein tayin yöntemleri mevcuttur (López vd., 1993; Komsa-Penkova vd., 1996; Macovescu vd., 2016). Bu çalışmada kullanılan Bradford yöntemi, hızlı, basit ve hassas bir yöntemdir. Coomassie Blue G250 gibi organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek, renk değiştirmesini esas alır. Standart yöntem (10-100 µg) ve Mikroanaliz yöntemi (1-10 µg) olarak iki farklı konsantrasyon aralığı için uygulanabilir (Kruger, 2009).

Su ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, protein moleküllerini içeren formölasyon geliştirme ve salım profilini tahmin etmek için kullanılabilecek yeni, hızlı ve doğrulanmış bir Bradford yöntemi tanımlanmışlardır. Burada, Bradford yöntemiyle kalibrasyon eğrileri oluşturulurken pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanılmıştır (Su vd., 2010).

Bu tez çalışmasında, Bölüm 4.3.'de belirtildiği gibi, pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) kullanılarak 1-10 µg ve 10-100 µg olmak üzere 2 farklı konsantrasyon aralığı için Bradford analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, şekil 5.5. ve 5.6.'da gösterilen renk değişimleri gözlemlenmiştir. 100 µl içinde farklı oranlardaki protein örnekleri üzerine konulan Bradford reaktifi protein ile kompleks oluşturarak mavi renk vermiştir. Artan protein konsantrasyonuyla birlikte oluşan mavi rengin kademeli olarak koyulaştığı gözlemlenmiştir.

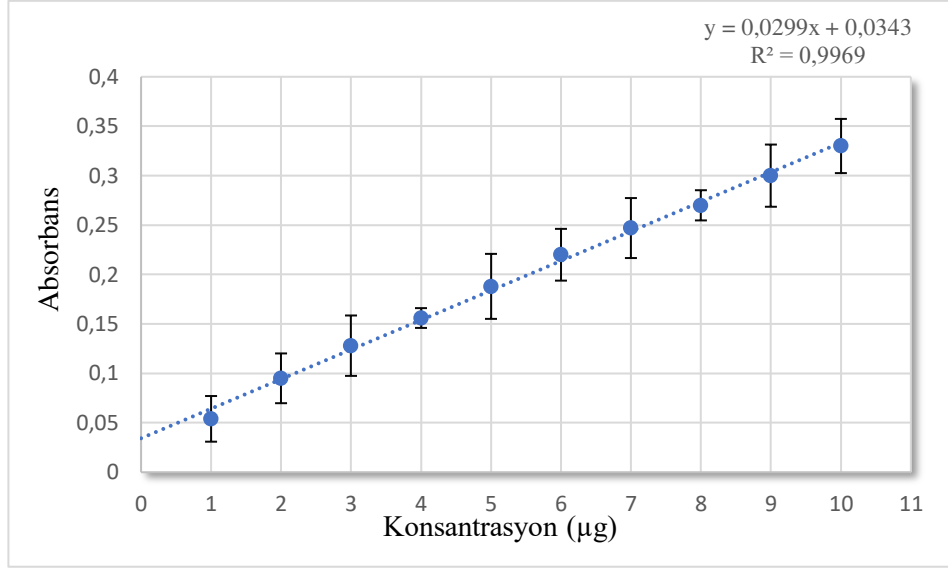


Şekil 5.5. 1-10 µg konsantrasyon aralığındaki Bradford reaktifi eklenmiş protein çözeltilerindeki renk değişimleri

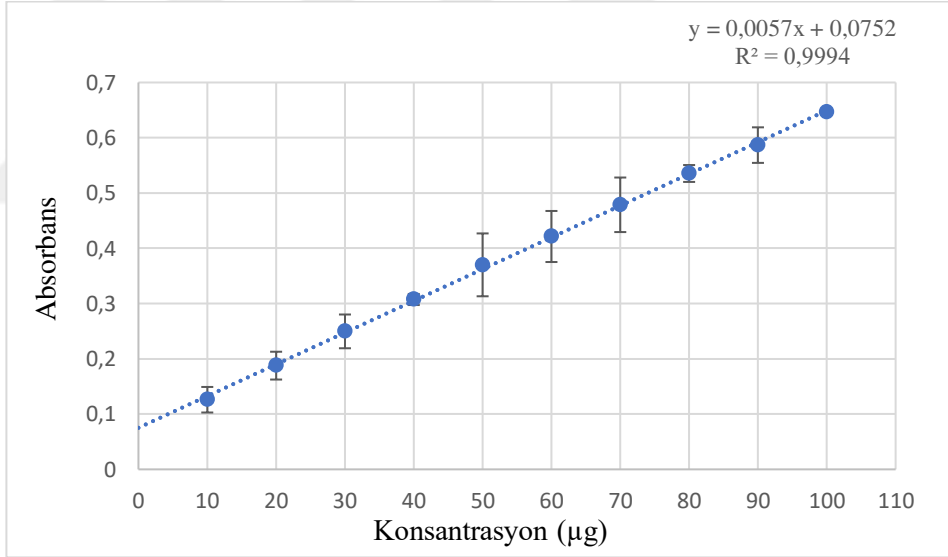


Şekil 5.6. 10-100 µg konsantrasyon aralığındaki Bradford reaktifi eklenmiş protein çözeltilerindeki renk değişimleri

Çalışma her iki konsantrasyon aralığı içinde 3'er tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır ve köre karşı 595 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ile Şekil 5.7. ve Şekil 5.8.'da gösterilen kalibrasyon grafiği çizilmiştir. 1-10 µg konsantrasyon aralığındaki eğriye ait doğrusallık eşitliği $y = 0,0299x + 0,0343$ ($r^2 = 0,9969$), 10-100 µg konsantrasyon aralığındaki eğriye ait doğrusallık eşitliği ise $y = 0,0057x + 0,0752$ ($r^2 = 0,9994$) olarak bulunmuştur.



Şekil 5.7. 1-10 µg konsantrasyon aralığı için kalibrasyon grafiği (n=3)



Şekil 5.8. 10-100 µg konsantrasyon aralığı için kalibrasyon grafiği (n=3)

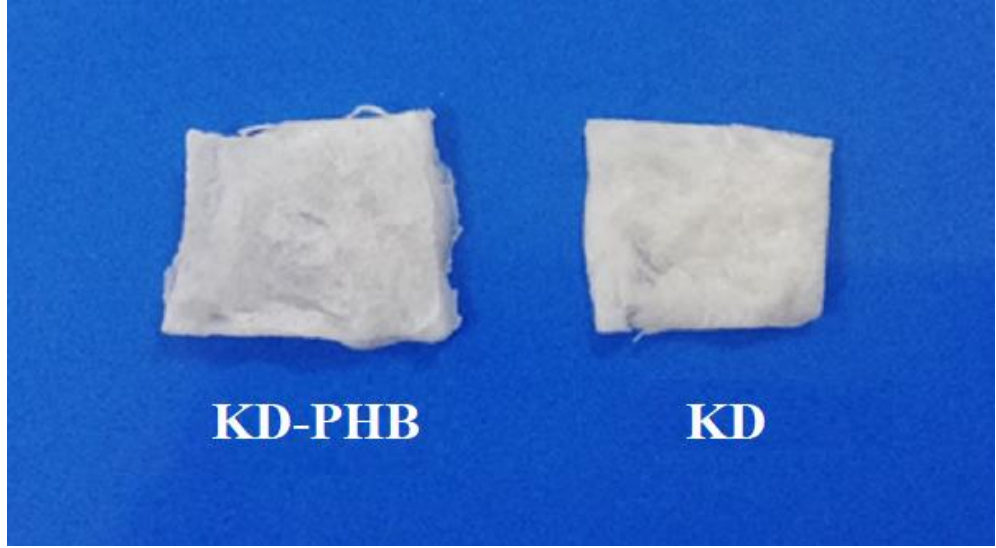
5.5. Kollajen Yüklü PHB Formülasyonlarının Hazırlanma Çalışmaları

PHB üretimi için yapılan çalışmalar sonucunda çok yüksek verimde polimer üretilmemesi, elde edilen polimerin elastik özellik göstermemesi nedeniyle, formülasyon geliştirme çalışmalarında hem polimer miktarını arttırmak hem suda çözünmeyen PHB'yi suda çözünür özellikteki kollajen ile birlikte formüle edebilmek, hem de PHB'ye esneklik verebilmek amacıyla Kollicoat MAE100P, PEG400 ve Eudragit

RS100 polimerleri kullanılmıştır. Bölüm 4.4'te belirtildiği şekilde hazırlanan liyofilize disk içerisinde kullanılan Kollicoat MAE100P, 1:1 oranında metakrilik asit ve etil akrilat içeren ve kopolimeri nötralize etmek için sodyum hidroksit ile muamele edilen bir kopolimerdir. Bu kopolimer enterik kaplama için sıklıkla kullanılan ve toksik özelliği olmayan bir polimerdir. Ayrıca literatürdeki bilgilere göre, PEG, Kollicoat® MAE 100P ile kaplama için plastikleştirici olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Nguyen vd., 2019). Eudragit RS100 polimeri, kontrollü ilaç salınımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Fizyolojik pH'da çözünmeyen ve şişebilen yapıda olan bu polimerin (Jana vd., 2014), hazırlanan film yapı içinden kollajenin kontrollü salınması için etkin olacağı düşünülmüştür.

5.5.1. KD ve KD-PHB formülasyonları

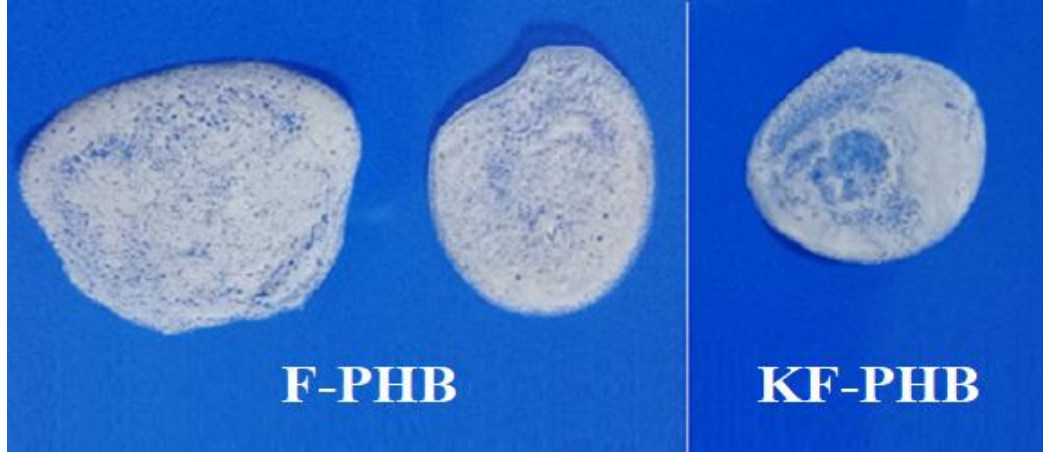
Bölüm 4.4.1'de anlatıldığı gibi hazırlanan Kollicoat MAE100P ve PEG400 ve kollajen içeren liyofilize diskler (KD)'in süngerimsi, homojen dağılımlı ve hacimli bir yapıya sahip olduğu gözlenmiştir. Bu disklerden 0,5X0,5 cm boyutlarında kesitler alınmış ve tartılmıştır (Tablo 4.7). PHB emdirilen disklerin (KD-PHB), KD'ye oranla yüzeylerinin biraz genişlediği ve hacimli yapının sönüğü gözlenmiştir. Ayrıca, ince bir sünger tabakası gibi esnek olan KD disk formunun esnekliğini de azalttığı ancak parçalanma açısından yapıyı daha sağlam forma soktuğu gözlemlenmiştir. Bu esneklik diskin ikiye katlanmasında kırılmaya neden olmayacak oranda olmuştur ve yara üzerine uygulanma sırasında yara yüzeyine adapte edilebilecek esnekliğe sahip yapıdadır. KD diskinin, pens ile tutulması ve düşük kuvvet uygulanması ile kolay kopan formunun, PHB emdirilmesi ile dayanıklılık kazandığı gözlenmiştir. Hazırlanan KD ve KD-PHB formülasyonlarına ait görseller Şekil 5.9.'da sunulmuştur.



Şekil 5.9. Liyofilize kollajen diskleri

5.5.2. F-PHB ve KF-PHB formülasyonları

Bölüm 4.4'te belirtilen oranlarda hazırlanan F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarının teflon yüzeye damlatıldıktan ve klorofomun uzaklaşmasından sonraki görüntüsü, gözenekli bir yapının oluştuğunu işaret etmektedir. Bu gözenekli yapının, yoğun polimer yapıdan kloroformun buharlaşmasına bağlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.10). Gözeneklerin oluşmaması için kloroform buharlaştırma işlemi, teflonun ısıtılması ile azaltılmaya çalışılmıştır ancak, sıcaklık etkisi ile kaynama derecesi düşük olan kloroformun (62,1 °C) yüzeyde toplanmasına ve içerisinde çözünen polimerlerinde onunla birlikte yüzeye çıkmasına dolayısıyla hazırlanan fım yapının heterojen olmasına neden olmuştur. Bu nedenle, kloroformun uzaklaştırılması oda ısısında bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Bu durum, formülasyon geliştirme çalışmaları sırasında, Eudragit RS100 ve PHB'nin kloroformda çözündürülüp, teflon yüzeye kloroformun uzaklaştırılmasında da denenmiş ve PHB'nin kümeler halinde toplanarak Eudragit RS100 polimerinden ayrılarak homojen dağılmadığını göstermiştir. Bu nedenle ortama, polimerlerin daha homojen dağılmaları hem de suda çözünür özellikteki kollajenin bu polimer içerisinde dağılmasının sağlanması amacıyla, s/y tipi emülsiyon oluşturmada kullanılan Span 80 yüzey etkin maddesi kullanılmıştır.



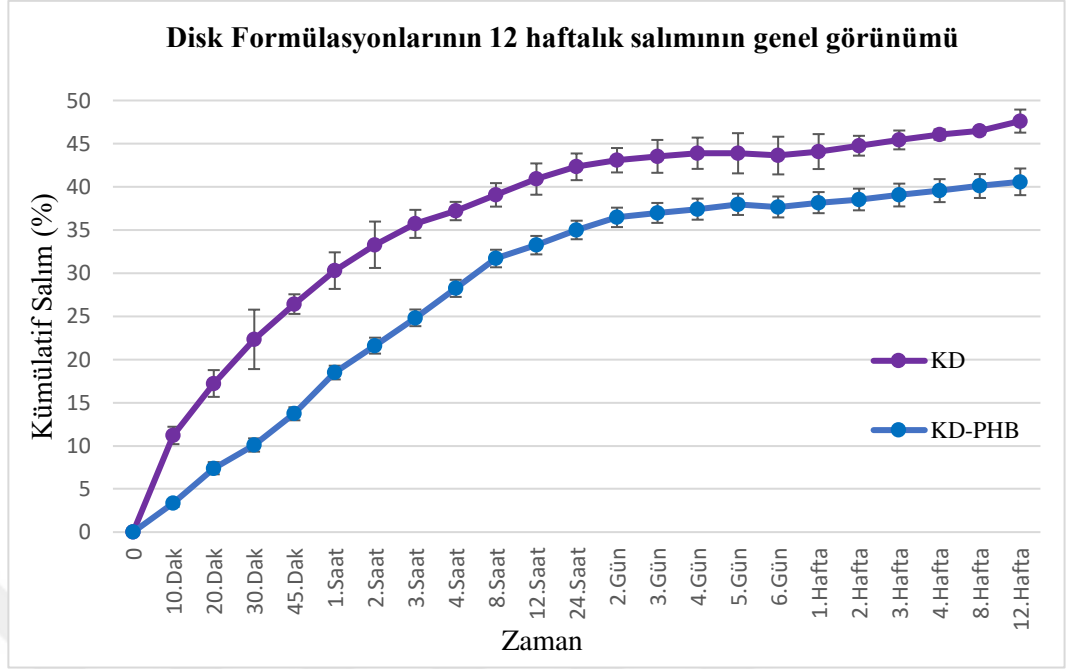
Şekil 5.10 Emülsiyon yöntemiyle hazırlanan film formülasyonları

5.6. Kollajen Yüklü PHB Formülasyonlarının *In Vitro* Salım Çalışmaları

3 tekrarlı olarak hazırlanan KD, KD-PHB ve KF-PHB formülasyonları, pH 7,4 olan PBS ortamına konularak salım çalışması gerçekleştirilmiştir. 3 ay boyunca belirli aralıklarla numune alınan örneklerden toplanan değerler, kalibrasyon eğrisinin oluşturulduğu Bradford yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir.

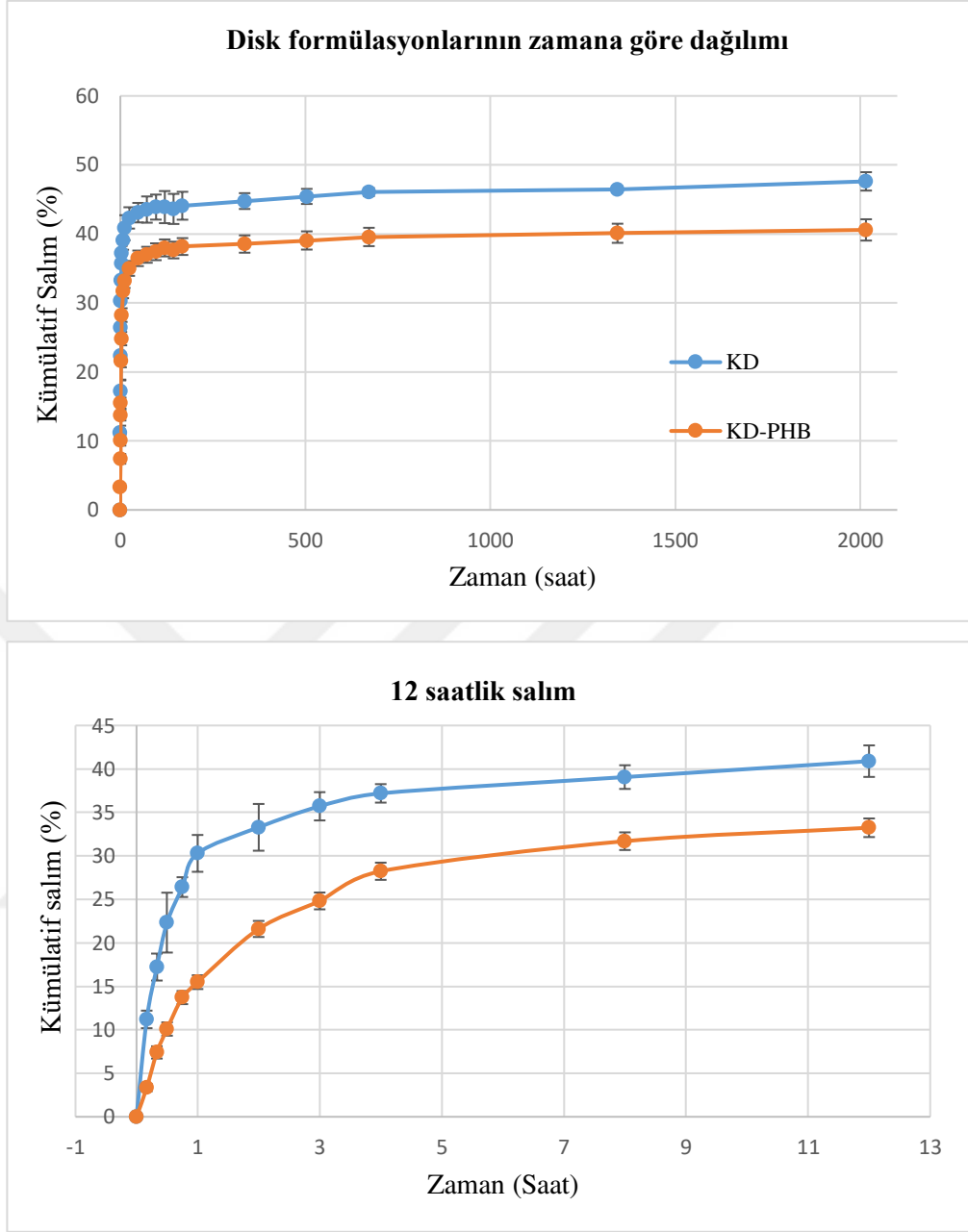
5.6.1. KD ve KD-PHB formülasyonların salım profili

Bradford analizi sonucu çıkan sonuçlar, oluşturulan denklem ile hesaplanarak liyofilize kollajen disklerinin salım profili karşılaştırmalı olarak çıkarılarak Şekil 5.11. ve Şekil 5.12.'de gösterilmiştir. Kollajen suda çözünür özellikte olduğundan, salım ortamına konulduğunda (PBS) hemen çözündüğü görülmüştür. KD formülasyonunun salım profili dikkate alındığında, formülasyon hazırlarken kullanılan Kollicoat MAE100P ve PEG'in de kollajenin salımının uzatıldığı görülmektedir. Kollicoat MAE100P ile ilgili Majeed'in yaptığı bir araştırmada, kontrollü şekilde ilaç salımını arttırmak ve geliştirmek için polimerik mikrokürelerin geliştirilmesine yönelik, içerisinde Kollicoat MAE100P'inde bulunduğu polimerik formülasyonlar geliştirmiş ve bu kopolimerin kontrollü salımda etkili olduğunu göstermiştir. (Majeed vd., 2019). Üç ay süresince sürdürülen salım çalışması sonucunda, formülasyonda bulunan kollajenin %47 oranında salındığı gözlenmiştir. Salım durdurulduğunda, tüplere konulan diskin yapısının yaklaşık %50'sinin halen salım ortamında formunu koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.11. KD ve KD-PHB formülasyonlarının 12 haftalık zaman dilimi içinde ki genel salım profili

Kollajenin KD'den salınımı gecikmeli olarak gerçekleşmesine rağmen, KD-PHB'den salınımı ile karşılaştırıldığında daha hızlı olduğu görülmüştür. KD ilk 1 saatte kollajenin %30'unu salarken, KD-PHB'den %15 oranında salım gerçekleşmiştir (Şekil 5.12). Bu da KD'nin ilk 1 saatte KD-PHB'ye göre 2 kat hızlı salım yaptığını göstermektedir. KD'nin 4 saat sonunda %40 oranında salım yaptığı ve 12 haftalık süre sonuna kadar %48'e ulaştığı görülmüştür. KD-PHB ise bu süreler arasında, %28'den %40'a kadar ulaşmıştır. Literatürde çok sayıda çalışma, PHB'nin kontrollü ilaç salım sistemleri geliştirmek için uygun olduğu ifade edilmiştir (Pouton ve Akhtar, 1996; Goreva vd., 2009; Masood vd., 2013). Ayrıca yapılan bir çalışmada, yara iyileşmesi uygulamaları için kollajen kaplı PHB-Gelatin nanofiber iskeleler geliştirilmiştir. PHB içeren bu iskelelerin kollajenin kontrollü salımana etkisinin olduğu gösterilmiştir (Kandhasamy vd., 2017).



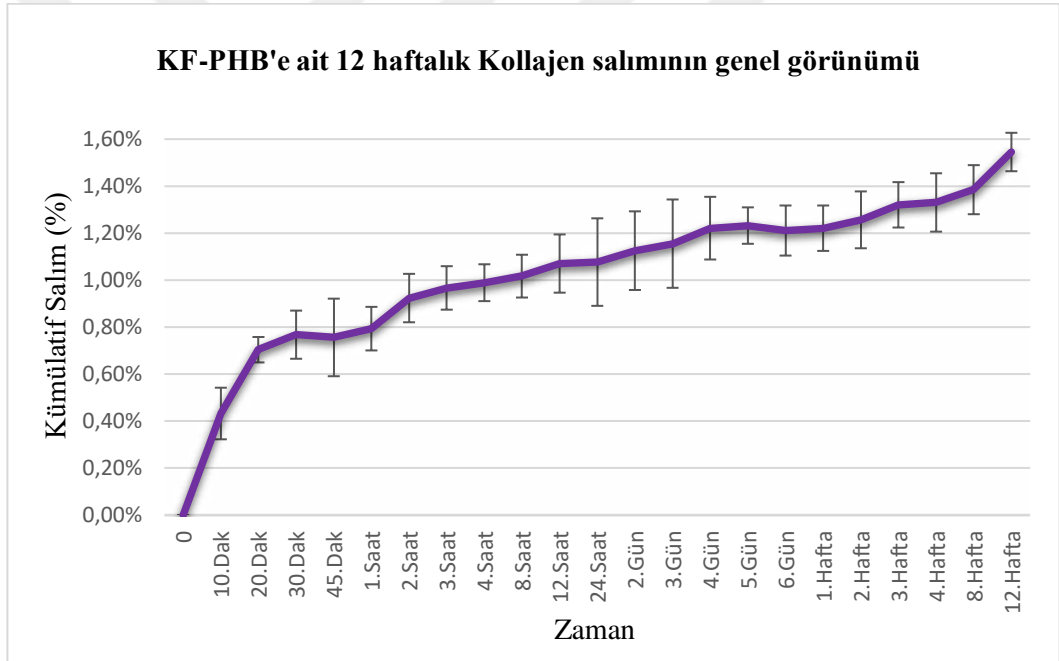
Şekil 5.12. KD ve KD-PHB formülasyonlarından salınan kollajenin zamana göre dağılımı

Şekil 5.11 ve Şekil 5.12'deki iki disk için oluşturulan salım profilleri karşılaştırıldığında, KD formülasyonu daha kısa sürede salınırken, KD-PHB formülasyonunun daha yavaş salındığı gözlemlenmektedir. Bu durum PHB'nın uzatılmış salımdaki etkisini göstermektedir.

5.6.2. KF-PHB formülasyonlarının salım profili

Bradford analizi sonucu çıkan sonuçlar, oluşturulan denklem ile hesaplanarak KF-PHB formülasyonlarının salım profili çıkartılmıştır. Oluşturulan salım profili Şekil 5.13'te gösterilmiştir.

Eudragit RS100'ün kontrollü salıma etkisine yönelik literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Jana ve diğerlerinin geliştirdiği bi formülasyonda Eudragit RS100 ile etkin madde yüklü nanopartiküller hazırlanarak bu polimerin yavaş salıma etkisi gösterilmiştir (Jana vd., 2014). Aynı şekilde Kasnif ve arkadaşlarının etkin madde yüklü Eudragit RS100 ile geliştirdikleri mikropartiküllerinde kontrollü salımda etkili olduğu bildirilmiştir (Kasnif vd., 2017).



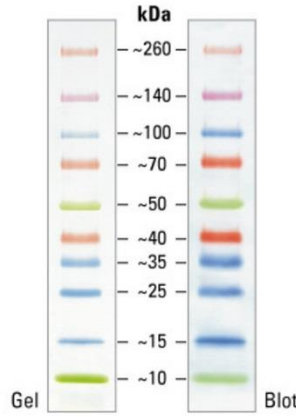
Şekil 5.13. KF-PHB formülasyonlarının salım profili

KF-PHB formülasyonunun salım profili, KD-PHB formülasyonunun salım profili ile karşılaştırıldığında daha etkili bir uzatılmış salım gözlemlenmektedir. Bu durum, film formülasyonunun oluşturulduğu emülsiyon yönteminde, kollajenlerin PHB içerisine hapsolması ve PHB ve Eudragit tamamen çözünmeden kollajenlerin tam olarak dışarı çıkamamasından kaynaklanmaktadır. Bu salım profili, kollajenin çok az miktarda salındığını gösterdiğinden, yara iyileşmesi süresi düşünüldüğünde uygun bulunmamıştır.

5.7. SDS-PAGE Çalışması

Formülasyon koşulları sırasında ve salım çalışmaları süresince kollajenin yapısının bozunup bozunmadığı Bölüm 4.6'daki anlatıldığı gibi SDS-PAGE yöntemi ile analiz edilmeye çalışılmıştır. Globüler proteinlerin aksine, doğrusal fiber benzeri bir yapıya sahip olan kollajen moleküllerinin en belirgin özelliği, üç polipeptit zincirinden oluşması ve üçlü helezon yapısına dönüşmesidir (Yetim, 2011; Sun vd., 2017). Kollajen proteinin yapı taşlarını oluşturan ve polipeptid alt birimlerden oluşan α -zincirleri mikro fibrilleri, mikro fibriller makro fibrilleri ve daha sonra da makro fibriller bir araya gelerek kollajen fiberlerini meydana getirirler (Yetim, 2011).

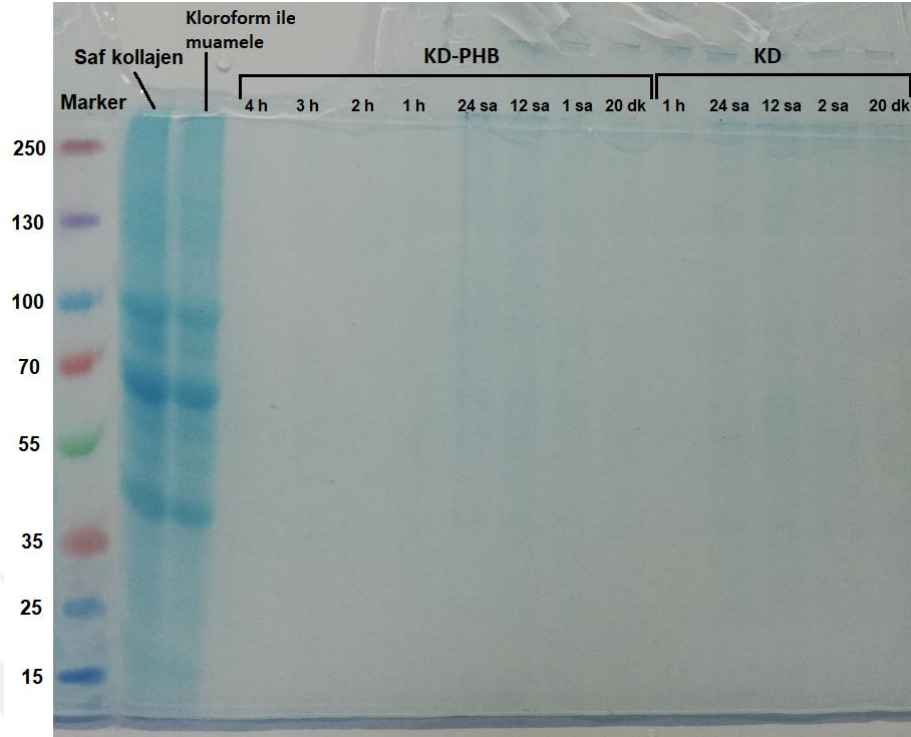
Bu çalışmada, kollajenin jel üzerinde verdiği bantların değerlendirilmesi amacıyla, kontrol olarak molekül boyutunu 4 renkte ve 10 farklı kDa değerlerinde bant verme özelliğe sahip PageRuler™ Plus Protein Ladder kullanılmıştır (Şekil 5.14). Ancak bu çalışmada 8 bant çıkmasının nedeni %7,5'lik ayırma jeli kullanılmasıdır.



Şekil 5.14. Proteinlerin molekül ağırlığını belirlemek için kullanılan marker (<http-3>)

Yürütme sonrası boyanan jelde, denizanası kollajeni için litaretürdekine benzer kısımlarda bantlar görülmektedir. Addad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı denizanası türlerinden kollajenler izole edilmiş ve SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. Buna göre üçlü-sarmal proteinlerin, düşük hidrofobik amino asit kalıntısı içerikleri nedeniyle, SDS-PAGE'de moleküler kütleleriyle ilişkili olmayan bir elektroforetik mobiliteye sahip oldukları gözlemlenmiştir (Addad vd., 2011).

Bizim yaptığımız çalışmada elde edilen bantlar Derkus vd. tarafından yapılan jellyfish kollajenin SDS-PAGE çalışmasındaki sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Derkus vd., tarafından yapılan çalışmada jellyfish kollajen proteininin SDS-PAGE jeli üzerinde verdiği 3 bant 30-100 kDa aralığına karşılık gelen bölgede gözlemlenmiştir (Şekil 5.15) (Derkus vd., 2016). Şekil 5.15 incelendiğinde, bu çalışmada saf kollajen ve kloroform ile muamele edilen kollajen için gözlemlenen bantlar 30-100 kDa aralığında yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde, saf proteinin ve kloroform ile muamele edilmiş kollajenin bantlarının benzerlik gösterdiği gözlemlenmektedir. Yüksek yüzdeli alkol ile muamele edilen kollajenin üçlü sarmal yapısından tekli sarmal yapıya doğru kaydığı belirtilmiştir (Gopinath vd., 2014). Formülasyonda bulunan alkol ve kloroformun etkisi ile bu yapının tekli sarmal yapıya yönelmesi mümkündür ancak, SDS-PAGE işleminde proteinlerin jele yüklenmeden önce de denatüre edilmesi, üçlü sarmal yapılarının ayrılması işlemi de yapılmaktadır. Jel görüntülerinin alkol ve kloroformla muamele görmüş kollajen yapının, denatüre olmuş saf kollajen yapıdan farklı bantlar sunmaması, formülasyondaki kollajenin tekli fibril yapıya dönmüş olsa bile parçalanmadığını işaret etmektedir. Bu durum, kollajenin formülasyon hazırlama esnasına kullanılan çözücülerle muamele, karıştırmak ve liyofilze etmek gibi stres ortamlarına maruz kladığında bozulmadan yapısını koruduğunu göstermektedir.



Şekil 5.15. Kollajen, KD ve KD-PHB salım örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü. *h; Hafta, sa; Saat, dk; Dakika*



Şekil 5.16. Kollajen ve KF-PHB salım örneklerinin SDS-PAGE görüntüsü. *h; Hafta, sa; Saat, dk; Dakika*

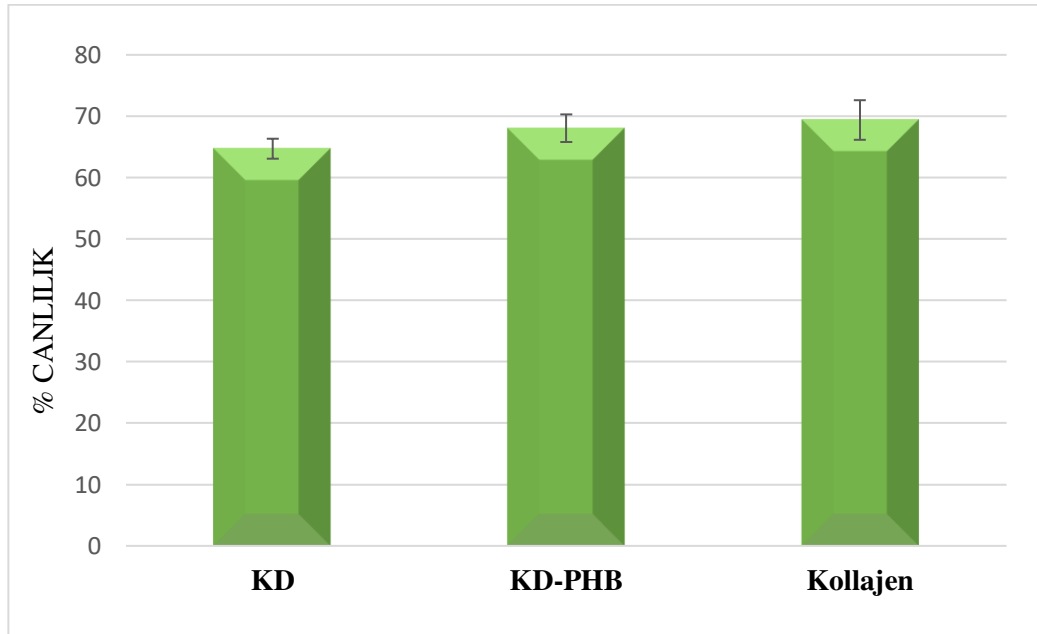
Şekil 5.15 ve 5.16 incelendiğinde, sonuçların yapılan salım çalışmalarıyla uyumlu olduğu gözlemlenmektedir. KD ve KD-PHB formülasyon salım örneklerinde bantlar silik olarak gözlemlenmiştir. Bu durum salım örneklerindeki kollajen miktarının yeterli olmamasından kaynaklanmaktadır. KF-PHB salım örnekleri ile karşılaştırıldığında neredeyse hiç bant gözlemlenmemiştir. Bunun nedeni, film formülasyonunun, disk formülasyonlarına göre çok daha yavaş salım yapması ve bunma bağlı olarak kollajen miktarının çok düşük olması, dolayısıyla Bradford analiz yöntemi kadar hassas olmayan SDS-PAGE ile belirlenememesidir.

5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Sitotoksite çalışmalarında, hazırlanan film ve disk formülasyonların hücreler üzerinde olan etkisini belirlemek için MTT testi kullanılmıştır. Sitotoksisite çalışmaları, disk formülasyonlarında KD, KD-PHB, F-PHB ve KF-PHB formülasyonları üzerinde denenmiştir.

5.8.1. KD ve KD-PHB formülasyonlarının sitotoksisite değerleri

KD ve KD-PHB formülasyonları için yapılan sitotoksisite çalışmasında, bu diskler ve disk içeriği ile aynı oranda kollajen uygulanmış hücrelerin 72 saat sonunda elde edilen MTT test sonuçları Şekil 5.17’de gösterilmiştir.



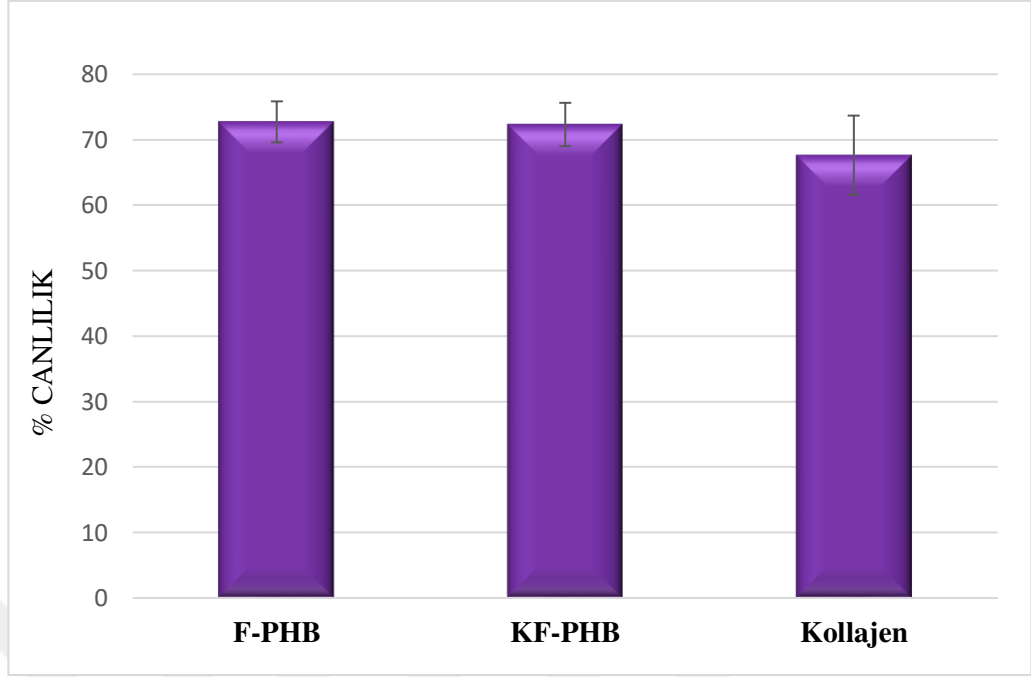
Şekil 5.17. KD ve KD-PHB formülasyonlarının HaCat hücre hattında 72. saatteki sitotoksite değerleri (n=4)

Formülasyonların yapısında bulunan kollajenin yara iyi edici özellikte olduğu bilinmektedir (Vigneswari vd., 2016). Kollajen proteini farklı kaynaklardan elde edilebilir. Bu tez çalışmasında da kullanılan denizanası kollajeni için yapılan bir çalışmada, insan fibroblastları, endotel hücreler, düz kas hücreleri ve kondrositler gibi farklı hücre hatlarına uygulanan kollajenin yüksek hücre canlılığı gösterdiği belirtilmiştir (Song vd., 2006). Literatürde, Kollicoat MAE100P ile hazırlanan nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine herhangi bir toksik etkisi olmadığı gösterilmiştir (Kumar vd., 2019). Ayrıca, formülasyonun yapısına dahil edilen PHB'nin non-toksik olduğunu belirten çok sayıda çalışma vardır (Karahaliloğlu vd., 2013; Pourmollaabbassi vd., 2016). PHB içeren bu iskelelerin kontrollü salıma etkisinin yanında, antibakteriyel aktiviteleri, sitotoksitesi, hücreye yapışma özellikleri ve fibroblast hücre proliferasyonunun gözlemlenmesi gibi özelliklere sahip olması yara iyileşmesi için umut verici biyomateryal olduğunu göstermiştir (Kandhasamy vd., 2017).

Şekil 5.17 incelendiğinde kollajen içeren liyofilize disklere PHB emdirildiği zaman, PHB emdirilmemiş disklere göre hücre canlılığında artış olduğu gözlemlenmektedir. KD ve KD-PHB formülasyonlarının kontrol grubunun altında kalması ise yavaş salımla beraber ortama daha az kollajenin geçtiğini düşündürmektedir.

5.8.2. F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarının sitotoksite değerleri

F-PHB ve KF-PHB formülasyonları için yapılan sitotoksite çalışmasında, bu filmler ve film içeriği ile aynı oranda kollajen uygulanmış hücrelerin 72 saat sonunda elde edilen MTT test sonuçları Şekil 5.18'de gösterilmiştir.



Şekil 5.18. F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarının HaCat hücre hattında 72. saatteki sitotoksite değerleri (n=4)

Film formülasyonlarının yapısında bulunan Eudragit RS100 için yapılan bir çalışmada, Eudragit RS100 ile hazırlanan nanopartiküllerin sınırlı sitotoksisiteye sahip olduğu ve bu durumun hücre tipine ve konsantrasyona bağlı olduğu belirtilmiştir (Gargouri vd., 2009).

Şekil 5.18'deki sonuçlar incelendiğinde, kollajen içermeyen filmler ile kollajen içeren filmlerin yaklaşık olarak aynı canlılık oranına sahip olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum PHB'nin hücre canlılığı üzerine olumlu etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Emülsiyon yöntemiyle oluşturulan filmlerde kollajen çevresini saran PHB, 72 saatin sonunda tam olarak parçalanmaması nedeniyle hücre canlılığının boş emülsiyon filmleriyle yaklaşık aynı değerde çıktığı söylenebilir.

Şekil 5.17 ve Şekil 5.18 karşılaştırıldığında, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarında KD ve KD-PHB formülasyonlarına göre daha yüksek hücre canlılığı gözlemlenmiştir. Bunun nedeni, sitotoksite çalışmalarında kullanılan film formülasyonlarındaki PHB miktarının, disk formülasyonlarından daha fazla olmasından kaynaklanabilir. Tablo 4.9'da yer alan disk ve film formülasyon içerikleri incelendiğinde disk formülasyonlarının daha yüksek kollajen içerisine sahip olduğu belirtilmiştir. Sitotoksite çalışmaları ise kollajen miktarı sabit tutularak yapıldığı için aynı miktarda

kollajen içeren disk ve film formülasyonlarında PHB oranları farklı olmaktadır ve film formülasyonları daha yüksek PHB içermektedir. Literatürdeki birçok çalışma PHB'nin, hücre proliferasyonu üzerinde arttırıcı etkisi olduğunu gözlemlemiştir (Li vd., 2008; Kandhasamy vd., 2017). Özellikle HaCat hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada, PHB nanofibröz iskelelerin sitotoksitesitesi incelenmiş ve bu iskelelerin hem PHB içeriği hem de gözenekli yapısı sayesinde hücre canlılığı üzerinde arttırıcı etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir (Li vd., 2008). Bu sonuçlar ele alındığında, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

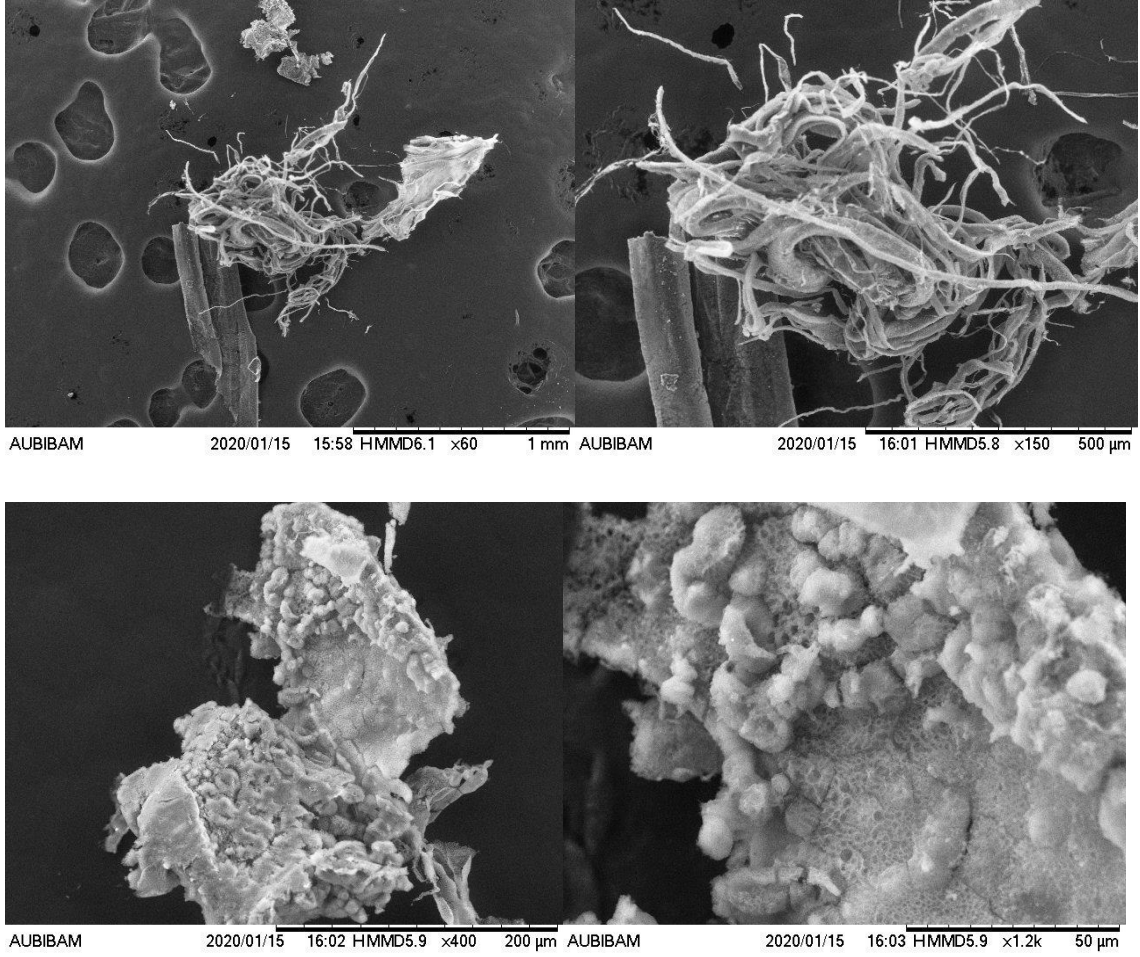
5.9. Karakterizasyon Çalışmaları

5.9.1. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizi

Bir tür elektron mikroskobu olan SEM, hücrelerin üç boyutlu görüntülerinin elde edilmesi amacıyla kullanılır. Burada oluşturulan elektron demeti hücrenin içinden geçmez. Elektron demetleri, ağır metal ile kaplanmış hücre yüzeyini tarayarak, örnek yüzeyinden geri gelen ve saçılan elektronlar üç boyutlu bir görüntü oluşturabilmek üzere toplanır. Burada elektronlar, numunedeki atomlarla etkileşime girerek çeşitli sinyaller üretir ve bu durum numunenin bileşimi ve topografyası hakkında sinyaller üretilmesine neden olur. Çözünürlüğü yaklaşık 10 nm kadar olduğundan, hücre içi organeller ve makromoleküllerin aksine sadece hücre yüzey bütünlüğü incelenebilir. (Cooper ve Hausman, 2004; Stokes, 2008).

– PHB-İ

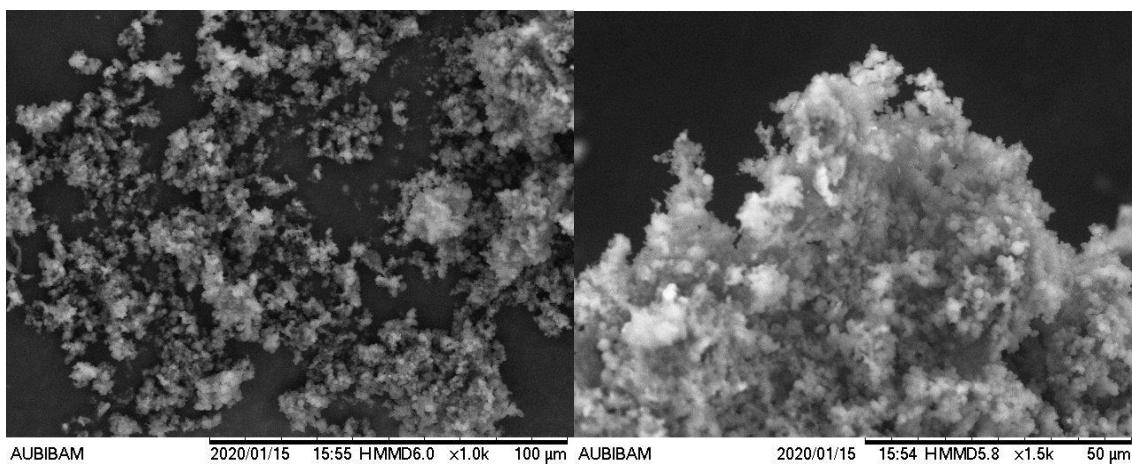
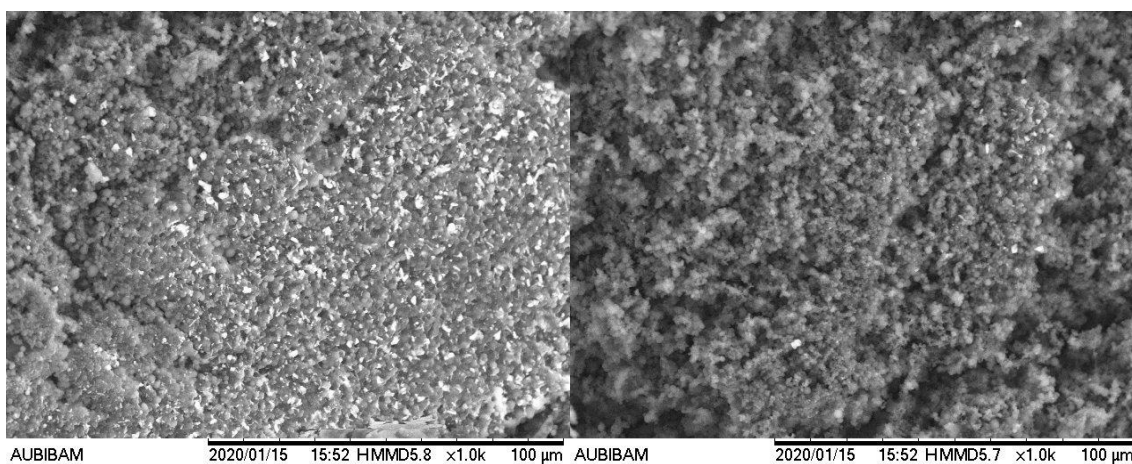
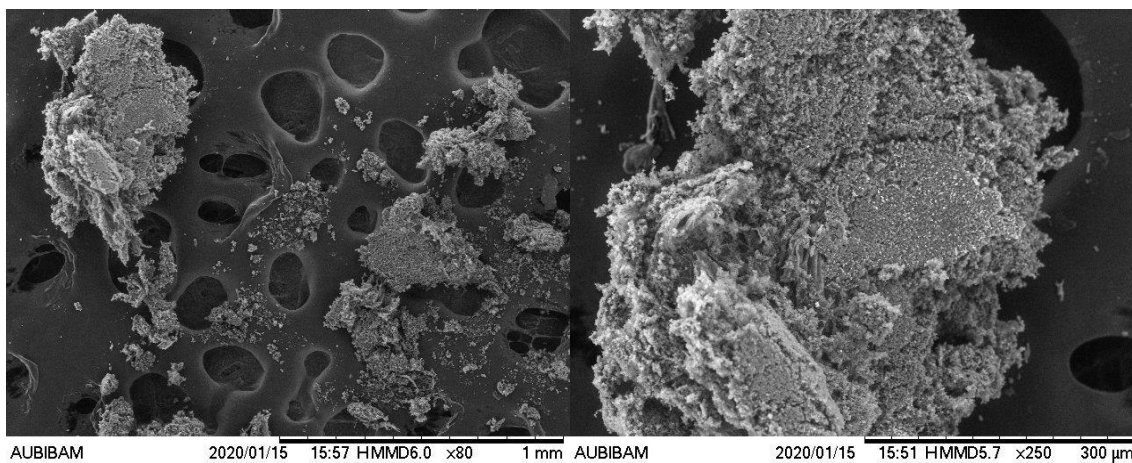
PHB-İ olarak sunulan örnek, Sheffield Üniversitesi (İngiltere) Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü, İnovasyon Merkezinde PHA üretimi üzerine çalışan Prof.Dr. Ipsita Roy tarafından çok miktarda üretilmektedir ve bu çalışmada referans ürün olarak kullanılmıştır. Referans olarak kullanılan polimerin hem lifli hem de bulk yapılar taşıdığı SEM görüntüleri ile (Şekil 5.19) belirlenmiştir.

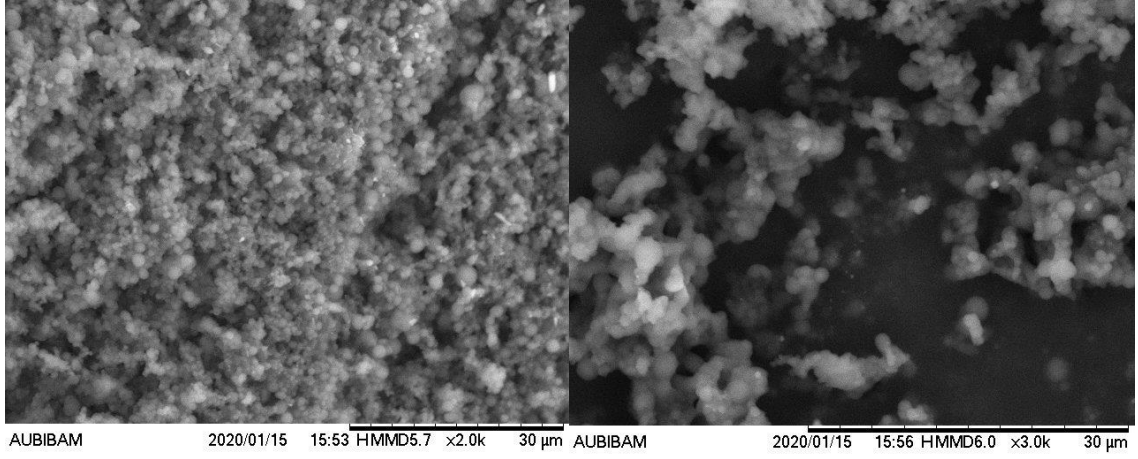


Şekil 5.19. Referans PHB (PHB-İ)'nin SEM görüntüleri

– **PHB-M**

Bu çalışma kapsamında üretilen PHB-M'nin lifli yapıda olmadığı, bulk ve porlu matertal olduğu gözlenmiştir. Elde edilen polimer, beyaz renkte ve yumuşak toz dokuya sahiptir ve üzerine kuvvet uygulandığında hacmini kaybetmektedir ancak tekrar pens ile tutulduğunda dağılıp eski toz formuna ufalanarak dönüşmektedir. PHB-M'ye ait SEM görüntüleri Şekil 5.20'de sunulmuştur. Bu yapının PHB-İ'den farklı oluşunun ekstraksiyon yöntemindeki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ektraksiyon ve formülasyon aşamasında kullanılan organik çözücülerin PHB'nin yapısını porlu hale getirdiği rapor edilmiştir (Tan vd., 2016).

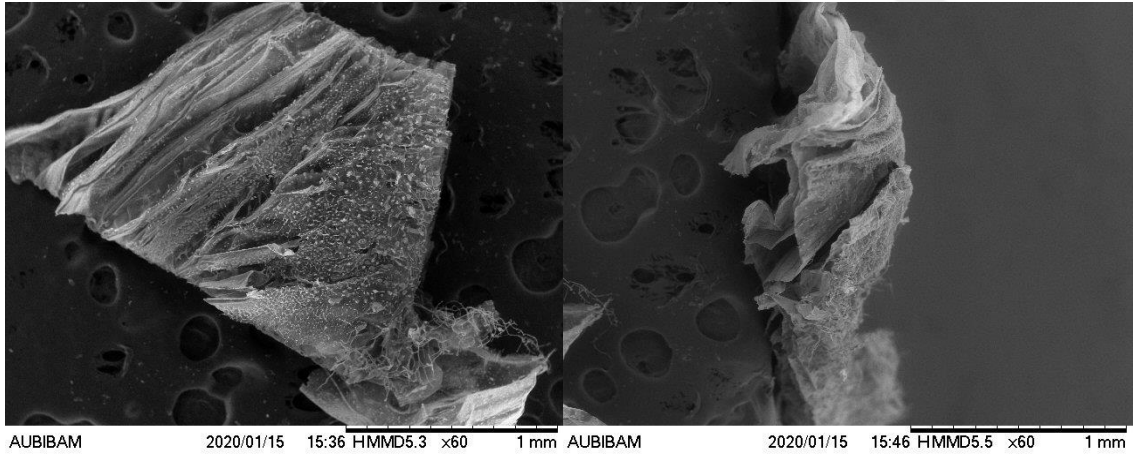


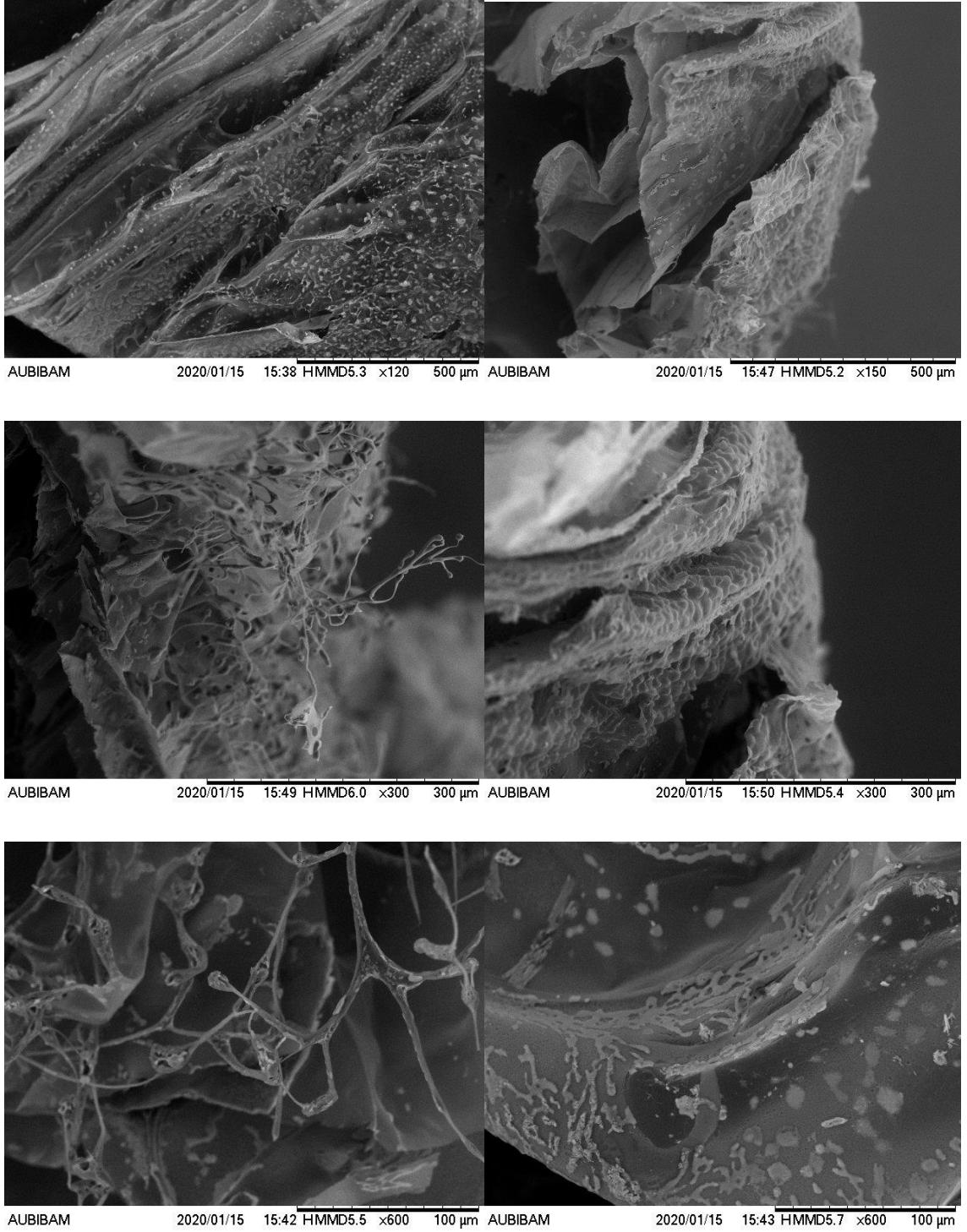


Şekil 5.20. PHB-M'ye ait çeşitli kesitlerin SEM görüntüleri

– **Kollajen**

Kullanılan denizanası kollajeninin SEM görüntüleri Şekil 5.21’de sunulmuştur. Kollajen liflerin bir araya gelerek tabakaları oluşturduğu gözlenmiştir.



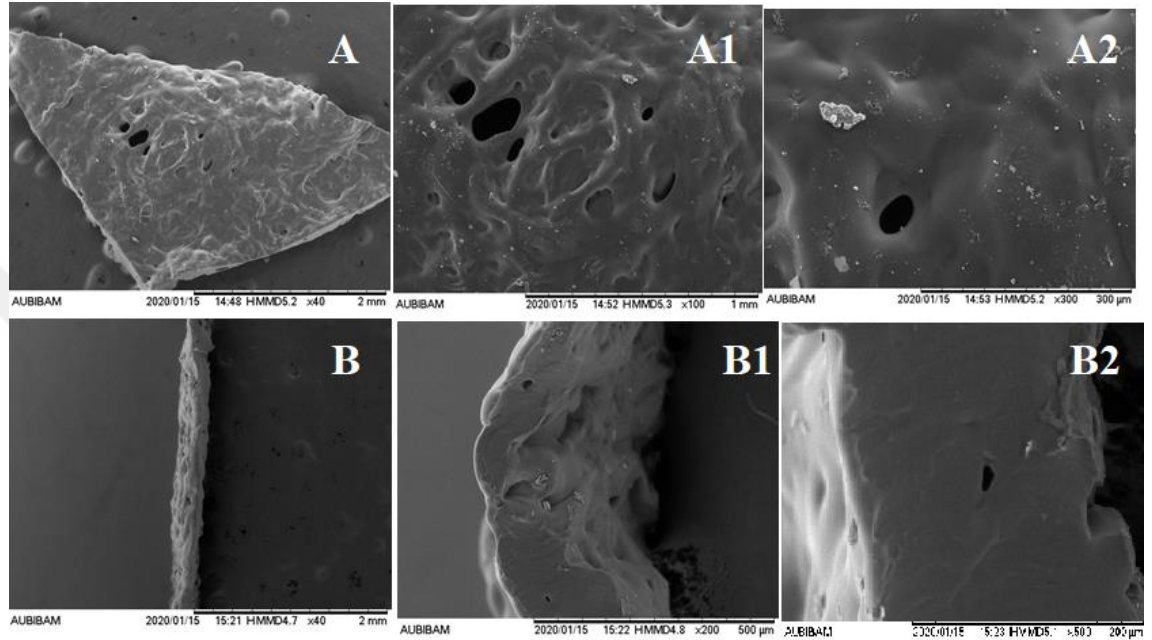


Şekil 5.21. Denizanası kollajenin farklı kesitlerdeki SEM görüntüleri

– **Kollajen liyofilize disk (KD)**

KD formülasyonuna ait farklı kesitlerden alınmış ve büyütülmüş SEM görüntüleri Şekil 5.22’de sunulmuştur. Suda çözünmüş kollajenin, Kollicoat ve PEG ile karışımı ile

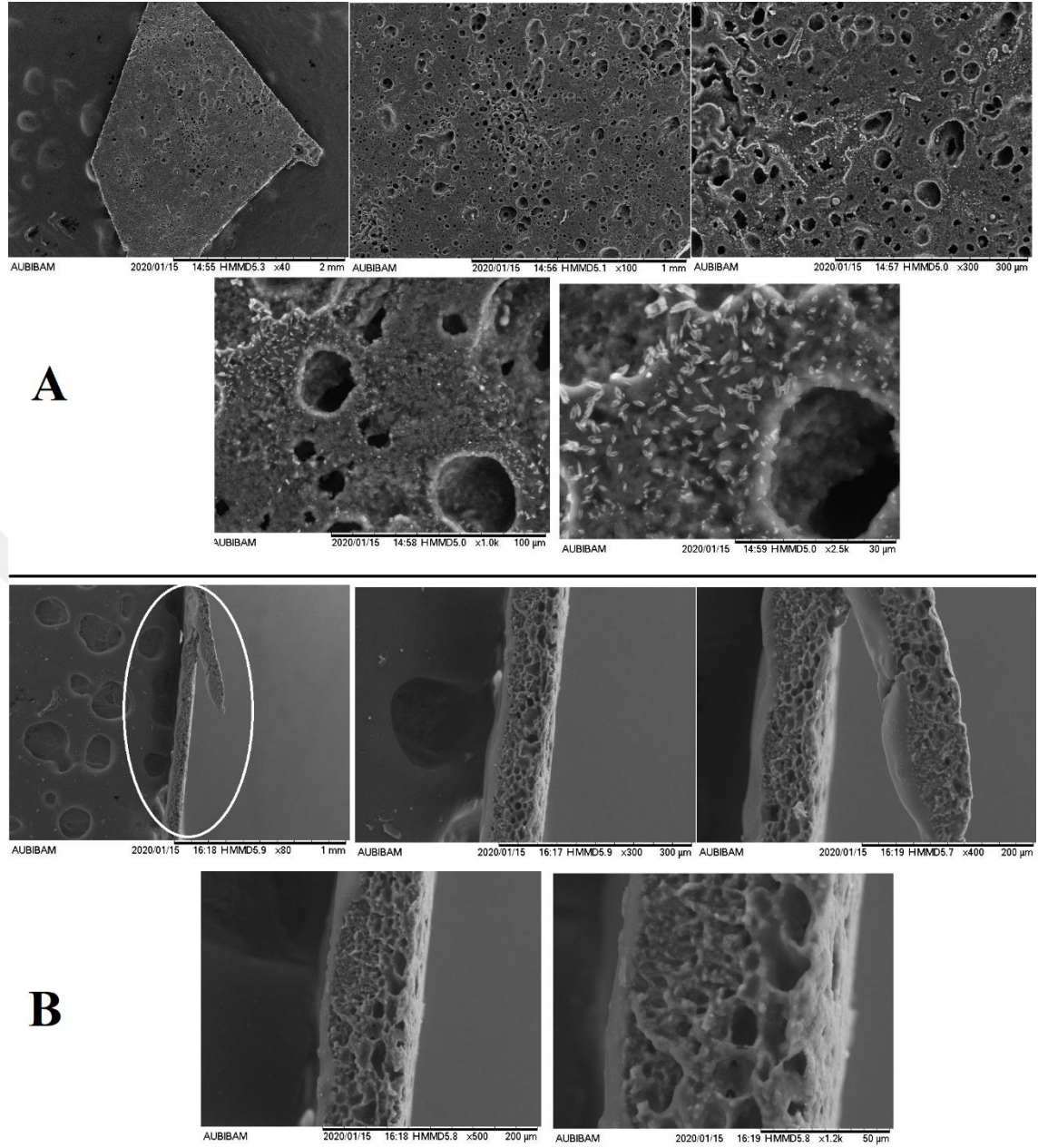
elde edilen bu diskin SEM görüntüleri, kollajenin bu iki polimer karışımında homojen karıştığını ve çok porlu bir yapı oluşturmadığını göstermektedir. Diskin uygulandığı bölgede, Kollicoat ve PEG'in ıslanıp şişmesi ve değredasyonu ile kollajenin homojen bir şekilde salınacağı düşünölmektedir.



Şekil 5.22. KD diskinin SEM görüntüleri, A; Disk yüzeyi, B; Diskin yan kesiti

– **PHB Emdirilmiş Kollajen liyofilize disk (KD-PHB)**

KD-PHB diskinin üst ve yan kesitlerinden çeşitli büyötmelerle alınmış olan SEM görüntülerinde, PHB'nin varlığının KD disk yapısında porlu bir yapı oluşturduğu gözlenmiştir. PHB'nin KD'nin yapısı ile bütünleştiği, kullanılan kloroformun PHB üzerindeki etkisiyle porlu yapı kazanıldığı gözlenmiştir (Tan vd., 2016). KD-PHB diskinde ait SEM görüntüleri Şekil 5.23'te sunulmuştur.

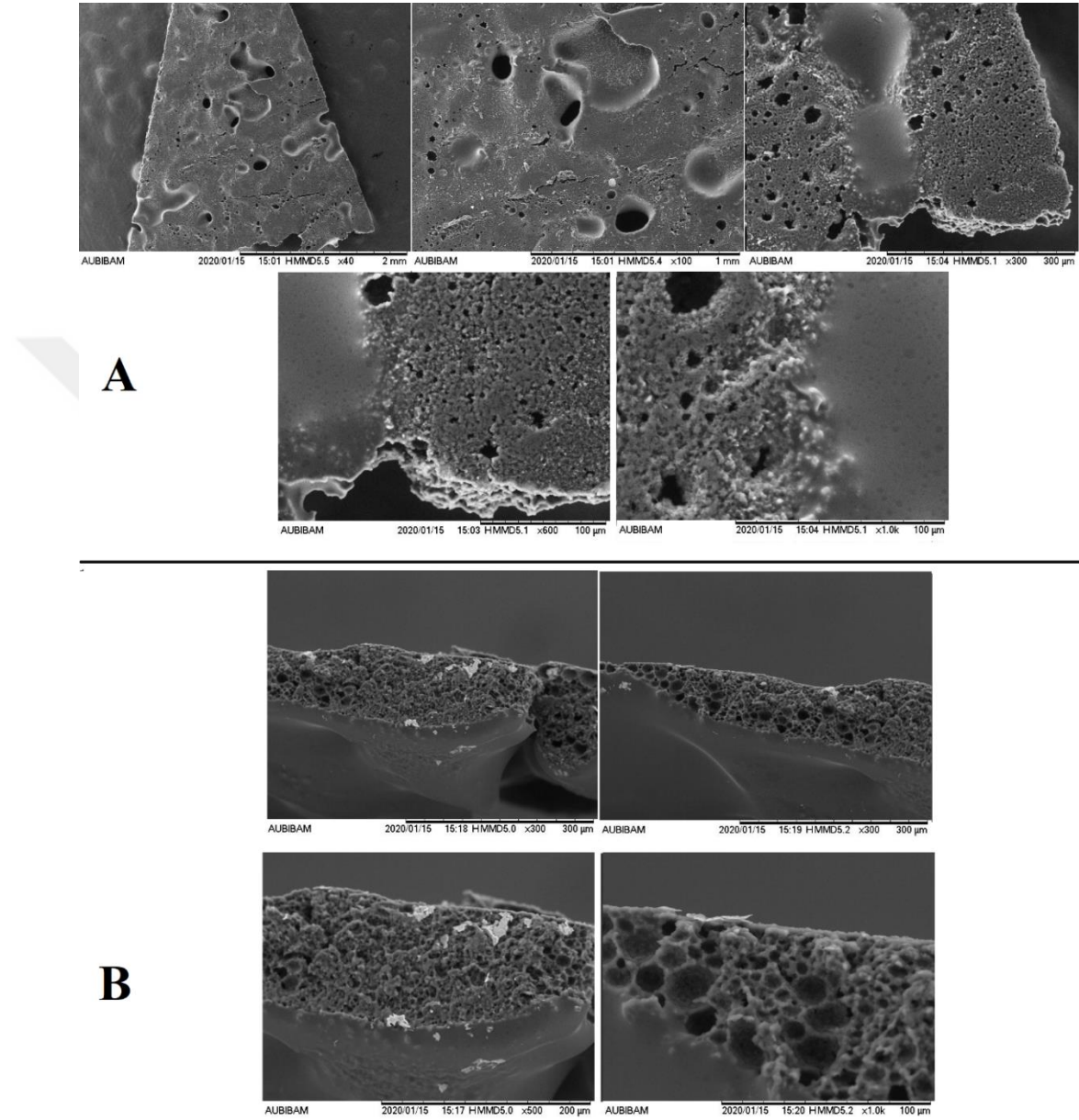


Şekil 5.23. KD-PHB diskinin SEM görüntüleri, A; Disk yüzeyi, B; Diskin yan kesiti

– **PHB Emülsiyon Film (F-PHB)**

F-PHB filminin yüzey ve yan kesitlerine ait farklı büyütme ölçeklerinde çekilmiş SEM görüntüleri Şekil 5.24’te verilmiştir. Bu görüntülere göre, film yapının disk yapılarına oranla daha küçük ancak çok daha porlu, süngerimsi yapıda olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni, s/y tipi emülsiyon hazırlama tekniğinin ve sert/esnek olmayan olmayan Eudragit RS100 polimerinin kullanılmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Görüntüler, PHB’nin

bu polimer içerisinde homojen dağıldığını ve gözeneklerin ise polimer içerisinde dağıtılmış su fazının buharlaşmasından sonra oluştuğu düşünülmektedir.

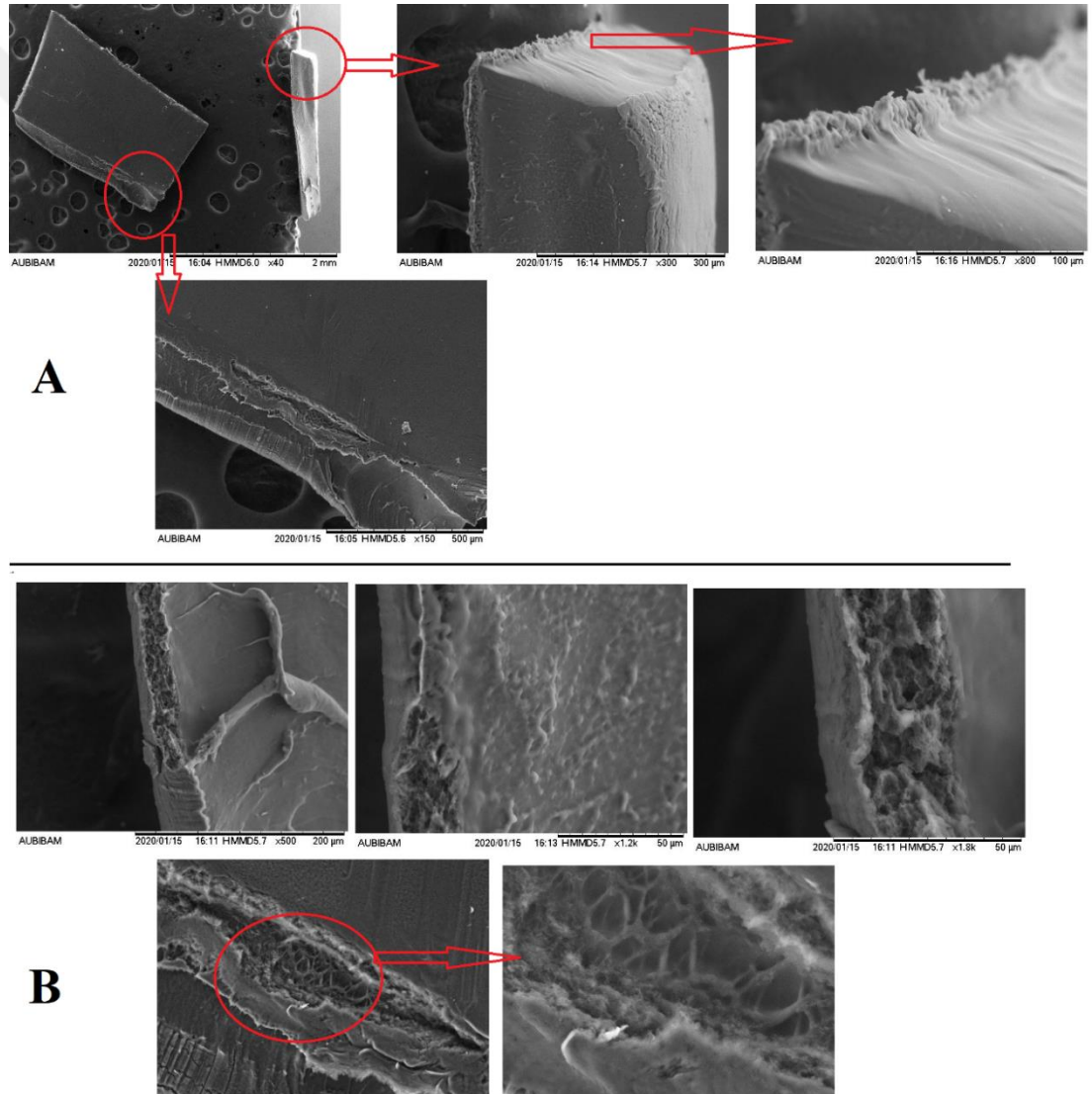


Şekil 5.24. *F-PHB filminin SEM görüntüleri, A; Film yüzeyi, B; Film yan kesiti*

– **Kollajen içeren PHB Emülsiyon Film (KF-PHB)**

Kollajenin varlığının, F-PHB yapısına esneklik kazandırdığı gözlenmiştir ve bu SEM görüntüleri ile de doğrulanmaktadır (Şekil 5.25). Şekil 5.24'te görüntülerde F-

PHB film yapının yüzeyinin porlu görüntüsü KF-PHB’de gözlenmemektedir ve F-PHB kırılğan bir yapıya sahipken KF-PHB’nin daha yumuşak ve yapışkan bir yapıya sahip olduğu, örnekler hazırlanırken kullanılan makasa yapıştığı gözlenmiştir. KF-PHB’nin yan kesitinden film yapının iç kısımlarının hala porlu yapı taşıdığını göstermektedir. Salım profillerinden çıkan sonuçlar da kollajenin salınmasının çok yavaş olduğunu göstermiştir, bu da porlu film yapının dış yüzeyinin PHB ve Eudragit polimerleri ile kaplandığını ve polimerlerin degrede olmadan kollajenin salınmasının mümkün olmadığını işaret etmektedir.



Şekil 5.25. KF-PHB filminin SEM görüntüleri, A; Film yüzeyi, B; Film yan kesiti

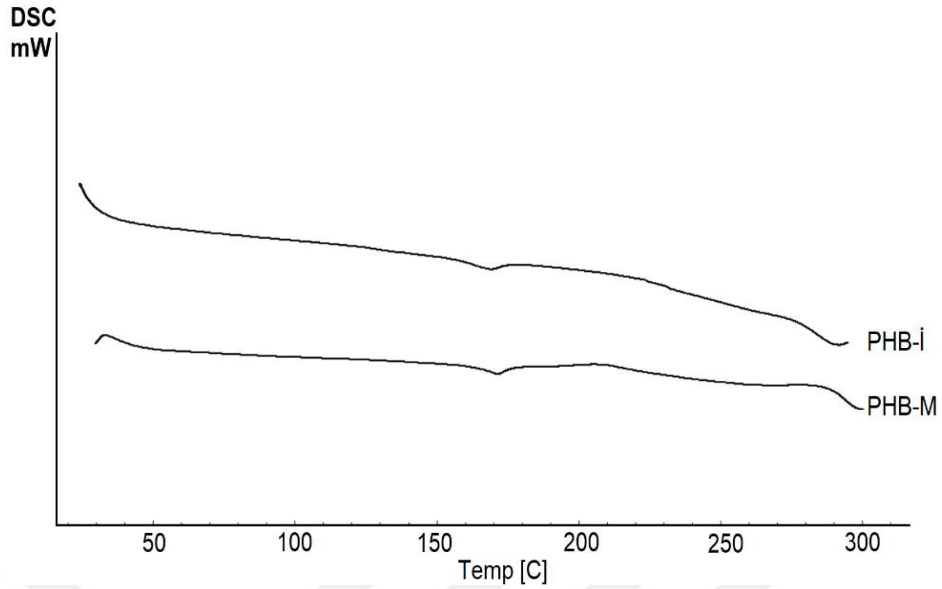
5.9.2. Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi

Diferansiyel tarama kalorimetresi, termal olarak indüklenen olayların özgül ısı kapasitesini ölçmek için kullanılır. Birçok farklı biyolojik makromolekül ve ekstraktın termodinamik özelliklerini incelemek için oldukça hassas bir tekniktir (Chiu ve Prenner, 2011). DSC, erime (T_m), kristalizasyon (T_c) ve cam geçiş sıcaklıklarının (T_g) ve buna karşılık gelen entalpi ve entropi değişikliklerinin belirlenmesini sağlamaktadır (Schick, 2009).

– **PHB**

Ekstre edilen polimerin ve elimizdeki referans PHB'nin termal özelliklerinden biri olan T_m (erime sıcaklığı), DSC ile tespit edilmiştir. Şekil 5.26.'da ekstre edilen polimerin ve referans polimerin DSC grafikleri karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir. Her iki polimer içinde erime sıcaklıkları çok benzer bulunmuştur. Literatürde PHB için erime sıcaklığı, üretilen mikroorganizmadan bağımsız olarak 173-180 °C aralığında olduğu belirtilmektedir (Hanh vd., 1995; Sudesh vd., 2000).

Şekil 5.26. incelendiğinde ekstre ettiğimiz polimerin (PHB-M) 171,27 °C'de, referans polimerin (PHB-İ) 174,31 °C'de erime noktasına sahip olduğu bulunmuştur. Bu durum, ekstre ettiğimiz polimer için elde ettiğimiz değerin PHB'ye ait olduğunu göstermektedir. Literatürdeki çok sayıdaki çalışma bu durumu doğrulamaktadır (Valappil vd., 2007; Misra vd., 2007). Ekstre edilen polimer, referans polimer ile karşılaştırıldığında T_m değerinde hafif bir azalma olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 5.26. DSC grafikleri, PHB-İ: Referans polimer, PHB-M: Ekstre edilen polimer

Ekstrakte edilen polimerin kristallik yüzdesi, denklem (5.1) kullanılarak DSC eğrisinden elde edilen füzyon entalpisi ölçülerek belirlenmiştir (Misra vd., 2007).

$$\%Kristallik (X_c) = \frac{\Delta H_f(\text{örnek})}{\Delta H_f(\%kristallik)} \times 100 \quad (5.1)$$

Burada $\Delta H_f(\text{örnek})$ ekstre edilen PHB'nin füzyon entalpisini belirtirken, $\Delta H_f(\%kristallik)$ %100 kristal PHB'nin füzyon entalpisini ifade etmektedir. %100 kristal PHB'nin füzyon entalpisinin 149.37 J/g olduğu bilinmektedir (Misra vd., 2007). Bu çalışmada ekstrakte edilen PHB için elde edilen füzyon entalpisi denklemde yerine konulduğunda %20,49 gibi düşük bir kristallik derecesi elde edilmiştir.

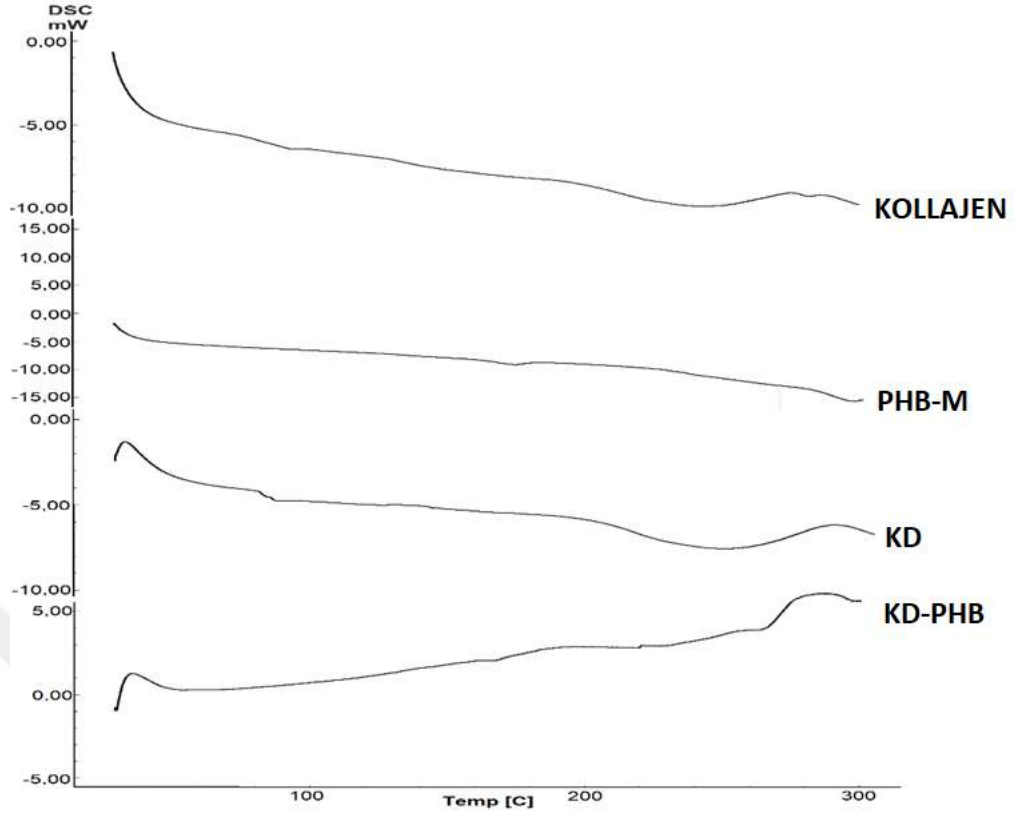
PHB, bakteri içerisinde amorf halde bulunurken, bakteriden izole edildiğinde ekstraksiyon tekniklerine bağlı olarak kristal yapı kazandığı bilinmektedir. Valappil ve arkadaşları farklı ekstraksiyon teknikleriyle *Bacillus cereus*'dan üretilen PHB için kristallik derecesini araştırmışlar ve bu kristalliğinin kullanılan ekstraksiyon tekniğine bağlı olduğunu göstermişlerdir (Valappil vd., 2007). Çalışmamızda bulunan bu düşük değerdeki kristalliğin ekstraksiyon yöntemimize bağlı olduğu düşünülmektedir. Laboratuvarımız imkânlarında küçük miktarlarda üretilen bakteriler ve elde edilen polimerin ekstraksiyon optimizasyonu, çalışma süresince mümkün olamadığından

kaynaklıdır. Ancak, DSC diyagramında başka bir pik görülmemesi, polimerin saf olarak elde edildiğinin göstergesidir.

– **KD ve KD-PHB formülasyonları**

DSC, bir formülasyonda ilaç ve polimer arasındaki fizikokimyasal etkileşimi bulmak için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir (Barzegar-Jalali vd., 2012). Kollajen, polimer (PHB-M) ve hazırlanan formülasyonlardan kollajen liyofilize disk (KD) ve PHB emdirilmiş kollajen liyofilize disk (KD-PHB) için DSC analizi yapılmış ve termogramları Şekil 5.27’de gösterilmiştir.

Literatürde T_m değerleri, denizanası kollajeni için ~31,9 °C (Rastian vd., 2018), PHB için ~173-180 °C (Hanh vd., 1995; Sudesh vd., 2000) olduğu belirtilmektedir. Şekil 5.27 incelendiğinde, kollajen liyofilize diske (KD) ait termogramda gözlemlenen geniş endotermik pik, içerisinde bulunan amorf yapıdaki Kollicoat MAE100P’ye aittir (Kim vd., 2014; Turanlı vd., 2019). Yapıya PHB’nin eklenmesiyle termogram yukarı yöne doğru yönelmiştir. KD-PHB termogramında yaklaşık 173,10 °C’de gözlemlenen pikin PHB-M’ye ait olduğu düşünülmektedir. Bu durum, PHB-M’nin hazırlanan formülasyon içerisindeki diğer maddelerle etkileşime girmediğini ve yeni bir bileşik oluşturmadığını dolayısı ile formülasyon içinde kararlı kaldığını göstermektedir.

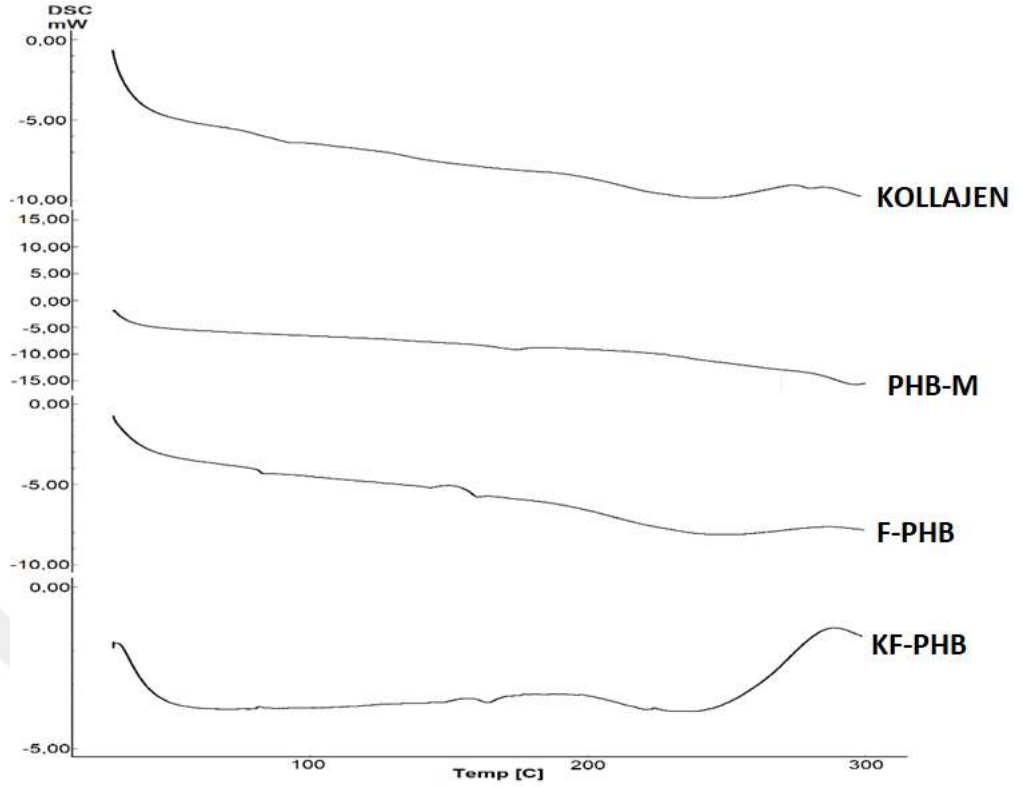


Şekil 5.27. Kollajen, PHB-M, KD ve KD-PHB formülasyonlarına ait DSC termogramları

– **F-PHB ve KF-PHB formülasyonları**

Kollajen, polimer (PHB-M) ve hazırlanan formülasyonlardan boş emülsiyon film (F-PHB) ve kollajen yüklü emülsiyon filmler (KF-PHB) için DSC analizi yapılmış ve termogramları Şekil 5. 28’de gösterilmiştir.

Boş F-PHB termogramında, 161,17 °C’de formülasyonun yapısındaki PHB-M’ye ait pik gözlemlenmiştir. 171,27 °C’de gözlemlenen PHB-M pikinde, formülasyon sonucunda düşüş yaşanmıştır. F-PHB formülasyonu yapısındaki Eudragit RS100, termogramın aşağıya doğru yönelmesine neden olmuştur (Pignatello vd., 2001; Jana vd., 2014). Boş emülsiyon film yapısına kollajen eklenmesiyle termogramda geniş bir ekzotermik pik gözlemlenmiştir. Oluşan bu yeni yapı içerisinde 163,88 °C’de gözlemlenen pikin PHB-M’ye ait olduğu düşünülmektedir. Bu durum, PHB-M’nin hazırlanan formülasyon içerisindeki diğer maddelerle etkileşime girmeden, kararlı kaldığını göstermektedir.



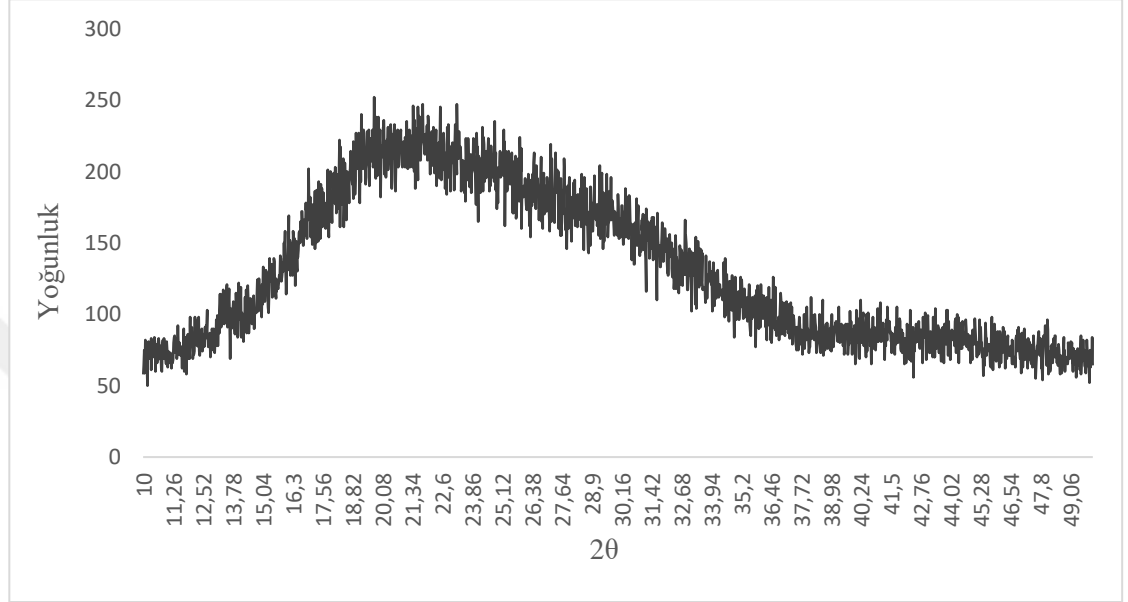
Şekil 5.28. Kollajen, PHB-M, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarına ait DSC termogramları

5.9.3. X-ışını kırınımı (XRD) analizi

X-ışınları yüksek enerjili elektromanyetik ışımalardır. Elektromanyetik spektrumda y ışınları ve ultraviyole (UV) ışınları arasına yerleştiren yaklaşık 200 eV ila 1 MeV arasında bir enerjilere sahiptirler (Suryanarayana ve Norton, 2013). X-ışını kırınımı, kristal yapıda bir maddenin atomik ve moleküler yapısını belirler. Bu kristal yapı, gelen X-ışın demetinin birçok yöne saçılmasına neden olur. Saçılan bu ışınların açı ve yoğunlukları ölçülerek, kristal yapı içindeki bu elektron yoğunluğunun üç boyutlu görüntüsü üretilir. Bu yöntemde, kristal yapı içindeki atomların ortalama konumları, kimyasal bağları ve çeşitli diğer bilgiler de analiz edilebilir (Copeland ve Bragg, 1958).

XRD analizi, ekstre ettiğimiz PHB'nin kristal yapısını kontrol etmek için yapılmıştır. Devi ve arkadaşları *Bacillus cereus*'dan elde ettikleri PHB için yaptıkları XRD çalışmasında 13,69°, 1,32°, 22,67°, 25,32°'de dört belirgin tepe notası gözlemlenmiştir. Bu pikler ve özellikle 13,69°'deki belirgin pik PHB'nin kristal yapıda olduğunu göstermektedir (Devi vd., 2015).

Şekil 5.29’da gösterilen, ekstre edilen PHB-M’nin XRD kırınım diyagramına bakıldığında belirgin tepe noktaları gözlemlenmemektedir. Bu durum ekstre edilen PHB-M’nin amorf yapıda olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 5.29. PHB-M’nin XRD kırınım diyagramı

PHA’nın denatürasyonu ve kristalizasyonu, genellikle ekstraksiyon yöntemindeki donma ve çözme döngüleri veya solventlere, deterjanlara maruz kalması gibi fiziksel stres yollarından fazlasıyla etkilenir (Grage vd., 2009). Ekstraksiyon tekniğinden kaynaklanan nedenlerle amorf yapıda polimer oluşumu gerçekleşebilir.

5.9.4. Fourier dönüşümü infrared spektrometresi (FTIR) analizi

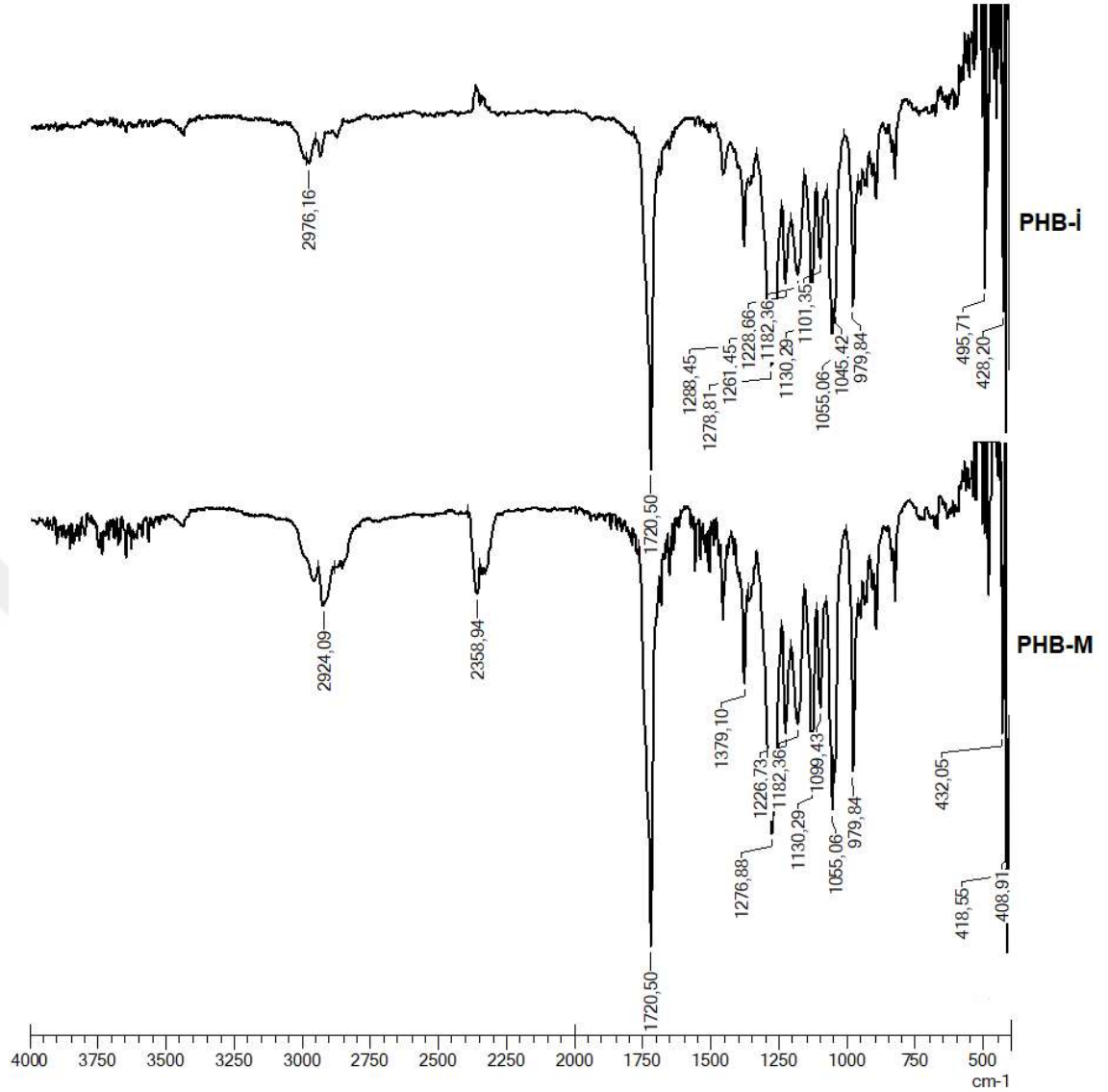
Fourier dönüşümü infrared spektrometresinde (FTIR), her bir moleküler grubun karakteristik titreşim modu, belirli bir frekansta kızılötesi spektrumda bantların ortaya çıkmasına neden olur. Bu durum, aynı zamanda çevredeki fonksiyonel gruplardan fazlasıyla etkilenir. Böylece FTIR spektroskopisi, organik bileşiklerin kalitatif tayinine izin vermektedir. Ayrıca bu analiz yönteminde, spektrumda oluşan bantların yoğunlukları konsantrasyonla doğru orantılı olduğundan kantitatif analiz yapmak da mümkündür (Vlachos vd., 2006). FTIR spektroskopisinde, bir girişim dalgası, etkileşimde bulunan enerjinin iyi tanımlanmış bir dalga boyu aralığı aldığı bir dağıtıcı aletin aksine numune ile etkileşir. Bu girişim dalgası, bir interferometrede üretilir. IR kaynağından toplanan

ışın demeti, interferometreye yönlendirilir ve burada bir ışın ayırıcı ile bölünür. Bölünen ışının yarısı sabit bir aynadan, diğer yarısı hareketli bir aynadan yansıtılır. İki ışın demeti, aynalardan döndükten sonra yeniden birleşir ve girişim dalgası olarak yeniden yapılanmış bir ışın demetine dönüşür. Girişim ışın demeti örnekten geçer ve numune ile etkileşime girerek modifiye edilir. Oluşan sinyaller detektöre gelerek burada bir analog-dijital dönüştürücü (ADC) tarafından hesaplanır ve veriler bilgisayarda depo edilir (Faix, 1992).

– **PHB**

Substrat olarak glikoz kullanılarak üretilen polimerin fonksiyonel grubu araştırmak ve konformasyonu için FTIR spektroskopisi, elimizdeki referans PHB ile birlikte araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Spektrumlar 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} aralığında kaydedilmiştir.

Şekil 5.30’da gösterilen, ekstrakte edilen polimerin FTIR spektrumunda, PHB molekülünde bulunan ester bağlanması için karakteristik olan sırasıyla karbonil $\text{C}=\text{O}$ ve asimetrik C-O-C gerilme titreşimine karşılık gelen, $1720,50\text{ cm}^{-1}$ ve $1278,81\text{ cm}^{-1}$ bölgelerinde keskin pikler gözlemlenmektedir (Aarthi ve Ramana, 2011; Ansari ve Fatma, 2016). Bu pikler, referans PHB için elde edilen piklere karşılık gelerek, ekstre edilen polimerin PHB olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, ekstre edilen polimerdeki piklerden $2976\text{-}2924$ ve 1101 cm^{-1} pikleri sırasıyla C-H ve C-O gerilmesinin varlığını göstermektedir (Devi vd., 2015).



Şekil 5.30. PHB-İ: Referans polimer, PHB-M: Ekstre edilen polimer için FTIR spektrumları

– **KD ve KD-PHB formülasyonları**

Çeşitli kaynaklardan ekstre edilen kollajen için yapılan bir çalışmada, polipeptid omurgasını belirten C-O gerilmesi $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ aralığında olduğu belirtilmiştir. Yaklaşık olarak 1653 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik N-H gerilmesi ile C-O arasında meydana gelen hidrojen bağlarını göstermektedir (Amid I bandı). 1558 ve 1539 cm^{-1} 'deki piklerin varlığı N-H düzlem içi bükülmesi ve C-N gerilme titreşimlerini ifade etmektedir (Amid II bandı) (Riaz vd., 2018). Kollajen için karakteristik olan ve C=H gerilmesini gösteren bir diğer amid bantı ise KD'de belirgin hale gelerek 1456 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir (Amid III bandı) (Safandowska ve Pietrucha, 2013). Cheng ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada,

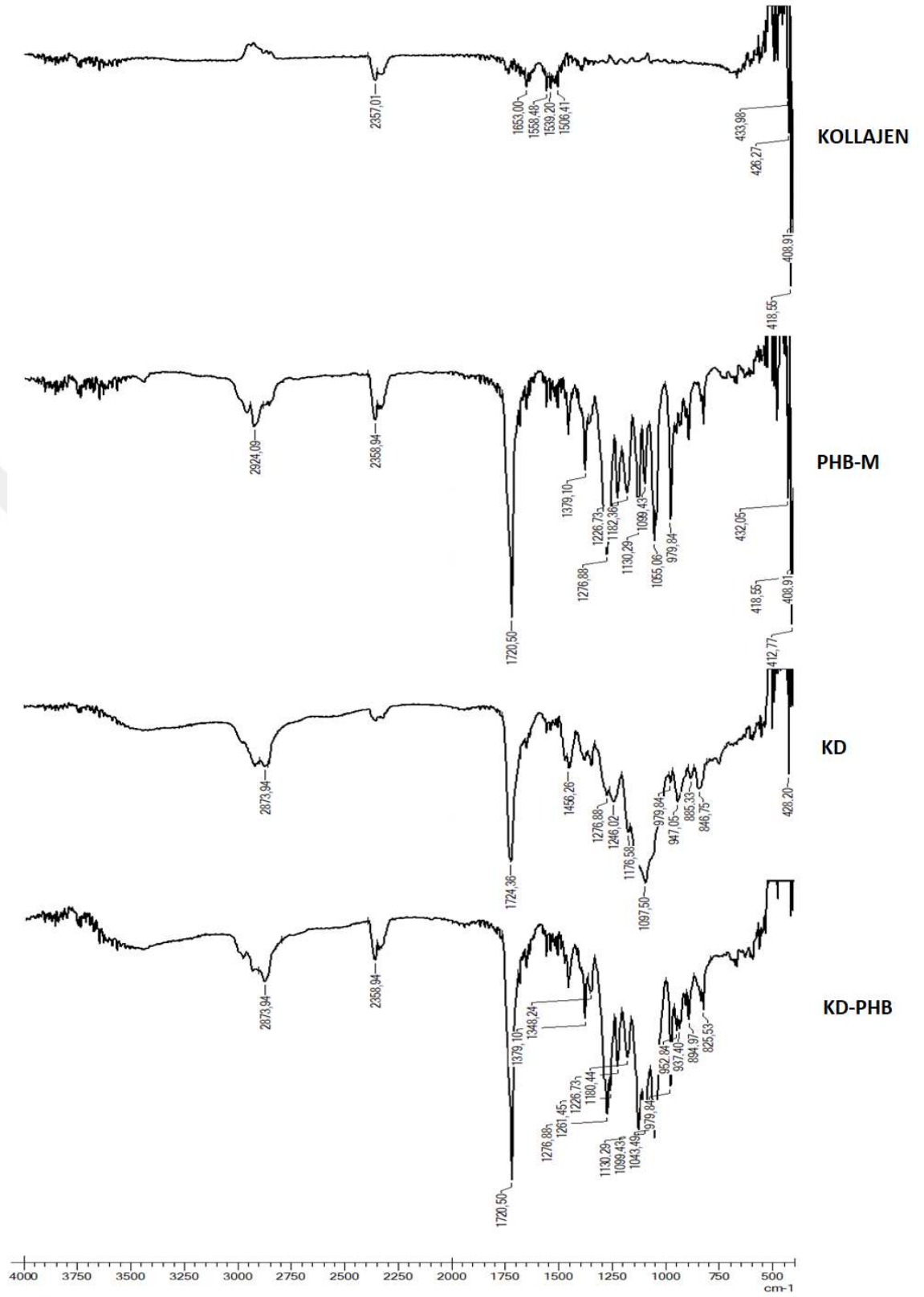
denizanasından elde edilen kollajenin FTIR spektrumunda 2362 cm^{-1} 'de gözlemlenen bantın yoğunluğu arttıkça, çapraz bağlanma derecesinde arttığı tespit edilmiştir (Cheng vd., 2017). Şekil 5.31'de saf kollajen ve oluşturulan formülasyon verileri karşılaştırıldığında, PHB'ninde etkisiyle 2358 cm^{-1} 'deki pikte artış gözlemlenmiştir.

Majeed ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, Kollicoat MAE100P'nin FTIR spektrumu için 3421 cm^{-1} 'de OH gerilmesini gösteren geniş bir bant gözlemlendiği belirtilmiştir. Kolicoat MAE100P için karakteristik olan diğer bantlar ise 1637 cm^{-1} 'de C=O gerilmesini, 2915 cm^{-1} 'de C-H gerilmesini ve $1723\text{-}1698\text{ cm}^{-1}$ 'de karbonil grubunun varlığını göstermektedir (Majeed vd.,2019).

Şekil 5.31. incelendiğinde hem KD'de hem de KD-PHB'de Kollicoat MAE100P için karakteristik olan, yaklaşık $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ 'de geniş bant gözlemlenmiştir. KD'de gözlemlenen ve Kollicoat MAE100P'nin varlığını ifade eden 1724 cm^{-1} 'deki pikin şiddetinde, PHB'nin formülasyona eklenmesiyle artış gözlemlenmiştir.

Elmarzugi ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada, PEG400 için, 885, 944, 1096, 1349, 2886 cm^{-1} 'de gözlemlenen birçok karakteristik pik belirtilmiştir. Özellikle 2886 ve 3749 cm^{-1} 'deki güçlü pikler PEG400 için doymuş karbonların $(\text{CH}_2\text{CH}_2)_n$ varlığını göstermektedir (Elmarzugi vd., 2014). Şekil 5.31.'ye bakıldığında hem KD içerisinde hem de KD-PHB'de, PEG400'e ait karakteristik piklerin varlığı gözlemlenmektedir.

Şekil 5.31 incelendiğinde, KD formülasyonuna PHB'nin emdirilmesiyle çapraz bağların varlığını ifade eden $2358,94\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik tekrar gözlemlenmiştir. KD formülasyonundaki Kollicoat MAE100P'den kaynaklanan $1724,36\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik PHB'nin karakteristik piki olan $1720,50\text{ cm}^{-1}$ 'e doğru kayarak daha şiddetli bir pik gözlemlenmiştir.

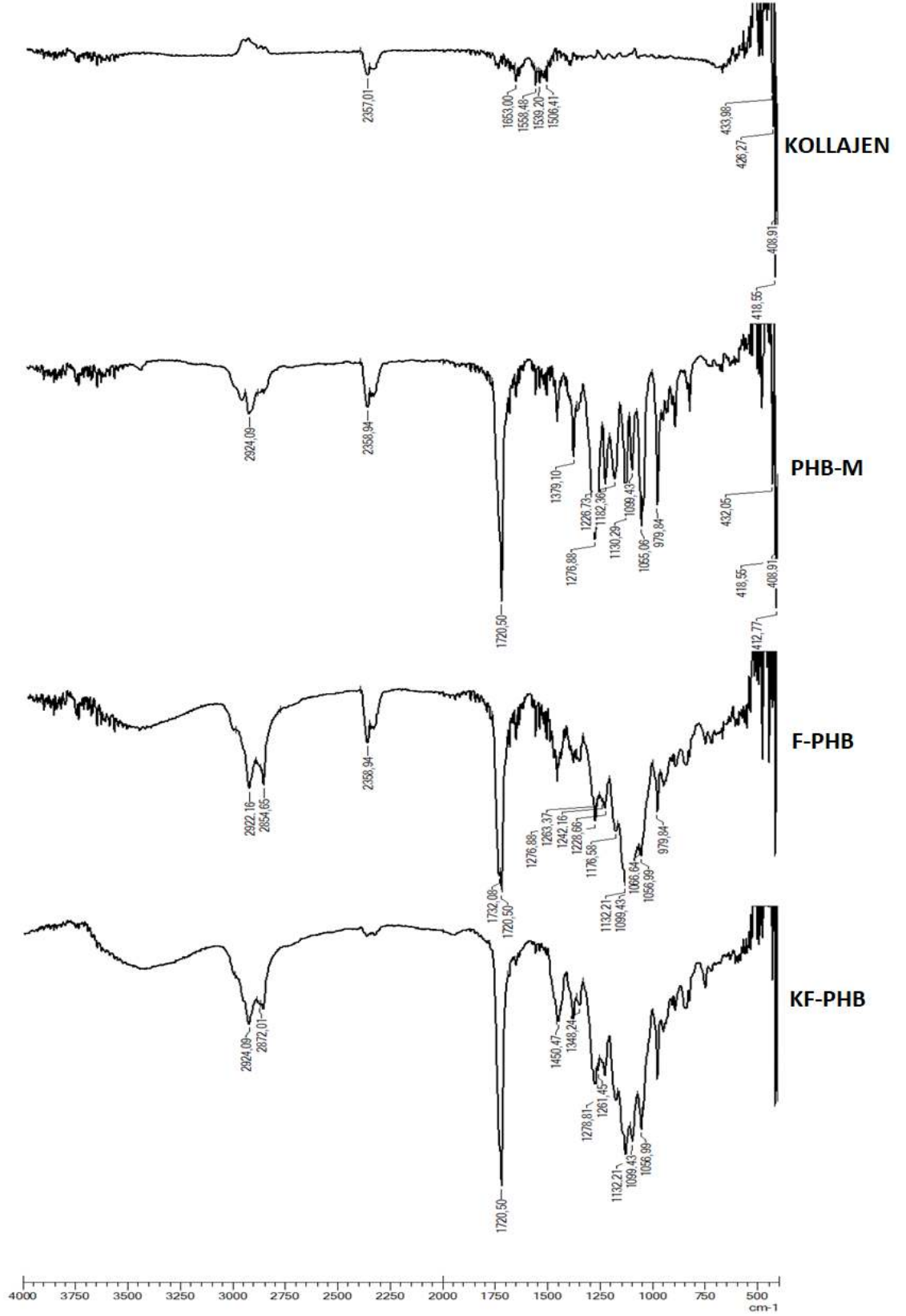


Şekil 5.31. Kollajen, PHB-M, KD ve KD-PHB formülasyonlarına ait FTIR spektrumları

– **F-PHB ve KF-PHB formülasyonları**

KF-PHB formülasyonları oluşturulurken kullanılan Eudragit RS100 için karakteristik olan 3384, 2981, 1724-1572 cm^{-1} pikleri, sırasıyla NH, CH, -C=O gerilmelerine karşılık gelmektedir (Barzegar-Jalali vd., 2012). Eudragit RS100 için karakteristik olan diğer pikler ise 2360, 2342, 1458, 1388, 1149 cm^{-1} 'de gözlemlenmektedir (Jana vd., 2014).

Şekil 5.32 incelendiğinde, F-PHB formülasyonu yapısında, Eudragit RS100 için karakteristik piklerin varlığı tespit edilmiştir. Yapıya kollajen eklenmesiyle, 2358,94 cm^{-1} 'deki pik küçülmüş ve bu nedenle formülasyondaki çapraz bağ yapısı azalmıştır. KF-PHB formülasyonuna bakıldığında, yaklaşık olarak PHB için karakteristik olan 1720,50 ve 1278,81 cm^{-1} , Kollajen için karakteristik bantlardan biri olan 1450 cm^{-1} , PEG400 için karakteristik olan 2872,01 cm^{-1} ve Eudragit RS100 için karakteristik olan yaklaşık olarak 2924, 1720, 1450, 1348 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikler, bu yapıların hazırlanan formülasyon içerisinde yapısının korunduğunu göstermektedir.



Şekil 5.32. Kollajen, PHB-M, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarına ait FTIR spektrumları

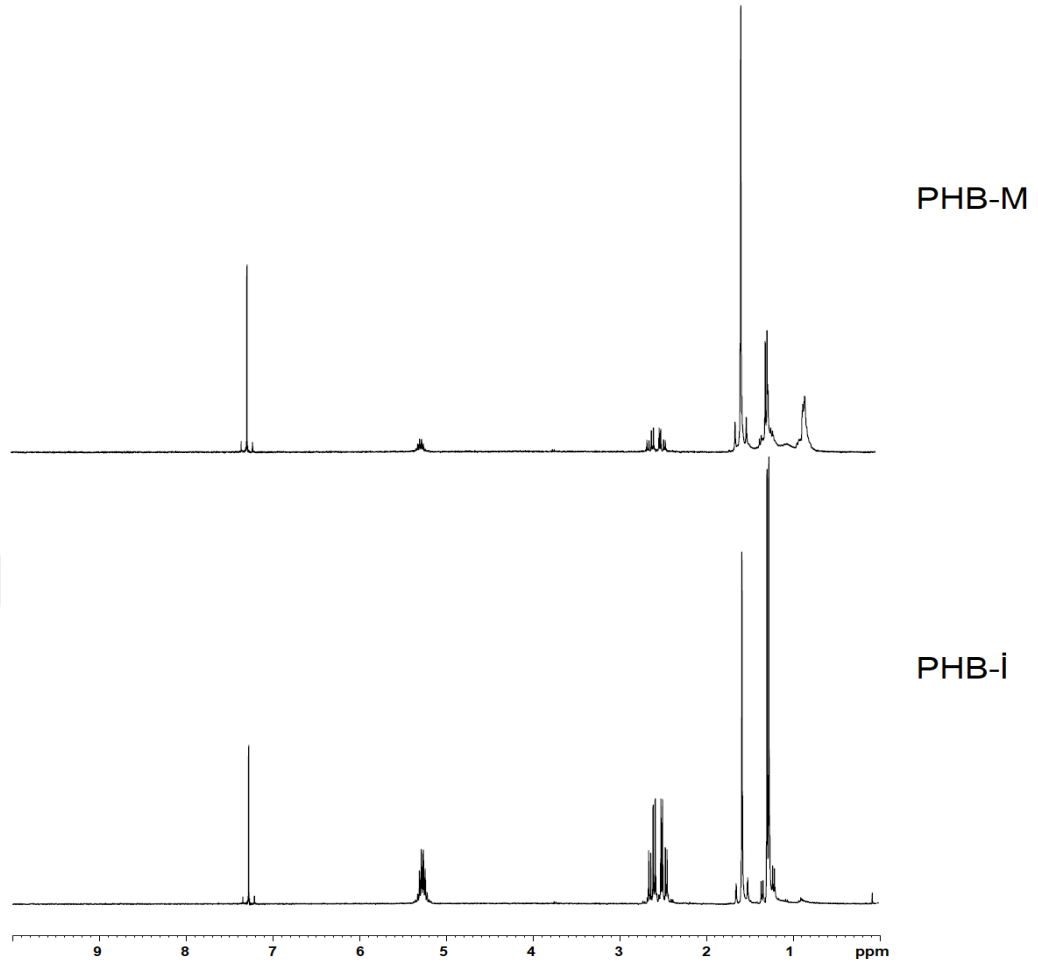
5.9.5. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi analizi

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, bileşiklerin ve sistemlerin kompozisyonu, yapısı ve dinamikleri hakkında kısa sürede çok fazla bilgi sağlamaktadır. NMR, güçlü bir sabit manyetik alandaki çekirdeklerin zayıf bir manyetik alan tarafından bozulduğu ve çekirdekteki manyetik alanın frekans karakteristiğine sahip bir elektromanyetik sinyal üreterek yanıt verdiği bir yöntemdir (Hoult ve Bhakar, 1997).

– **PHB**

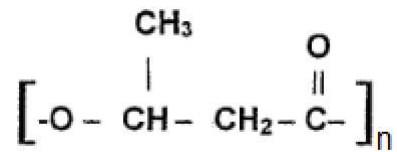
Döterokloroform (CDCl_3) çözeltisi içindeki polimerlerin, ^1H NMR spektrumları elde edilmiştir. Şekil 5.33'te gösterilen, ekstrakte edilen PHB ve elimizdeki referans PHB'nin karşılaştırıldığı ^1H -NMR spektrumlarına bakıldığında, elde ettiğimiz polimerin referans PHB ile benzer noktalarda sinyal verdiği gözlemlenmektedir. Ayrıca, ekstre ettiğimiz polimer için elde edilen sinyaller, Babruwad tarafından yapılan bir çalışmada, *B. cereus*'dan izole edilen PHB'nin ^1H -NMR spektrumlarındaki sinyallerle benzerlik göstermektedir (Babruwad vd., 2016). Aynı zamanda, Mahansaria ve Kathiraser tarafından elde edilen ve farklı organizmalar tarafından üretilen PHB'lerinde benzer sonuçlara sahip olduğu tespit edilmiştir (Kathiraser vd., 2007; Mahansaria vd., 2018). Bu durum elde ettiğimiz polimerin PHB olduğunu literatürde yer alan çalışmalarla beraber doğrulamaktadır.

Elde edilen spektruma ayrıntılı bakıldığında, 7, 27'deki sinyal çözücüyü (CDCl_3) ifade etmektedir (Mahansaria vd., 2018). 5,26 ppm'deki çoklu rezonans metin protonuna (-CH) aittir. Rezonans değeri 2,66-2,44 ppm aralığında görünen sinyaller metilen protonlarını vermiştir. Son olarak, 1,26-1,29 ppm aralığında ise metil protonlara (CH_3) ait sinyaller gözlemlenmiştir (Ansari ve Fatma, 2016).



Şekil 5.33. PHB-İ: Referans polimer, PHB-M: Ekstre edilen polimeriğin 1H NMR spektrumları

Spektrumda gözlemlenen pikler, Devi ve arkadaşlarının B. cereus'dan izole edilen PHB üzerinde yaptıkları karakterizasyon çalışmasına benzer sonuçlar göstererek Şekil 5.34'teki formülü ifade etmektedir (Devi vd., 2015).

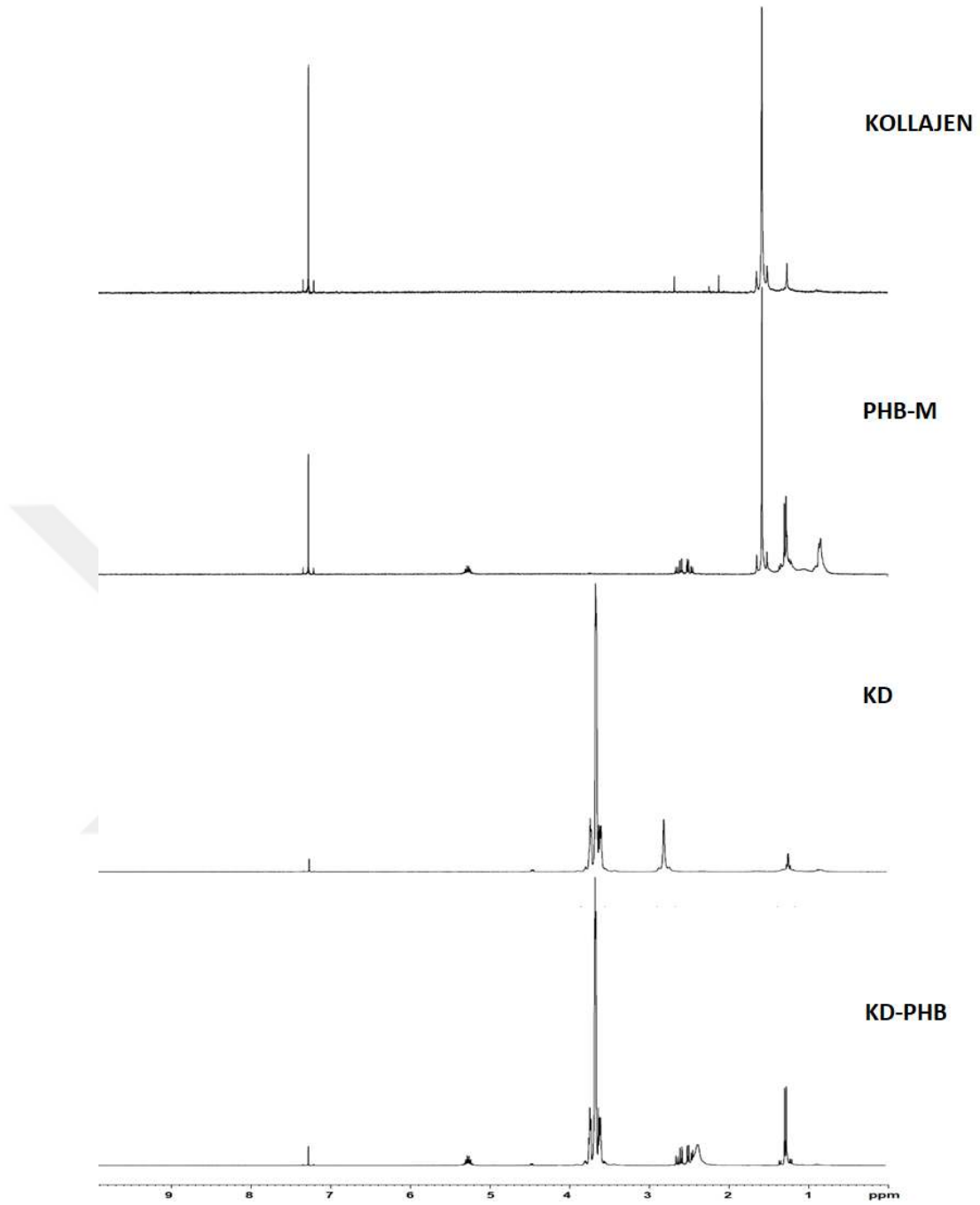


Şekil 5.34. PHB'nin kimyasal formülü (Devi vd., 2015)

– **KD ve KD-PHB formülasyonları**

Kollajen, polimer (PHB-M) ve hazırlanan formülasyonlardan kollajen liyofilize disk (KD) ve PHB emdirilmiş kollajen liyofilize disk (KD-PHB) için ^1H NMR analizi yapılmış ve analiz sonuçları Şekil 5.35'te gösterilmiştir.

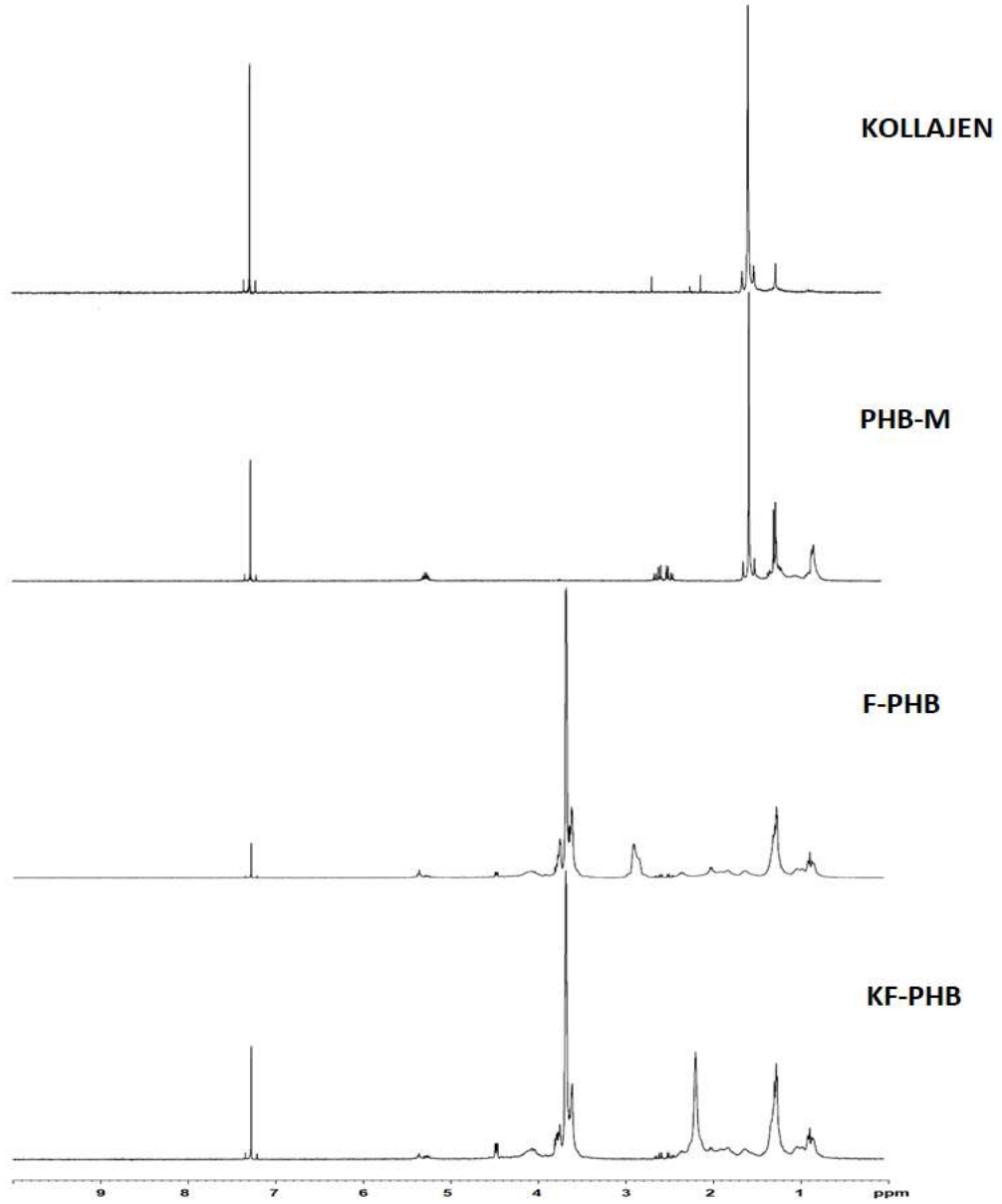
Şekil 5.35'e bakıldığında, tüm veriler içerisinde 7,27 ppm'de gözlemlenen sinyal, analiz aşamasında kullanılan çözücüyü (CDCl_3) ifade etmektedir (Mahansaria vd., 2018). Kollajen spektrumunda yaklaşık 1,6 ppm'de gözlemlenen pikte, formülasyon oluşturulduktan sonra kayma gerçekleşmiştir. KD formülasyonunda yaklaşık 3,8 ppm'de gözlemlenen belirgin piklerin Kollicoat MAE 100P yapısında bulunan metilakrilat ve etil akrilata ait olan pikler olduğu düşünülmektedir. Literatürde metilakrilat ve etil akrilata ait kombine $-\text{OCH}_2$ proton sinyallerinin belirgin bir şekilde 3.98-4.1ppm'de görüldüğü belirtilmiştir (Pitchumani vd., 1982). KD formülasyon yapısına PHB-M'nin eklenmesiyle, PHB'nin yapısında bulunan, 5,26 ppm'de metin protonuna ($-\text{CH}$) ait çoklu rezonans, 2,66-2,44 ppm'de metilen protonlarına ait çoklu rezonans ve 1,26-1,29 ppm aralığında metil protonlara (CH_3) ait sinyaller gözlemlenmiştir (Ansari ve Fatma, 2016). Bu durum yapıya giren PHB'nin diğer maddelerle etkileşime girmeden kaldığını göstermektedir. KD ve KD-PHB spektrumları karşılaştırıldığında 1,26 ppm'deki pikin şiddetinde artış yaşanmıştır. Bu durum hem kollajene hem de PHB'ye ait olan metil gruplarının üst üste gelmesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 5.35. Kollajen, PHB-M, KD ve KD-PHB formülasyonlarına ait ^1H NMR spektrumları

– **F-PHB ve KF-PHB formülasyonları**

Kollajen, polimer (PHB-M) ve hazırlanan formülasyonlardan boş emülsiyon film (F-PHB) ve kollajen yüklü emülsiyon filmler (KF-PHB) için ^1H NMR analizi yapılarak spektrumları Şekil 5.36’da gösterilmiştir.



Şekil 5.36. Kollajen, PHB-M, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarına ait 1H NMR spektrumları

F-PHB ve KF-PHB formülasyonları yapısındaki Eudragit RS100'e ait pikler literatürdekine benzer şekilde gözlemlenmiştir (Yenilmez, 2017). PHB-M'yi içeren F-PHB ve KF-PHB formülasyonları incelendiğinde PHB'ye ait piklerin varlığı gözlemlenmiştir. Ancak 5,26 ppm'de metin protonuna (-CH) ait çoklu rezonans ve 2,66-2,44 ppm'de metilen protonlarına ait çoklu rezonansın şiddetinde azalma olduğu gözlemlenmektedir (Ansari ve Fatma, 2016). Yapıya kollajen eklenmesiyle 1,26 ppm'deki pikin şiddetinde artış yaşanmıştır. Bu durum hem kollajene hem de PHB'ye ait olan metil gruplarının üstüste gelmesinden kaynaklanmış olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus cereus* suşu kullanılarak, kısa zincir uzunluğundaki polihidroksialkanoat (Scl-PHA) sentezlenmesi, saflaştırılması, fizikokimyasal karakterizasyonlarının ardından kollajen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, *Bacillus cereus* suşu için uygun üretim ortamı kullanılmış ve farklı ekstraksiyon teknikleri uygulanarak PHB sentezi gerçekleştirilmiştir. Ancak laboratuvar ölçeğinde üretilen polimerin, optimizasyon çalışmalarının yapılması için yeterli zaman olmamasından kaynaklı PHA üretimi ortalama %30 gibi düşük bir verimde gerçekleşmiştir. Karakterizasyon çalışmalarıyla ise ekstrakte edilen polimer ve referans polimer karşılaştırılmıştır. DSC, FTIR ve NMR analiz sonuçları incelendiğinde referans polimer ve ekstrakte edilen polimerin termal ve kimyasal yapı özellikleri yaklaşık değerlerde pik vermiş ve bu durum literatür ile desteklenmiştir. Böylece elde ettiğimiz polimerin PHB olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen PHB ile denizanası kollajenini (jellyfish collagen) ihtiva eden disk ve film sistemleri olarak geliştirilmiş, karakterizasyonu ve *in vitro* değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu bölümde, geliştirilen KD, KD-PHB, F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarının *in vitro* salım profilleri çıkartılmış ve bu sistemlerin hücre canlılığı üzerindeki etkileri HaCat hücre hattı üzerinde incelenmiştir.

12 Haftalık süre sonunda elde edilen salım profillerine göre, kollajenin KD'den salınımı gecikmeli olarak gerçekleşmesine rağmen, KD-PHB'den salınımı ile karşılaştırıldığında daha hızlı olduğu görülmüştür. KD'nin 4 saat sonunda %40 oranında salım yaptığı ve 12 haftalık süre sonuna kadar %48'e ulaştığı görülmüştür. KD-PHB ise bu süreler arasında, %28'den %40'a kadar ulaşmıştır. Bu durum PHB'nin uzatılmış salımdaki etkisini göstermektedir. 12 Haftalık süre sonundaki KF-PHB formülasyonunun maksimum %1,6 oranında salım yaptığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre, KF-PHB KD-PHB formülasyonuna oranla çok daha yavaş salım gösterdiğini ortaya koymuştur ancak yara iyileşmesi süreci için kullanıma uygun bulunmamıştır.

HaCat hücre hattı üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmalarında ise, KD-PHB formülasyonunun KD formülasyonuna göre hücre canlılığında artışa neden olduğu gözlemlenmektedir. Ancak KD ve KD-PHB formülasyonlarından ortama, yavaş salımla beraber daha az kollajen geçmesi nedeniyle bu formülasyonların hücre canlılığının

kontrol grubunun altında kaldığı düşünülmektedir. F-PHB ve KF-PHB formülasyonları ise kontrol grubundan daha yüksek oranda ve birbirleri ile aynı oranda hücre canlılığına sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuca göre, emülsiyon yöntemiyle oluşturulan KF-PHB filmlerde kollajen çevresini saran PHB' nin 72 saat sonunda tam olarak parçalanmaması nedeniyle hücre canlılığının F-PHB filmleriyle yaklaşık aynı değerde çıktığı söylenebilir. KD, KD-PHB, F-PHB ve KF-PHB formülasyonları hücre canlılıkları karşılaştırıldığında en yüksek canlılığın F-PHB ve KF-PHB formülasyonlarında olduğu tespit edilmiştir. Bu durum aynı miktarda kollajen içeren formülasyonların farklı oranlarda PHB içermesinden kaynaklanmaktadır. Daha yüksek oranda PHB içeren film formülasyonları, PHB' nin hücre proliferasyonu üzerinde arttırıcı etkisini göstermektedir. Bu sonuçlara göre PHB'nin her iki formülasyon üzerinde de hücre canlılığını arttırıcı etkisi tespit edilmiştir ve formülasyonlar arasında F-PHB ve KF-PHB hücre canlılığı açısından daha iyi olduğu bulunmuştur.

Elde edilen hücre kültürü ve *in vitro* salım profili sonuçlarına göre, hücre canlılığı açısından F-PHB ve KF-PHB formülasyonları daha yüksek sonuçlar vermesine rağmen, KF-PHB' nin salım profili, kollajenin çok az miktarda salındığını gösterdiği için yara iyileşmesi süresi düşünüldüğünde uygun bulunmamıştır. KD-PHB formülasyonları, göreceli olarak hem hücre canlılığını arttırıcı etkisi hem de uzatılmış salım etkisi açısından KF-PHB formülasyonlarına göre daha iyi olduğuna karar verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ürettiğimiz polimerlerin amaçlanan scl-PHA ile benzer yapısal özelliklere sahip olduğu, üretilen polimerin kollajen ile formülasyonu sonucu uzatılmış etkili toksik olmayan salım sistemlerinin oluşturulabileceği belirlenmiştir. PHB moleküllerinin kollajen ile beraber hücre canlılığını arttırıcı etkiye sahip olduğu *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle KD-PHB formülasyonunun yara örtüsü olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğu ve gelecekteki hayvan deneyleri çalışmaları ile *in vivo* olarak da etkinliğinin araştırılması gerektiği kanatı oluşmuştur.

KAYNAKÇA

- Aarthi, N., & Ramana, K. V. (2011). Identification and characterization of polyhydroxybutyrate producing *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* strains. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(5), 744-756.
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(14), 1213-1221.
- Addad, S., Exposito, J. Y., Faye, C., Ricard-Blum, S., & Lethias, C. (2011). Isolation, characterization and biological evaluation of jellyfish collagen for use in biomedical applications. *Marine drugs*, 9(6), 967-983.
- Akaraonye, E., Moreno, C., Knowles, J. C., Keshavarz, T., & Roy, I. (2012). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source. *Biotechnology journal*, 7(2), 293-303.
- Althuri, A., Mathew, J., Sindhu, R., Banerjee, R., Pandey, A., & Binod, P. (2013). Microbial synthesis of poly-3-hydroxybutyrate and its application as targeted drug delivery vehicle. *Bioresource technology*, 145, 290-296.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International journal of biological macromolecules*, 89, 161-174.
- Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): screening, optimization and characterization. *PLoS One*, 11(6).
- Ayhan, K. (2000). Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar ve Bulaşma Kaynakları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Ankara, Ankara Üniversitesi.
- Babruwad, P. R., Prabhu, S. U., Upadhyaya, K. P., & Hungund, B. S. (2016). Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. *Journal of Biochemical Technology*, 6(3), 990-995.
- Bagheriasl, S. (2012). Development and characterisation of polyhydroxybutyrate from selected bacterial species. Doctoral dissertation, University of Birmingham.

- Bailon, P., & Berthold, W. (1998). Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(8), 352-356.
- Barzegar-Jalali, M., Alaei-Beirami, M., Javadzadeh, Y., Mohammadi, G., Hamidi, A., Andalib, S., & Adibkia, K. (2012). Comparison of physicochemical characteristics and drug release of diclofenac sodium–eudragit® RS100 nanoparticles and solid dispersions. *Powder Technology*, 219, 211-216.
- Berger, E., Ramsay, B. A., Ramsay, J. A., Chavarie, C., & Braunegg, G. (1989). PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnology techniques*, 3(4), 227-232.
- Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.
- Bhatia, S. K., Wadhwa, P., Bhatia, R. K., Patel, S. K. S., & Yang, Y. H. (2019). Strategy for Biosynthesis of Polyhydroxyalkonates Polymers/Copolymers and Their Application in Drug Delivery. In *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* (pp. 13-34). Springer, Singapore.
- Bhattacharjee, A., & Bansal, M. (2005). Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario. *IUBMB life*, 57(3), 161-172.
- Bilek, S. E., & Bayram, S. K. (2015). Kolajen Hidrolizatının Fonksiyonel Bir Bileşen Olarak Gıda Endüstrisinde Kullanılması. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 13(4).
- Bini, R. A., Silva, M. F., Varanda, L. C., da Silva, M. A., & Dreiss, C. A. (2017). Soft nanocomposites of gelatin and poly (3-hydroxybutyrate) nanoparticles for dual drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 157, 191-198.
- Bizani, D., & Brandelli, A. (2002). Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 512-519.
- Bonjoch, N. P., & Tamayo, P. R. (2001). Protein content quantification by Bradford method. In *Handbook of plant ecophysiology techniques* (pp. 283-295). Springer, Dordrecht.

- Braunegg, G., Lefebvre, G., & Genser, K. F. (1998). Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of biotechnology*, 65(2-3), 127-161.
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in enzymology* (Vol. 541, pp. 151-159). Academic Press.
- Chee, J. Y., Yoga, S. S., Lau, N. S., Ling, S. C., Abed, R. M., & Sudesh, K. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2, 1395-1404.
- Chen, G. Q. (2010). Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. In *Plastics from bacteria* (pp. 17-37). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chen, G. Q., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565-6578.
- Cheng, H., Wu, Z., Wu, C., Wang, X., Liow, S. S., Li, Z., & Wu, Y. L. (2018). Overcoming STC2 mediated drug resistance through drug and gene co-delivery by PHB-PDMAEMA cationic polyester in liver cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*, 83, 210-217.
- Cheng, X., Shao, Z., Li, C., Yu, L., Raja, M. A., & Liu, C. (2017). Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish rhopilema esculentum kishinouye for use in hemostatic applications. *PloS one*, 12(1).
- Chiu, M. H., & Prenner, E. J. (2011). Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 39.
- Chodak, I. (2008). Polyhydroxyalkanoates: origin, properties and applications. In *Monomers, polymers and composites from renewable resources* (pp. 451-477). Elsevier.

- Collier, T. A., Nash, A., Birch, H. L., & de Leeuw, N. H. (2019). Relative orientation of collagen molecules within a fibril: a homology model for homo sapiens type I collagen. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(2), 537-549.
- Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2004). *The cell: Molecular approach*. Medicinska naklada.
- Copeland, L. E., & Bragg, R. H. (1958). Quantitative X-ray diffraction analysis. *Analytical Chemistry*, 30(2), 196-201.
- De Souza, L., & Shivakumar, S. (2019). Polyhydroxyalkanoates (PHA)—Applications in Wound Treatment and as Precursors for Oral Drugs. In *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* (pp. 227-270). Springer, Singapore.
- Derkus, B., Arslan, Y. E., Bayrac, A. T., Kantarcioglu, I., Emregul, K. C., & Emregul, E. (2016). Development of a novel aptasensor using jellyfish collagen as matrix and thrombin detection in blood samples obtained from patients with various neurodisease. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 228, 725-736.
- Devi, A. B., Nachiyar, C. V., Kaviyarasi, T., & Samrot, A. V. (2015). Characterization of polyhydroxybutyrate synthesized by *Bacillus cereus*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(3), 140-144.
- Divyashree, M. S., & Shamala, T. R. (2009). Effect of gamma irradiation on cell lysis and polyhydroxyalkanoate produced by *Bacillus flexus*. *Radiation Physics and Chemistry*, 78(2), 147-152.
- Divyashree, M. S., & Shamala, T. R. (2010). Extractability of polyhydroxyalkanoate synthesized by *Bacillus flexus* cultivated in organic and inorganic nutrient media. *Indian journal of microbiology*, 50(1), 63-69.
- Divyashree, M. S., Shamala, T. R., & Rastogi, N. K. (2009). Isolation of polyhydroxyalkanoate from hydrolyzed cells of *Bacillus flexus* using aqueous two-phase system containing polyethylene glycol and phosphate. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14(4), 482-489.

- Doi, Y. (1995, July). Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 98, No. 1, pp. 585-599). Basel: Hüthig & Wepf Verlag.
- Dong, Z., & Sun, X. (2000). A new method of recovering polyhydroxyalkanoate from *Azotobacter chroococcum*. *Chinese Science Bulletin*, 45(3), 252-256.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews*, 6(4), 324-338.
- Durner, R., Witholt, B., & Egli, T. (2000). Accumulation of poly [(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(8), 3408-3414.
- Elmarzugi, N. A., Adali, T., Bentaleb, A. M., Keleb, E. I., Mohamed, A. T., & Hamza, A. M. (2014). Spectroscopic characterization of PEG-DNA biocomplexes by FTIR. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(8), 6.
- Faix, O. (1992). Fourier transform infrared spectroscopy. In *Methods in lignin chemistry* (pp. 83-109). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fan, Y., Wu, W., Lei, Y., Gaucher, C., Pei, S., Zhang, J., & Xia, X. (2019). Edaravone-loaded alginate-based nanocomposite hydrogel accelerated chronic wound healing in diabetic mice. *Marine drugs*, 17(5), 285.
- Findlay, R. H., & White, D. C. (1983). Polymeric beta-hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(1), 71-78.
- Fiorese, M. L., Freitas, F., Pais, J., Ramos, A. M., de Aragão, G. M., & Reis, M. A. (2009). Recovery of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Cupriavidus necator* biomass by solvent extraction with 1, 2-propylene carbonate. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 454-461.
- Gangrade, N., & Price, J. C. (1991). Poly (hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: preparation, morphology and release properties. *Journal of microencapsulation*, 8(2), 185-202.

- Gargouri, M., Sapin, A., Bouali, S., Becuwe, P., Merlin, J. L., & Maincent, P. (2009). Optimization of a new non-viral vector for transfection: Eudragit nanoparticles for the delivery of a DNA plasmid. *Technology in cancer research & treatment*, 8(6), 433-443.
- Ghatnekar, M. S., Pai, J. S., & Ganesh, M. (2002). Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate from *Methylobacterium* sp V49. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 77(4), 444-448.
- Giourieva, V. S., Papi, R. M., & Pantazaki, A. A. (2019). Polyhydroxyalkanoates Applications in Antimicrobial Agents Delivery and Wound Healing. In *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* (pp. 49-76). Springer, Singapore.
- Gopinath, A., Reddy, S. M. M., Madhan, B., Shanmugam, G., & Rao, J. R. (2014). Effect of aqueous ethanol on the triple helical structure of collagen. *European Biophysics Journal*, 43(12), 643-652.
- Goreva, A., Shishatskaya, E., & Volova, T. (2009). Biodegradable microspheres based on polyhydroxyalkanoates (PHA) as drug carriers. *New Biotechnology*, (25), S37.
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(4), 660-669.
- Gross, R. A., & Kalra, B. (2002). Biodegradable polymers for the environment. *Science*, 297(5582), 803-807.
- Guo, S. A., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314.
- Güngör, Ö., Zungur, A., Koç, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2013). Emülsiyonların Özellikleri ve Emülsifikasyon Koşullarının Aroma ve Yağların

Mikroenkapsülasyonu Üzerine Etkisi. *Academic Food Journal/Akademik GIDA*, 11(2).

- Güngörmedi, G., Demirbilek, M., Mutlu, M. B., Denkbaş, E. B., & Çabuk, A. (2014). Polyhydroxybutyrate and hydroxyvalerate production by *Bacillus megaterium* strain A1 isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(15).
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., & Lee, S. Y. (1995). Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(1), 34-39.
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., & Chang, H. N. (1994). Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2), 256-261.
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., Lee, K. M., & Chang, H. N. (1993). The recovery of poly (3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology techniques*, 7(3), 209-212.
- Hazer, D. B., Kılıçay, E., & Hazer, B. (2012). Poly (3-hydroxyalkanoate) s: diversification and biomedical applications: a state of the art review. *Materials Science and Engineering: C*, 32(4), 637-647.
- Holmes, P. A. (1985). Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in technology*, 16(1), 32.
- Holmes, P. A. (1988). Biologically produced (R)-3-hydroxy-alkanoate polymers and copolymers. In *Developments in crystalline polymers* (pp. 1-65). Springer, Dordrecht.
- Hoult, D. I., & Bhakar, B. (1997). NMR signal reception: Virtual photons and coherent spontaneous emission. *Concepts in Magnetic Resonance: An Educational Journal*, 9(5), 277-297.
- Huynh, C. T., & Lee, D. S. (2015). Controlled release. *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, 439-449.

- Jacquel, N., Lo, C. W., Wei, Y. H., Wu, H. S., & Wang, S. S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15-27.
- Jana, U., Mohanty, A. K., Manna, P. K., & Mohanta, G. P. (2014). Preparation and characterization of nebivolol nanoparticles using Eudragit® RS100. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 269-275.
- Javan, N. B., Omid, N. J., Hasab, N. M., Shirmard, L. R., Rafiee-Tehrani, M., & Dorkoosh, F. (2018). Preparation, statistical optimization and in vitro evaluation of pramipexole prolonged delivery system based on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 44, 82-90.
- Jendrossek, D., & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual review of microbiology*, 56(1), 403-432.
- Jha, M. K. (2012). Modified release formulations to achieve the quality target product profile (QTPP). *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 3(8), 2376.
- Kalkan, S. (2006). Çiğ sütte *Bacillus cereus* sayılması için yöntem modifikasyonları üzerine çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Kandhasamy, S., Perumal, S., Madhan, B., Umamaheswari, N., Banday, J. A., Perumal, P. T., & Santhanakrishnan, V. P. (2017). Synthesis and fabrication of collagen-coated osthonamide electrospun nanofiber scaffold for wound healing. *ACS applied materials & interfaces*, 9(10), 8556-8568.
- Kapritchkoff, F. M., Viotti, A. P., Alli, R. C., Zuccolo, M., Pradella, J. G., Maiorano, A. E., Miranda, E.A. & Bonomi, A. (2006). Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by *Ralstonia eutropha*. *Journal of biotechnology*, 122(4), 453-462.
- Karahaliloğlu, Z., Demirbilek, M., Şam, M., Erol-Demirbilek, M., Sağlam, N., & Denkbay, E. B. (2013). Plasma polymerization-modified bacterial

polyhydroxybutyrate nanofibrillar scaffolds. *Journal of applied polymer science*, 128(3), 1904-1912.

Kashif, P. M., Madni, A., Ashfaq, M., Rehman, M., Mahmood, M. A., Khan, M. I., & Tahir, N. (2017). Development of Eudragit RS 100 microparticles loaded with ropinirole: optimization and in vitro evaluation studies. *AAPS PharmSciTech*, 18(5), 1810-1822.

Kathiraser, Y., Aroua, M. K., Ramachandran, K. B., & Tan, I. K. P. (2007). Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(9), 847-855.

Katı, H., Karaca, B., & Gülşen, Ş. H. (2016). Topraktan izole edilen *Bacillus* türlerinin tanımlanması ve biyolojik özelliklerinin araştırılması. *Sakarya University Journal of Science*, 20(2), 281-290.

Kazuhiko, J., Masahiro, N., & Miho, K. (1986). Controlled release of aclarubicin, an anticancer antibiotic, from poly- β -hydroxybutyric acid microspheres. *Journal of controlled release*, 4(1), 25-32.

Keenan, T. M., Tanenbaum, S. W., Stipanovic, A. J., & Nakas, J. P. (2004). Production and Characterization of Poly- β -hydroxyalkanoate Copolymers from Burkholderiacepacia Utilizing Xylose and Levulinic Acid. *Biotechnology progress*, 20(6), 1697-1704.

Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology*, 13(3), 321-326.

Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process biochemistry*, 40(2), 607-619.

Kim, M., Cho, K. S., Ryu, H. W., Lee, E. G., & Chang, Y. K. (2003). Recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology letters*, 25(1), 55-59.

- Kim, N. A., Choi, D. H., Lim, J. Y., Kim, K. H., Lim, D. G., Lee, E., ... & Jeong, S. H. (2014). Investigation of polymeric excipients for dutasteride solid dispersion and its physicochemical characterization. *Archives of pharmacal research*, 37(2), 214-224.
- Kim, Y. B., & Lenz, R. W. (2001). Polyesters from microorganisms. In *Biopolyesters* (pp. 51-79). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., & Braunegg, G. (2013). Extraction of short-chain-length poly-[(R)-hydroxyalkanoates](scl-PHA) by the “anti-solvent” acetone under elevated temperature and pressure. *Biotechnology letters*, 35(7), 1023-1028.
- Koller, M., Hesse, P., Bona, R., Kutschera, C., Atlić, A., & Braunegg, G. (2007, August). Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co-and terpolyesters for potential medical application by the archaeon *Haloferax mediterranei*. In *Macromolecular symposia* (Vol. 253, No. 1, pp. 33-39). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Komsa-Penkova, R., Spirova, R., & Bechev, B. (1996). Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 32(1), 33-43.
- Kouchak, M., Handali, S., & Boroujeni, B. N. (2015). Evaluation of the mechanical properties and drug permeability of chitosan/Eudragit RL composite film. *Osong public health and research perspectives*, 6(1), 14-19.
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4(2), 55.
- Kruger, N. J. (2009). The Bradford method for protein quantitation. In *The protein protocols handbook* (pp. 17-24). Humana Press, Totowa, NJ.
- Kumar, P. V., Maki, M. A. A., Wei, Y. S., Tatt, L. M., Elumalai, M., Cheah, S. C., ... & Majeed, A. B. B. A. (2019). Rabbit as an Animal Model for Pharmacokinetics Studies of Enteric Capsule Contains Recombinant Human Keratinocyte Growth

- Factor Loaded Chitosan Nanoparticles. *Current clinical pharmacology*, 14(2), 132-140.
- Kumar, T., Singh, M., Purohit, H. J., & Kalia, V. C. (2009). Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste. *Journal of applied microbiology*, 106(6), 2017-2023.
- Kunasundari, B., & Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polymer Letters*, 5(7).
- Lakshman, K., & Shamala, T. R. (2006). Extraction of polyhydroxyalkanoate from *Sinorhizobium meliloti* cells using *Microbispora* sp. culture and its enzymes. *Enzyme and microbial technology*, 39(7), 1471-1475.
- Larsson, M., Bergstrand, A., Mesiah, L., Van Vooren, C., & Larsson, A. (2014). Nanocomposites of polyacrylic acid nanogels and biodegradable polyhydroxybutyrate for bone regeneration and drug delivery. *Journal of Nanomaterials*, 2014, 1.
- Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1961). Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *Journal of bacteriology*, 82(1), 33-36.
- Law, K. H., Cheng, Y. C., Leung, Y. C., Lo, W. H., Chua, H., & Yu, H. F. (2003). Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. *Biochemical engineering journal*, 16(2), 203-208.
- Lee, C. H., & Lee, Y. (2016). Collagen-based formulations for wound healing applications. In *Wound Healing Biomaterials* (pp. 135-149). Woodhead Publishing.
- Lee, W. H., Loo, C. Y., Nomura, C. T., & Sudesh, K. (2008). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource technology*, 99(15), 6844-6851.
- Lee, Y. F., Sridewi, N., Ramanathan, S., & Sudesh, K. (2017). The influence of electrospinning parameters and drug loading on polyhydroxyalkanoate (PHA) nanofibers for drug delivery. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 4(4), 103-113.

- Li, X. T., Zhang, Y., & Chen, G. Q. (2008). Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. *Biomaterials*, 29(27), 3720-3728.
- Lin, S., & Chien, Y. W. (2013). Drug Delivery: Controlled Release. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Six Volume Set (Print)* (pp. 955-984). CRC Press.
- Lizarraga-Valderrama, L. R., Nigmatullin, R., Taylor, C., Haycock, J. W., Claeysens, F., Knowles, J. C., & Roy, I. (2015). Nerve tissue engineering using blends of poly (3-hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Engineering in Life Sciences*, 15(6), 612-621.
- Lomas, A. J., Webb, W. R., Han, J., Chen, G. Q., Sun, X., Zhang, Z., ... & Forsyth, N. R. (2013). Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/collagen hybrid scaffolds for tissue engineering applications. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 19(8), 577-585.
- Loo, C. Y., & Sudesh, K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*, 2(2), 31-57.
- Loo, C. Y., Lee, W. H., Tsuge, T., Doi, Y., & Sudesh, K. (2005). Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from palm oil products in a *Wautersia eutropha* mutant. *Biotechnology letters*, 27(18), 1405-1410.
- López, J., Imperial, S., Valderrama, R., & Navarro, S. (1993). An improved Bradford protein assay for collagen proteins. *Clinica chimica acta*, 220(1), 91-100.
- Lu, X. Y., Zhang, Y., & Wang, L. (2010). Preparation and in vitro drug-release behavior of 5-fluorouracil-loaded poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) nanoparticles and microparticles. *Journal of applied polymer science*, 116(5), 2944-2950.
- Macovescu, G., Chelaru, C., Kaya, M. G. A., & Albu, L. (2016). Medical Bioproducts Collagen Quantification by Hydroxyproline Determination. In *International Conference on Advanced Materials and Systems (ICAMS)* (pp. 105-110). The National Research & Development Institute for Textiles and Leather-INCOTP.

- Macrae, R. M., & Wilkinson, J. F. (1958). Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *Microbiology*, 19(1), 210-222.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(1), 21-53.
- Mahansaria, R., Dhara, A., Saha, A., Haldar, S., & Mukherjee, J. (2018). Production enhancement and characterization of the polyhydroxyalkanoate produced by *Natrinema ajinwensis* (as synonym) $\equiv$ *Natrinema altunense* strain RM-G10. *International journal of biological macromolecules*, 107, 1480-1490.
- Majeed, A., Ranjha, N. M., Hussain, M., & Rasool, M. F. (2019). Fabrication and evaluation of pH-dependent polymeric microspheres of ivabradine and their in vitro and in vivo studies. *Polymer Bulletin*, 76(6), 3127-3151.
- Martla, M., Umsakul, K., & Sudesh, K. (2018). Production and recovery of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from biodiesel liquid waste (BLW). *Journal of basic microbiology*, 58(11), 977-986.
- Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Fatima, N., Hasan, F., & Hameed, A. (2013). Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application. *Materials Science and Engineering: C*, 33(3), 1054-1060.
- Masood, F., Yasin, T., & Hameed, A. (2015). Polyhydroxyalkanoates—what are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 35(4), 514-521.
- Meng, D. C., & Chen, G. Q. (2017). Synthetic biology of polyhydroxyalkanoates (PHA). In *Synthetic biology—metabolic engineering* (pp. 147-174). Springer, Cham.
- Mercan, N., & Beyatlı, Y. (2004). Bakteriyal Biyoplastikler ve Kullanım Potansiyelleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(4), 2-18.
- Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M. A., & Ferreira, E. C. (2015). Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures

- using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica chimica acta*, 865, 8-15.
- Metcalf, A. D., & Ferguson, M. W. (2006). Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(14), 413-437.
- Misra, S. K., Nazhat, S. N., Valappil, S. P., Moshrefi-Torbati, M., Wood, R. J., Roy, I., & Boccaccini, A. R. (2007). Fabrication and characterization of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate) composite containing bioglass. *Biomacromolecules*, 8(7), 2112-2119.
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017b). Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and biophysics reports*, 12, 206-213.
- Mohapatra, S., Sarkar, B., Samantaray, D. P., Daware, A., Maity, S., Pattnaik, S., & Bhattacharjee, S. (2017a). Bioconversion of fish solid waste into PHB using Bacillus subtilis based submerged fermentation process. *Environmental technology*, 38(24), 3201-3208.
- Możejko, J., & Ciesielski, S. (2013). Saponified waste palm oil as an attractive renewable resource for mcl-polyhydroxyalkanoate synthesis. *Journal of bioscience and bioengineering*, 116(4), 485-492.
- Możejko-Ciesielska, J., & Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271-282.
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 56-77.
- Nawaz, A., Safdar, M., Arshad, M. S., Rasool, M. F., Khan, G. M., & Akhlaq, M. (2018). Formulation Development and In vitro Permeability of Curcumin Films Using Different Penetration Enhancers. *Drug Delivery Letters*, 8(1), 78-84.

- Nguyen, M. N., Tran, P. H., & Tran, T. T. (2019). A single-layer film coating for colon-targeted oral delivery. *International journal of pharmaceutics*, 559, 402-409.
- Numanoğlu, U., & Tarımcı, N. (2006). Katı Lipid Nanopartiküllerin (SLNTM) Özellikleri, Farmasötik ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları. *Ankara Ecz. Fak. Derg*, 35 (3) 211 – 235.
- O' Donnell, P. B., & McGinity, J. W. (1997). Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique. *Advanced drug delivery reviews*, 28(1), 25-42.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Koller, M., Kucera, D., & Pernicova, I. (2018). Involvement of polyhydroxyalkanoates in stress resistance of microbial cells: Biotechnological consequences and applications. *Biotechnology advances*, 36(3), 856-870.
- Odeniyi, O. A., & Adeola, O. J. (2017). Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates. *International journal of biological macromolecules*, 104, 407-413.
- Ojumu, T. V., Yu, J., & Solomon, B. O. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African journal of Biotechnology*, 3(1), 18-24.
- Omar, S., Rayes, A., Eqaab, A., Voß, I., & Steinbüchel, A. (2001). Optimization of cell growth and poly (3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology letters*, 23(14), 1119-1123.
- Özakar, E. (2014). Etkin Madde Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması ve İn Vitro Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Entitüsü.
- Padermshoke, A., Katsumoto, Y., Sato, H., Ekgasit, S., Noda, I., & Ozaki, Y. (2005). Melting behavior of poly (3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(4), 541-550.
- Park, S. J., Kim, T. W., Kim, M. K., Lee, S. Y., & Lim, S. C. (2012). Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology advances*, 30(6), 1196-1206.

- Pathare, Y. S., Hastak, V. S., & Bajaj, A. N. (2013). Polymers used for fast disintegrating oral films: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21(1), 169-178.
- Pavlova, A. S., Dyudeeva, E. S., Kupryushkin, M. S., Amirkhanov, N. V., Pyshnyi, D. V., & Pyshnaya, I. A. (2018). SDS-PAGE procedure: Application for characterization of new entirely uncharged nucleic acids analogs. *Electrophoresis*, 39(4), 670-674.
- Payab, S., Jafari-Aghdam, N., Barzegar-Jalali, M., Mohammadi, G., Lotfipour, F., Gholikhani, T., & Adibkia, K. (2014). Preparation and physicochemical characterization of the azithromycin-Eudragit RS100 nanobeads and nanofibers using electrospinning method. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 24(6), 585-590.
- Peter, H. Y., Chua, H., Huang, A. L., & Ho, K. P. (1999). Conversion of industrial food wastes by *Alcaligenes latus* into polyhydroxyalkanoates. In *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 445-454). Humana Press, Totowa, NJ.
- Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 82(3), 233-247.
- Pignatello, R., Ferro, M., De Guidi, G., Salemi, G., Vandelli, M. A., Guccione, S., ... & Puglisi, G. (2001). Preparation, characterisation and photosensitivity studies of solid dispersions of diflunisal and Eudragit RS100® and RL100®. *International journal of pharmaceutics*, 218(1-2), 27-42.
- Pillai, A. B., Kumar, A. J., Thulasi, K., & Kumarapillai, H. (2017). Evaluation of short chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 451-460.
- Pitchumani, S., Reddy, C. R., & Rajadurai, S. (1982). Reactivity ratios of ethyl acrylate, n-butyl methacrylate copolymer system by ¹H-NMR. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 20(2), 277-282.

- Pourmollaabbassi, B., Karbasi, S., & Hashemibeni, B. (2016). Evaluate the growth and adhesion of osteoblast cells on nanocomposite scaffold of hydroxyapatite/titania coated with poly hydroxybutyrate. *Advanced biomedical research*, 5.
- Pouton, C. W., & Akhtar, S. (1996). Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18(2), 133-162.
- Pötter, M., & Steinbüchel, A. (2005). Poly (3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly (3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules*, 6(2), 552-560.
- Prieto, M. A., de Eugenio, L. I., Galán, B., Luengo, J. M., & Witholt, B. (2007). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates. In *Pseudomonas* (pp. 397-428). Springer, Dordrecht.
- Rai, R., & Roy, I. (2011). Polyhydroxyalkanoates: the emerging new green polymers of choice. *A handbook of applied biopolymer technology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 79-101.
- Ramanathan, G., Muthukumar, T., & Sivagnanam, U. T. (2017). In vivo efficiency of the collagen coated nanofibrous scaffold and their effect on growth factors and pro-inflammatory cytokines in wound healing. *European journal of pharmacology*, 814, 45-55.
- Rastian, Z., Pütz, S., Wang, Y., Kumar, S., Fleissner, F., Weidner, T., & Parekh, S. H. (2018). Type I collagen from Jellyfish *Catostylus mosaicus* for biomaterial applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(6), 2115-2125.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*, 87(2), 137-146.
- Reddy, S. V., Thirumala, M., & Mahmood, S. K. (2009). A novel *Bacillus* sp. accumulating poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from a single carbon substrate. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(6), 837-843.
- Rho, K. S., Jeong, L., Lee, G., Seo, B. M., Park, Y. J., Hong, S. D., ... & Min, B. M. (2006). Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal

- human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*, 27(8), 1452-1461.
- Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z., ... & Rehman, I. U. (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9), 703-746.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., & Niles, A. L. (2011). Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. In *Mammalian Cell Viability* (pp. 103-114). Humana Press.
- Rossi, S., Azghani, A. O., & Omri, A. (2004). Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly (hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54(6), 1013-1018.
- Safandowska, M., & Pietrucha, K. (2013). Effect of fish collagen modification on its thermal and rheological properties. *International journal of biological macromolecules*, 53, 32-37.
- Salehizadeh, H., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology advances*, 22(3), 261-279.
- Sandle, T. (2013). Aseptic processing and filling. Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals: technology, validation and current regulations. *Woodhead Publishing Series in Biomedicine*, 209-225
- Sayginer, Ö., & Çomoğlu, T. (2016). Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. *Ankara Ecz. Fak. Derg./ J. Fac. Pharm. Ankara*, 40(3): 62-79.
- Schick, C. (2009). Differential scanning calorimetry (DSC) of semicrystalline polymers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(6), 1589.
- Senthilkumar, P., Dawn, S. S., Samanvitha, K. S., Kumar, S. S., Kumar, G. N., & Samrot, A. V. (2017). Optimization and characterization of poly [R] hydroxyalkanoate of *Pseudomonas aeruginosa* SU-1 to utilize in nanoparticle synthesis for curcumin delivery. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 12, 292-298.

- Shangguan, Y. Y., Wang, Y. W., Wu, Q., & Chen, G. Q. (2006). The mechanical properties and in vitro biodegradation and biocompatibility of UV-treated poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials*, 27(11), 2349-2357.
- Singh, A. K., Srivastava, J. K., Chandel, A. K., Sharma, L., Mallick, N., & Singh, S. P. (2019). Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(5), 2007-2032.
- Song, E., Kim, S. Y., Chun, T., Byun, H. J., & Lee, Y. M. (2006). Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. *Biomaterials*, 27(15), 2951-2961.
- Stokes, D. (2008). *Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM)*. John Wiley & Sons.
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science*, 25(10), 1503-1555.
- Sugappriya, M., Sudarsanam, D., Joseph, J., Mir, M. A., & Selvaraj, C. (2019). Applications of Polyhydroxyalkanoates Based Nanovehicles as Drug Carriers. In *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates* (pp. 125-169). Springer, Singapore.
- Sun, L., Li, B., Song, W., Si, L., & Hou, H. (2017). Characterization of Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin collagen and fabrication of collagen sponge as a good biocompatible biomedical material. *Process Biochemistry*, 63, 229-235.
- Suryanarayana, C., & Norton, M. G. (2013). *X-ray diffraction: a practical approach*. Springer Science & Business Media.
- Suwannasing, W., Imai, T., & Kaewkannetra, P. (2015). Cost-effective defined medium for the production of polyhydroxyalkanoates using agricultural raw materials. *Bioresource technology*, 194, 67-74.

- Taguchi, S., & Doi, Y. (2004). Evolution of polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by “enzyme evolution”: successful case studies of directed evolution. *Macromolecular bioscience*, 4(3), 145-156.
- Tamer, I. M., Moo-Young, M., & Chisti, Y. (1998). Disruption of *Alcaligenes latus* for recovery of poly (β -hydroxybutyric acid): comparison of high-pressure homogenization, bead milling, and chemically induced lysis. *Industrial & engineering chemistry research*, 37(5), 1807-1814.
- Tan, W. L., Yaakob, N. N., Abidin, A. Z., Bakar, M. A., & Bakar, N. A. (2016). Metal Chloride Induced Formation of Porous Polyhydroxybutyrate (PHB) Films: Morphology, Thermal Properties and Crystallinity. *Ser. Mater. Sci. Eng*, 133(1), 012012.
- Tezcaner, A., Bugra, K., & Hasırcı, V. (2003). Retinal pigment epithelium cell culture on surface modified poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) thin films. *Biomaterials*, 24(25), 4573-4583.
- Thakral, S., Thakral, N. K., & Majumdar, D. K. (2013). Eudragit®: a technology evaluation. *Expert opinion on drug delivery*, 10(1), 131-149.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 2.
- Turanlı, Y., Tort, S., & Acartürk, F. (2019). Development and characterization of methylprednisolone loaded delayed release nanofibers. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, 58-65.
- Tüylek, Z. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim. Drug Delivery Systems and Nanotechnological Interaction. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89-98.
- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132(3), 251-258.

- Vardhan, H., Mittal, P., Adena, S. K. R., & Mishra, B. (2017). Long-circulating polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate nanoparticles for tumor targeted docetaxel delivery: formulation, optimization and in vitro characterization. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 85-94.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research*, 37(5), 1528-1542.
- Verlinden, R. A., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of applied microbiology*, 102(6), 1437-1449.
- Vigneswari, S., Murugaiyah, V., Kaur, G., Khalil, H. A., & Amirul, A. A. (2016). Biomacromolecule immobilization: Grafting of fish-scale collagen peptides onto aminolyzed P (3HB-co-4HB) scaffolds as a potential wound dressing. *Biomedical Materials*, 11(5), 055009.
- Visakh, P. M. (2014). Polyhydroxyalkanoates (PHAs), their blends, composites and nanocomposites: State of the art, new challenges and opportunities. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) based Blends, Composites and Nanocomposites*, 30, 1.
- Vlachos, N., Skopelitis, Y., Psaroudaki, M., Konstantinidou, V., Chatzilazarou, A., & Tegou, E. (2006). Applications of Fourier transform-infrared spectroscopy to edible oils. *Analytica Chimica Acta*, 573, 459-465.
- Vural, G. U., & Özer, A. Y. (2015). Nükleer Tıpta İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Teranostik Kullanımları. *Nuclear Medicine Seminars / Nükleer Tıp Seminerleri*, 109-119
- Wang, Z., Wu, H., Chen, J., Zhang, J., Yao, Y., & Chen, G. Q. (2008). A novel self-cleaving phasin tag for purification of recombinant proteins based on hydrophobic polyhydroxyalkanoate nanoparticles. *Lab on a chip*, 8(11), 1957-1962.

- Wu, Q., Wang, Y., & Chen, G. Q. (2009). Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 37(1), 1-12.
- Yalovaç, A., & Ulusu, N. N. (2007). Collagen and collagen disorders. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(3), 139.
- Yang, Y. H., Brigham, C., Willis, L., Rha, C., & Sinskey, A. (2011). Improved detergent-based recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Biotechnology letters*, 33(5), 937-942.
- Yao, Y. C., Zhan, X. Y., Zhang, J., Zou, X. H., Wang, Z. H., Xiong, Y. C., ... & Chen, G. Q. (2008). A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials*, 29(36), 4823-4830.
- Yasotha, K., Aroua, M. K., Ramachandran, K. B., & Tan, I. K. P. (2006). Recovery of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) through enzymatic digestion treatments and ultrafiltration. *Biochemical engineering journal*, 30(3), 260-268.
- Yenilmez, E. (2017). Desloratadine-Eudragit (R) RS100 Nanoparticles: Formulation and Characterization. *Turk J Pharm Sci*;14(2):148-156
- Yetim, H. (2011). Jelatin üretimi, özellikleri ve kullanımı. 1. *Ulusal Helal ve Sağlıklı Gıda Kongresi. Gıda Katkı Maddeleri: Sorunlar ve Çözüm Önerileri. Sayfa*, 86-94.
- Yousuf, R. G. (2018). Novel Polyhydroxybutyrate (PHB) Production Using a Waste Date Seed Feedstock (Doctoral dissertation, The University of Manchester (United Kingdom)).
- Zalipsky, S. (1995). Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16(2-3), 157-182.
- Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced drug delivery reviews*, 53(1), 5-21.

http-1, <https://www.lgcstandards->

[atcc.org/Products/All/14579.aspx?geo_country=tr#generalinformation](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/14579.aspx?geo_country=tr#generalinformation)

http-2, [https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-](https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline)

[phosphate-buffered-saline](https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/pbs-phosphate-buffered-saline)

http-3, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26620#/26620>



ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: 0000-0002-8792-6599

Adı Soyadı: Müşerref YILMAZ

Yabancı Dil: İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı: Bursa/ 1993

E-Posta: msrrfylvaz@gmail.com

Eğitim:

- Lise : Ali Karasu Lisesi, 2011
- Lisans : Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 2015

Mesleki Geçmiş:

- 2013, Stajyer, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.
- 2019-devam ediyor, Ar-Ge Personeli, Zip Prime Biyoteknoloji Ltd.

Bilimsel Faaliyetler:

- 2018, Bilimsel Araştırma Projesi, *Bacillus* Suşu Kullanılarak Kısa Zincir Uzunluğunda (SCL) Polihidroksialkanoat (PHA) Sentezi, Karakterizasyonu ve Kollajen ile Formülasyonu, Araştırmacı
- 2019-Devam ediyor, KAMAG- Kamu Araştırmaları Destek Grubu, Kriminal DNA Analiz Kitleri, Araştırmacı.