

**KURKUMİN İÇEREN YARA İYİ EDİCİ SİSTEM GELİŞTİRMEK İÇİN  
BAKTERİDEN POLİHİDROKSİALKANOATLAR (PHA)'IN  
ÜRETİLMESİ**

**BURCU LATİFE ARSLAN**

**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 BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1804S082  
no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.*

**ÖZET**  
KURKUMİN İÇEREN YARA İYİ EDİCİ SİSTEM GELİŞTİRMEK İÇİN  
BAKTERİDEN POLİHİDROKSİALKANOATLAR (PHA)'IN  
ÜRETİLMESİ

BURCU LATİFE ARSLAN

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Polihidroksialkanoatlar (PHA) biyoyumlu, %100 biyobozunur, toksik özellik göstermeyen biyopolimerlerdir. Polihidroksialkanoatlar içerdikleri karbon sayılarına göre uzun, kısa, orta zincir uzunluğuna sahip olup, farklı mekanik ve fiziksel özellikler kazanırlar.

Günümüze kadar olan süreçte ziratte, hayvancılıkta, plastik sanayiinde ve tıbbi uygulama gibi birçok farklı alanda kullanılmak üzere PHA'lar üretilmiş ve çalışılmıştır. Bunlar arasından en fazla tıbbi uygulamalar dikkat çekmektedir. Özellikle orta zincir uzunluklu PHA (Mcl-PHA) sahip olduğu özellikler ile yumuşak doku onarımında ve ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmak üzere ümit vericidir.

Bu çalışmada planlanan, *Pseudomonas mendocina* suşlarında Mcl-PHA'nın üretilmesi ve farklı yöntemler ile saflaştırılarak, yaraların iyileştirilmesi için kullanılacak kurkumin içeren sistem haline getirilmesidir. Bu amaçla üretilen Mcl-PHA'nın monomer yapısının belirlenmesi ve hazırlanan yara iyi edici filmin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için *in vitro* karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiş, sistemin etkinliği hücre kültürü çalışmalarla belirlenmiş ve kurkumin salım profili değerlendirilmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** *Polihidroksialkanoat (PHA), Mcl-PHA, Pseudomonas mendocina, Kurkumin.*

## ABSTRACT

PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES (PHA) FROM BACTERIA FOR DEVELOP WOUND-HEALING SYSTEM THAT CONTAINS CURCUMIN

BURCU LATİFE ARSLAN

Department of Advanced Biotechnology

Programme in Biotechnology

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

Supervisor: Assoc. Prof. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biocompatible, 100% biodegradable, biopolymers that do not exhibit toxic properties. Polyhydroxyalkanoates have long, short, medium chain lengths according to the carbon numbers they contain and have different mechanical and physical properties.

In the process up to the sun, in agriculture, animal husbandry, plastic industry and medical etc. PHAs have been produced and worked for use in many different areas. Among these, the most medical applications draw attention. Especially medium chain length PHA (Mcl-PHA) is promising with its features for its soft tissue repair and drug delivery system.

The aim of this study is to produce Mcl-PHA in *Pseudomonas mendocina* strains and to purify it using different methods then to prepare a system that containing curcumin to be used for healing wounds. In order to determine the monomer structure of Mcl-PHA produced for this purpose and to determine the physicochemical properties of the wound healing film, *in vitro* characterization tests were performed. The effectiveness of the system was determined by cell culture studies and the curcumin release profile was evaluated.

**Keywords:** *Polyhydroxyalkanoate (PHA), Mcl-PHA, Pseudomonas mendocina, Curcumin.*

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyuncaengin bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışma sürecim boyunca desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Tez çalışmamda hücre kültürünü ve çalışma prensibini öğreten yardımcı tez danışman hocam Arş. Gör. Dr. Behiye ŞENEL'e,

Çalışmalarım sırasında bilgilerinden ve desteklerinden faydalandığım Farmasötik Teknoloji Bölümü hocalarım Prof. Dr. Müzeyyen Demirel'e, Doç. Dr. Ebru BAŞARAN'a, Doç. Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDAŞ KIRIMLIOĞLU'na, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, ve Dr. Öğr. Üyesi Alper ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarım sürecinde yardım ve desteklerini esirgemeyen Mikrobiyoloji Laboratuvarı hocalarına ve lisansüstü öğrencilerine,

Yüksek lisans eğitim sürecinde bilgi ve deneyimleri ile olduğu kadar manevi olarak destek ve yardımlarını aldığım laboratuvar çalışma arkadaşlarım Müşerref YILMAZ, Rasim MASİMOV ve Serdar ALAGÖZ'e,

Manevi desteği ile her zaman yanımda olan arkadaşım Zülfiye CEFEROVA'ya

Tez sürecimde gerek bilgi ve tecrübesi, gerekse manevi olarak desteğini esirgemeyen Gökhan GÜNGÖR'e,

Maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan sevgili ailem ve Celal MENTEŞE'ye,

## TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

BURCU LATİFE ARSLAN

## **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 Eskişehir Teknik 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.

**BURCU LATİFE ARSLAN**

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

BAŞLIK SAYFASI .....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Biyobozunur Plastikler.....	3
2.1.1. Kimyasal olarak sentezlenmiş polimerler.....	4
2.1.2. Nişasta bazlı plastikler.....	5
2.1.3. Polihidroksialkanoatlar (PHA).....	5
2.2. Polihidroksialkanoatların Tarihçesi.....	6
2.3. Polihidroksialkanoatların Genel Özellikleri .....	8
2.3.1. Mcl-PHA özellikleri .....	13
2.3.2. Polihidroksialkanoatların biyosentez yolları.....	15
2.3.3. PHA üretiminde fermantasyon mekanizmaları.....	20
2.3.4. Polihidroksialkanoatların biyodegradasyonu .....	20
2.3.5. Polihidroksialkanoatların ekstraksiyon yöntemleri .....	22
2.3.5.1. <i>Solvent ekstraksiyonu</i> .....	23
2.3.5.2. <i>Sindirim yöntemleri</i> .....	24
2.3.5.3. <i>Mekanik bozulma</i> .....	25
2.4. <i>Pseudomonas mendocina</i> Özellikleri ve PHA Üretimi.....	29
2.5. Polihidroksioktanoatın (PHO) Genel Özellikleri.....	31

2.6.	PHA' nın Medikal Uygulamaları .....	33
2.6.1.	İlaç taşıyıcısı olarak PHA.....	36
2.7.	Kurkuminin Genel Özellikleri ve Doku Rejenerasyonu.....	38
2.7.1.	Kurkuminin medikal olarak kullanımı.....	39
2.8.	Polimerik Yara İyi Edici Film .....	42
2.8.1.	Polietilen Glikol (PEG).....	44
2.8.2.	Kollicoat® MAE 100 P .....	45
3.	GEREÇLER.....	46
3.1.	Kullanılan Maddeler.....	46
3.2.	Kullanılan Cihazlar .....	47
4.	YÖNTEM .....	48
4.1.	<i>Pseudomonas mendocina</i> Suşunun Saflığının Kontrolü ve Aktifleştirilmesi .....	48
4.1.1.	Gram boyama.....	49
4.2.	<i>Pseudomonas mendocina</i> 'dan Polihidroksialkanoat Üretimi .....	52
4.3.	Kloroform-Sodyum Hipoklorit Dispersiyon Yöntemi ile Polihidroksoktanoatın (PHO) Ekstraksiyonu .....	54
4.4.	Kurkumin Yüklü Film Formülasyonu .....	55
4.5.	PHO'nun ve Film Formülasyonlarının Karakterizasyonu .....	56
4.5.1.	Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) Analizi.....	56
4.5.2.	Yapısal özelliklerin belirlenmesi.....	57
4.5.2.1.	<i>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi</i> .....	57
4.5.2.2.	<i>Nükleer manyetik rezonans (NMR) Analizi</i> .....	57
4.5.2.3.	<i>X ışını kırınımı (XRD) analizi</i> .....	58
4.5.2.4.	<i>Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi</i> .....	59
4.6.	Film Formülasyonlarının <i>in vitro</i> Salım Çalışması .....	59
4.6.1.	Kurkimine ait kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi .....	59
4.7.	Sitotoksite Deneyleri .....	63
5.	BULGULAR VE TARTIŞMA .....	66
5.1.	<i>Pseudomonas mendocina</i> Suşunun Saflığının Kontrolü .....	66
5.2.	<i>Pseudomonas mendocina</i> 'dan Polihidroksialkanoatın Üretim	

Prosesi.....	67
5.3. Polihidroksialkanoatın Ekstraksiyon Çalışması .....	69
5.4. Kurkumin Yüklü Film Formülasyonlarının Hazırlaması.....	71
5.5. Karakterizasyon Çalışması Sonuçları.....	72
5.5.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi .....	72
5.6.2. Yapısal özelliklerin belirlenmesi.....	74
5.6.2.1. <i>Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi</i> .....	74
5.6.2.2. <i>Nükleer manyetik rezonans (NMR) Analizi</i> .....	80
5.6.2.3. <i>X ışını kırınımı (XRD) analizi</i> .....	85
5.6.2.4. <i>Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi</i> .....	86
5.6. <i>in vitro</i> Salım Çalışması Sonuçları.....	90
5.7. Sitotoksite Çalışması Sonuçları.....	96
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	99
KAYNAKÇA .....	101
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b> PHA metobolizmasındaki enzimler ve onların fonksiyonu .....	11
<b>Tablo 2.2.</b> Farklı bakteriler ve arkealar tarafından üretilen polihidroksialkanoatlar.....	18
<b>Tablo 2.3.</b> PHA'nın ekstraksiyon yöntemleri avantaj ve dezavantajları.....	27
<b>Tablo 4.1.</b> Kullanılan Tryptic Soy besiyeri içerikleri.....	49
<b>Tablo 4.2.</b> Kullanılan MSM içeriği .....	53
<b>Tablo 4.3.</b> İz element içeriği.....	53
<b>Tablo 4.4.</b> Oluşturulan filmlerin kodları .....	56
<b>Tablo 4.5.</b> 10ppm kurkumin kalibrasyon grafiği miktar tablosu.....	61
<b>Tablo 4.6.</b> 100ppm kurkumin kalibrasyon grafiği miktar tablosu.....	61
<b>Tablo 4.7.</b> Film formülasyonlarının belirlenen miktarları ve kurkumin içerikleri.....	62
<b>Tablo 4.8.</b> PBS için gerekli malzemeler ve miktarları .....	63
<b>Tablo 5.1.</b> Liyofilize edilen hücrelerin kuru hücre ağırlıkları ve ekstrakte edilen polimerin % değeri sonuçları .....	69
<b>Tablo 5.2.</b> Ekstrakte edilen PHO miktarları .....	70

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1. Biyo bazlı ve biyobozunur olan farklı polimer sınıfları .....	4
Şekil 2.2. Biyobozunur ve biyo bazlı polimerlerden oluşan biyopolimerler .....	5
Şekil 2.3. Mikrobiyal intraselüler polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) ve PHA yapıları .....	6
Şekil 2.4 Polihidroksialkanoatların genel yapısı. R1 / R2 = alkil grupları C1-C13, x = 1-4, n = 100-30,000 .....	9
Şekil 2.5. Bakteriyel polyesterlerin genel sınıflandırması.....	9
Şekil 2.6. Polihidroksialkanoat sentezinden sorumlu genler .....	10
Şekil 2.7. PHA granüllerinin şematik çizimi .....	12
Şekil 2.8. mcl-PHA üretimi için $\beta$ -oksidasyon yolağı .....	14
Şekil 2.9. PHA biyosentez yolları .....	17
Şekil 2.10. Gram negatif bakterinin iç ve dış zarlarının moleküler modeli.....	30
Şekil 2.11. E. coli endotoksinin kimyasal yapısı .....	30
Şekil 2.12. PHA moleküler yapısının hidroksialkanoat birimi.....	31
Şekil 2.13. PHA'nın medikal uygulamalarda gelişim süreci.....	34
Şekil 2.14. Kurkumunun kimyasal yapısı.....	39
Şekil 2.15. Doku onarımının hücrel ve moleküler mekanizması .....	41
Şekil 5.1. <i>Pseudomonas mendocina</i> suşunun seri dilüsyonu.....	66
Şekil 5.2. <i>Pseudomonas mendocina</i> suşunun TSA yayma ekim sonucu.....	66
Şekil 5.3. <i>Pseudomonas mendocina</i> suşunun gram boyaması sonucu .....	67
Şekil 5.4. <i>Pseudomonas mendocina</i> suşundan PHA'nın ekstraksiyon aşamaları.....	70
Şekil 5.5. Film formülasyonları ve PHO .....	72
Şekil 5.6. Film formülasyonlarının farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri .....	73
Şekil 5.7. FTIR analiz sonucu.....	77
Şekil 5.8. FTIR analiz sonucu.....	79
Şekil 5.9. <i>P. mendocina</i> 'nın oktanoat besiyerinde geliştirilmesi elde edilen polimerin genel yapısı.....	81
Şekil 5.10. FB, FB+PHO, kurkumin, FB+PHO+kurkumin ve PHO 1H- NMR analiz sonucu.....	82
Şekil 5.11. Kurkumin, FB, FK, FK + (PHO+kur), PHO 1H- NMR analiz sonucu.....	84
Şekil 5.12. Polimerin XRD analizi sonucu.....	86

<b>Şekil 5.13.</b> Kurkumin, PHO, FB, FB+PHO ve FB+(PHO+kur) DSC analizi sonucu .....	88
<b>Şekil 5.14.</b> Kurkumin ve PHO fiziksel karışımı DSC analizi.....	89
<b>Şekil 5.15.</b> Kurkuminin 10ppm kalibrasyon eğrisi.....	91
<b>Şekil 5.16.</b> Kurkuminin 100ppm kalibrasyon eğrisi.....	91
<b>Şekil 5.17.</b> FB+(PHO+kur) film formülasyonunun 12 haftalık salım grafiği .....	92
<b>Şekil 5.18.</b> FB+(PHO+kur) film formülasyonundan salınan kurkuminin zamana (saat) göre dağılımı .....	93
<b>Şekil 5.19.</b> FK+(PHO+kur) ) film formülasyonunun 12 haftalık salım grafiği.....	94
<b>Şekil 5.20.</b> FK+(PHO+kur) film formülasyonundan salınan kurkuminin zamana (saat) dağılımı .....	95
<b>Şekil 5.21.</b> Sitotoksisite deneyi sonuçları.....	97

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>3HB</b>	: 3-hidroksibutirat
<b>3HHx</b>	: 3-hidroksiheksanoat
<b>3HO</b>	: 3-hidroksioktanoat
<b>ACP</b>	: Açıl Taşıyıcı Protein
<b>ATP</b>	: Adenozin Triphosphate
<b>ATPE</b>	: Sulu İki Fazlı Ekstraksiyon
<b>ATPS</b>	: Sulu İki Fazlı Sistem
<b>C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub></b>	:(1E,6E)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Klorür
<b>CH<sub>4</sub></b>	: Metan
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	: Kloroform
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>CoA veya CoASH</b>	: CoenzimA
<b>DAP</b>	: Diaminopimelik Asit
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DSC</b>	: Diferansiyel Taramalı Kolorimetre
<b>ECM</b>	: Hücre Dışı Matrisi
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
<b>EGF</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü
<b>FAS</b>	: Tümör Nekroz Faktör ailesi üyesi
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü

<b>FISH</b>	: Fluorescence In Situ Hybridisation
<b>FTIR</b>	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
<b>GC-MS</b>	: Gaz Kromatografisi – Kütle Spektroskopisi
<b>GPC</b>	: Jel Permeasyon Kromatografisi
<b>H<sub>2</sub></b>	: Hidrojen
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Su
<b>HCl</b>	: Hidrojen Klorür
<b>HMEC-1</b>	: İnsan Endotelyal Hücresi
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>HSQC</b>	: Heteronükleer Tek Kuantum Tutarlılığı
<b>INS-PLC-NP</b>	: İnsülin Fosfolipit Kompleksi Yüklü PHBHHx Nanopartikülleri
<b>ICI</b>	: Emperyal Kimya Enstitüsü
<b>IR</b>	: İnfrared
<b>Lcl-PHA</b>	: Uzun zincir uzunluklu PHA
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>LipA</b>	: Lipit A
<b>Mcl-PHA</b>	: Orta zincir uzunluklu PHA
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	: Magnezyum
<b>NaOCl</b>	: Sodyum Hipoklorit
<b>NaOH</b>	: Sodyum Hidroksit
<b>NFκB</b>	: Nükleer Faktör kappa B
<b>NMR</b>	: Nükleer Manyetik Rezonans
<b>NPCM</b>	: PHA Olmayan Hücresel Kütle

<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>P (3HB-3HV)</b>	: Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)
<b>P (3HB-co-3HHx)</b>	: Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat)
<b>P(3HB-4HB)</b>	: Poli-3-hidroksibütirat-4-hidroksibütirat
<b>P(3HHx-co-3HO)</b>	: Poli (3-hidroksiheksanoat-ko-3-hidroksioktanoat)
<b>P(3HO)</b>	: Polihidroksioktanoat
<b>P(4HB)</b>	: Poli(4hidroksibütirat)
<b>P(3HB)</b>	: Poli (3-hidroksibütirik asit)
<b>PAA</b>	: Poliakrilik asit
<b>PBAT</b>	: Poli (bütilen adipat-ko-etahalat)
<b>PBBS</b>	: Poli (bütilen süksinat)
<b>PBS</b>	: Fosfat Buffer Solüsyonu
<b>PCL</b>	: Polikaprolakton
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PDGF</b>	:Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
<b>PDI</b>	: Polidispersite İndeksi
<b>PE</b>	: Polietilen
<b>PES</b>	: Polietersülfon
<b>PET</b>	: Polietilen tereftalat
<b>PGA</b>	: Poliglikolik asit, Poliglikolit
<b>PHA</b>	: Polihidroksialkanoat
<b>PhaA</b>	: $\beta$ -ketotiaz
<b>PhaB</b>	: NADPH'ye bağlı Asetoasetil-CoA Redüktaz

<b>PhaC</b>	: Poliester Sentaz
<b>PhaG</b>	: Açıl-ACP-CoA Transaçilaz
<b>PHBV</b>	: Poli Hidroksivalerat
<b>PHBVHHx</b>	: 3-hidroksibutirat-3-hidroksivalerat- $\beta$ -3-hidroksiheksanoat
<b>PLA</b>	: Polilaktil Asit, polilaktit
<b>PLGA</b>	: Poli (laktik-co-glikolik) Asit
<b>PP</b>	: Polipropilen
<b>PS</b>	: Polistiren
<b>PVC</b>	: Polivinil Klorür
<b>RaSMCs</b>	: Rat Aortic Smooth Muscle Cells
<b>RTD</b>	: Kalma Süresi Dağılımı
<b>SBH</b>	: Southern Blot Hibridizasyon
<b>SC-CO<sub>2</sub></b>	: Süperkritik Karbondioksit
<b>SCF</b>	: Süperkritik Sıvı
<b>ScI-PHA</b>	: Kısa zincir uzunluklu PHA
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>TAG</b>	: Triaçilgliserit
<b>TEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskopisi
<b>TGF</b>	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
<b>Wet-STEM</b>	: Islak Tarama Geçirgenliği Elektron Mikroskobu
<b>XRD</b>	: X-ışını Kırılması
<b>PEG400</b>	: Polietilen Glikol 400
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

## 1. GİRİŞ

Tüm dünyada yara tedavisi araştırmaları ve uygulamalarında kullanılan yara örtüleri önemli bir yer tutmaktadır. Bu yara bakım ürünleri yara bölgesini örtüp, zarar görmüş dokuyu dış etkilerden koruyarak ve yapısı uygunsa hücre üretimini aktive ederek iyileşme sürecine katkı sağlamaktadır. Yara bölgesinde polihidroksialkanoat türevlerinin kullanımı yeni bir yaklaşım olarak görülmüş ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır.

Biyolojik olarak parçalanabilen plastiklerden olan Polihidroksialkanoatlar (PHA) biyoyumlu, %100 biyobozunur, kendisi ve parçalanma ürünleri toksik özellik göstermeyen, piezoelektrik özelliğe sahip biyopolimerlerdir. Zincir uzunluklarına ve yan dallarına göre farklı yapılar gösterebilmektedirler. Orta zincir uzunluklu (Mcl-PHA)'lar yüksek esneklik ve düşük kristallik özellikleri ile hormonların ve ilaçların yavaş salınımını sağlarlar. Ayrıca PHA bozunması sonucu oluşan monomerler toksik özellik göstermezken, aksine insan vücudunda doğal olarak bulunur. Belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağı olarak kullanılır ve beyin gelişiminde rol alan aminoasitlerin prekürsörü olarak fizyolojik bir role sahiptir. Polihidroksialkanoatlar bu özelliği ile canlı vücudunda mükemmel uyum sağlarlar.

Bununların yanında PHA toprakta, suda, kanalizasyonda aerobik koşullar altında karbondioksit ve suya, anaerobik koşullar altında metana kadar indirgenebilir. Araştırmalarla, PHA'nın %85'inin yedi hafta içinde bozunmuş olduğu ve sudaki ortamlarda 60°C'yi aşmayan sıcaklıklarda 254 gün içinde bozunduğu ve bozunma ürünlerinin toksik olmadığı rapor edilmiştir.

Kurkuminin yara iyileştirme potansiyeli, anti-inflamatuar anti-enfeksiyöz ve anti-oksidan aktiviteleri gibi biyokimyasal etkilerinden kaynaklanmaktadır. Kurkuminin, dokuyu yeniden modelleme, granülasyon dokusu oluşumu ve kollajen depolanmasına katılmasıyla kutanöz yara iyileşmesini arttırdığı bulunmuştur. Çeşitli çalışmalar, kurkuminin yara üzerine uygulanmasının epitel rejenerasyonunu arttırdığını ve fibroblast proliferasyonunu, vasküler yoğunluğunu ve kollojen miktarını arttırdığını, yara iyileşme süresini kısalttığı göstermiştir.

Bu çalışmada amaçlanan,

- *Pseudomonas mendocina* suşlarından Mcl-PHA olan polihidroksioktanoatın üretilmesi, ekstrakte edilmesi

- PHA'ya kurkuminin hapsedilerek yara iyi edici film formülasyonunun geliştirilmesi

- Elde edilen film formülasyonlarının, karakterizasyon testlerinin yapılması ve salım profillerinin çıkarılması.

- Elde edilen film formülasyonlarının, sitotoksitesinin belirlenmesidir.

Bu amaçla *Pseudomonas mendocina* suşlarının uygun koşullarda üretilmesi ve polimer üretim ortamına maruz bırakıldıktan sonra ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Üretilen Mcl-PHA'nın monomer yapısının belirlenmesi için *in vitro* karakterizasyon testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PHA ile kurkumin içeren yara iyi edici film formülasyonu geliştirilerek ve bu sistemin *in vitro* salım çalışması yapılmıştır.

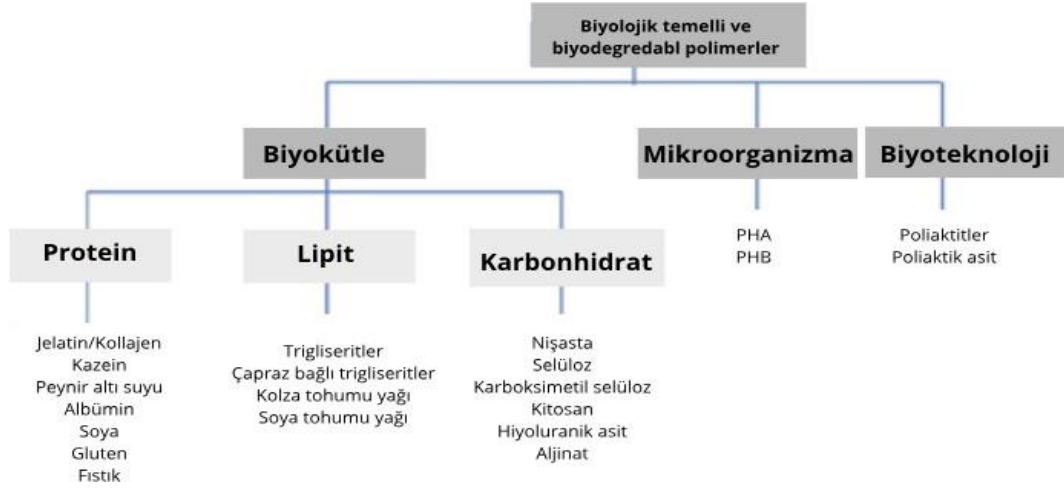
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyobozunur Plastikler

Plastikler, çok yönlülük, hafiflik, dayanıklılık ve bozunmaya karşı direnç özelliklerine sahiptir. Yaşamın konforunu ve kalitesini arttırmak için önemli bir madde haline gelmişlerdir. Plastikler, hemen hemen tüm sanayi alanlarının önemli bir parçasıdır (Khanna vd., 2005). Farklı endüstriyel alanlarda polietilen tereftalat (PET), polietilen (PE), polipropilen (PP), polistiren (PS) ve polivinil klorür (PVC) kullanılmaktadır (Raza vd., 2017). Plastik üretiminin maliyeti ucuz olsa da plastik ürünlerin %90'ını bir kez kullandıktan sonra atılmakta ve böylece küresel bir çevre krizi yaratmaktadır (Şekil 2.1) (The future of plastic, 2018). Plastik toprakta uzun süre parçalanmadan kalarak çevre kirliliği ve toksik madde birikime sebep olurken, yakılması sırasında potansiyel olarak tehlikeli olan hidrojen siyanür, akrilonitril oluşması sebepleri ile sağlık açısından zararlı olmasının yanında pahalı bir yoldur (Khanna vd., 2005; Miraç vd., 2003). 1970'li yıllardaki petrol krizinde petrol fiyatlarının artmasına da bağlı olarak, petrol kökenli polimerlere alternatifler aranmış ve 1976 yılında, İngiltere'deki Emperyal Kimya Endüstrisi (ICI), bakteriyel fermentasyonla üretilen poli- $\beta$ -hidroksibütirat'la (PHB) ilgili araştırmalara başlamıştır (Zinn vd., 2001; Miraç vd., 2003). Biopol, Nodax, Biogreen and Biomer olarak adlandırılan ürünler farklı monomer kompozisyonları kullanılarak farklı mikroorganizmalardan polihidroksialkanoatlarda edilmiştir (Bhuwal vd., 2013).

Plastiklerin geri dönüşümü yapılabilir, ancak zordur. Farklı çeşitte atılmış plastik malzemelerin sınıflandırılması da çok zaman alan bir süreçtir. Ayrıca pigmentler, kaplamalar, dolgu maddeleri gibi çok çeşitli katkı maddelerinin varlığı, geri dönüştürülmüş malzemenin kullanımını sınırlar. Böyle bir durumda, biyolojik olarak bozunabilir plastikler, konvansiyonel plastiklerden kaynaklanan çevresel tehlikeye en iyi çözümü sunar (Khanna vd., 2005).

Biyolojik olarak bozunabilir plastikler üç kategoriye ayrılabilir: Kimyasal olarak sentezlenen plastikler, nişasta bazlı plastikler ve polihidroksialkanoatlar (Şekil 2.1).

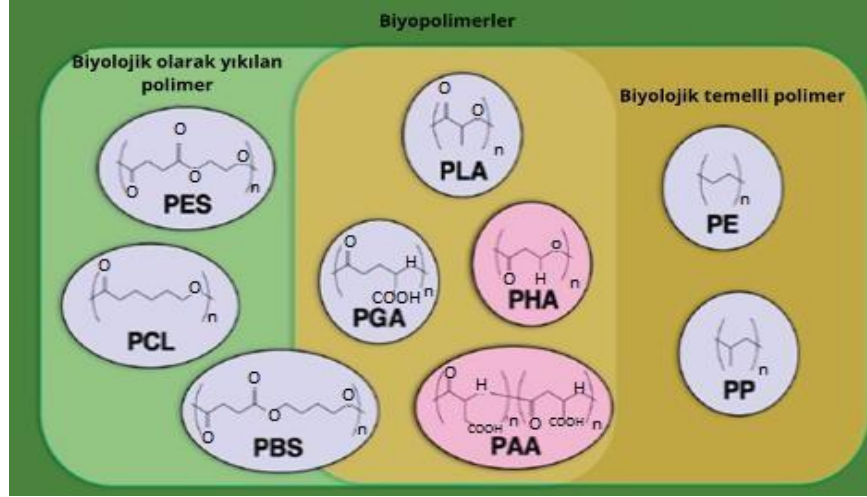


Şekil 2.1. Biyo bazlı ve biyobozunur olan farklı polimer sınıfları (Bugnicourt 2014)

### 2.1.1. Kimyasal olarak sentezlenmiş polimerler

Petrokimyasal ham maddelerden üretilen konvensiyonel plastikler ve laktik asitten üretilen sentetik polimerler bu gruba girmektedir (Yates vd., 2013; The future of plastic, 2018). Biyobozunur polimerler, aerobik veya anaerobik koşullar altındaki mikroorganizmalar tarafından CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> ve H<sub>2</sub>O gibi daha küçük moleküllere ayrılabilir.

Fotodegradasyon, oksidasyon ve hidrolizan gibi abiyotik kimyasal reaksiyonlar da bozunma sürecine yardımcı olurlar (The future of plastic, 2018). En yaygın olarak bilinen biyolojik olarak çözünebilir polimerler, polilaktit (PLA), poliglikolit (PGA), polikaprolakton (PCL), polihidroksialkanoatlar (PHA), poli(bütülen süksinat) (PBS) ve poli(bütülen adipat-ko-etahalat) (PBAT), poli(ε-kaprolakton), polivinil alkol, poli(etilen oksit) bu kategoriye girer (Şekil 2.2). Bunlar enzimatik veya mikrobik saldırıya duyarlıdır. Plastiklerin tüm özelliklerini birebir karşılayamadıkları için plastikler yerine kullanılmaları ticari olarak uygun değildir (Khanna vd., 2005; The future of plastic, 2018).



Şekil 2.2. Biyobozunur ve biyo bazlı polimerlerden oluşan biyopolimerler (Rohman., 2017)

PLA yenilenebilir kaynaklardan üretilen, parçalanma sonucunda laktik asit monomerlerini üreterek toksik ürün oluşturmayan sentetik biyopolimerdir (Rancan vd., 2014). Sahip olduğu fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri nedeniyle mevcut plastiklerin yerini alacak en iyi aday olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bu tür biyolojik olarak bozunabilir polimerler endüstriyel ölçekte üretilirse, gıda ürünlerine sahip araziler için rekabet oluşturacağı için sorun haline gelebilir (The future of plastic, 2018).

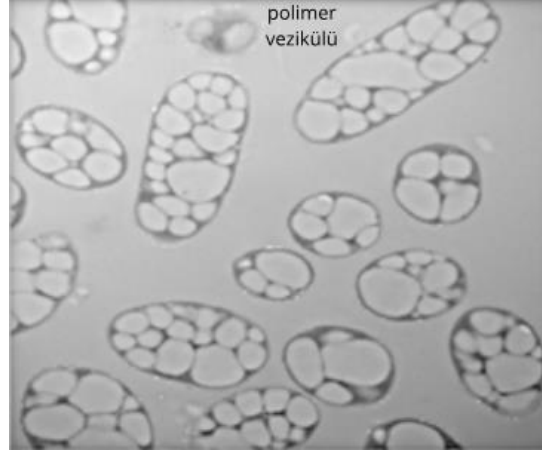
### 2.1.2. Nişasta bazlı plastikler

Bu tip nişasta, nişasta ve plastik karışımı (örneğin, nişasta-polietilen) üretmek için dolgu maddesi ve çapraz bağlayıcı madde olarak ilave edilir. Toprak mikroorganizmaları, nişastayı kolayca bozarak polimer matrisini parçalamaktadır. Bu, bozunma süresinin önemli ölçüde azalmasına neden olur. Ancak bu tür plastikler kısmen parçalanabilir. Nişasta kaldırıldıktan sonra kalan parçalar geri döndürülemez ve uzun bir süre ortamda kalır (Khanna vd., 2005).

### 2.1.3. Polihidroksialkanoatlar (PHA)

Polihidroksialkanoatlar %100 biyobozunur enerji ve karbon deposu olarak kullanılan biyopolimerlerdir (Kim vd., 2001). Polihidroksialkanoatlar nitrojen, azot, oksijen, fosfat gibi temel besleyicilerin sınırlı konsantrasyonunda ve aynı zamanda fazla karbon kaynağı varlığında mikroorganizmalar tarafından hücre içinde üretilen polihidroksialkanoatların polyesterleridir (Şekil 2.3). Polipropilen gibi çeşitli sentetik termoplastiklere benzer özelliklere sahiptirler ve dolayısıyla yerlerine kullanılabilirler

(Ojumu vd., 2004; Verlinden vd., 2007). PHA'lar insandaki yağ veya bitkilerdeki nişasta gibi bakterilerde depo maddesi olarak rol almaktadır (Miraç vd., 2003).



**Şekil 2.3.** Mikrobiyal intraselüler polihidroksialkanoatlar (PHA'lar) ve PHA yapıları (Chen vd., 2018)

PHA'lar, çeşitli ortamlarda yüksek biyobozunurlukları gibi benzersiz özelliklere sahiptir ve bu nedenle biyobozunur polimer bileşikleri kadar büyük ilgi çekmektedir (Raza vd., 2017). Aaerobik koşullar altında tamamen suya ve karbondioksite, toprak, göl suyu ve kanalizasyonda bulunan mikroorganizmalar tarafından anaerobik koşullar altında metana indirgenirler. (Khanna vd., 2005; Ong vd., 2017) Biyopolimerler arasında, sahip oldukları özellikler ile biyo bazlı polyesterler, petrokimyasal termoplastikler için bir alternatiftir (Raza vd., 2017).

Bu sebeplerden dolayı PHA'nın kolaylıkla geri kazanılması, ekonomik üretiminde çok önemli bir parametredir. Dolayısıyla, PHA'nın ekstraksiyonu için yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır, böylece genel işlem daha basit ve daha ucuz yapılabilir (Khanna vd., 2005).

## 2.2. Polihidroksialkanoatların Tarihçesi

Kloroformda çözünen sudanofilik, lipid benzeri inklüzyonların varlığı ilk olarak 1920'li yıllarda *Azotobacter chroococcum*'da gözlemlenmiştir. *Bacillus megaterium*'daki benzer inklüzyonların kimyasal bileşimi, Lemoigne tarafından 1923'te açıklığa kavuşturulmuştur (Verlinden vd., 2007). *Bacillus subtilis* kültürleri ile yapılan çalışma ile granüllerin monomer bileşeni poli (3-hidroksibutirik asit) (P[3HB]) olarak tanımlanmıştır

(Khanna vd., 2005). 1950'lerin sonuna gelindiğinde, P (3HB)'nin bu bakterilerde karbon ve enerji için hücre içi rezerv olarak işlev gördüğünün tespiti için *Bacillus* cinsi üzerine yapılan çalışmalarla elde edilmiş ve 11 farklı kısa zincirli  $\beta$ -hidroksi asit birimini tanımlamıştır (Sudesh vd., 2000; Findlay vd.,1983).

Bundan sonraki çalışmalar, PHA'ların farklı mikroorganizmalarda üretilmesi ve eldesine doğru yönelmiştir. Mikrobiyal PHA'da 3-hidroksibütirat (3HB) dışındaki hidroksoalkanoat (HA) birimlerinin tanımlanması, ticari olarak büyük potansiyele sahip olduğu düşünülerek, bu bakteri depo polimerinin araştırılması hız kazanmıştır (Sudesh vd., 2000).

Ramsay ve arkadaşları 1990 yılında *Alcaliaenes eutrophus* biyokütlesini bir sürfektan kullanarak, Hanh ve arkadaşları 1994 yılında, yine *Alcaliaenes eutrophus*'den sodyum hipoklorit çözeltisi ve kloroform kullanarak dispersiyon ile PHA eldesi gerçekleştirmiştir.

Schroll ve arkadaşları 1996 yılında, *Pseudomonas* cinslerinin undekanoat veya dodekanoat içeren besiyerinde yetiştirildiğinde orta zincirli uzunlukta PHA'ların üretimine ek olarak, önemli miktarda 3OH bütirik asit içeren PHA karışımlarının üretilmesiyle sonuçlanmıştır. Mcl-PHA'nın varlığının ispatı ile farklı araştırmacılar farklı mikroorganizmalarla çalışmalar gerçekleştirmiş ve elde edilen ürünleri tanımlamıştır.

2000 yılında Tian ve arkadaşları, *Pseudomonas mendocina* suşlarını miristik asit, oktanoat, oleik asit ve sitrik asit gibi farklı karbon kaynaklarını içeren besiyerlerinde yetiştirip, Mcl-PHA türlerini analiz etmişlerdir.

Kroumova ve arkadaşları 2002'de, *Pseudomonas mendocina*'yı karbonhidrat içeren besiyerinde yetiştirerek PHA üretim yolunu araştırmış ve Mcl-PHA'nın 3OH açıl bileşenlerini, yağ asidi sentetaz (FAS) yolağından türetildiğini bulmuşlardır. Furrer ve arkadaşları 2007 yılında, *Pseudomonas putida*'dan poli 3-hidroksioktanoat-ko-3-hidroksiheksanoat geri kazanımı için sıcaklık kontrollü bir yöntem geliştirmişlerdir.

Rai ve arkadaşları 2011'de *Pseudomonas mendocina*'nın tek karbon kaynağı olarak sodyum oktanoat ile yetiştirildiğinde, bir kopolimer yerine, poli (3-hidroksioktanoat) P(3HO)'nun homopolimerini ürettiğini belirlemişlerdir.

Günümüzde, düz, dallı, doymuş, doymamış ve aromatik yapılara sahip polihidroksialkanoatların, 150 farklı monomer bileşenlerinin 90'dan fazla mikrobiyal tür tarafından üretildiği bildirilmiştir (Anjum vd., 2016). 1970'lerin başında, araştırmacılar PHA'ların sentezinden sorumlu genleri bulmuşlar ve 1980'lerin sonlarında, *Ralstonia eutropha* suşunu kullanarak biyosentetik yolda yer alan enzimleri klonlayarak, *E. coli*'de fonksiyonel olarak aktif enzimler elde etmişlerdir. Bu yaklaşım, polimer üretimi için yeni bir yol olarak görülmektedir (Rohman, 2017).

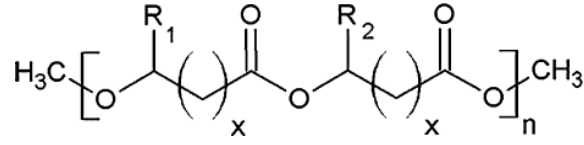
Tanımlanan polihidroksialkanoat türevlerinin biyomedikal ve farmasötik alanlardaki kullanımları FDA tarafından 2007'de onaylanmıştır (Papaneophytou vd., 2019). Farklı araştırma grupları olan; Simion ve arkadaşlarının 2013 yılında, Gumel ve arkadaşlarının 2015'de, Senthilkumar ve arkadaşlarının 2017 yılında ilaç taşıyıcı sistem olarak PHA türevlerini kullanmayı denemişlerdir.

### **2.3. Polihidroksialkanoatların Genel Özellikleri**

Polihidroksialkanoatlar (PHA), hücre içi karbon ve enerji depolama bileşeni olarak çok sayıda gram pozitif ve negatif bakteri, arkealar ve bitkiler tarafından sentezlenen depo maddeleridir (Khanna vd., 2005; Verlinden vd., 2007; Tan vd., 2014). Genellikle, bakteriler, büyümenin sabit fazı boyunca, dengesiz bir büyüme koşuluna maruz kaldıklarında, fazla karbon kaynağı ve aynı anda oksijen, azot, kükürt, magnezyum ve fosfor gibi besinlerin sınırlandırılması ile bu granülleri üretirler. Bununla birlikte, bazı bakteri, *Alcaligenes latus* gibi herhangi bir beslenme kısıtlamasına tabi tutulmadan PHA'ları üretir. (Rai vd., 2011).

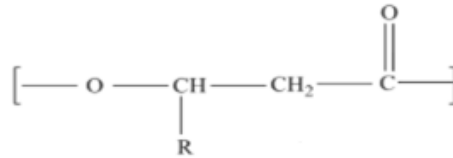
Polihidroksialkanoatlar (PHAs) Şekil 2.4'de gösterilen kimyasal yapıya sahip 3, 4, 5 ve 6 hidroksialkanoik asitlerin poliesterleridir (Rai vd., 2011). Polihidroksialkanoatlar suda ve alkolde çözünmezken, kloroform ve diğer klorlu hidrokarbonlarda çözülebilirler (Bugnicourt vd., 2014).

Polihidroksialkanoatlar sitoplazmik inklüzyonlar olarak birikirler ve bu granüllerin sayısı türler arasında farklılık gösterirler (Zinn vd., 2001; Rai vd., 2011). Bu granüllerin boyutu 0,2µm ve 0,5µm arasında olup, Nile Red, Nile Blue A veya Sudan Black B ile boyanarak faz kontrast mikroskopuyla gözlemlenebilirler (Urtuvia vd., 2014; Rohman, 2017).



**Şekil 2.4** Polihidroksialkanoatların genel yapısı.  $R_1 / R_2 =$  alkil grupları C1-C13,  $x = 1-4$ ,  $n = 100-30,000$ . (Rai vd., 2011)

300'den fazla bakteri türünün, yapısına ve hidroksialkanoik asit monomerlerinden oluşan yan zincir uzunluğuna göre Şekil 2.5'te gösterildiği gibi üç gruba ayrılabilen PHA'yı sentezleyebileceği bulunmuştur (Kathiraser vd., 2007; Guo vd., 2011). Bu bakteriler tarafından üretilen 150'den fazla homopolimer ve kopolimer tanımlanmıştır (Parlane vd., 2016). Birinci grup kısa monomer birimlerinden (3-5 karbon atomu) oluşan kısa zincir uzunluğunda PHAs'dır (Scl-PHA) (Guo vd., 2011; Kourmentza vd. 2017). Bu sınıfın örnekleri arasında poli (3-hidroksibutirat) [P (3HB)] ve poli (4 hidroksibutirat) [P(4HB)] bulunur (Keshavarz vd., 2010).



**R-Metil veya Etil (kısa zincir uzunluklu PHA)**

**R-Propil, Bütil, Pentil (orta zincir uzunluklu PHA)**

**R-Tekrarlayan birimlerde 14'den fazla karbon (uzun zincir uzunluklu PHA)**

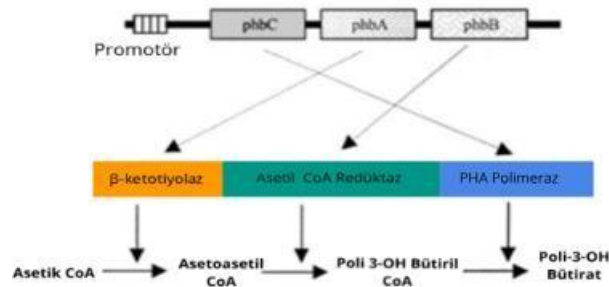
**Şekil 2.5.** Bakteriye polyeşterlerin genel sınıflandırması (Roy vd., 2014)

İkinci grup çoğunlukla *Pseudomonas* türleri tarafından sentezlenen monomerler olup genellikle 6-14 arası bir karbon zinciri uzunluğuna sahip orta zincirli uzunlukta PHAs 'dır (Mcl-PHA) (Guo vd., 2011; Kourmentza vd., 2017). Bu sınıfın örnekleri, poli (3-hidroksiheksanoat) [P(3HHx)], poli (3-hidroksioktanoat) [P(3HO)] homopolimerlerini ve P(3HHx-co-3HO) gibi heteropolimerleri içerir (Keshavarz vd., 2010).

Üçüncü grup, 16 karbondan daha fazla karbon içeren monomer birimlerinden oluşan uzun zincir uzunluğuna sahip PHAs'dır (Lcl-PHA) (Kathiraser vd., 2007; Kourmentza vd., 2017). Bir *R. Eutropha* mutantının ürettiği kısa zincir uzunluğunda ve orta zincirli uzunluktaki PHAs kopolimerlerinden oluşan ürün, Lcl-PHA'ya örnek olarak verilebilir (Guo vd., 2011). Biyosentetik enzimlerin stereo özgünlüğü nedeniyle tüm monomerler R konfigürasyonunda olup biyodegradasyonu ve biyoyoumluluğu bu şekilde sağlarlar (Zinn vd., 2001; Anjum vd., 2016).

PHA'ların fiziksel ve yapısal özellikleri, monomer kompozisyonu ve kimyasal yapısı, yani polimer omurgasından uzanan sarkık grupların uzunluğu, bu sarkık grubun homo veya kopolimer olarak kimyasal bileşimden ve polimer omurgasında ester bağları arasındaki mesafeden büyük ölçüde etkilenmektedir (Anjum vd., 2016; Raza vd., 2018).

PHA biyosentezinde görevli üç gen *PhaA* ( $\beta$ -ketotiyolaz), *PhaB* (NADPH'ye bağlı asetoasetil-CoA redüktaz) ve *PhaC* (Poliester sentaz), *PhaCAB* operonu ile düzenlenmiştir. Bu genlerin her organizmada kümelenmiş olması veya aynı sırada olması gerekmez (Şekil 2.6) (Reddy vd., 2003). PHA polimerazlar sitozolde lokalize olup, granül yüzeyine gelince aktive olur. Alt birimlerin sayısı, boyutu ve substrat özgüllüğü ile farklılık gösteren 53 farklı PHA polimeraz klonlanıp krakterize edilmiştir (Zinn vd., 2001).



Şekil 2.6. Polihidroksialkanoat sentezinden sorumlu genler (Reddy vd., 2003)

PHA depolimeralar (*PhaZ*), PHA'ları parçalayan ana enzimdir. PHA depolimerazları, hücre içi ve hücre dışı depolimerazlar olmak üzere iki gruba ayrılır (Parlane vd., 2016). Hücre içi PHA (iPHA) depolimerazlar, *PhaC1* ve *PhaC2* genleri arasında iki kopya şekilde kodlanırlar ve ilk defa *Pseudomonas putida*'da tespit

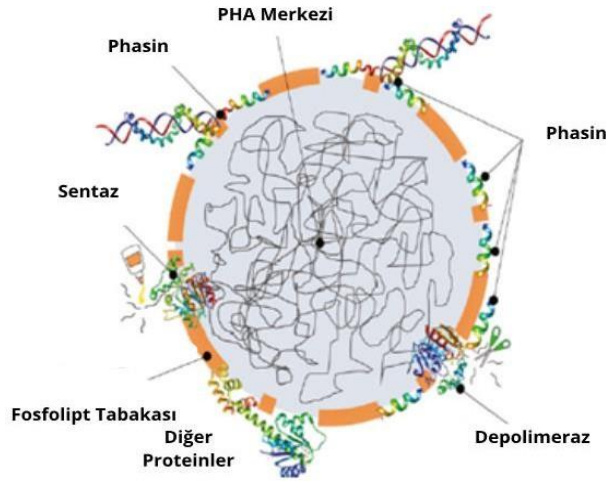
edilmişlerdir (Jendrossek, 2009). PHA granüllerinin yüzeyinde bulunur ve daha önce birikmiş olan PHA'ları bakteri içinde yıkar. Hücre dışı PHA polimerazlar, hücre dışındaki (denatüre) PHA'ları kullanabilmek için çok sayıda bakteri tarafından hücre dışına salgılanır (Parlane vd., 2016).

**Tablo 2.1.** PHA metabolizmasındaki enzimler ve onların fonksiyonu (Sagong vd., 2018)

Enzim	Fonksiyonu
PhaA	Asetil-CoA asetiltransferaz ( $\beta$ -ketotiolaz)
PhaB	Asetil-CoA redüktaz
PhaC	PHA sentaz
PhaE	PHA sentaz (Sınıf II PHA sentaz alt ünitesi)
PhaR	PHA sentaz (Sınıf IV PHA sentaz alt ünitesi)
PhaZ	PHA depolimeraz
PhaY	PHA oligomer hidrolaz
PhaP	Phasin, PHA granüllerinin sayısı ve boyununun kontrolü, PhaC transkripsiyon regülasyonu, PHA sentezini destekler
PhaF	Phasin, hücre bölünmesinde PHA granüllerinin segregasyonu ve hücre içi lokasyonunda rol alır, PhaC transkripsiyon regülasyonu
PhaI	Phasin, bilinmeyen fonksiyonu ile PHA sbiyosentezi üzerine etkilidir, PhaF ile etkileşim
Ga14, Msm16	Phasin, PHA granüllerinin sayısı ve boyununun kontrolü
ApdA	Phasin, PHA granüllerinin sayısı ve boyununun kontrolü, PHA depolimerazı aktive eder
PhaM	Hücre bölünmesi sırasında PHA granüllerinin segregasyonu ve hücre içi lokasyonunda rol alır, PHA sentazı aktive eder
PhaR	Phasinin transkripsiyonel regülasyonu, PHA biyosentezi regülasyonu
PhaQ	Phasinin transkripsiyonel regülasyonu

Granüllerin yapısı kısa ve uzun zincirli PHA'larda farklılık gösterir. Mcl-PHA ve Scl-PHA'nın her ikisinin granül yapısında proteinler ve bunlarla ilişkili yapılar 4 sınıfa ayrılır; PHA polimeraz, PHA depolimeraz, Phasin, PHA monomerlerinin sentezinde yer alan enzimler ve transkripsiyonel regülatörler gibi proteinlerdir (Zinn vd., 2001; Maestro vd., 2017).

PHA'lar, Şekil 2.7'de gösterildiği üzere; hücre sitoplazmasında, amorf bir biopolyester çekirdeğe ve ağ şeklinde veya gömülü olarak yapısal, metabolik ve düzenleyici polipeptitlere sahip bir yüzeyi oluşturan 2-4 nm kalınlığında proteinli bir yüzey tabakası (granülle ilişkili proteinler veya GAP'ler) ile kaplanan suda çözünmeyen 100-800 nm büyüklüğünde granüller halinde depolanır (Pouton vd., 1996; Zinn vd., 2001; Parlana vd., 2016). PHA granülleri, granuloz, glikojen, triasilgliseroller ve balmumu esterleri gibi PHA'ların yanı sıra karbon ve enerjinin diğer prokaryotik depolama bileşiklerini içeren yapılar 'karbonozom' olarak adlandırılan karmaşık ve iyi organize edilmiş yapılardır (Janderosseck, 2009).



Şekil 2.7. PHA granüllerinin şematik çizimi (Maestro vd., 2017)

Granüllere elektron mikroskobu ile bakıldığında iki protein tabakasını bölen fosfolipt tabakası içerdiği gözlenir (Zinn vd., 2001). GAP'lar, katalitik fonksiyonlardan yoksundur ancak granül yapısında ve PHA metabolizmasında önemli bir rol oynayan ve PHA granüllerinin çoğunu kaplayan ve phasin olarak adlandırılan küçük heterojen proteinler ile birlikte PHA metabolizması ile ilişkili birkaç enzimi içerir (Maestro vd., 2017).

Phasinlerin, PHA sentezinin düzenlenmesinin yanında PHA depolimerazı aktifleştirerek granül yapısının bozunması, granülün büyüklüğünün düzenlenmesi, PHA granül yüzeyi üzerinde ağların oluşumu ve PHA granüllerinin hücre bölünmesi sırasında

dağılımı gibi başka birçok fonksiyona katıldığı ileri sürülmektedir (Parlane vd., 2016; Mezzina vd., 2016).

Granül yapısı, sitoplazma ve dış membrandan orjin alan lipofilik proteinler ile kolayca kontamine olduğundan granül ilişkili proteinlerin ayrımını yapmak zordur. Bu nedenle granül ilişkili proteinlerin granül üzerinde orijinal lokasyonu ile ilgili şüpheler vardır (Zinn vd., 2001).

PHA'lar moleküler ağırlığı 50,000 ve 1,000,000 Dalton arasında değişen, biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumlu, piezoelektrik özellik gösteren (kemik büyümesini teşvik eder ve yara iyileşmesinde yardımcı olur) ve kimyasal yapılarındaki çeşitlilikten kaynaklanan geniş fiziksel ve mekanik özellikler sergileyen moleküllerdir (Reddy vd., 2003; Rai vd., 2011).

Bu özellikler nedeniyle PHA'lar, özellikle tıbbi uygulamalar gibi çeşitli uygulamalar için tercih edilen biyolojik materyal olarak dikkat çekmektedir (Rai vd., 2011). PHA'ların biyomedikal uygulamaları, fiziksel ve mekanik özelliklerine bağlıdır. PHA'nın mekanik özellikleri, hidroksialkanoatların dallı uzunluğuna bağlı olarak kırılabilirlik ve esneklik özelliklerinin derecesini belirlemektedir (Guoqiang vd., 2001). Mcl-PHA düşük kristallik, gerilme mukavemeti, erime noktasına ve düşük cam sıcaklıkları esnek bir maddedir (Guoqiang vd., 2001; Philip vd., 2007). Kırılabilir scl-PHA'larla karşılaştırıldığında, mcl-PHA'lar yapışkan, elastik ve şekilsiz olma eğilimindedir (Wang vd., 2017). Bu nedenle Mcl-PHA'lar ve kopolimerleri, kalp kapakları, kalp yamaları ve diğer vasküler uygulamalar, cilt dokusu mühendisliği, yara iyileşmesi, kontrollü ilaç taşınması ve benzeri uygulamalar için daha caziptir (Rai vd., 2011a).

### **2.3.1. Mcl-PHA özellikleri**

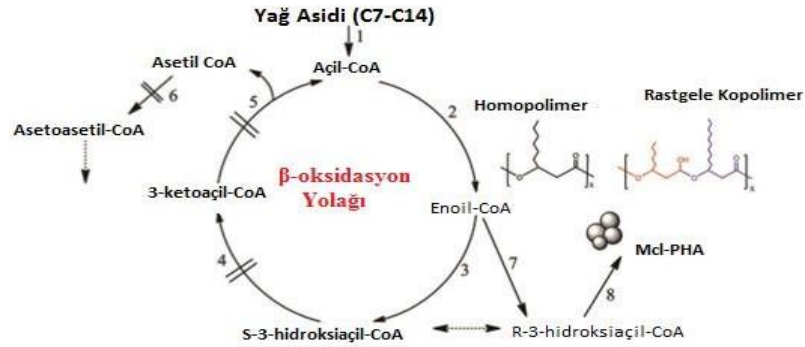
Mcl-PHAs ilk olarak 1983 yılında *P. oleovorans*'ın oktanda yetiştirildiği zaman keşfedilmiştir. O zamandan beri, rRNA homoloji grubuna ait olan birçok floresan *Pseudomonas* sp. PHA üretimi için kullanılmıştır. Bugüne kadar değişik karbon substratlarında çeşitli *Pseudomonas* suşlarının kültürlenmesiyle 150'den fazla Mcl-PHA monomeri üretilmiştir (Rai, vd., 2011b). Scl-PHA'lara kıyasla, Mcl-PHA'lar düşük kırılabilirlik, azalan kristallik, düşük cam geçiş sıcaklığı ve yüksek erime sıcaklıkları gibi

mekanik özelliklere sahipken, zayıf gerilme mukavemeti özelliklerine sahiptirler (Raza vd., 2017).

Genel olarak, Mcl-PHA'ların sınıflandırılması;

- 1) herhangi bir fonksiyonel kısım içermeyen doymuş alifatik Mcl-PHA'lar, örneğin; P (3HO), P (3HHx) ve P (3HN)
- 2) terminal-reaktif gruplarında n-alken besiyerinde karbon-karbon çift bağları ve karbon-karbon üçlü bağları içeren doymamış Mcl-PHA'lar
- 3) brom, klor, florür gibi halojenlenmiş reaktif grupları içeren Mcl-PHA'lar
- 4) aromatik yan zincirleri içeren Mcl-PHA'lar, olarak yapılırlar (Anjum vd., 2016).

Mcl-PHA'lar üç yolla sentezlenebilir. Birincisi, açıl-CoA'nın asetil-CoA ile yoğunlaştırılmasıyla zincir uzunluğunun artırılmasıdır. İkincisi, yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonu yoludur (Şekil 2.8); bu, yağ asitlerinin substrat olarak kullanıldığı ana yoldur. Üçüncüsü, ucuz karbon bileşiklerinin biyosentezinde anahtar adım olan yağ asitlerinin biyosentezi yoluyla gerçekleşir (Raza vd., 2017).



**Şekil 2.8.** mcl-PHA üretimi için  $\beta$ -oksidasyon yolağı: medium-chain-length PHA; 1: yağ asidi-CoA ligaz; 2: açıl-CoA dehidrojenaz; 3: S-enoil-CoA hidrataz; 4: S-3-hidroksiaçıl-CoA dehidrojenaz; 6: acetyl-CoA asetiltransferaz; 7: R-enoil-CoA hidrataz; 8: PHA sentaz (Wang vd., 2017)

*Pseudomonas* türleri, PHAs üretmek için yapısal olarak ilişkili ve ilişkisiz karbon kaynakları üzerinde yetiştirilebilir. (Rai vd., 2011a).

Bazı mikroorganizmaların aromatik hidrokarbonlardan, hem aromatik hem de alifatik mcl-PHA'ları biriktirdiği gözlenmiştir. Bununla birlikte bazı istisnalar vardır,

örneğin *Pseudomonas mendocina*, oktanoat beslemesinde yetiştirildiğinde PHA homopolimerini (3HO) biriktirmiştir (Rai vd., 2011a).

Mcl-PHAs hidrofobiktir, bu nedenle halojenler, karboksil, hidroksil, epoksi, fenoksi, siyanofenoksi, nitrofenoksi grupları gibi işlevsel grupların varlığı özellikle önemlidir (Lenz vd., 1992). Mcl-PHA'ların fonksiyonel kısımları onları diğer PHA'lardan daha çok yönlü hale getirir ve belirli uygulamalar için daha serbest bir şekilde değiştirilebilir (Raza vd., 2017). Bu fonksiyonel kısımların daha ileri kimyasal modifikasyonları ile uyarlanabilen özelliklere sahip yeni biyomateryallerin üretimi sağlanabilir. Bu gibi işlevsel gruplar ayrıca medikal tedavi için ilaçlar gibi aktif bileşiklerin sonraki bağlantıları için potansiyel hedefler olarak da görev yapabilir (Lenz vd., 1992).

Mcl-PHA'ların kristalin bölgeleri fiziksel çapraz bağ olarak rol oynar, bu nedenle erime sıcaklığına yakın sıcaklıklarda yumuşar. Mcl-PHA grubunun diğer kopolimerleri, polimer yapısının düzensizliğinde bozukluk oluşturan ve kristalleşmeyi önleyen işlevsel grupların varlığı nedeniyle kristallenmezler. Mcl-PHA'lar, fiziksel çapraz bağlar olarak işlev gören kristalin kısımları içeren elastomerlerdir. Vasküler uygulamalar, sinir ve cilt yenilenmesi gibi yumuşak doku rejenerasyonu veya daha elastomerik polimerlerin gerekli olduğu, kontrollü ilaç dağıtım sistemleri için gerekli olan matrisler için yüksek esneklik ve düşük sertlikte elastomerik Mcl-PHA'lar caziptir (Rai vd., 2011a).

### **2.3.2. Polihidroksialkanoatların biyosentez yolları**

PHA'ların üretilmesi için kimyasal sentez, transgenik bitki hücreleri kullanılarak ve bakteri fermentasyonu olarak bilinen üç ana teknik vardır. Bakteriyal fermentasyon sayesinde PHA biyopolimeri hücre sitoplazmasında sentezlenir (Jacquel vd., 2008).

PHA üreten mikroorganizmalar farklı karbon kaynaklarını kullanarak PHA'nın çeşitlenmesini sağlamaktadırlar. Bu karbon kaynakları arasında sakkaritler (örn.; Fruktöz, laktoz, arabinoz, vb.), N-alkanlar (örn.; heksan, oktan, vb.), N-alkanoik asitler (örn.; asetik asit, propiyonoik asit, bütirik asitler, asit, vb.), n-alkoller (örn.; metanol, oktanol, gliserol vb.), gazlar (örn.; metan ve karbon dioksit) ve su ürünleri vardır (Tan vd., 2014).

PHA üretiminde bakterilerdeki biyosentetik yolları doğrudan veya dolaylı olarak bakterinin glikoliz, pentoz fosfat yolları, Krebs Döngüsü,  $\beta$ -oksidasyon, de novo yağ asitleri sentezi, amino asit katabolizması, Calvin Döngüsü ve serin yolu dahil olmak üzere merkezi metabolik yollar ile karmaşık bir şekilde bağlantılıdır. Bugüne kadar 14 PHA sentez yolu tanımlanmıştır. Ancak bunlardan 4 ana yol aydınlatılabilmektedir (Tan vd., 2014; Sagong vd., 2018).

İlk yolak Şekil 2.9.(B) A. *eutrophus*'ta incelenmiştir. Bu yolda 3HB monomeri,  $\beta$ -ketotiyolaz enzimi tarafından asetoasetil-CoA oluşturmak üzere trikarboksilik asit (TCA) döngüsünden iki asetil-CoA molekülünün kondensasyonu ile üretilir. Daha sonra, bir NADPH 'ye bağlı asetoasetil-CoA redüktaz (PhaB) enzimi, 3. pozisyondan indirgeyerek, 3-hidroksibutiril-CoA'ya dönüşümünü gerçekleştirir. Son adımda PHA sentaz (PhaC) tarafından 3-hidroksibutiril-CoA'nın poli (3- hidroksibutirat) esterifikasyonu yoluyla katalizlenen polimerizasyon reaksiyonudur (Khanna vd., 2005, Philip vd., 2007, Zinn vd. 2001). Bu reaksiyon yalnızca hücre içinde gerçekleşir (Zinn vd. 2001).

Yağ asidi metabolizmasına katılan yollar, PHA biyosentezinde kullanılan farklı hidroksalkanoat monomerler üretirler. İkinci yolak Şekil 2.9.(J) bir PHA biyosentetik yolağı tipi, rRNA homoloji grubu I *P.oleovorana*'a ait birçok *Psuedomonas* türünde bulunur ve hücreler alkanlar, alkanoller veya alkanolik asitte yetiştirilirse, Mcl-PHA türevlerini biriktirir (Khanna vd., 2005; Philip vd., 2007).

Üçüncü yolak PHA biyosentetik yol tipi Şekil 2.9.(K), rRNA homoloji grubu II 'ye ait hemen hemen tüm *Psuedomonas* türlerinde bulunur. Yol III en ilgililenen yoldur çünkü yapısal olarak basit, ucuz karbon kaynakları olan glikoz, sukroz ve fruktoz PHA sentezi için monomerler üretmeye yardımcı olurlar. Yağ asidi biyosentetik yolağından gelen  $\beta$ -3-hidroksiaçil ara maddeleri, açil taşıyıcı protein (ACP) formundan açil-ACP-CoA transaçilaz enzimi (phaG ile kodlanmış) tarafından CoA formuna dönüştürülür (Khanna vd., 2005; Philip vd., 2007).

Dördüncü yol ise; *Rhodopsuedomonas rubrum*'da,  $\beta$ -ketoitolaz tarafından oluşturulan asetoasetil-CoA'nın bir NADH'ye bağımlı redüktaz ile L-(+)-3-hidroksibutiril-CoA'ya indirgendiği ve daha sonra iki enoil-CoA hidrataz tarafından D-(-)-3-hidroksibutiril-CoA'ya dönüştürüldüğü ikinci aşamadan sonra farklılık gösterir (Khanna vd., 2005).



**Tablo 2.2.** Farklı bakteriler ve arkealar tarafından üretilen polihidroksialkanoatlar (Reddy vd., 2003; Verlinden vd., 2007; Urtuvia, 2014; Tan vd., 2014; Raza vd., 2018)

Organizma	Kültür Koleksiyon Numarası	Karbon Kaynağı	PHA
<i>Aeromonas hydrophila</i>		Laurik asit, Oleik asit	mcl-PHAs
<i>Alcaligenes eutrophus</i>		Glikonat, Propionat, Octanoat	PHB
<i>Alcaligenes latus</i>		Malt, Soya atığı, Süt atığı	PHB
<i>Azohydromonas australica</i>	ATCC29713, DSM1124, IAM12664, LMG3324	Malt atığı	P3HB
<i>Azohydromonas lata</i>	ATCC29714, DSM1123, IAM12665, LMG3325	Sükroz	P3HB
<i>Azotobacter beijerinckii</i>	DSM1041, NCIB 11292	Fruktoz, Glikoz	P3HB
<i>Bacillus cereus</i>		Glikoz, ε-caprolactone, Şeker pancarı	
<i>Bacillus megaterium</i>	DSM90	Sitrik asit, Glikoz, Gliserol, Süksinik asit	P3HB
<i>Bacillus megaterium</i>	CCM1464, DSM509, IFO12109, NBRC12109	Sitrik asit, Glikoz, Gliserol, Süksinik asit, Oktanoik asit	P3HB, scl-mcl-PHA, mcl-PHA
<i>Bacillus spp.</i>		Asetat, n-alkanoat, 3-Hidroksibütirat, Propionat, Sükroz, Valerat, ε-caprolactone, Şeker pancarı	3HB, 3HV, 3HHx
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		Trehaloz, Ksiloz, Rafinoz, Maltoz, Dekstroz, Laktöz, Prüvat, Şeker pancarı, Malloz,	PHB
<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC17759 DSM50181 NCIM9085	Ksiloz: levulinik asit Gliserol Fruktoz, Glikoz, Sükroz	P(3HB-co-3HV) P3HB P3HB
<i>Burkholderiasacchari</i> sp. Nov.		Hurma yağı, Oleik asit, Palmiye çekirdeği yağı Adenitol, Arabinoz, Arabitol, Sellobioz, Furuktoz Fukoz, Laktöz, Maltoz, Rafinoz	PHB, PHV PHB, PHV
<i>Burkholderia</i> sp. DSMZ9243		Sükroz, Glikonoat	PHB, P(3HPE)
<i>Burkholderia</i> sp. USM JCM15050		Laurik asit, Miristik asit, Oleik asit, Palmirik asit, Stearik asit	P3HB
<i>Burkholderia sacchari</i> IPT189		Sükroz: propionik asit	P(3HB-co-3HV)
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400		Glikoz	PHB
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC15990, DSM20137, NCIB10337	Asetik asit, Sitrik asit, Glikoz, Gliserol, Süksinik asit	PHB, mcl-PHA
<i>Corynebacterium hydrocarboxydans</i>	ATCC21767	Asetat, Glikoz	3HB, 3HV
<i>Caulobacter crescentus</i>		Glikoz, Caulobacter medium	PHB
<i>Culobacter vibrioides</i>	DSM4727	Glikoz	P3HB
<i>Cupriavidus necator</i> H16	ATCC 17699 DSM428 KCTC22496 NCIM10442 DSM518 ATCC17697, DSM531 CECT4623, KCTC2649, NCIMB11599 DSM545	Fruktz, Glikoz, 4-hidroksihegzanoik asit, Mısır yağı, Oleik asit, Zeytin yağı, Palm yağı, Asetat, Bütirat, Laktik asit, Propanoik asit, CO2 4-Hidroksihegzanoik asit 4-hidroksihegzanoik asit, CO2 Glikoz, Patates nişastası, sakkaritlenmiş atık Şeker kamışı	P3HB P3HB P3HB, P3HV P3HB P3HB P3HB P3HB P3HB P3HB P3HB P3HB P3HB
<i>Holomonas boliviensis</i> LCI	ATCC BAA-759, DSM 15516	Glikoz, Propionik asit, Atık gliserol Hidrolizlenmiş nişasta	P3HB3HV P3HB P3HB
<i>Hydrogenophaga pseudoflova</i>	ATCC33668, DSM1034	Maltoz, Maltotetroz, Maltoheksoz Laktöz, Sükroz, Hidrolize kesilmiş süt suyu ve Valerat	PHB P3HB3HV
<i>Klebsiella aerogenes</i> rekombinant		Şeker kamışı	PHB
<i>Legionella pneumophila</i>		Nutrient broth	PHB
<i>Lyciobacillus sphaericus</i> GBS1		Glikoz	scl-PHA

**Tablo 2.2. (Devam) Farklı bakteriler ve arkealar tarafından üretilen polihidroksialkanoatlar (Reddy vd., 2003; Verlinden vd., 2007; Urtuvia, 2014; Tan vd., 2014; Raza vd., 2018)**

<i>Methylobacterium extorquens</i>	ATCC55366, ATCC8457, DSM1340, NCIB2879, NCTC2879	Metanol	P3HB
<i>Methylocystis sp. GB25</i>	DSM7674	Metan	P3HB
<i>Microlunatus phosphovorius</i>	DSM10555, JCM9379	Glikoz, Asetat	3HB, 3HV
<i>Nocardia lucida</i>	NCIMB10980	Asetat, Süksinat	3HB, 3HV
<i>Novosphingobium nitrogenifigens Y88</i>	DSM19370, ICMP16470	Glikoz	P3HB
<i>Paracoccus denitrificans</i>	ATCC17741, DSN413	n-Pentanol	P3HV
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NCIM2948	Glikoz, oleik asit, yağ asidi, kızartma yağı	mcl-PHAs
<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i>	ATCC47085	Şeker kamışı, fruktoz, glikoz, gliserol, sükröz	P3HB
<i>Pseudomonas frederiksbergensis G023</i>	NCIMB41539	polietilen pirolizinden yağ ve yapıştırıcı ürünleri	mcl-PHA
<i>Pseudomonas marginalis</i>	DSM50276	Polietilen tereftalat pirolizinden tereftalik asit	mcl-PHA
<i>Pseudomonas mendocina</i>	ATCC25411, DSM50017	1,3-Bütandiol, Oktanoat	scl-mcl-PHA, mcl-PHA
<i>Pseudomonas nitroreducens AS 1.2343</i>		1,3-Bütandiol, Oktanoat	scl-mcl-PHA
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	ATCC8062, DSM1045	Linolenik asit	mcl-PHA
<i>Pseudomonas putida</i>		Oktanoik asit	mcl-PHAs
<i>Pseudomonas putida CA-3</i>	NCIMB41162	4-Hegzanoik asit	scl-mcl-PHA
<i>Pseudomonas putida GO19</i>	NCIMB41537	Glikoz, Oktanoik asit, Andekenoik asit	mcl-PHAs
<i>Pseudomonas putida GPo1</i>	ATCC29347	Palm yağı, Lauric asit, Miristik asit	PHA
<i>Pseudomonas putida KT2440</i>	ATCC47054	Polistren pirolizinden stiren	mcl-PHA
<i>Pseudomonas putida F1</i>	ATCC70007, DSM6899	Polietilen tereftalat pirolizinden tereftalik asit	mcl-PHA
<i>Pseudomonas putida mt-2</i>	NCIMB10432	Alkenler, n-alkenler	mcl-PHA
<i>Pseudomonas resinovorans</i>	NRRLB-2649	n-Alkanoatlar	scl-mcl-PHA, mcl-PHA
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		Nonaik asit, 4-Hidroksihegzanoik asit, Glikoz	mcl-PHA
<i>Ralstonia europaea H16</i>	NCIMB40126	Benzen, Etilbenzen, Toluen	mcl-PHA
<i>Rhizobium meliloti, R. viciae</i>		Toluen, p-ksilen, Asetik asit, Sitrik asit,	mcl-PHA
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>		Gliserol, Oktanoik asit, Pentanoik asit, Süksinik asit	
<i>Spirulina platensis (cyanobacterium)</i>		Trigliserit	mcl-PHA
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		Glikoz, Soya fasulyesi	
<i>Streptomyces spp.</i>		Glikoz	PHB
<i>Thermus thermophilus HB8</i>	ATCC27634, DSM579	Fruktoz	PHV
		Asetik asit	
		Valerik asit	
		Asetat, 2-alkenoat, 1,4-Bütandiol, 5-kloroalerat,	P3HB3HV
		Fruktoz, Glikoz, Hekzanoat, 4-Hidroksibütirat,	
		Laktat, Şeker kamışı, Süksinat, Valerat	
		Glikoz, Sükröz, Galaktoz, Mannitol	PHB
		Asetat, Malat, Fumarat, Süksinat,	PHB, PHV
		Propionat, Malonat, Glukonoat	
		Karbondioksit	PHB
		Malt, Soya atığı, Süt atığı, sirke atığı, susam yağı	
		Glikoz	P3HB
		Kesilmiş süt suyu	scl-mcl-PHA

#### Arkea

<i>Haloferax mediterranei</i>	ATCC33500, CCM3361, DSM1411	Vinaz, Hidrolizlenmiş kesilmiş süt suyu,	P3HB3HV
		Biyodizel ürünlerden gliserol ve ham gliserol	
Çeşitli arkeal suş		Fruktoz, Glikoz, Gliserol	P3HB, P3HB3HV
<i>Haloferax mediterranei</i>	ATCC33500, CCM3361, DSM1411	Vinaz, Hidrolizlenmiş kesilmiş süt suyu,	P3HB3HV
		Biyodizel ürünlerden gliserol ve ham gliserol	
Çeşitli arkeal suş		Fruktoz, Glikoz, Gliserol	P3HB, P3HB3HV

### 2.3.3. PHA üretiminde fermantasyon mekanizmaları

Hedeflenen PHA'nın üretimi için uygun mikroorganizma ve besiyeri seçildikten sonraki en önemli aşama fermantasyon koşullarının iyi belirlenmesidir. Birçok PHA fermantasyonu iki aşamada gerçekleştirilir. *A. Lotus* türü ise tek aşamalı fermantasyon kültüründe PHA üretebilmektedir (Grothe vd., 1999). İki aşamalı kültürlerde amaç, ilk aşamada yüksek hücre yoğunluğuna sahip kültürü üretmek ve daha sonra genellikle besin sınırlayıcı bir fermantasyon olan ikinci aşamada PHA'ların konsantrasyonunu arttırmaktır (Grothe vd., 1999; Keshavarz vd., 2010). İkinci aşamada kullanılan besin sınırlayıcı büyüme koşulların değiştirilmesi ile istenilen ağırlıkta ve yapılarda PHA elde edilebilir (Bhagyashri vd., 2017).

Fermantasyon koşulları mikroorganizmanın ihtiyaçlarına bağlıdır ve biyopresesin verimliliğini büyük ölçüde etkiler (Grothe vd.,199). Düşük çalkalama hızında genellikle 30-37 °C 'lik bir sıcaklık aralığında inkübasyon yapılır. pH hem kontrolsüz bırakılarak hem de substrat (örn., Glikoz, Sükroz) ilavesine bağlanarak düzenlenmiştir. Elde edilmesi hedeflenen PHA için en etkili fermantasyon koşullarını geliştirmek için kapsamlı ve detaylı optimizasyon çalışmaları yapılarak uygun koşullar sağlanmalıdır. Farklı karbon kaynakları, farklı sınırlayıcı besin maddeleri (örneğin azot, fosfat, oksijen), farklı beslenme rejimleri ve farklı seyreltme oranları, farklı sıcaklıklar ve çalkalama hızları araştırılmıştır. (Keshavarz vd., 2010).

### 2.3.4. Polihidroksialkanoatların biyodegradasyonu

Bağların ayrılması ve sonrasında kimyasal dönüşümler (homojenlikte yapısal oluşum) ile sonuçlanan kimyasal, fiziksel veya biyolojik reaksiyonlar nedeniyle polimer özelliklerinde değişikliklere neden olan işlemler (işlevsellikte bozulma) polimerin degradasyonu olarak adlandırılır (Shah vd., 2008). PHA havada kararlı, inert, neme dirençli ve suda çözünmez niteliktedir. Aerobik koşullar altında suya ve karbondioksite, toprak, deniz, göl suyu ve kanalizasyondaki mikroorganizmalar tarafından anaerobik koşullar altında metan ve karbondioksite tamamen indirgenebilirler (Anjum vd., 2016; Philip vd., 2007).

Polihidroksialkanoatların biyodegradasyonu hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılır. Hücre içi bozulma veya mobilizasyon, bakterinin karbon sınırlama koşulları altında strese girmesi durumunda gerçekleşir. Hücrelerdeki biriken PHA granülleri, karbon ve enerji kaynakları olarak hidrolize edilir (Ong vd., 2017). Hücre içi parçalanma

sırasında, hücredeki PHA depolimeraz, P(3HB)'yi parçalayıp 3-hidroksibütirik asit oluşturur. Bir dehidrojenaz, ikincisine etki eder ve onu asetil asetata okside eder ve bir  $\beta$ -ketotiyolaz asetilasetata asetil-CoA'ya bölmek için etki eder. B-ketotiyolaz enzimi hem biyosentetik hem de biyolojik parçalanma yollarında önemli bir rol oynamaktadır. Aerobik koşullar altında asetil-CoA, sitrik asit döngüsüne girer ve CO<sub>2</sub>'ye oksitlenir. Hücre içi depolimerazlar hakkında her zaman P(3HB) granüllerine sıkı sıkıya bağlı oldukları için çok az şey bilinmektedir ve genel işlem çok karmaşıktır (Philip vd., 2007).

Hücre dışı depolimerazlar, kısmen kristalize P(3HB)'yi hidrolize etme kabiliyetine sahip olup, C terminalinden N-terminaline doğru, sinyal peptidi (22-58 amino asit) ve üç fonksiyonel alan olan katalitik alan (320-400 amino asit), bağlayıcı alan (50-100 amino asit) ve substrat bağlanma alanından (40-60 amino asit) oluşur (Ong vd., 2017). Mikroorganizmalar tarafından üretilen hücre dışı PHA depolimerazlar, polimerleri indirgeyerek, organizmalar tarafından bir karbon kaynağı olarak kullanılabilir, suda çözünür oligomerlere ve monomere dönüştürürler. Bu monomerler hücre duvarlarından emilerek hücre içerisine alınır (Philip vd., 2007; Anjum vd., 2016). PHA, depolimerize edildiğinde oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır. (Mercan vd., 2004). Termal yöntemlerle veya biyolojik bir sistemde, PHA'lar, biyolojik dokular enzimatik olmayan veya enzimatik hidrolizle degrade edilebilir (Anjum vd., 2016).

Çevredeki biyolojik bozunma PHA'ların biyolojik bozunum çalışmalarında bir prototip olarak ele alınmıştır. Çevredeki *Pseudonocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Thermomonosporaceae*, *Streptosporangiaceae* ve *Streptomyetaceae* familyalarına ait mikroorganizmalar baskın olarak P(3HB)'yi parçalamaktadır. Buna ek olarak, çoğu PHA üreten bakteri, polimeri hücrelerarası olarak indirgeyebilir. (Philip vd., 2007). PHA'nın biyolojik olarak parçalanması monomer kompozisyonu, kristallik, katkı maddeleri ve yüzey özellikleri gibi PHA materyalleri ile ilgili olanlar ve sıcaklık, nem, pH, besin isteği gibi çevresel koşullara ve bakteri, fungus ve yüksek yapılı organizmalar gibi biyolojik faktörlere bağlıdır (Reddy vd., 2003; Mercan vd., 2004; Philip vd., 2007).

Yapılan çalışmalara dayanarak, PHA bozulmasının çok fazlı olduğu belirlenmiştir. İlk birkaç hafta, amorf bölgeler rastgele bölünmeyle aşınır. Birkaç hafta boyunca, polimer zincirleri bozulur ve polimerin kristallliği artar (Philip vd., 2007). PHB'nin yıkım hızı

birkaç aydan (anaerobik), birkaç yıla (denizsu) kadar olabilmektedir (Mercan vd., 2004).

PHA granüllerinin degradasyonunun düzenlenmesi için kesin bir anlayış henüz yoktur. PHA sentezinin ve degradasyonunun eşzamanlı olduğunu veya hızlı bir şekilde polimeraz ve depolimeraz aktivitesinin değiştiği savunulmaktadır (Zinn vd., 2001).

### **2.3.5. Polihidroksialkanoatların ekstraksiyon yöntemleri**

PHA'lar, suda çözünmeyen inklüzyonlar olarak çeşitli organizmalar ve bitkiler tarafından biriktirilir (Zinn vd., 2001; Rai, 2010). Bu nedenle, PHA'ların ekstraksiyonu tüm PHA üretim döngüsünde çok önemli bir adımdır. Kullanılan ekstraksiyon yöntemi, ekstrakte edilmiş PHA'ların verimi, moleküler ağırlığı, termal işlenebilirliği ve polimerin farmakolojik saflığı üzerinde ciddi bir öneme sahiptir (Rai, 2010).

Lipopolisakarit (LPS), PHA'larla birlikte ekstre edilen gram negatif bakteri hücre duvarının ana bileşenidir. LPS, doğada pirojeniktir ve bu nedenle kullanılan ekstraksiyon yöntemleri, PHA'ların çıkarılmasına ek olarak bu kirletici olan LPS'yi de uzaklaştırmalıdır (Rai, 2010).

Fermentasyondan sonra, PHA'ların hücrelerden ayrılması için öncelikle santrifüjleme, filtreleme veya flokülasyon santrifüjlemesi gibi ön işlemlerle biyokütlenin toplanması gerekmektedir. Bazı araştırmacılar biyokütlenin toplanmasına gerek kalmadan PHA'nın geri kazanım prosesini geliştirerek maliyeti düşürmüşlerdir (Kourmentza vd., 2017). Hücre çeperinin ve zarfının zayıflamasını kolaylaştırarak PHA granüllerinin geri kazanımını sağlayan fiziksel, kimyasal veya biyolojik ön muameleler yapılabilmektedir (Madkour vd., 2013). Bu işlemler; sıcaklık (Koning vd., 1997), HCl (Alakomi vd., 2000), NaOH (Mohammadi vd., 2012), ısı şoku (Güngörmedi vd., 2014) gibi uygulamalardır (Kourmentza vd., 2017). Ön muamele için kullanılan yöntemler her bir mikroorganizmada farklılık göstermektedir (Madkour vd., 2013, Kourmentza vd., 2017). Liyofilizasyon işlemi en ilgi çekenidir ancak teknik ve ekonomik zorluklara sahip olması sebebiyle endüstriyel uygulamalarda kullanılmaları sorun oluşturmaktadır. PHA'nın geri kazanımında hücrenin kurutulmadan direk besiyerindeki ıslak biyokütlenin kullanıldığı kimyasal ve fiziksel yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri veya birkaçı birlikte kullanılabilir. Bunlardan kimyasal yöntem olarak; Sodyum

hipoklorit ile hücre membranının parçalanmadan önce NaCl ile ön muamelesi yapılarak PHA'nın saflığı ve veriminde artış sağlanmıştır (Kourmentza vd., 2017).

Hücre membranı zayıflatılan hücrelerden çözücü ekstraksiyonu ile PHA'nın çözülmesi veya PHA granüllerini bir bütün şekilde elde edebilmek için toplanan hücrelerden PHA olmayan biyokütlenin uzaklaştırılması için çeşitli ekstraksiyon yöntemleri uygulanır (Rai, 2010; Madkour vd., 2013).

PHA'nın geri kazanımında uygulanan ön muamele işlemlerinin amacı hücre bozunmasına yardımcı olmaktır (Jacquel vd., 2008). Bu işlemler endüstriyel uygulamalar için maliyeti düşürürken, verimi ve saflığı arttırdığı için kullanışlıdır ancak kullanılacak ön muamele yöntemi her analiz için kullanılacak bakteriyel suş, fermantasyon koşulları ve PHA'nın ileri uygulamalardaki kullanımlarına göre seçilmeleri gerekmektedir (Kourmentza vd., 2017). Daha yüksek saflıkta ürün elde edebilmek için işleme saflaştırma adımı eklenebilir (Jacquel vd., 2008).

#### **2.3.5.1. Solvent ekstraksiyonu**

Solvent ekstraksiyonu yöntemi, hücre biyokütlesinden PHA'nın geri kazanılması için en eski ve yaygın yöntemdir (Tablo 2.3). İlk defa 1920'de Lemoigine tarafından *Bacillus* suşundan PHB elde etmek için kullanılan yöntem sadeliği ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle rutin olarak kullanılmaktadır (Rai, 2010; Madkour vd., 2013).

Tüm solvent ekstraksiyon yöntemlerinin temeli PHA'nın suda çözünmez olup sadece belirli organik çözücüde çözünebildiği mantığına dayalıdır (Madkour vd., 2001). Bu yöntem öncelikle hücre membranının geçirgenliğinin düzenlenmesi ve daha sonra PHA granüllerinin çözünmesini içeren iki basamaktan oluşur (Jacquel vd., 2008). Bu çözücüler içinde ekstraksiyondan sonra, hücre kalıntıları polimer çözeltisinden uzaklaştırmak için süzülür, konsantre edilir ve daha sonra, güçlü çalkalama ile metanol veya etanol gibi soğutulmuş maddeler kullanılarak PHA çökeltir (Rai, 2010).

PHA'nın eldesinde iki farklı solvent kullanılır. PHA'nın klorlu hidrokarbonlar, yani kloroform, 1,2-dikloroetan, metilen klorür gibi çözücülerle veya etilen karbonat ve 1,2-propilen karbonat gibi bazı siklik karbonatlarla ekstraksiyonu sağlanır. Aseton gibi ketonlar, özellikle mcl-PHA'nın ekstraksiyonu için en belirgin çözücülerdir. PHA'nın çökeltilmesi ise genellikle metanol ve etanol gibi çözücü olmayan maddeler tarafından indüklenir. (Kunasundari vd., 2011; Madkour vd., 2013).

Solvent ekstraksiyonu, verimlilik açısından PHA'nın diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre avantajlara sahiptir. Bu yöntem ayrıca bakteriyel endotoksini uzaklaştırılabilir ve polimerlerde ihmal edilebilir bir bozulmaya neden olur. Dolayısıyla, yüksek moleküler ağırlığa sahip saf PHA elde etmek mümkündür (Raza vd., 2018).

Bu yöntemin dezavantajları, çözücü ile birlikte ekstrakte edilen PHA olmayan bileşiklerin, PHA fraksiyonunda kalabilmesidir. Çözücü ekstraksiyon işlemlerinin bir başka dezavantajı, çoğu çözücü için hücrelerin ilk önce kurutulması gerekliliğidir (Madkour vd., 2013). Bu tür ekstraksiyon yöntemleri, yüksek sermaye ve işlemsel maliyetler ve büyük miktarlarda çözücünün gerekli olmasından dolayı endüstriyel olarak kullanımı uygun değildir (Rai, 2010; Kunasundari vd., 2011).

Tüm bunların yanında laboratuvar ölçekli uygulamalar için standartlaştırılmış koşullar altında solvent ekstraksiyonu kullanışlı bir yöntem olup çözücülerin kullanımı, gram negatif bakterilerden elde edilen PHA'daki endotoksin içeriğini azaltır (Madkour vd., 2013).

#### ***2.3.5.2. Sindirim yöntemleri***

Solvent ekstraksiyon teknikleri ile PHA granüllerinin çözünmesi sağlanırken, sindirim yöntemleri PHA granüllerini çevreleyen hücresel materyallerin çözünmesi sağlanır. Sindirim yöntemleri, kimyasal sindirim ve enzimatik sindirim olarak sınıflandırılabilir. (Kunasundari vd., 2011). Yöntemlerin her ikisi de PHA olmayan hücresel kütleyi sindirir (Raza vd., 2018).

Kimyasal sindirim, PHA olmayan hücresel kütlenin (NPCM) çözündürülmesine dayanır ve bunun için sodyum hipoklorit veya yüzey aktif maddeler kullanır (Madkour vd., 2013). Kimyasal sindirimde bilinen üç temel yöntem vardır: Sodyum hidroksit, sodyum hipoklorit ve sodyum dodesil sülfat (Kourmentza vd., 2017). Sodyum hipokloritin güçlü bir oksitleyici olması ve hem hücre membranını parçalarken hem de NPCM'yi sindirmesi PHA geri kazanımını kolaylaştırmak için manipüle edilebilir (Kunasundari vd., 2011; Madkour vd., 2013).

Sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton X-100, palmitoil karnitin, betain gibi bir dizi yüzey aktif maddeler (sümfektan) hücre zarfının lipit tabakasına eklenerek hücreleri parçalarlar. Parçalanma sonucu PHA granülleri hücre debrisinin olduğu sıvıya salınır (Jacquel vd., 2008; Kunasundari vd., 2011).

Asidik ve alkalın sindirim, protonlar tarafından PHA olmayan hücre kütlelerinin seçici çözünmesidir. Bu yöntem ile PHA olmayan hücre bileşenlerinin protonlar tarafından çözünmesi ve PHA'nın kristalleştirilmesi esasına dayanır (Jacquel vd., 2008).

Enzimatik sindirim ile hücre duvarının enzimler kullanılarak sindirimi hedeflenir (Kourmentza vd., 2017). Bugüne kadar, proteazlar, nükleazlar, lizozim ve lipazlar gibi bazı enzim türleri, proteinler ve bakteriyel hücre kütlelerinin diğer polimerlerin üzerinde yüksek hidrolitik etkiler gösterirler ve hücre lizizi başlatırlar, fakat PHA üzerinde hiç etkisi yoktur veya yalnızca küçük etkileri vardır. (Kunasundari vd., 2011).

Farklı çalışma grupları olan Jacquel ve arkadaşlarının 2008'de, Kathiraser ve arkadaşlarının 2007'de yaptıkları çalışmalar ile enzimatik uygulamanın PHA'nın ekstraksiyonunda kullanılabilecek önemli bir yol olduğu gösterilmiştir.

Enzimatik sindirim, çalışma koşullarının basit olması ile kullanımı caziptir. Enzimler katalize ettikleri reaksiyonlara göre çok spesifik olduklarından, PHA'nın yüksek saflıkta geri kazanımı beklenir. Bununla birlikte, enzimlerin yüksek maliyeti ve geri kazanım sürecinin karmaşıklığı ve ölçek büyütülmesindeki zorluklar avantajlarından daha ağır basmaktadır (Kunasundari vd., 2011).

#### **2.3.5.3. Mekanik bozulma**

Mekanik hücre bozulması, hücre içi proteinleri serbest bırakmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriyel hücrelerden PHA'yı geri kazanmak için test edilmiştir. Çeşitli mekanik bozulma yöntemleri arasında, tane öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon, farmasötik ve biyoteknoloji endüstrilerinde büyük ölçekli çalışmalarda hücre bozulmasını sağlar. Diğer geri kazanım yöntemlerinden farklı olarak, mekanik bozulma esas olarak ürünlere hafif zarar verdiğinden tercih edilmektedir. Hücrelerin mekanik bozulması, herhangi bir kimyasal içermez, bu nedenle ürünün kirlenmesi ve çevre kirliliğini en aza indirir. Ancak yüksek sermaye gereksinimi, işlem süresinin uzunluğu ve ölçümdeki güçlükler endüstriyel anlamda kullanılmasını sınırlandırmaktadır (Jacquel vd., 2008; Madkour vd., 2013).

Tane öğütücü, çalkalama için değişken hızlı rotor ile eş merkezli bir silindire sahip dikey bir öğütme haznesine sahiptir. Hücre karışımı değirmenlerin en tabanından girer, rotor ve stator arasındaki dairesel boşluklardan yukarıya doğru akarak üstten çıkar. Hücre bozulma derecesi; kalma süresi dağılımı (RTD), kesme kuvvetleri, mikroorganizma

türleri, hücre konsantrasyonu, süspansiyonun besleme hızı, karıştırıcı hızı, öğütme haznesinin geometrisi ve karıştırıcının tasarımı gibi çok sayıda parametreye de bağlıdır. Bu işlem sırasında açığa çıkan ısının kontrol altında tutulması için yeterli soğutma yapılmalıdır (Jacquel vd., 2008; Kunasundari vd., 2011).

Yüksek basınçlı homojenizasyonda hücre karışımının yüksek basınç altında iki paralel yarıktan zorlayan hava tahrikli bir pozitif yer değiştirme pompasından ibarettir. Proses parametreleri, hücre bozulmasını etkileyen tek faktör değildir, ancak mikrobiyal fizyolojik parametreler, hücre konsantrasyonunun yanı sıra mikroorganizmaların tip ve büyüme fazı da bozulma verimliliğini etkiler. Yüksek basınçlı homojenizasyon ile ilgili dezavantajlar arasında, elde edilmesi istenen ürünlerin ısıl degradasyonuna yol açabilmesi veya PHA granüllerinin daha sonraki aşağı işlemine müdahale edebilecek ince hücresel kalıntı oluşması olasılığı bulunmaktadır (Madkour vd., 2013).

Ultrasonikasyon yönteminde, hücre sağ kalım fraksiyonunu, akustik gücü, boyut bozulma endeksi ve çalışma süresini birbirine bağlayan teorik bir model oluşturulmuştur. Ultrasonikasyondan sonra, hücreler santrifüjleme ile izole edilir (Jacquel vd., 2008). Genel olarak, sonikasyon küçük laboratuvar ölçeğinde büyük endüstriyel ölçekte olduğundan daha iyi uygulanabilir (Madkour vd., 2013).

Süperkritik sıvılar (SCF), PHA geri kazanımı alanlarında potansiyel bir ekstraksiyon tekniği olarak ortaya çıkmıştır. Yüksek yoğunluk ve düşük viskozite gibi SCF'nin eşsiz fizikokimyasal özellikleri bunları uygun ekstraksiyon çözücüleri yapmaktadır. Süperkritik-karbondioksit (SC-CO<sub>2</sub>), düşük toksisitesi ve reaktivitesi, orta hassaslıkta sıcaklık ve basıncı (31 ° C ve 73 atm), bulunabilirlik, düşük maliyet ve yanmazlık özellikleriyle en yaygın kullanılan SCF'dir (Jacquel vd., 2008).

Bu yöntemlere ek olarak, *hücre kırılabilirliği, yüzdürme, sulu iki fazlı sistem (ATPS), gama ışını, hava sınıflandırması ve çözünmüş hava flotasyonu* gibi yöntemler de PHA'ların elde edilmesi için kullanılmaktadır. Tablo 2.3'de PHA'ların eldesi için kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin kullanım yerleri ve uygunlukları hakkında genel bilgi verilmiştir.

**Tablo 2.3.** PHA'nın ekstraksiyon yöntemleri avantaj ve dezavantajları (Kunasundari vd., 2011; Madkour vd., 2013)

	<b>Avantaj</b>	<b>Dezavantaj</b>
<b>Solvent Ekstraksiyonu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Endotoksin uzaklaştırılması</li> <li>• Tıbbi uygulamalar için kullanılması</li> <li>• Yüksek saflık ve verimlilik</li> <li>• Polimer için sınırlı bozunma</li> <li>• Yüksek moleküler ağırlık</li> <li>• Hızlı sonuç verir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çevre dostu değil</li> <li>• Toksik ve uçucu çözücülerin fazla tüketimi</li> <li>• %5'den fazla PHB içeren solüsyonlardan PHA çıkarma zorluğu</li> <li>• Küçük hacimde uzun sürede çalışma</li> <li>• Polimer zincirinin sırası bozulabilir</li> <li>• PHA'da kirlilik</li> </ul>
<b>Kimyasal sindirim</b>		
<b>Sülfektan</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çıkarılan PHA ojeinal ağırlığını korur</li> <li>• PHA granüllerinde polimer zincirin doğal düzeni korunur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PHA'nın saflığı düşüktür</li> <li>• Atıktan sülfektanları çıkartmak için işlemler gereklidir</li> </ul>
<b>Sodyum Hipoklorit</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PHA yüksek saflıkta ve büyük ölçekte elde edilebilir</li> <li>• Kurutulmayan örnekten PHA eldesi sağlanır</li> <li>• Kurutulmadığı için maliyeti düşüktür</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipokloritin PHA'yı parçalaması nedeni ile PHA'nın moleküler ağırlığı düşer</li> </ul>
<b>Ardışık Sülfektan-Hipoklorit</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PHA'nın kalitesi yüksektir</li> <li>• Hızlı geri kazanım ve basit süreç</li> <li>• PHA granüllerinde polimer zincirlerinin doğal düzeni korunur</li> <li>• Solvent ekstraksiyonundan kıyasla maliyeti düşüktür</li> <li>• Kültür ortamında direk polimer eldesi sağlanır</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sülfektan ve sodyum hipokloritin birlikte maliyeti</li> <li>• Kalıntı sülfektanların uzaklaştırılması için atık su arıtması gerekli</li> </ul>
<b>Sülfektan şelat</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uygun kullanım</li> <li>• Yüksek kaliteli ürün</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fazla miktarda atık su üretimi</li> </ul>
<b>Solvent ekstraksiyonu ve Sodyum Hipoklorit dispersiyonu</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PHA'nın yüksek saflıkta eldesi</li> <li>• Sodyum hipoklorit ile polimer olmayan hücrel materyalin sindirime bağlı olarak çözücünün azaltılmış vizkozitesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çevre dostu değil</li> <li>• Fazla miktarda toksik ve uçucu çözücü tüketimi</li> <li>• Yüksek geri kazanım maliyeti</li> </ul>
<b>Protonlar ile NPCM'nin seçici çözünmesi</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük işletme maliyeti</li> <li>• Daha yüksek geri kazanım</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proses parametreleri sıkı kontrol edilmezse moleküler ağırlıkta ciddi azalma</li> </ul>
<b>Enzimatik sindirim</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hafif çalışma koşulları</li> <li>• Yüksek kalite ile fazla geri kazanım</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Karmaşık süreç</li> <li>• Enzimin yüksek maliyeti</li> </ul>
<b>Mekanik Parçalanma</b>		
<b>Tanecik öğütme</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiçbir kimyasal kullanılmaz</li> <li>• Daha az kirlilik</li> <li>• Tıkanmaya duyarlı değil</li> <li>• PHA granüllerinin mikronizasyonu yok</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etkili soğutma gerekli</li> <li>• Anlamlı geri kazanım için birkaç işlem gerekir</li> <li>• Uzun işlem süreci</li> <li>• Çeşitli işlem parametreleri hassas şekilde kontrol edilmeli</li> </ul>

**Tablo 2.3. (Devam)** PHA'nın ekstraksiyon yöntemleri avantaj ve dezavantajları (Kunasundari vd., 2011; Madkour vd., 2013)

Yüksek basınçlı homojenizasyon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiçbir kimyasal kullanılmaz</li> <li>• Daha az kirlilik</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PHA granüllerinin şiddetli mikronizasyonu</li> <li>• Hem süreç hem de mikrobik fizyolojik parametrelere bağlıdır.</li> <li>• İstenilen ürünlerin termal bozunması</li> <li>• Aşağı işleme müdahale eden hücre kalıntılarının oluşumu</li> </ul>
<b>Süperkritik sıvı (SCF)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Basit</li> <li>• Ucuz</li> <li>• Hızlı</li> <li>• Çevre dostu</li> <li>• Düşük toksisite ve reaktivite</li> <li>• Ekipman ve iş gücü azdır</li> <li>• Verim kaybı azdır</li> <li>• Enzim inaktivasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proses parametrelerine bağlı</li> <li>• Polar analitlerin çıkarılması zordur</li> <li>• Doğal numune ile ilgilenmede zorluklar</li> <li>• Proses optimizasyonu için değişen basınç ve sıcaklıkta biyomoleküllerin çözünürlüğünün ölçümü ve tayin zorluğu</li> <li>• Temizlik sıklığı önemlidir</li> </ul>
<u>SCF Tipleri</u>		
Karbondioksit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük toksisite ve reaktivite</li> <li>• Kritik sıcaklık ve basınç</li> <li>• Kullanılabilirlik</li> <li>• Düşük maliyet</li> <li>• Yanıcı değildir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük dielektrik sabiti</li> </ul>
Amonyak	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Karbondioksitten daha iyi solvent mukavemeti</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pompolamada zorluk</li> <li>• Kimyasal reaktif</li> <li>• Rutin kullanım için tehlikeli</li> </ul>
Metanol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• İyi bir çözüdür</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek kritik sıcaklık</li> <li>• Oda sıcaklığında sıvı olması nedeniyle ekstraksiyonda zorluk</li> </ul>
<b>Sulu iki fazlı sistem (ATPS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• İşlem süresi kısa</li> <li>• Malzeme maliyeti düşük</li> <li>• Enerji tüketimi düşük</li> <li>• Çözünürlüğü iyi</li> <li>• Verim yüksek</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proses parametrelerine bağlı</li> <li>• Tekrarlanabilirlik sorunu</li> <li>• ATPS'yi bench ölçeğinde değerlendirmede ticari kit olmaması</li> <li>• Mekanizmanın yanlış anlaşılması</li> </ul>
<b>Gama ışını</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük çapraz bağlanma derecesine bağlı solvent çözünürlüğünün tutulması</li> <li>• Kimyasal kullanılmaz</li> <li>• Kirlenme azdır</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Işınlanma süresi uzunluğu</li> <li>• Başlangıç yatırımı maliyeti yüksek</li> </ul>
<b>Yüksek basınçlı homojenizasyon</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek biyokütle eldesi</li> <li>• Büyük ölçekli uygulamada kullanılabilir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Düşük biyokütle konsantrasyonunda parçalanma azdır</li> </ul>
<b>Ultrasonikasyon</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yüksek oranda saf eldesi için diğer yöntemlerle kombinasyonu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Büyük ölçeğe uygulaması zor</li> </ul>
<b>PHA'nın spontene salınması</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kimyasal kullanımı gerekmez</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetik olarak düzenlenen suşlar gerekir.</li> </ul>

#### 2.4. *Pseudomonas mendocina* Özellikleri ve PHA Üretimi

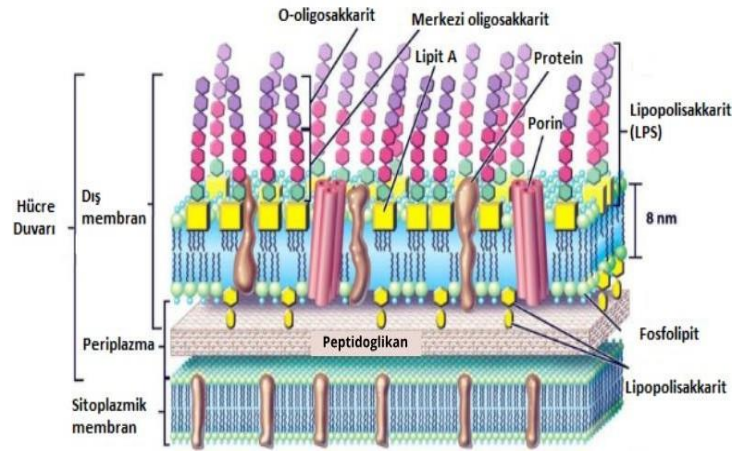
*Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas stutzeri* türlerini karakterize etmek için çalışan araştırmacılar tarafından ilk olarak 1969 yılında keşfedilen gram negatif, polar monotrik kamçılı, aerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir. Orijinal olarak *P. stutzeri* olduğu varsayılan örnekler Mendoza, Arjantin’de toplanmıştır. Bunlar, nişasta veya maltozun karbon kaynağı olarak kullanılmamasından dolayı yeni bir tür olarak belirlenmiştir. *P. mendocina*, *Pseudomonas* cinsinin diğer üyelerinden morfolojik farklılıklara sahiptir. Kolonilerin morfolojileri Palleroni ve arkadaşları tarafından “düz, pürüzsüz, şeffaf, ve kahverengimsi sarı renk” olarak belirtilmiştir ve bu sarı pigmentasyon daha sonra bakteri içinde karotenoid pigmentlerin varlığından kaynaklandığı belirlenmiştir (http-1).

*P. mendocina* çok geniş metabolik çeşitliliğe sahiptir. D-glikoz, D-fruktoz, asetat, malonat, DL-hidroksibutirat, sitrat ve etilen glikol dahil olmak üzere farklı ortamlarda çeşitlilik gösterebilir. Bazı nadir suşlar, tek karbon kaynağı olarak fensiklidin gibi karmaşık molekülleri kullanabilirler (http-1).

*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Pasteurellaceae*, and *Vibrionaceae* gibi gram negatif bakterilerin dış zarı, makromoleküllerin (bakteriyosin veya enzimler gibi) ve hidrofobik maddeleri tutabilen etkin bir bariyer görevi görür (Raetz vd., 2002; Magalhães vd., 2007). Dış membrandaki geçirgenlik farklılığı gözeneklerin özelliklerinden kaynaklandığı düşünülür (Zgurskaya vd., 2015). Ancak dış membranın geçirgenlik bariyeri özelliği büyük ölçüde membran yüzeyinde bir endotoksin olan lipopolisakkarit (LPS) tabakasından kaynaklanır (Alakomo vd., 2000; Magalhães vd., 2007; Zgurskaya vd., 2015).

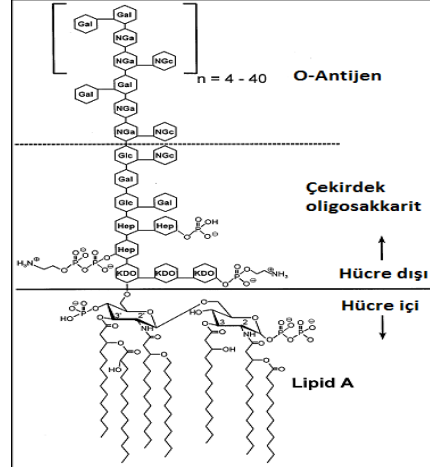
Gram negatif bakterilerin membran yapısı Şekil 2.10’da görüldüğü gibi kompleks yapıdadır.

Tipik LPS, N- ve O-açillenmiş diglukozamin bifosfat omurgasını içeren bazik bir lipit A (LipA) ve buna kovalent olarak bağlanan dışarı doğru çıkıntı yapan ve bir hidrofilik polisakkarit zincirinden ve O-antijen bölgesinden oluşur (Şekil 2.11) (Alakomo vd., 2000; Magalhães vd., 2007; Zgurskaya vd., 2015).



Şekil 2.10. Gram negatif bakterinin iç ve dış zarlarının moleküler modeli (<http://2>)

Toksisite, lipit bileşeniyle (Lipid A) ilişkilidir ve immünojenisite, polisakkarid bileşenleriyle ilişkilidir. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarı antijenleri (O antijenleri) LPS'nin bileşenleridir (Todar, 2008-2012).

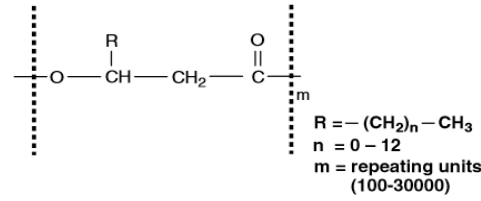


Şekil 2.11. *E. coli* endotoksinin kimyasal yapısı. (Hep) *L-glisero-D-manno-heptoz*; (Gal) "galaktoz; (Glc) glikoz; (KDO) *2-keto-3-deoksikotonic asit*; (NGa) *N-asetil-galaktosamin*; (NGc) *N-asetil-glukosamin* (Magalhães vd., 2007)

Lipopolisakkaritin dış membrandan salınan ya da zar içerisindeki interkalatı serbest bırakan belirli dış etkenler, dış membranının bütünlüğünü ortadan kaldıracaktır. Permeabilizer denen bu ajanlarla her iki durumda da membran geçirgenliğinde eş zamanlı bozunmaya neden olur (Alakomo vd., 2000). Magnezyum iyonları, lipit A'nın fosforil kısımları ve çekirdeğe iyonik bağ tabakası oluşturur ve çift tabakalardaki LPS

moleküllerini stabilize eder. Ayrıca LPS, membran-su arayüzlerinde hidrasyon profilini değiştirebilir. LPS'ye bağlı hidrasyon ve elektrostatik profillerdeki değişiklikler, gömülü proteinleri etkileyebilir ve protein-protein etkileşimlerini değiştirebilir (Zgurskaya vd., 2015). Permeabilizerların, gram negatif hücrelere bakterisidal veya bakteriostatik olması gerekmez, ancak diğer bileşiklerin nüfuz etmesine izin verilerek, hidrofobik antibiyotiklere, deterjanlara, lizozim veya bakteriyosinlere karşı artan bir duyarlılık sağlamalıdır (Alakomo ve ark. 2000).

*P. mendocina*, mcl-PHA'ların üretimi için yoğun olarak çalışılmıştır. Organizma, yapısal olarak ilişkili karbon kaynakları, heksanoat, heptanoat, oktanoat ve nonanoat üzerinde ve yapısal olarak ilişkili olmayan karbon kaynakları, glikoz, sükroz ve fruktoz üzerinde geliştirilebilir. Kullanılan besin maddesine göre elde edilen polimer ana yapıdaki tekrarlar ve bağlar ile çeşitlilik gösterir (Şekil 2.12) (Rai, 2010).



Şekil 2.12. PHA moleküler yapısının hidroksialkanoat birimi (Kathiraser vd., 2007)

*Pseudomonas*'ın PHA biyosentez kabiliyetindeki çeşitlilik, bu organizmalarda PHA sentazını kodlayan iki geninin substrat spesifitesindeki farklılığından kaynaklandığı söylenebilir. *P. mendocina*, diğer *Pseudomonas* gibi, PHA sentazını kodlayan iki phaC genine sahiptir. Hein ve arkadaşları PHA üretimi için *PhaCI*'in *P. mendocina*'daki majör sentazı kodladığını ve *PhaC2*'nin yapısal olarak ilişkisiz karbon kaynaklarından mcl monomerlerinin birikmesinde rol oynayan bir enzimi kodladığını tespit etmişlerdir (Rai, 2010).

## 2.5. Polihidroksioktanoatın (PHO) Genel Özellikleri

Polihidroksioktanoatlar hidrofobik yan zincirler içeren biyolojik olarak parçalanabilen orta zincir uzunluğuna sahip polihidroksialkanoatlardır (Renard vd., 2016). İlk olarak heteropolimer üreten mikroorganizmalardan elde edilmiştir. Daha sonra

*Pseudomonas mendocina* suşunda sadece oktanat besiyerinde homopolimer olarak üretildiği bulunmuştur (Rai vd., 2011a).

Oktanoat beslemesinde yetiştirilen bakteri *P. mendocina* kullanılarak oluşturulan polimer P(3HO), cilt dokusu mühendisliği gibi yumuşak doku mühendisliği için uygun elastomerik yapı ve biyouyumluluk gösteren özelliklere sahiptir. P(3HO)'nun son derece esnek yapısı ile vücudun zorlu konturlarında bulunan yara bölgeleri içine uygulanmasını mümkün kılar ve çevredeki dokuları olumsuz bir şekilde etkilemeksizin çok sayıda deformasyona uygulanır ve iyileştirir. Buna ek olarak, biyolojik olarak parçalanabilir doğası gereği, P(3HO), daha sonra çıkarılması için ek cerrahi müdahale gerekmeden sağlıklı hücreler için geçici bir mekanik destek oluşturabilir (Rai vd., 2017). Ancak PHO'nun suda çözünebilmesini gerektiren bazı medikal uygulamalarda kullanılabilmesi için modifiye edilmesi gerekmektedir (Sparks vd., 2008). Taşıdığı pentil yan zincire polar grupların dahil edilmesi gibi farklı modifikasyonlar ile hidrofilik özelliği artırılabilir (Li vd., 2015; Renard vd., 2016).

Elde edilen polimerlerin moleküler ağırlığındaki farklılığın ekstraksiyon metodlarının, polimer zincirlerinde parçalanmaya neden olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum, farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilen polimerin Jel Permeasyon Kromatografisi analizinin yapılmasıyla doğrulanmıştır. Ranjana Rai tarafından P(3HO)'ün PDI değeri 1.76 ile 2.26 arasında bulunmuş olup, daha önce oktanoattan mcl-PHA üretimi için elde edilen değerlerin aralığında olduğu gözlenmiştir. (Rai, 2010).

Hekzan kullanılarak yapılan ekstraksiyon ile P(3HO)'ün en yüksek moleküler ağırlığa sahip,  $5.98 \times 10^5$  Mw,  $2.64 \times 10^5$  Mn, 2.26 PDI değerine sahip olduğu bulunmuştur. Aseton kullanılarak yapılan ekstraksiyon yönteminde elde edilen polimerin Mw değeri  $5.85 \times 10^5$ , Mn değeri  $2.83 \times 10^5$  ve PDI değeri ise 2.06 olarak bulunmuştur (Rai, 2010).

Polimerin termal özellikleri, işlenmesi için çok önemlidir. Bu nedenle, farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstrakte edilen P(3HO)'da morfolojik farklılıkları neden olup olmadığını görmek için farklı termal özelliklerin değişimi ile sonuçlanan çalışmalar yapılmıştır. Farklı metodolojiler kullanılarak ekstrakte edilen P(3HO) için Tg

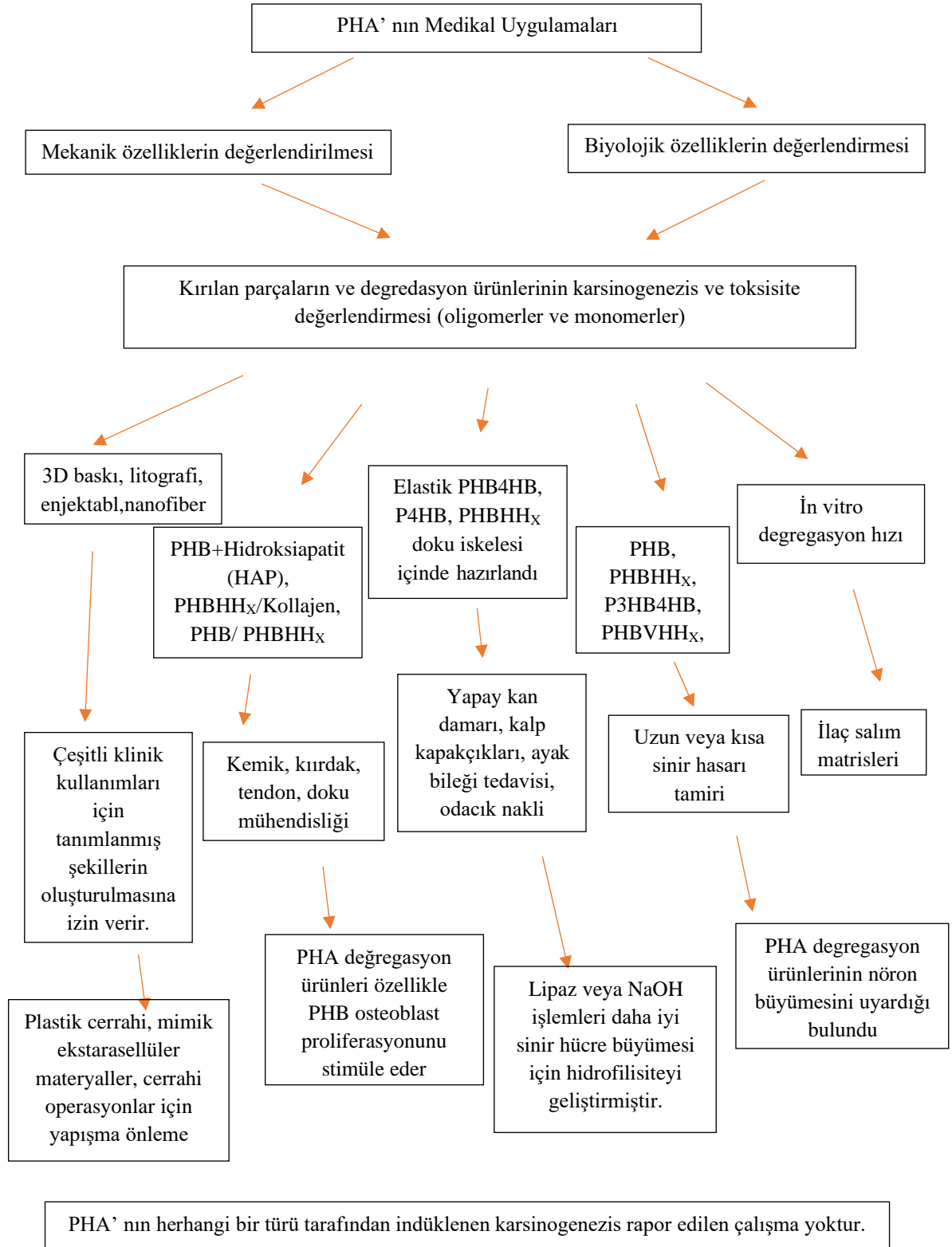
ve Tm değerleri -35.04 °C ile -36.18°C ve 39.21 ile 49.46°C arasında değişmiştir (Rai, 2010).

PHO'nun *in vitro* değregasyonu tam olarak anlaşılamamış olmasına karşın 6 aylık bir sũreęte abiyotik faktœrler ile yıkımının geręekleřtięi bulunmuştur. PHO'nun uzun yan zincirleri nedeni ile PHB'den daha yavaş paręalanma geręekleřtireceęi dũřœnũlmektedir (Marois vd., 2000).

## 2.6. PHA' nın Medikal Uygulamaları

Polihidroksialkanoatların plastik malzeme potansiyeline ilaveten, optik olarak aktif bileşiklerin kimyasal sentezi için kiral prekũrsœr gœrevi gœrebilen stereo dũzenli bileşikler olarak kullanımı da yararlıdır (Anjum vd., 2016). Polihidroksialkanoatların ęeřitli hũcre tipleri ile biyoyumlu olmaları ve biyobozunur œzellięe sahip olmaları, paręalanma ũrũnlerinin doğaya zarar vermemesi ve pizoelektrik œzellikleri ile geniş bir kullanım alanına sahiptir (Şekil 2.13) (Gumel vd., 2012; Raza vd., 2018). PHA'ların yukarıda bahsedilen œzelliklerinin yanında sentetik plastiklerle karşılaştırıldığında dokuda toksisite oluşturmaz. ęũnkũ P3HB kan dolaşımında 0.3 ile 1.3 mM arasında değişen konsantrasyonda ve œkaryorların hũcre zarında doğal olarak bulunur. (Zinn vd., 2001; Ray vd., 2017). Biyobozunur olmasına rağmen, PHA'lar modifiye edilmediklerinde son derece stabildir. PHA'ların bu œzellikleri onların terapœtik fonksiyonlarını azaltır. PHA'ları biyomedikal alanda kullanışlı hale getirmek için PHA ũretiminde kullanılan organizmaların birkaç istisnai œzellięini korunarak modifiye edilmiştir. Bu modifikasyon ile hidroksil ve/veya karboksil grupları, metillenmiş dallar ve diğer hidrofilik tũrevleri içeren fonksiyonel yan gruplara sahip olan nadir gœrũlen PHA'lar, birkaç organizma tarafından ũretilmiřtir (Song vd., 2018).

Tıbbi alanlarda PHA, œzellikle P (3HB), P (3HB-3HV), P (4HB), P (3HO) ve P (3HB3HHx) doku mũhendislięinde ve medikal cihazlarda da kullanılabilir (Anjum vd., 2016; Ray vd., 2017). Bunlardan bazıları; eklem kıkırdak onarımı, kardiyovaskũler yama grefti, meniskũs onarım cihazı, ortopedik pimler, onarım yaması, peręinler ve ęiviler, zimbalar ve vidalar, stentler, cerrahi ağ vb. ũrũnler farklı hastalıkların tedavisinde arağ olarak kullanılabilir. Daha œnceleri farklı materyallerle hazırlanan implantlar enfeksiyon riski taşırken, bugũn PHA ile hazırlanan implantların toksisite oluşturmadığı gœzlenmiřtir (Ray vd., 2017).



Şekil 2.13. PHA' nın medikal uygulamalarda gelişim süreci (Chen vd., 2018)

Basnett ve arkadaşlarının 2013 de yaptığı çalışmada PHO ve P3HB/P3HO karışımlarına, fetal bovin serum kullanılarak protein adsorbsiyonu yapılmış ve insan endotelial hücrelerine (HMEC-1) uygulanarak DMEM ve PBS otamlarında polimerin parçalanma ve proteinin salım profilleri incelenmiştir. Protein adsorbsiyonu, gerilme gücü ve hücre sağ kalımı P3HB/P3HO karışımında daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma ile absorbe edilen ilaçlarda gereken koroner stentler için bir matris sistemi olarak P3HB/P3HO karışımının kullanılabilirliği ileriiki çalışmalara ışık tutmaktadır (Basnett vd., 2013a).

*Pseudomonas mendocina* tarafından üretilen bir tür PHA türü olan poli-3-hidroksikotanoat, spesifik olarak kalp dokusu mühendisliği için çalışılarak kalpteki miyokard dokusuna benzer özellik gösterdiği ve dokudaki rejenerasyon işleminden sonra arkasında atık madde biriktirmeden dokunun yeniden oluşmasına izin verdiğini göstermişlerdir. Bu çalışma ile kardiyak doku mühendisliği için P (3HO) 'nın ayırt edici özelliklerini kanıtlamıştır (Bağdadi vd., 2016). PHB bazlı ortopedik implantların, kedilerde kullanıldığı ve PHB/HA bazlı kompozitlerin tavşanlarda kemiğin yerine geçmesi için uyumlu olduğu bulunmuştur (Raza vd., 2018).

Tüm bu matris sistemlerinin yanında kök hücre ile yapılan çalışmalar da mevcuttur. İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin sinir hücrelerine farklılaşmasını teşvik etmek için iskele olarak 3-hidroksibutirat-3-hidroksivalerat- $\beta$ -3-hidroksiheksanoat (PHBVHHx) terpolyesterinin kullanımı Wang ve ark. Tarafından 2010 yılında gerçekleştirilmiştir (Gumel vd., 2012).

İnsanlarda yüksek 3HB konsantrasyonunun birikmesi ile ketoasidoz uyarılır ve 3HB oligomerleri, bu bileşiklerin periferik dokular içinde hızlı bir şekilde yayılmalarına maruz kalan hastalar için iyi enerji substratı olarak işlev görme özelliğine sahiptir. 3HB oligomerleri kalp verimliliğini artırabilmek ve beyin hasarını önlemek için mitokondriyal enerjiyi yeniler. PHA'lardan türetilen HA monomerleri,  $Ca^{+2}$  kanallarını uyarabilir ve bu da hafızanın geliştirilmesine yardımcı olabilir. 3HB ayrıca vücutta kalsiyum ve güçlü serum alkalın fosfataz aktivitesini hızla biriktirerek osteoblastların büyümesini ve antiosteoporoz aktivitesini artırır. Kemik mineral yoğunluğunun düşürülmesinde ve serum osteokalsin seviyesinin azaltılmasında yardımcı olur. (Ray vd., 2017).

Antineoplastik ajanları kanser hücrelerine vermek PHA nanoparçacıkları oluşturularak, tümöre özgü bir ligand ile fonksiyonelleştirilen PHB nanopartikülleri, belirli meme kanseri hücrelerini spesifik olarak hedeflemek için kullanılan çalışmalar yapılmıştır (Gumel vd., 2012).

PHA boncuklarının hedef füzyon proteini ile etkileşime girerek tamamen kaplandığı ve daha sonrasında bu hedef proteinin PHA boncuklarından  $\text{CaCl}_2$  ile elde edilip kalan PHa boncuklarının çökeltilmesi ile saf şekilde proteinin elde sağlanmıştır. Bu PHA boncuklarının spesifik antijen, antikor ve proteinlerle etkileşimi ile teşhis uygulamalarında kullanılabilir olduğu önerilmiştir (Parlane vd., 2016).

Ayrıca PHA kullanılarak yapay sinir kanalları oluşturulmaya çalışılmıştır. PHB iskelesinin erişkinlerde Schwan hücrelerinin bağlanmasını, çoğalmasını ve hayatta kalmasını destekledi ve greft içindeki belirgin aksonal rejenerasyonu desteklediğine yönelik bulgular elde edilmiştir. PHBHHx nanofiber iskelelerinin (matrisler), merkezi sinir sistemi hasarını tedavi etmede kullanıldığı, PHO/PHB karışımının, nöron hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması için belirgin şekilde desteklediği gözlenmiştir (Chen vd., 2018).

Çeşitli moleküllerde etkileşime giren PHA boncukları ile biyomedikal uygulamalarda teşhis araçları olarak kullanılmaktadır. Belirli proteinleri veya antikorları tanımlamak için bunları bağlaya bilen PHA boncukları tasarlanabilmektedir. Bunun yanında enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde T hücre belleği aracılı immün yanıtları uyarmak için yararlı olan PHA boncuklarının üretimini mümkündür (Parlane vd., 2016).

Polihidroksialkanoatların yukarıda örneklerle anlatılan doku mühendisliğinde iskelet olarak kullanılması, bazı mikroorganizmalara karşı antibiyotik olarak kullanılması, biyomedikal cihazlarda kullanımı ve biyodegradabl implant olarak kullanımının yanında ilaç taşıyıcısı olarak kullanımı ile çalışmalar da yapılmıştır (Chen vd., 2018).

### **2.6.1. İlaç taşıyıcısı olarak PHA**

İlaç taşıyıcı sistemlerde amaç hedef bölgeye uygun sürede uygun miktarda ilacın verilebilmesidir. Terapötik maddeler, çeşitli şekillerde (oral, parenteral, transdermal, transmukozal, vb.), sürekli bir şekilde ve belirli bir zaman dilimi içinde verilebilir. Polimer malzemeler bu alanda kullanılmaktadır (Peptu vd., 2018). PHA 'lar uzun süreli

ve yavaş salım gerçekleştirdikleri için; ayrıca biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri ile ilaç salım sistemleri oluşturularak ilacın sirkülatif sisteme verilmesinde kullanılabilir mükemmel araçlardır (Gumel vd., 2012; Raza vd., 2018). PHA'nın sahip olduğu mikro ve nanosferleri ilacı kaplayan dış katman olarak görev yapar ve bozulmaya başladıkça ilacı salar (Raza vd., 2018). İlacın salımı tamamen difüzyon temeline dayanır. İlaç salınımı; fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak moleküler düzeyde ileri modifikasyonlar ile PHA'nın yüzey özellikleri, monomer içerikleri ve moleküler ağırlıkları değiştirilerek kontrol edilebilir. Düşük kristallik derecesi ilacın polimerde tutunmasını artırır. Mcl-PHA'lar scl-PHA'ya göre düşük kristalite ve erime noktasına sahip olduğu için ilaç salımında daha kullanışlıdır (Ray vd., 2017; Peptu vd., 2018).

Biyobozunur polimerlerin makromolekülleri, düşük molekül ağırlıklı toksik olmayan fragmanlara indirgenir ve bunların birikmesi önlenerek vücuttan güvenli bir şekilde çıkarılabilir. Metabolik atılım daha güvenli bir boşaltım yolu sağlar ve bu nedenle, biyolojik olarak parçalanabilir polimerler ilaç dağıtım sistemlerine artan bir ilgi çekmektedir (Nigmatullin vd., 2015).

İlaç salımında PHA'lar tavşan, fare, sığır gibi birçok hayvanda denenmiştir (Raza vd., 2018). Kontrollü salım sistemi için kullanılan PHB mikrosferlerinden antitümör ilaç olan rubomisin'in Ehrlich karsinomuna sahip farelerde proliferasyonu inhibe ettiğini gösterilmiştir (Shrivastav vd., 2013).

Hidroksialkanoat nanopartikülleri, PhaP ve PhaP'ye birleşmiş polipeptit veya protein ligandlarından oluşan spesifik bir ilaç verme sistemi geliştirilmiştir. P3HB/3HV mikropartiküllerinde enkapsüle edilen sitostatik ilacın, HeLa tümör hücrelerine karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır (Chen vd., 2018).

Sert P (3HB) ve esnek P (3HO) karışımları, ilaç salan koroner stentler için bir matris olarak kullanılabilir olduğunu aspirini matris içine dağıtarak yükleyip salımına bakılarak gösterilmiştir. Salım profilinde ilk 24 saatte aspirin salımındaki ani yükseliş olup daha sonra 20 gün boyunca salım sabit olup 30 günde salım tamamlanmıştır. Bu çalışma ile stent implantasyonundan sonra arter tıkanıklığının tekrar ortaya çıkma riskini önlemek için antitrombotik ajanların lokal olarak verilmesi bu matris ile sağlanmıştır (Basnett vd., 2013b).

Mcl-PHA, transdermal ilaç salımındaki uygunluğu nedeniyle birçok, çalışmada kullanılmıştır. 3HO ve 3HHx içeren PHA kopolimerleri, python reticulatus cildine yapışmıştır ve tamsulosin, ketoprofen ve klonidin gibi ilişkili üç ilacı dağıtmak için kullanılmıştır (Ray vd., 2017).

Mcl-PHAs'lar arasında, P(3HO) ve P(3HB-co-3HHx) kopolimerleri fazla miktarda bulunmaları nedeniyle araştırılmıştır. Tavşan aortasından alınan düz kas hücrelerinde (RaSMCs), hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ilerlemesi ve fenotipik değişiklikler üzerinde çalışmayı hedeflemişlerdir. %20 HHx polimerin düşük kristallenmeleri ve polimerler üzerindeki artan metil gruplarının sayısı nedeniyle hidrofobik mikro-ortamı hücrelerin çoğalabileceği ortamı sağlamıştır ve greft olarak kullanımı daha uygun olduğu bulunmuştur (Qu ark., 2006a).

Mcl-PHAs ile ilgili en eski *in vivo* çalışmalardan biri, tavşanlarda polimer implantların (mikro kürecikler, tüpler ve peletler) subkutan implantasyonu yoluyla poli (3-hidroksioktanoat-ko-3-hidroksiheksanoat) [P (3HO-ko-3HX)] kopolimeri üzerinde gerçekleştirilmiştir (Qu vd., 2006b).

3-hidroksibütirat/4-hidroksibütirat [P(3HB/4HB)] kopolimerlerine allojenik fibroblast kültürü yüklenerek farelerde yara dokusuna uygulanmıştır. Yapılan çalışmalar ile fibroblastların varlığı tespit edilmiş, hücrelerin hücre dışı proteinler salgıladıkları ve yaranın çevresindeki dokularda epidermal hücrelerin göçünü teşvik ettikleri gözlenmiştir (Shishatskaya vd., 2016).

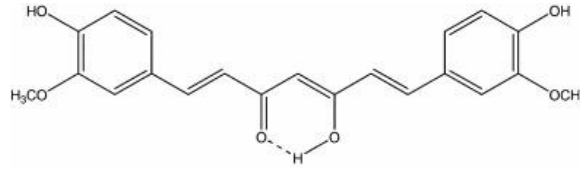
## **2.7. Kurkuminin Genel Özellikleri ve Doku Rejenerasyonu**

Zingiberacea bitki familyasındaki bir cins olan Curcuma, curcuminlerin de dahil olduğu kurkuminoidlerin biyolojik kaynağıdır. Zerdeçaldan izole edilen üç ana kurkuminoidler; kurkumin, demetoksi kurkumin ve bisdemetoksi kurkumindir ve kurkumin, zerdeçalın biyolojik aktivitesinden sorumlu olan önemli aktif bileşendir (Joe vd., 2004).

Fitokimyasallar bitkilerin sekonder metabolitleri olup biyotik/abiyotik strese karşı bitki tarafından sentezlenen moleküllerdir. Bu grupta özellikle polifenolik bileşiklerin antioksidan özelliğe sahip olup, sağlık üzerindeki olumlu etkileri açısından en yaygın olarak bilinen moleküllerdir. Zerdeçal (*Curcuma longa*) bitkisinin rizomlarından elde edilen doğal sarı pigmentli kurkumin de bunlardan birisidir. Geleneksel tıpta, öksürük,

sinüzit, astım, karın ağrısı, romatizma, diyabet gibi pek çok hastalıkta kullanılmaktadır (Joe vd., 2004; Nabavi vd., 2014).

Kurkuminin kimyasal formülü  $C_{21}H_{20}O_6$  olup, molekül ağırlığı 368,38 g/mol'dür. IUPAC isimlendirmesi (1E, 6E)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6- heptadien-3,5-dion'dur (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Kurkuminin kimyasal yapısı (Joe vd., 2004)

Kristal formda, cis-enol konfigürasyonunda olduğu ve rezonans destekli hidrojen bağları ile stabilize kaldığı belirtilmektedir. Kurkuminin enol formu keto formuna göre daha stabildir. Çözeltilerde cis-trans izomerleri halinde bulunan kurkumin trans formu kurkumin çatısının zıt yönde fenolik metoksi grupları, cis formunda molekül çatısı ile aynı yönde fenolik metoksi grupları taşır. Kurkumin hidrofobik bir molekül olup, metanol, etanol, asetonitril, kloroform, DMSO ve etil asetat gibi solventlerde çözünür. İki adet belirgin absorpsiyon bandı vardır. Görünür bölge spektrumunda 410-430 nm'de maksimum absorpsiyon verir, UV bölgede ise maksimum absorpsiyonu 265 nm'dedir (Shomea vd., 2016).

### 2.7.1. Kurkuminin medikal olarak kullanımı

Kurkumin, geleneksel tıpta, öksürük, sinüzit, astım, karın ağrısı, romatizma, diyabet gibi pek çok hastalıkta kullanılmaktadır (Joe vd., 2004; Nabavi vd., 2014). Gıda sektöründe baharat olarak yaygın şekilde kullanılması nedeni ile istenmeyen yan etkilerinin de oldukça az olduğu düşünülmektedir. Kanseri, artriti, kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ümit verici düzeyde olmasına rağmen suda çözünürlüğünün düşük olması, biyoyararlanımını ve klinik etkinliğini sınırlandırmaktadır (Joe vd., 2004; Kim vd., 2011). Serum konsantrasyonları ve doku dağılımları düşüktür, bununla birlikte hızlı metabolize olmaları nedeni ile kısa yarılanma ömrüne sahiptir. Bu problemlerin

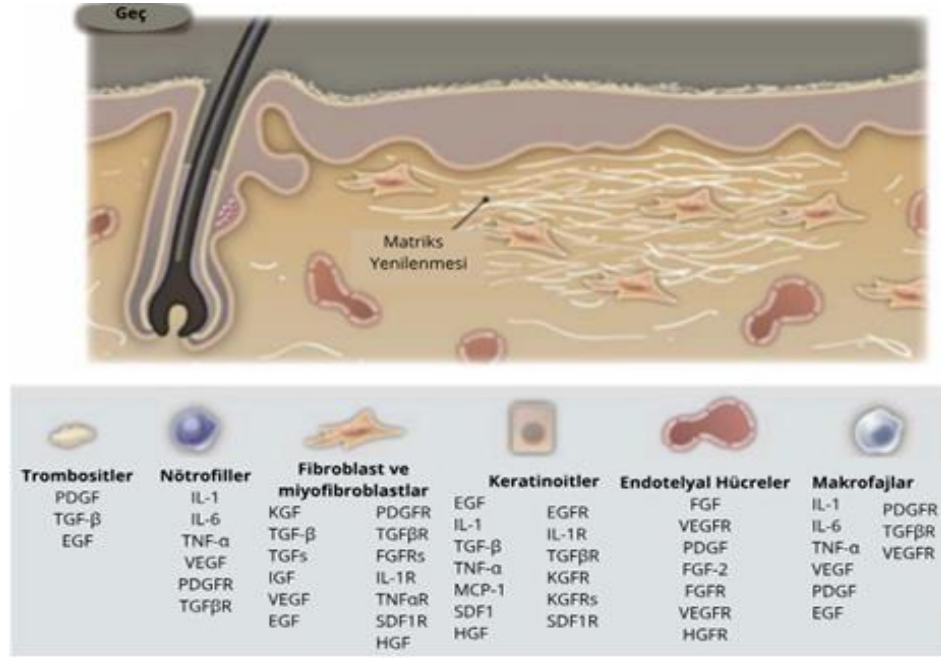
üstesinden gelebilmek için kurkumin lipozom, polimerik nanopartiküller, lipid bazlı nanopartiküller, biyoparçalanır mikroküreler, siklodekstrin ve hidrojel olmak üzere çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenerek denenmiştir (Kim vd., 2011).

Yara onarımı, çözünebilir mediyatörler, kan hücreleri, hücre dışı matris ve parenkimal hücrelerin ortak çalışmasını gerektiren hücrel ve moleküler karmaşık ve dinamik bir süreçtir (Li vd., 2016). Yara onarımı dört temel adımı vardır; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve remodeling (Gence, 2008). Yaralanmanın hemen ardından hemostaz başlar (Mohanty vd., 2017). Yara bölgesindeki kan kaybını azaltmak, mikroorganizmaların ve antijenlerin uzaklaştırılması ve doku boşluğunu sitokinler ve büyüme faktörlerinden oluşan kan pıhtısıyla doldurmak için kan ve lenfatik damarlar travmatize edilir (Şekil 2.15) (Reinke vd., 2012).

Yaralı bir kan damarındaki kanamanın durdurulması için trombositler, hasarlı kan damarlarının kapatılmasını teşvik eden ve böylece kan kaybının azaltılmasına yardımcı olan vazokonstriktörler salgırlar (Mohanty vd., 2017). Bu aşamada oluşturulan geçici örtü hemostazı sağlar (Gence, 2008). Kan pıhtılaşıma yolunun aktive edilmesi ile aynı zamanda yaralanmadan 2-5 gün içerisinde immün sistem hücreleri aktifleştirilerek inflamatuvar yanıt oluşturulur (Gurtner vd., 2008). Kan pıhtısı lökositlerin, keratinositlerin, fibroblastların ve endotel hücrelerinin göçü için iskele yapısı ve büyüme faktörlerinin rezervuarı olarak geçici matriks oluşturan, fibrin molekülleri, fibronektin, vitronektin ve trombospondinleri içerir (Şekil 2.15) (Reinke vd., 2012). Trombin, çözümlü plazma proteini olan fibrinojeni, fibrin çözünmez liflerine dönüştüren bir serin proteaz görevi görür. Kollojen trombositler ve kan hücreleri ağı (kan pıhtısı) kan damarındaki hasarı kapatır (Mohanty vd., 2017).

Proliferasyon sürecinde, trombositler, hasarlı kan damarını onarmak için düz kas hücreleri ve fibroblastları aktive eder ve makrofajların, nötrofillerin, fibroblastların kemotaksisini geliştirerek yeni kan damarları ve kılcallar yavaş yavaş şekil alır (Mohanty vd., 2017; Wang vd. 2019). Proliferasyon süreci yaralanmadan 3 gün ve 2 hafta içerisinde olan süreci kapsar (Wang vd. 2019). Nötrofiller, bakterisidal ve fagositik özellikleri ile enfeksiyonu önleyen ve elastaz, kollajenaz gibi proteazları salan, hasarlı ve denatüre olmuş ekstraselüler matriks elemanları yani ölü doku artıklarını ortadan kaldırılmasını sağlayan, yara bölgesine ilk olarak gelen lökositlerdir. Makrofajlara dönüşen monositler,

büyüme faktörleri salınımını etkilerken iyileşme sürecinde oldukça önemlidirler (Gence, 2008).



**Şekil 2.15.** Doku onarımının hüresel ve moleküler mekanizması. Erken aşamada hemostaz ve keratinositlerin ve enflamatuar hücrelerin aktivasyonu olur; orta evrede keratinositlerin ve fibroblastların çoğalmasımı, matris yıkımını ve anjiyogenezi, son aşamada tekrar yapılandırılma, skar oluşumu ve bariyer restorasyonunu içerir. Bu süreçte restorasyonu sağlamak için çok sayıda büyüme faktörü, sitokin ve kemokin (listelenmiştir) salgılayan çoklu hücre tipleri görev almaktadır (Eming vd., 2014)

Hem trombositler hem de lökositler enflamasyon sürecini başlatmak için sitokinleri ve büyüme faktörlerini (PDGF, transforme edici büyüme faktörü (TGF)-β, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve epidermal büyüme faktörü (EGF)) serbest bırakır (Reinke vd., 2012). Makrofajlar, fagositik hücreler tarafından salgılanan TGF-β, FGF, PDGF, tümör nekroz faktörü (TNF) a ve interlökin-1 (IL-1) gibi ek sitokinlerin daha fazla salgılanmasını sağlayarak iyileşme basamağının başlaması için sinyal yolağını başlatır (Şekil 2.15) (Mohanty vd., 2017).

Yeni doku oluşumu süreci, yaralananmadan 2-10 gün sonra başlar (Gurtner vd., 2008) ve 3 haftadan 2 yıla kadar olan süreçte devam eder (Wang vd. 2019). Onarımın ilk evrelerindeki hücreler yara bölgesine göç etmeye başlar ve yara bölgesinde yeni kan damarları oluşur. Epitel hücrelerin göçü başlar ve onarım fonksiyonel dokunun bir hücre yaması (çoğunlukla fibroblastlar) olarak başlar ve skar olarak adlandırılan hücre dışı

matris (çoğunlukla kollajen) haline gelmesiyle sonuçlanır (Gurtner vd., 2008). Remodeling sürecinde kollejen sentezi azalır ve yara yırtılma mukavemeti artar. Remodeling, skar oluşumu ile başlayan ve yıllar süren bir süreçtir (Gence, 2008).

Pek çok modern yara örtüsü taşıdıkları etkin maddenin formüle edilmesi ve etkin maddenin yara bölgesine salımı için taşıyıcı olarak kullanılan polimerlerden üretilmiştir. Etkin madde taşınmasında yara bakım ürünleri jel, film ve köpük şeklinde de uygulama alanı bulurken, yeni nesil olarak adlandırabileceğimiz polimerik yara örtüleri; filmler, poröz süngerler, dondurularak kurutulmuş diskler, wafer sistemler veya doku mühendisliği ile geliştirilmiş polimerik sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır. (Kurtoğlu vd., 2009). Doğal malzemeler arasında, matris sistemini oluşturmak için biyopolimerlerden polihidroksialkanoat (PHA) ailesi umut vaad etmektedir. PHA'nın parçalanması PLA veya PLGA'nın toplu olarak parçalanmasının aksine yüzey bozulmasıyla ve kontrollü bir şekilde olur (Rai vd., 2017).

## **2.8. Polimerik Yara İyi Edici Film**

Polimerler genellikle suda çözünmeye dayanıklıdır. Ancak bazı polimerler suda çözülebilir özellikte olup noniyonik ve iyonik polimerler olarak sınıflandırılabilir (Çelikhan, 2003). Polimerik taşıyıcılar geleneksel yöntemlere kıyasla, daha iyi emilim oranları ve biyouyumluluk, aylar boyunca depolanabilirlik, proteolitik enzimler tarafından ilacın bozulmaya karşı güvenliği, hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçların kapsüllenebilmesi veya adsorbe edilebilmesi, fonksiyonelleştirilebilmesi ve en önemlisi kapsüllenmiş ilacın kontrollü salımını sağlamak için fizikokimyasal özelliklerinin ayarlanabilmesi, terapötik aralıkta vücuttaki ilaç konsantrasyonlarının daha uzun süre boyunca kontrol edilmesi, ilaçların hücre ve dokuya spesifik hedeflenmesi gibi üstün özelliklere sahiptir. (Agrawal, 2014; Rancan vd.,2014).

İlaçların polimer veya lipid sistemlerden salımı, (1) ilaçların sistemden difüzyonu, (2) sistemin bozulmasına veya parçalanmasına yol açan kimyasal veya enzimatik bir reaksiyon veya (3) hem ozmoz yoluyla hem de çözücü aktivasyonu ile sistemin şişmesiyle ilacın sistemden çıkması olmak üzere üç genel mekanizma bağlıdır (Robert, 1998).

Yaralar veya ülserler, kutanöz mukozal dokunun devamlılığında kesintiler olarak bilinir ve yapısal ve fizyolojik değişikliklere yol açar (Costa vd., 2020). Oluşan yaralarda çeşitli faktörler (obezite, yaş, konjenital hastalıklar) yara bölgesinde enfeksiyonu

geliştirme riskini arttırır. Epidermal rejenerasyon için uygun alan yaratmak ve yaralanma enfeksiyonunu ve su kaybını engellemek için yara yüzeyini kaplayacak şekilde çok sayıda yara örtüsü hazırlanmıştır (Agrawal P., 2014; Tüylek Z., 2017; Okur vd., 2019).

Geleneksel tedavilerin oluşturduğu olumsuzluklara karşı alternatif olarak, polimer bazlı yara örtüleri, yara bölgesinin fiziksel olarak korunması için örtü ve aynı zamanda ilaç salım sistemi olarak görev alırlar. Bioaktif yara pansumanı olarak adlandırılan bu yara örtüleri, hastanın hayat kalitesinin ve konforunu arttırır (Costa vd., 2020).

İdeal biyoaktif yara örtüleri, kolay uygulama ve sökme imkanı sağlayan iyi direnç ve esnekliğe sahip olmalı, yara bölgesini örterek, zarar görmüş dokuyu dış etkilerden korumalı, lezyonun arayüzünde nemli bir ortam sağlamalı ve yapısı uygunsa hücre üretimini aktive ederek iyileşme sürecine katkı sağlamalı, etkin oksijen sirkülasyonu sağlamalı, fazla eksüdayı temizlemeli ve lezyondaki mikroorganizmalara karşı fiziksel bir bariyer görevi görmelidir (Kurtoglu vd., 2009; Costa vd., 2020). Bu tür yara örtüleri toksik olmayan, alerjik olmayan ve yapışmayan malzemelerden hazırlanmalıdır. (Costa vd., 2020). Birçok yara örtüsü, mikroorganizmalara karşı koruyucu etki gösteren antimikrobiyal ajanlar veya iyileştirici ajanlar ile yüklenir (Okur vd., 2019).

Kurkumin düşük toksisitesi, anti-virüs, antibakteriyel, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri gibi geniş spektrumlu biyolojik ve farmakolojik aktiviteleri nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmüştür. Ek olarak, kurkumin peroksi radikallerine karşı temizleme etkisi gösterir ve keratinositlere ve fibroblastlara hidrojen peroksit kaynaklı hasarı önler (Wathoni vd., 2017; Duan vd., 2020). Kurkumin, granülasyon dokusu oluşumu, doku yeniden modelleme, kollajen birikimi, fibroblast proliferasyonunu, vasküler yoğunluğunu destekleme ve yara kasılması ile yara iyileşmesini destekleme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, kurkuminin topikal uygulaması, yarayı etkili bir şekilde tedavi edebilmektedir. Günümüzde, kurkumin yüklenen polimerik film, lif, hidrojel, nonoformülasyonlar olarak yara iyileşmesini teşvik etmek için topikal formülasyon geliştirilmiştir (Duan vd., 2020).

Film yara örtüleri, yaralı dokuya nemli bir ortam sağlayabilen şeffaf polimerik kaplama ince tabakalardır. Dermal yara iyileşme sürecinde, kurkumin yüklü filmlerin bakteri gelişimini inhibe ederek, iyileşme sürecini hızlandırdığı ve deri kıl foliküllerini

yenilenmesini sağladığı histolojik çalışmalarla belirlenmiştir (Tong vd., 2017; Mohanty vd., 2017).

Biyobozunur filmler, dokuya benzer mekanik ve anatomik özelliklere sahiptirler. Vücutta uygun yapısal ve mekanik özelliklere sahip bir bağ dokusu matrisini geride bırakarak yavaş yavaş bozunurlar. Bu filmler, büyüme faktörleri ve genetik materyaller gibi ilave biyoaktif materyallerin yaraya verilmesi için potansiyeline sahiptirler (Boateng vd., 2008).

PHA'lar, petrol bazlı plastiklere kıyasla karbon zinciri içinde daha uygun olmaları, yüzeylerinin canlı veya canlı olmayan hücrelerde kalıcı olmayacak şekilde (biyobozunur) düzenlenebilmesi ve ilaçlar için kaplama maddesi olarak kullanılabilmesi gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde sayısız uygulamada kullanılmaktadır (Ali vd., 2016).

PHA'ların biyoyumlu ve fonksiyonel polimerler olduğuna dair bilimsel kanıtlar vardır. PHA'ların iskelelerinin fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, nöronlar ve kök hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücrelerin proliferasyonunu kolaylaştırdığını, fibroblastların ve keratinositlerin PHA iskelelerinde diğer materyallerden daha iyi gelişim gösterdiği bilimsel çalışmalar sonucunda bulunmuştur (Shishatskaya vd., 2016).

### **2.8.1. Polietilen Glikol (PEG)**

İyonik olmayan polimerler grubuna giren polietilen glikol (PEG) suda çözünebilir polimerlerdir (Çelikhhan, 2003). Polietilen glikol,  $HO-(CH_2CH_2O)_n-H$  genel kimyasal yapısına sahip olup, tekrarlayan etilen oksit alt birimlerinden oluşurlar (Bailon vd., 1998). 200 ile 10 000 arasında çeşitli moleküler ağırlığa sahiptirler. Moleküler ağırlığı  $< 600$  ise; renksiz viskoz bir sıvı ve moleküler ağırlığı  $> 800$  ise: mumsu, beyaz ve katıdır (Chen vd., 2005). PEG hücre zarları ile etkileşir ve yüksek konsanstrasyonda hücre füzyonunu etkiler (Jäschke vd., 1994). Taşıyıcı sistemin hidrofiliğini artırarak bozunma hızını artırır (Huang vd., 1997). Biyolojik olarak parçalanabilir ve hiçbir toksik etkisi yoktur ve bozulma sonucu asitliği azaltır (Huang vd., 1997; Vuksanović vd., 2013). Camsı geçiş sıcaklığı kristallik yüzdesine göre  $-65$  ile  $-20$  °C arasında değişmektedir (Çelikhhan, 2003). Hem iyi bir proton alıcısı hem de vericisidir. Çeşitli biyolojik ve biyo-tıbbi uygulamalar için kullanılır (Vuksanović vd., 2013). Hidrofilik karakterdeki PEG etkin maddenin dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlar (Tüylek, 2017).

### **2.8.2. Kollicoat® MAE 100 P**

Kollicoat MAE 100 P, Metakrilik asit:etil akrilat'ın 1:1 oranını içerir. Film formuna gelerek, tablet, kapsül, granül uygulamalarında kullanılabilir. pH >5.5 değerlerde hızlı salım yaparak ilacın doğru bölgede salınmasını sağlarlar (http-3). İlaç salımında uzatılmış salım için kullanılan ana polimerlerdendir. MAE 100 P'nin yüzey karboksilik asit gruplarının polimerizasyonu, iyonik agregatları arttırarak ve polimer zincirlerini çözündürerek polimer filmin özelliklerinin değiştirir. Artan iyonik agregatlar filmin mekanik özelliklerini geliştirir. Bunun yanı sıra polimer zincirindeki çözünme ile film oluşturma mekanizmasını dispersiyon esaslı filmde, çözelti esaslı filme dönüştürür (Li, 2016).

### 3. GEREÇLER

#### 3.1.Kullanılan Maddeler

53552- <i>Pseudomonas mendeocina</i>	: ATCC, Amerika
Amonyum oksalat	: Merck, Almanya
Amonyum sülfat	: Meck, Almanya
Aseton	: Merck, Almanya
Bakır II sülfat pentahidrat %99	: Acros, USA
Demir III klorür %98	: Acros, USA
Diklorometan	: VWR, Fransa
Dipotasyum hidrojenfosfat	: Merck, Almanya
Disodyum hidrojenfosfat	: Merck, Almanya
DMEM	: Biological Ind., İsrail
DMSO	: Applichem, Almanya
Etanol %99,8	: Merck, Almanya
Hidrojen klorür %38-%36,4	: SIGMA-Aldrich, Almanya
İmmersion yağı	: SIGMA-Aldrich, Almanya
İyodin	: Merck, Almanya
Kalsiyum klorür	: SIGMA-Aldrich, Almanya
Kloroform	: SIGMA-Aldrich, Almanya
Kobalt II klorür %97	: Acros, Amerika
Kollicoat MAE 100P	: BASF, Almanya
Kristal violet	: Merck, Almanya
Krom II klorür hegzahidrat	: Merck, Almanya
Kurkumin	: Merck, Almanya
Magnezyum sülfat heptahidrat	: Merck, Almanya
Metanol	: Merck, Almanya
MTT	: Applichem, Almanya
Nikel II klorit hegzahidrat	: Merck, Almanya
Nutrient Broth No:3	: SIGMA-Aldrich, Almanya
Polietilen Glikol 400 (PEG400)	: Tekkim, Türkiye
Potasyum iyodin	: Merck, Almanya
Safranin-O	: Merck, Almanya
Sodium caprylate (sodyum oktanoat) %98	: Acros, Amerika

Sodyum hidroksit	: SIGMA-Aldrich, Almanya
Sodyum hidroksit	: Merck, Almanya
Sodyum hipoklorit	: Merck, Almanya
Tyrictica Soy Broth	: Merck, Almanya
Tyriptica Soy Agar	: Merck, Almanya

### 3.2.Kullanılan Cihazlar

CO <sub>2</sub> 'li etüv	: Hera Cell 240i, Amerika
<i>Cytation 5</i> plaka okuyucu	: BioTek, ABD
Çalkalamalı etüv	:New Brunswick <sup>TM</sup> Innova <sup>®</sup> 42R, Almanya
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC-60)	: Shimadzu, Japonya
Distile su cihazı	: Millipore, Amerika
Dondurucu (-20°C)	: Arçelik, Türkiye
Dondurucu (-80°C)	: New Brunswick Sci., Amerika
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	: Shimadzu, Japonya
Hassas terazi	: Ohaus, Amerika
İnvert mikroskobu	: Leica DMIL, Almanya
Laminar Akış Kabini	: Heal, Force Çin
Liyofilizatör	:SCANVAC, Danimarka
Manyetik karıştırıcı	: Heidolph, Almanya
Nükleer manyetik rezonans (NMR)	: Bruker, ABD
Orbital Çalkalayıcı	: Stuart SSL1, İngiltere
Otoklav	: Hirayama, Japonya
Otomatik mikropipetler	: Eppendorf, Almanya
pH-metre	: Mettler Toledo, ABD
Santrifüj	: Eppendorf 5810, Almanya
Spektrofotometre	: SHIMADZU, Japonya
Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)	: Hitachi, Japonya
Vorteks karıştırıcı	: Jeio Tech Co., Çin
X-ışını Difraktometre (XRD)	: Rikagu, Japonya

## 4. YÖNTEM

### 4.1. *Pseudomonas mendocina* Suşunun Saflığının Kontrolü ve Aktifleştirilmesi

ATCC53552 *Pseudomonas mendocina* 'nın aktifleştirilmesi için Tryptic Soy Broth besiyeri kullanılmıştır (http-4). Bunun için Tablo 4.1. belirtildiği gibi 6 mL'lik tüp içerisinde besiyeri hazırlanmıştır ve 121°C'de 15 dakika otoklav (Hirayama, Japonya) ile sterilize edilmiştir. Besiyeri oda sıcaklığına gelince 1 mL alınarak liyofilize haldeki organizma üzerine eklenmiş ve pipetaj ile organizmalar dispers edilmiştir. Elde edilen bu dispersiyondan katı besiyerine ekilmek üzere örnek ayrılmış, geri kalan örneğin tamamı, 6 mL'lik Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine aktarılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

Besiyeri ile hazırlanan bakteri süspansiyonundan ayrılan örnekle tek kolni elde etmek için Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine bek alevinde sterile edilen drigalski spatülü ile yayma ekim yapılmıştır. Bunun için, Tablo 4.1'de belirtilen oranlarda toplam hacim 200 mL olacak şekilde besiyeri çözeltisi hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika otoklav cihazı (Hirayama, Japonya) ile otoklavlanmıştır. Otoklavlanan besiyeri yaklaşık 45 °C'deyken plastik petriye steril kabin içerisinde yaklaşık 15-20 mL olacak şekilde dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. 6 mL'lik TSB besiyerinde inkübasyon ile aktive edilen bakteri süspansiyonundan alınan 1 mL'lik örnek serum fizyolojik ile 9 mL'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde  $10^{-7}$ - $10^{-1}$  konsantrasyon aralığında seri dilüsyon tekniği ile seyreltilmiştir. Dilüsyon tekniği materyaldeki hücre sayısını seri seyreltme yaparak kademeli bir şekilde azaltmak amacıyla genellikle 1:9 (10 misli) oranında seyreltme temeline dayanır. Dilüsyonda kullanılan çözeltinin, canlı mikroorganizma sayısını azaltacak ya da artıracak kimyasal maddeleri içermemesi gerekir. Bu sebeple %0,9 NaCl kullanılır (Gürgün vd., 1990).

Daha sonra  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  seyreltmelerinden 100 µL alınarak Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine yayma ekim yapılmış 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında, üreyen bakteriyi tek koloniye düşürmek için, petriden öze ile aseptik koşullarda örnek alınarak başka Tryptic Soy Agar (TSA) petrilere çizgi ekim yapılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 3 farklı petriden seçilen tek kolonilerin gram negatif ve saf olduğu belirlemek amacıyla gram boyama yapılmıştır. Bu yöntemle saf olduğu belirlenen organizma, stok yapılması amacı ile TSA yatık besiyerine ekim yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrasında tüpler +4 °C'ye kaldırılmıştır. Uzun süreli saklama amacıyla, besiyerine %20 gliserol eklenmiş, cryo tüplere 1 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Öze yardımı ile tek kolini halinde alınan mikroorganizmanın bu tüplere transferi aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiş, vortekslenerek (Jero Tech Co., Çin) tamamen dispers olması sağlanmış, tüplerin kapakları parafillenerek -20 °C ve -80 °C'de saklamaya alınmıştır.

**Tablo 4.1.** Kullanılan Tryptic Soy besiyeri içerikleri ([http-4](#))

<b>Tryptic Soy Broth (TSB)</b>	<b>gr/L</b>	<b>Tryptic Soy Agar (TSA)</b>	<b>gr/L</b>
Casein peptone (pancreatic)	17	Casein peptone (pancreatic)	15
Soya peptone (papainic)	3	Soya peptone (papainic)	5
Glikoz	2,5	Sodium Chloride	5
Sodium Chloride	5	Dipotassium Phosphate	2,5
Dipotassium Phosphate	2,5	Agar	15
TSB ve TSA besiyerlerinin pH'ları, pH 7.3 ± 0.2'e 1M NaOH ve 1N HCl ile ayarlanmıştır.			

Saklamaya alınan kültür her kullanımdan önce aktifleştirilmiştir.

Serum fizyolojik hazırlamak için, 1 L distile su içine 9 gr sodyum klorür (NaCl) eklenmiş ve çözündürülmüştür. Çözeltinin pH'sı 1M NaOH ile 7.4 olacak şekilde ayarlanmış ve çözelti 9 mL olacak şekilde cam tüplere aktararak, 121°C'de 15 dakika otoklav (Hirayama, Japonya) ile sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığına geldikten sonra kullanılmıştır.

#### **4.1.1. Gram boyama**

Gram boyama, kristal violet-iodin kompleksi ve safranin boyasının diferansiyel boyama temeline dayanan gram pozitif ve gram negatif bakterileri ayırt etmeyi sağlayan temel mikrobiyolojik yöntemdir. Doku kültürü numunelerinin bakteriyel kontaminasyonunu değerlendirmek veya karışık veya izole bakteri kültürlerinden izole edilen bakterilerin Gram boyamasını ve morfolojik özelliklerini incelemek için kullanılır (Coico, 2005).

Gram negatif bakteriler peptidoglikan tabakasına sahiptir. Peptidoglikan tabakası dış membran adı verilen lipit-protein çift tabakasını içerir. Gram-negatif bakterilerin endotoksik bileşeni olan lipopolisakkarit (LPS) adı verilen benzersiz bir lipit tabakası vardır. Fosfolipidler esas olarak iç membranın iç yüzü boyunca hizalanır, LPS ise dış yüzdedir. İç membran nispeten esnek bir lipit çift tabakası olduğundan ve peptidoglikan çok ince olduğundan, Gram negatif bakterilerin duvar yapısı Gram pozitif bakteriler kadar güçlü değildir. (Beveridge, 2001). Gram-pozitif organizmaların hücre duvarları, alkol ile muameleden sonra bu kristal violet-iodin kompleksini muhafaza eder ve mor görünürken, gram-negatif organizmalar alkol ile muamele sonucu bu kompleksi açığa çıkartarak yıkama ve safraninle ikincil boyama sonrası pembe görünür ( Henry vd., 1943; Coico, 2005).

*Pseudomonas mendocina* suşlarının saflığını kontrol etmek amacı ile Coico, 2005'de yayınlanan solüsyonlar ve yöntem baz alınarak, gram boyama aşağıdaki basamaklar izlenilerek yapılmıştır;

- Bek alevi yanında lam üzerine 1 damla distile su damlatılmıştır. Özenin ucu tamamen kızarana kadar alevde tutularak sterilize edilir ve alevin zon alanından çıkmadan özenin soğuması beklenmiştir.

- Petri plaktan soğuyan öze yardımıyla tek koloni alınarak distile suya dairesel hareketler ile yayılmıştır ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

- Kuruyan cam lamele organizmaları fikse etmek için 2-3 kere bek alevinden hızlıca geçirilmiştir.

- Isı fiksasyonundan sonra, tüm yüzey kristal violet çözeltisi ile kaplanmış ve 1 dakika beklenmiştir.

- Distile su ile yıkanmış ve fazla su sallanarak uzaklaştırılmıştır.

- Tüm yüzey iyot çözeltisi ile kaplanmış ve 1 dakika bekletilmiştir.

- Distile su ile yıkanmış ve fazla su sallanarak uzaklaştırılmıştır.

• Alkol içeren renk giderici çözelti ile tüm yüzey kaplanmıştır ve 30 saniye bekletilmiştir. (Uzun süre bekletmemek önemlidir. Eğer süre aşılsa yanlış gram negatif sonuç verebilir.)

- Distile su ile yıkanmış ve fazla su sallanarak uzaklaştırılmıştır.
- Tüm yüzey safranin çözeltisi ile kaplanmıştır ve 1 dakika bekletilmiştir.
- Distile su ile yıkanmış ve fazla su sallanarak uzaklaştırılmıştır.
- Oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

• 100x büyütmede bakılacağı için, immersion yağından 1 damla damlatılarak, üzerine lamel kapatılmadan ışık mikroskobu (Leica DMIL, Almanya) altında, gözlemlenmiştir.

#### **Kristal violet çözeltisi;**

Kristal violet stok (Solüsyon A): 20 gr kristal violet, 100 mL %95'lik ethanolde çözülmüştür.

Oksalat stok (Solüsyon B): 1gr amonyum oksalat, 100 mL distile suda çözülmüştür.

Solüsyon A, distile su ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. 1:4 oranında Solüsyon B ile karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti, kristal violet çözeltisi olarak kullanılmıştır.

#### **Renk giderici çözelti;**

Eşit hacimde %95 etanol ve aseton karıştırılarak hazırlanmıştır.

#### **İyodin(lügol) çözeltisi;**

1 gr iyodin ve 2 gr potasyum iyodin 5 mL distile suda çözülmüştür. 240 mL distile su ve 60 mL %5 (ağırlık/hacim) sodyum bikarbonat eklenmiştir.

#### **Safranin çözeltisi;**

2,5 gr Safranin-O 100ml %95 etanolde çözülmüştür.

#### 4.2. *Pseudomonas mendocina*'dan Polihidroksialkanoat Üretilmesi

*Pseudomonas mendocina*'nın üretilmesinde tek karbon kaynağı olarak sodyum oktanoatı kullandıklarında, bir kopolimer yerine, poli (3-hidroksioktanoat) P(3HO)'nun homopolimerini ürettiği ilk defa Rai ve arkadaşları (2011b) belirlemiştir. Bu çalışmada, ATCC53552 *Pseudomonas mendocina* suşunun aşı kültürlerinin yapılması ve polihidroksioktanoat üretmek için, Rai ve arkadaşlarının 2011'de, Guo ve arkadaşlarının 2013'de ve Güngörmedi vd., 2014'de yayınladığı yöntemler kullanılmıştır. Buna göre;

**Birinci aşamada;** 1 L için 5.0 g pepton, 1.5 g bitki ekstraktı, 1.5 g maya ekstraktı, 5.0 g sodyum klorit bulunan hazır Nutrient Broth (Sigma-Aldrich No3)'dan 13 g tartılmış, 1 L'ye distile su ile tamamlanmış ve pH 7,0 +/- 0,2'ye 1N hidrojen klorür (HCl) ile ayarlanmıştır ve otoklav (Hirayama, Japonya) cihazı kullanılarak otoklavlanmıştır. Hazırlanan besiyeri 6 mL olacak şekilde cam tüplerde porsiyonlara ayrılmış ve bunlara petri plaklarda üretilmiş bakteri kolonilerinden aseptik koşulları altında eklenerek vortekslenmiştir ve 37°C'de 24 saat etüv (New Brunswick TMInnova®42R, Almanya)'de inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda 450 nm'deki Optik Density (OD) değeri spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) kullanılarak okutulmuştur. OD değerinin 0,8-1 aralığında olduğu belirlenen aşı kültürlerinin inkübasyon süresi sona erdirilmiş ve 0,8 OD değerine steril besiyeri ile sabitlenmiştir ve buradan %2 hacim/hacim oranında alınan inokulum, 30 mL yeni steril pH 7 Nutrient Broth bulunan 250 mL'lik erlene aşılama yapılarak 30°C'de, 200 rpm'e ayarlanmış çalkalayıcı etüv (New Brunswick TMInnova®42R, Almanya)'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda 450 nm'deki OD değeri spektrofotometrede okutulmuştur ve OD değeri 2'e sabitlenmiştir.

**İkinci aşamada ise;** *Pseudomonas mendocina*'dan, polihidroksialkanoat elde etmek için sınırlandırılmış besiyerinde (Minimal Salt Medium;MSM) üretilmesi yer almaktadır. Bu amaç için, içeriği Tablo 4.2'de verilmiş olan ve pH 7,0 +/- 0,2'ye 1M sodyum hidroksit (NaOH) ve 1N hidrojen klorür (HCl) ile ayarlanmış, steril MSM hazırlanmıştır. Daha sonra, 300 mL MSM 1L'lik steril erlene aktarılmış üzerine **birinci aşamadan** elde edilmiş, OD değeri 2 olan 30 mL *Pseudomonas mendocina* süspansiyonu eklenmiş ve 30°C'de 200 rpm'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Eşit miktarlarda olacak şekilde 50 mL'lik konik tabanlı falkon tüplerine porsiyonlar halinde bölünerek (~50 mL) 11.000 rpm'de, oda sıcaklığında, 30 dakika santrifüj (Eppendorf 5810, Almanya) edilmiştir.

Santrifüj sonrasında, süpernatantlar atılmış, pelletler üzerine 20 mL distile su konulmuş ve pelletin disperse edilmesi için vortekslenmiştir. Elde edilen dispersiyonlar tek falkon tüpünde toplanmış, 11.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Kuru kütle tayini yapmak için pelletler 1 mbar vakum altında, -110 C°’de liyofilize (Scanvac, Danimarka) edilmişlerdir. Ekstraksiyon aşamasında Kourmetza ve arkadaşları (2017)’nin yaptığı çalışmada belirttikleri gibi, liyofilizasyon yapılmadan da ekstraksiyon yapılabileceği için, deneysel süreci uzatan liyofilizasyon adımı her seferinde yapılmamıştır.

**Tablo 4.2.** Kullanılan MSM içeriği (Rai vd., 2011a)

<b>Minimal Salt Medium (MSM)</b>	<b>g/L</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
20 mM Sodyum oktanat	3,324gr

\*Sodyum oktanat ve MgSO<sub>4</sub>, otoklav (Hirayama, Japonya) ile sterilizasyon sonrasında çökme oluşturdukları için ayrı ayrı hazırlanmış ve otoklavlandıktan sonra karışıma ilave edilmişlerdir. Minimal salt medium kullanılmadan önce, 1 L MSM’ye 1ml iz element olacak şekilde eklenmiştir.

**Tablo 4.3’**de iz element için belirtilen miktarlar 50 mL olacak şekilde, 0,1N HCl ile hazırlanmış ve 0,2 µm filtre ile steril edilmiştir.

**Tablo 4.3.** İz element içeriği (Rai vd., 2011a)

<b>İz elementler</b>	<b>g/L</b>
CoCl <sub>2</sub>	0,218
FeCl <sub>3</sub>	9,7
CaCl <sub>2</sub>	7,8
NiCl <sub>3</sub>	0,118
CrCL <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	0,105
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,156

### **4.3. Kloroform-Sodyum Hipoklorit Dispersiyon Yöntemi ile Polihidroksoktanoatın (PHO) Ekstraksiyonu**

MSM besiyerinde üretilerek elde edilmiş hücre lizatlarından PHO'nun ekstraksiyonu için kloroform sodyum hipoklorit dispersiyon yöntemi kullanılmıştır (Hahn vd., 1993; Rai vd., 2010). Bunun için Bölüm 4.2'de anlatıldığı gibi; MSM besiyerinde üretilmiş ve çöktürülmüş bakteri pelleti üzerine 50 mL %30 hipoklorit çözeltisi eklenmiş, homojen bir dağılım elde edilinceye kadar tüp vortekslenmiş ve dağıtılmış bakteri lizatı 250 mL'lik erlene aktarılmıştır. Üzerine bakteri içindeki polimeri çözmesi için 50 mL kloroform eklenerek 2 saat 30°C'de 200 rpm'de etüvde karıştırılmaya bırakılmıştır. Karıştırma sonrasında örnekler 50 mL'lik falkon tüplere alınarak 11.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Oluşan üç fazdan en alttaki kloroform fazı başka bir 50 mL'lik falkon tüpe toplanmış ve son hacim 5 mL olacak şekilde, kloroformun uçması için falkon tüplerin ağızlarına alüminyum folyo geçirilip delik açılarak, oda sıcaklığında kloroformun uçması için bekletilmiştir. Polimer içeren ve bu 5 mL'lik kalan kloroform fazı daha sonrasında 15'lik falkonlara 1 mL'lik porsiyonlar halinde bölünmüş, üzerlerine 14 mL soğuk (+4 C°) absolve alkol eklenmiştir. Polimerin alkol varlığı ile çökmesi için, tüpler bir gece oda ısısında, ağzı kapalı bir şekilde bekletilmiş daha sonra 11.000 rpm'de oda sıcaklığında 20 dakika santrifüjlenerek polimerin tüplerin dibine çökmesi sağlanmıştır. Tüplerden süpernatant kısım alınarak atılmış, kalan kloroformun uzaklaştırılması ve çöken polimerin kurumaya bırakılması için oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

PHO'nun ekstraksiyon çalışmalarının optimizasyonu ve en iyi ekstraksiyon yöntemini belirleme çalışmaları sırasında, kloroform yerine daha az toksik kalıntı bırakan diklorometan (DCM) organik solvan olarak kullanılmıştır. DCM ile olan ekstraksiyon işlemi yukarıda belirtilen yöntemle aynı basamakları içerecek şekilde uygulanmıştır. Gram negatif bir suş olan *Pseudomonas mendocina*'dan polihidroksialkanoatın eldesi sırasında kullanılan diklorometan gibi solvanlar, membran yapısındaki lipopolisakkaritleri (LPS)'de çözer, bu da elde edilen polimerde kirliliğe yol açar. Kirliliğin uzaklaştırılması için önerilen, polimerin asetonda çözünmesi ve tekrar alkol ile çöktürülmesidir (Rai vd., 2011b). Bu nedenle, DCM ile yapılan ekstraksiyon yönteminde, kurutulan polimerin asetonla çözünmesinden sonra, üzerine soğuk etanol eklenerek çöktürülmesi işlemleri eklenmiştir. Çöktürülen polimer, süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tekrar kurumaya bırakılmıştır. Daha sonrasında tüm tüplerdeki örnekler toplanarak verim hesabı için tartılmıştır.

Mcl-PHA'ların asetonda çözünürlüğü vardır. Bu yöntemde kullanılan asetonun polimeri çözmesi ve süpernatantın atılması nedeniyle PHO'nun bir kısmının kaybedilmesi söz konusudur (Rai, 2010). Bu bilgi eşliğinde, her iki yöntemle elde edilen PHO'nun mikarları karşılaştırılmış ve kayıplar olduğu düşünüldüğünden bu adım her aşamada uygulanmamıştır.

#### **4.4. Kurkumin Yüklü Film Formülasyonu**

Polihidroksioktanoatlar, yapısı gereği çok yapışkan formdadır (Rai, 2010). Bu özellikte polimerin film formülasyonu yapılması oldukça zordur. Bunun yanı sıra polihidroksialkanoatların biyodegradasyonunun uzun süre aldığı bilinmektedir. Mcl-PHA olan PHO'nun fosfat tamponunda biyodegradasyonunun 60 günü aştığı bilinmektedir (Marois vd., 2000). Elde edilecek film formülasyonunun esnek ancak yapışkan olmayan formda olması istenmektedir. Bu sebeple hidrofilik özelliği ile suda çözünen, çözünmesi ile PHA'nın degradasyonunu hızlandırması ve az elde edilen PHA'nın miktarını arttırmak amacıyla toksik olmayan ve film yapısı oluşturabilen polimerlerden Kollicoat MAE 100 P ve PEG400 formülasyonlara dahil edilmiştir (Vuksanović vd., 2013; Li, 2016; Tüylek, 2017). Film yapının temelini oluşturacak Kollicoat MAE 100 P ve PEG400 karışımları hazırlanmıştır.

Bu amaçla; 800 mg Kollicoat MAE 100 P ve 700 mg PEG400 tartılmış ve 500 µL dH<sub>2</sub>O ve 9 mL Metanol ile çözülmüştür. Formülasyon teflon bir yüzeye dökülerek su ve metanolün tamamen uçması için 2 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen boş film, FB olarak kodlanmıştır (Tablo 4.4).

Daha sonrasında, elde ettiğimiz PHO'nun 20 mg'ı 200 µL DCM de çözülmüştür. Kullanılan PHO'nun %10'u kadar, yani 2 mg kurkumin tartılarak, 90 µL metanolde çözülmüştür. PHO ve kurkumin birleştirilerek vortekslenmiş, iyice karışması sağlanmıştır ve belirli ağırlıklarda steril bisturi ile kesilen FB filmler üzerine damlatılarak 1 gün oda sıcaklığındaorganik çözücülerin uçması için bekletilmiştir. Elde edilen sistem FB+(PHO+kur) olarak adlandırılmıştır. Hazırlanan film teflon yüzeyden çıkarılmıştır ve belirli ağırlıklarda parçalara steril bisturi ile ayrılarak salım çalışması ve hücre kültürü çalışmaları için oda ısında saklanmıştır.

Karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmalarında kurkuminin etkinliğini belirlemek amacıyla, kontrol olarak, kurkumin içermeyen PHO'lu film yapı hazırlanmıştır. Bunun

için 20 mg PHO 200 µL DCM de çözülmüştür ve FB kodlu baz film üzerine damlatılarak 1 gün oda ısısında bekletilmiştir. Elde edilen film, FB+PHO olarak kodlanmıştır.

Bir diğer film formülasyon için ise; yine 800 mg Kollicoat MAE 100 P ve 700 mg PEG400 tartılmış ve 500 µL dH<sub>2</sub>O ve 9 mL Metanol ile çözülmüştür, üzerine 1 mL metanolde çözüldürülmüş 2 mg kurkumin çözeltisi ileve edilmiştir. Formülasyon teflon bir yüzeye dökülerek oda sıcaklığında 2 gün kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan yüzeyden belirli ağırlıklarda steril bisturi ile kesilmiştir. Elde edilen kurkumin yüklü film, FK olarak kodlanmıştır.

Sisteme yüklenebilecek kurkimin miktarını arttırmak ve homohen bir şekilde dağıtabilmek amacıyla; elde ettiğimiz PHO'nun 20 mg'ı 200 µL DCM de çözülmüştür. Kullanılan PHO'nun %10'u kadar, yani 2 mg kurkumin tartılmış, 90 µL Metanolde çözülmüştür. PHO çözeltisi içerisine kurkumin çözeltisi eklenerek vortekslenmiş, iyiye karışması sağlanmıştır. Daha sonra, FK kodlu filmin belirli ağırlıklarda hazırlanan parçaları üzerine damlatılarak oda sıcaklığında 1 gün kuruması beklenmiştir. Oluşturulan film, FK+(PHO+kur) olarak kodlanmıştır. Hazırlanan film teflon yüzeyden çıkarılmıştır ve belirli ağırlıklarda parçalara steril bisturi ile ayrılarak salım çalışması ve hücre kültürü çalışmaları için oda ısısında saklanmıştır.

**Tablo 4.4.** Oluşturulan filmlerin kodları

Film içeriği	Kodu
Film boş (Kollicoat MAE 100 P + PEG400)	FB
Film kurkumin yüklü (Kollicoat MAE 100 P + PEG400 + kurkumin)	FK
Film boş + kurkumin yüklü PHO	FB+(PHO+kur)
Film kurumin yüklü + kurkumin yüklü PHO	FK+(PHO+kur)
Film boş + PHO	FB+PHO

## 4.5. PHO'nun ve Film Formülasyonlarının Karakterizasyonu

### 4.5.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) Analizi

SEM, malzemelerin yüzey özelliklerini ve morfolojisini gözlemlemek için örnek yüzeyine yüksek enerjili elektron göndererek, çıkan elektronlar/X-ışınlarını analiz etmede kullanılan cihazdır (Sharma vd., 2018).

Polimerin yüzey topografyası 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. Belirlenen 5 farklı örnek cam plaka üzerinde SEM cihazı altında incelenmiştir.

#### **4.5.2. Yapısal özelliklerin belirlenmesi**

##### **4.5.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi**

FT-IR Spektroskopisi, IR radyasyonu ile katı, sıvı veya gaz halde olabilen numune arasındaki etkileşimin belirlenmesine dayanan bir tekniktir. Kızılötesi spektroskopi genellikle enerji-madde etkileşimini ifade eden temel moleküler titreşim mekanizmasıdır. Numunenin emdiği frekansları ve ayrıca bu absorpsiyonların yoğunluğunu ölçer. Numunedeki bütün bileşikler IR spektral bölgesinde karakteristik absorpsiyon/emisyon gösterdiğinden ve bu özelliğe dayanarak FT-IR spektroskopisi kullanılarak hem niceliksel hem de niteliksel olarak analiz edilebilirler. Bileşenin konsantrasyonu emilimin yoğunluğuna göre belirlenebilir (Maria, 2012; Xu vd., 2013).

IR'nin diğer analiz tekniklerine göre en büyük avantajı, homonükleer diatomik moleküllerin (örn., N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, vb.) dışında, tüm bileşiklerin IR emilimini göstermesi ve böylece analiz edilebilmesidir. IR spektroskopisi, her örneğin bir spektrumu, saniyeler içinde ayrıntılı örnekler olmadan elde edilir (Bacsik vd., 2004).

Ekstrakte edilmiş PHO 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<sup>-1</sup> bölgesindeki emilim dalga boyuna karşı ölçülmüştür.

##### **4.5.2.2. Nükleer manyetik rezonans (NMR) Analizi**

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi organik bileşiklerin yapısının anlaşılmasında kullanılan yöntemdir. Atom çekirdekleri kimyasal bilgi vermek için kullanılacak manyetik özelliklere sahiptir (Edwards vd., 2009). Atom çekirdekleri

hem proton hem de nötronları içerir (Pykett vd., 1982). Kuantum mekanik olarak atom altı parçacıkların (protonlar, nötronlar ve elektronlar) spinleri vardır. Bazı atomlarda (örn. 12C, 16O, 32S) bu dönüşler eşleştirilir ve birbirini iptal eder. Böylece atom çekirdeğinin toplam dönüşü olmaz. Bunun yanında, birçok atom (1H, 13C, 31P, 15N, 19F vb.) çekirdeği genel bir dönüşe sahiptir. Belirli bir çekirdeğin dönüşünü belirlemek için belirli kurallar vardır. Nötron sayısı ve proton sayısı eşitse, çekirdeğin dönüşü yoktur. Nötron sayısı ve proton sayısı toplamı eşit değilse, çekirdeğin yarı tamsayı dönüşü vardır (1/2, 3/2, 5/2). Nötron sayısı ve proton sayısı her ikisi de eşit değil ise, çekirdeğin bir tamsayı dönüşü vardır (1, 2, 3) (Edwards vd., 2009). Nükleonların her biri ilişkili bir elektriksel değişim dağılımına sahip olduğundan, net dönüş veya spin manyetik alan oluşturur (Pykett vd., 1982). Her aktif çekirdek, karakteristik bir sinyal verir. NMR analizinde, manyetik alan kuvveti ile rezonans frekansı arasındaki ilişki nedeniyle NMR skalası spektrumları normalleştirilmelidir. Spektrometre frekansını referans olarak kullanarak, kimyasal kaymaların değerleri ppm cinsinden verilir (Diehl, 2008).

1H NMR, DSC ve FTIR gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında, kompleks yapıları ve diğer olası etkileşimlerin güçlü şekilde ayrımını yapabilen araçtır (Jahed vd., 2014).

Organizmadan ekstakte edilen PHA'nın, hazırlanan formülasyonların ve kurkuminin yapısal karakterizasyonu 1H NMR kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ekstrakte edilen polimer, 10 mg/ml konsantrasyonda deuterodimetil sülfoksit (DMSO-d<sub>6</sub>) içerisinde süspansiyon edilmiştir. 1H NMR spektrumları, 25 ° C'de 10 µs darbe genişliği (90 ° darbe açısı), 6103,516 Hz spektral genişlik, 16384 veri noktası ile Bruker UltraShield 300 spektrometresi (Bruker, ABD) üzerinde elde edilmiştir.

#### **4.5.2.3. X ışını kırınımı (XRD) analizi**

X ışını kırınımı (XRD), malzemelerin yapıları, fazları, kristal yönelimler ve ortalama tane büyüklüğü, kristallik, gerinim ve kristal kusurları gibi diğer yapısal parametreleri içeren karakterizasyonunu hakkında bilgi sağlayan güçlü bir tekniktir. (Bunaciu vd., 2015).

PHO'nun kristalitesinin tayini için, 40kV ve 15mA Cu-K<sub>a</sub> radyasyonu kullanılarak MİNIFLEX 600 Model X-ışını difraktometre (Rikagu, Japonya) cihazı üzerinde toplanan

sinyaller kaydedilene X ışını kırınımı analizi yapılmıştır. Veriler 2 °/dak tarama hızı kullanılarak sürekli tarama modunda 5°-70°'lik 2θ aralığında kaydedilmiştir.

#### **4.5.2.4. Diferansiyel tarama kalorimetresi (DSC) analizi**

Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), numune ve referansın konulduğu iki özdeş fırından oluşan, numunedeki reaksiyonlara göre; ısı değişikliklerini tespit ederek, sıcaklığın fonksiyonu olarak bir referansa karşı malzemelerin fiziksel veya kimyasal özelliklerindeki değişiklikleri izlemek için kullanılan termoanalitik bir tekniktir (Biliaders vd., 1983; Klančnik vd., 2010).

Polimerin termal özelliği erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>), bir DSC-60 (Shimadzu) ekipmanı kullanılarak diferansiyel tarama kalorimetre (DSC) çalışması yapılarak ölçülmüştür. Çalışma için kullanılan polimer ve formülasyonların miktarı 1 ile 2 mg arasında değişmekte ve standart alüminyum hücrelerde kapsüllenmişlerdir. Numuneler, 30 °C ve 300 °C sıcaklık aralığında dakikada 10 °C'lik bir ısıtma oranında ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Sıcaklığın alt ve üst derecesi analizi yapılacak olan örneklerin içeriklerine göre seçilmiştir. Polimerin erime derecesi Gagnon ve arkadaşlarının 1992'de ve Dufresne A. 2000'de yaptığı çalışmalar ile 40-60°C arasında bulunmuştur. Kurkumin etkin maddesinin erime sıcaklığı Silva arkadaşlarının 2017'de yaptığı çalışma ile 170-180°C arasında bulunmuştur. Film yapı için kullanılan diğer maddeelerin erime sıcaklıkları da 30-300°C aralığındadır.

### **4.6. Film Formülasyonlarının *in vitro* Salım Çalışması**

#### **4.6.1. Kurkimine ait kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi**

Hazırlanan film sistemlerinden kurkuminin salım profilinin belirlenmesi için öncelikle kurkuminin tayin yöntemi üzerinde çalışılmıştır. Bunun için UV spektrofotometre kullanılmıştır. Kurkuminin kalibrasyon eğrisini belirlemek için öncelikle kurkumin metanolde çözülerek, spektrum taraması yapılmış ve 421 nm'de kurkumin piki gözlenmiştir.

100 ppm stok kurkumin solüsyonu 1:1(h:h) oranında PBS:Metanol solüsyonunda hazırlanmıştır. Bu stoktan 1:9 oranında seyreltme yapılarak, 10 ppm stok kurkumin solüsyonu hazırlanmıştır.

Kurkumin kalibrasyon eğrisinin belirlenmesi için, 10 ppm stok kurkumin solüsyonu, 1:1(h:h) oranında PBS:Metanol çözeltisi ile Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'de verilen

oranlarda seyreltilmiş ve 421 nm'deki absorbands değerleri belirlenmiştir (Tamahkar, 2017).

PEG400, Kollicoat MAE 100 P, PEG400 + Kollicoat MAE 100 P karışımı, PEG400 + Kollicoat MAE 100 P + kurkumin karışımlarının 1:1 oranında PBS:Metanol solüsyonu ile çözülerek, 200-800 nm aralığında spektrum taraması yapılmış olup, 421 nm'de kurkumin içeren karışım hariç diğer maddelerde veya karışımda pik gözlenmemiştir. Bu durumda 421 nm'de absorbands alındığında sadece kurkuminin dedekte edileceği tespit edilmiştir.

Film formülasyonlarında kullanılacak olan etkin madde olan kurkuminin kalibrasyon grafiği oluşturulmadan önce metanolde çözülerek, spektrum taraması yapılmış ve 421 nm'de kurkumin piki gözlenmiştir.

100 ppm stok kurkumin solüsyonu 1:1(v:v) oranında PBS:Metanol solüsyonunda hazırlanmıştır. Bu stoktan 1:9 oranında seyreltme yapılarak, 10 ppm stok kurkumin solüsyonu hazırlanmıştır.

Kurkumin salım miktarının belirlenmesi için 1:1(v:v) oranında PBS:Metanol ile belirlenen seyreltme oranları (Tablo 4.5, Tablo 4.6) ile 421 nm'de kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. (Tamahkar, 2017).

PEG400, Kollicoat MAE 100 P, PEG400 + Kollicoat MAE 100 P karışımı, PEG400 + Kollicoat MAE 100 P + kurkumin karışımlarının 1:1 oranında PBS:Metanol solüsyonu ile çözülerek, 200-800 nm aralığında spektrum taraması yapılmış olup, 421 nm'de kurkumin içeren karışım hariç diğer maddelerde veya karışımda pik gözlenmemiştir. Bu durumda 421 nm'de absorbands alındığında sadece kurkumin salım miktarı dedekte edileceği tespit edilmiştir.

Her bir analiz üç tekrarlı olarak çalışılmış ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak standart sapmaları belirlenmiştir.

**Tablo 4.5.** 10ppm kurkumin kalibrasyon grafiği miktar tablosu

	10 ppm stoktan alınacak miktar ( $\mu\text{L}$ )	1:1 (h:h) PBS:Metanol alınacak miktar ( $\mu\text{L}$ )
0 ppm	0	1000
1 ppm	100	900
2 ppm	200	800
3 ppm	300	700
4 ppm	400	600
5 ppm	500	500
6 ppm	600	400
7 ppm	700	300
8 ppm	800	200
9 ppm	900	100
10 ppm	1000	0

**Tablo 4.6.** 100ppm kurkumin kalibrasyon grafiği miktar tablosu

	100 ppm stoktan alınacak miktar ( $\mu\text{L}$ )	1:1 (h:h) PBS:Metanol alınacak miktar ( $\mu\text{L}$ )
0 ppm	0	1000
10 ppm	100	900
20 ppm	200	800
30 ppm	300	700
40 ppm	400	600
50 ppm	500	500
60 ppm	600	400
70 ppm	700	300
80 ppm	800	200
90 ppm	900	100
100 ppm	1000	0

#### 4.6.2. Kurkiminin Film sistemlerinden salım çalışmaları

Bu çalışmanın amacı üretilen PHO' ile sistem geliştirmek olduğu için, PHO içerikli film formülasyonlarının salımları gerçekleştirilmiştir.

- FB+(PHO+kur)
- FK+(PHO+kur)

Başlık 4.4.'de belirtildiği gibi hazırlanan film örneklerinden FB+(PHO+kur) örneğinden 34.7 mg, 31.1 mg ve 37.0 mg tartılarak üç tekrarlı olacak şekilde ve FK+(PHO+kur) kodlu filminden 3 tekrarlı olacak şekilde 21.3 mg, 27.0 mg, 23.7 mg ve 26.1 mg olarak tartılmış 15 mL'lik falkon tüplerine konulmuştur (Tablo 4.7). Üzerlerine daha önceden sıcaklığı 37°C'ye ayarlanan pH 7,4 olacak şekilde hazırlanan fosfat buffer saline (PBS) solüsyonundan 8 mL her bir tüpe eklenmiştir. 15 mL'lik falkon tüpler yatay şekilde 37°C'ye ayarlanmış orbital çalkalayıcı (Stuart SSL1, İngiltere) üzerine sabitlenmiştir. Sıcaklık 37°C'de sabit tutularak 130 rpm çalkalama hızında 3 ay muhafaza edilmiştir ve belirli zaman aralıklarında 500 µL numune alınmış ve yerine 500 µL PBS eklenmiş hacim 8 mL tamamlanmıştır. Alınan numunelerin üzerine, 500 µL metanol eklenmiştir ve total 1 mL hacim santrifüj edilerek üst faz alınarak, 421 nm'de spektrofotometrede absorbans değerleri alınmıştır.

**Tablo 4.7.** Film formülasyonlarının belirlenen miktarları ve kurkumin içerikleri

FB+(PHO+kur)			
	Film ağırlığı	Kurkumin miktarı	İçerdiği PHO miktarı
1	37 mg	740 µg	740 µg
2	31,1 mg	622 µg	622 µg
3	34,7 mg	694 µg	694 µg
FK+(PHO+kur)			
	Film ağırlığı	Kurkumin miktarı	İçerdiği PHO miktarı
A	23.1 mg	465 µg	462 µg
B	27 mg	543 µg	540 µg
C	23.7 mg	477 µg	474 µg
D	26.1 mg	525 µg	522 µg

Salım çalışmasında, Cuppok ve arkadaşlarının 2011 yılında kullandıkları yöntemin modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. PBS için gerekli malzemeler ve miktarları Tablo 4.8’de verilmiştir.

**Tablo 4.8.** PBS için gerekli malzemeler ve miktarları

NaCl	8 gr
KCl	0,2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,22 gr

Salım deneyinde kullanılmak üzere 1 L PBS hazırlanmıştır. Tablo 4.7’ye göre tartımlar alınmış ve 800 mL distile suda çözülmüştür. 1N HCl ve 1N NaOH kullanılarak, pH 7,4’e ayarlanmıştır. Total hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 121 °C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (http-5).

#### 4.7. Sitotoksosite Deneyleri

Hücre canlılığının ve proliferasyonunun sayısal verilere dökülmesi, hücrelerin dış faktörlere verdikleri yanıt olarak çok sayıda in vitro testin temelini oluşturur. MTT testi hücre canlılığının ölçülmesinde kullanılan kolorimetrik bir analiz yöntemidir (Bahuguna vd., 2017). MTT [3- (4, 5-dimetiltiyazolil-2) -2,5-difeniltetrazolium bromür] sarı renkli suda çözülebilir tetrazolyum boyasıdır. Hücre (E, Z)’-5- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -1,3-difenilformazan (formazan)’a dönüştüren NAD(P)H’ye bağlı hücresel oksidoredüktaz enzimini içerir (Burton, 2005). Formazan ürünü, hücrelerin içinde çözünmeyen bir çökelti olarak birikir. Formazan ürününü çözünür hale getirmek, rengi stabilize etmek, fenol kırmızısı ve diğer kültür ortamı bileşenleri ile etkileşimi azaltmak için DMSO gibi maddeler ile etkileşimi gereklidir (Riss vd., 2016). Dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözünen formazan, 540 nm’de karakteristik emilim ile mor bir renk verir. Mor rengin yoğunluğu, hücre sayısı ile doğru orantılıdır ve bu nedenle hücre canlılığını gösterir (Bahuguna vd., 2017).

Hücre olarak insan keratinosit hücre hattı (HaCat) kullanılmıştır. DMEM besiyerinde pasajlanan HaCat hücreleri 37°C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında geliştirilmiştir.

Elde edilen jel formülasyonlarının sitotoksitesinin incelenmesi için hücre kültürü tekniklerinden faydalanılarak, MTT testi aşağıdaki adımlar takip edilerek uygulanmıştır.

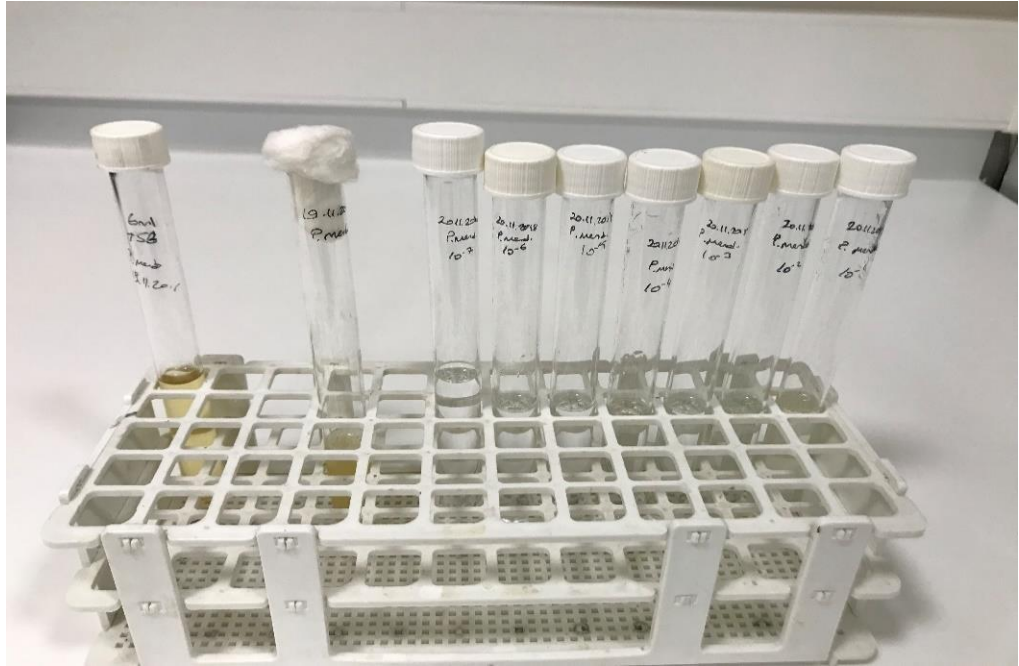
- DMEM besiyerinde CO<sub>2</sub> kabininde geliştirilen HaCat hücreleri hızlı büyüme evresine ulaştığında, 2X Tripsin/EDTA çözeltisi ile muamele edilerek hücreler flastan kaldırılmıştır.
- Tripsin miktarının 2 katı kadar besiyeri eklenerek, 1µL örnek alınarak Thoma lamında mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır.
- Mikroskopta inceleme sonucu yoğunluğu kuyu başına 17,500 olacak şekilde hazırlanarak 24 kuyucuklu plakalara ekim yapılmıştır.
- 24 saat CO<sub>2</sub> kabininde inkübasyon sonrasında besiyerleri dikkatlice çekilerek, 2 mL besiyeri eklenmiştir. Daha sonra, film formülasyonları kurkumin mikyari eşit olacak şekilde belirlenen miktarda hazırlanmış ve kurkumin için belirlenen sabit değer de tartılarak kuyulara laboratuvarımızda geliştirdiğimiz düzenek kullanılarak aşağıda anlatıldığı şekilde uygulanmıştır. Bu düzenek, kuyu tabanına yapışarak büyüyen hücrelere zarar vermemek, film sistemlerin hücre yüzeylerini kaplamaması ve filmlerin besiyeri içerisinde asılı kalması amacıyla planlanmıştır. Filmden salınan kurkumin ve polimerlerin homojen dağılımının sağlanabilmesi için, plakalar Cytation 5 plaka okuyucu içerisinde 1 saat aralıklarla 15 saniye orbital çalkalanacak şekilde programlanmış ve 72 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır.
- Uygulama öncesinde, kuyuların dibine temas etmeyecek şekilde hazırlanan metal ızgaralar %70 alkol içerisinde 2 saat bekletilerek steril edilmiştir.
- Steril kabin içerisinde metal ızgaralardaki alkol uçurularak 2 mL kuyulara yerleştirilmiş, üzerine film örnekleri konmuş ve çalkalama sırasında bu örneklerin hareket ederek hücre yüzeyine düşmemesi için üstü yine metal ızgara ile kapatılmıştır. Böylelikle, hazırlanan örnekler, well plate'de hücrelere değmeyecek şekilde yerleştirilmiştir.
- Kontrol grubu ve kurkumin içeren kuyular içerisine de boş metal ızgara eklenmiştir.
- Belirlenen miktarda kurkumin 20 µL %70 Ethanol de çözülmüş ve 2 mL DMEM besiyeri eklenerek HaCat cell ve metal ızgara içeren kuyuya uygulanmıştır.

- İnkübasyon sonrasında kuyulardaki besiyerleri uzaklaştırılmış ve içerisindeki metal ızgaralar dikkatlice çıkartılmıştır.
- Hücreler 1-2 mL PBS pH 7,4 ile nazıkçe yıkanmıştır.
- Her kuyuya 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan MTT boyasından 220 µL eklenerek, 4 saat CO<sub>2</sub> kabininde, 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra MTT boyası hücreler üzerinden dikkatlice çekilmiştir.
- Her bir kuyuya 1mL DMSO eklenerek 30 dakika CO<sub>2</sub> kabininde, 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında canlı hücrelerdeki renk değişimi belirlemek amacı ile Cytation 5 plaka okuyucuda 570 nm’de absorbans değerleri okutulmuştur.
- Deneydeki her bir örnek için her 24 well plate’de dört tekrarlı olarak çalışılmıştır.

## 5. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 5.1. *Pseudomonas mendocina* Suşunun Saflığının Kontrolü

ATCC53552 kodlu *Pseudomonas mendocina* suşu bölüm 4.1’de aktifleştirmek için gerekli olan ortam koşulları belirtildiği üzere canlandırma prosedürü gerçekleştirilmiştir. Canlandırılan organizmadan tek koloni düşürebilmek için Şekil 5.1’deki gibi seri dilüsyon yöntemi ile serum fizyolojik içerisinde seyreltmeler yapılarak besiyerine yayma ekimi sonucunda tek koloniler düşürülmüştür (Şekil 5.2).



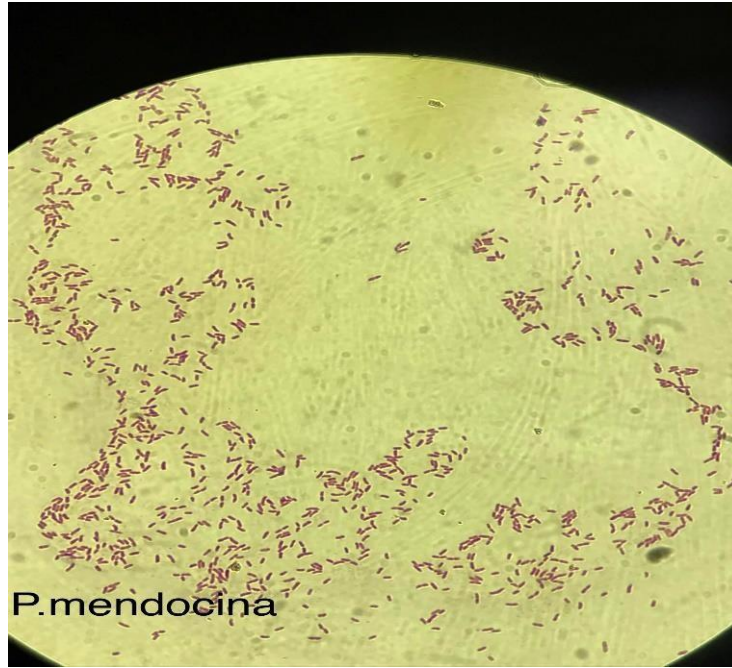
Şekil 5.1. *Pseudomonas mendocina* suşunun seri dilüsyonu



Şekil 5.2. *Pseudomonas mendocina* suşunun TSA yayma ekim sonucu

Bu tek kolonilerden gram boyama yapılarak (Bölüm 4.1.1) elimizdeki suşun Şekil 5.3.'de gösterildiği gibi 100x büyütmede ışık mikroskobu incelemesi sonucunda kolonilerin saf ve gram negatif basil formda olduğu gözlenmiştir. Gram negatif bakterilerin duvar yapısı gram pozitif bakteriler kadar güçlü değildir. Kristal violet çözeltisi ile boyama sonrasında etanol gibi organik solventler ile muamele adımı hücre duvarına zarar verir. Çoğunlukla hücrelerin sadece hayaletleri kalır. Böylece bir karşıt boya olan safranin, sadece geri kalan yapıları boyayarak kırmızı bir renk verir (Beveridge, 2001).

Bu veri *Pseudomonas mendocina* için literatürde verilen çubuk formunda ve gram negatif özellikte olması ve aynı zamanda koloni yapısının sarı krem renkli gözlenmesi ile literatür ile uyumludur (<http-1>).



Şekil 5.3. *Pseudomonas mendocina* suşunun gram boyaması sonucu

## 5.2. *Pseudomonas mendocina*'dan Polihidroksialkanoatın Üretim Prosesi

Polihidroksialkanoat üretimi için kullanılan mikroorganizma ve mikroorganizmanın yetiştirildiği koşullar elde edilen polimerin kimyasal ve fiziksel özelliğini değiştirdiği bilinmektedir (Mukheem vd., 2018). Polihidroksioktanoat (PHO)'nun homopolimer şeklinde üretilmesi için *Pseudomonas mendocina* suşunun

oktanoat besiyerinde belirli koşullarda yetiştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Rai vd., 2011a).

*Pseudomonas mendocina*'nın üretilmesi için gerekli olan n kültür koşulları bölüm 4.1.'de belirtildiği üzere gerçekleştirilmiştir. Kültüre edilen organizmalar 24 saat sonunda 450 nm'deki Optik Density (OD) değeri spektrofotometrede okutulmuştur (Rai vd., 2011b). Spektrofotometrik lm alındıktan sonra bu değer kültür üzerine steril besiyeri eklenip 0.8'e ayarlanarak her çalışmada sabitlenmiştir. %2 hacim/hacim olacak şekilde ikinci bir aşılama yapılarak 24 saat sonunda 450 nm'deki OD değeri spektrofotometrede okutulmuştur (Rai vd., 2011b) Spektrofotometrede alınan değer yaklaşık 2.0'dan çıkmaktadır. Bu değer kültür üzerine steril besiyeri eklenerek 2.0'a her çalışmada sabitlenmiştir.

Bu aşamadan sonra üretilen *Pseudomonas mendocina* suşları MSM besiyerine aktarılmış 48 saat inkübasyon sonucunda bölüm 4.2'de belirtildiği üzere sınırlayıcı ortam koşullarında polimerin üretilmesi sağlanmıştır. Hücrelerin bölüm 4.2'de değinildiği gibi liyofilizasyon yöntemi ile kuru hücre ağırlığı kontrol edilmiştir veya direk ıslak hücre şeklinde saklanmıştır.

Tüm deney boyunca genel izlenen prosedür olarak, ıslak hücrelerden direk PHA eldesi protokolüdür (Kourmentza vd., 2017). Bu prosedür kullanılarak, liyofilizasyon adımından dolayı yaşanan zaman kaybı önlenir.

DiĐer yöntemde ise; kuru hücre ağırlığını belirlemek için toplanan mikroorganizmalardan dört seti dondurularak, liyofilizatre konulmuş ve 1 gün kurutulup tartımları alınmıştır (Sofińska vd., 2019) (Tablo 5.1).

Kurutulan hücrelerden ekstraksiyon işlemi soncunda elde edilen polimerlerin % değeri Basnett ve arkadaşlarının 2019'da verdiği denklem 5.1'de belirtilen formül ile hesaplanmış ve Tablo 5.1'de verilmiştir.

$$\% \text{ Polimer Kütlesi} = \frac{\text{Polimer ağırlığı}}{\text{Biyokütle}} \times 100 \quad (5.1)$$

**Tablo 5.1.** *Liyofilize edilen hücrelerin kuru hücre ağırlıkları ve ekstrakte edilen polimerin % değeri sonuçları*

Örnek kodları	Liyofilize hücre ağırlığı	Ekstrakte edilen polimer % değeri
1. Örnek	0,4364gr	% 12.83
2. Örnek	0,3654gr	% 11.49
3. Örnek	0,3083gr	% 10.05
4. Örnek	0,3460gr	% 10.40

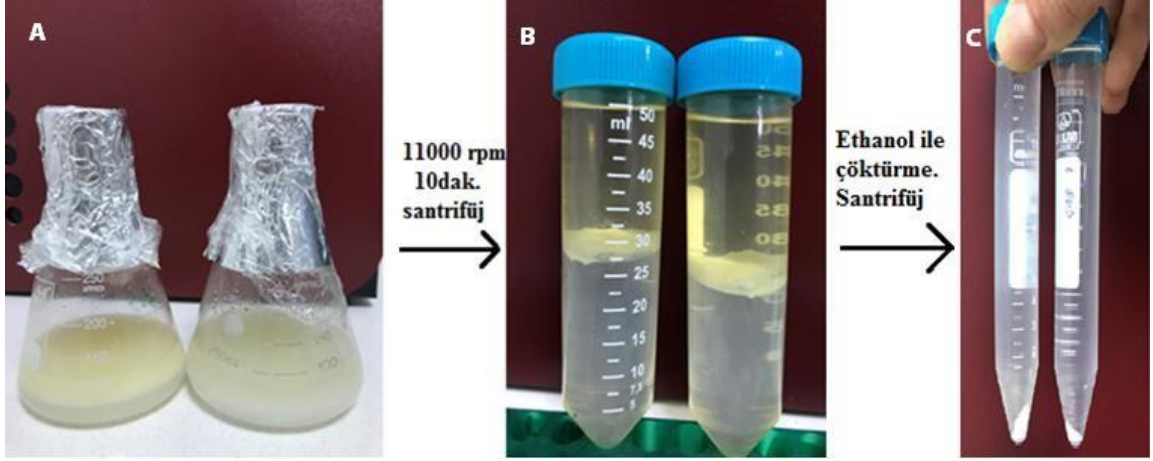
P. mendocina dan elde edilen % PHO polimer miktarları Tian vd., 2000'deki çalışmasında %45, Rai 2011'de yaptığı çalışmasında % 31.3 olarak bulunmuştur. Polimer miktarının, kültür koşullarının C/N oranları ve de kullanılan glikoz kaynağı miktarı ile değiştiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Bizim elde ettiğimiz polimerin % değeri bu değerlerden düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin octanoate miktarının az olması veya laboratuvar koşullarımızda kontrol edemediğimiz C/N oranına bağlı olduğu düşünülmektedir.

### **5.3. Polihidroksialkanoatın Ekstraksiyon Çalışması**

Ekstraksiyon için Tablo 2.3'de belirtildiği gibi farklı birçok yöntem vardır. Bu yöntemlerden kloroform sodyum hipoklorit dispersiyon yöntemi Kunasundari vd., 2011'de belirttiği üzere, PHA'nın yüksek saflıkta ve verimle elde edildiği yöntem olduğu için seçilmiştir. PHA'nın ekstraksiyon çalışması bölüm 4.3'de belirtilen protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon adımında optimum çalışma koşullarının 1:1 oranında %30 sodyum hipoklorit ve kloroformun kullanılarak 30 °C'de 60-150 dk arasında hücrelere uygulanmasının yüksek saflık ve verimde PHA eldesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Hahn vd., 1994; Jacquell vd., 2008). (Şekil 5.4).

İnkübasyon sonrasında örnekler 50ml'lik falkon tüpe alınarak santrifüjlenmiştir (Hahn vd., 1994) Oluşan üç fazdan, en alttaki kloroform fazı başka bir 50ml'lik falkon tüpe toplanarak uçması sağlanmıştır (Şekil 5.4). Bu aşamada, sodyum hipokloritin hücre zarına zarar vererek PHA'nın hücre dışına çıkmasını ve daha sonra kloroform ile hücre dışına salınan PHA'nın çözünmesi sağlanmıştır.



**Şekil 5.4.** *Pseudomonas mendocina* suşundan PHA'nın ekstraksiyon aşamaları. A; Sodyum hipoklorit ve kloroform ekli hal. B; Santrifüj sonrası 3 faz. C; Kloroform fazından Etanol ile polimerin çökeltilmesi

Kloroform içerisinde çözülmüş polimerin çöktürülmesi için belirlenen kloroform fazı ve alkol arasındaki oran yapılan denemeler ile belirlenmiştir. Buna göre en uygun alkol:kloroform oranı 10:1 olarak bulunmuştur ve mL'ye kadar uçurulan kloroform faz 15 mL'lik falkon tüplere eşit porsiyonda (1 mL) bölünmüş ve her bir tüpün üzerine 10 mL soğuk absolute alkol eklenmesi ile Şekil 5.4'de gösterildiği üzere çökelti şeklinde polimer tabakası gözlenmiştir. PHO'nun çökmesi için tüler ağzı kapalı olarak 1 gece oda sıcaklığında bekletilmiş ve santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelletin kuruması için tüpler ağzı açık şekilde oda sıcaklığında 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örnekler tartılmış ve veriler Tablo 5.2'de verilmiştir.

Literatürde Rai ve arkadaşlarının 2011'de aldıkları polimer miktarları ile hesaplanan verim ve bizim elde ettiğimiz polimer miktarları karşılaştırıldığında, polimer miktarının oldukça düşük verimle elde edildiği sonucuna varılmıştır. Polimer miktarları arasındaki farklılıkların ve de düşük oranda elde edilmesinin sebebi, koşulların tamamen optimize şartlar altında gerçekleşmemesinden ve bu nedenle polimer yapıda oluşabilen değişikliklerin, polimerin ağırlıklarındaki değişimler olarak sonuçlandırıldığı düşünülmektedir.

**Tablo 5.2.** Ekstrakte edilen PHO miktarları

Örnek kodu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Miktarı(mg)	17	15,4	10,7	50,3	55,4	32,1	33,2	39	31	56	36,1	56	60	42	30

Elde edilen örneklerin bazıları sarı ve yapışkan formda idi; bu yapılar asetonda çözüldükten sonra tekrar çöktürme aşamasında tamamen kayboldular ve bu nedenle tartımları alınamadı.

Lipopolisakkaritlerin lipofilik özellikleri nedeni ile organik çözücülerde çözüldüğü bilinmektedir (Nguyen vd., 2019). Mcl-PHA'ların da aseton da çözüldüğü bildirilmiştir. Bu sebeple aseton ile yıkama sırasında kaybedilebilmektedir (Rai vd., 2011b).

#### **5.4. Kurkumin Yüklü Film Formülasyonlarının Hazırlaması**

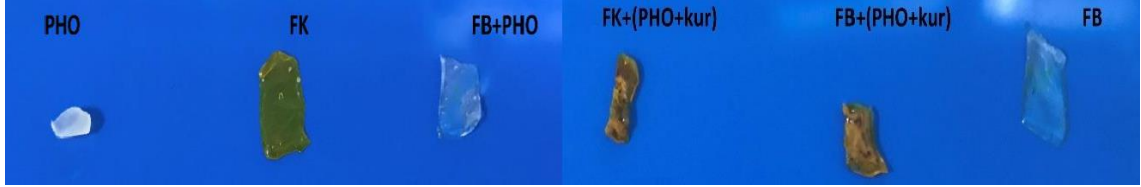
Mcl-PHA'lar elastomerik yapıda olup düşük mekanik güce sahip elastomerik yapısı ile doku mühendisliği uygulamalarında film olarak kullanılması için idealdirler (Renard vd., 2010). Ancak biyomedikal uygulamalar, doku mühendisliği ve diğer spesifik uygulamalar için fiziksel ve mekanik özelliklerinin çeşitlendirilmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir (Hazer vd., 2006). Bunun yanı sıra suda çözünmediği için yıkım süresi ve dolayısı ile ilaç salım süresi uzundur (Sparks vd., 2008). Bu sebeple tek başlarına film formuna gelmeleri oldukça zordur. Ayrıca salım süresinin bu kadar uzun olması yara iyileşmesinde sorun olabileceği düşünülmektedir.

PHA'nın biyomedikal olarak uygun hale getirmek için yara bölgesine uygulanacak olan film formülasyonlarından etken maddenin salımını hızlandıracak olan diğer yardımcı maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. PEG hücre zarları ile etkileşir ve hücre füzyonunu etkileyen jelatin yapı oluşturur (Jäschke vd., 1994; Gohel vd., 2003). Taşıyıcı sistemin hidrofiliğini arttırarak bozunma hızını arttır ve bozulma sonucu asitliği azaltır (Huang vd., 1997). Kollicoat ise; film yapısı oluşturur ve pH 5'in üstünde bozularak taşıdığı etken maddeyi salmaya başlar (Amado vd., 2017; Prada vd., 2019).

Cildin pH değeri 4-6 arasındadır (Ali vd., 2013). Kollicoatın pH değeri 5 üstünde parçalanmaya başlaması cilt dokusunda ilacın salımını sağlar. Kollicoat MAE 100 P ve PEG400'ün sahip oldukları özellikler ile yara iyi edici film formülasyonunda kullanılmaları uygundur.

Elde etmeyi hedeflediğimiz polihidroksialkanoat yapısı gereği daha elastiktir. Bu sebeple tek başlarına film formuna gelmeleri oldukça zordur ve diğer polimerlerle birlikte kullanılmaları gerekmektedir. Bu amaçla Kollicoat MAE100P ve PEG400'ün belirli

oranlarda film formları denenmiş ve uygun miktarlar belirlenmiştir ve bölüm 4.4'de verilen yöntem ile film formülasyonları hazırlanmıştır (Şekil 5.5).



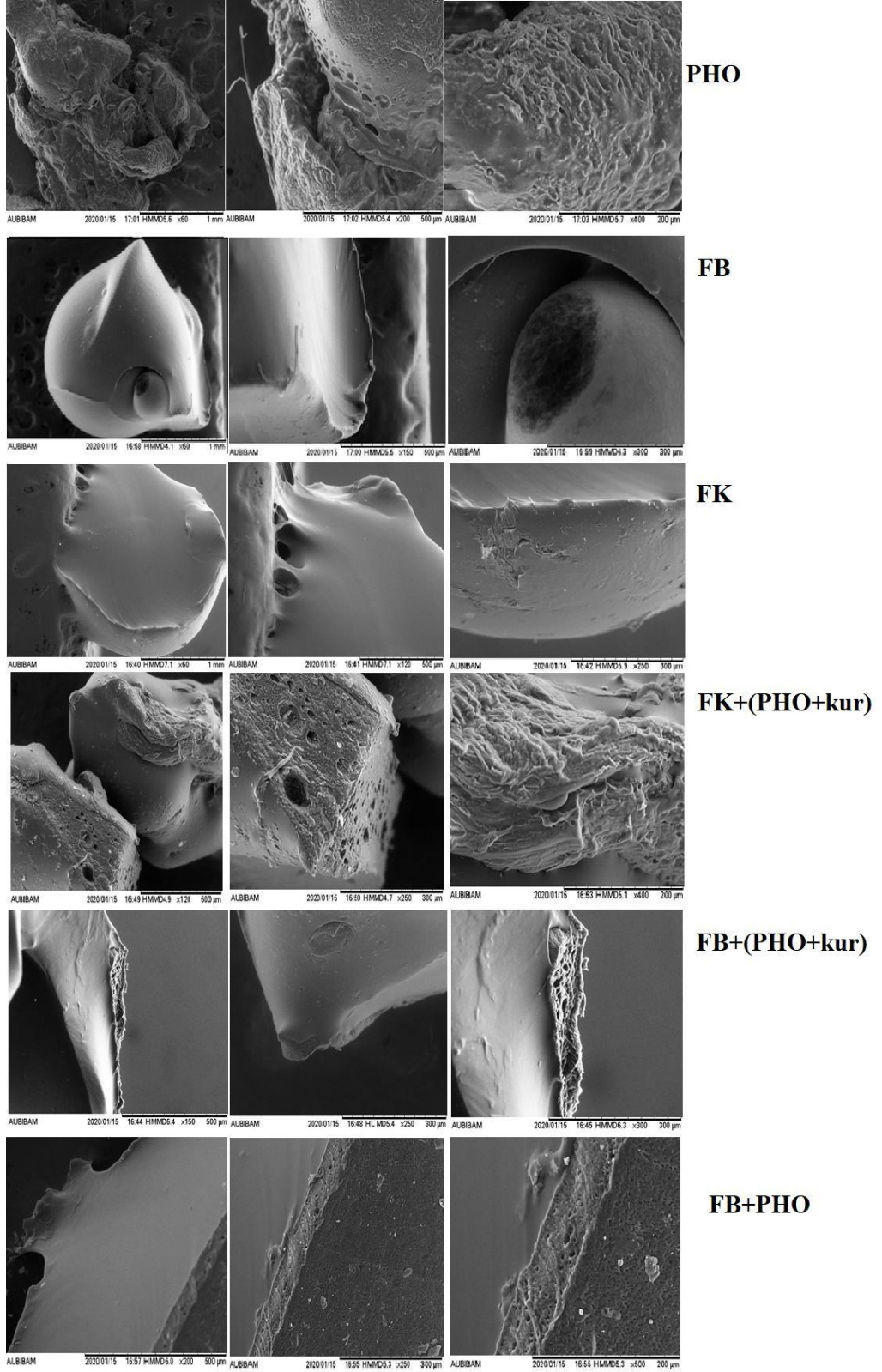
Şekil 5.5. Film formülasyonları ve PHO

## 5.5. Karakterizasyon Çalışması Sonuçları

### 5.5.1. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Bu teknik, örnek yüzeyinin görüntülenmesi için kullanılır ve tüm yüzey alanına odaklanıldığı için büyük alan derinliği olan görüntüler sağlayabilir (Liu vd., 2012). SEM cihazı, iki katot ışın tüpü (CRT) oluşur. Bunlardan birinde incelenecek olan nesne yüzeyi, düşük enerjili bir elektron demeti (1-30 keV) ile bombardımana tabi tutulur. Bu bombardımanın etkisi ile ve numuneden geri saçılan elektronlar, ikincil elektronlar ve karakteristik X-ışınları uygun bir dedektör tarafından algılanır ve CRT'de gözlenir veya ikinci bir şebekeye orantılı bir voltaj sinyali gönderilir. Her iki CRT de eşzamanlı olarak tarandığından, örneğin CRT üzerinde numunenin görüntüsü nokta nokta oluşturulur (Leamy, 1982; Dudkiewicz vd., 2011). Çıkan elektronlar/X-ışınları, materyalin topografyası, morfolojisi, bileşimi, tanelerinin oryantasyonu, kristalografik (atom düzenlenmeleri) bilgileri hakkında bilgi verir. Morfoloji şekli ve boyutu gösterirken, topografya bir nesnenin yüzey özelliklerini, dokusunu, pürüzsüzlüğü/pürüzlülüğünü gösterir (Sharma vd., 2018).

Odaklanmış iyon demeti ile SEM'de 3D görüntü alınabilir (Liu vd., 2012). Görüntü oluşturma yönteminin büyük avantajı, SEM cihazına farklı tipte dedektörlerin takılması ve aynı anda çalıştırılabilmesidir (Leamy, 1982).



Şekil 5.6. Film formülasyonlarının farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri

Hazırlanan her bir film yapı, el ile esnetilebilir ve yumuşak yapıya sahip olarak film yapıyı oluşturmuştur. PHO'nun yapışkan ve esneyebilir plastik özelliğini, girdiği tüm formülasyonlara da verdiği görülmüştür. İleriki çalışmalarda gerekli cihazlar kullanılarak filmlerin esneme özelliklerinin belirlenmesi çalışmaları planlanmaktadır. SEM görüntülerinden alınan sonuçlar, hazırlanan film formülasyonların dış yüzeylerinin pürüzsüz olduğunu, iç yüzeylerinde ise porlu bir yapının oluştuğunu göstermektedir (Şekil 5.6). PHO'nun yer almadığı FK formülasyonunda iç kısımlarında porlu yapı gözlenmezken, PHO varlığında yan kesit alınması mümkün olmuş ve PHO'ya bağlı olarak porlu yapıların oluştuğu düşünülmüştür. Bu da oluşturulan formülasyonlarda, kullanılan PHO'nun diğer polimerlerle homojen olarak karıştığını ve her iki yapısında kendi özelliklerini göstermeye meyilli olduğunu işaret etmektedir.

## **5.6.2. Yapısal özelliklerin belirlenmesi**

### **5.6.2.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi**

Kızılötesi spektroskopisi, enerji-madde etkileşimini ifade eden analiz yöntemidir. Numunedeki bütün bileşikler belirli frekanslarda titreşir ve karakteristik absorpsiyon /emisyon gösterir. Bu özelliğe dayanarak, FTIR spektroskopisi ile numunenin hem niceliksel hem de niteliksel analizi yapılabilir (Maria, 2012; Xu vd., 2013).

PHO'nun IR spektrumu mcl-PHA'ların tipik yapısını göstermektedir.  $3400\text{ cm}^{-1}$ 'e yakın bant, PHO son grubunun OH gerilmesine,  $1730\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$  aralığında özellikle  $1725\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen güçlü pik ester karbonil grubunda CO'nun gerilmesi olarak yorumlanır.  $2925\text{ cm}^{-1}$  ve  $2850\text{ cm}^{-1}$  arasındaki iki yoğun bant,  $\text{CH}_2$ 'nin ve  $\text{CH}_3$  gruplarının simetrik ve antisimetrik gerilmesine ve yaklaşık  $720\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pikler, polimerin temel yapısını oluşturan tekrarlayan metil grupları olarak yorumlanan titreşimleri gösterir (Sofiska vd., 2019).  $1467\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik alifatik  $-\text{CH}_2-$  bağımlı göstermektedir.  $1380\text{ cm}^{-1}$ 'deki güçlü pik ise C-CH<sub>3</sub> bağındaki gerilmeyi göstermektedir. Ester gruplarında uzanan güçlü  $1320, 1160$  ve  $1100\text{ cm}^{-1}$  pikleri eter (C-O) grubuna aittir (Rai., 2010, Marois vd., 2000).  $1453\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik kristalitenin şiddetini veren piktir (Rai., 2010).

PHO'nun FTIR analizi sonucunda elde edilen spektrumda,  $2918\text{ cm}^{-1}$  ve  $2951\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen iki pik  $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  grupları arasındaki gerilmeyi gösteren pikler olduğu düşünülmektedir.  $1726\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikin ester karbonil grubuna (C=O) ait pikin görüldüğü  $1730\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ 'deki aralıkta olduğu için bu grubu gösterdiği düşünülmektedir.  $1458\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pikin büyüklüğü kristalliteyi belirleyen pik ile yaklaşık aynı

bölgede gözlenmiştir.  $1377\text{ cm}^{-1}$ ,  $1161\text{ cm}^{-1}$  ve  $1097\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen piklerin eter gruba ait olduğu ve  $720\text{ cm}^{-1}$  civarında görülen pikler tekrarlayan metil gruplarını gösteren pikler olduğu literatür bilgisi ile teyit edilmiştir (Şekil 5.7 (e), Şekil 5.8 (e)).

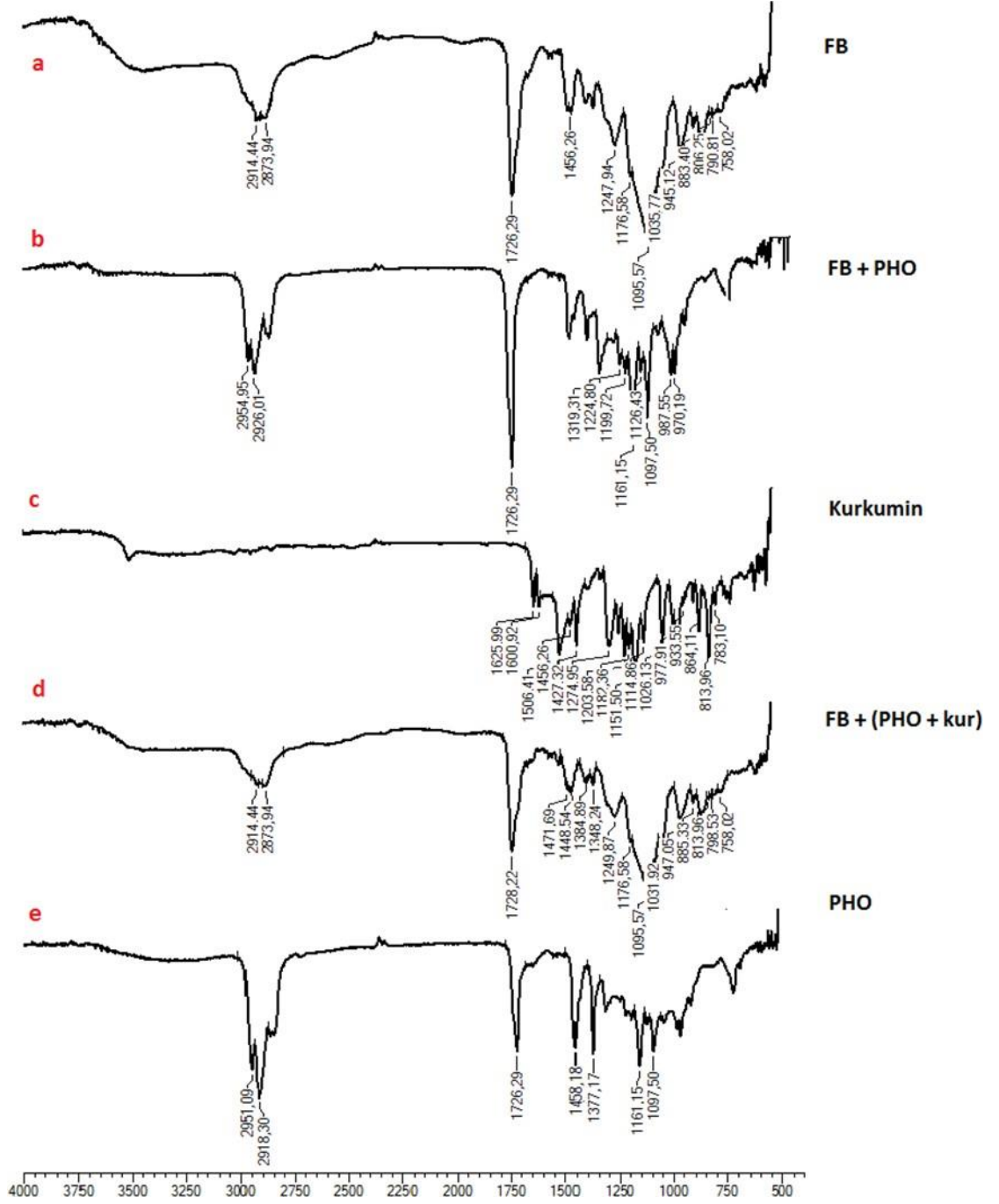
*P.mendocina*'nın oktanoat besiyerinde yetiştirilmesi sonucunda homopolimer olarak, polihidroksioktanoatın elde edilmesi beklenmektedir. FTIR analizi sonucunda PHO için elde edilen spektrum verisi, literatürdeki PHO için farklı veriler ile karşılaştırıldığında uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Bu sonuca göre; ekstraksiyon ürünümüzün PHO olduğu kanıtlanmıştır.

Boş film formülasyon içeriğinde Kollicoat MAE100P ve PEG400 kullanılmıştır. Kollicoat MAE100P'nin IR spektrumuna bakıldığında  $3421\text{ cm}^{-1}$ 'de karakteristik geniş bir bant gösterir.  $1637\text{ cm}^{-1}$ 'de C = O germe titreşim bandı ve OH gerilmesine aittir.  $2915\text{ cm}^{-1}$ 'de bir CH gerilmesine ait pike aittir.  $1723$  ve  $1698\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler karbonil grubunu temsil eder (Majeed vd., 2017).

PEG400'ün IR spektrumuna bakıldığında  $1347\text{ cm}^{-1}$ 'de antisimetrik C-O-C gerilmesine ait titreşim,  $2860\text{ cm}^{-1}$ 'de civarında C-H gerilmesine ait titreşim (Yu vd., 2014).  $1106\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik, C-O fonksiyonel grubunun gerilme titreşimi neden olduğu,  $3357\text{ cm}^{-1}$ 'deki tepe noktası, O-H fonksiyonel grubunun germe titreşimine aittir (Karaman vd., 2011).  $950$ ,  $2871$ ,  $2886$ ,  $3749\text{ cm}^{-1}$ 'de-CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub>- gerilmesine ait karakteristik pikler verir (Karaman vd., 2011, Elmarzugi vd., 2014). Bunlar dışında  $885$ ,  $944$ ,  $1096$ ,  $1146$ ,  $1287$ ,  $1296$ ,  $1349$ ,  $1556$ ,  $1772$ ,  $2710$ ,  $2886$  ve  $3711\text{ cm}^{-1}$ 'de PEG 400'e ait pikler gözlenmektedir (Elmarzugi vd., 2014).

Boş film formülasyonunun FTIR analizine bakıldığında, Kollicoat MAE100P'nin  $3400\text{ cm}^{-1}$  civarlarında karakteristik bir geniş bant gösterdiği görülmektedir.  $2914\text{ cm}^{-1}$ 'de Kollicoat ve PEG400'ün her ikisinde gözlenen CH gerilme ait pik ve  $2873\text{ cm}^{-1}$ 'de PEG400'ün CH gerilme iat pik gözlenmektedir.  $1726\text{ cm}^{-1}$ 'de Kollicoat MAE 100P'nin karakteristik karbonil grubuna ait pik gözlenmektedir. Kollicoat'ın  $1600\text{ cm}^{-1}$ 'lerde gözlenen C=O gerilmesi, PEG400'ün  $1350\text{ cm}^{-1}$ 'lerde gözlenen titreşimi ile maddeler arasındaki yeni bağlardan kaynaklı olduğu düşünülen  $1456\text{ cm}^{-1}$ 'de yeni bir titreşim olarak gözlemlenmiştir. PEG 400' ün spesifik piki olan C-O fonksiyonel grubuna ait pik  $1095\text{ cm}^{-1}$ 'de alınmıştır.  $994\text{ cm}^{-1}$  ve  $883\text{ cm}^{-1}$ 'de titreşiminde diğer spesifik pikler alınmıştır (Şekil 5.7 (a), Şekil 5.8 (b)).

Boş film formülasyonu elde edilen PHO ile birleştirildiğinde oluşan formülasyonun spektrum analizinde, PHO'nun  $2918\text{ cm}^{-1}$  ve  $2951\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen iki pik ve  $2914\text{ cm}^{-1}$ 'de Kollicoat ve PEG400'ün her ikisinde gözlenen CH gerilme ait pik Kollicoatın  $3400\text{ cm}^{-1}$  'deki gerilmesinden kaynaklı  $2954\text{ cm}^{-1}$  ve  $2926\text{ cm}^{-1}$  piklerini verecek şekilde gerilmede kayma gözlenmiştir. Ayrıca  $2873\text{ cm}^{-1}$ 'de PEG400'ün CH titreşimine ait pik aynı gerilmeden kaynaklı pik şiddeti düşmüş ve geniş bir pik göstermiştir.  $1726\text{ cm}^{-1}$ 'de hem Kollikocat MAE100P hem de PHO'daki karbonil grubuna ait pikler birleşerek pik şiddetinde artış göstermiştir.  $1458\text{ cm}^{-1}$ 'de PHO'da gözlenen ve kristaliteyi belirleyen pik FB formülasyonundaki  $1456\text{ cm}^{-1}$  gerilmesi ile yaklaşık aynı yerde olacak şekilde pik şiddetinde azalma şeklinde gözlenmiştir. Bu pikin şiddetinin azalması kristalitede düşüş yaşanması ile uyumlu sonuç göstermektedir.  $1097\text{ cm}^{-1}$ 'de hem PHO hem de PEG400'ün karakteristik piki aynı bölgede birleşerek artan bir titreşim olarak gözlenmiştir.  $987$  ve  $970\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen pikler boş film formülasyonunda PEG400'e ait piklerin PHO pikleri ile birleşmesi ile artmış titreşim şeklinde gözlenmiştir (Şekil 5.7(b)).



Şekil 5.7. (a)FB, (b)FB+PHO, (c)kurkumin, (d)FB+PHO+kurkumin, (e)PHO FTIR analiz sonucu

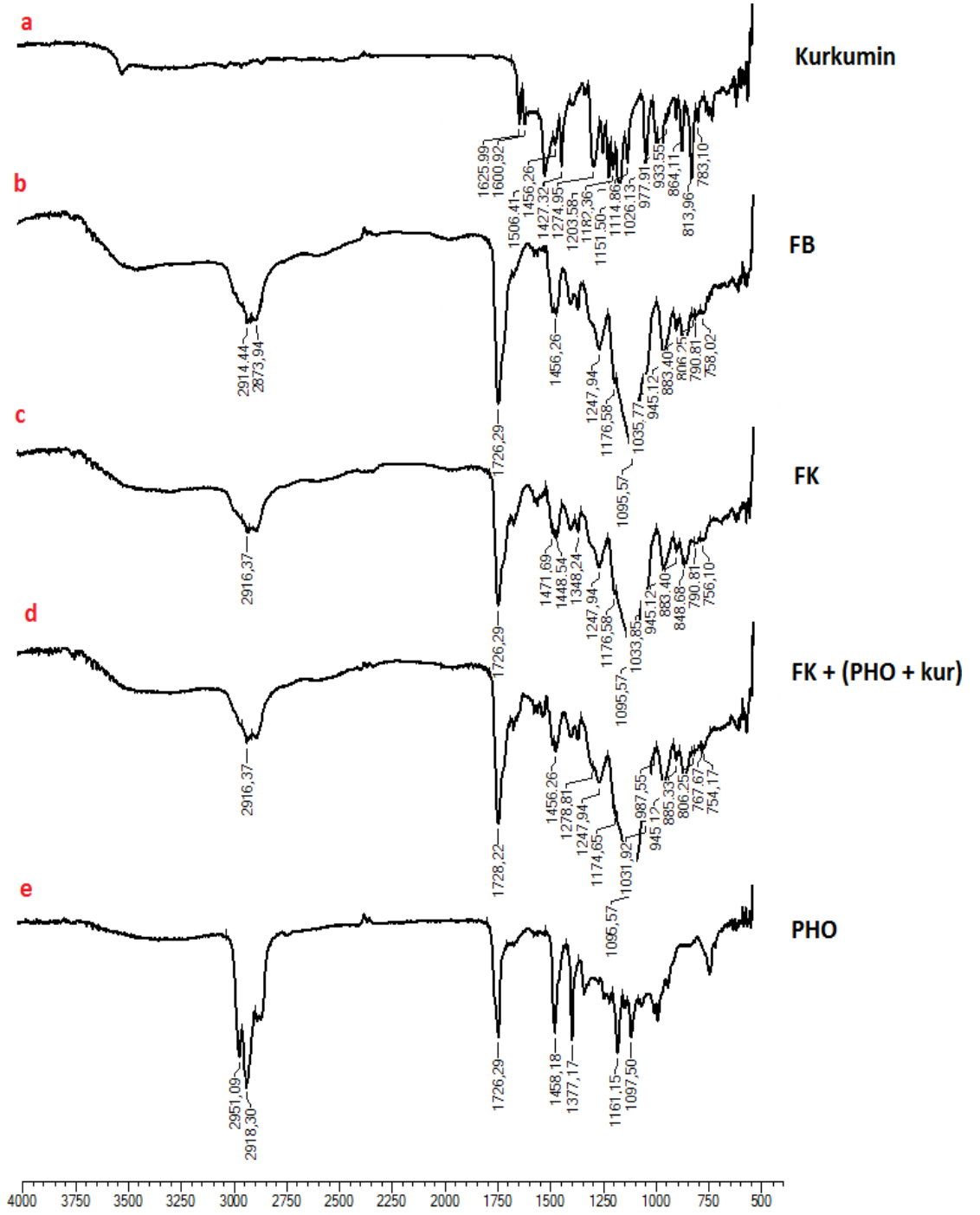
Saf kurkuminin FTIR analizinde  $3700\text{--}3584\text{cm}^{-1}$ 'de fenolik hidroksil (O-H) gerilmesinin pik görülmektedir (Sanphui vd., 2011).  $1605\text{--}1629\text{ cm}^{-1}$ 'de benzen halkasında C=O amid bağına ait keskin pik ve  $1585\text{ cm}^{-1}$ 'de N-H amid bağını ait keskin pik gözlenir (Pan vd. 2006; Liu vd., 2016).  $1508\text{ cm}^{-1}$ 'de C=C titreşimine ait pik,  $1427\text{--}1426\text{ cm}^{-1}$ 'de olefinik C-H piki,  $1273\text{--}1280\text{ cm}^{-1}$ 'de benzen halkasının aromatik enol C-

O gerilmesine ait piki ve 1026-856  $\text{cm}^{-1}$ 'de aralığında ise C-O-C gerilmesinden kaynaklı pikler gözlemlenir (Darandale vd., 2013; Silva vd., 2017).

Analize gönderdiğimiz kurkuminde, 3500  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki O-H gerilme piki, 1625  $\text{cm}^{-1}$ , 1600  $\text{cm}^{-1}$ 'de N-H amid bağına iat pik, 1506  $\text{cm}^{-1}$ 'de C=C, 1427  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H gerilmesine ait pik, 1274  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O gerilmesine ait pik, 1026-813  $\text{cm}^{-1}$ 'de aralığında ise C-O-C gerilmesine ait pikler gözlenmiş olup, elde edilen veriler literatür ile uyumludur (Şekil 5.7 (c) ve Şekil 5.8 (a)).

Boş film formülasyonuna kurkumin yüklü PHO'nun yüklenmesi ile kurkuminin 3500 civarında fenoksil grubundan kaynaklı gerilme nedeni ile FB+PHO'da gözlemlenen 2954  $\text{cm}^{-1}$ , 2926  $\text{cm}^{-1}$  ve 2800  $\text{cm}^{-1}$  civarında gözlemlenen C-H gerilme piklerin şiddetinde düşüş yaşanmıştır. Kurkumin ile oluşturulan yeni yapı ile burada gözlemlenen pikler 2914  $\text{cm}^{-1}$  ve 2873  $\text{cm}^{-1}$  titreşimi şeklinde gözlemlenmiştir. FB+PHO'da 1726  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen karbonil grubuna iat şiddetli pik, kurkuminin 1600  $\text{cm}^{-1}$ 'de benzen halkasının C=O bağına ait gerilme ile 1728  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır ve şiddetinde azalma gözlemlenmiştir. FB+PHO'da, 1456  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki pikler kurkuminin 1508  $\text{cm}^{-1}$ 'deki C=C titreşimine ait gerilme kuvvetinin etkisi ile 1471  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Kurkuminde, 1274  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O gerilmesine ait gözlenen pik, FB+PHO'da 1224  $\text{cm}^{-1}$  gözlenen pikin gerilmesi ile 1249  $\text{cm}^{-1}$ 'de daha geniş bir pik olarak gözlemlenmiştir. 1097  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen boş film formülasyonuna ait PEG 400'ün C-O fonksiyonel grubuna ait karakteristik pik 1095  $\text{cm}^{-1}$ 'e kayarak gözlemlenmiştir (Şekil 5.7.d).

FK kodlu kurkumin yüklü film incelendiğinde, boş filme kurkuminin yüklenmesi ile, boş filmde 2914  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen C-H gerilme piki, 2916  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenmiştir. Kurkuminin 3500  $\text{cm}^{-1}$ 'deki fenoksil grubu gerilmesinden kaynaklı Kollicoat MAE100P'nin 3400  $\text{cm}^{-1}$  civarındaki karakteristik geniş bandı ile birleşerek Kurkumin yüklü jelde geniş bant şeklinde gözlemlenmiştir. 1726  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen boş film formülasyonunun karbonil grubuna iat pik, kurkumin yüklü film formülasyonunda da gözlemlenmiştir. 1095  $\text{cm}^{-1}$ 'de hem PHO hem de PEG400'ün karakteristik piki aynı bölgede birleşerek artan bir titreşim olarak gözlenmiştir. 1026  $\text{cm}^{-1}$  ve 856  $\text{cm}^{-1}$  aralığında hem kurkumine ait C-O-C gerilmesinden kaynaklı pikler hem de boş film formülasyonunda PEG400'ün spesifik piklerinden kaynaklı titreşimleri birbiri ile etkileşime girmiş şekilde gözlemlenmiştir (Şekil 5.7 (c)).



Şekil 5.8. (a)Kurkumin, (b)FB, (c)FK, (d)FK+ (PHO+kur), (e)PHO FTIR analiz sonucu

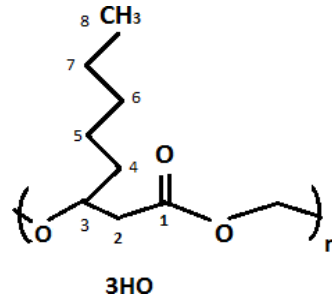
FK kodlu film formülasyonuna kurkumin yüklü PHO'nun yüklenmesi ile elde edilen film formülasyonunun spektrumu incelendiğinde, 2916 cm<sup>-1</sup>'de kurkuminin ve PHO'nun C-H gerilme piki gözlemlenmiştir. Yine kurkuminin 3500 cm<sup>-1</sup>'deki fenoksil grubu gerilmesinden kaynaklı, Kollicoat MAE100P'nin 3400 cm<sup>-1</sup> civarındaki

karakteristik geniş bandı ile birleşerek Kurkumin yüklü jelde geniş bant şeklinde gözlemlenmiştir. Burada Şekil 5.7'de (d)'ye bakıldığında boş film formülasyonuna yüklenen kurkuminin yüklü PHO'nun etkisi  $2954\text{ cm}^{-1}$  ve  $2926\text{ cm}^{-1}$  piklerinde artan şiddete karşılık, Şekil 5.8 (d)'de kurkurmin yüklü filme kurkumin yüklü PHO'nun yüklenmesi ile kurkuminin artmış etkisi,  $3500\text{ cm}^{-1}$  civarındaki O-H gerilme pikinin etkisi,  $2900\text{ cm}^{-1}$  civarındaki piklerin şiddetinde azalma ile gözlemlenmiştir.  $1097\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik hem PHO'nun eter gruba hem de film formülasyonunun PEG400 bileşeninin karakteristik piki olduğu için artan şiddette gözlenmiştir.  $1456\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen pik hem kurkumin hem de film formülasyonuna ait pikin birleşmesi ile gözlemlenen karakteristik pik olup, kristalite ile ilgili bilgi veren piktir.  $1278$ ,  $1247$  ve  $1117\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler kurkuminin C-O gerilmesi, PHO'nun eter grubu ve film formülasyonunun karakteristik piklerinin etkileşmesiyle oluşmuş yeni piklerdir. PHO için  $720\text{ cm}^{-1}$  civarındaki pikler PHO'nun tekrarlayan metil grubu, kurkuminin C-O-C bağına ait titreşimler ve film formülasyonunda PEG400 bileşenine ait karakteristik piklerin etkileşmesi ile oluşan yeni pikler olarak yorumlanmıştır (Şekil 5.8 (d)).

#### 5.6.2.2. Nükleer manyetik rezonans (NMR) Analizi

PHO'nun ve oluşturulan formülasyonların moleküler bileşenleri ve sitokiyometrik olarak varlıkları  $^1\text{H}$  NMR'ı ile analizi belirlenmiştir. Kloroform solventinini rezidüel sinyali  $7.26\text{ppm}$ - $7.32\text{ppm}$ 'dir (Basnett vd., 2012; Sofińska vd., 2019).

*P. mendocina*'nın oktanoat besiyerinde geliştirilmesi ile elde edilen moleküldeki (Şekil 5.9) protonlara ait H spektrum analizinde 5 farklı pik vardır. Kimyasal kaymalar  $2.5$ ,  $5.1$ ,  $1.5$ ,  $1.2$ , ve  $0.8\text{ppm}$  için sırasıyla C2 (-CH<sub>2</sub>), C3 (-CH), C4 (-CH<sub>2</sub>), C5, C6, C7(-CH<sub>2</sub>) ve C8 (-CH<sub>3</sub>) bağlı protonların varlığını gösterir (Rai vd., 2011b, Basnett vd., 2012).

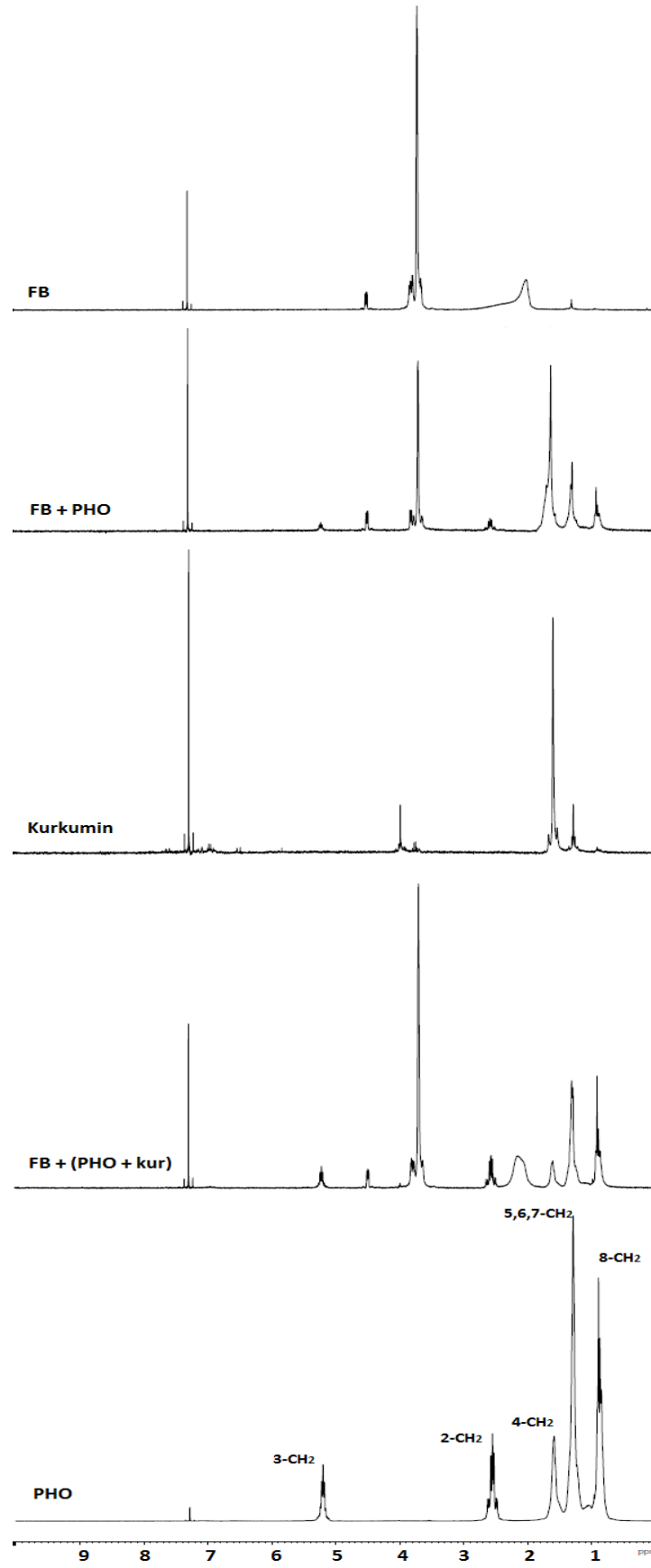


**Şekil 5.9.** *P. mendocina*'nın oktanoat besiyerinde geliştirilmesi elde edilen polimerin genel yapısı (Basnett vd., 2012)

Şekil 5.10'da PHO için; NMR sonucuna bakıldığında 5.1 ppm, 2.5 ppm, 1,5 ppm, 1.2 ppm, 0.8 ppm'de aynı pikler aynı sayıda yarımla ile gözlemlenmiştir. Bu veri literatür verisi ile birebir örtüşmektedir. 7.2 ppm'de küçük bir sinyal alınmıştır. Bu sinyal NMR'da kullanılan kloroform solventine aittir.

Kurkumine ait <sup>1</sup>H spektrumuna ait pikler incelendiğinde, üç farklı bölgede pik gözlenmektedir. 6-10 ppm'de kurkuminoitler, 3-6 ppm'de karbonhidratlar ve 0.4 pp-4ppm'de zorunlu yağ asitlerine ait pikler elde edilmektedir (Gad vd., 2017). 7,5- 6.87 ppm'de aromatik hidrojen grubuna ait pikler, 2.70, 2.4'de hidrojen gruplarına ait pikler ve 3.95 ppm'de OCH<sub>3</sub>C- grubuna ait pik gözlenmektedir (Dhar, 2014; Lestari vd., 2014).

Şekil 5.10 ve Şekil 5.11'de kurkumine ait spektrum değerlendirildiğinde, 7.2 ppm'de gözlenen pik çözücü solvent olan kloroforma ve hidrojen gruplarına aittir. 6-10 ppm arasında gözlenen küçük pikler kurkuminoitlere aittir. 6.9 ppm'de gözlenen pik aromatik hidrojen grubuna ait olduğu düşünülmektedir. 3.7 ve 1.6 ppm'de gözlenen piklerin hidrojen gruplarına ait olduğu düşünülmektedir.

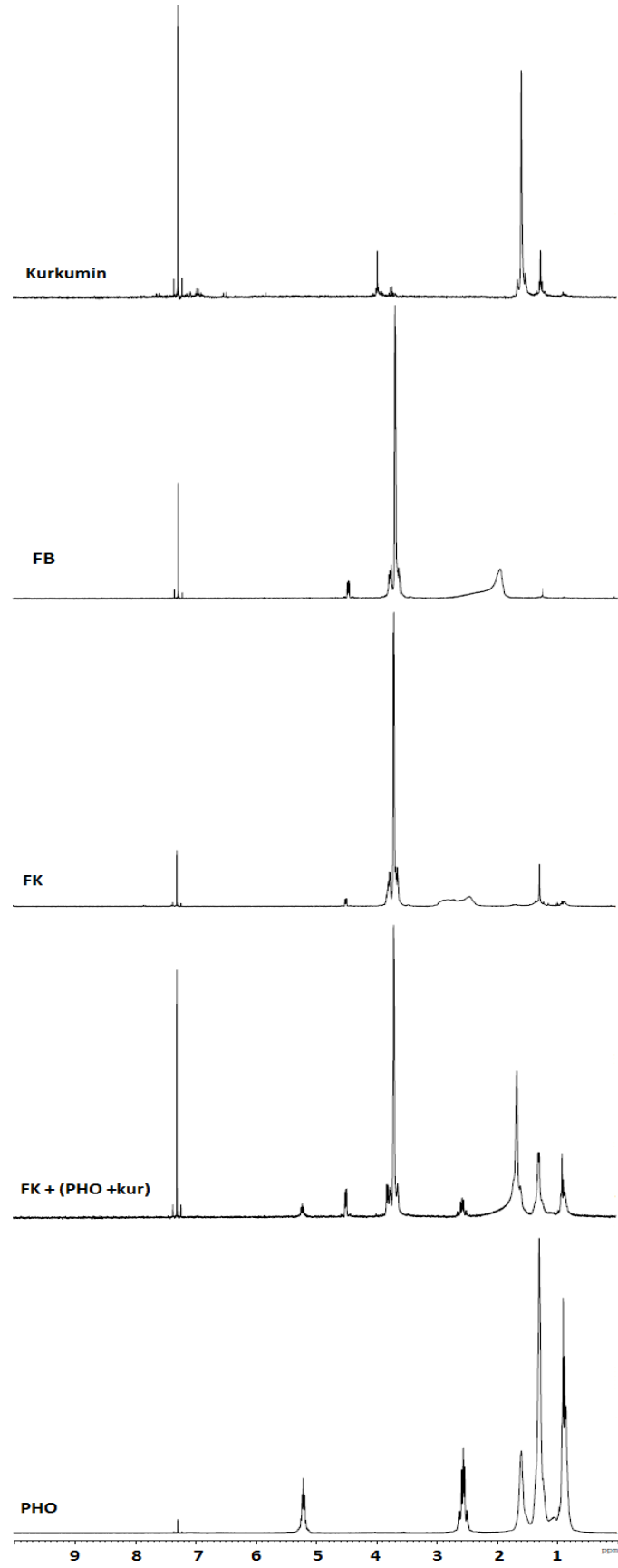


Şekil 5.10. FB, FB+PHO, kurkumin, FB+PHO+kurkumin ve PHO <sup>1</sup>H-NMR analiz sonucu

FB kodlu boş formülasyonda, PEG400 ve Kollicoat MAE100P vardır. 3.6 ppm PEG400'ün -CH<sub>2</sub> (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> CH<sub>2</sub>- grubuna ait hidrojen pikleri 2.44 ppm'de CH<sub>3</sub> grubuna ait pikler vardır (Sadeghpour vd., 2019). Kollicoat MAE100P'nin (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub> grubuna iat 4.0 ppm'de OCH<sub>2</sub> grubuna ait pikler gözlenir. 3.6 ppm'de OCH<sub>3</sub> grubuna ait piki verir. 1.8 ppm'de proton/karbon omurgasına ait CH<sub>2</sub> grubuna ait hidrojenlere ait pik gözlenir (Shanti vd., 2016).

Boş film formülasyonuna (FB) bakıldığında 4.4 ppm, 3.79 ppm-3.67 ppm aralığında PEG400'e ve Kollicoat MAE100P'nin OCH<sub>2</sub> grubuna ait hidrojen pikleri gözlenmiştir. 1.96 ppm'de geniş tabanlı bir pik gözlenir. Bu pik PEG400'ün etil grubu ve KollicoatMAE100P'nin proton/karbon omurgasına ait CH<sub>2</sub> grubuna ait piklerden kaynaklanmakta olduğu düşünülür. 7.2 ppm'de görülen pik solvent olan kloroforma ait piktir(Şekil 5.11).

Şekil 5.10'daki FB + PHO formülasyonuna ait NMR spektrumu incelendiğinde; PHO'nun 5.2 ppm'de gözlenen -CH grubuna ait hidrojen pikinde ve 2.5ppm'de -CH<sub>2</sub> grubuna ait piklerin şiddetinde azaltma gözlenmiştir. 4.4 ppm ve 3.8 ppm- 3.6 ppm aralığında PEG400'e ve Kollicoat MAE100P'nin OCH<sub>2</sub> grubuna ait hidrojen pikleri gözlenmiştir.1.5 ppm, 1.2 ppm ve 0.8 ppm'de PHO'ya spesifik olan pikler gözlenmektedir. 1.5 ppm'deki pikin şiddetinde ve alanında artma gözlenmektedir. Bunun sebibinin, FB formülasyonunda 1.8-1.96 ppm'deki hidrojen piklerinin kayarak yeni yapı oluşturup 1.5 ppm'de artan pik şeklinde gözlendiği düşünülmektedir. 7.2 ppm'de solvent olan kloroforma aittir.



Şekil 5.11. Kurkumin, FB, FK, FK + (PHO+kur), PHO 1H- NMR analiz sonucu

Şekil 5.10'daki FB+(kur+PHO) formülasyonuna ait NMR spektrumu incelendiğinde; PHO'nun 5.2 ppm'de gözlenen -CH grubuna ait hidrojen pikinde ve 2.5 ppm'de -CH<sub>2</sub> grubuna ait piklerin şiddetinde azaltma gözlenmiştir. 4.4 ppm ve 3.8 ppm-3.6 ppm aralığında PEG400'e ve Kollicoat MAE100P'nin OCH<sub>2</sub> grubuna ait hidrojen pikleri gözlenmiştir. Aynı zamanda 3.7 ppm'de kurkumine ait pikten dolayı artan şiddette gözlenmiştir. 1.5 ppm, 1.2 ppm ve 0.8 ppm'de PHO'ya spesifik olan piklerle kurkumine spesifik olan pikler gözlenmektedir. Burada 1.6 ppm'de kurkuminde gözlenen pik azalarak, 2.1 ppm'e doğru kayma ve pik alanında artma gözlenmiştir. Oluşan yeni piklerin var olan yapıların formülasyon ile değişerek yeni yapılar oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 5.11'deki FK+(kur+PHO) formülasyonuna ait NMR spektrumu incelendiğinde; FB+(kur +PHO) formülasyonuna ait NMR spektrumun pikleri neredeyse aynıdır. Kurkumine ait 1.6 ppm'deki pikin arttığı ve 2.1 ppm'e doğru olan kaymanın kaybolduğu gözlenir. Bu kaymanın önlenerek, 1.6 ppm'de kurkumine ait net pikin gözlenmesi, kurkuminin artmış miktarı ile ilgili olabilir.

#### **5.6.2.3.X ışını kırınımı (XRD) analizi**

X-ışını kırınımı (XRD), çeşitli bileşiklerin kalitatif olarak tanımlanması, kimyasal türlerin nicel çözünürlüğü, kristallik derecesinin ölçülmesi, izomorf yer değiştirmeler, toplama hataları, polimorfizmler, faz geçişleri, parçacık boyutları vb. hem moleküler hem de kristal yapıların analizi için kullanılan analitik tekniktir (Rasel Das vd., 2014).

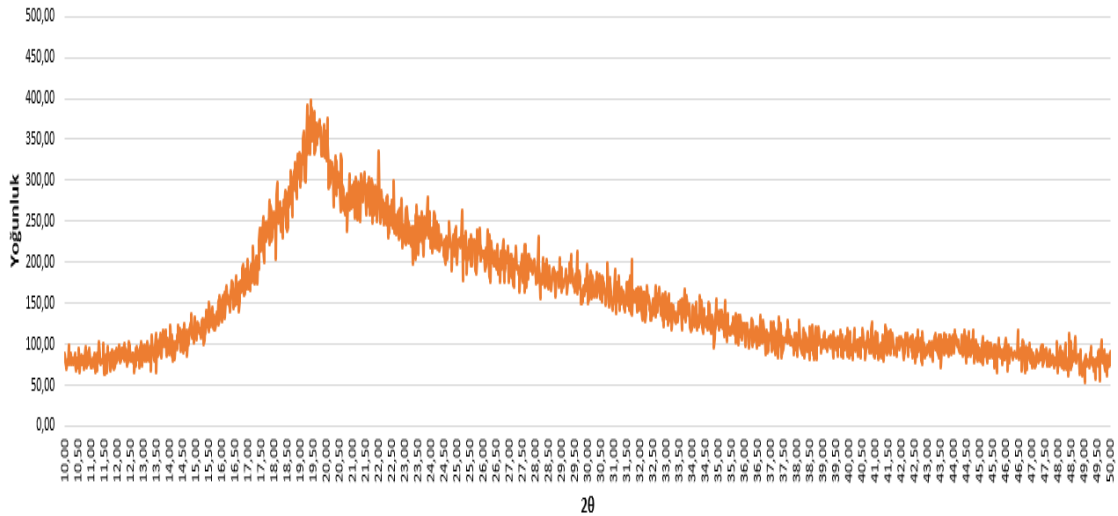
X-ışını difraktometreleri; bir X-ışını tüpü, bir numune tutucu ve bir X-ışını detektörünü içeren üç temel elemandan oluşur. X-ışınları elektron üretmek, bir voltaj uygulayarak elektronları bir hedefe doğru hızlandırmak ve hedef materyali elektronlarla bombalamak için bir filament ısıtarak katot ışın tüpünde üretilir. Elektronlar, hedef materyalin iç kabuk elektronlarını çıkarmak için yeterli enerjiye sahip olduğunda, karakteristik X-ışını spektrumları üretilir (Bunaciu vd., 2015). X-ışınları, enerjileri 100 eV-100 keV (dalga boyu 0.01 ile 10 nm) arasında değişen fotonlardır. Enerjileri 5-10 keV'nin üstündeki (0.2-0.1 nm dalga boyunun altında/üstünde) fotonlara sert, altındaki fotonlara yumuşak X-ışınları denir (Giannini vd., 2016).

X-ışınları, fotoelektrik soğurma nedeniyle madde içinden geçerken zayıflar. Küçük zayıflama katsayısı, ortamın ışına nispeten şeffaf olduğu anlamına gelir. Zayıflatma

katsayısının tersi penetrasyon derinliğidir. Her ikisi de enerjiyle (dalga boyu) değişir (Giannini vd., 2016).

Kristallik derecesini belirlemek için kristalin tepeler ve karakteristik yansımaları belirlenmiştir: 11.47 ° (040), 17,94 ° (120), 18,71 ° (130), 19,32 ° (011), 20,45 ° (140), 21.66 ° (031), 22.84 ° (080), 28.78 ° (200). XRD analizinden elde edilen PHO'nun kristalliği Lorentzian modelleri kullanılarak %36,7 (Sofiska vd., 2019), %37,5 (Rai vd., 2011), %31 (Foster vd., 2006), %30 (Gagnon vd., 1992) olarak bulunmuştur.

Polihidroksialkanoatların XRD analizi ile amorf ve kristal yapısı Horowitz vd., 1995 ve Zhang vd., 2000 tarihinde yaptıkları çalışmalar ile göstermişlerdir. Elde ettiğimiz PHO'nun XRD analizi sonucunda elde edilen grafik ile polimerin amorf yapıda olduğu söylenebilir (Şekil 5.12).



Şekil 5.12. Polimerin XRD analizi sonucu

#### 5.6.2.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), ısı değişikliklerini tespit ederek, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak malzemelerin fiziksel veya kimyasal özelliklerindeki değişiklikleri izlemek için kullanılan termoanalitik bir tekniktir (Biliaders vd., 1983). DSC cihazı, biri numune için diğeri referans için olmak üzere iki özdeş mikrofırına sahiptir. Bu mikrofırınlar ayrı ayrı ısıtılır ve örnek fırınında reaksiyon gerçekleştiğinde

sıcaklığın artma ve azalmasına göre referans fırını düzenlenir (Klančnik vd., 2010). DSC analizi ile numunenin ve aynı oranda ısıtılan veya soğutulan referans fırınının aynı sıcaklıkta tutulması için gereken diferansiyel enerji ölçülür. Endotermik bir geçiş meydana geldiğinde, numune tarafından enerji absorblanır ve sıcaklık dengesini korumak için numuneye enerji girişi arttırılır. Bu enerji girişi, geçişte emilen enerjiye tam olarak eşit olduğunda, dengeleme enerjisi olarak kaydedilir ve geçiş enerjisinin doğrudan kalorimetrik ölçümünü verir (Watson vd., 1964).

Numunede, ısının emilmesi ile ilişkili değişiklikler, diferansiyel ısı akışında değişikliğe neden olur, bu değişiklik pik olarak kaydedilir. Zirvenin altındaki alan, entalpik değişiklikle doğru orantılıdır ve pikin yönü termal olayın endotermik veya ekzotermik olup olmadığını gösterir (Biliaders vd., 1983).

Numune toz veya tabaka formunda uygulanır. DSC cihazı miligram seviyesindeki numunelerin yüksek hızlarda (dakikada 80 °C'ye kadar tarama hızları) ve 173° ile 773°K (-1000 ile +500 °C) sıcaklık aralığında termal analizler yapar. Pik genliği geçiş enerjisinin saniyede milikalorisini ve pik alanı da milikalorideki toplam geçiş enerjisini temsil eder (Watson vd., 1964).

PHO'nun erime sıcaklığı 45-61 °C aralığında bulunmuştur (Song vd., 1998; Gagnon vd., 1992; Dufresne A. 2000; Renard vd., 2010; Sofińska vd., 2019). Elde ettiğimiz PHO'nun DSC analizine bakıldığında erime sıcaklığı yaklaşık 60 °C olarak bulunmuştur.

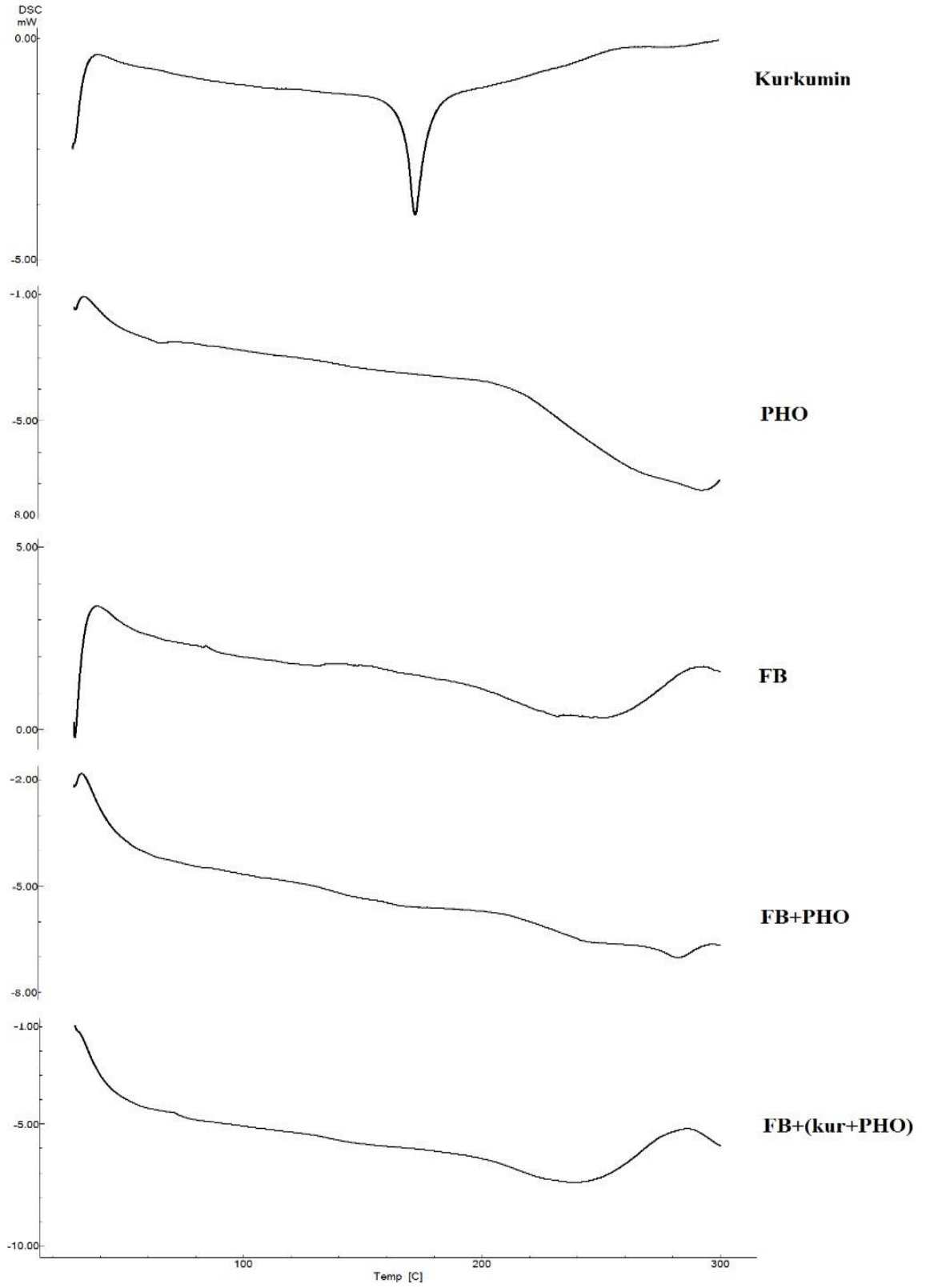
Kurkumin erime sıcaklığı 170-180 °C aralığında bulunmuştur (Silva vd., 2017, Fugita vd., 2012). Kullandığımız Kurkuminin DSC analizine bakıldığında; 180 °C'de erime sıcaklığına ait pik gözlenmiştir ve literatür ile uyumludur.

Kollicoat MAE100P'nin erime sıcaklığı 210-215°C aralığında keskin olmayan bir tepe olarak bulunmuştur (Kim vd., 2014; Majeed vd., 2017).

PEG400'ün saf halinde erime sıcaklığı 30 °C'de erime sıcaklığına ait pik gözlenmiştir. (Karaman vd., 2011).

FB formülasyonunda, Kollicoat MAE100P ve PEG400'ün pikleri göz önünde bulundurulduğunda 210 °C'de Kollicoat MAE100P'ye ait pik ile yaklaşık 30 °C'de

PEG400'e ait pik bu iki maddenin birleşmesi ile erime sıcaklığı yaklaşık 80 °C'de gözlenmiştir.

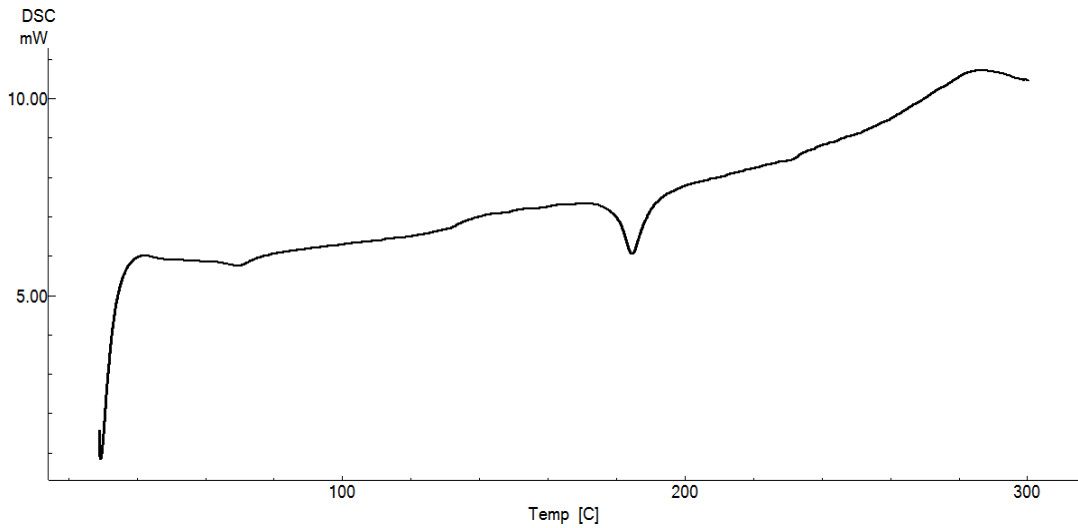


Şekil 5.13. Kurkumin, PHO, FB, FB+PHO ve FB+(PHO+kur) DSC analizi sonucu

FB+PHO formülasyonunda, yaklaşık 75 °C’de hafif bir pik gözlenmiştir (Şekil 5.13). Bu formülasyonda FB formülasyonunda 80 °C’de gözlenen erime sıcaklığı piki ile PHO’nun 60 °C’de gözlenen erime sıcaklığı, yeni oluşan yapı ile 75 °C’de gözlendiği düşünülmüştür.

FB+(kur+PHO) formülasyonunda, 66 °C’de FB ve PHO kaynaklı erime sıcaklığı piki ve kurkuminden kaynaklı olarak yaklaşık 180 °C’de yayvan bir pik şeklinde erime sıcaklığı piki gözlenmiştir (şekil 5.13).

Kurkumin ve PHO’nun fiziksel karışımına bakıldığında, 65 °C’de PHO’ya ait erime sıcaklığı piki, 180 °C’de kurkumine ait erime sıcaklığı piki, elde edilmiştir (Şekil 5.14).



Şekil 5.14. Kurkumin ve PHO fiziksel karışımı DSC analizi

Kristallik şu eşitliğe göre hesaplanır;

$$X_{C, DSC} = \frac{H_{PHO}}{H_{PHB, 100\%}} \times 100\% \quad (5.2)$$

Denklem (5.2)’de verilen eşitlikte, ‘H PHO’ ekstre edilen PHO’nun füzyon entalpisini belirtirken, ‘H PHB, 100%’, %100 kristal PHB’nin füzyon entalpisini ifade etmektedir.

PHO'nun erime sıcaklığı, PHB'nin %100 kristallik derecesi %146 J/g değeri ile Lorentzian modeli kullanılarak hesaplanır (Sofińska vd., 2019). Denklem (5.2)'ye göre elde ettiğimiz polimerin kristallik derecesi %34 olarak hesaplanmıştır. Bu değer Gagnon vd., 1992; Dufrense A. 2000; Rai, 2011 ve Witko vd., 2020'de yaptıkları çalışmalarda elde ettikleri %30-%37 PHO kristallik derecesi ile uyumlu olup semi-kristalin yapıda olduğu tespit edilmiştir.

### 5.6. *in vitro* Salım Çalışması Sonuçları

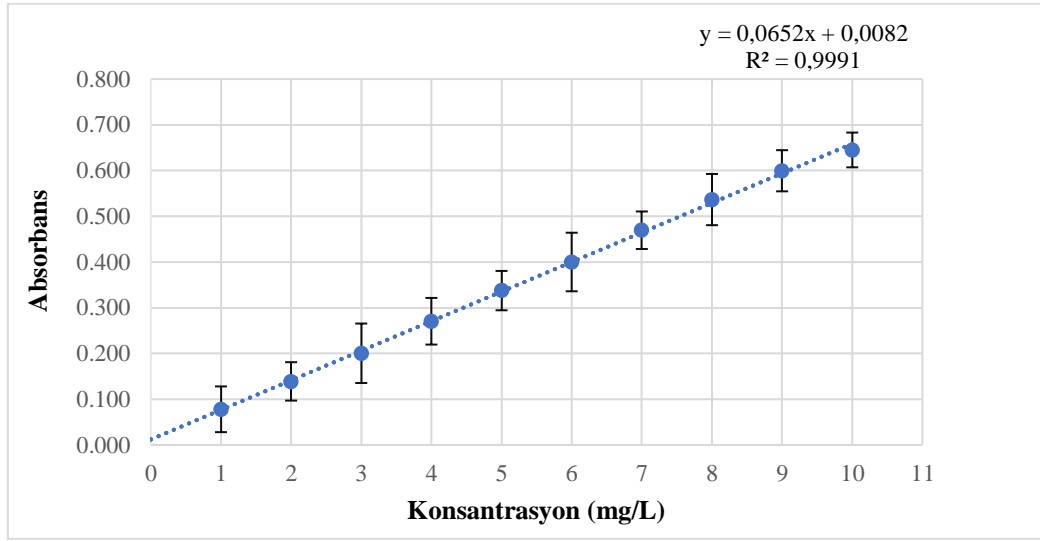
Hazırlanan filmlerden etkin madde olan kurkuminin salım çalışmasının yapılmasından önce kurkumine ait 100 ppm ve 10 ppm'lik kalibrasyon grafikleri bölüm 4.5'de verilen yöntem ile oluşturulmuştur. Elde edilen 421nm'deki absorbans ortalama değerleri Tablo 5.3'de verilmiştir. Verilen bu değerler ile kurkumine ait kalibrasyon grafikleri çıkartılmıştır (Şekil 5.15, Şekil 5.16).

Kullanılan PEG400, Kollicoat MAE 100P 421nm'de absorbans vermedikleri için bu maddeleri içeren kalibrasyon eğrisine gerek duyulmamıştır.

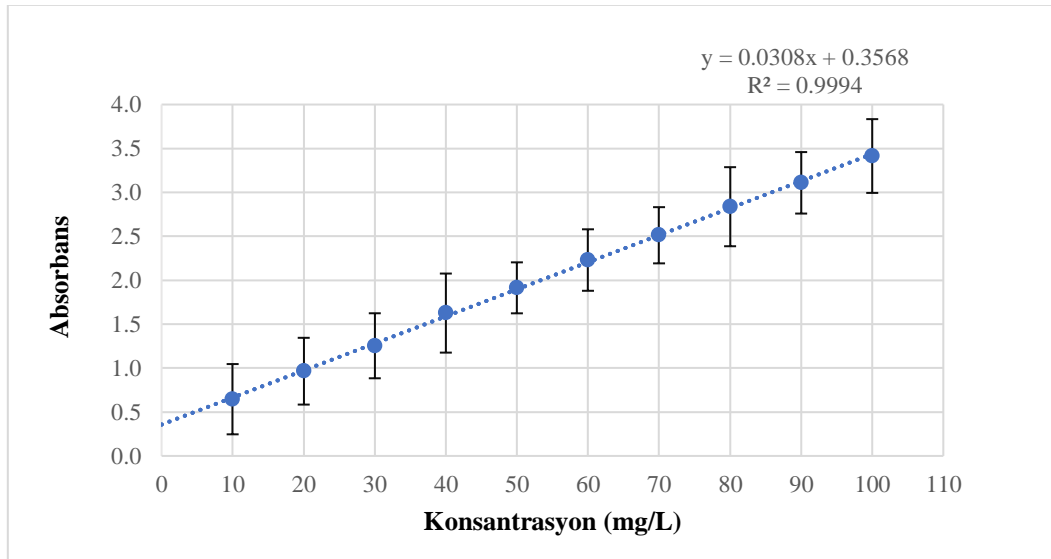
**Tablo 5.3.** Kurkuminin ortalama absorbans değerleri (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans
0 ppm	0,000	0 ppm	0,000
1 ppm	0,078±0,84	10 ppm	0,646±0,12
2 ppm	0,139±0,51	20 ppm	0,965±0,28
3 ppm	0,201±0,33	30 ppm	1,254±0,41
4 ppm	0,271±0,41	40 ppm	1,626±0,34
5 ppm	0,338±0,48	50 ppm	1,914±0,25
6 ppm	0,400±0,51	60 ppm	2,230±0,32
7 ppm	0,470±0,13	70 ppm	2,512±0,24
8 ppm	0,527±0,12	80 ppm	2,837±0,33
9 ppm	0,600±0,23	90 ppm	3,109±0,14
10 ppm	0,645±0,18	100 ppm	3,414±0,24

Hazırlanan film formülasyonlarının salım profillerine bakılması için sıcaklığı ve çalkalama hızını sabit tuttuğumuz sistem oluşturulmuştur. Hazırlanan iki farklı formülasyondan (FK+(PHO+kur) ve FB+(PHO+kur)) belirlenen miktarlar PBS içerisinde 37 °C’de 130 rpm’de 3 ay süre ile salım çalışmasına bırakılmıştır. Belirlenen sürelerde bölüm 4.5’de verilen yöntem doğrultusunda örnekler toplanarak, 421 nm’de absorbanları alınmıştır (Tablo 5.3).

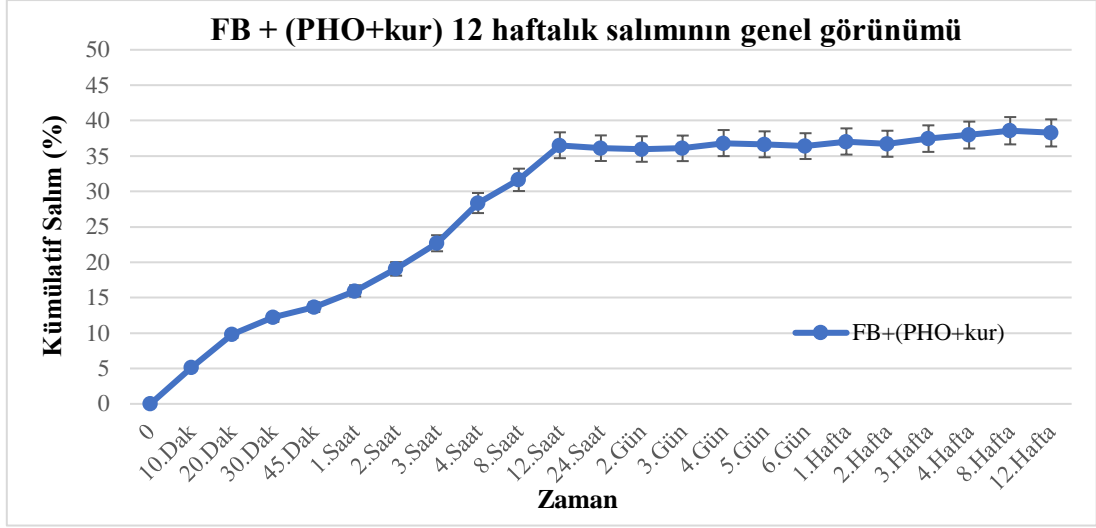


Şekil 5.15. Kurkuminin 10ppm kalibrasyon eğrisi (n=3)

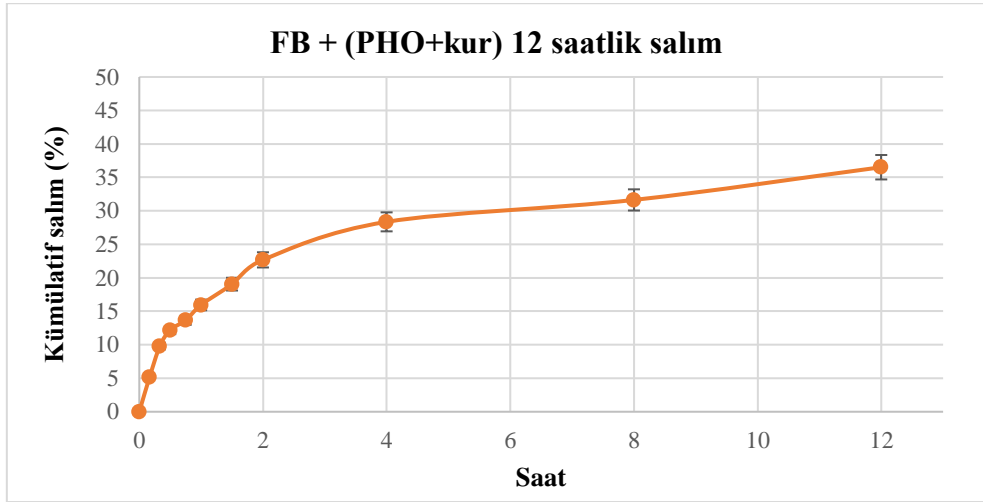
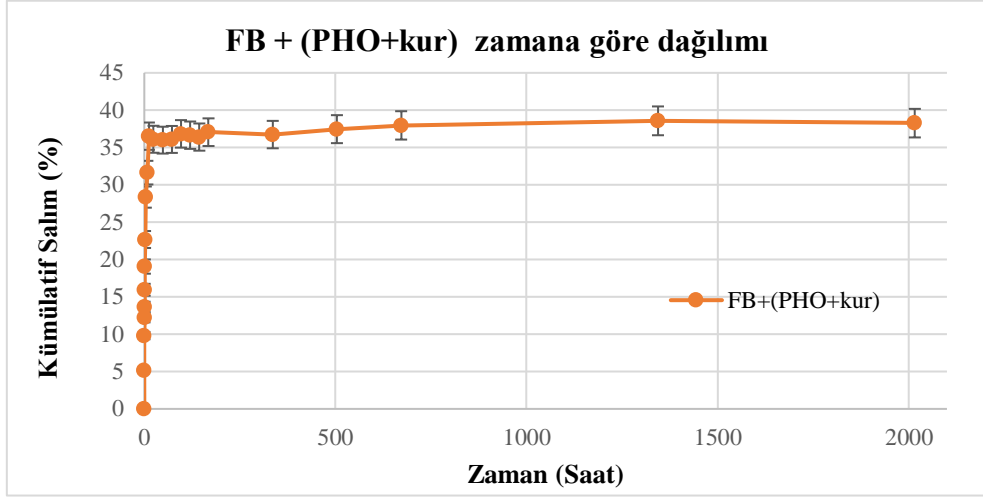


Şekil 5.16. Kurkuminin 100ppm kalibrasyon eğrisi (n=3)

Şekil 5.15 ve Şekil 5.16’da verilen kalibrasyon grafiklerinden faydalanılarak absorbands sonuçlarına göre, salım sonuçları belirlenmiştir. Verilen sonuçlar, kümülatif salım verileri ve yüzdeliği halinde hesaplanmış ve salım profilleri oluşturulmuştur (Şekil 5.17 ve Şekil 5.18).

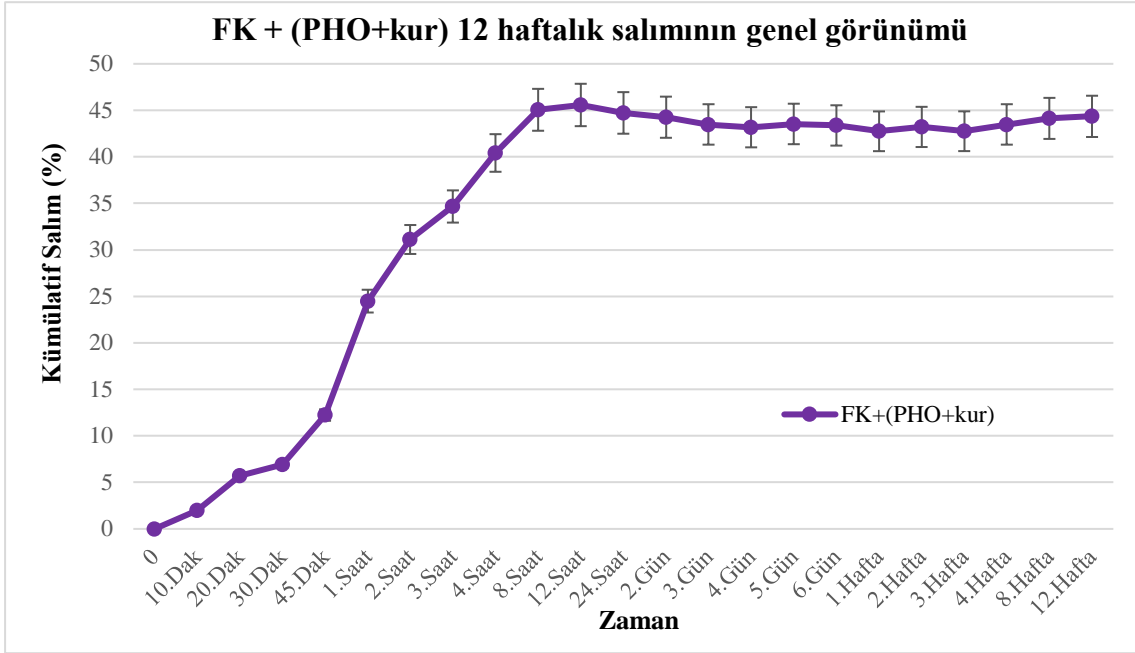


Şekil 5.17. *FB+(PHO+kur)* film formülasyonunun 12 haftalık salım grafiği (n=3)



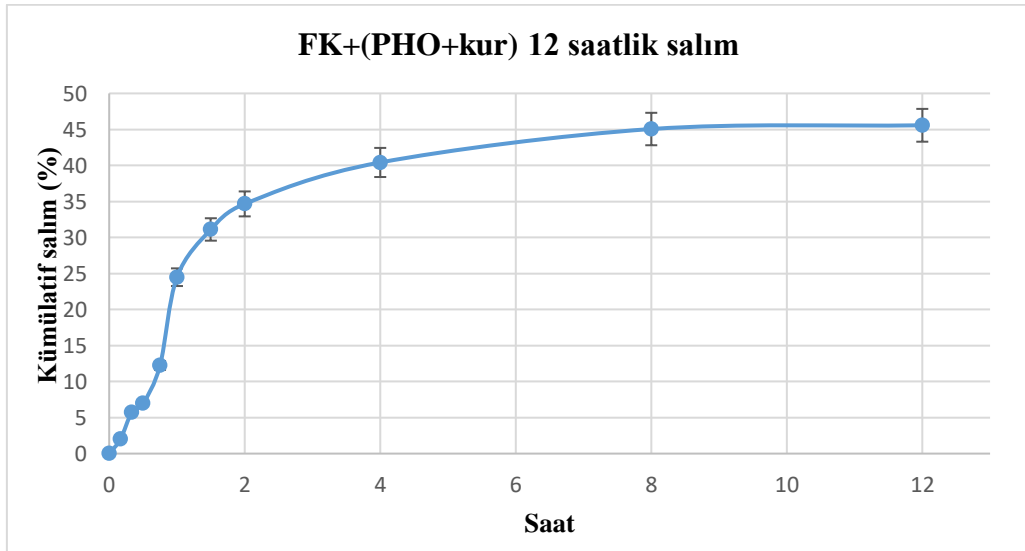
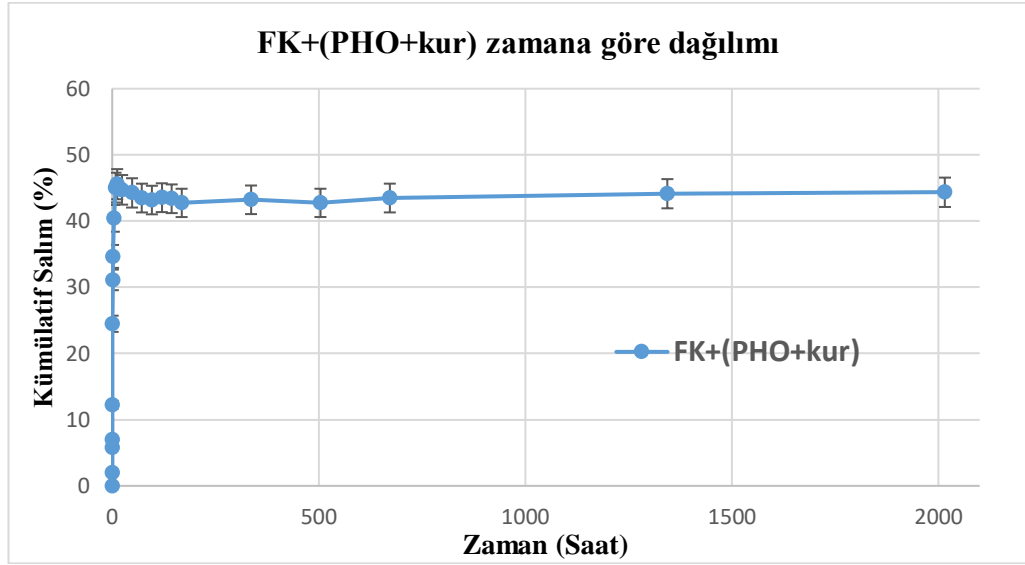
Şekil 5.18. FB+(PHO+kur) film formülasyonundan salınan kurkuminin zamana (saat) göre dağılımı (n=3)

FB+(PHO+kur) salım grafiği incelendiğinde ilk 1 saatte etkin madde salımının hızlı olup % 15 üzerine çıktığı gözlenmiştir. Salım hızı yavaşlasa da düzenli bir şekilde artarak 48 saat boyunca devam etmiştir. 48. saatte film formülasyonuna yüklenmiş etkin maddenin yaklaşık %36'sı salınmıştır. İlk 48 saatte gözlenen bu hızlı salım boş filmin PBS'de hızlı bir şekilde çözülmesi ile açıkta kalan kurkuminin salınmasından kaynaklanmaktadır. Daha sonraki günlerde salım örnekleri alınmaya devam edilmiş ve salımın hala devam edip %38-%40 aralığında sabit kaldığı gözlenmiştir (Şekil 5.17).



Şekil 5.19. FK+(PHO+kur) ) film formülasyonunun 12 haftalık salım grafiği (n=3)

FK+(PHO+kur) salım grafiği incelendiğinde, FB+(PHO+kur) salım grafiğine benzer şekilde bir grafik elde edildiği gözlenmiştir. İlk 1 saatte etkin madde salımının yaklaşık %25 olduğu, 48 saat boyunca ise; salımın artarak yaklaşık %44 olduğu gözlenmiştir. 48 saat sonrasında örnek alınmaya devam edilmiş ve salım %45-%50 aralığında sabit kaldığı gözlenmiştir. İki grafik arasında gözlenen bu salım oranındaki farklılık FK+(PHO+kur) formülasyonunda bir miktar fazla kurkumin içermesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 5.19).



Şekil 5.20. FK+(PHO+kur) film formülasyonundan salınan kurkuminin zamana (saat) dağılımı (n=3)

Her iki grafikte de salımın öncelikle artması ve sonra sabit kalması birbiri ile uyumlu olup, beklenen bir sonuçtur. Şekil 5.17.'de salımın sabit kaldığı aralık %25-%30 iken; Şekil 5.19'da %45-%50'dir. Bu sonuç taşıdıkları etkin madde miktarı ile uyumludur.

PHO'nun parçalanması oldukça zaman alan bir süreçtir. PHO'nun sahip olduğu nanosfer ve mikrosferlere kurkumin hapsolarak, PHO parçalandıkça kurkumin salınması

gerçekleşir (Raza vd., 2018). 48 saat sonrasında etkin maddenin salımın yavaş olmasının sebebi, PHO'nun parçalanma hızının yavaş olması ile açıklanabilir.

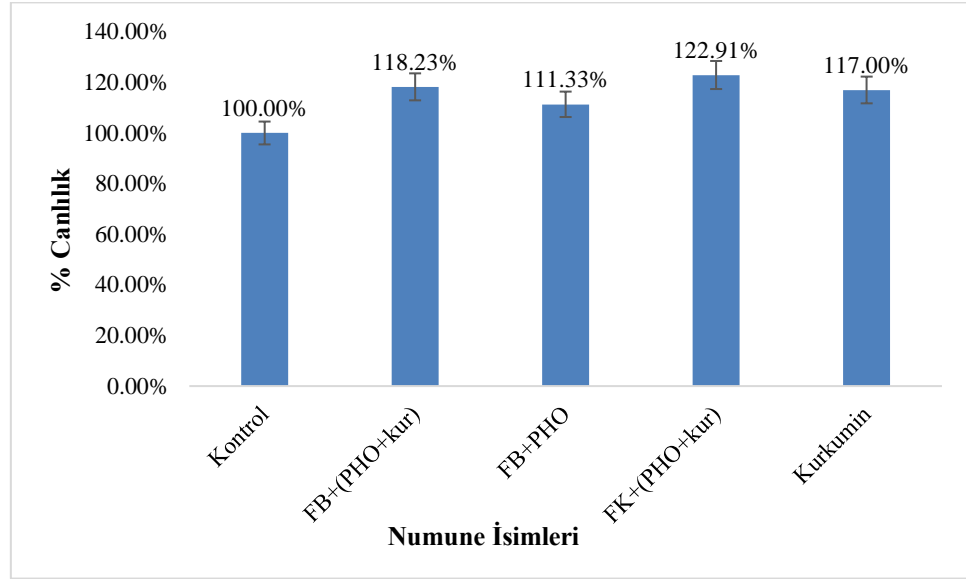
### **5.7. Sitotoksosite Çalışması Sonuçları**

Hazırlanan film formülasyonlarının sitotoksitesini değerlendirmek için MTT yöntemi bölüm 4.7'de verildiği şekilde uygulanmıştır. Bu yöntem ilaçların taranmasında hücre canlılığının ve sitotoksitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak uygulanan bir yöntemdir (Bahuguna vd., 2017).

Hazırlanan film formülasyonlarının yara bölgesinde toksik özellik göstermemesi beklenmektedir. Etkin madde olarak kullanılan kurkuminin anti inflamatuvar, anti enfeksiyöz, yara iyi edici ve doku yeniden modelleme özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Mahmood vd., 2015). Ayrıca hızlı metabolize olarak iyileşme sürecini hızlandırır (Kim vd., 2011). Ancak film formülasyonlarında kullanılan diğer maddelerin sitotoksik özellik göstermemesi de iyileşme sürecinde önemli bir parametredir.

Film formülasyonunda kullanılan PEG hücre zarları ile etkileşebilen, biyolojik olarak parçalanabilen ve hiçbir toksik etkisi olmayan bir maddedir (Jäschke vd., 1994, Vuksanović vd., 2013). İlaç taşınmasında jelatin yapı oluşturduğu için tercih edilmektedir (Gohel vd., 2003). Film formülasyonunda kullanılan bir diğer madde olan Kollicoat MAE 100 P film yapısına güçlü ve esnek bir yapı sağlar. (Amado vd., 2017). Kollicoat MAE 100 P sitotoksosite çalışması ile non toksik özellikte olduğu bilinmektedir (Prada vd., 2019). Ayrıca Kollicoat pH 5'in üstünde bozularak taşıdığı etkin maddeyi salmaya başlar (Amado vd., 2017; Prada vd., 2019).

Film formülasyonlarının hepsinde aynı doz kurkumini içerecek şekilde tartılarak hazırlanmış ve 4 tekrarlı olarak HaCat hücreleri ile MTT testi yapılmıştır (Şekil 5.21). Chu ve arkadaşlarının 2015'de ve Lundvig ve arkadaşlarının 2015'de yaptığı çalışma ile kurkuminin sitotoksitesinin 20 µM dozda kullanıldığında arttığı belirtilmiştir. Kurkuminin 10 µM olarak kullanılan dozunda hücre canlılığının %80 üstünde olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple tüm formülasyonlarda 10 µM dozunda kurkumin içeren filmler kullanılmıştır.



**Şekil 5.21.** Sitotoksosite deneyi sonuçları (n=3) (Kontrol: HaCat hücreleri, FB+(PHO+kur): HaCat hücrelerine FB+(PHO+kur) film uygulaması, FB+PHO: HaCat hücrelerine FB+PHO film uygulaması, FK+(PHO+kur): HaCat hücrelerine FK+(PHO+kur) film uygulaması, Kurkumin: HaCat hücrelerine kurkumin uygulaması)

Kurkumin yüklü polihidroksialkanoatın endotel hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite deneyi sonucunda %90 üzerinde hücre canlılığı ile düşük toksik özellik göstermektedir (Simion vd., 2013).

Sitotoksosite sonucunu içeren Şekil 5.21’de görülen grafikte, kontrol grubu olarak, sadece HaCat hücreleri kullanılmıştır. Alınan yüzdeler kontrol grubu referans alınarak hesaplanmıştır. Grafikte FB+PHO etiketli örnek, HaCat hücrelerine FB+PHO kodlu filmin uygulanması ile elde edilen % hücre sağ kalımını % 118.23 verir. Kurkumin etiketli örnek ise; HaCat hücrelerine kurkuminin 10 µM’lık uygulaması sonucunda hücre sağ kalımını, % 117,0 olarak verir. Bu iki sonucu değerlendirdiğimizde, FB+PHO filmin ve kurkuminin kontrol grubuna göre, hücre canlılığını arttırdığı gözlenmiştir. FB+PHO filmin, kurkumine göre yaklaşık %1 farkla hücre canlılığının daha iyi olduğu gözlenmiştir. Witko ve arkadaşlarının 2020’de yaptığı çalışma ile PHO’nun hücre canlılığını ve göçünü arttırdığı literatür bilgisi dikkate alındığında elde edilen veri PHO’nun hücre proliferasyonuna destek olduğunu göstermektedir.

FB+(PHO+kur) %118,23 hücre canlılığı gösterirken, FK+(PHO+kur) aynı miktarda kurkumin içermesine rağmen %122.91 hücre canlılığı göstermektedir. Bunun sebebinin, FK+(PHO+kur) filminin suda çözülebilen kısmı olan PEG400 ve Kollicoat

MAE 100P hızlı parçalanarak içerisinde bulunan kurkuminin salımını sağladıkları bu nedenle hücre sağ kalımının daha yüksek olduğu düşünülmektedir. FB+(PHO+kur) filminde ise; PEG400 ve Kollicoat MAE 100P parçalanırsa bile kurkuminin miktar olarak daha fazla kısmı PHO polimeri içerisine gömülü olduğu için salımın çok yavaş olması nedeni ile % hücre canlılığı FK+(PHO+kur) filmine göre daha düşük bulunmuştur. Sitotoksikite sonuçlarına genel olarak baktığımızda hazırlanan tüm film örneklerinde kontrol grubuna göre % hücre canlılığını artırarak, hücre sağ kalımını desteklediği gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bilgi hem etkin madde olan kurkumin hem de PHO'nun hücre sağ kalımını desteklediğine ait literatür ile uyumlu bulunmuştur.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının ilk aşamasında, mikrobiyal kaynaklı biyopolimer olan polihidroksioktanoat üretimi ve ikinci aşamasında ise bu polimerin film yapıda taşıyıcı sistem olarak kullanılarak kurkumin ile formüle edilmesi ve film formülasyonların karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Biyopolimer iki aşamalı kültür ortamında *Pseudomonas mendocina* suşlarının önce hücre yoğunluğu arttırılmış ve daha sonra oktanoat besiyerinde ve belirli koşullarda inkübasyonu sonrasında, kloroform sodyum hipoklorit dispersiyon yöntemi ile polimer izole edilmiştir.

Elde edilen PHO yapısal özelliği yapışkan olduğu ve yavaş bir bozunma gösterdiği için, film oluşturma sırasında Kollicoat MAE 100P ve PEG400 polimer ile belirli oranlarda karıştırılarak formüle edilmiştir. Oluşturulan film taşıyıcı sisteme, etkin madde olarak kurkumin yüklemesi gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen polimerin ve film sistemleri ile kurkuminin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, NMR, FTIR, DSC, XRD ve SEM analizi yapılmıştır. *P. mendocina*'nın oktanoat besiyerinde yetiştirilmesi sonucunda ekstrakte edilen polimerin monomer kompozisyonunun kantitatif analizi ve çözücü safsızlığının tespiti NMR analizi ile gerçekleştirilmiştir. FTIR ve NMR analizi sonucunda elde edilen piklerin literatürdeki spesifik pikler ile uyumlu olması ile polimerin PHO olduğu tespit edilmiştir.

Hazırlanan sistemlerin [FB+PHO, FB+(PHO+kur), FK+(PHO+kur)] ve kurkuminin, toksisite ve hücre yenilemesi üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi HaCat hücreleri kullanılarak yapılmıştır ve sonuç olarak film formülasyonlarında ve kurkuminde kontrol grubuna göre hücre canlılığında artış tespit edilmiştir.

Hazırlanan sistemlerden kurkuminin zamana göre salınma hızının belirlenmesi için, FB+(PHO+kur) ve FK+(PHO+kur) formülasyonları için 3 aylık salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Salımın 48 saat boyunca arttığı ve daha sonra FB+(PHO+kur) için %38-40, FK+(PHO+kur) için %45-50 oranında sabit kaldığı gözlenmiştir. Etkin maddenin yavaş şekilde uzun süreli salınması PHO'nun yıkım hızının yavaş olmasına bağlı bulunmuştur.

Hücre canlılık oranı ve salım profilinden elde edilen sonuçlar ile bu tez kapsamında elde ettiğimiz biyopolimerin, kurkumini yavaş salabileceği ve hücre canlılığını

arttırabileceği *in vitro* olarak belirlenmiştir. Bu sistemin, yara iyi edici etkinliğinin, gelecekte hayvan çalışmaları ile *in vivo* olarak da desteklenmesi uygun olacaktır.

## KAYNAKÇA

- Agrawal, P. (2014). Significance of Polymers in Drug Delivery System. *Journal of Pharmacovigilance*, 3(1).
- Alakomi, H., L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. Ve Helander, I., M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol*, 66(5), 2001-2005.
- Ali, I. ve Jamil, N. (2016). Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field *Frontiers in Biology*, 11(1): 19–27.
- Ali, S. M. ve Yosipovitch, G. (2013). Skin pH: from basic science to basic skin care. *Actadermato- venereologica*, 93(3), 261-269.
- Amado, J. R. R., Prada, A. L., Duarte, J. L., Keita, H., da Silva, H. R., Ferreira, A. M. Ve Carvalho, J. C. T. (2017). Development, stability and *in vitro* delivery profile of new loratadine-loaded nanoparticles. *Saudi pharmaceutical journal*, 25(8), 1158-1168.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, M. N., ve Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 161-174.
- Bagdadi, A., V., Safari, M., Dubey, P., Basnett, P., Sofokleous, P., Humphrey, E., Locke, I., Edirisinghe, M., Terracciano, C., Boccaccini, A., R., Knowles, J., C., Harding, S. E. ve Roy, I. (2018). Poly(3-hydroxyoctanoate), a promising new material for cardiac tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12 (1), E495-E512.
- Bailon, P., & Berthold, W. (1998). Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(8), 352-356.
- Basnett, P., Ching, K., Y., Stolz, M., Knowles, J., C., Boccaccini, A., R., Smith, C., Locke, I., C. Keshavarz, T. ve Roy, I. (2013a). Novel Poly(3-hydroxyoctanoate)/Poly(3-hydroxybutyrate) blends for medical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 73(10), 1340-1348.

- Basnett, P., Ching, K.Y., Stolz, M., Knowles, J.C., Boccaccini, A.R. ve Smith, C. (2013b). Aspirin-loaded P(3HO)/P(3HB) blend films: potential materials for biodegradable drug-eluting stents. *Bioinspired Biomim Nanobiomat*, 2,141–153.
- Basnett, P., Lukasiewicz, B., Marcello, E., Gura, H. K., Knowles, J. C. ve Roy, I. (2017). Production of a novel medium chain length poly (3-hydroxyalkanoate) using unprocessed biodiesel waste and its evaluation as a tissue engineering scaffold. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1384-1399.
- Beveridge, T. J. (2001). Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), 111-118.
- Bhuwal, A. K., Singh, G., Aggarwal, N. K., Goyal, V. ve Yadav, A. (2013). Isolation and Screening of Polyhydroxyalkanoates Producing Bacteria from Pulp, Paper, and Cardboard Industry Wastes. *International Journal of Biomaterials*, 1-10.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E. ve Eccleston, G. M. (2008). Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(8), 2892–2923.
- Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A. ve Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *eXPRESS Polymer Letters*, 8 (11), 791–808.
- Chen, Guo-Q. ve Zhang, J. (2018) Microbial polyhydroxyalkanoates as medical implant biomaterials. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46:1, 1-18.
- Chen, J., Spear, S. K., Huddleston, J. G. ve Rogers, R. D. (2005). Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry*, 7(2), 64-82.
- Chen, S., Liu, Q., Wang, H., Zhu, B., Yu, F., Chen, G. Q. ve Inoue, Y. (2009). Polymorphic crystallization of fractionated microbial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Polymer*, 50, 4378–4388.
- Chu, Y. W., Liu, S. T., Cheng, H. C., Huang, S. M., Chang, Y. L., Chiang, C. P., ve Wang, W. M. (2015). Opposing effects of Zac1 and curcumin on AP-1-regulated expressions of S100A7. *PloS one*, 10(12), e0144175.

- Coico, R. (2006). Gram staining. *Current protocols in microbiology*, (1), A-3C.
- Costa, N. N., de Faria Lopes, L., Ferreira, D. F., de Prado, E. M. L., Severi, J. A., Resende, J. A. ve Cotrim, M. A. P. (2020). Polymeric films containing pomegranate peel extract based on PVA/starch/PAA blends for use as wound dressing: *In vitro* analysis and physicochemical evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 110643.
- Çalikhan, H., (2013). Suda çözünen polimerler, *Polimer Teknolojisi Yüksek Lisans Tez Ödevi*
- Çelen, N., Bilensoy, E., ve Çalış, S. Siklodekstrinler ve Biyomedikal Alandaki Uygulamaları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, (1), 50-69.
- De Koning, G., J. ve M., Witholt, (1997). B. Process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads Part 1: Solubilization. *Bioprocess Engineering* 17, 7-13.
- Dhar, K.L. (2014). Cahpter4, *School of Pharmaceutical Science*, 76-163.
- Duan, Y., Li, K., Wang, H., Wu, T., Zhao, Y., Li, H. ve Yang, W. (2020). Preparation and evaluation of curcumin grafted hyaluronic acid modified pullulan polymers as a functional wound dressing material. *Carbohydrate Polymers*, 116195.
- Dufresne, A. (2000). Dynamic mechanical analysis of the interphase in bacterial polyester/cellulose whiskers natural composites. *Composite Interfaces*, 7(1), 53-67.
- Eming, S. A., Martin, P. ve Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, 6(265), 265sr6–265sr6.
- Findlay, R. H. ve White, D. C. (1983). Polymeric Beta-Hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*. *Applied And Environmental Microbiology*, 45, (1), 71-78.
- Furrer, P., Panke, S. ve Zinn, M. (2007). Efficient recovery of low endotoxin medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoate) from bacterial biomass. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 206–213.

- Gadhawe, R. V., Das, A., Mahanwar, P. A., ve Gadekar, P. T. (2018). Starch based bioplastics: the future of sustainable packaging. *Open Journal of Polymer Chemistry*, (8), 21-33.
- Gagnon, K. D., Lenz, R. W., Farris, R. J. ve Fuller, R. C. (1992). Crystallization behavior and its influence on the mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 25(14), 3723-3728.
- Gence, H. (2008). Fötal Yara İyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 61(03), 171-179.
- Glenn, G. M., Orts, W., Imam, S., Chiou, B.S., ve Wood, D. F. (2014). Starch Plastic Packaging and Agriculture Applications. *Starch Polymers*, 421–452.
- Gohel, M. C. ve Patel, L. D. (2003). Processing of nimesulide-PEG 400-PG-PVP solid dispersions: preparation, characterization, and *in vitro* dissolution. *Drug development and industrial pharmacy*, 29(3), 299-310.
- Grothea, E., Moo-Younga, M. ve Chistib, Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 132–141.
- Gumel, A. M., Razaif-Mazinah M. R. M., Anis, S. N. S. ve Annuar, M. S. M. (2015). Poly (3-hydroxyalkanoates)-co-(6-hydroxyhexanoate) hydrogel promotes angiogenesis and collagen deposition during cutaneous wound healing in rats. *Biomedical Materials*10,1-14.
- Gumel, A., M., Annuar, M., S., M. ve Chist, Y. (2012). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and Environment*. 21(2), 580-605.
- Guo, W., Song, C., Kong, M., Geng, W., Wang , Y., ve Wang, S. (2011). Simultaneous production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates and alginate oligosaccharides by *Pseudomonas mendocina* NK-01. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 92, 791–801.
- Guoqiang, C., Qion, W. ve Jinchun C. (2001). Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates. *Tsinghua Science and Technology*, 6(3), 93 – 199.

- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. ve Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321.
- Güngörmedi, G., Demirbilek, M., Mutlu, M., B., Denkbaş, E., B. ve Çabuk, A. (2014). Polyhydroxybutyrate and Hydroxyvalerate Production by *Bacillus megaterium* Strain A1 Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Journal of Applied Plimer Science*, 1-8.
- Gürgün, V., Halkman, K. (1990). Mikrobiyolojide Sayım Yöntemleri. Gıda Teknolojisi Derneği 2. Baskı. No 7.
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S. ve Chang, H. N. (1994). Optimization of Microbial Poly(3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 256-261.
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S., Lee, K. M. ve Chang, H. N. (1993). Therecovery of poly (3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology techniques*, 7(3), 209-212.
- Hazer, B. ve Steinbüchel, A. (2007). Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 1-12.
- Henry, H., & Stacey, M. (1943). Histochemistry of the gram-staining reaction for micro organisms. *Nature*, 151(3841), 671-671. *Histochemistry*, 76(3), 111–118.
- http-1:Walsh,D.(2014).  
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas\\_mendocina](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Pseudomonas_mendocina)  
*Pseudomonas mendocina*. Microbewiki (Erişim tarihi: 10.12.2019).
- http-2:<http://www.biyolojidersnotlari.com/dokuz-eylul-universitesi-bakterilerin-yapisi-ve-siniflandirilmesi.html> (Erişim tarihi:13.12.2019).
- http-3:Kollicoat MAE100P MAE 100 P Technical information,  
[http://transchemcorp.com/wp-content/uploads/2017/09/Technical-Information\\_Kollicoat-MAE-100-P.pdf](http://transchemcorp.com/wp-content/uploads/2017/09/Technical-Information_Kollicoat-MAE-100-P.pdf) (Erişim tarihi: 25.12.2019).
- http-4:<https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/53552.aspx#documentation>  
(Erişim tarihi: 01.03.2018).

- Huang, Y. Y., Chung, T. W. ve Tzeng, T. W. (1997). Drug release from PLA/PEG microparticulates. *International Journal of pharmaceutics*, 156(1), 9-15.
- Jacquel, N., Lo, Chi-W., Wei, Yu-H., Wu, Ho-S. ve Wang, S. S. (2008). Isolation and Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal Of Bacteriology*, 3195–3202 191/10.
- Jäschke, A., Fürste, J. P., Nordhoff, E., Hillenkamp, F., Cech, D. ve Erdmann, V. A. (1994). Synthesis and properties of oligodeoxyribonucleotide—polyethylene glycol conjugates. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4810–4817. doi:10.1093/nar/22.22.4810
- Joe, B., Vijaykumar, M. ve Lokesh, B.R. (2004). Biological Properties of Curcumin- Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 97–111.
- Junyu, Z., Shishatskaya, E., I., Volova, T., G., Ferreira da Silva, L. ve Chen, G., Q. (2018). Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Material Science and Engineering C Material Biological Applications.*, 1(86), 144-150.
- Kathiraser, Y., Aroua, M., K., Ramachandran, K., B. ve Tan, I., K., P. (2007). Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 847–855.
- Keshavarz , T., ve Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current opinion in microbiology*, 13, 321-326.
- Khanna, S. ve Srivastava A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607–619.
- Kim, T. H., Jiang, H. H., Youn, Y. S., Park, C. W., Tak, K. K., Lee, S. ve Lee, K. C. (2011). Preparation and characterization of water-soluble albumin-bound curcumin nanoparticles with improved antitumor activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 17,403, 285–291.
- Kim, Y. B. ve Lenz, R. W. (2001). Polyesters from Microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 70.

- Kourmentza, C., Placido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N. ve Reis, M. A. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4, 55, 4-43
- Kroumova, A. B., Wagner, G. J. ve Davies, H. (2002). Biochemical observations on medium-chain-length polyhydroxyalkanoate biosynthesis and accumulation in *Pseudomonas mendocina*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 405, 95-103.
- Kunasundari, B., ve Sudesh, K. (2011). Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Malaysia Polymer Letters*, 5(7), 620-634.
- Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S. ve Aggarwal, B. B. (2017). Curcumin, The Golden Nutraceutical: Multitargeting for Multiple Chronic Diseases. *British Journal of Pharmacology*. 174, 11, 1325-1348.
- Kurtoğlu, A. H. ve Karataş, A. (2009). Yara Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar: Modern Yara Örtüleri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38, 3, 211-232.
- Langer, R. (1998). Drug delivery and targeting. *NATURE-LONDON*-, 5-10.
- Lemoigne M. (1926). Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Bulletin de la Société de chimie biologique*. 8, 770-782.
- Lenz, R. W., Kim, Y. W., ve Fuller, R. C. (1992). Production of unusual bacterial polyesters by *Pseudomonas oleovorans* through cometabolism. *FEMS Microbiology. Rev.*, 103, 207-214.
- Li, X., Ye, X., Qi, J., Fan, R., Gao, X., Wu, Y. ve Guo, G. (2016). EGF and curcumin co-encapsulated nanoparticle/hydrogel system as potent skin regeneration agent. *International Journal of Nanomedicine*, 17, 11, 3993-4009.
- Li, Y. (2016). Investigation of the effects of curing and casting methods on the physicochemical properties of polymeric coating systems. University of Iowa.
- Li, Z. ve Loh, X. J. (2015). Water soluble polyhydroxyalkanoates: future materials for therapeutic applications. *Chemical Society Reviews*, 44(10), 2865-2879.
- Lundvig, D. M., Pennings, S. W., Brouwer, K. M., Mtaya-Mlangwa, M., Mugonzibwa, E., Kuijpers-Jagtman, A. M., ... & Von den Hoff, J. W. (2015). Cytoprotective

- responses in HaCaT keratinocytes exposed to high doses of curcumin. *Experimental cell research*, 336(2), 298-307.
- Maestro, M. ve Sanz., J.M. (2017). Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1323-1337.
- Magalhães, P., Lopes, A., M., Mazzola, P., G., Rangel-Yagui, C., Penna, T., C., V. ve Jr. Pessoa, A. (2007). Methods of Endotoxin Removal from Biological Preparations: a Review. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 10 (3): 388-404.
- Mahmood, K., Zia, K. M., Zuber, M., Salman, M. ve Anjum, M. N. (2015). Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 877-890.
- Marois, Y., Zhang, Z., Vert, M., Deng, X., Lenz, R. ve Guidoin, R. (2000). Mechanism and rate of degradation of polyhydroxyoctanoate films in aqueous media: A long-term *in vitro* study. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 49(2), 216-224.
- Mercan, N. ve Beyatlı, Y. (2004). Bakteriyal Biyoplastikler ve Kullanım Potansiyelleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(4), 2-18
- Mezzina, P. ve Pettinari, M.J. (2016). Phasins, the multifacetic polyhydroxyalkanoate granule associated proteins. *Applied Environmental Microbiology*, 15;82(17):5060-7.
- Mohammadi, M., Hassan, M. A., Phang, L. Y., Shirai, Y., Che Man, H., Ariffin, H. ve Syairah, S. N. (2012). Efficient Polyhydroxyalkanoate recovery from recombinant *Cupriavidus necator* by using low concentration of NaOH. *Environmental Engineering Science*, 29(8), 783-789.
- Mohanty, C. ve Sahoo, S. K. (2017). Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today*. 22, 10, 1582-1592.

- Mohanty, C. ve Sahoo, S. K. (2017). Curcumin and its topical formulations for wound healing applications. *Drug Discovery Today*, 22(10), 1582-1592.
- Nabavi, S. F., Daglia, M., Moghaddam, A. H., Habtemariam, S. ve Nabavi, S. M. (2014). Curcumin and Liver Disease: from Chemistry to Medicine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13, 1, 62-77.
- Nguyen, M. P., Namgoong, H. ve Kim, Y. H. (2019). Applications of different solvents and conditions for differential extraction of lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria. *Journal of Microbiology*, 1-11.
- Nigmatullin, R., Thomas, P., Lukasiewicz, B., Puthussery, H. ve Roy, I. (2015). Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, 90, 1209–1221.
- Ojumu, T.V., Yu, J. Ve Solomon, B.O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*, 3, 18-24.
- Okur, N. Ü., Hökenek, N., Okur, M. E., Ayla, Ş., Yoltaş, A., Sifaka, P. I. ve Cevher, E. (2019). An alternative approach to wound healing field; new composite films from natural polymers for mupirocin dermal delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(5), 738-752.
- Ong, S.Y., Chee, J.Y. ve Sudesh, K. (2017). Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review *Journal of Siberian Federal University*, 10(2), 211-225.
- Papaneophytou, C., Katsipis, G., Halevas, E. ve Pantazaki, A. A. (2019). Polyhydroxyalkanoates applications in drug carriers. In *Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates* (pp. 77-124). Springer, Singapore.
- Parlane, N.A., Gupta, S.K., Reyes, P.R., Chen, S., Miro, M.G., Wedlock D.N. ve Rehm, B.H.A. (2016). Self-assembled protein-coated polyhydroxyalkanoate beads: properties and biomedical applications *ACS Biomaterial Science Engineering*, 3(12), 3047-3057.
- Peptu, C. ve Kowalczyk, M. (2018). Biomass-derived polyhydroxyalkanoates: Biomedical applications. In *Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value* (pp. 271-313).

- Philip, S., Keshavarz T. ve Roy I. (2007). Review Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82, 233–247.
- Pouton, C.W. ve Akhtarb, S. (1996). Biosynthetic polyhydroxyalkanoates delivery and their potential in drug. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18, 133-162.
- Prada, A. L., Keita, H., de Souza, T. P., Lima, E. S., Acho, L. D. R., da Silva, M. D. J.A., ve Amado, J. R. R. (2019). Cassia grandis Lf nanodispersion is a hypoglycemic product with a potent  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase inhibitor effect. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(2), 191-199.
- Pradhan, M., Srivastava, S., Singh, D., Saraf, S., Saraf, S. ve Singh, M.R. (2018). Perspectives of Lipid-Based Drug Carrier Systems for Transdermal Delivery. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 35(4):331–367.
- Qu, X. H., Wu, Q., Liang, J., Zou, B. ve Chen, G. Q. (2006a). Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3hydroxybutyrate-co-3hydroxyhexanoate) on *in vitro* growth and differentiation of smooth muscle cells. *Biomaterials*, 27, 2944-2950.
- Qu, X. H., Wu, Q., Zhang, K. Y. ve Chen, G. Q. (2006b). *In vivo* studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions. *Biomaterials*, 27, 3540-3548.
- Raetz, C.R.H. ve Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. Review. *Biochemistry*, 71, 635–700.
- Rai, R. (2010). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and its medical applications (Doctoral dissertation, University of Westminster).
- Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J., Boccaccini, A. ve Roy, I. (2011a). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical. *Materials Science and Engineering*, 72, 29-47.
- Rai, R., Roether, J. A., Knowles, J. C., Mordan, N., Salih, V., Locke, I. C. ve Roy, I. (2017). Highly elastomeric poly(3hydroxyoctanoate) based natural polymer

- composite for enhanced keratinocyte regeneration. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66,7, 326-335
- Rai, R., Yunos, D. M., Boccaccini, A.R., Knowles, J.C., Barker, I.A., Howdle, S.M., Tredwell, G.D., Keshavarz, T. ve Roy, I. (2011b). Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a Medium Chain Length Polyhydroxyalcanoate Homopolymer from *Pseudomonas mendocina*. *Biomacromolecules*, 12, 2126-2136.
- Ramsay, J. A., Berger, E., Ramsay, B. A., ve Chavarie, C. (1990). Recovery of Poly-3-Hydroxyalpoic Acid Granules by a Surfactant-Hypochlorite Treatment. *Biotechnology Techniques*, 4, 4, 221-226.
- Rancan, F., Blume-Peytani, F. ve Vogt, A. (2014). Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 23–34.
- Ray, S. ve Kalia, V., C. (2017). Biomedical Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Indian Journal of Microbiology*. 57(3), 261–269.
- Raza, A. Z., Abida, S. ve Banatb, I., M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and application. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 126, 45–56.
- Raza, A. Z., Riaz, S. ve Banat, İ.M. (2017). Polyhydroxyalkanoates: Properties and chemical modification approaches for their functionalization. *Formulation and Engineering of Biomaterials*, 34(1), 29-41.
- Reddy, C.S.K., Ghai, R. ve Kalia R.V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87, 137–146.
- Reinke, J. M. ve Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43.
- Renard, E., Timbart, L., Vergnol, G. ve Langlois, V. (2010). Role of carboxyl pendant groups of medium chain length poly (3-hydroxyalkanoate) s in biomedical temporary applications. *Journal of applied polymer science*, 117(4), 1888-1896.
- Robinson, D.H. ve Mauger, J.W. Drug delivery systems, *American journal of hospital pharmacy*, 48, 14-23, 1991.

- Rohman, G. (2017). Biodegradable Polymers: Recent Developments and New Perspectives. International Association of Physical Chemists.
- Roy, I. ve Visakh, P. M. (Eds.). (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA) based blends, composites and nanocomposites (Vol. 30). Royal Society of Chemistry.
- Sagong, Hye-Y., Son, H.F., Choi, S.Y., Lee, S.Y. ve Kim, Kyung-J. (2018). Structural Insights into Polyhydroxyalkanoates Biosynthesis. Trends in Biochemical Sciences, 16.
- Schroll, G., Denner, E. B., Rijlleke, S., Lubitz, W. ve Busse, H.J. (1996). Characterization of a new *Pseudomonas* isolate, capable of accumulating polyesters of medium chain length 3-hydroxyalkanoic acids. Journal of Biotechnology, 47, 53-63
- Senthilkumar, P., Dawn, S.S., Sree Samanvitha, K., Sanjay Kumar, S., Narendra kumar, G. ve 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.
- Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A. ve Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. Biotechnology Advances, 26, 246–265.
- Shishatskaya, E. I., Nikolaeva, E. D., Vinogradova, O. N. ve Volova, T. G. (2016) Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 27(11).
- Shishatskaya, E., I., Nikolaeva, E., D., Vinogradova, O., N. ve Volova, T., G. (2016). Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. Biomaterials Synthesis And Characterization, 27,165, 1-16.
- Shomea, S., Talukdar, A. D., Choudhury, M. D., Bhattacharya, M. K. ve Upadhyaya, H. (2016). Curcumin as potential therapeutic natural product: a nanobiotechnological perspective. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 68, 12, 1481-1500.
- Shrivastav, A., Kim, H., Y., ve Kim, Y., R. (2013). Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, 1-12.

- Simion, V., Stan, D., Gan, Ana-M., Pirvulescu, M. M., Butoi, E., Manduteanu, I., Deleanu, M., Andrei, E., Durdureanu-Angheluta, A., Bota, M., Enachescu, M., Calin, M. ve Simionescu, M. (2013). Development of curcumin-loaded poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) nanoparticles as anti-inflammatory carriers to human-activated endothelial cells. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(2).
- Sofińska, K., Barbasz, J., Witko, T., Dryzek, J., Haraźna, K., Witko, M. ve Guzik, M. (2019). Structural, topographical, and mechanical characteristics of purified polyhydroxyoctanoate polymer. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(4), 47192.
- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C. ve Zheng, Z. (2018). Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Desing, Development of Theraphy*, 12, 3117-3145.
- Sparks, J. ve Scholz, C. (2008). Synthesis and characterization of a cationic poly ( $\beta$ -hydroxyalkanoate). *Biomacromolecules*, 9(8), 2091-2096.
- Sudesh, K., Abe, H., ve Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25, 1503-1555.
- Svenson, S. (2004). Chapter 1, Carrier-Based Drug Delivery. *Dendritic NanoTechnologies*, 2-23.
- Tamahkar, E. (2017). Poli (Bütülenadipat-ko-Tereftalat)(PBAT) Mikro ve Nanopartiküller: Sentez, Karakterizasyon ve Kurkumin Salım Kinetiğinin İncelenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Tan, G., Y., Chen, C., L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I., M., N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y. ve Wang, J., Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6, 706-754.
- Thangapazham, R. L., Sharad, S. ve Maheshwari, R. K. (2013). Skin Regenerative Potentials of Curcumin. *BioFactors*, 39,1, 141–149
- The future of plastic. (2018). *Nature Communication*. 9(1):2157.

- Thorat Gadgil, B., S., Killi, N. ve Rathna, G. V.N. (2017). Polyhydroxyalkanoates as biomaterials. *Med. Chem. Commun.*, 8, 1774.
- Tian, W., Hong, K., Chen, G. Q., Wu, Q., Zhang, R. ve Huang, W. (2000). Production of polyesters consisting of medium chain length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas mendocina* 0806 from various carbon sources. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, 31–36.
- Todar, K. (2008-2012). Bacterial Endotoxin. *Todar's Online Textbook*, [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net) (Erişim tarihi:10.12.2019).
- Tong, W. Y., bin Abdullah, A. Y. K., binti Rozman, N. A. S., bin Wahid, M. I. A., Hossain, M. S., Ring, L. C. ve Tan, W.-N. (2017). Antimicrobial wound dressing film utilizing cellulose nanocrystal as drug delivery system for curcumin. *Cellulose*, 25(1), 631–638.
- Tüylek, Z., (2017). İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim, *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89-98.
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M. ve Seeger, M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates, *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 208–213.
- Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D. ve Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1437–1449.
- Vuksanović, J. M., Živković, E. M., Radović, I. R., Djordjević, B. D., Šerbanović, S. P., ve Kijevčanin, M. L. (2013). Experimental study and modelling of volumetric properties, viscosities and refractive indices of binary liquid mixtures benzene+ PEG 200/PEG 400 and toluene+ PEG 200/PEG 400. *Fluid Phase Equilibria*, 345, 28-44.
- Wallen, L. L. ve Rohwedder, W. K. (1974). Poly-beta-hydroxyalkanoate from Activated Sludge. *Environmental Science & Technology*. 8, 6, 576-579.

- Wang, W., Lu, K. J., Yu, C. H., Huang, Q. L. ve Du, Y. Z. (2019). Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. *Journal of nanobiotechnology*, 17(1), 82.
- Wang, Y., Chung, A. ve Chen, G.Q. (2017). Synthesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Homopolymers, Random Copolymers, and Block Copolymers by an Engineered Strain of *Pseudomonas entomophila*. *Adv. Healthcare Mater*, 1-10.
- Wathoni, N., Motoyama, K., Higashi, T., Okajima, M., Kaneko, T. ve Arima, H. (2017). Enhancement of curcumin wound healing ability by complexation with 2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin in sacran hydrogel film. *International journal of biological macromolecules*, 98, 268-276.
- Witko, T., Solarz, D., Feliksiak, K., Harażna, K., Rajfur, Z. ve Guzik, M. (2020). Insights into In Vitro Wound Closure on Two Biopolyesters Polylactide and Polyhydroxyoctanoate. *Materials*, 13(12), 2793.
- Yates, M. R., ve Barlow, C. Y. (2013). Life cycle assessments of biodegradable, commercial biopolymers, A critical review. *Resources, Conservation and Recycling*, 78, 54–66.
- Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y. (2003). Biyoplastik: Poli- $\beta$ -Hidroksibütirat (PHB). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1,109,1-33.
- Zgurskaya, H.I., López, C.A. ve Gnanakaran, S. (2015). Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS infectious diseases*, 1, 512–522.
- Zinn, M., Witholt, B. ve Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 5–21.